



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

TESIS:

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UN CÚMULO DE CÉLULAS
GFAP+/NESTINA+ DEL TECHO DEL ACUEDUCTO DE SILVIO**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARIANNE LIZETH MARTÍNEZ MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
DR. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM

Querétaro, Qro., México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RESUMEN

El acueducto de Silvio forma parte del sistema ventricular, está rodeado por la sustancia gris periacueductal (PAG) del mesencéfalo, conectando el tercer y cuarto ventrículo. En esta tesis, se describe un nicho de células con propiedades de células madre que se encuentra en el techo del acueducto de Silvio, empleando una batería de marcadores selectivos de células madre y líneas de ratones transgénicos. Este grupo celular se denominó: DAN (nicho del acueducto dorsal). Los somas de las células del DAN se localizan hacia la luz del ventrículo formando múltiples capas en estrecha asociación con el líquido cefalorraquídeo. Un solo proceso emerge del soma y se proyecta hacia el parénquima, mientras que otros procesos entran en contacto con los vasos sanguíneos o incluso los envuelven. Estas células expresan varios marcadores de células madre/glía, como las proteínas de filamento intermedio, proteína ácido glial fibrilar (GFAP), vimentina y nestina, el transportador de glutamato GLAST o precursores de oligodendrocitos como NG2, PDGFR α u Olig2, lo que sugiere el alto potencial de esta región como un nicho para la generación de nuevas células. Según su morfología y su inmunoreactividad, las células DAN se asemejan a los tanicitos, células ependimarias especializadas que se encuentran principalmente en el tercer ventrículo. Los tanicitos transfieren señales bioquímicas del líquido cefalorraquídeo al sistema nervioso central y muestran capacidad proliferativa. Se realizaron pruebas de proliferación celular mediante la incorporación de BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina), y se encontró que las células del DAN lo incorporan de forma basal, además expresan Ki67, un marcador bien establecido de proliferación celular endógeno. En conclusión, mis resultados sugieren que las células de la región dorsal del acueducto de Silvio similares a tanicitos, forman un novedoso nicho de células en el cerebro de ratón adulto con potencial proliferativo en condiciones basales.

ABSTRACT

The aqueduct of Sylvius is part of the ventricular system, surrounded by the midbrain periaqueductal gray matter (PAG), connecting the third and fourth ventricles. Here, we describe a new group of cells with stem cell properties found in the roof of the aqueduct of Sylvius, using a battery of selective stem cell markers and transgenic mouse lines. This region was named: DAN (dorsal aqueduct niche). The somas of DAN cells are located toward the ventricular lumen forming multiple layers in close association with the cerebrospinal fluid. A single process emerges from the soma and projects into the parenchyma, while other processes contact or even enwrap blood vessels. These cells express several radial stem cell/glia markers, such as intermediate filament proteins, glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and nestin, the glutamate transporter GLAST or oligodendrocyte precursors like NG2, PDGFR α or Olig2, suggesting the high potential of this region as a niche for the generation of new cells. According to their morphology, DAN cells resemble tanycytes, specialized ependymal cells found mainly in the third ventricle. Tanycytes transfer biochemical signals from the cerebrospinal fluid to the central nervous system and show proliferative capacity. Furthermore, these tanycyte-like ependymal cells can proliferate, as shown by BrdU integration and Ki67 expression, well-established markers of cell proliferation. In conclusion, our results suggest that cells from the dorsal region of the aqueduct of Sylvius similar to tanycytes form a novel cell niche in the adult mouse brain with proliferative potential in basal conditions.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A mi familia

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Instituto de Neurobiología (INB)

Tutor

Dr. Ataúlfo Martínez Torres.

Comité Tutor

Dr. Iván Velasco Velázquez y Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda.

Jurado de Examen

Dr. Jorge Antonio Larriva Sahd; Dr. Ataúlfo Martínez Torres; Dra. María de Lourdes Massieu Trigo; Dr. Miguel Ángel Pérez de la Mora y Dra. Wendy Portillo Martínez.

Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular (D15)

Técnico Académico Dra. Ángeles Edith Espino Saldaña

Auxiliar de laboratorio Marina Ramírez Romero

Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz, Dra. Cynthia Alejandra Rodríguez Arzate, Dr. Pablo Ordaz Ramos y a todos los compañeros del laboratorio.

Unidad de enseñanza

M. en C. Leonor Casanova Rico

A la Unidad de Microscopía

Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y Ma. Lourdes Palma Tirado.

Bioterio

Dra. Alejandra Castilla León; MVZ. María Antonieta Carbajo; MVZ. José Martín García Servín y LAV. Efrén Ruiz Alcibar.

Videoconferencia

Lic. en Psicología Ma. de Lourdes Lara Ayala; M. Moisés Mendoza Baltzar.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Fondos para la investigación: CONACYT A1S7659. Becario 597956.

UNAM-DGAPA-PAPIIT: IN204520.

Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM

No. de cuenta 516021687

Para mi mamá, mi bro y don Fede.

¡GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

Resumen	2
Abstract	3
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	12
Sistema ventricular.....	12
Nichos neurogénicos.....	13
Tanicitos.....	14
Marcadores de células progenitoras	17
Del cuarto ventrículo al Acueducto de Silvio	21
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Inmunohistofluorescencias.....	25
Tinción de Golgi-Cox.....	25
Vasculatura	26
Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	26
Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y tinción con azul de toluidina....	27
Análisis de proliferación celular	28
Conteo de células y análisis de imágenes.....	29
RESULTADOS	30
Identificación del DAN	30
Morfología celular y organización de la pared dorsal del acueducto	31

Nestina	34
Vimentina	35
GLAST.....	36
Asociación del DAN con la vasculatura	37
Microglía.....	38
Contribución del linaje oligodendroglial al DAN.....	39
Linaje neuronal.....	41
Ensayo de proliferación	42
Superficie ventricular del acueducto de Silvio	45
Características ultraestructurales del DAN y del AS dorsolateral	47
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIÓN	58
PERSPECTIVAS.....	60
REFERENCIAS.....	61
LISTA DE FIGURAS.....	72
LISTA DE TABLAS	73
INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....	74

ABREVIATURAS

3V	Tercer ventrículo
4V	Cuarto ventrículo
AS	Acueducto de Silvio
DAN	Nicho del acueducto dorsal
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
GFAP	Proteína ácido glial fibrilar
GLAST	Transportador de Glutamato
LCR	Líquido cefalorraquídeo
NeuN	Transportador de Monocarboxilatos
NG2	Proteoglicano de condroitina
PAG	Sustancia gris periacueductal
PDGFRα	Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SNC	Sistema Nervioso Central
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
VL	Ventrículos laterales
V-SVZ	Zona ventricular-subventricular

1. INTRODUCCIÓN

El sistema ventricular contiene el líquido cefalorraquídeo (LCR) que es producido por los plexos coroideos, estructuras epiteliales altamente vasculares, ubicadas dentro de los ventrículos (Lowery et al., 2009). Las células epiteliales que recubren este sistema ventricular son llamadas endotelios o células endoteliales, son de origen endotelial glial y por lo que expresan la proteína ácida glial fibrilar (GFAP), así como por la presencia de cilios y microvellosidades en su cara apical, la cual da a la luz del ventrículo y está en contacto con el LCR formando una interfaz entre éste y el parénquima (Rodríguez et al., 2005). El sistema ventricular está formado por una serie de cavidades o ventrículos conectados entre sí y son: dos laterales (VL), el tercero (3V) y el cuarto (4V). El tercer y cuarto ventrículos están comunicados entre sí por el acueducto cerebral o de Silvio (Figura 1A) a través del cual fluye el LCR (Mortazavi et al., 2014). Este acueducto está rodeado por el PAG (sustancia gris periacueductal), que se sabe juega un papel crucial en la modulación del procesamiento sensorial, y la estimulación eléctrica del PAG provoca inhibición del dolor. Además, es un área cerebral implicada en analgesia por morfina y en el control endógeno del dolor (Gao et al., 2019).

Hasta ahora, numerosos estudios sobre la diversidad celular de las células endoteliales que rodean los ventrículos han proporcionado descripciones detalladas de su morfología y función. Por ejemplo, en el hipotálamo, en la base del tercer ventrículo se encuentra un tipo celular morfológica y funcionalmente distinto, ya que está intercalado entre las células endoteliales: los tanicitos. Estas células se definen por la presencia de un proceso único y largo que se extiende desde el espacio perivascular de una red capilar y penetra profundamente en el tejido nervioso (Horstmann 1954), anclado en la membrana basal ventricular, formando una interfaz entre el parénquima y el LCR (Peruzzo et al., 2004).

Los tanicitos exhiben una morfología análoga se parecen morfológicamente a la de la glía radial, que durante el desarrollo de la corteza desempeña el papel de células progenitoras neurales y forma un andamio para la migración de las neuronas recién

generadas. Éstas se clasifican en cuatro tipos, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ según su ubicación, morfología, ultraestructura y función. Expresan GFAP, GLAST (transportador de glutamato-aspartato), nestina y vimentina, marcadores asociados con células precursoras neurales, (Goodman & Hajihosseini, 2015, Bolborea & Dale, 2013). Un estudio reveló que los subtipos $\alpha 2$ y $\beta 2$ pueden generar derivados gliales o neuronales (Robins et al., 2013), semejando al epitelio ventricular primordial. Más recientemente, se encontraron poblaciones similares a los tanicitos en el piso del cuarto ventrículo, pero su función aún se ignora (Mirzadeh et al., 2017). Además, se describió un grupo de células con características morfológicas similares a esta población a lo largo de la línea media del cerebelo, en el techo del cuarto ventrículo, que contacta con la región más caudal del acueducto (González-González et al., 2017). Estas células expresan GFAP, nestina y vimentina, pero no proliferan activamente; es decir, no incorporan BrdU (análogo de la timidina que se incorpora a las células en división durante la síntesis de ADN) tanto en condiciones basales como de hipoxia (González-González et al., 2017, Becerra-González et al., 2019).

En estudios preliminares en los que se utilizaron ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente bajo el promotor GFAP (hGFAP-eGFP; Nolte et al., 2001) en Bregma -2.92mm a -5.02mm (Paxinos, 2001), se encontró una formación particular de células localizadas en el ápice dorsomedial periacueductal distribuidas de manera estratificada, que se dirigen hacia el parénquima con procesos largos y los somas dirigidos hacia la luz del ventrículo formando múltiples capas celulares, algunos procesos de estas células terminan contactando con vasos sanguíneos, incluso rodeándolos. A este grupo de células se les denominó DAN (nicho del acueducto dorsal) y están inmersas en la región dorsal de la sustancia gris periacueductal (PAG). Este arreglo celular es diferente a los observados en las paredes laterales del acueducto, en las cuáles solo se presenta la monocapa epitelial que forma la interfaz con el fluido cerebroespinal y que carece de procesos largos.

Debido a que las células del DAN tienen características morfológicas parecidas a los tanicitos, el objetivo de este trabajo fue describir la organización de este nicho

celular y determinar si tienen potencial proliferativo, utilizando diferentes metodologías incluyendo microscopía electrónica de transmisión, de barrido, de epifluorescencia y confocal, así como ensayos de proliferación celular con BrdU e inmunohistofluorescencia con una serie de anticuerpos primarios.

2. ANTECEDENTES

2.1 Sistema ventricular

La porción interna de las cavidades ventriculares conforma una región altamente conservada. Este sistema es crucial para el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central (SNC). El sistema ventricular está formado por una serie de cavidades conectadas que se encuentran en la parte profunda del cerebro y que contienen al líquido cefalorraquídeo. Las cavidades o ventrículos están revestidas por un neuroepitelio asociado con estructuras secretoras. El LCR se produce principalmente en los plexos coroideos, estructuras altamente vascularizadas ubicadas dentro de los ventrículos, también algunas de las células que recubren los ventrículos pueden producir LCR. El control de flujo de LCR se cree que se origina por gradientes de presión producidos por secreción y movimiento ciliar (Lowery et al., 2009). Este sistema es un componente clave en la regulación de la neurogénesis adulta tanto en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) que se encuentra adyacente a los ventrículos laterales como en la zona subgranular del hipocampo (Lun et al., 2015).

Los ventrículos cerebrales se describieron por primera vez hace más de dos mil años y están compuestos por cuatro ventrículos conectados: dos ventrículos laterales dentro del cerebro, un tercer ventrículo dentro del diencefalo y un cuarto ventrículo entre el cerebelo y la protuberancia, (Figura 1). Los ventrículos laterales están conectados con el tercer ventrículo, que está unido al cuarto ventrículo a través del acueducto de Silvio. A su vez, el cuarto ventrículo se une al canal central

de la médula espinal y al espacio subaracnoideo que envuelve el cerebro (Lowery et al., 2009).

