



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

NEUROGENÉISIS EN LA CORRIENTE ROSTRAL
MIGRATORIA EN EL CEREBRO DE LA RATA
ADULTA: EVIDENCIA *in vivo*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
JULIETA GRISELDA MENDOZA TORREBLANCA

TUTOR:
DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
COMITÉ TUTORAL:
DRA. CLORINDA ÁRIAS ALVAREZ
DR. LUIS COVARRUBIAS ROBLES

MEXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi hijo Julio, por supuesto.

Agradezco al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por su legado de conocimiento; pero sobre todo, por su paciencia y camaradería; sin las cuales, este proyecto jamás se habría realizado. Gracias, me inspiras el mayor de los ímpetus.

A Miguel y Eduardo, incansables y dueños de las respuestas, centinelas seguros y amigos veraces.

A Rogelio, mi gran amor. Gracias por reconocerte a través de mí y por ser la fluorescencia más intensa en estos arduos meses finales.

A Julio, memoria ancestral de mi origen y conjurador de mis endemoniados días de ignorancia.

A mi madre: Josefina de mis mañanas y mis instantes, inspiradora de sueños recogidos al final en realidades de titanes. Infinitas gracias, no puedo pagar los años que has dedicado a mí, sólo puedo honrarte con todo lo que este trabajo pueda significar.

La presente investigación se realizó con fondos aportados por los proyectos de PAPIIT (1N210105) y CONACYT (38615N y 45872M). Fondos adicionales fueron proporcionados por IMPULSA 02 UNAM y por el programa de apoyos Integrales para la formación de Doctores en ciencias 2006, CONACYT (solicitud 53194).

También agradecemos a *Microbrightfield Inc* por el apoyo técnico y por donar el sistema de análisis de imágenes que fue usado para el estudio estereológico del presente trabajo.

Índice

Introducción	1
Hipótesis.....	6
Estrategia experimental.....	6
Objetivos particulares.....	6
Material y métodos.....	8
Animales	8
Grupos experimentales.....	8
Sentido y estructura de cada uno de los grupos	9
Procedimiento quirúrgico: Inserción de la barrera física (BF)	11
Marcaje con fluoroesferas	12
Marcaje de BrdU	13
Obtención de las muestras.....	13
Inmunocitoquímicas (ICQ)	13
Conteo celular	15
Análisis estadístico.....	16
Resultados	18
Discusión.....	30
Apéndice	36
Zona subventricular.....	37
Corriente rostral migratoria.....	43
Bulbo olfatorio	44
Bibliografía	49

Introducción¹

La idea de que todas las neuronas del Sistema Nervioso Central de los mamíferos se producían antes del nacimiento prevaleció hasta finales del siglo XX.² El predominio de esta concepción se debió principalmente a que se pensaba que la configuración del cerebro, una vez establecida, era demasiado elaborada para dar cabida al reemplazo neuronal. Además, las técnicas utilizadas en esa época sólo permitían identificar a las neuronas maduras del cerebro adulto (Gross, 2000; Nicholls y Nicholls, 2001). Quizá, el arraigo a esta concepción explica porqué los artículos sobre la neurogénesis adulta publicados a principios del siglo XX (Allen, 1912; Sugita, 1918), así como aquéllos publicados en la década de los sesentas, tuvieron poco reconocimiento por parte de la comunidad neurocientífica. Aun cuando, en estos últimos, se consiguió un importante avance al demostrarse, con una nueva técnica de marcaje de proliferación celular³, el nacimiento de nuevas neuronas en una variedad de estructuras que incluían al bulbo olfatorio, el hipocampo y la corteza cerebral de la rata adulta (Altman y Das, 1965, 1966; Altman, 1969).⁴

Fue hasta después de 1990, por tres eventos fundamentales, que se reconoció ampliamente que nuevas neuronas se generaban e integraban en el cerebro adulto (Kornack y Rakic^b, 2001; Bedard y Parent, 2004; Sanai, *et al.*, 2004). El primero se debió a la demostración de la neurogénesis en los canarios adultos; aunque en un

¹ Para facilitar la comprensión de este apartado, hay al final un apéndice con la descripción detallada de las estructuras y los componentes de la zona subventricular, la corriente rostral migratoria y el bulbo olfatorio.

² Aunque se sabía que los astrocitos y oligodendrocitos conservaban su capacidad de división en el cerebro adulto y que eran capaces de responder a lesiones aumentando su proliferación (Nicholls y Nicholls, 2001).

³ La técnica de marcaje de proliferación celular con timidina tritiada que se intercala en las cadenas del ácido desoxirribonucleico (ADN) durante la fase S del ciclo celular.

⁴ Además, tiempo después, al conjugarse el marcaje de proliferación celular con la microscopía electrónica, se pudieron observar las dendritas y sinapsis de las nuevas neuronas (Kaplan y Hinds, 1977; Kaplan, 1981).

principio se pensó que esto era irrelevante para el mamífero, esos experimentos fueron la piedra angular para las investigaciones futuras (Gross, 2000; Nottebohm, 2002). El segundo fue la construcción de un modelo que explicaba el origen celular y las rutas de migración de las nuevas neuronas en los roedores y primates (Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Luskin, 1993; Morshead, *et al.*, 1994; Kornack y Rakic, 1999; Gage, 2002).⁵ El tercero fue la demostración de que la neurogénesis adulta podía ser regulada, al menos en el hipocampo, por factores tales como estrés, complejidad ambiental y aprendizaje, y variación hormonal (Kempermann y Gage, 1999; Gross, 2000; Conover y Allen, 2002; Gould y Gross, 2002; Kempermann, 2002)

En la actualidad se acepta ampliamente que existen dos zonas del cerebro que producen nuevas neuronas; una de ellas se encuentra localizada en el giro dentado del hipocampo (Kempermann y Gage, 1999); y la otra, en las paredes de los ventrículos laterales, específicamente en la zona subventricular, (Conover y Allen, 2002). Las neuronas originadas en la capa subgranular del giro dentado (en su etapa de neuroblasto) migran y se diferencian en neuronas granulares en el mismo hipocampo (Kempermann y Gage, 1999). Las de la ZSV, que se mantienen proliferando, migran a su vez a lo largo de la corriente rostral migratoria (CRM) para llegar al bulbo olfatorio (BO), en donde se integran y se diferencian en las láminas granular y glomerular

⁵Para ello se aislaron y se cultivaron células con características de autorrenovación (la capacidad de proliferar *in vitro* bajo la influencia de factores de crecimiento y dar origen continuamente a otras células indiferenciadas) y multipotencia (la capacidad de dar origen a astrocitos, oligodendrocitos, y neuronas) que, se propuso, correspondían *in vivo* a las células troncales que daban origen a las nuevas neuronas (Morshead, *et al.*, 1994; Gage, 2002). Además, mediante la transfección de genes reporteros se trazaron las rutas de migración y por medio de un nuevo marcador de proliferación celular la 5-bromo-3'-desoxiuridina (BrdU) (que también se intercala en las cadenas de ADN en la fase S del ciclo celular) y marcadores específicos de linaje neuronal (por medio de anticuerpos dirigidos contra proteínas tales como doblecortina (DCX), β -tubulina III (reconocida por el anticuerpo TUJ1) y MAP-2 todas ellas asociadas a microtúbulos y que marcan estados comprometidos neuronales inmaduro, temprano y diferenciado respectivamente; asimismo contra la proteína NCAM marcador específico de neuroblasto (Gross, 2000; Cooper-Kuhn y Kuhn, 2002; Bedard y Parent, 2004) se tuvo un mayor grado de confiabilidad de que las células recién generadas eran neuronas; p. ej. (Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Luskin, 1993; Kornack y Rakic, 1999).

(figura1) (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch, *et al.*, 1997; Garcia-Verdugo, *et al.*, 1998; Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002; Gage, 2002; Winner, *et al.*, 2002). Asimismo, existen reportes que proponen que en la ZSV hay otros neuroblastos originados también allí aunque éstos migran y se integran a la corteza y a la sustancia *nigra* en roedores y primates (Altman, 1969; Kaplan, 1981; Gould, *et al.*, 1999; Zhao, *et al.*, 2003); pero debido a la discrepancia entre los resultados de experimentos reproducidos en diferentes laboratorios, no se acepta todavía que se puedan integrar neuronas a otros circuitos, especialmente en la corteza(Gould, *et al.*, 1999; Kornack y Rakic, 2001^a; Nottebohm, 2002; Rakic, 2002; Zhao, *et al.*, 2003; Frielingsdorf, *et al.*, 2004).

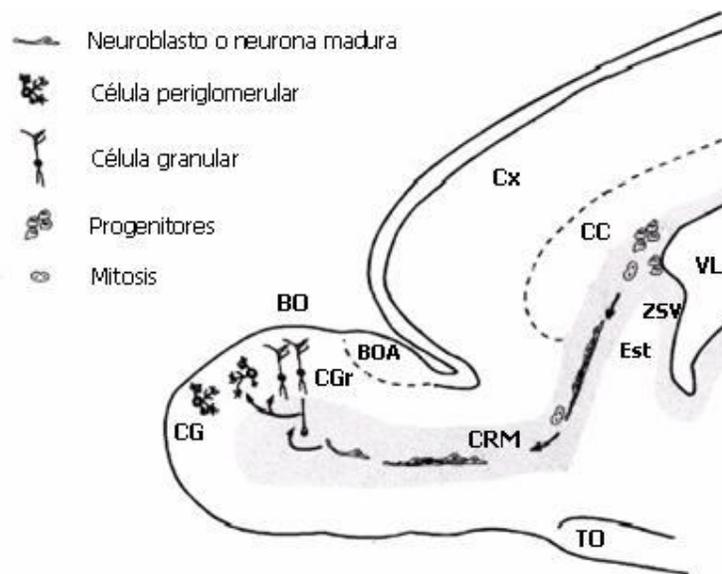


Figura 1. Representación esquemática del proceso de neurogénesis adulta de la zona subventricular (ZSV). Los neuroblastos que son producidos en la ZSV, se mantienen proliferando y migran a través de una vía restringida formada por una red tubular de astrocitos denominada corriente rostral migratoria (CRM) para alcanzar al bulbo olfatorio (BO) en donde se diferencian e integran a la capa granular (CGr) y glomerular (CG). Ventrículo lateral (VL); Estríado (Est); Cuerpo calloso (CC); Corteza (Cx); bulbo olfatorio accesorio (BOA); Tracto olfatorio (TO). Adaptado de (Menezes, *et al.*, 2002)

Por otra parte, también se ha sugerido que el eje ventricular, la médula espinal, el BO y la corriente rostral migratoria (CRM) contienen, como en el giro dentado del hipocampo y en la ZSV, células troncales residentes que pueden dar origen a nuevas neuronas (Weiss, *et al.*, 1996; Fukushima, *et al.*, 2002; Gritti, *et al.*, 2002; Hack, *et al.*, 2005). En el caso específico de la CRM originalmente se había postulado que era tan sólo la vía de paso que utilizaban los neuroblastos subventriculares en su camino al BO y que sólo las células troncales y las amplificadoras intermedias de la ZSV estaban implicadas en la generación de los neuroblastos que posteriormente se diferencian en neuronas granulares y periglomerulares. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que la realidad puede ser mucho más compleja.

Tomasiewicz, *et al.*, (1993) reportaron que en ratones deficientes de la molécula PSA-NCAM⁶ se detiene la migración rostral de las células subventriculares y se observa una acumulación de neuroblastos no sólo alrededor de la ZSV sino también en la CRM, esto podría indicar una generación local de progenitores proliferantes. Posteriormente, Craig *et al.*, (1999), en un experimento de doble marcaje con timidita tritiada y el retrovirus β -gal, mostraron que no obstante la gran cantidad de células activamente proliferantes que se pueden observar en la CRM sólo una pequeña proporción (6.5%) pertenece a las células generadas en el ventrículo lateral cuando están migrando en ruta hacia el BO. Subsiguientemente, Gritti *et al.*, (2002) aislaron neuroesferas (presumiblemente células troncales) de la CRM de animales cuyos neuroblastos subventriculares habían sido eliminados mediante un inhibidor de la mitosis denominado citosina-arabínica. Por su parte, Smith y Luskin (1998) y Hack *et al.*, (2005) encontraron que cuando se marcan con retrovirus las células ubicadas en el “codo” de la CRM aumenta el número de

⁶ La proteína NCAM es sintetizada por los neuroblastos en forma poliasilada y esta intrínsecamente relacionada con la migración celular (Gross, 2000; Cooper-Kuhn y Kuhn, 2002; Bedard y Parent, 2004).

interneuronas que llegan a la capa glomerular, lo que sugiere que, al menos en la CRM, los precursores neuronales están comprometidos a generar un solo tipo celular. Hack *et al.*, (2005) también observan que el 50% de las células periglomerulares llegan a la capa glomerular 3 días después del marcaje celular sistémico con BrdU, lo que concordaría con un nacimiento celular en una región más cercana que la ZSV. En conclusión y con base en estos datos, se ha sugerido que existen células troncales residentes en la CRM generadoras de progenitores neuronales proliferantes periglomerulares predominante o exclusivamente.

No obstante los experimentos anteriores, el continuo tránsito y proliferación de los neuroblastos de la ZSV a través de la CRM han dificultado la confirmación tanto de la existencia de las células troncales residentes como del tipo neuronal que generan. Por eso, los objetivos de este estudio fueron: determinar si la CRM genera neuroblastos a partir de células troncales residentes, establecer si estos neuroblastos migran, y mostrar a qué capa del BO se integran. Para ello, diseñamos un modelo experimental en el cual la migración de los neuroblastos provenientes de la ZSV es interrumpida por medio de una barrera física que separa completamente el polo anterior del lóbulo frontal y el BO del resto del telencéfalo.

Hipótesis

Existen células troncales residentes en la corriente rostral migratoria que generan predominantemente neuronas periglomerulares.

Estrategia experimental

Los objetivos particulares que se describirán a continuación se llevaron a cabo para: 1) Permitir la observación y estudio de la posible generación neuronal en la CRM sin la presencia de los neuroblastos de origen subventricular; 2) Establecer si la operación o la inserción de la BF tiene un efecto en el peso corporal de los animales; 3) Determinar si existe producción de neuroblastos en la CRM y ver el efecto de la manipulación experimental en la cantidad producida; 4) Investigar la cantidad neuroblastos generados en la CRM a lo largo del tiempo tomando como referencia tres periodos (12, 46, y 108 días, después de la inserción de la BF); 5) Estudiar si los neuroblastos generados en la CRM, como los producidos en la ZSV, mantienen la capacidad de proliferar. 6) Ubicar a las probables células troncales residentes en la CRM; 7) Definir si los neuroblastos generados en la CRM migran y a qué capa del BO se integran.