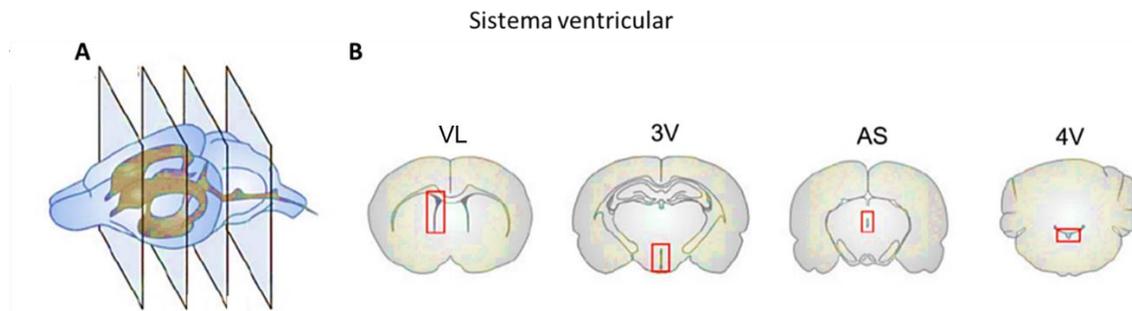


Figura 1. Sistema ventricular. A) Encéfalo de murino en posición sagital que muestra el sistema ventricular, B) cortes a diferentes coordenadas en orientación coronal anteroposterior, donde se observan los ventrículos laterales (VL), tercer ventrículo (3V), acueducto de Silvio (AS) y cuarto ventrículo (4V). (Modificado de Hermann et al., 2009).

2.2 Nichos neurogénicos

La zona germinal más grande del cerebro del roedor adulto se encuentra dentro de la región periventricular de los VL, llamada zona subventricular (SVZ), y en la zona subgranular en el giro dentado dentro del hipocampo, por lo tanto, estas regiones son llamadas nichos neurogénicos del cerebro adulto. Las neuronas generadas migran rostralmente hacia el bulbo olfatorio, donde maduran principalmente a interneuronas. Estos nichos contienen por lo menos tres tipos celulares diferentes, definidos por su morfología, ultraestructura y marcadores moleculares. Las células A, que son neuronas migratorias jóvenes, células germinales denominadas células B, que proliferan lentamente, para dar a lugar a las células tipo C, que son precursores altamente proliferativos (Figura 2), (Alvarez-Buylla & García-Verdugo, 2002). La SVZ es separada de la cavidad ventricular por células endimarias (células tipo E). Hay tres tipos: E1, células endimarias multiciliadas, E3 que tienen un cilio primario, similar a la glía radial y que están asociadas a células Ki67⁺ y E2, la mayoría de estas células tienen 1 ó 2 cilios largos, estos dos últimos tipos celulares participan regulando la actividad progenitora y sensando los metabolitos del LCR. Algunos datos sugieren que las células E2 podrían corresponder a α -

tanicitos, mientras que las E3 corresponden a β -tanicitos, los cuales podrían retener un potencial proliferativo (Mirzadeh et al., 2017).

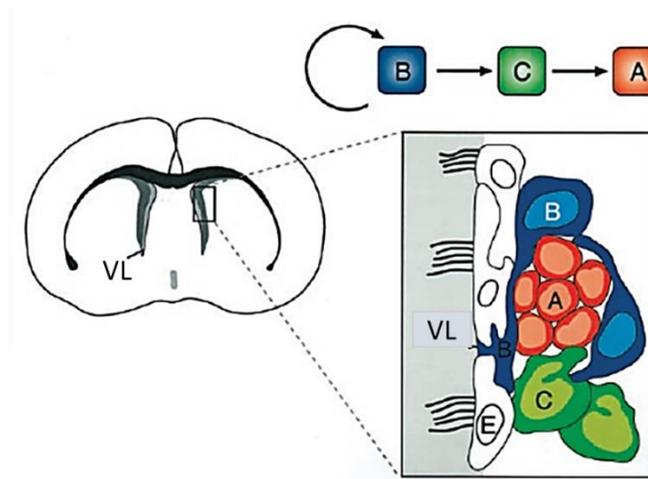


Figura 2. Organización y linaje en la zona subventricular. Esquema del corte coronal de cerebro de ratón, donde se localiza la zona subventricular, indicando en el recuadro la pared lateral de los ventrículos laterales. A la derecha la organización y tipos celulares: las células A (rojas), rodeadas por las células B (azules) las cuales tienen características astrocíticas y forman estructuras en tubulares y las células C (verde). Las células B generan células C que a su vez generan a las células A. Las células ependimales poseen los cilios encargados del movimiento del líquido cefalorraquídeo (Modificado de Alvarez-Buylla & García-Verdugo, 2002).

2.3 Tanicitos

Es un grupo de células ependimales altamente especializadas, que han sido descritas en la base del tercer ventrículo y más recientemente en el piso del cuarto ventrículo. Estas células emergen alrededor del día embrionario 17 (E17) en ratones (Goodman & Hajihosseini, 2015). Tienen potenciales de reposo muy negativos, exhiben resistencias de entrada muy bajas y no muestran signos de fluctuaciones espontáneas en el potencial de membrana. Sus membranas son altamente selectivas para K^+ . En conjunto, estas características son similares a las de los astrocitos y, al igual que algunos astrocitos, los tanicitos exhiben acoplamiento

eléctrico entre sí. Los tanicitos responden a varios transmisores, especialmente ATP, histamina y acetilcolina (ACh), al exhibir señales de Ca^{2+} rápidas y robustas (Bolborea & Dale, 2013).

Están morfológicamente definidos por la presencia de un solo proceso largo que se extiende del espacio perivascular de la red de capilares y que penetra profundamente dentro del tejido nervioso (Horstmann 1954). Estos tanicitos endodimales unen los sistemas ventricular y vascular, formando una interfaz entre la sangre y el LCR, jugando un papel central en el control del balance energético en el SNC (Peruzzo et al., 2004). Son células polarizadas que expresan activamente transportadores de glucosa, de glutamato, receptores al GABA y componentes de la vía endocítica como la clatrina (Rodríguez et al., 2005).

Los tanicitos son una población de células heterogéneas, muestran diferentes características con respecto a su ubicación, relaciones espaciales, morfología, citoquímica, ultraestructura y funciones. Existe evidencia suficiente para proponer que los cuatro tipos de tanicitos corresponden a cuatro tipos de células diferentes, cada uno con un fenotipo distinto dividida en cuatro subtipos, ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$) dependiendo de la posición dorso ventral de sus cuerpos celulares, proyección de sus procesos basales (Figura 3) y expresión de marcadores específicos, (Rodríguez et al., 2019), (Tabla I, Robins et al., 2013).

Los tanicitos $\alpha 1$ se ubican en la parte media del tercer ventrículo y proyectan su proceso hacia el núcleo ventromedial, mientras que los tanicitos $\alpha 2$ se observan ventralmente proyectando hacia el núcleo arcuato (ARC). Los tanicitos $\beta 1$ y $\beta 2$ se encuentran, respectivamente, en la porción lateral o medial del piso del tercer ventrículo y envían sus proyecciones ventrolateralmente ($\beta 1$) o ventralmente ($\beta 2$) al plexo de los capilares fenestrados del sistema porta ubicados en la capa externa de la eminencia media (De Francesco et al., 2017).

Se ha sugerido a los tanicitos como posibles precursores de células hipotalámicas ya que comparten las características de los precursores neuronales de la zona subventricular (SVZ) y la zona del giro dentado (SGZ) (Robins et al., 2013).

Los tanicitos se parecen a la glía radial, que durante el desarrollo de la corteza juegan el papel de las células progenitoras neurales y forman un andamio para la migración de nuevas neuronas. Este proceso es llevado a cabo mediante el ATP que actúa a través de los receptores P2Y1 para la generación de las ondas de calcio en las células progenitoras. Los tanicitos poseen algunos de los sistemas de señalización: pueden liberar ATP, poseer receptores P2Y1 y responder a la activación de las ondas de calcio (Bolborea et al., 2013).

Un estudio reveló que los tanicitos de los subtipos $\alpha 2$ y $\beta 2$ pueden generar derivados gliales o neuronales (Robins et al., 2013). Más recientemente se encontraron poblaciones similares a los tanicitos en el piso del cuarto ventrículo, pero su papel funcional aún no ha sido establecido (Mirzadeh et al., 2017).

Marcador	$\alpha 1$ - Tanicitos	Dorsal- $\alpha 2$ Tanicitos	Ventral- $\alpha 2$ Tanicitos	B- Tanicitos	Ependimocitos	Astrocitos subventriculares
Nestina	+	+	+	++	+/-	-
Vimentina	+	+	+	++	+/-	-
GFAP	+/-	+	-	-	+/-	+
GLAST	+/-	+	-	-	+/-	+

Tabla 1. Marcadores de identidad de tanicitos y su clasificación. Modificada de Robins et al., 2013. (+) Representa la expresión del marcador indicado. (-) No se expresa el marcador y (+/-) el marcaje depende del subtipo celular.

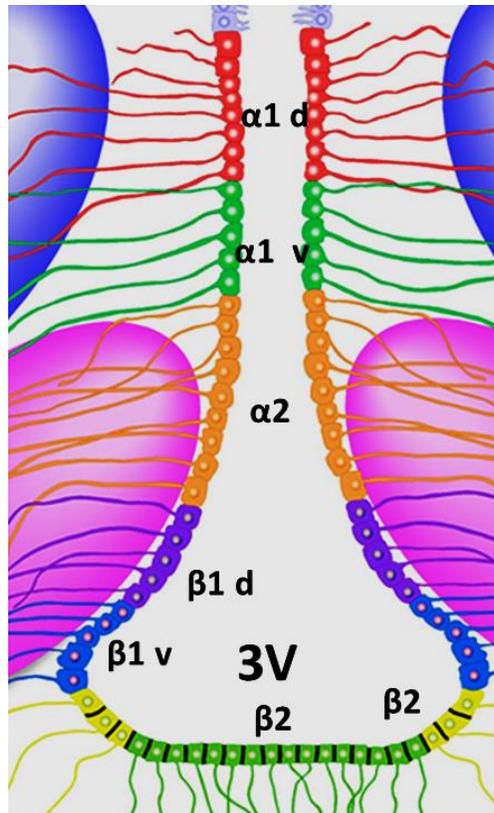


Figura 3. Esquema de la localización de los tanicitos. Posición dorso ventral de los tanicitos, los α -tanicitos tienen procesos largos que pueden contactar con el núcleo ventromedial y ventralmente hacia el núcleo arcuato, mientras que los β -tanicitos envían sus procesos al núcleo arcuato y capilares fenestrados portal ubicados en la capa externa de la eminencia media. (3V, tercer ventrículo) (Modificado de Recabal et al., 2017).

2.4 Marcadores de células progenitoras

Nestina

Está clasificada como filamento intermedio tipo VI, constituyendo un componente principal del citoesqueleto. La nestina se ha utilizado frecuentemente como marcador de las células madre neurales multipotentes en varias regiones del sistema nervioso (Morshead et al., 1994). En ratones la expresión de este filamento es evidente y selectivo en varios subconjuntos de células madre, sin embargo, no es claro cómo influye en etapas adultas (Li et al., 2013). Se ha propuesto que la

nestina pudiera ser sustituida por el neurofilamento y la proteína ácida fibrilar glial en las neuronas y las células gliales, respectivamente (Li et al., 2013). Estos acontecimientos pueden reflejar el control temporal y espacial de la expresión de los filamentos intermedios, lo que facilita los cambios de la forma celular y de su potencial migratorio (Li et al., 2013). En ensayos ex vivo las células nestina+, forman neuroesferas para generar células de linajes neuronal o astrocítico dependiendo de los elementos presentes cuando se está llevando a cabo este proceso. Además, la mayoría de las células nestina+ coinciden con el marcaje positivo para el marcador de proliferación Ki67, además de la integración de BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina), que refleja un estado proliferativo (Bernal & Arranz, 2018).

GFAP

La proteína ácido glial fibrilar (GFAP), está expresada de manera específica y representa el componente principal de los filamentos intermedios de células astrogliales maduras. Provee de estabilidad estructural a los astrocitos, además de estar involucrada en el movimiento y la comunicación celular, así mismo, participa ensamblando la red de filamentos durante la mitosis (Hol & Pekny., 2015). La expresión de GFAP se ha vuelto un marcador comúnmente utilizado para la población astrocítica en condiciones fisiológicas y en respuesta a un daño; ya que el aumento de esta proteína coexiste con la gliosis reactiva (Vijayan et al., 1990). En 2001, Nolte y colaboradores mejoraron el ratón transgénico previamente reportado por Zhuo et al 1997, empleando la proteína altamente fluorescente (EGFP) como molécula reportera, que proporciona una fluorescencia mucho más brillante. La EGFP puede detectarse a niveles de expresión tan bajos como 100 nM, que es 10 veces menor que el límite de detección de la de la GFP (Patterson et al., 1997). Con esta línea de ratones transgénicos se pueden observar detalles celulares que no se habían observado con la inmunotinción con GFAP (Nolte et al., 2001).

Vimentina

La vimentina cuyo nombre se deriva de la palabra latina *vimentum*, que significa mimbre, es una proteína multifuncional de 466 aminoácidos con un alto grado de conservación evolutiva en vertebrados, originalmente se describió dentro de los filamentos de 10 nm de diámetro, pertenece a los filamentos intermedios de clase III (Battaglia et al., 2018), que también es expresada en células mesenquimales, tiene una función importante en la migración durante el desarrollo, presente en las células de la glía radial (Kommata & Dermon, 2018). También se expresa en múltiples tipos de células del sistema nervioso, como las neuronas, los astrocitos, otros tipos de células gliales, las células endoteliales, las células progenitoras neurales y las neuronas inmaduras (Ridge et al., 2022). La vimentina es un componente importante de los filamentos intermedios citoplasmáticos de los astrocitos. Estas células desempeñan un papel clave en la organización del SNC y controlan muchas funciones del cerebro, la médula espinal y la retina. El aumento de la vimentina y de la GFAP, así como de la nestina, es el sello distintivo de la reactividad de los astrocitos y de la gliosis reactiva en respuesta a una lesión, isquemia o neurodegeneración (Hol & Pekny., 2015).

Filamento intermedio	Proteína	Tamaño (kDa)	Subtipo celular	Función
VI	Nestina	240	Células madre neurales y progenitoras, precursores tipo glía radial, células endoteliales	Proliferación, migración, diferenciación
	GFAP	51	Células madre neurales, precursores tipo glía radial, astrocitos, glía madura.	Mantenimiento estructural, forma celular, motilidad.
III	Vimentina	53	Células mesenquimales, desarrollo de neuronas, astrocitos, células endoteliales.	Mantenimiento estructural, forma celular, motilidad, adhesión focal.

Tabla 2. Filamentos intermedios. Resumen de características de cada filamento. Modificada de (Bernal & Arranz, 2018).

NG2 y PDGFR α

NG2 es un proteoglicano de condroitina de membrana integral, la cual se expresa en células progenitoras. El receptor alfa del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR α) es un receptor tirosina quinasa. Diversos estudios sobre la expresión de NG2 y PDGFR α en las células del sistema nervioso central indican que las dos moléculas son expresadas por células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) que son células proliferativas, con una gran capacidad migratoria, pero desaparecen una vez que estas son diferenciadas a oligodendrocitos maduros (Nishimaya et al., 1999).

La NG2 existe uniformemente a través del SNC maduro, en las materias gris y blanca. Sin embargo, la densidad de células disminuye conforme el cerebro madura. Aunque los progenitores NG2+ muestran morfologías ligeramente diferentes según su ubicación en el cerebro, suelen caracterizarse por un pequeño soma poligonal y un árbol multipolar de procesos finos, largos, múltiples y ramificados (Barateiro & Fernandes., 2014).

El PDGFR α está intensamente expresado en los OPC y es, junto con su ligando, factor de crecimiento derivado de las plaquetas-A (PDGF-A), de mucha importancia para la formación de oligodendrocitos en el ratón en desarrollo a través de la promoción de la proliferación y la supervivencia mediante la inhibición de la maduración prematura de estas células, sin embargo, el estudio del papel de este receptor en adultos aún no es del todo claro (Dang et al., 2019).

GLAST

El transportador de glutamato (GLAST) se localiza en la membrana celular de los astrocitos maduros y también en los de la región ventricular del cerebro, zona donde se producen neuronas y neuroglia. El RNAm de GLAST, se expresa en etapas tempranas por lo que se sugiere que esté implicado en la regulación de la transmisión sináptica y juega un papel importante en el desarrollo y diferenciación del SNC (Shibata et al.,1997). En algunos estudios, GLAST parece localizarse preferentemente en las regiones astrocíticas cercanas a las sinapsis excitatorias (Sery et al., 2015). Además, GLAST se expresa intensamente en otras células

gliales de tipo radial, incluidas las células de Müller de la retina y en los tanicitos de los órganos circunventriculares (Robins et al., 2013).

3. Del cuarto ventrículo al Acueducto de Silvio

En nuestro laboratorio se encontró en el techo del cuarto ventrículo, un arreglo celular novedoso entre los lóbulos I, II y X del cerebelo, formado por células que están en estrecha asociación con el LCR (Figura 4). Este cúmulo celular se distribuye rostrocaudalmente a lo largo del corte central del techo del 4V (González-González et al 2017). La figura 5 muestra un corte coronal a nivel del lóbulo II del cerebelo en donde se observa que las células que lo componen tienen su soma desplazado hacia la luz del ventrículo y extienden un proceso largo hacia el parénquima, también se encontraron astrocitos que contactan vasos sanguíneos con sus procesos. Las células que lo conforman no parecen proliferar activamente, es decir, no incorporan BrdU en condiciones basales o hipóxicas (González-González et al., 2017) (Becerra-González et al 2020).

Por su novedad la organización y función de estos grupos de células no han sido descritas, pero debido a su relación estrecha con el LCR y sus antecedentes que indican que células positivas a nestina y GFAP dan origen a astrocitos, existe la posibilidad de que esta región del cerebelo corresponda a un nicho de células gliales, neuronales y/o tumorigénicas en el cerebelo adulto (González-Pérez et al., 2010; Li et al., 2013). Sin embargo; se sabe que en esta región la neurogénesis y gliogénesis es limitada o nula en estado adulto (Su X et al., 2014).

Estos hallazgos muestran que las células GFAP⁺ y nestina⁺, cumplen con varios de los criterios para ser considerados como tanicitos. Las observaciones realizadas en nuestro laboratorio mostraron que estas células también están presentes en el plano más caudal del acueducto de Silvio, hacia la región dorsal de la sustancia gris periacueductal formando el cúmulo de células que se ha denominado DAN.

La PAG, integra información de las áreas corticales y subcorticales para modular diferentes conductas, incluyendo respuestas defensivas al dolor (Bandler and Keay., 1996), amenazas, estrés, control cardiovascular y de la respiración. Poblaciones celulares heterogéneas dentro del PAG rodean el acueducto de Silvio y se organizan en columnas rostral-caudales que median sus funciones (Carrive et al 1987., Bagley e Ingram., 2020). Las lesiones en la parte dorsal del PAG (dPAG), incluyendo el área ocupada por el DAN bloquearon la hipoalgesia mediada por opioides (George et al., 2019).

Sin embargo, para este trabajo de tesis, es importante esclarecer si el DAN se extiende hacia la parte más anterior del acueducto, así como establecer su función y su organización, y determinar la expresión de marcadores que permitan confirmar inequívocamente su identidad.

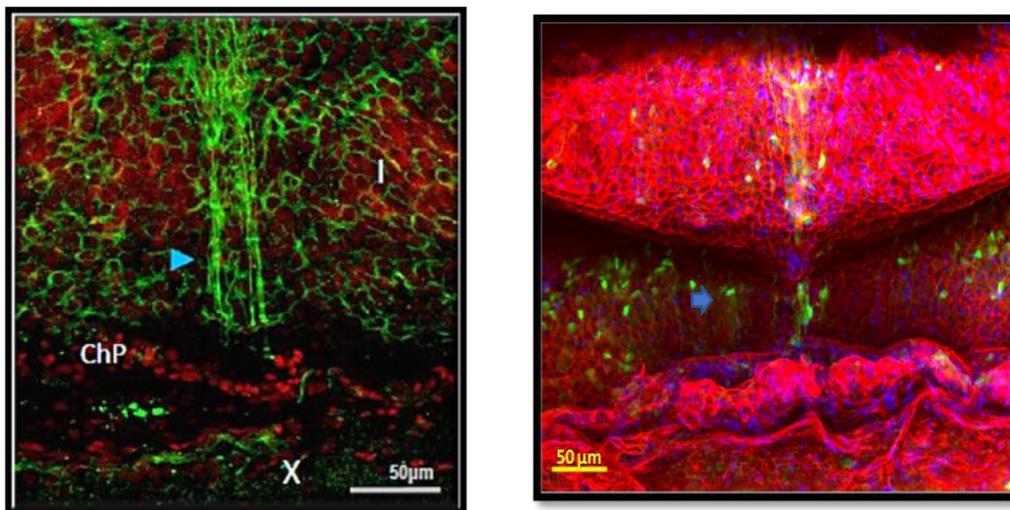


Figura 4. Organización de las células GFAP⁺/nestina⁺ en la preparación de libro abierto (las flechas azules indican el cúmulo celular). En la imagen de la izquierda se observa la disposición celular entre el lóbulo I y X del cerebelo, que se extiende rostrocaudalmente y es positivo al marcador de nestina (verde), contrateñido con yoduro de propidio (marcador de núcleos, rojo). En la imagen de la derecha, se muestra este mismo arreglo celular (flecha azul) positivo para la proteína GFAP en verde y para faloidina-rodamina que marca el citoesqueleto (rojo).

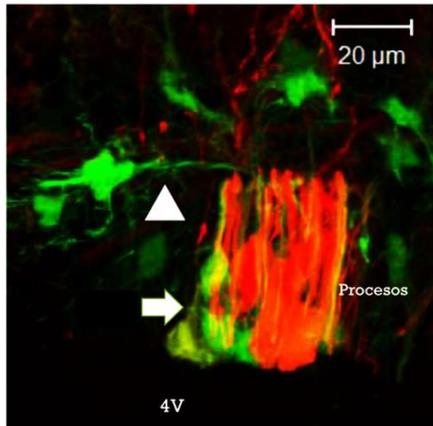


Figura 5. Imagen de microscopía confocal de un corte coronal de cerebelo del ratón GFAP-eGFP. Se muestran las células con los somas desplazados hacia la luz del ventrículo y los procesos dirigidos hacia al parénquima. También se observa un astrocito extendiendo uno de sus procesos hacia este cúmulo celular (cabeza de flecha). En rojo, células que expresan la proteína roja fluorescente (mCherry) a través de transducción adenoviral (Gómez-González, Tesis de Maestría 2014).

HIPÓTESIS

Las células GFAP⁺/nestina⁺ del DAN son tanicitos o células progenitoras de glía y/o neuronas.

OBJETIVOS

1. Analizar la organización, características estructurales y expresión de marcadores de identidad de las células GFAP⁺/nestina⁺ del DAN.
2. Determinar si el grupo de células del DAN integra BrdU y expresa marcadores de proliferación celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inmunohistofluorescencia

Se utilizaron ratones de la cepa CD1 y los ratones transgénicos: TgN(hGFAP-CreERT2), TgH(CX3CR1-EGFP), TgH(GLAST-CreERT2) y TgN(hGFAP-EGFP), (Tabla Suplementaria 2), edad postnatal 30 (P30). Se anestesiaron con pentobarbital y se perfundieron intracardialmente con una solución salina (0.9% NaCl) y una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en un buffer de fosfatos con un pH7.4 (NaCl 137mM, KCl 27mM, Na₂HPO₄ 10mM y KH₂PO₄ 2mM). Posteriormente los cerebros se aislaron y crioprotegieron en gradientes crecientes de sacarosa (de 10% al 30%). Los cortes histológicos coronales seriados (30 µm), del techo del cuarto ventrículo desde el lóbulo X del cerebelo hasta el acueducto de Silvio (Bregma -2.92mm a -5.20mm), se obtuvieron con un criostato (Leica CM 1850). Los cortes se colocaron en portaobjetos (Superfrost®Plus/Colorfrost by Daigger) y se almacenaron a 4°C hasta su uso en la inmunohistofluorescencia. Los anticuerpos utilizados se encuentran en la Tabla suplementaria 1 y los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindole). Las imágenes fueron obtenidas en dos microscopios confocales: Zeiss LSM 780®) y 800 Axio Observer Z1/7. La resolución en ambos microscopios fue de 512x512 y 1024x1024 píxeles. Los láseres utilizados fueron Argón, con una longitud de onda de excitación de 488nm y de emisión de 517nm, DPSS de 561nm a 618nm y láser de 405nm con una emisión de 465nm, se utilizaron filtros de emisión para detectar GFP-YFP/FG, FR/Alexa 594, y DAPI respectivamente. Los objetivos fueron, 25x/0.8 Oil DIC y 63x/1.40 Oil DIC.

Tinción de Golgi-Cox

Los ratones CD1 fueron anestesiados por vía intraperitoneal con pentobarbital (Cheminova, 30 mg/kg) y perfundidos con NaCl al 0,9% seguido de PFA al 4%. Las muestras de cerebro se extrajeron y se sumergieron en una solución de Golgi-Cox (Shiga et al., 1983) que se mantuvo en la oscuridad durante 4 semanas a

temperatura ambiente. Se utilizó un vibratomo para obtener secciones coronales de 250 μm . Posteriormente, los cortes se procesaron mediante pasos de deshidratación con cantidades crecientes de etanol y xileno. Finalmente, los cortes se montaron en portaobjetos cubiertos con medio de montaje Permount (Das et al., 2013). Se obtuvieron imágenes de diferentes profundidades focales (z-stack) con un microscopio de luz (Olympus BX60) acoplado a una cámara CCD Olympus DP70. Las imágenes fueron procesadas y binarizadas utilizando el software Fiji de ImageJ v.1.47. Los dibujos manuales se realizaron con la aplicación Camara Lucida del sistema operativo iOS. A partir de cada célula reconstruida se determinó el diámetro y el área del soma, así como el número y la longitud de los procesos (Rodríguez-Arzate et al., 2021). No se incluyeron en este análisis las células en las que no se podían distinguir dos o más procesos por plano focal y los somas o procesos se solapaban en la proyección máxima. Se calculó la media aritmética, la desviación estándar y la media de error estándar para todos los parámetros.