Objetivos particulares

1. Bloquear la migración de los neuroblastos originados en la ZSV por medio de la inserción de una barrera física al inicio de la CRM en ratas macho adultas¹
2. Registrar cambios en el peso corporal en las ratas control, en las implantadas con barrera física (BF), y en las operadas falsamente (*sham*)²

¹ Con base en el tiempo de cicatrización de la herida en la cabeza y el tiempo que necesitan los neuroblastos migratorios que se encuentran en la CRM para llegar al BO (Hack, *et al.*, 2005). Se tomó un periodo de recuperación de 12 días en todos los grupos experimentales.

² Ver el apartado de Grupos experimentales en el capítulo de Material y métodos.

3. Establecer la efectividad de la BF para impedir el tránsito de los neuroblastos subventriculares a través de la CRM
4. Documentar la presencia de neuroblastos en la CRM y cuantificar su número en la CRM, en los animales de los grupos control, implantados con BF y *sham*, 46 días después de la operación de los dos primeros,³ mediante las técnicas de inmunocitoquímica (ICQ) para doblecortina (DCX)⁴, microscopia de campo claro y estereología.
5. Contar el número de neuroblastos localizados en la CRM en los animales control y en los implantados a los 12 días⁵ y 108 días⁶ después de la inserción de la BF en el segundo grupo, mediante las técnicas de ICQ para DCX, microscopia de campo claro y estereología.
6. Determinar, por medio de las técnicas de ICQ para BrdU, microscopia de campo claro y estereología, el número de células que están proliferando constantemente en la CRM de los animales control y en los implantados con BF, que fueron inyectados con una sola dosis de 5'-bromo-3'-desoxiuridina (BrdU)⁷, doce días después de implantada la BF, y sacrificados 2 horas después de la inyección.
7. Contar, por medio de las técnicas de ICQ para BrdU, microscopia de campo claro y estereología, el número de células BrdU localizadas en la CRM, en las capas granular (CGr) y glomerular (CG) del BO de los animales control y BF,

³ 12 días de recuperación, 4 días de tratamiento con BrdU (ver abajo y material y métodos) y 30 días después.

⁴ La doblecortina es una proteína de citoesqueleto que sólo se detecta en los neuroblastos entre los 2 y 10 días después del nacimiento celular. Esta proteína auxilia el proceso de migración neuronal regulando la organización y estabilidad de los microtúbulos (Cooper-Kuhn y Kuhn, 2002)

⁵ Sólo se permitió el tiempo de recuperación

⁶ 12 días de recuperación, 6 días de tratamiento con BrdU (ver abajo y material y métodos) y tres meses después

⁷ La 5-bromo-3'-desoxiuridina (BrdU) es un marcador de proliferación celular que se intercala en las cadenas de ADN en la fase S del ciclo celular (Nowakowski, *et al.*, 1989).

que fueron inyectados con cuatro dosis de BrdU y sacrificados 46 días después de implantada la barrera.

Material y métodos

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* (300-350grs de peso corporal), las cuales se mantuvieron con iluminación (7:00a.m.- 6:00 p.m. de luz), temperatura (22°C) y humedad controlada, y con acceso libre a comida (Beta Chip, Nepco) y agua (deionizada adicionada con ácido clorhídrico (10ml/25l)). Todos los procedimientos y los protocolos de experimentación fueron aprobados por el comité local para uso y cuidado de los animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Grupos experimentales

En la tabla 1, se muestran los diferentes grupos de animales y un resumen de las condiciones experimentales, las regiones del cerebro estudiadas y los datos que se buscaron en cada uno de ellos.

Se utilizó, además, otro grupo cuyas células subventriculares fueron marcadas con fluoresferas.

Tabla 1. Descripción general de los grupos de animales, las condiciones experimentales y las regiones del cerebro estudiadas en los diferentes grupos. Corriente rostral migratoria (CRM), Capa granular (CGr), CG (Capa glomerular), Bulbo olfatorio (BO).

Grupo experimental	Protocolo de administración de BrdU	ICQ	Región conteo celular	Dato que se buscó
C/12	1 dosis 2 horas antes del sacrificio	BrdU/DCX	CRM	Número de células en constante proliferación y número de neuroblastos
BF/12	“ “	BrdU/DCX	CRM	“ “
C/46 ^a	Una dosis diaria, durante 4 días, 30 días antes del sacrificio	BrdU/DCX	CRM	Número de células de lenta proliferación y número de neuroblastos
BF/46 ^a	“ “	BrdU/DCX	CRM	“ “
Sham/46	“ “	BrdU/DCX	CRM	Número de neuroblastos
C/46 ^b	Una dosis diaria, durante 4 días, 30 días antes del sacrificio ¹	BrdU	CGr y CG	Número de células marcadas que llegaron al BO
BF/46 ^b	“ “	BrdU	CGr y CG	“ “
C/108	Una dosis diaria, durante 6 días, 30 días antes del sacrificio ²	DCX	CRM	Número de neuroblastos
BF/108	“ “	DCX	CRM	“

Sentido y estructura de cada uno de los grupos

Para determinar y evaluar la producción de nuevas neuronas (células DCX-IR) en la CRM, en un principio, se usaron 17 ratas divididas en tres grupos: A los animales agrupados en el primero de ellos, denominado BF/46^a (n=6) (y a todos los implantados

¹ La doble inmunocitoquímica (ICQ) BrdU/DCX dificulta el conteo de las células BrdU-IR en el BO, por ello se dividieron los grupos y en el segundo sólo se realizó la ICQ para BrdU

² Por razones de tiempo ya no se incluyeron en este documento los resultados de las células BrdU-IR de estos dos últimos grupos.

con BF), se les insertó una BF cerca del inicio de la CRM (ver abajo y figura 3b). Esta maniobra, separó enteramente el polo frontal y el BO del resto del cerebro. Al los animales del segundo grupo, llamado sham/46 (n=4), se les efectuó la misma manipulación quirúrgica que al primero pero no se les insertó la BF. A los animales del tercer grupo, nombrado C/46^a (n=7)³, no se les sometió a ninguna manipulación quirúrgica. Además, para identificar a las probables células troncales residentes en la CRM, a los tres grupos de animales se les aplicó un tratamiento sistémico de BrdU, una dosis durante 4 días, doce días después de la operación de los dos primeros grupos. Treinta días después de la última aplicación de BrdU, todos los animales fueron sacrificados y sus cerebros fueron procesados para la doble ICQ contra BrdU/DCX y las células inmunoreactivas para doblecortina (DCX-IR) e inmunoreactivas para BrdU (BrdU-IR)⁴ fueron contadas por estereología. Los pesos de los tres grupos de animales fueron registrados durante 6 semanas.

A continuación, para establecer la efectividad de la BF para impedir el tránsito de los neuroblastos subventriculares a través de la CRM se utilizaron dos grupos de animales uno control (n=4) y uno con BF (n=5). Doce días después del implante en el grupo BF, en ambos grupos se marcaron a los neuroblastos subventriculares con fluoroesferas y 15 días después se evaluó la migración de los neuroblastos a través de la CRM.

Posteriormente, con el objetivo de cuantificar el número de neuroblastos localizados en la CRM a lo largo del tiempo, se añadieron dos grupos de animales más, uno control (C/12; n=6) y otro implantado con BF (BF/12; n=5). Pero además, para observar si los neuroblastos mantenían la capacidad de proliferar, a todos los animales se les aplicó una

³ La diferencia en la *n* de los grupos es porque no a todos los animales se les implantó correctamente la BF, cuando esto sucedía se descartaban en el conteo celular.

⁴ Al observar que no hubo diferencias significativas entre el número de neuroblastos localizados en la CRM de los animales control y sham, se decidió trabajar sólo con los grupos control e implantados. Es por ello que sólo se contaron a las células DCX-IR en el grupo sham 46

dosis de BrdU, doce días después de realizado el implante de la BF en el grupo correspondiente, dos horas antes del sacrificio. Las muestras fueron recolectadas y procesadas para la doble ICQ BrdU/DCX y las células DCX-IR y BrdU-IR, localizadas en la CRM, fueron contadas por estereología.

A continuación se amplió el análisis temporal de la cantidad neuroblastos en la CRM con dos grupos más uno control (C/108; n=6) y otro con BF (BF/108; n=6). Estos animales fueron sacrificados 108 días después de la operación del grupo BF y sus cerebros fueron procesados para la ICQ contra DCX y las células fueron contadas por estereología.

Finalmente, para establecer a que capa del BO se integraban la células BrdU-IR generadas en la CRM se utilizaron 12 animales más divididos en dos grupos C/46^b (n=6) y BF/46^b (n=7). Los animales de estos grupos, fueron inyectados con cuatro dosis de BrdU, una diaria (doce días después del implante en los animales BF), y sacrificados 30 días después de la última inyección⁵. Las muestras fueron procesadas para la ICQ contra BrdU y las células BrdU-IR fueron contadas en la CRM, capa granular (CGr) y glomerular (CG) del BO.

Procedimiento quirúrgico: Inserción de la barrera física (BF)

Los animales de los grupos implantados con BF fueron anestesiados con un vaporizador de halotano (Vapor 19.1, Plarre) (que mantiene el suministro constante de anestesia) y montados en un aparato estereotáxico. Una vez fijada en el aparato, la cabeza fue lavada y rasurada. Entonces, con un bisturí se realizó una incisión medial de 2 centímetros de longitud aproximadamente, se reflejo el músculo temporal y se efectuó con un taladro

⁵ Se decidió aplicar 4 dosis de BrdU debido a la lenta proliferación de las células troncales (28 días aproximadamente en la ZSV; (Morshead, *et al.*, 1994) y se esperó un mes para que las células marcadas sistémicamente con BrdU, terminaran su proceso de migración en la CRM, y diferenciación e integración en el BO (Winner, *et al.*, 2002).

(Modelo 770, Dremel Multipro 7.2V) una craneotomía transversal (AP:2.5mm de Bregma) cuya longitud abarcó la extensión correspondiente al hemisferio derecho. Hecha la craneotomía, se introdujo a través de ella una lámina estéril de polipropileno (4mm de ancho, 6mm de alto, 60-80 μ m de grosor) hasta alcanzar la parte ventral del cerebro. Una vez realizada la implantación, se controló la hemorragia por compresión suave con un algodón y se suturó la piel (Atramat 3.0). Finalmente, se aplicó violeta de genciana tópicamente sobre la herida, y se administró intraperitonealmente un antibiótico (Baytril 5%; Bayer) para prevenir infecciones postoperatorias.

Marcaje con fluoroesferas

Doce días después del implante de la BF, todos los animales (control y BF) fueron anestesiados con halotano y montados en un aparato estereotáxico. Una vez fijada la cabeza en el aparato, fue lavada y rasurada. Entonces, con un bisturí se realizó una incisión medial de 2 centímetros de longitud aproximadamente, se reflejó el músculo temporal y se hizo un orificio (con un taladro modelo 770, Dremel Multipro 7.2V) (AP:0.0; L:1.1mm de Bregma) por donde se insertó una aguja (7758-02, Hamilton) (DV:4.5mm de Bregma) que sirvió para administrar 5 μ l de fluoroesferas diluidas al 10% en agua estéril (Red-orange 0.04 μ m, Fluospheres fluorescent color kit, Molecular probes). Al término de esta maniobra se mantuvo introducida la aguja durante 5 minutos más para evitar el regreso de las fluoroesferas, y se retiró la aguja, se limpió el orificio con un algodón y se suturó la piel (Atramat 3.0). Finalmente, se aplicó violeta de genciana tópicamente sobre la herida, y se administró intraperitonealmente un antibiótico (Baytril 5%; Bayer) para prevenir infecciones postoperatorias.

Marcaje de BrdU

Para marcar a las células en proliferación, se inyectó 5'-bromo-3'-deoxiuridina (BrdU; Sigma, St. Louis, MO, USA) intraperitonealmente a una dosis de 50µg/g de peso de acuerdo a los protocolos descritos en la tabla 1.

Obtención de las muestras

Los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital sódico (140mg/kg de peso), y perfundidos a través del corazón, primero con una solución salina (0.9%) y luego con paraformaldehído (4%) amortiguado con fosfatos (PB 0.1M; pH 7.4). Después, con una guillotina se decapitaron y sus cerebros fueron disecados y posfijados a temperatura ambiente durante 12 horas en el mismo fijador. Terminado ese plazo, se les transfirió a soluciones crioprotectoras constituidas por sacarosa (20% y 30%) hasta que se infiltraron completamente. Posteriormente, los cerebros fueron congelados en 4-metilbutano preenfriado con hielo seco, y se almacenaron a hasta su uso (-74°C). Finalmente, se realizaron cortes sagitales seriados del hemisferio derecho (60µm de grosor) con un criostato y se colectaron en cajas de cultivo de 24 pozos llenos de amortiguador de fosfatos (PB 0.1M; pH 7.4).