Vasculatura

Para determinar la relación entre el DAN y el sistema vascular, en otra serie de experimentos se incluyó la carbocianina Dil, (Molecular Probes, D282), 100mg en 16.7ml de etanol, en el diluyente (glucosa al 5% en agua destilada), de 5 a 10ml de Dil, para marcar vasos. Previamente se realizó un lavado con PBS (10ml) para extraer toda la sangre y después se dejó pasar la solución fijadora (PFA 4%). Para el marcaje con Dil, se procesaron 5 cerebros para cada experimento y se visualizaron en el microscopio confocal LSM 780 (Li et al., 2008).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para este análisis se utilizaron ratones CD1, de 30 días de nacidos (P30), se fijaron con una solución de PFA 4% y glutaraldehído 0.5%, disueltos en solución de cacodilato de sodio (0.1M, pH de 7.4). Se hizo una disección de libro abierto que dejó descubierto el techo del acueducto de Silvio y se mantuvo en glutaraldehído al 3.0% en cacodilato 0.1M, pH de 7.4 a 4°C por 2 horas, después se realizaron lavados con cacodilato y sacarosa 0.25M (3 de 15min). Se postfijaron con tetraóxido

de osmio 1% en cacodilato 0.1M por 2h en baño de hielo, campana de extracción y se lavó con una solución de ácido tánico 2% en cacodilato 0.2M, pH 7.4 a 4°C (5 lavados de 15 min). Al finalizar, los tejidos se deshidrataron en diferentes concentraciones crecientes de alcohol (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100%) en baño de hielo (2 incubaciones de 15 min por cada concentración). Para la observación de la muestra se hizo un recubrimiento con oro por pulverización catódica y observadas en un microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO 50 (González-González et al., 2017).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y tinción con azul de toluidina

Los cerebros de los ratones CD1 (3 machos, 2-3 meses de edad) se posfijaron durante 24 horas con PFA al 4% en cacodilato de sodio trihidratado 0.1M (Cat.12310, Electron Microscopy Sciences) y se enjuagaron con cacodilato 0.2 M durante 30 minutos a temperatura ambiente. El tejido se sumergió en tetróxido de osmio al 1% (EMS, cat. 19110) en agua desionizada durante 1 h, se lavó en cacodilato de sodio al 1% durante 30 min y se incubó en ácido tánico al 1% (EMS, cat. 21710) durante 1 h, se sumergió en cacodilato 0.2 M y se mantuvo a 4°C. Posteriormente, en hielo, las muestras se deshidrataron en un gradiente de etanol, del 10 al 100% en pasos del 10%, durante 20 min cada uno. Las muestras se sumergieron en óxido de propileno (2 veces, 15 min cada una) a temperatura ambiente y se infiltraron en una resina epoxi (1:1 en óxido de propileno) (EPON 812 cat. 14900, DDSA cat. 13710, NMA cat. 19000, BDMA cat. 11400) hasta que el propileno se evaporó (24 h aproximadamente). Se retiró la resina y se sustituyó por resina epóxica al 100% y se colocó en un agitador orbital durante 5 h a temperatura ambiente, luego las muestras se colocaron en una cápsula de haz de luz llena de resina epóxica al 100% hasta que se polimerizó. Para las secciones teñidas semifinas, el bloque de resina se cortó en secciones de 300 a 600 nm utilizando un micrótomo, se colocó en un portaobjetos y se fijó con calor (en una placa caliente a 50° durante 24 h). Las muestras se tiñeron con azul de toluidina al 3% en ácido bórico 0.1M durante 10 minutos en la placa caliente, luego se enjuagaron con agua

Milli-Q y se montaron en medio Entellan. Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio de luz Leica DM750 con una cámara integrada (Leica ICC50E).

Se obtuvieron secciones de 60 nm con una cuchilla de diamante y se procesaron para TEM. Se recuperaron en una rejilla hexagonal de 50 mallas y se tiñeron con uranilo al 2% (disuelto en agua destilada) durante 25 minutos, se incubaron durante 7 minutos en citrato de plomo al 2% (en una solución de NaOH al 0,1) y finalmente se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM 1010 (JEOL, Tokio, Japón).

Análisis de proliferación celular

Se utilizó la administración del análogo de la timidina, BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina), que se integra al DNA de células en división, por la vía intraperitoneal y después se lleva a cabo la inmunodetección con un anticuerpo.

Protocolo de integración lenta

Se administraron dos dosis de BrdU (50mg/kg), por vía intraperitoneal (n=5), espaciadas por 6 horas durante 4 días consecutivos. Al quinto día se sacrificaron los ratones y se procesaron las muestras para inmunohistofluorescencia. En los cortes coronales que incluyeron las regiones del cuarto ventrículo, acueducto de Silvio y ventrículos laterales, este último como control positivo. Para los grupos controles solo se administró el vehículo, que consiste en solución salina (NaCl 0.9%).

Se realizaron lavados con PBS1x (3 de 10min), la hidrólisis de DNA se llevó a cabo con HCl 2N por 30 min a 37°C, seguido de lavado con PBS1x-Tx (0.5%), (3 de 10min) y solución de bloqueo TSA 0.5% durante 30 minutos y se realizó la inmunohistofluorescencia con el anticuerpo anti BrdU (abcam, ab6326) y un anticuerpo secundario A488 (González-González et al., 2017). Las muestras y fotografías se observaron por microscopia confocal (Zeiss LSM 780).

Conteo de células y análisis de imágenes

El número de células marcadas con BrdU, Ki67, Iba1, Olig2, PDGFR α , NeuN y NG2 se determinó a partir de imágenes histológicas adquiridas con un microscopio de fluorescencia Axio Scan.Z1 y los microscopios confocales Zeiss LSM 780 y 800 Axio Observer Z1/7. Las imágenes confocales se reconstruyeron utilizando el comando Z-Maximum Intensity Projection del software ImageJ y el programa ZEN 2.6 blue y black Edition. Las imágenes se convirtieron a formato binario y se utilizó el método de erosión para eliminar los píxeles de los bordes de las células en colisión. El número de células etiquetadas positivas se determinó para cada uno de los marcadores moleculares descritos anteriormente con el plugin Cell Counter de ImageJ. Las células positivas se expresaron como el número de células etiquetadas por el marcador molecular por el total de células DAPI positivas.

RESULTADOS

Identificación del DAN

Mediante la obtención de cortes coronales seriados del techo del cuarto ventrículo, se identificaron las células previamente reportadas por González-González et al (2017). Estas son células GFAP+ con somas desplazados hacia la luz del ventrículo y procesos que se dirigen hacia el parénquima (Figura 6).

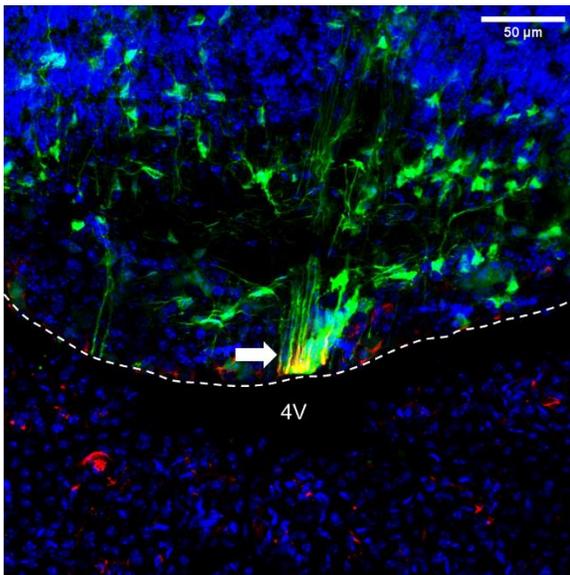


Figura 6. Cúmulo celular del techo del cuarto ventrículo. En verde está la proteína GFAP, la cual también está presente en astrocitos y células endimarias. Nestina está en rojo (Alexa 594). Los núcleos se muestran en azul (DAPI), 4V indica el cuarto ventrículo. Corte coronal en Bregma -6.36mm. La flecha blanca indica la coexpresión de nestina con la GFAP la cual da una señal amarilla.

Siguiendo con el análisis del techo del 4V y para determinar hasta dónde se extienden estas células, se realizaron cortes coronales seriados, iniciando en el cerebelo a partir del lóbulo X hasta llegar al acueducto de Silvio como se indica en el esquema de la figura 7.

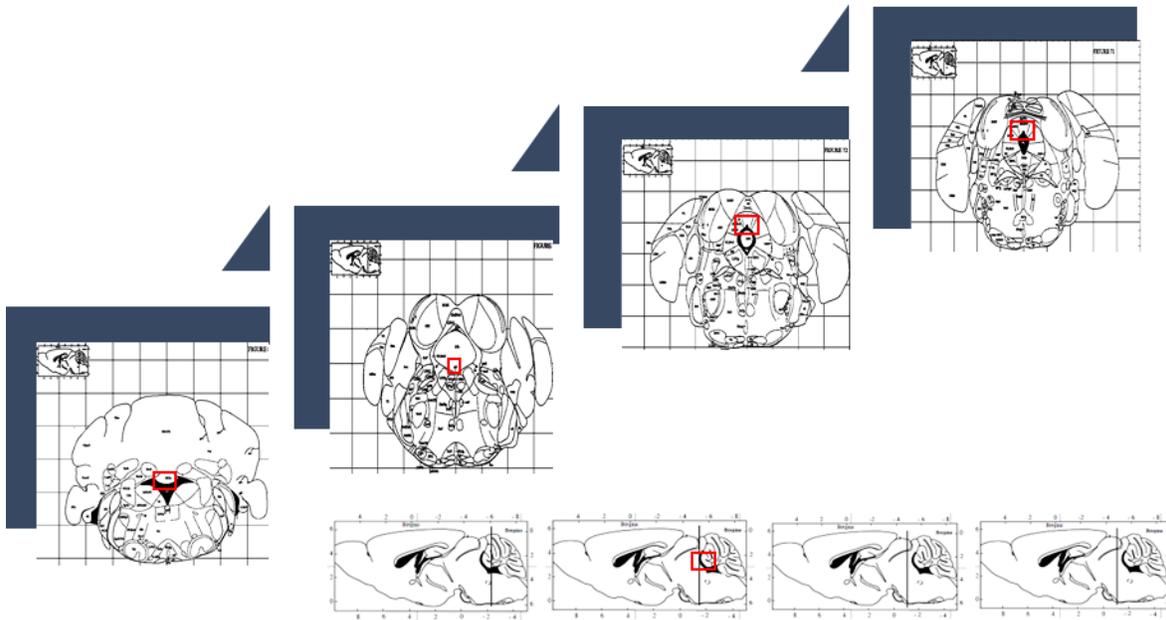


Figura 7. Atlas del cerebro de ratón. Bregma -6.36mm a -4.84mm. Se muestran cortes coronales y sagitales en serie que inician en el techo del cuarto ventrículo, en contacto con el lóbulo X hasta la región del acueducto de Silvio. El cuadro en rojo indica el contacto del cuarto ventrículo con el acueducto de Silvio (Paxinos, 2001).

A lo largo del plano dorsal del AS las células endimarias forman una monocapa que separa el LCR del parénquima. Una inspección minuciosa de la zona reveló que: 1) la sección dorsolateral de la pared del AS está formada por células endimarias ciliadas típicas con somas cuboides y procesos cortos que se proyectan hacia el parénquima; 2) la sección dorsal del AS incluye un nicho de células cuyos somas son pequeños y redondos ($6.93 \pm 0.19 \mu\text{m}$ de diámetro) que se apilan hacia el ventrículo. De los somas de estas células emerge un proceso largo que se proyecta hacia la línea media y que divide el PAG dorsal. Por su morfología estas células asemejan a tanicitos. Como se ha mencionado anteriormente, denominamos a este grupo de células DAN (Figura 8A, 8B y 8C). También, en esta zona, los astrocitos se encuentran cerca de los procesos de las células del DAN (Figura 8A). Además, las células endimarias del AS muestran claras diferencias de composición y organización entre los planos dorsal y dorsolateral. En las siguientes secciones se ofrece una descripción detallada de esta zona.

Morfología celular y organización de la pared dorsal del acueducto.

GFAP y Tinción de Golgi

Los cortes seriados de 30 μm se realizaron en el ratón transgénico hGFAP-eGFP y como lo muestran las imágenes de microscopia confocal a lo largo de las diferentes coordenadas de Bregma, se observaron células con una disposición muy parecida a la descrita para los tanicitos (Figura 8A-C). Además, analizamos imágenes tomadas al microscopio de luz de cortes impregnados de plata de la sección dorsal del acueducto (secciones coronales de 200 μm). Estas preparaciones confirmaron la presencia de células con procesos largos en el plano dorsal del acueducto (Figura 8D). Estas células tienen somas pequeños ($6.93 + 0.19 \mu\text{m}$ de diámetro, Figura 8D cabeza de flecha amarilla) con un proceso largo que emerge y se proyecta hacia el PAG dorsal (longitud media de los procesos $965.65 + 32.95 \mu\text{m}$, Figura 8D cabeza de flecha gris) ($n= 3$ a 5 células de $n=5$). Esta preparación también reveló la presencia de astrocitos, en promedio se observaron $5.58 + 0.60$ astrocitos en la zona de interés, de los cuales, algunos contactan sus procesos con las células DAN, mientras que otros astrocitos contactan tanto con los vasos sanguíneos como con los procesos de las células DAN (Figura 8D y 8H). Asimismo, se observó que los procesos del DAN están cerca de un vaso sanguíneo que corre dorsoventralmente (Figura 8D).

En la sección dorsolateral del AS, observamos dos tipos diferentes de células intercaladas entre las células ependimarias (Tipo A y Tipo B; Figura 8E-G). Los somas de estas células tienen forma redonda con un diámetro medio de $10.28 + 0.60 \mu\text{m}$ y $9.33 + 0.54 \mu\text{m}$ respectivamente. Sin embargo, la célula de tipo A sólo tiene un proceso principal de $54.41 + 4.31 \mu\text{m}$ (punta de flecha azul, Figura 8E, F, H), mientras que la célula de tipo B tiene un proceso principal de $40.05 + 3.30 \mu\text{m}$ que se bifurca en dos procesos secundarios de $12.73 + 0.80 \mu\text{m}$ (punta de flecha morada, Figura 8E, G, H) ($n= 1$ a 3 células de $n=5$). Estas células se observaron en la sección dorsolateral del AS, pero no en las secciones dorsal o ventral.

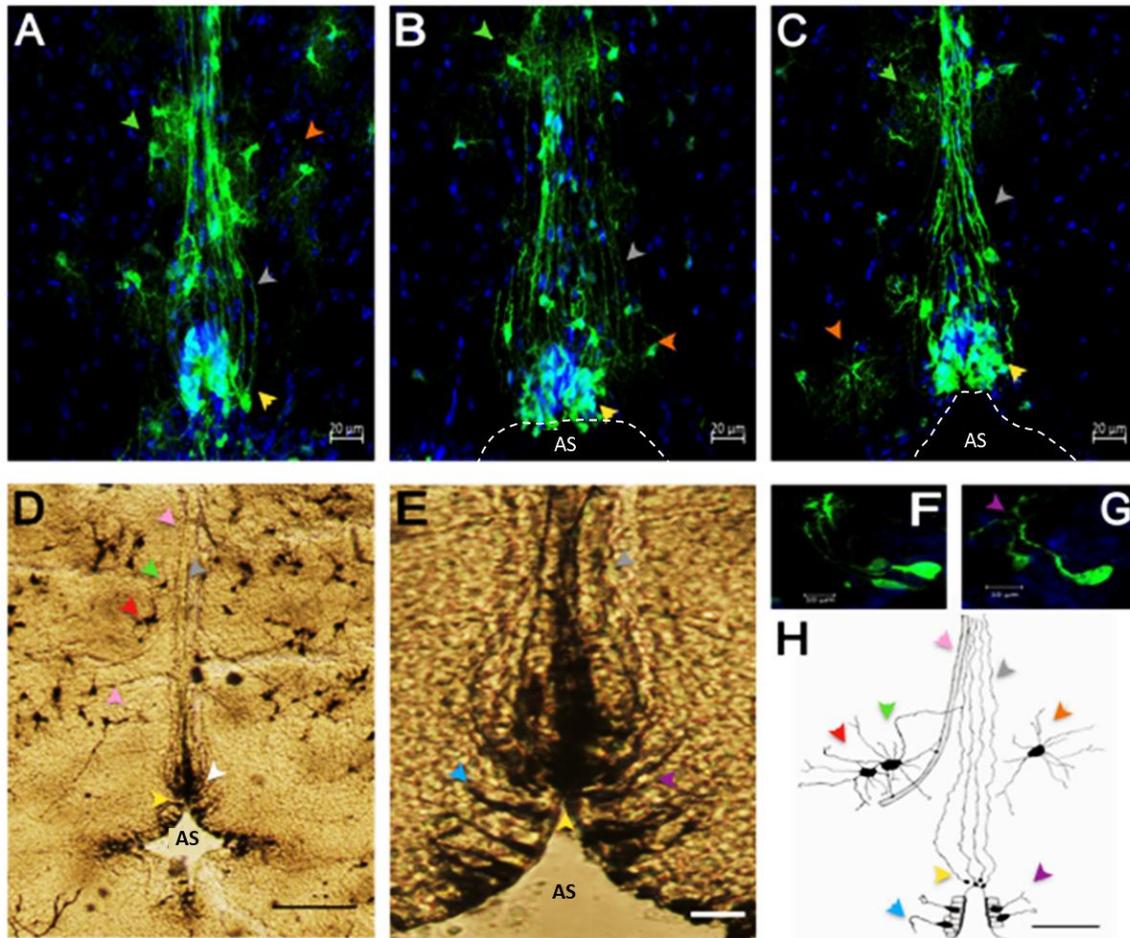


Figura 8. Cortes coronales a nivel del PAG muestran un novedoso nicho celular.

Cortes coronales seriados que muestran el nuevo nicho de células o DAN en las secciones posterior (A), central (B) y anterior (C) del acueducto del ratón transgénico hGFAP-eGFP. Coordenadas de Bregma: -4.24mm a -5.02mm. Los somas de las células que expresan eGFP (puntas de flecha amarillas) se acumulan en la sección dorsal del acueducto y extienden un proceso hacia el parénquima (puntas de flecha grises). En esta zona se observan varios astrocitos (puntas de flecha naranjas), algunos de ellos están en contacto con los procesos largos (puntas de flecha verdes). (D), (E) Imágenes representativas de los fenotipos de las células del DAN y de la sección dorsolateral del AS impregnada con la técnica de Golgi-Cox (barra de escala 100µm). (D) Una sección coronal de 200µm que muestra el DAN (punta de flecha blanca). La flecha rosa indica un vaso sanguíneo que está cerca de algunos procesos astrocíticos; en promedio observamos 5.58 ± 0.60 astrocitos en esta región, de los cuales, algunos contactan sus procesos con células del DAN, mientras que otros astrocitos contactan tanto vasos sanguíneos como procesos de células del DAN. (H) Dibujo de cámara lucida del DAN. Las células tienen un pequeño soma (diámetro: 6.93

$\pm 0.19 \mu\text{m}$, área: $43.80 \pm 3.33 \mu\text{m}$) (punta de flecha amarilla), y un único proceso largo ($965.65 \pm 32.95 \mu\text{m}$) (punta de flecha gris) que se proyecta hacia la sección dorsal del PAG. También se observan dos poblaciones diferentes de células en la sección dorsolateral del AS. Las células nuevas situadas entre las células ependimarias se clasificaron como tipo A (F), que tienen un soma pequeño (diámetro: $10.28 \pm 0.60 \mu\text{m}$, área: $134.96 \pm 16.42 \mu\text{m}$) y un proceso principal ($54.41 \pm 4.3 \mu\text{m}$, punta de flecha azul), y el tipo B (G), que tiene un soma pequeño (diámetro: $9,33 \pm 0,54 \mu\text{m}$, área: $118,44 \pm 19,42 \mu\text{m}$) y un proceso principal ($40,05 \pm 3,30 \mu\text{m}$, punta de flecha púrpura) que se divide en dos procesos secundarios ($12,73 \pm 0,80 \mu\text{m}$).

Nestina

La nestina forma parte de los filamentos intermedios, pero también lo expresan células progenitoras endoteliales, de glía o de neuronas en cerebros adultos (Bernal y Arranz, 2018) y es considerada un marcador de identidad de tanicitos. La marca más evidente de nestina en el ratón hGFAP-eGFP se encontró en las células de la interfaz entre el techo del cuarto ventrículo y el AS, tal y como se observa en la figura 9. Existen células que únicamente presentan señal para nestina, otras sólo para GFAP y una tercera población positiva para ambos marcadores. Por lo que se infiere que las células del DAN son una población heterogénea, al menos con los criterios establecidos con el marcaje con nestina y GFAP.

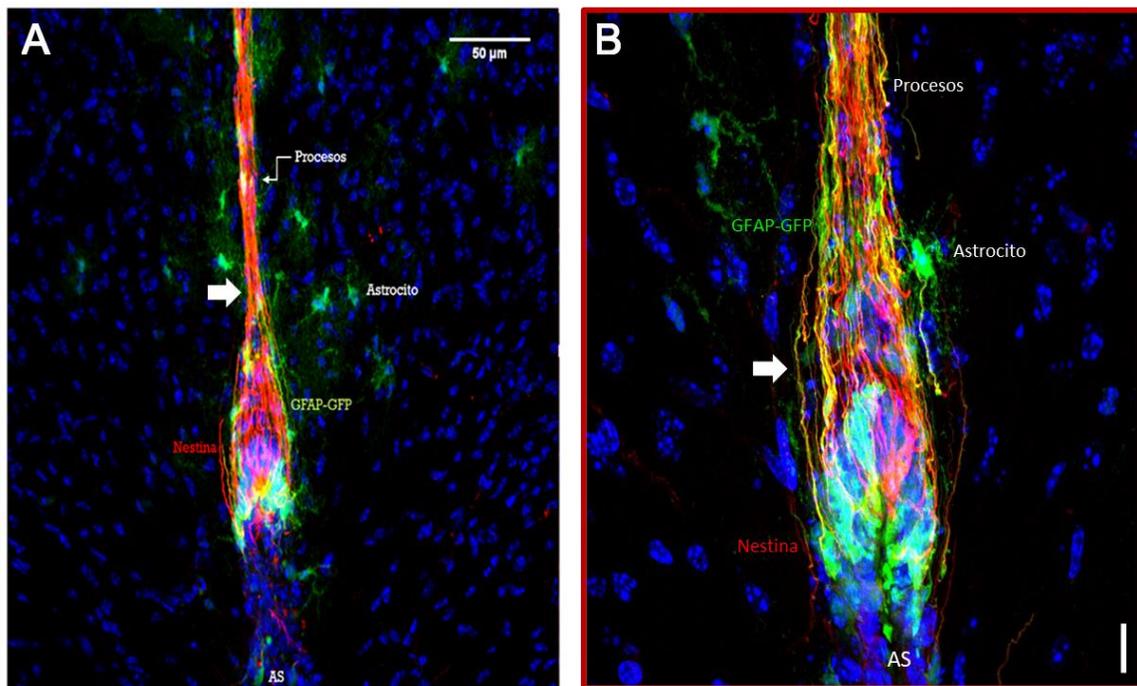


Figura 9. Nestina. La inmunorreactividad de nestina (rojo) se encontró en los procesos largos de las células positivas a hGFAP-eGFP (verde). Muchas células coexpresan ambos marcadores (flecha blanca). Los núcleos celulares están en azul (DAPI), n=5, la captura de imágenes se hizo cada 1.12µm en 27 cortes ópticos, objetivos 25x y 63x. Barras de calibración 50 y 10µm.

Vimentina

Respecto a vimentina fue una proteína utilizada para caracterizar el DAN, esta forma parte de los filamentos intermedios. Como lo muestra la figura 10, se observó marca de vimentina en las células que están en contacto con la luz del ventrículo en algunos procesos que colocan con la proteína GFAP y otros que son solo positivos para vimentina. No todos los procesos vimentina⁺ eran GFAP-eGFP⁺ pero cuando convergen las señales, lo hacen en sitios de contacto discretos; es decir, no en todo el proceso. Sin embargo, la marca no es tan abundante, como con nestina.

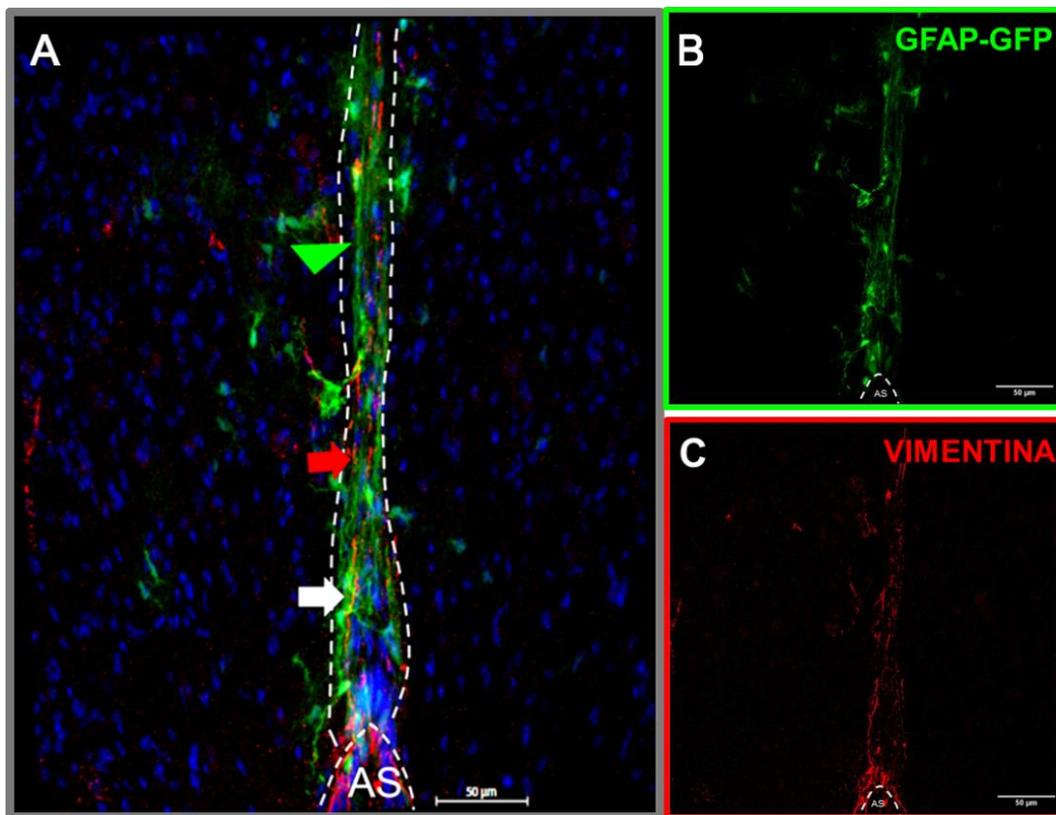


Figura 10. Marcaje de vimentina. La vimentina (rojo) se localizó de forma limitada en los somas de células que están en contacto con el LCR del AS. Encontramos procesos que son GFAP⁺ (cabeza de flecha verde) y vimentina⁺ (flecha roja) en cortes de 30 μm. También se observan algunos procesos positivos para ambos marcadores como lo muestra el empalme de las señales (flecha blanca). Barras de calibración A-C de 50 μm.