Inmunocitoquímicas (ICQ)

Se estandarizaron las ICQ sencilla para DCX y doble para DCX-BrdU. Todo el proceso se realizó por flotación y a temperatura ambiente. Algunos lavados se llevaron a cabo con amortiguador de fosfatos (PB 0.1M; pH 7.4) y otros con amortiguador de fosfatos adicionado con tritón (PBT 0.1M; pH 7.4; tritón X-100, 0.3%). Cada lavado se repitió 3 veces durante 10 minutos. Los anticuerpos primarios utilizados fueron, un monoclonal dirigido contra-BrdU (1:500; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y un anticuerpo policlonal obtenido en cabra dirigido contra el carboxilo terminal de la DCX humana

(1:500; Santa Cruz, Santa Cruz, CA). Los anticuerpos secundarios biotinilados utilizados fueron, uno de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón (1:500; Chemicon, Temecula, CA) y otro de conejo anti-inmunoglobulinas de cabra (1:500; Chemicon); todos ellos se diluyeron con una solución de bloqueo constituida por suero de caballo (5%) en PBT. Para identificar y amplificar la señal del anticuerpo secundario se usó el complejo avidina-peroxidasa (Elite ABC kit, Vector, Burlingame, CA), y para revelar la actividad de peroxidasa se empleó el cromógeno 3,3-diamino-bencidina (DAB), con níquel para obtener una coloración negra y sin níquel para obtener una coloración café (Vector Laboratories). El substrato se utilizó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

El protocolo se inició incubando los cortes con peróxido de hidrógeno al 3% (Sigma) diluido en PBT durante 10 minutos. Los cortes se lavaron con PBT para ser después incubados en HCl (1N) a 37° C durante 30 minutos. Los cortes se enjuagaron por 10 minutos en una solución de borato de sodio (0.1M; pH 8.5), y se incubaron de nuevo en una solución desenmascaradora de antígenos (Immuno-retriver; Diagenocell) a 65° C por 30 minutos. Terminado el periodo, los cortes se dejaron reposar por 15 minutos más a temperatura ambiente. Una vez finalizado este procedimiento, los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios contra DCX, BrdU o DCX/BrdU durante una noche. Al día siguiente, en el caso de las ICQ sencillas para DCX o BrdU, los cortes fueron lavados nuevamente con PB y se incubaron con el anticuerpo secundario conejo anti-cabra ó cabra anti-ratón respectivamente por 2 horas. Después de los lavados, los cortes fueron incubados con avidina-peroxidasa durante 90 minutos. Nuevamente, después de los lavados, los cortes se incubaron con DAB (con níquel para DCX y sin níquel para BrdU) durante 4 minutos, la reacción fue detenida lavando los cortes en PB durante 10-15 minutos. En el caso de la doble ICQ, después de realizada la incubación

con los anticuerpos primarios juntos, al día siguiente, los cortes fueron lavados con PB y se incubaron con el anticuerpo monoclonal dirigido contra la BrdU durante 2 horas. Después de lavados, los cortes se incubaron con avidina-peroxidasa durante 90 minutos. Una vez más, los cortes se lavaron y después se incubaron con DAB más níquel durante 4 minutos. La reacción se detuvo lavando los cortes en PB durante 10-15 minutos. A continuación, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario conejo anti-cabra por 2 horas, seguido de una sesión de lavado con PB. Al término de ésta, los cortes se incubaron con avidina-peroxidasa durante 90 minutos, seguido de una sesión de lavado con PB. Por último, los cortes se incubaron con DAB sin níquel durante 4 minutos. La reacción se detuvo mediante un lavado con PB durante 10-15 minutos. Terminado el protocolo, los cortes se montaron en laminillas y en el caso de las muestras de los grupos C/12, BF/12, C/46^b Y BF/46^b las laminillas se contratiñeron con verde de metilo de acuerdo al protocolo suministrado por el proveedor (Vector Laboratories). Finalmente, las laminillas se montaron con cytooseal y se observaron en un microscopio de campo claro (Optiphot-2, Nikon) equipado con una cámara de video digital (Coolpix, Nikon).

Conteo celular

El conteo celular lo realizó el experimentador conforme se terminaban de procesar las muestras en los diferentes experimentos. El conteo de las células DCX-IR y BrdU-IR se realizó en la CRM, en la capa granular (CGr) y en la capa glomerular (CG) del BO. El conteo celular realizado en la CRM se extendió desde el “codo” hasta su entrada al BO antes de alcanzar a la capa granular (Ver figura 3^a y 3b). Para llevar a cabo el conteo, se utilizó un procedimiento sistemático al azar con una prueba denominada “fraccionador óptico” (West, *et al.*, 1991), en un equipo semiautomático de estereología (Stereoinvestigator, MicrobrightField, Colchester, VT, USA). El tamaño de los cuadros

de conteo, de las rejillas de muestreo y la periodicidad de las secciones para cada tipo celular en cada zona se presentan en el tabla 2. La altura de los cuadros de conteo fue de 15 μm y las zonas de guarda fueron de 2 μm arriba y debajo de éstos. Las células IR que intersecaron la zona de guarda superior así como las líneas laterales de exclusión no fueron incluidas en el conteo. El estimado del número total de células fue determinado por el programa de estereología *Stereoinvestigator 7* que considera el número de células contadas con relación al área de la región de interés trazada, y el promedio del grosor muestreado en múltiples zonas elegidas al azar. Todos los conteos se realizaron con un aumento de 100x, y la consistencia y confiabilidad de los mismos se determinaron estimando el coeficiente de error de Gundersen, el cual siempre fue menor o igual a 0.1.

Análisis estadístico

Los datos están expresados como el promedio \pm el error estándar (ES). Para comparar grupos equivalentes se utilizaron las pruebas t-Student (prueba de normalidad aprobada). Para realizar comparaciones múltiples se utilizó ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post-hoc* Holm-Sidack. Los niveles significativos se asumieron a $p < 0.05$.

Tabla 2 Dimensiones de los diferentes parámetros estereológicos utilizados en la estimación del número total de células DCX-IR y BrdU-IR en la corriente rostral migratoria (CRM), capa granular (CGr) y capa glomerular (CG) en el cerebro de ratas adultas

Grupo experimental	Región de conteo	Marcador celular	Cuadro de conteo	Rejilla espaciadora	Periodicidad de las secciones
C/12	CRM	DCX	25 X 25	150 X 150	2
		BrdU	45 X 35	130 X 130	1
BF/12	CRM	DCX	25 X 35	135 X 135	2
		BrdU	45 X 35	130 X 130	1
C/46 ^a	CRM	DCX	25 X 25	130 X 130	2
	CRM	BrdU	45 X 35	55 X 55	2
BF/46 ^a	CRM	DCX	25 X 25	120 X 120	2
	CRM	BrdU	45 X 35	50 X 50	2
Sham/46	CRM	DCX	25 X 25	120 X 120	2
C/46 ^b	CGr	BrdU	25 X 25	300 X 300	4
	CG	BrdU	45 X 35	150 X 150	5
BF/46 ^b	CGr	BrdU	25 X 25	100 X 100 160 X 160	4
	CG	BrdU	45 X 35	140 X 140	3
C/108	CRM	DCX	25 X 25	150 X 150	2
BF/108	CRM	DCX	25 X 25	110 X 110	2

Resultados

Para establecer si la operación o la inserción de la BF tenían un efecto en el peso corporal de los animales, los tres grupos, C/46^a, BF/46^a y sham/46, fueron pesados antes y después de la operación. En general, la herida de aquellos animales que sufrieron algún tipo de manipulación quirúrgica tardó en sanar entre 5-7 días. En la figura 2 se muestra la ganancia de peso semanal de todos los animales. Como se puede observar, el grupo control presenta un aumento lineal de peso corporal a lo largo de las 6 semanas con un incremento promedio del 4%. Los animales de los grupos sham y BF fueron operados entre la semana 2 y la semana 3. Nótese que en la semana 3 ninguno de los dos grupos mostró aumento de peso e inclusive los animales BF disminuyeron 4g en promedio. Sin embargo, en las semanas subsiguientes, los dos grupos de animales recuperaron peso aumentando finalmente, como los animales controles, un promedio del 4% de peso corporal.

La figura 3 ilustra los resultados obtenidos después de la implantación crónica de la barrera física (BF) en el polo frontal del cerebro. Cabe señalar que no se muestran los cortes representativos del grupo sham/46 debido a que fueron similares a los del grupo control. Como puede observarse al comparar los cerebros C/46^a con aquellos implantados (BF/46^a), la BF interrumpió eficazmente el paso de los neuroblastos, originados en la ZSV y marcados con doblecortina (DCX-IR), hacia el codo y el brazo horizontal de la CRM. Dichos neuroblastos se acumularon en la cara posterior de la barrera incrementando el grosor de la ZSV. Es importante destacar que no obstante la magnitud del bloqueo obtenido se observan, del otro de la barrera, neuroblastos a lo largo de la CRM aunque en menor cantidad.

Posteriormente, para demostrar que los neuroblastos observados en la CRM de los animales implantados no provenían de la ZSV y demostrar la efectividad de la BF, se marcaron a los neuroblastos subventriculares de los grupos control y BF (doce días después del implante) con fluoroesferas y 15 días después se evaluó su migración. La figura 4 muestra la presencia de los neuroblastos marcados con fluoroesferas a través de la CRM de los animales control y la gran acumulación de neuroblastos en la cara posterior de la BF en notable ausencia de neuroblastos en la CRM de los animales implantados.

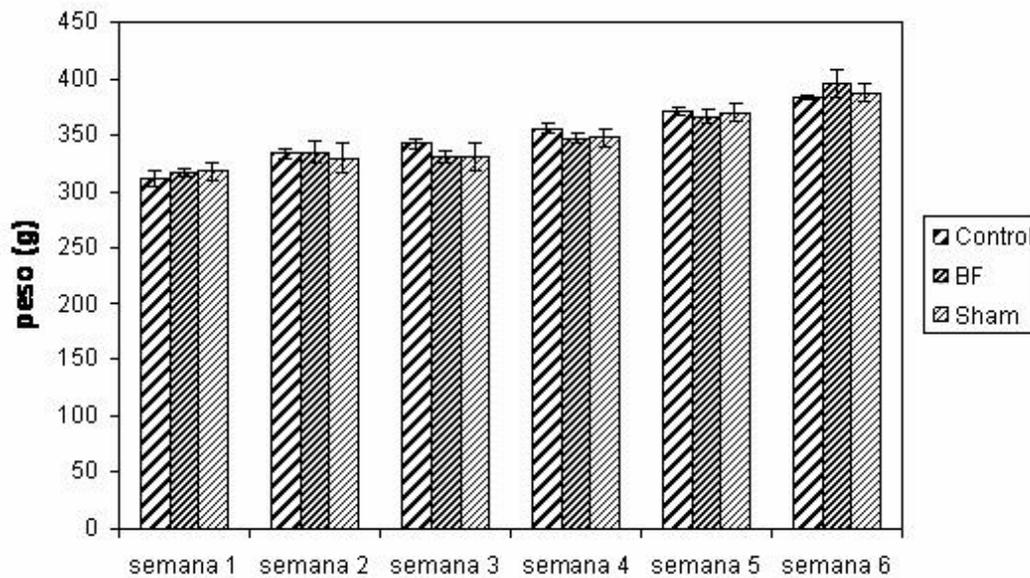


Figura 2. Gráfica que representa el peso corporal de los grupos de animales C/46^a, BF/46^a y Sham/46 a lo largo del tiempo. Nótese el incremento gradual del peso de los animales C/46^a. La operación en los grupos BF/46^a y Sham/46 se llevó a cabo entre la semana 2 y la semana 3, obsérvese como en esta última no existió ganancia de peso en estos grupos, sin embargo, hacia la semana 6 los animales manipulados quirúrgicamente se recuperaron mostrando inclusive un incremento promedio de peso corporal ligeramente mayor que en el grupo control.

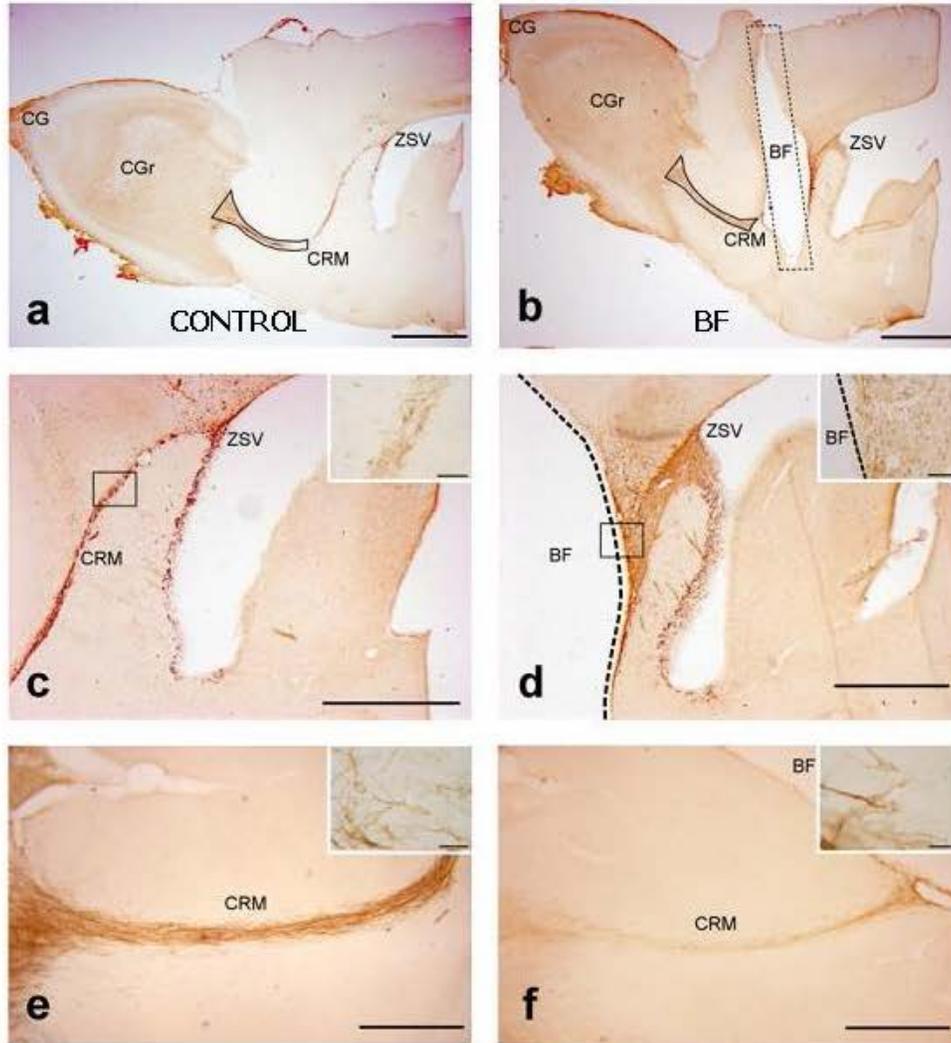


Figura 3. Fotomicrografías que ilustran cortes sagitales del hemisferio derecho del cerebro de una rata control (*a,c,e*) y de una rata implantada con barrera física (*b,d,f*), teñidos para DCX y obtenidos 46 días después del implante de la BF. Los contornos en la CRM en *a* y *b* indican el área en donde se realizaron los conteos celulares estereológicos. La línea punteada en *b* especifica el sitio de inserción de la BF (escala 2mm). Los recuadros *c* y *d* muestran la distribución de los neuroblastos DCX-IR a lo largo del brazo vertical de la CRM y en la pared anterior de la ZSV en las ratas control y con BF respectivamente (escala 500 μ m). Nótese el grosor de la CRM y la ZSV antes de la BF (línea punteada en *d*). Los insertos muestran a mayor aumento a la CRM en ambos grupos (escala 50 μ m). Los recuadros *e* y *f* muestran la distribución de los neuroblastos a lo largo de la CRM (escala 100 μ m). A pesar de la reducción del grosor de la CRM todavía existen neuroblastos DCX-IR (inserto en *f*) como en el caso de su contraparte control (inserto en *e*) (escala 20 μ m).

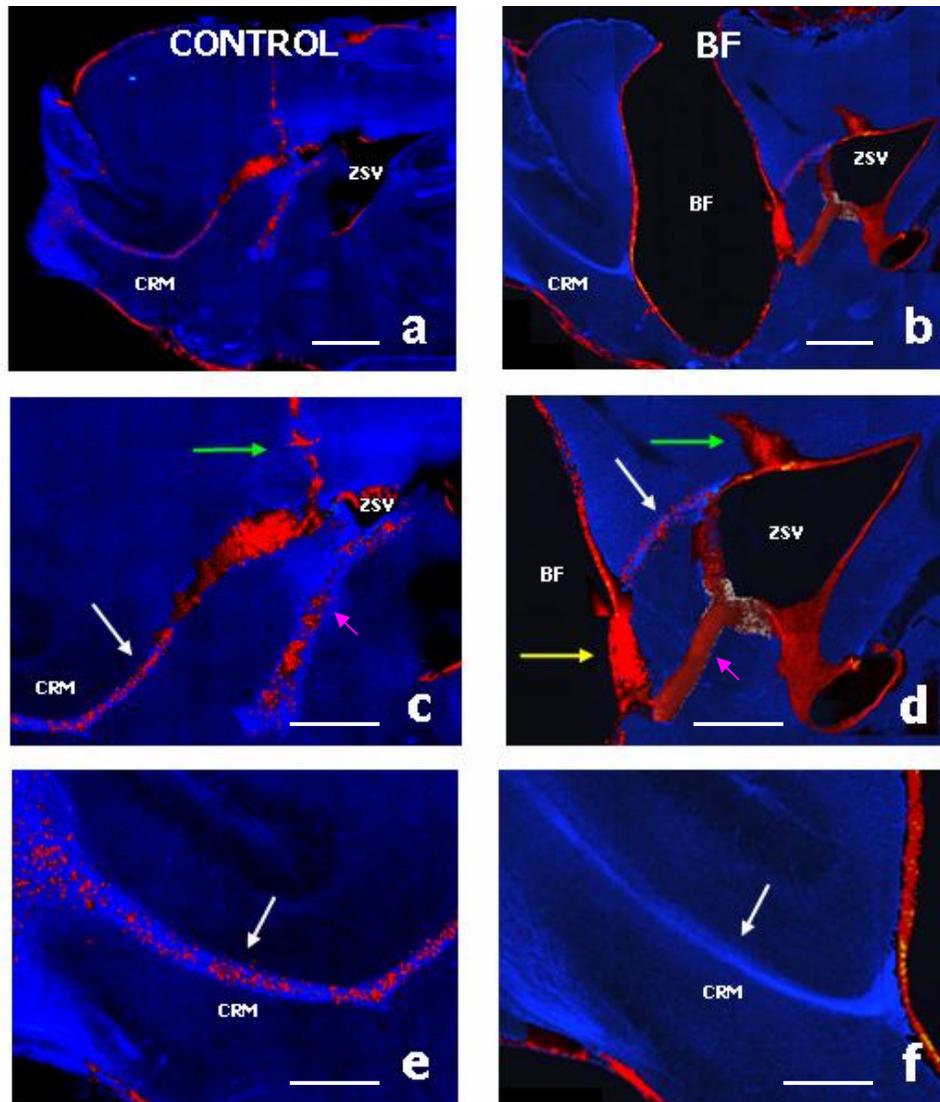


Figura 4. Fotomicrografías sobrepuestas (marcaje azul DAPI, marcaje rojo fluoroesferas) que ilustran cortes sagitales del hemisferio derecho del cerebro de una rata control (*a,c,e*) y de una rata implantada con barrera física (*b,d,f*), marcados 12 días después del implante y obtenidos 15 días después del marcaje con fluoroesferas. En *a* y *b* se observa una panorámica general del marcaje celular (escala 2mm). Los recuadros *c* y *d* muestran la distribución de los neuroblastos marcados con fluoroesferas (puntos rojos) migrando por la CRM (flechas blancas) y el punto de inyección de las fluoroesferas (flechas verdes). Nótese la gran acumulación de marca en la cara posterior del sitio de inserción de la BF (flecha amarilla) y en la ZSV de ambos animales (flechas rosas) (escala 500 μ m). Los recuadros *e* y *f* muestran la distribución de los neuroblastos a lo largo de la CRM (flechas blancas) en los animales control y la notable ausencia de los mismos en los animales con BF (escala 100 μ m).

A continuación, para estimar la cantidad de neuroblastos originados exclusivamente en la CRM y determinar si la manipulación quirúrgica tenía alguna influencia en la generación de ellos, se realizó un conteo estereológico de las células DCX-IR en la

CRM de los grupos C/46^a, BF/46^a y sham/46. Como se puede observar en la gráfica de la figura 5, el número de neuroblastos en los animales BF/46^a disminuyó significativamente con respecto de los animales Sham/46 (59%) y C/46^a (49%) (BF/46^a= 9372 ± 854; Sham/46 =20803 ± 2289; C/46^a =18249 ± 858). A pesar del aumento en la cantidad de neuroblastos en los animales Sham/46 (19%) con respecto de C/46^a, los datos obtenidos entre estos dos grupos, no mostraron diferencias significativas.

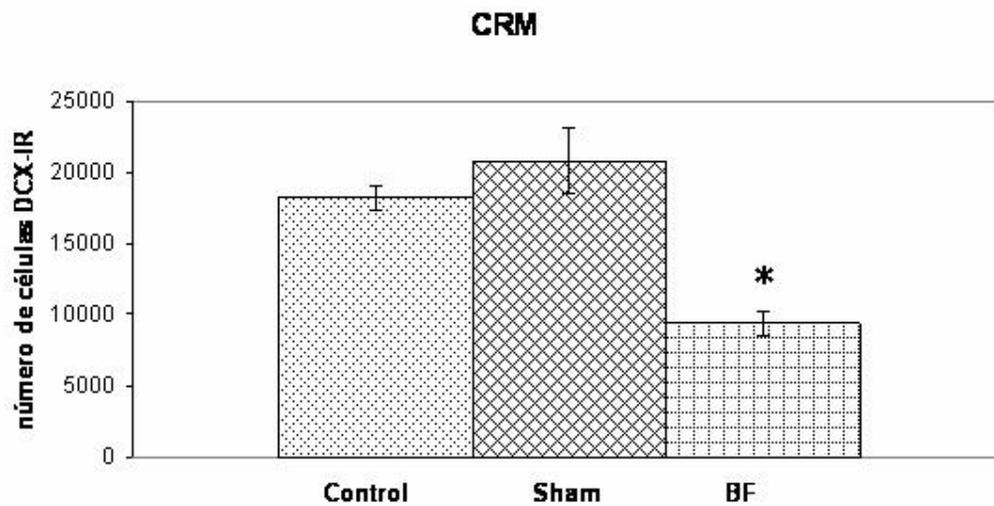


Figura 5. Gráfica que representa el número de neuroblastos localizados en la CRM de los grupos control (n=7), Sham (n=4) e implantados con BF (n=6), 42 días después de la operación. Nótese el aumento, no significativo, en el grupo de animales sham y la sensible disminución de neuroblastos en los animales implantados con BF. Los datos están presentados como el promedio del estimado del número total de células DCX-IR en la CRM ± ES. *Estadísticamente significativo $p < 0.001$. ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Holm-Sidak.

La gráfica de la figura 6 muestra el estimado de número total de neuroblastos localizados en la CRM de los animales control (C/12, C/46^a y C/108) y con BF (BF/12, BF/46^a y BF/108), en los tres tiempos estudiados (12, 46 y 108 días después del implante). Como se puede observar, los tres grupos de animales implantados con BF muestran una disminución significativa con respecto de sus grupos control (29%, 49%

y 39% respectivamente) (BF/12= 13091 ± 1231; BF/46^a= 9372 ± 854; BF/108= 8863 ± 718; C/12= 18402 ± 1533; C/46^a= 18249 ± 858; C/108= 14513 ± 493). Además, no existieron diferencias significativas entre los grupos control C/12 y C/46^a, pero sí entre C/12 y C/108. Tampoco hubo diferencia significativa entre los grupos BF/12 y BF/46^a pero sí entre BF/12 y BF/108.

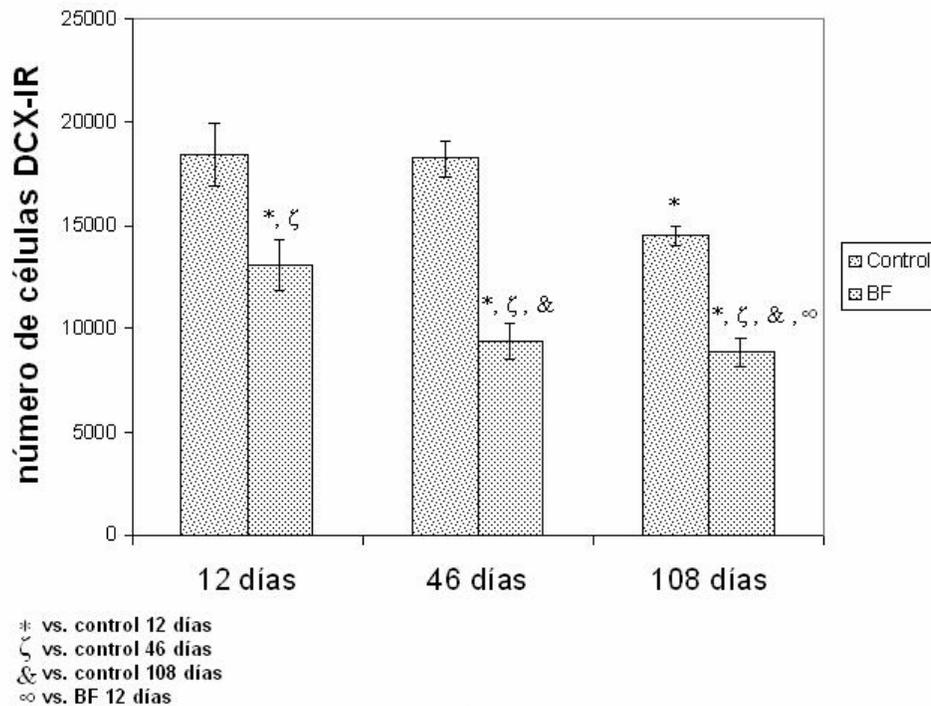


Figura 6. Gráfica que muestra el número de células DCX-positivas (neuroblastos) localizadas en la CRM de animales control (C/12 n=6; C/46^a n=7; y C/108 n=6) y con barrera física (BF/12 n=5; BF/46^a n=6; y BF/108 n=6), sacrificados a los 12, 46 y 108 días después del implante. Obsérvese la notable disminución de neuroblastos en los animales BF de los tres grupos. *, ζ, &, ∞ Estadísticamente significativo p<0.001; ANOVA de una vía seguida por una prueba post-hoc Holm-Sidack. Los datos están presentados como el promedio del estimado total del número de células DCX-positivas en la CRM ± ES.

Posteriormente, para determinar si las células generadas en la CRM migran hacia el BO, se examinaron y compararon el número de células BrdU-IR en la CRM de los grupos BF/12 y C/12 contra BF/46^a y C/46^a. Los animales sacrificados 2 horas después de la inyección de BrdU (BF/12, C/12) muestran una gran cantidad de células BrdU-IR en la

CRM (figura 7 a y c). Es importante enfatizar que a pesar de que no todas las células BrdU-IR presentan co-localización con DCX, la morfología de sus núcleos fue muy similar a la de los neuroblastos DCX-IR (figura 8 a y b). En contraste, los cerebros de los animales sacrificados 30 días después de la última inyección de BrdU (BF/46^a y C/46^a) exhiben muy pocas células BrdU o BrdU/DCX-IR (figura 7 b y d; figura 8 c y d). Sin embargo, las células BrdU que se aprecian son de morfología variada predominando aquellas que son pequeñas ($\approx 8\mu\text{m}$) y redondas (figura 8 e y f). Por otra parte, los resultados del conteo de las células en proliferación activa obtenidos de los grupos C/12 y BF/12 muestran que los promedios del estimado total número de células BrdU-IR en la CRM fueron similares para ambos grupos (BF/12= 2461 ± 314 ; C/12= 2367 ± 115) (figura 7 e). Igualmente, el conteo de las células BrdU-IR (de lenta proliferación) en los grupos de animales C/46^a y BF/46^a presentan un promedio similar con una ligera disminución (12%) no significativa del grupo BF/46^a con respecto de su control (BF/46^a= 540 ± 66 ; C/46^a= 616 ± 70) (figura 7 f).

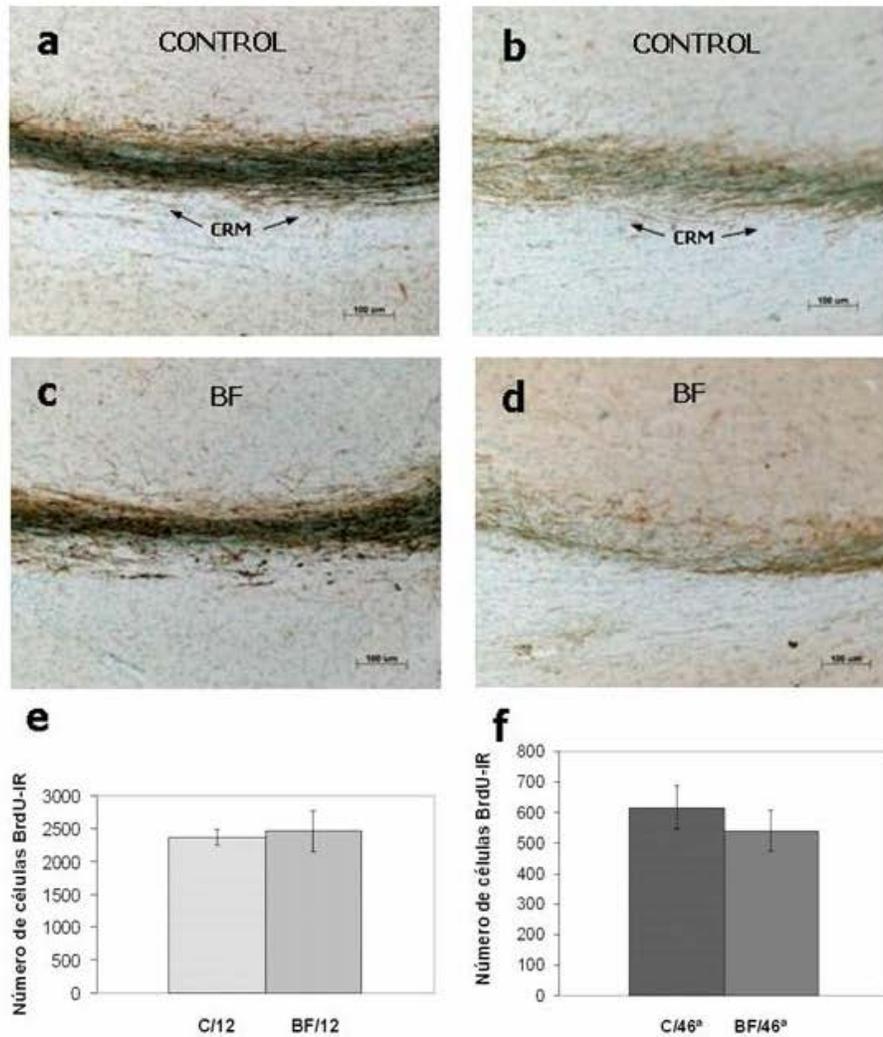


Figura 7. Fotomicrografías que ilustran la vista sagital de la CRM del cerebro de una rata control (*a,b*) y de una rata implantada con barrera física (*c,d*). Los animales fueron sacrificados 2 horas (*a,c*) (C/12, n=6; BF/12, n=5) y 30 días (*b,d*) (C/46^a, n=6; BF/46^a, n=6) después de la administración de BrdU. Los cortes fueron procesados para la doble ICQ BrdU/DCX y contrateñidos con verde de metilo. Nótese la gran cantidad de células BrdU-IR que se pueden observar en *a* y *c*, y que no se distinguen en *b* y *d* (escala 100 μ m). En *e* y *f* se muestran las gráficas del conteo de las células BrdU-IR en los diferentes grupos. Los resultados están presentados como el promedio de los datos \pm ES. No hubo diferencia estadísticamente significativa.