GLAST

Otro marcador utilizado para la descripción de células tipo tanicitos, es GLAST (Berger y Hediger, 2001). Diferentes trabajos han utilizado el ratón transgénico GLAST-CreERT2 para determinar si las células positivas a este marcador tienen potencial de renovación o proliferación (Mori et al., 2006). En la inmunohistofluorescencia realizada con el anticuerpo anti-GFAP en la región del AS, se observó que todos los procesos del DAN son positivos para GLAST y colocalizan con GFAP (Figura 11).

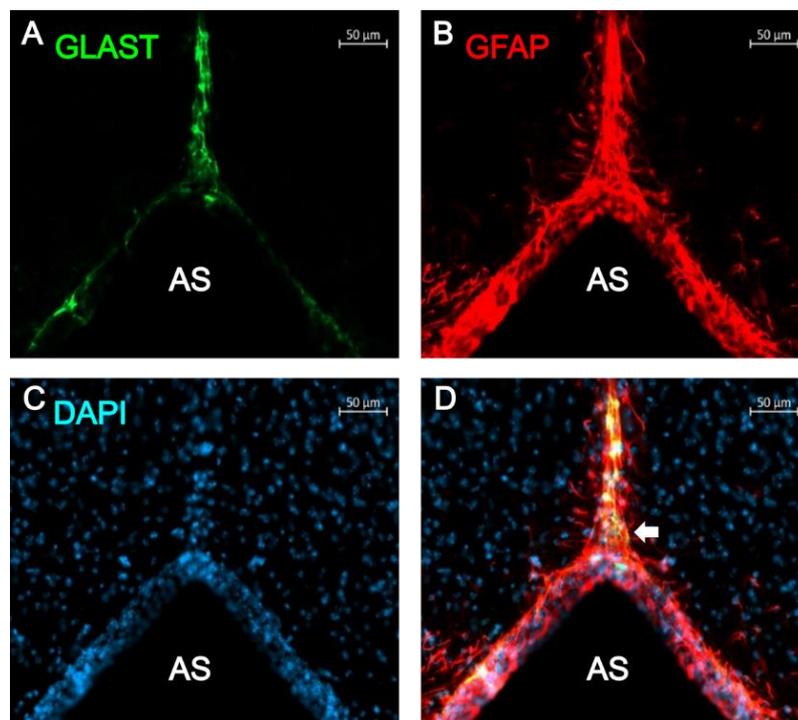


Figura 11. GLAST. En esta figura se muestra el DAN en los diferentes canales de captura, en el canal verde se encuentra el transportador de glutamato GLAST (A) en rojo está marcado el anticuerpo GFAP (B), en azul la tinción de núcleos DAPI (C), y en el panel D, está el empalme de las tres señales. El DAN contiene células con expresión del gen reportero de GLAST-CreERT2, lo que sugiere su fenotipo astrogliar/radial glial. En este caso, prácticamente el 100% de los procesos GFAP⁺ fueron positivos a la recombinación dependiente de GLAST-CreERT2; el cruce de estas señales se muestra en D (flecha blanca).

Asociación del DAN con la vasculatura

En la Figura 8D mostramos que las células de la línea media dorsal del DAN impregnadas con el método Golgi-Cox acercan sus procesos a los vasos sanguíneos, tal y como se describe en los pies astrocíticos. Para una mejor visualización y facilitar el análisis de la vasculatura y su interacción con las células del DAN, marcamos los vasos sanguíneos con la carbocianina fluorescente (Dil) en ratones GFAP-eGFP (Figura 12A-C). Mediante microscopía confocal obtuvimos imágenes que revelaron que los procesos de las células similares a tanicitos del DAN contactan con la vasculatura, y algunos procesos incluso rodean a los vasos sanguíneos de la misma manera que lo hacen los típicos pies vasculares del astrocito (12B-C, flecha amarilla). Esto demuestra que las células del DAN están estrechamente asociadas a la vasculatura de la región, y se puede especular que pueden regular el paso de nutrientes u otras moléculas hacia el parénquima desde la sangre y el LCR. Serán necesarios más estudios funcionales para resolver esta cuestión.

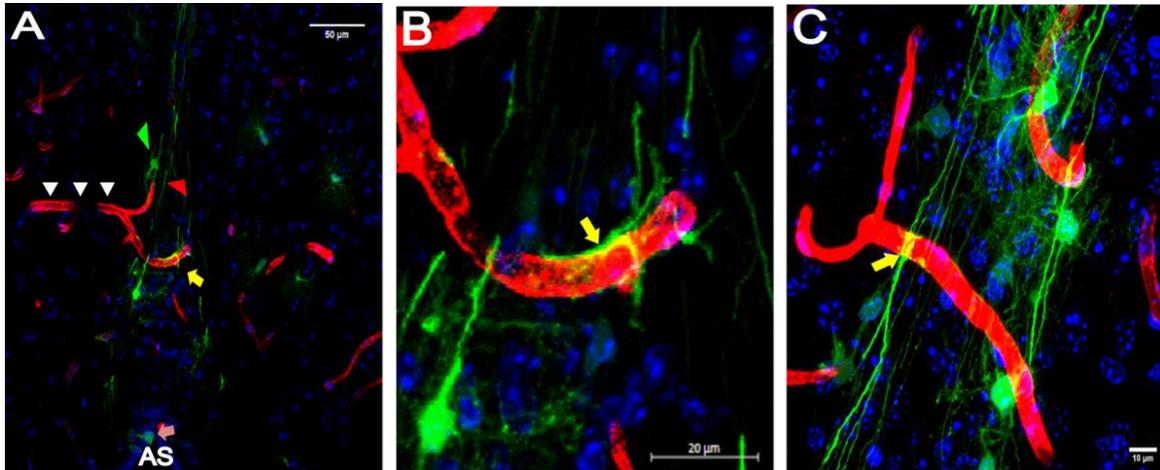


Figura 12. Interacción del DAN con las vasculatura. (A) Vasos sanguíneos marcados con Dil (en rojo e indicados con puntas de flecha blancas) en el ratón transgénico hGFAP-eGFP. Se observa que un proceso de una célula del DAN sobrepasa y envuelve el vaso sanguíneo (flecha amarilla). Esta zona está con más detalle en B y C (objetivo 63x, barra de escala 20 y 10 μm) en el cual se ve que incluso estos procesos del DAN rodean el vaso sanguíneo. Por otro lado, se aprecia un astrocito cerca del vaso sanguíneo y de los largos procesos de las células del DAN. También, se distingue una célula ependimaria GFAP-

eGFP positiva con un único proceso corto (flecha rosa en A) en la región dorsolateral del AS, ambas estructuras reportadas en las figuras 1D, 1E, F, H. Los núcleos celulares están marcados en azul (DAPI).

Microglía

La microglía es encontrada frecuentemente en las zonas subependimarias de los nichos neurogénicos y parece ser funcionalmente diferente de la microglía de otras áreas del cerebro (Ribeiro Xavier et al., 2015). También se ha sugerido que pueden contribuir a la actividad neurogénica por mecanismos aún no revelados (Sirerol-Piquer et al., 2019, Goings et al., 2006, Marshall et al., 2008). La microglía se marcó con un anticuerpo anti-Iba1 y se observan células de microglías en diferentes posiciones a lo largo del DAN. Algunas células Iba1⁺ están en contacto con los somas de las células del DAN en el lumen de la región medial (Figura 13B), mientras que otras contactan con los procesos GFAP positivos (Figura 13C-E).

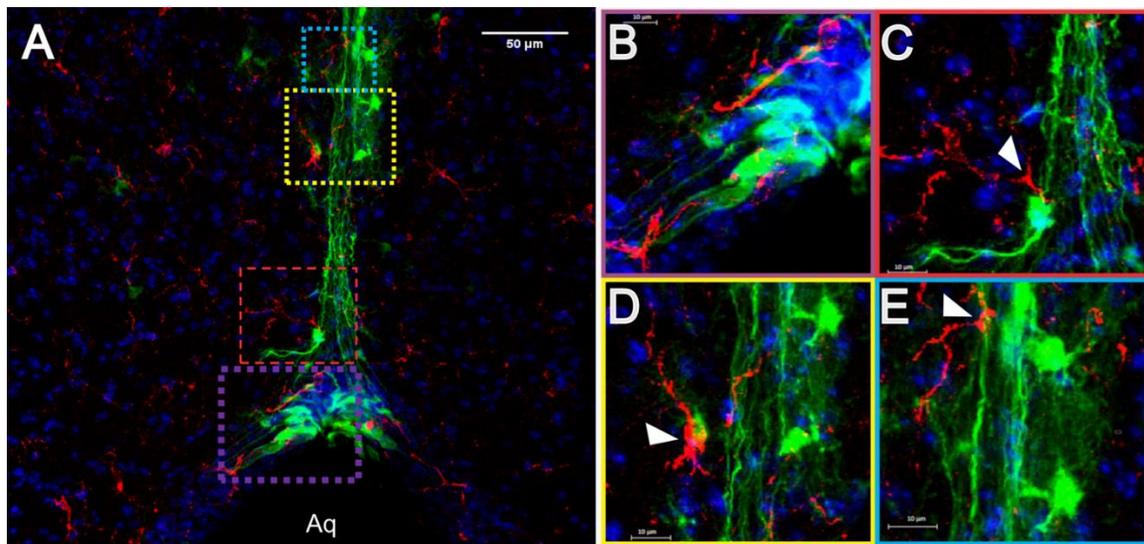


Figura 13. Microglía. (A) Expresión del marcador de microglía Iba1 (rojo) en el ratón transgénico GFAP-EGFP. Las células Iba1 positivas se encuentran en diferentes posiciones de la región de estudio, los recuadros coloreados se amplían en (B-E). (B) Algunas células Iba1-positivas cerca del lumen del AS en contacto con una célula GFAP+ con su proceso corto. (C-E) Otras células microgliales entran en contacto a lo largo de los procesos de las

células GFAP+ del DAN (puntas de flecha blancas). Los núcleos están teñidos con DAPI. Barra de escala de 10 μ m (B-E).

Contribución del linaje oligodendroglial al DAN

Las células de la eminencia media del hipotálamo expresan NG2 y 2',3'-nucleótidos cíclicos 3'-fosfodiesterasa (anticuerpo RIP) e incorporan BrdU, lo que sugiere su potencial para diferenciarse en nuevos oligodendrocitos (OLs) (Zilkha-Falb et al., 2020). Las diferentes etapas de diferenciación de los OLs pueden ser identificadas por el patrón de expresión de marcadores moleculares específicos (Barateiro y Fernandes, 2014). Para determinar si las células del DAN incluyen el linaje OL, utilizamos anticuerpos para marcar células progenitoras de oligodendrocitos (OPC): anti-PDGFR α (platelet-derived growth factor α -receptor), el cual es detectado en estadios muy tempranos del desarrollo durante la maduración de las células gliales mielinizantes y anti- proteoglicano NG2, además de un marcador para oligodendrocitos maduros (anti-MBP).

Las células PDGFR α -positivas se encontraron escasamente distribuidas en el PAG, pero se localizaron abundantemente en la pared del AS en su sección más dorsal y también a lo largo de los procesos del DAN, el porcentaje de células positivas a este marcador fue de 16.17% (Figura 14A). Las células positivas a PDGFR α colocalizaron con Olig2. La expresión de Olig2 se localizó principalmente en la región medial en dirección al parénquima (Figura suplementaria 1).

Las células NG2-positivas se encontraron intercaladas entre la zona endimaria y subendimaria en el AS dorsal, en las secciones laterales del DAN y en contacto con células GFAP-positivas en la región medial del AS dorsal (Figura 14B). Este resultado sugiere que existen células progenitoras de linaje oligodendroglial en el DAN. Por otro lado, los axones mielinizados marcados con MBP que discurren perpendicularmente al DAN, mostraron sólo unos pocos contactos con procesos GFAP+ (Figura 14C).