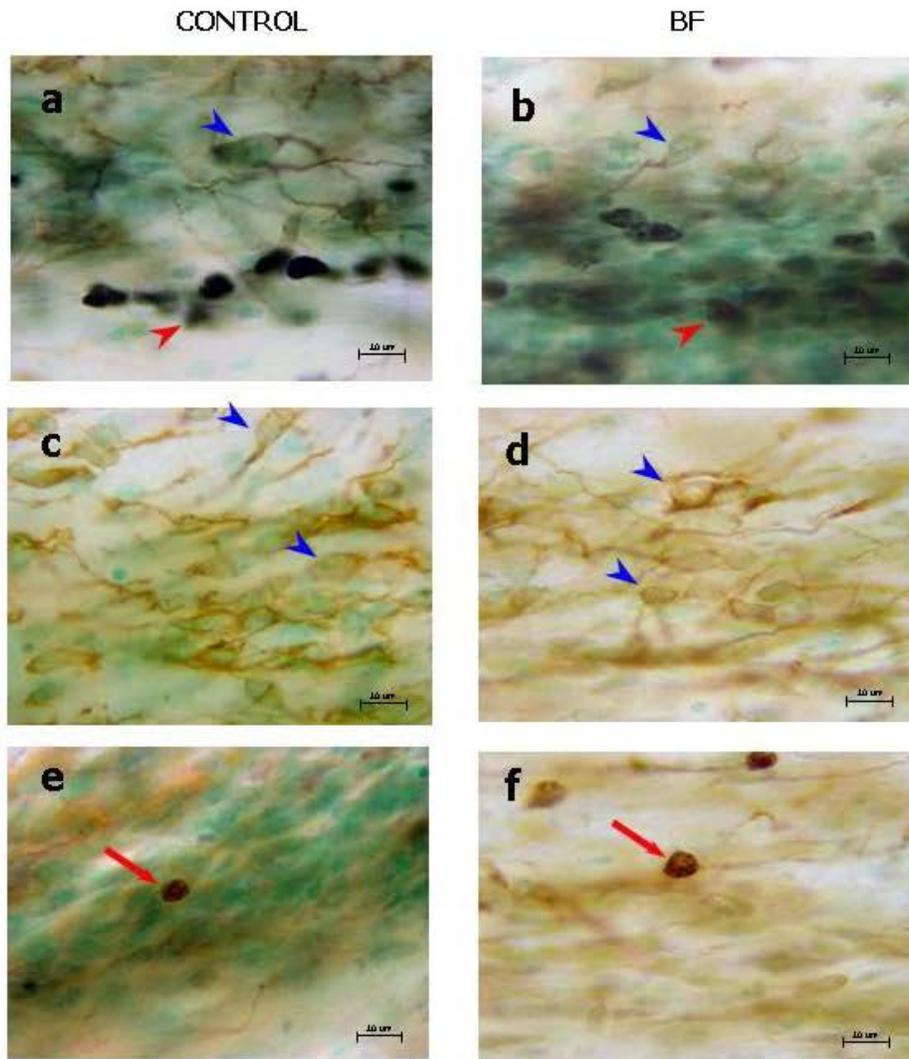


Figura 8. Fotomicrografías que muestran en detalle a las células BrdU-IR y/o DCX-IR en la CRM de los grupos C/12 (a), BF/12 (b) y C/46^a (c,e), BF/46^a (d,f). Obsérvese, en los paneles a y b, a las numerosas células BrdU-IR (cabeza de flecha roja) de los animales inyectados con BrdU dos horas antes del sacrificio y a los neuroblastos DCX-IR (cabeza de flecha azul). En los paneles c,d,e,f, se muestran a las células localizadas en la CRM de los animales sacrificados 30 días después de la administración de BrdU, como se puede apreciar en su mayoría son neuroblastos DCX-IR (cabeza de flecha azul), con ocasionales células BrdU-IR pequeñas y redondas (flecha roja) (escala 10 μm).

En seguida, para determinar a que capa del BO se integraron las células BrdU-IR marcadas en los grupos C/46^b y BF/46^b se realizó un conteo de las mismas en la capa granular (CGr) y glomerular (CG). Los datos obtenidos indican que en la CGr, los animales implantados mostraron un decremento significativo (78%) de las células

BrdU-IR incorporadas con relación a sus controles (BF/46^b=25773 ± 6157; C/46^b=115837 ± 15368) (figura 9).

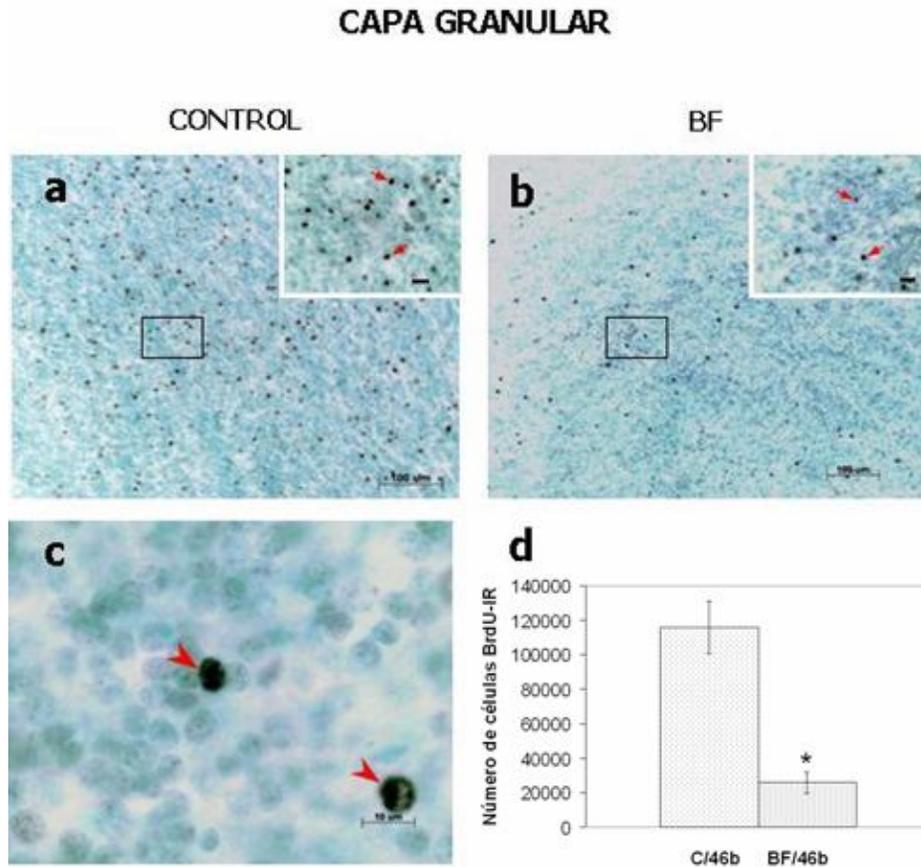


Figura 9. Fotomicrografías que muestran cortes sagitales representativos de la capa granular (CGr) del bulbo olfatorio, de una rata control (a) (C/46^b n=6) y de una rata implantada con barrera física (b) (BF/46^b n=6), procesados por ICQ contra BrdU y contrateñidos con verde de metilo (escala 100 μm). Los recuadros muestran a un mayor aumento a la células BrdU (escala 20μm) Adviértase la gran cantidad de células BrdU-IR (flechas rojas) localizadas en los animales controles en comparación con los de BF. El panel c muestra dos típicas células BrdU-IR (cabeza de flecha) localizadas en la CGr, cuya morfología es redonda y su tamaño de 6-8μm. característico de las interneuronas granulares (escala 10 μm). En d se presenta la gráfica del conteo de las células BrdU-IR en la CGr de los dos grupos. Los datos están presentados como el promedio ± ES. *Significativamente diferente p<0.001 con una prueba *t-Student*.

Por otra parte se advirtió una disminución no significativa del 36% de células BrdU-IR incorporadas a la capa glomerular (BF/46^b= 8513 ± 1169; C/46^b= 13205 ± 1382) (Figura 10 d).

CAPA GLOMERULAR

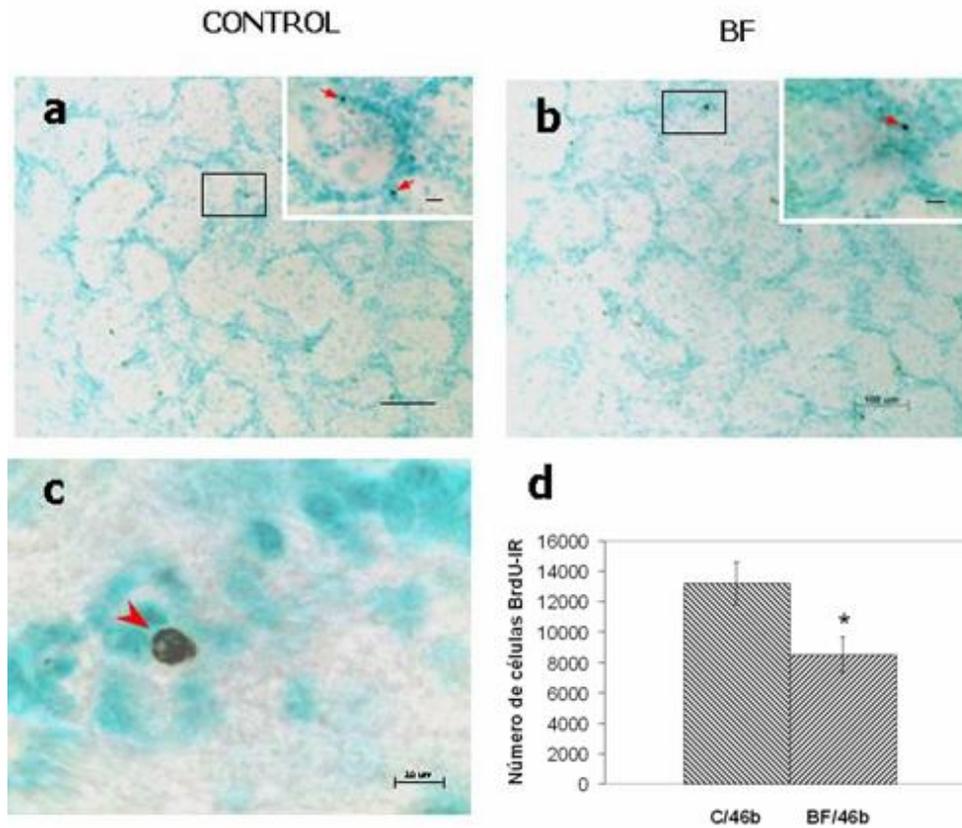


Figura 10. Fotomicrografías que muestran cortes sagitales representativos de la capa glomerular (CG) del bulbo olfatorio de una rata control (a) (C/46, n=4) y de una rata implantada con barrera física (b) (BF/46, n=4) procesados por ICQ contra BrdU y contrateñidos con verde de metilo (escala 100 μ m). Los recuadros muestran como alrededor de los glomérulos se encuentran los somas de las células periglomerulares (flechas rojas) (escala 20 μ m). En c se observa una interneurona periglomerular (cabeza de flecha). En d se presenta la gráfica del conteo de las células BrdU-IR en la CG de los dos grupos. Los datos están presentados como el promedio \pm ES. *Significativamente diferente $p < 0.02$ con una prueba *t-Student*

Finalmente, basados en el conteo celular, los resultados muestran que, el promedio de número total de células BrdU-IR que se incorporaron al BO en los animales C/46^b fue de 129 042. De este total, el 90% (115 837) se observaron en la CGr, mientras que sólo el 10% (13 205) se incorporó a la CG. Por otra parte, el promedio del número total de células BrdU-IR incorporadas al BO en las ratas B/46^b fue de 34 286.

De este total 75% (25 773) de ellas se observaron en la CGr mientras que sólo el 25% (8 513) se incorporó en la CG. Sin embargo, si asumimos que el número de células BrdU-IR en el BO de C/46^b representa a las que vienen de la ZSV y CRM en conjunto y que las células BrdU-IR en el BO de B/46^b corresponde solamente a la porción de células suministradas por la CRM, nosotros estimamos que la producción local en la CRM de células que se incorporan al BO es del 27%. En este mismo sentido, las células granulares representan el 22% y la glomerulares el 64% del total del número de células que se incorporan al BO.

Discusión

Durante la última década, se fortaleció la evidencia que sostiene que existen dos zonas neurogénicas en el cerebro adulto: la zona subventricular (ZSV) y el giro dentado del hipocampo. Sin embargo, investigaciones más recientes sugieren que hay otras regiones que pueden contener nichos de células troncales con la capacidad para producir nuevas neuronas.

Los principales trabajos que apoyan esta idea para la CRM sugieren que: 1) existen células troncales residentes productoras de progenitores neuronales proliferantes en esa zona (Tomasiewicz, *et al.*, 1993; Craig, *et al.*, 1999; Gritti, *et al.*, 2002); y 2); que los precursores neuronales en la CRM están comprometidos a la generación de un solo tipo celular (Smith y Luskin, 1998; Hack, *et al.*, 2005). Sin embargo, el continuo tránsito y proliferación de los neuroblastos generados en la ZSV a través de la CRM ha dificultado la investigación de este tema. Es en este contexto donde nuestro trabajo cobra importancia debido a que aislamos a la CRM de las células que nacen en la ZSV.

Bajo estas circunstancias, encontramos neuroblastos DCX-IR presentes en la CRM a los 12, 46 y 108 días después del bloqueo; lo que indica que, en esta zona, existen células troncales residentes que generan a estos neuroblastos.

En la presente investigación se utilizó el parámetro del peso corporal como un indicador indirecto del estado de salud de los animales. Los animales manipulados quirúrgicamente fueron operados entre la semana 2 y 3 en donde ninguno de los grupos mostró aumento de peso e inclusive los animales con BF disminuyeron ligeramente su promedio. Lo anterior lo atribuimos al proceso de restablecimiento de la operación. Sin embargo, al observarse una recuperación del peso corporal de los animales manipulados quirúrgicamente y al no encontrar diferencias significativas entre los pesos de los tres grupos a lo largo de las 6 primeras semanas, concluimos que ni la operación ni la inserción de la BF produjeron evidente daño adicional a la lesión cerebral en los animales operados y evaluados 46 días después de la operación. Además, cabe señalar que al no encontrar diferencias significativas en el número de neuroblastos localizados en la CRM de los grupos sham/46 y C/46^a, deducimos que la manipulación quirúrgica no influía en la presencia o en la cantidad de neuroblastos generados en esta zona.

Por otra parte, era importante confirmar que la BF impedía efectivamente el tránsito de los neuroblastos de origen subventricular a través de la CRM. Esto lo hicimos mediante el marcaje con fluoroesferas. Como se observa, hay gran cantidad de fluoroesferas en la CRM de los animales control con notable ausencia de las mismas en los animales con BF. Pero es posible, además, observar la gran acumulación de las fluoroesferas en la cara posterior de la BF de los animales implantados, justo donde también se acumula el marcaje de los neuroblastos DCX-IR, lo que nos hace concluir que, en los animales control, los neuroblastos fueron marcados con las fluoroesferas y continuaron su migración. Mientras que en los animales con BF los neuroblastos de

origen subventricular se acumularon alrededor de la ZSV y no continuaron su traslado a través de la CRM.

Con respecto del tránsito de los neuroblastos producidos en la CRM, nosotros observamos una gran cantidad de células BrdU-IR con una morfología similar a la de los neuroblastos DCX-IR, e inclusive células BrdU/DCX-IR, dos horas después del marcaje con BrdU. Sin embargo, 30 días después de la administración de BrdU, sólo se observaban esporádicas células de este tipo de morfología variada (sin asociación de DCX y con morfología diferente a los neuroblastos); predominantemente, aquéllas pequeñas y redondas a lo largo de toda la CRM. Este resultado aunado a las numerosas células BrdU-IR que se encontraron en el BO de estos mismos animales, sugiere que los neuroblastos generados en la CRM también migran hacia el BO.

Asimismo, debido a que la tasa de proliferación de las células troncales en la ZSV es de aproximadamente 28 días (Morshead *et al.*, 1994), el hecho de haber localizado en los animales implantados núcleos fuertemente teñidos para BrdU a lo largo de la CRM treinta días después de la administración de BrdU, robustece la idea que sugiere la existencia de células B (putativas células troncales; Doetsch *et al.*, 1997; Garcia-Verdugo *et al.*, 1998) en la CRM (Gritti *et al.*, 2002). Otro precedente que apoya esta idea es el trabajo en ratones deficientes de la molécula PSA-NCAM que está involucrada en la migración celular. En estos ratones es posible observar una gran acumulación de células no sólo en la ZSV si no también a lo largo de la CRM, esto sugiere otra vez la existencia de células troncales en ambos sitios (Tomasiewicz *et al.*, 1993)

El hecho de que nuestros resultados muestren que no hay diferencia significativa en el número de células BrdU-IR en la CRM en los animales crónicamente implantados y sacrificados 30 días después de la administración de BrdU, junto con el precedente de

que tres días después de la administración local de timidita tritiada en la ZSV se marcan neuroblastos y no células B (Lois, *et al.*, 1996; Fukushima, *et al.*, 2002), apoya la noción de que la ZSV adulta no provee a la CRM de células troncales. Sin embargo no podemos excluir la posibilidad de que éstas entren a la CRM durante la vida embrionaria o posnatal para posteriormente llegar a formar una población local permanente.

Un aspecto importante que se debe discutir, se relaciona con el papel fisiológico de las células troncales en la CRM. Algunos estudios, por un lado, proponen la idea de que la CRM posee un microambiente que favorece el compromiso de algunos de los precursores neuronales migratorios/proliferativos hacia el fenotipo celular glomerular (Smith y Luskin, 1998; Fukushima, *et al.*, 2002; Li, *et al.*, 2002; Hack, *et al.*, 2005) y por otro, también sugieren que podrían existir células troncales residentes en la CRM que producirían este tipo de neuronas (Smith y Luskin, 1998; Hack, *et al.*, 2005). El presente estudio es compatible con la segunda idea, aunque tiene más alcance, ya que, según nuestro estimado, el mayor porcentaje de células periglomerulares (64%) se producen en la CRM. Sin embargo, no se debe olvidar que, aunque en mucha menor proporción (22%), también se producen neuronas granulares. Para apoyar este concepto, está el hecho de que en las ratas lesionadas en la CRM se observa una disminución importante en los porcentajes de las células periglomerulares (Fukushima, *et al.*, 2002). Finalmente, nuestras estimaciones en las ratas implantadas sugieren que el 64% de la población de células periglomerulares se pueden producir en la CRM. Esto no está lejos del porcentaje estimado por Hack *et al.*, ($\approx 50\%$). Estamos conscientes de que se requeriría una doble ICQ para marcar a las neuronas que llegaron a las diferentes capas y, con eso, se obtendría una mayor precisión de la interpretación de nuestros datos.

Por otra parte, durante el desarrollo temprano del cerebro, la decisión del fenotipo de una neurona esta influida por el sitio de origen de sus precursores a lo largo del tubo neural. En otras palabras, existe información posicional a lo largo del tubo neural que imprime identidad segmental a la neurona en diferenciación, lo que posteriormente determina su destino fenotípico. Por lo tanto, la compartimentalización no es un concepto desconocido en el sistema nervioso en desarrollo, debido a que parece ser un principio de organización del cerebro asociado con la generación de la diversidad celular. Por esto, no debería de sorprendernos que regiones capaces de producir diferentes linajes celulares y clases de neuronas en el cerebro adulto pudieran estar anatómicamente segmentadas. En apoyo a esta posibilidad, previos trabajos en el cerebro posnatal y adulto sugieren que la ZSV contiene diferentes zonas que preferentemente producen neuronas gliales o granulares (Luskin, 1993; Suzuki y Goldman, 2003; Hack, *et al.*, 2005). En la CRM, al parecer, la especificación fenotípica también está compartimentalizada con una mayor cantidad de progenitores de neuronas periglomerulares especificadas en posiciones más rostrales que los precursores neuronales granulares (Hack, *et al.*, 2005). Nuestros datos apoyan no solamente la idea de que la especificación fenotípica esta compartimentalizada a lo largo de la CRM, sino también la producción celular. Ciertamente, el hecho de que la CRM produzca grandes cantidades de núcleos BrdU que se incorporan a las estructuras glomerulares favorece este concepto.

Finalmente, pensamos que nuestros resultados sugieren que la hipótesis de dos precursores para la generación de células periglomerulares puede ser correcta; en tanto que propone la existencia de dos distintas regiones de progenitores neuronales periglomerulares: una localizada cerca del BO, y la otra situada a una mayor distancia en la ZSV (Guillemot y Parras, 2005). Sin embargo, queda por resolver un asunto

importante: si el sitio de generación está relacionado con el linaje neuronal de los distintos tipos de células periglomerulares.

En conclusión, en nuestro modelo, al no mezclarse las células producidas en la ZSV con las de la CRM, nosotros podemos decir que: 1) En la CRM se producen tanto células granulares como periglomerulares; y 2) Que efectivamente la mayor producción de células periglomerulares se producen en la CRM. Por lo tanto, afirmamos que, además de la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo, la corriente rostral migratoria tiene células troncales residentes capaces de generar neuroblastos que mantienen su cualidad proliferante y que, de igual manera, migran tanto a la capa granular como a la capa periglomerular del bulbo olfatorio.

Apéndice

La corriente rostral migratoria (TRM), la zona subventricular (ZSV) y el bulbo olfatorio (BO) participan en la neurogénesis localizada en el cerebro anterior de la rata adulta. En la ZSV se producen los neuroblastos que migran a través la CRM para llegar al corazón del BO donde se distribuyen radialmente en las láminas granular y periglomerular en donde se diferencian como interneuronas (Fig.11). A continuación se describirán algunas características de los principales tipos celulares que se encuentran en la ZSV, la conformación la CRM y la estructura del BO.

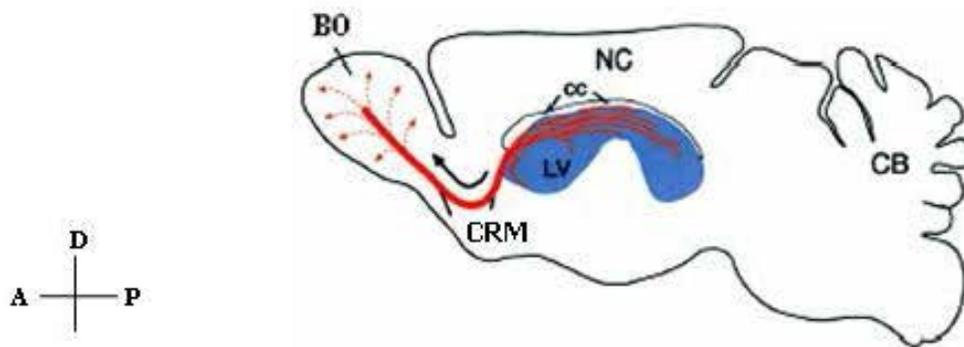


Fig.11. El sistema zona subventricular-corriente rostral migratoria-bulbo olfatorio (ZSV-CRM-BO). Vista esquemática sagital del cerebro de la rata adulta. La ZSV se observa a lo largo de la pared lateral del ventrículo lateral (LV, azul). Nuevas neuronas están constantemente produciéndose en toda la ZSV. Los neuroblastos se alinean a lo largo de las cadenas (líneas rojas) que forman una compleja red de vías interconectadas. Muchas de esas cadenas, se vinculan en la parte anterior de la ZSV con la CRM que conduce a los neuroblastos al corazón del BO. En el BO, las células se dispersan radialmente (líneas punteadas) y completan su diferenciación como interneuronas granulares o periglomerulares. NC, neocorteza; CC, cuerpo calloso. (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002).

Zona subventricular

La ZSV se localiza en las paredes laterales de los ventrículos laterales. Cuatro son los tipos celulares que se han identificado con base en su morfología, su ultraestructura y sus marcadores moleculares (tabla 3 y 4). Las células de tipo A o neuroblastos, las de tipo B o astrocitos, las altamente proliferativas de tipo C, y las células E o ependimales que recubren a los ventrículos (Fig.12). También se distinguen otros tipos celulares como neuronas, microglía, tanacitos, macrófagos y endotelio aunque en menor proporción (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002).

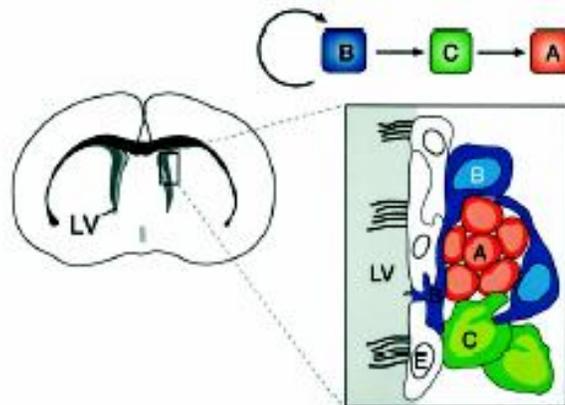


Fig. 12. Organización y linaje de la ZSV. *Izquierda*, vista esquemática coronal del cerebro de la rata adulta indicando la localización de la ZSV en la pared lateral del ventrículo lateral (VL). *Derecha*, Composición y organización de la ZSV; las cadenas de neuroblastos (células A, rojas) están rodeadas por las células B (azules) que tienen características astrocíticas y forman estructuras tubulares, además se observan agrupaciones de células C altamente proliferativas (verdes) que están asociadas con las cadenas de neuroblastos; las células E forman una capa epitelial que separa a la ZSV del ventrículo (LV). *Arriba*, las células B generan a las transitorias células amplificadoras C que, a su vez, generan a las células A. (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002).

Las células A o neuroblastos se originan a lo largo de toda la pared de los ventrículos laterales. Entre sus principales características ultraestructurales se encuentran: la de tener un cuerpo celular alargado con uno o dos procesos. Su núcleo muestra abundante cromatina laxa con dos a cuatro pequeños nucleolos. Su citoplasma escaso y oscuro, y contiene muchos ribosomas, una cisterna corta de retículo endoplásmico rugoso, un aparato de Golgi pequeño, muchos microtúbulos orientados a lo largo del eje de las células. Además, tienen contornos suaves que contactan a otros tipos de células A mediante uniones adherentes. También se observan vesículas endocíticas. (Fig.13) (Doetsch, *et al.*, 1997; Garcia-Verdugo, *et al.*, 1998).

Pueden distinguirse dos tipos de células B, B1 y B2. Ambas tienen características ultraestructurales de astrositos. Así, poseen múltiples procesos que se intercalan extensamente entre otras células. Estos procesos están soportados por filamentos intermedios ricos en proteína ácida fibrilar (GFAP). Muestran además, depósitos electrodensos en su citoplasma y uniones comunicantes entre si. Las B1 son ligeramente más largas, tienen un citoplasma más claro y un núcleo con cromatina más dispersa al ser comparadas con las células B2. Ambos tipos envuelven a los neuroblastos migratorios, sólo que las B1 están en contacto con la capa endodimensional (Fig.13) (Doetsch, *et al.*, 1997; Garcia-Verdugo, *et al.*, 1998; Lim y Alvarez-Buylla, 1999).

Las células de tipo C tienen una forma más redondeada y menos procesos que los tipos anteriores. También son más electrolúcidas que las células A pero más electrodensas que las B. Además, poseen un núcleo largo con un nucleolo reticulado y cromatina laxa. Su citoplasma contiene un aparato de Golgi en forma alargada y una menor cantidad de ribosomas que las células A. Frecuentemente se observan pequeñas uniones adherentes con las que contactan a las células A (fig.13). Las células C, se encuentran en relación con las cadenas de células migratorias a todo lo largo de la red

de la ZSV aunque no están uniformemente distribuidas ya que se encuentran en menor número en la parte caudal. Se considera que las células C son las que proliferan más activamente (Doetsch, *et al.*, 1997; Garcia-Verdugo, *et al.*, 1998).