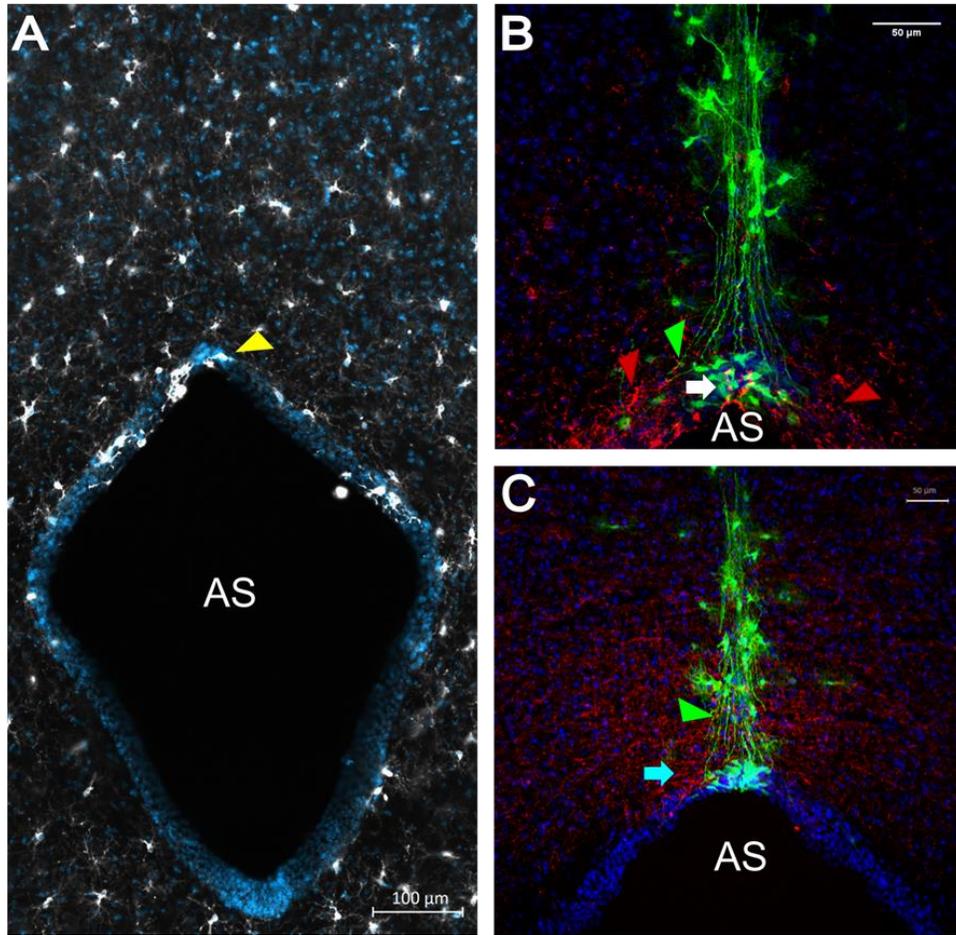


Figura 14. Linaje de oligodendrocitos en el DAN. (A) Las células PDGFR α (blancas) están ampliamente distribuidas en el PAG y son particularmente abundantes en las capas celulares ventricular y subventricular de la sección dorsal del AS (cabeza de flecha amarilla). (B) Las células NG2 (rojas) se observan en el PAG pero son más abundantes alrededor del DAN (puntas de flecha rojas). Algunas células NG2 están en estrecho contacto con el soma de las células GFAP-eGFP (flecha blanca) del DAN o con sus procesos (cabeza de flecha verde). Estos resultados sugieren la presencia de células progenitoras oligodendrogiales en el dominio del DAN. (C) Los axones se marcaron con MBP (rojo, indicado con una flecha azul). Se observaron escasos contactos con los procesos de las células GFAP-eGFP (cabeza de flecha verde). DAPI en azul.

Linaje neuronal

Para determinar si las células del DAN tienen un origen neuronal, utilizamos dos marcadores. El primero fue la doblecortina para determinar si eran neuronas inmaduras, y el segundo fue el NeuN para marcar las neuronas maduras. Sin embargo, como se ve en la Figura 15, los anticuerpos dirigidos contra la DCX marcaron muy pocas células en el DAN (0.04%), mientras que el NeuN sólo detectó células en las regiones dorsal y dorsolateral del PAG (1.83%). Por lo tanto, es poco probable que el DAN incluya una gran población de neuronas maduras o inmaduras.

Con estos experimentos concluimos que el DAN comprende diferentes tipos de células gliales. Una observación importante fue la colocalización de nestina y GFAP, que sugiere la presencia de células con potencial proliferativo. Sin embargo, el hecho de que el DAN no incluya neuronas inmaduras o maduras (Figura 1S) indica que si existiese proliferación celular en el PAG esta debe ser muy probablemente de origen glial. Aun así, no se ha demostrado la existencia de proliferación y migración celular en el PAG adulto (Berger y Hediger, 2001).

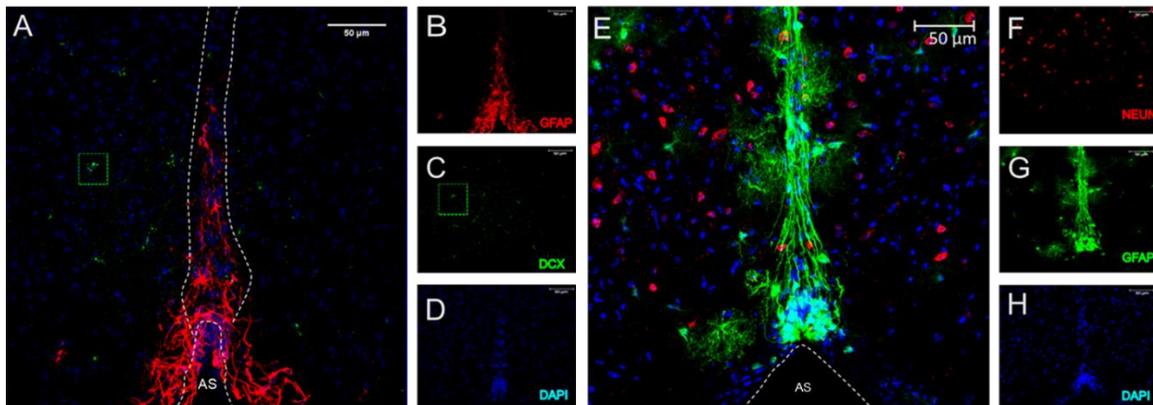


Figure 15. Células de linaje neuronal en el DAN. A. Imagen formada por los tres marcadores GFAP (rojo), DCX (verde) y DAPI (núcleos, azul). Se detectó un escaso marcaje de neuronas inmaduras fuera del DAN. Una célula DCX-positiva se indica dentro del recuadro verde. B, C y D imágenes de muestra de los tres marcadores. E. Imagen de los marcadores NeuN (rojo), GFAP (verde) y DAPI (núcleos, azul). La mayoría de las señales de las neuronas maduras se encuentran en el PAG y sólo unas pocas células en el DAN.

Ensayo de proliferación

Dado que observamos que algunas células del DAN expresan marcadores moleculares de células progenitoras gliales y neuronales (nestina, GFAP, vimentina, PDGFR y NG2) y que estas células interactúan con el LCR y los vasos sanguíneos, decidimos determinar si incorporan BrdU en condiciones basales y si expresan el marcador de proliferación endógena Ki67.

BrdU se detectó abundantemente en la región más caudal del AS, cerca de la interfaz con el cuarto ventrículo de los ratones CD1 (Figura 16A). Con este protocolo también encontramos abundante integración de BrdU en los ventrículos laterales (un nicho neurogénico bien conocido) y en el piso del cuarto ventrículo (donde se identificó un nicho de células similares a los tanicitos (Mizardeh et al., 2017); Figura suplementaria 2). Al analizar la incorporación de BrdU en el acueducto, (Figura 16B-D), encontramos integración de BrdU en las células del DAN a lo largo del AS y en algunas células a lo largo de sus procesos (Figura 16B, C, D). Además, buscamos la presencia de Ki67, una proteína que se expresa en las fases G1, S y G2 del ciclo celular. Se detectó la presencia de Ki67 en las células de la región medial del AS situadas a lo largo de los procesos celulares del DAN, pero no en las capas celulares ventriculares o subventriculares. Estos resultados mostraron que algunas de las células GFAP positivas que componen el DAN tienen capacidad proliferativa (Figura 17).

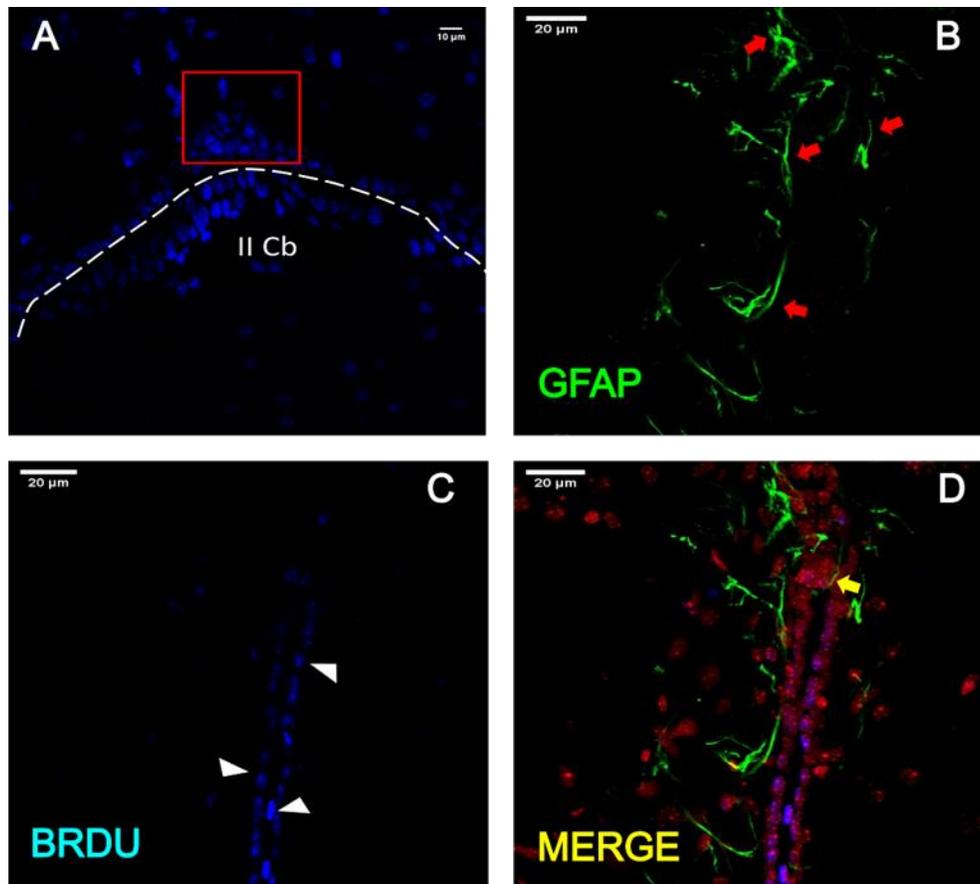


Figura 16. Incorporación de BrdU. Para determinar si las células del DAN integran BrdU se observaron secciones coronales del AS. La imagen (A) esta capturada en la región más caudal del AS. Se detecta BrdU (en azul) en la misma posición que las células del DAN (recuadro rojo) y en otras células subventriculares. En el lóbulo II del cerebelo (II Cb) también es evidente el marcaje. En los mismos ratones se analizaron la integración de BrdU en los ventrículos laterales y en el suelo del cuarto ventrículo (véase la figura suplementaria 2). (D) BrdU⁺ integrado en las células GFAP⁺ (flecha amarilla) de la pared del ventrículo. Los procesos GFAP⁺ se indican con una flecha roja, y algunas células BrdU⁺ son señaladas con una punta de flecha blanca. (B) Células GFAP⁺ y (C) Células marcadas con BrdU. Núcleos marcados con yoduro de propidio (rojo). Barra de escala (B-D) 20 μ m.

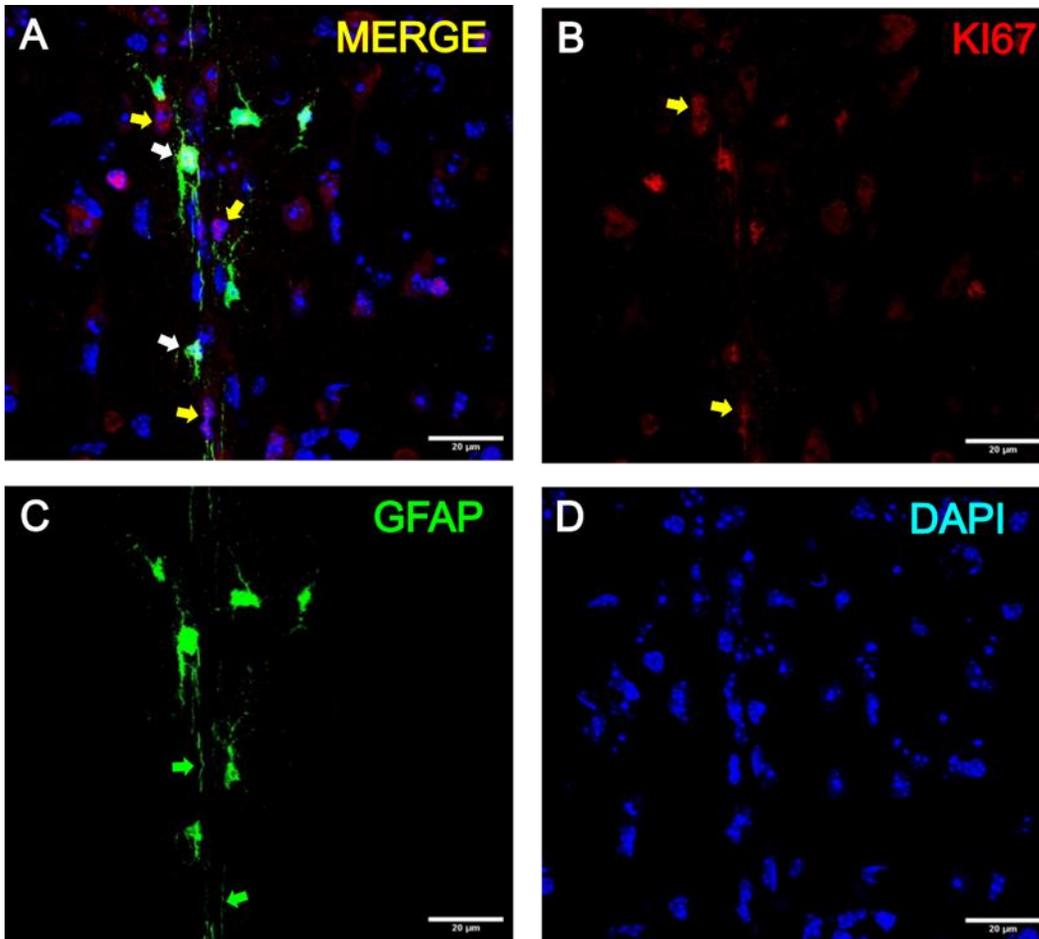


Figura 17. Marcaje Ki67. (A) Ki67 es detectado en la región medial del AS localizado a lo largo de los procesos celulares del DAN (flecha amarilla). Algunas de estas células son positivas para GFAP. Las células que componen el DAN tienen capacidad proliferativa y pueden dar lugar a nuevas células, muy probablemente de origen glial (flecha blanca). Paneles B) Ki67 en rojo, C) hGFAP-eGFP, D) DAPI. Barra de escala 20 μm.