Por último, se encuentran las células E que forman una capa epitelial que separa a la ZSV de la cavidad ventricular. En la superficie expuesta a la cavidad ventricular, estas células presenta microvellosidades y cilios. Cuentan con un núcleo esférico de cromatina dispersa. Su citoplasma es electrolúcido, contiene muchas mitocondrias y cuerpos basales localizados en el citoplasma apical (Fig.13) (Doetsch, *et al.*, 1997; Garcia-Verdugo, *et al.*, 1998). Se pensaba que estas células constituían la población de células troncales. Sin embargo datos recientes sugieren que son aquellas que dan origen a las células C y estas a su vez a las A¹ (Doetsch, *et al.*, 1999; Alvarez-Buylla, *et al.*, 2001; Conover y Allen, 2002); estos últimos, una vez generados comienzan su camino hacia el BO en la CRM.

¹ Álvarez-Buylla y su grupo de investigación, proponen un modelo diferente al clásico que sugiere que las neuronas y glía se derivan de dos líneas celulares separadas y explican como las células B con características astrocíticas pueden ser las células troncales progenitoras de los neuroblastos migratorios. En su modelo, las células neuroepiteliales (en el embrión) dan origen ya sea a la glía radial o a los neuroblastos corticales. La glía radial, a su vez, se divide asimétricamente y produce neuronas y glía, en la etapa perinatal, cuando las células radiales desaparecen, se transforman en astrocitos, los cuales continúan produciendo neuronas aún en la etapa adulta (p. ej. Álvarez Buylla *et al.*, 2001).

Tabla 3. Marcadores moleculares de las células del la ZSV

	PSA-NCAM	TUJ-1	DCX	GFAP	Nestina
Tipo A	+++	+++	+++	--	+
Tipo B	---	---	---	++	++
Tipo C	---	---	---	---	+
Tipo E	---	---	---	+	+++

La intensidad relativa de la tinción inmunohistoquímica se traduce en cruces: + claro; ++ intermedio; +++oscuro; --- sin tinción Adaptado de (Doetsch, *et al.*, 1997; Garcia-Verdugo, *et al.*, 1998)

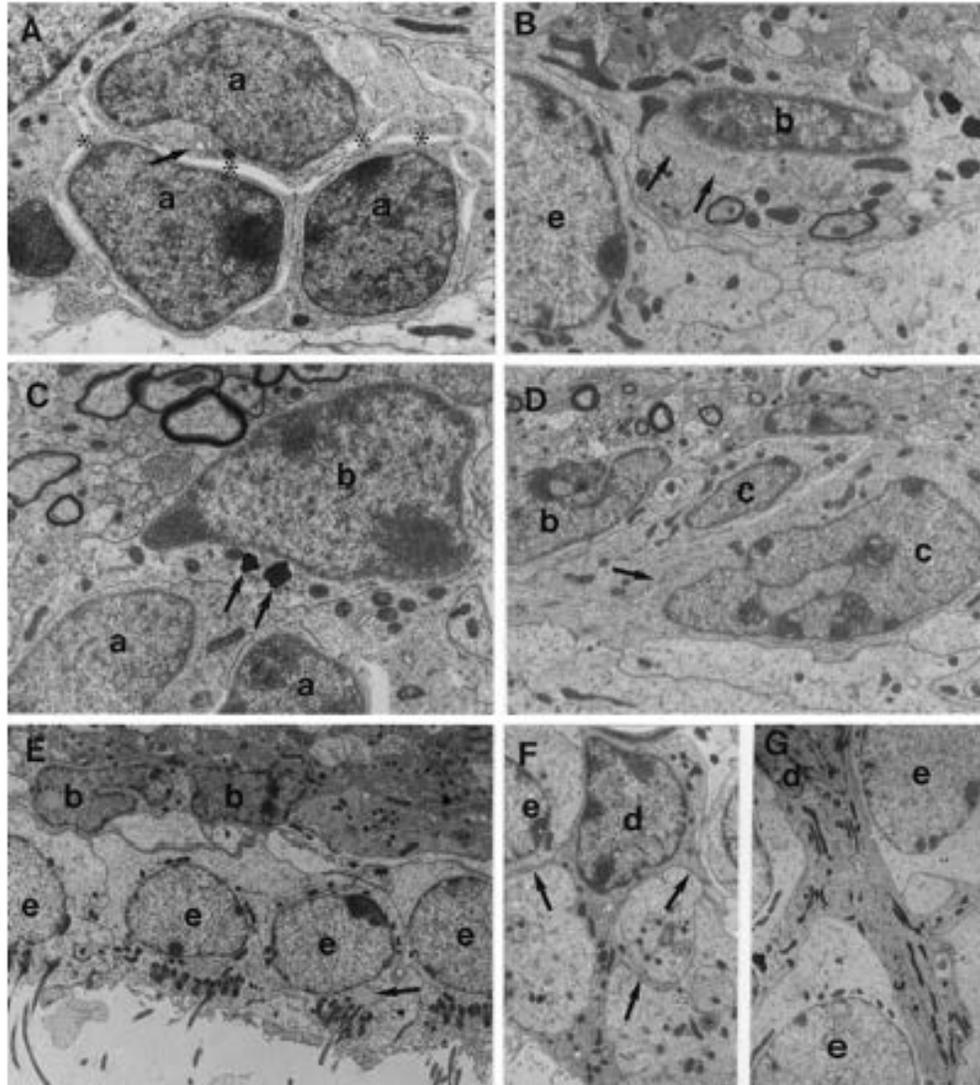


Figura 13. Micrografía electrónica que muestra los tipos celulares en la ZSV del ratón adulto. La identificación de los diferentes tipos celulares fue realizada en reconstrucciones seriadas, y no todas las características ultraestructurales están presentes en cada fotomicrografía. A, tres tipos de células A (a) mostrando un aparato de Golgi pequeño (flecha). La superficie de las células A es relativamente suave; su forma alargada no es visible en este corte. Las células tipo A están frecuentemente separadas por espacios extracelulares abiertos (asteriscos) y unidas por uniones complejas especializadas. Magnificación, 10 500x. B, las células tipo B1 tienen haces gruesos de filamentos intermedios (flecha) y contornos irregulares que penetran en ESpacio intracelular alrededor de ellos. Las células tipo B1 están localizadas en la interface entre las células ependimales (e) y el tejido adyacente. Magnificación 13 000x. C, las células tipo B2 (b) tienen cuerpos densos en su citoplasma (flechas) y están localizadas basalmente en la interface del parénquima estriatal y las células tipo A (a). Nótese los contactos de las células tipo B2 con los axones mielinizados y desmielinizados del parénquima estriatal. Magnificación 8 000x. D, las células tipo C contienen un claro aparato de Golgi (flecha). Magnificación, 6500x. E, células ependimales (e) yacen en la línea ventricular y frecuentemente están ciliadas, las gotas lipídicas (flechas) son únicas en las células ependimales. Nótese dos tipos de células B. Magnificación 3,800x. F, G. Tanacitos (d) son células oscuras no ciliadas que contactan el ventrículo exhiben ramificaciones laterales (flechas) que se interdigitalizan con las células ependimales (e) y con las células B. Magnificación 6 000x en F; 4 500x en G (Doetsch, *et al.*, 1997).

Tabla 4. Características morfológicas de los diferentes tipos celulares de la ZSV

	A Neuroblastos migratorios	B1 Astrositos	B2 Astrocitos	C Precursores intermedios	E Ependimales
Tamaño (µm)	31	58	43	62	117
Contorno	Alargado, uniforme	Irregular	Irregular	Uniforme, elíptico	Interdigital
Citoplasma	Oscuro, escaso	Claro (más que las B2)	Claro	Intermedio entre A y B	Muy claro
Núcleo	Alargado	Irregular	Irregular	Largo, esférico	Esférico
Nucleolo	2-4	1 a 2	1 a 2	Reticulado	1 a 2
Cromatina	Dispersa	No compacta	Compacta	La mayoría dispersa, alguna compacta	No compacta
RER	+	++	++	+++	+
Golgi	Pequeño	Medio	Medio	Largo	Pequeño
Mitocondria	+	+	+++	++	+++
Ribosomas libres	++++	+	++	+++	+
Filamentos intermedios	No	Si	Si	No	Si
Microtúbulos	++++	+	+	++	+
Gotas lipídicas	No	No	No	No	Si
Cuerpos densos	No	Si	Si	No	Si
Cilios, microvellosidades	No	Algunas veces	No	No	Ambos
Contactos	A-A, A-C	B-B, B-E	B-B, B-E	C-C, C-A	E-E, E-B

Estas características están basadas en la reconstrucción ultrafina de secciones seriadas de los diferentes tipos celulares. RER, retículo endoplásmico rugoso; + poco; ++ intermedio; +++ abundante; extremadamente abundante Adaptado de (Doetsch, *et al.*, 1997).

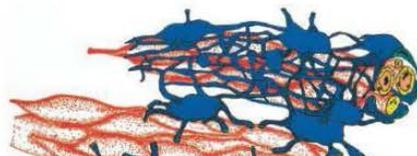
Corriente rostral migratoria

La CRM es una vía bien delimitada formada por dos tipos celulares: los neuroblastos migratorios y los astrocitos tipo B1. Los neuroblastos tienen una forma alargada y se encuentran estrechamente agrupados y unidos por especializaciones de membrana. Los grupos de neuroblastos migran de una forma especial denominada “migración en cadena” (Lois, *et al.*, 1996; Peretto, *et al.*, 1997; Pencea, *et al.*, 2001). Una característica importante de los neuroblastos es que continúan dividiéndose durante su migración, a diferencia de la mayoría de los neuroblastos del SNC (Smith y Luskin, 1998; Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002; Conover y Allen, 2002). La proliferación de los neuroblastos, sin embargo, disminuye considerablemente conforme se aproximan al bulbo olfatorio. En los roedores, la distancia total que recorren durante la migración es de 5-8mm. La velocidad de desplazamiento es de aproximadamente 30µm por hora; por lo que tardan entre 7-11 días en llegar a su destino final, el BO (Lois, *et al.*, 1996; Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002).

Por su parte los astrocitos tipo B1 envuelven a los neuroblastos formando una red tubular a través de la cual estos últimos migran (Fig.14). Las características ultraestructurales de estas células son muy parecidas o inclusive iguales a las que se observan en la ZSV, aunque con una tasa de proliferación mucho menor (Lois, *et al.*, 1996; Doetsch, *et al.*, 1997; Garcia-Verdugo, *et al.*, 1998). Aunque se desconoce su función ya que se ha mostrado que no son esenciales para la migración en cadena (Wichterle, *et al.*, 1997), pero factores secretados por ellos parecen aumentar la migración de los neuroblastos (Mason, *et al.*, 2001).

A

B



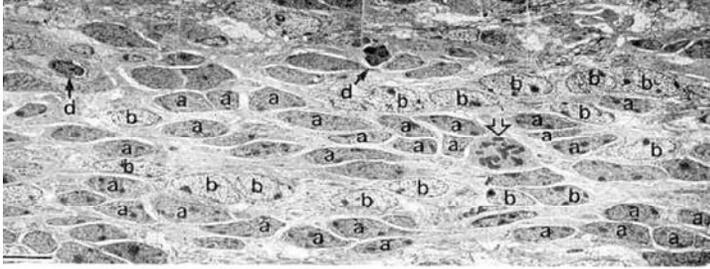


Fig. 14. A, Micrografía electrónica sagital la CRM del ratón adulto. Células A (a), forman cadenas flanqueadas por células B (b). Una célula en mitosis (flecha vacía) se presenta en una cadena de células A. Dos células muriendo (d) con núcleos picnóticos están presentes en la periferia la CRM. B, representación esquemática de la migración en cadena. Los neuroblastos (rojo) en la red de la ZSV y en la CRM, migran continuos formando largas cadenas envueltas por células gliales (azul) que tienen características astrocíticas, incluyendo densos paquetes de filamentos intermedios inmunoreactivos GFAP y pies terminales sobre vasos sanguíneos (flecha roja). Se ilustran dos cadenas, en la parte inferior solamente algunos de los astrocitos han sido dibujados para mostrar la apretada organización de los neuroblastos dentro de las cadenas. Las características intracelulares de algunas células B (azul claro) y células A (amarillo) son ilustradas. La mitosis de una célula A esta representada en la cadena inferior a la derecha. (Lois, *et al.*, 1996; Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002).

Bulbo olfatorio

El BO es una estructura que está constituida por seis capas (Fig. 15) que son: 1) La lamina del nervio olfatorio; 2) La lamina glomerular; 3) La lamina plexiforme externa; 4) La capa de las células mitrales; 5) la lamina plexiforme interna y 6) La lamina granular (G. M. Shepherd, 1972). Los neuroblastos migratorios que se generan en la ZSV migran en cadena, llegan al corazón del BO y se distribuyen radialmente a las láminas granular y glomerular en donde se diferencian como interneuronas (Smith y Luskin, 1998). Nada se conoce acerca de las señales que en el BO inducen el cambio de la forma de migración ya que la glía radial no está presente, ni de los procesos de diferenciación (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002). Además se ha reportado que el BO no es necesario para la migración rostral de los neuroblastos (Jankovski, *et al.*, 1998; Kirschenbaum, *et al.*, 1999).

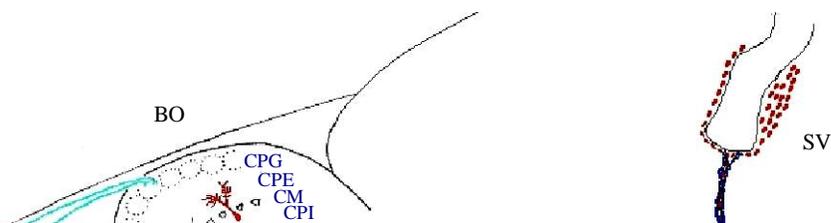


Fig. 15. Representación esquemática de un corte histológico del bulbo olfatorio mostrando la estructura de la organización laminar; CPG capa periglomerular; CPE capa plexiforme externa; CM capa mitral; CPI capa plexiforme interna; CG capa granular. Nótese que la conexión olfatoria ha sido simplificada para mayor entendimiento. Adaptado de (Gordon M. Shepherd y Greer, 1998).

A continuación se presenta de manera muy resumida los elementos neuronales que constituyen a la vía olfatoria (Fig. 16). La entrada sensorial está dada por los axones de las neuronas sensoriales olfatorias (NSO), cuyo neurotransmisor principal es el glutamato. Una vez que los axones de las NSO atraviesan la lámina basal del neuroepitelio olfatorio, después de atravesar a la lámina cribosa, entran al bulbo olfatorio y se dirigen hacia los glomérulos olfatorios. Los glómérulos son estructuras esféricas de neuropilo que tienen entre 40 y 100 μm de diámetro que, además de recibir a la aferente primaria sensorial, contienen las dendritas apicales de las neuronas mitrales. En uno de los casos más extremos de convergencia en el sistema nervioso, miles de axones de las NSO establecen sinapsis con las dendritas de sólo 5-25 células mitrales en cada glomérulo; sin embargo esta proyección es específica a ciertos glomérulos (Gordon M. Shepherd y Greer, 1998; Doetsch y Hen, 2005).

La salida de información del bulbo olfatorio está dada por los axones de las células mitrales y las células *en penacho*, ambas glutamatérgicas. Cada célula mitral origina una dendrita primaria, la cual atraviesa la capa plexiforme externa (CPE) y termina dentro

de un glomérulo elaborando un penacho. El penacho tiene un diámetro de 50-150 μm y se extiende en todo el glomérulo. Cada célula mitral da origen a varias dendritas secundarias que se ramifican discretamente en la CPE. Los axones de las células mitrales forman al tracto olfatorio lateral. Dentro del bulbo olfatorio, los axones dan origen a *colaterales recurrentes*, las cuales permanecen en la capa granular y en la capa plexiforme interna. Las células *en penacho* (15-20 μm de diámetro) están localizadas más superficialmente en la CPE. Esta denominación es genérica puesto que se han descrito diversos subtipos para estas células. Sin embargo, tienen en común una dendrita primaria que termina dentro de un glomérulo elaborando un penacho relativamente limitado. Además sus axones también constituyen una fracción del tracto olfatorio lateral (Gordon M. Shepherd y Greer, 1998; Doetsch y Hen, 2005).

Alrededor de los glomérulos se encuentran los somas de las células periglomerulares (PGC), interneuronas con 6-8 μm de diámetro. Cada PGC posee una pequeña y tupida dendrita que arboriza alrededor de 50-100 μm dentro de un glomérulo; siendo muy raras las PGC que inervan a dos glomérulos. Sus ramas dendríticas se conectan con las terminales de los axones olfatorios y las ramas de las células mitrales y *en penacho*. El axón de las PGC se distribuye lateralmente dentro de regiones extraglomerulares, extendiéndose hasta cinco glomérulos posteriores. Debido a que su axón permanece dentro del bulbo olfatorio, las PGC son clasificadas como *células de axón corto*. Las células periglomerulares producen GABA y dopamina, y se ha reportado una amplia variedad fenotípica e incluso la colocalización de ambos neurotransmisores en la misma PGC (Gordon M. Shepherd y Greer, 1998; Doetsch y Hen, 2005; Hack, *et al.*, 2005).

Debajo de la capa de células mitrales se encuentra una capa gruesa que contiene los somas de las células granulares (GRC), interneuronas cuyo tamaño (6-8 μm de diámetro) las coloca como una de las células más pequeñas del SNC. Los somas de las

GRC se encuentran agrupados en la capa granular. Cada GrC da origen a un proceso superficial que se extiende radialmente a través de la superficie y se ramifica y termina en la CPE; su campo de ramificación se extiende entre 50-200 μm . Las GrC poseen otro proceso que se ramifica discretamente dentro de la capa granular. Así como en las periglomerulares, existe una diversidad de subtipos de las GrC, sin embargo todas poseen la característica notable de la ausencia de axón. Las GrC son GABAérgicas y glicinérgicas. Existe un último grupo de interneuronas en el bulbo olfatorio, las células de axón corto, las cuales se pueden encontrar escasamente en la capa glomerular y más frecuentemente en la capa granular. En esta última capa, se han descrito diversos subtipos con árboles dendríticos de longitud variable, y axones que se ramifican en la CPE o la capa granular (Gordon M. Shepherd y Greer, 1998; Doetsch y Hen, 2005).

El bulbo olfatorio también recibe aferentes desde las neuronas piramidales de la corteza olfatoria las cuales terminan en la capa granular. De igual manera, el núcleo olfatorio anterior manda proyecciones hacia la misma capa y hacia la capa glomerular. Desde el tallo cerebral llegan fibras noradrenérgicas provenientes del *locus coeruleus*, así como serotoninérgicas provenientes del complejo del *raphé rostral*; ambas inervan principalmente a la capa glomerular (Gordon M. Shepherd y Greer, 1998; Doetsch y Hen, 2005).

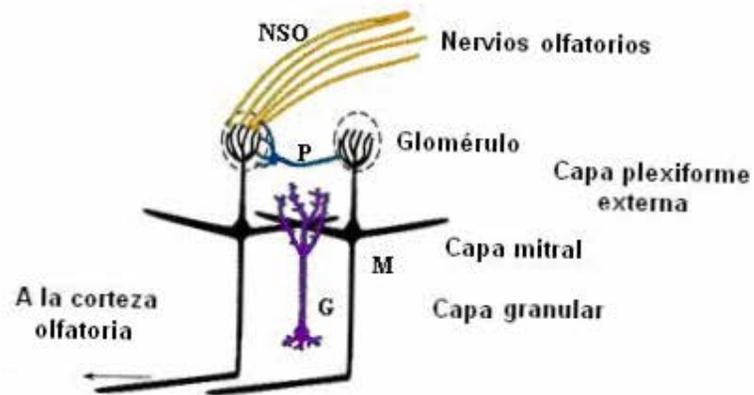


Fig. 16. Circuito del bulbo olfatorio (BO). Las neuronas sensoriales olfatorias (NSO) expresan el mismo receptor que converge dentro de un solo glomérulo y hace sinapsis con las células mitrales (M), las principales células de salida del BO. Las células mitrales envían una sola dendrita apical al glomérulo y extienden numerosas dendritas laterales en la capa plexiforme externa. Las células tufted no se representan por simplicidad. Las neuronas periglomerulares (P) y granulares (G) son interneuronas inhibitorias. Las neuronas periglomerulares se encuentran en la capa glomerular y hacen sinapsis dendro-dendríticas con las dendritas de la célula apical mitral y las NSOs. Las neuronas granulares hacen sinapsis dendro-dendríticas con las dendritas laterales de las células mitrales y median la inhibición lateral. Adaptado de (Doetsch y Hen, 2005)

Bibliografía

- Altman, J. “**Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.**” *J Comp Neurol* 137 (4): 433-57, (1969).
- Altman, J. y Das, G.D. “**Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.**” *J Comp Neurol* 124 (3): 319-35, (1965).
- Altman, J. y Das, G.D. “**Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions.**” *J Comp Neurol* 126 (3): 337-89, (1966).
- Alvarez-Buylla, A. y Garcia-Verdugo, J.M. “**Neurogenesis in adult subventricular zone.**” *J Neurosci* 22 (3): 629-34, (2002).
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M. y Tramontin, A.D. “**A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells.**” *Nat Rev Neurosci* 2 (4): 287-93, (2001).
- Allen, E. “The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat.” *J. Comp. Neurol.* 19: 547-568, (1912).
- Bedard, A. y Parent, A. “**Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb.**” *Brain Res Dev Brain Res* 151 (1-2): 159-68, (2004).
- Conover, J.C. y Allen, R.L. “**The subventricular zone: new molecular and cellular developments.**” *Cell Mol Life Sci* 59 (12): 2128-35, (2002).
- Cooper-Kuhn, C.M. y Kuhn, H.G. “**Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain.**” *Brain Res Dev Brain Res* 134 (1-2): 13-21, (2002).
- Craig, C.G., D’sa, R., Morshead, C.M., Roach, A. y van der Kooy, D. “**Migrational analysis of the constitutively proliferating subependyma population in adult mouse forebrain.**” *Neuroscience* 93 (3): 1197-206, (1999).
- Doetsch, F. y Alvarez-Buylla, A. “**Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain.**” *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (25): 14895-900, (1996).
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M. y Alvarez-Buylla, A. “**Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain.**” *J Neurosci* 17 (13): 5046-61, (1997).
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M. y Alvarez-Buylla, A. “**Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain.**” *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (20): 11619-24, (1999).
- Doetsch, F. y Hen, R. “**Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain.**” *Curr Opin Neurobiol* 15 (1): 121-8, (2005).
- Frielingsdorf, H., Schwarz, K., Brundin, P. y Mohapel, P. “**No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra.**” *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (27): 10177-82, (2004).

- Fukushima, N., Yokouchi, K., Kawagishi, K. y Moriizumi, T. **“Differential neurogenesis and gliogenesis by local and migrating neural stem cells in the olfactory bulb.”** *Neurosci Res* 44 (4): 467-73, (2002).
- Gage, F.H. **“Neurogenesis in the adult brain.”** *J Neurosci* 22 (3): 612-3, (2002).
- Garcia-Verdugo, J.M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D.A. y Alvarez-Buylla, A. **“Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells.”** *J Neurobiol* 36 (2): 234-48, (1998).
- Gould, E. y Gross, C.G. **“Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems.”** *J Neurosci* 22 (3): 619-23, (2002).
- Gould, E., Reeves, A.J., Graziano, M.S. y Gross, C.G. **“Neurogenesis in the neocortex of adult primates.”** *Science* 286 (5439): 548-52, (1999).
- Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., Galli, R., Verdugo, J.M., Herrera, D.G. y Vescovi, A.L. **“Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents.”** *J Neurosci* 22 (2): 437-45, (2002).
- Gross, C.G. **“Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma.”** *Nat Rev Neurosci* 1 (1): 67-73, (2000).
- Guillemot, F. y Parras, C. **“Adult neurogenesis: a tale of two precursors.”** *Nat Neurosci* 8 (7): 846-8, (2005).
- Hack, M.A., Saghatelian, A., de Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P.M. y Gotz, M. **“Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis.”** *Nat Neurosci* 8 (7): 865-72, (2005).
- Jankovski, A., Garcia, C., Soriano, E. y Sotelo, C. **“Proliferation, migration and differentiation of neuronal progenitor cells in the adult mouse subventricular zone surgically separated from its olfactory bulb.”** *Eur J Neurosci* 10 (12): 3853-68, (1998).
- Kaplan, M.S. **“Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex.”** *J Comp Neurol* 195 (2): 323-38, (1981).
- Kaplan, M.S. y Hinds, J.W. **“Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs.”** *Science* 197 (4308): 1092-4, (1977).
- Kempermann, G. **“Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis.”** *J Neurosci* 22 (3): 635-8, (2002).
- Kempermann, G. y Gage, F.H. **“New nerve cells for the adult brain.”** *Sci Am* 280 (5): 48-53, (1999).
- Kirschenbaum, B., Doetsch, F., Lois, C. y Alvarez-Buylla, A. **“Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb.”** *J Neurosci* 19 (6): 2171-80, (1999).
- Kornack, D.R. y Rakic, P. **“Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (10): 5768-73, (1999).
- Kornack, D.R. y Rakic, P.^a **“Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex.”** *Science* 294 (5549): 2127-30, (2001).

- Kornack, D.R. y Rakic, P.^b **“The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (8): 4752-7, (2001).
- Li, Z., Kato, T., Kawagishi, K., Fukushima, N., Yokouchi, K. y Moriizumi, T. **“Cell dynamics of calretinin-immunoreactive neurons in the rostral migratory stream after ibotenate-induced lesions in the forebrain.”** *Neurosci Res* 42 (2): 123-32, (2002).
- Lim, D.A. y Alvarez-Buylla, A. **“Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (13): 7526-31, (1999).
- Lois, C. y Alvarez-Buylla, A. **“Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (5): 2074-7, (1993).
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M. y Alvarez-Buylla, A. **“Chain migration of neuronal precursors.”** *Science* 271 (5251): 978-81, (1996).
- Luskin, M.B. **“Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone.”** *Neuron* 11 (1): 173-89, (1993).
- Mason, H.A., Ito, S. y Corfas, G. **“Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents.”** *J Neurosci* 21 (19): 7654-63, (2001).
- Menezes, J.R., Marins, M., Alves, J.A., Froes, M.M. y Hedin-Pereira, C. **“Cell migration in the postnatal subventricular zone.”** *Braz J Med Biol Res* 35 (12): 1411-21, (2002).
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S. y van der Kooy, D. **“Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells.”** *Neuron* 13 (5): 1071-82, (1994).
- Nicholls, J.G. y Nicholls, J.G. **From neuron to brain.** Sunderland, Mass., Sinauer Associates. (2001).
- Nottebohm, F. **“Why are some neurons replaced in adult brain?”** *J Neurosci* 22 (3): 624-8, (2002).
- Nowakowski, R.S., Lewin, S.B. y Miller, M.W. **“Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population.”** *J Neurocytol* 18 (3): 311-8, (1989).
- Pencea, V., Bingaman, K.D., Freedman, L.J. y Luskin, M.B. **“Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain.”** *Exp Neurol* 172 (1): 1-16, (2001).
- Peretto, P., Merighi, A., Fasolo, A. y Bonfanti, L. **“Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat.”** *Brain Res Bull* 42 (1): 9-21, (1997).
- Rakic, P. **“Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis.”** *J Neurosci* 22 (3): 614-8, (2002).

- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinajosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-Garcia Verdugo, J., Berger, M.S. y Alvarez-Buylla, A. **“Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration.”** *Nature* **427** (6976): 740-4, (2004).
- Shepherd, G.M. **“Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb.”** *Physiol Rev* **52** (4): 864-917, (1972).
- Shepherd, G.M. y Greer, C.A. (1998). **Olfactory Bulb. The synaptic organization of the brain.** G. M. Shepherd. New York, Oxford University Press, Inc.: 638.
- Smith, C.M. y Luskin, M.B. **“Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream.”** *Dev Dyn* **213** (2): 220-7, (1998).
- Sugita, N. **“Comparative studies on the growth of the cerebral cortex.”** *J. Comp. Neurol.* **29**: 61-117, (1918).
- Suzuki, S.O. y Goldman, J.E. **“Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration.”** *J Neurosci* **23** (10): 4240-50, (2003).
- Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D., Thompson, C., Goridis, C., Rutishauser, U. y Magnuson, T. **“Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system.”** *Neuron* **11** (6): 1163-74, (1993).
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C. y Reynolds, B.A. **“Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis.”** *J Neurosci* **16** (23): 7599-609, (1996).
- West, M.J., Slomianka, L. y Gundersen, H.J. **“Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator.”** *Anat Rec* **231** (4): 482-97, (1991).
- Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M. y Alvarez-Buylla, A. **“Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration.”** *Neuron* **18** (5): 779-91, (1997).
- Winner, B., Cooper-Kuhn, C.M., Aigner, R., Winkler, J. y Kuhn, H.G. **“Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb.”** *Eur J Neurosci* **16** (9): 1681-9, (2002).
- Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R.M., Johansson, C.B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisen, J. y Janson, A.M. **“Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (13): 7925-30, (2003).