Superficie ventricular del acueducto de Silvio

Dado que la superficie de las células ependimarias se caracteriza por la presencia de numerosos cilios, que es diferente a la de los tanicitos con un solo cilio, decidimos explorar la superficie de la sección dorsal del AS mediante SEM (Figura 18A-C).

Se llevó a cabo el análisis de imágenes del techo del acueducto en la modalidad de libro abierto, es decir, exponiendo la cara del techo del AS. Se encontraron numerosos cilios en la región dorsomedial que corresponde a la región en estudio (Figura 18A). No observamos células uniciliadas o biciliadas que, según Mizardeh et al., 2017, tienen capacidad proliferativa, sin embargo, se observaron ciertas peculiaridades no descritas en la literatura, entre ellas, unas estructuras esféricas adosadas a la pared del techo del acueducto (Figura 18B, cabeza de flecha rosa), así como una dilatación esférica en la punta de los cilios, de mayor tamaño que las estructuras esféricas adosadas a la pared (18B y C, flechas amarillas). Estas estructuras se asemejan a las observadas en el techo del cuarto ventrículo, cuya función aún se desconoce, pero que podrían proporcionar un mecanismo osmoregulador (González-González et al., 2017).

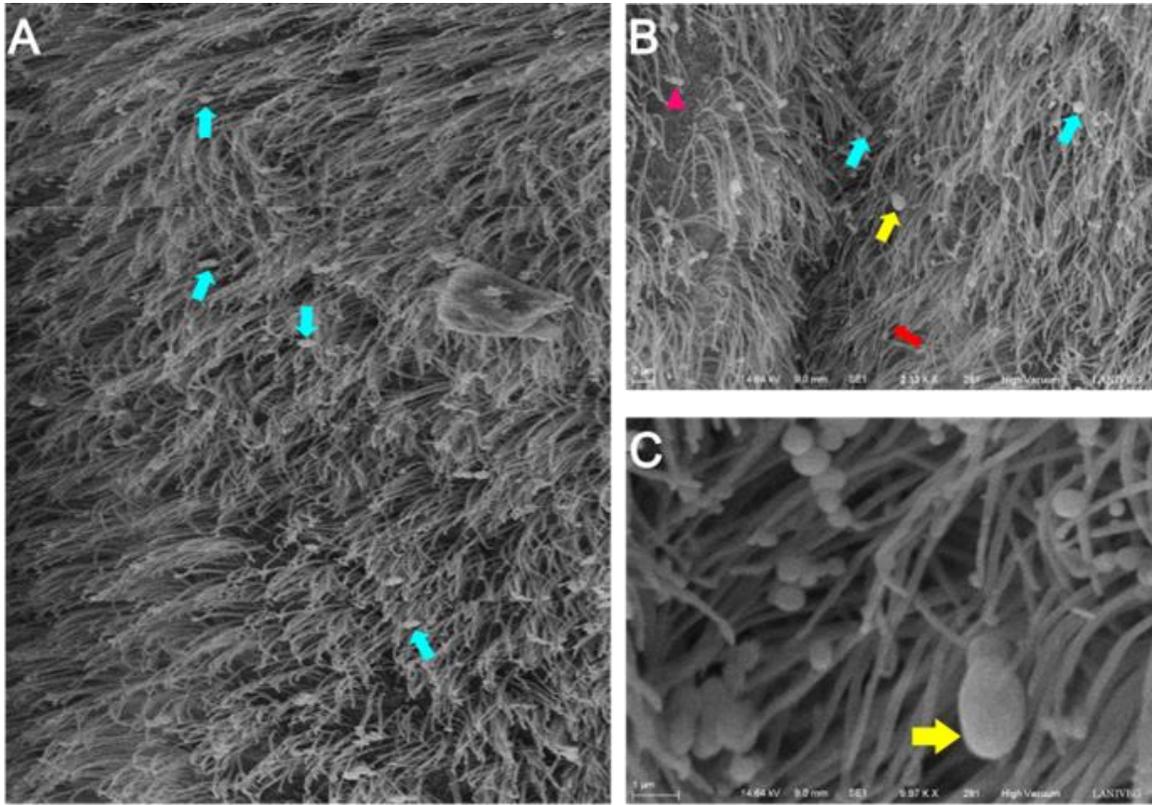


Figura 18. Superficie del AS por SEM. (A) Reconstrucción de una serie de imágenes a lo largo del techo del AS. Una inspección de esta zona muestra la distribución de abundantes cilios en la sección dorsolateral del AS. Muchos cilios presentan estructuras esféricas en el extremo de la punta (flecha azul). (B) La sección más dorsal del AS a nivel de la línea media posee menos cilios, pero son abundantes en las zonas laterales inmediatas (flecha roja), y la longitud de los cilios es de $5.78 \pm 0.33 \mu\text{m}$. Se observan estructuras esféricas en la superficie ventricular en las zonas desprovistas de cilios (punta de flecha rosa) (área del soma $0.2455 + 0.017\mu\text{m}$). Ocasionalmente emergen estructuras esféricas en la punta de los cilios (flecha amarilla) (área del soma $0.883 \pm 0.120\mu\text{m}$). (C) Imagen de mayor aumento de la estructura esférica mostrada en (B) (flecha amarilla). A y C, barra de escala $1 \mu\text{m}$ y B, $2 \mu\text{m}$.

Características ultraestructurales del DAN y del AS dorsolateral

Los cortes teñidos con azul de toluidina observados con el microscopio óptico mostraron la organización de los somas del DAN (Figura 19A y B). En los cortes coronales a lo largo del AS la densidad de somas era de 32 ± 3 por $120 \mu\text{m}$ por $120 \mu\text{m}$, abarcando un total de $780 \mu\text{m}$ en el eje anteroposterior del AS y $60\text{-}80 \mu\text{m}$ de la sección más dorsal del AS (Figura 19A, B). Los núcleos de estas células son electrodensos y ocupan la mayor parte del soma ($n = 3$ Figura 19B). Los largos procesos celulares se proyectan hacia la sección dorsal del PAG (Figura 19E), donde tienen contacto con los vasos sanguíneos y los procesos celulares de las células locales (19C-F), muy probablemente astrocitos como se sugiere en la Figura 1A.

Bajo TEM, las células del DAN muestran un diámetro de soma entre 5 y $10 \mu\text{m}$ con múltiples mitocondrias, polirribosomas, escaso citoplasma (Figura 19E, F, en rosa) y diferentes uniones celulares (19G), como se muestra en las figuras (19H-J). En consonancia con las observaciones bajo el SEM, el corte más dorsal del AS tiene sólo unos pocos cilios, pero es abundante en microvellosidades. El DAN está organizado en dos capas de células (Figura 19E); la capa interna contiene somas muy empaquetados y contacta con el lumen del ventrículo, mientras que la capa externa está situada dorsalmente a la capa interna y es menos compacta. No se observaron contactos sinápticos en esta región.

Como se ha mostrado anteriormente, el DAN está restringido a unos $60\text{-}80 \mu\text{m}$ del corte más dorsal del AS. Más lateralmente, la pared del acueducto continúa como una monocapa de células ependimarias cúbicas y multiciliadas con uno o dos procesos que se proyectan hacia el PAG dorsolateral. Por encima de la capa de células ependimarias, una capa de células gliales está presente en las paredes laterales.

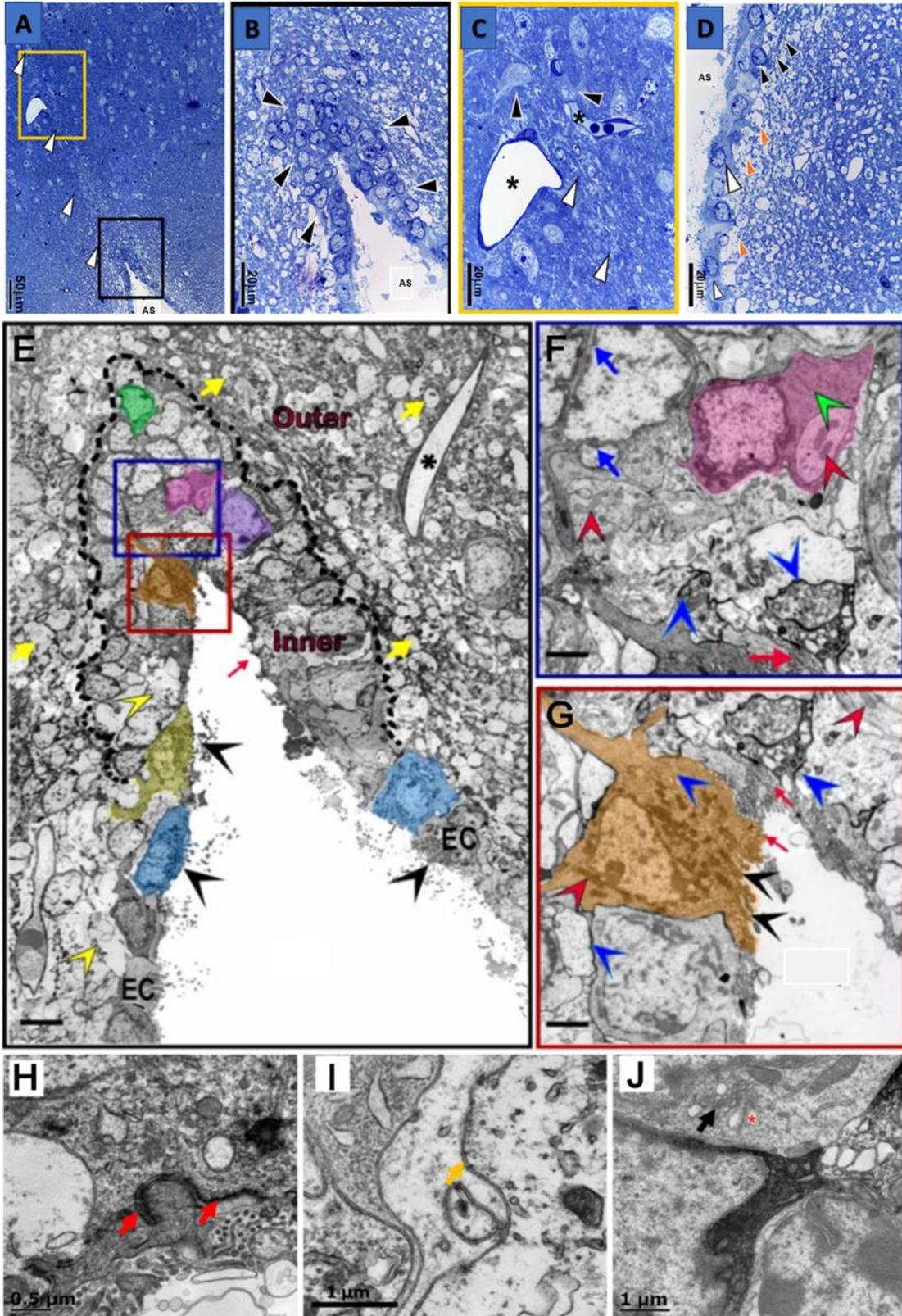


Figura 19. DAN con tinción de toluidina. (A) Secciones coronales del mesencéfalo (grosor 600 nm) muestran los somas de las células del DAN en la sección más dorsal del acueducto (recuadro línea negra), con sus procesos (puntas de flecha blancas) proyectando hacia el PAG dorsal. (B) Una ampliación del recuadro de línea negra en "A" muestra los núcleos teñidos del DAN en la sección más dorsal del AS dentro del PAG dorsal (cabezas de flecha); las células están compactadas en una bicapa orientada hacia el lumen del AS. (C) Ampliación del recuadro de línea amarilla en "A" para mostrar en detalle los procesos celulares del DAN (cabezas de flecha blancas) que se aproximan a los vasos sanguíneos (*) y son contactados por las células laterales (cabezas de flecha negras). (D) Sección dorsolateral de la pared del AS, formada principalmente por células ependimarias multiciliadas (puntas de flecha blancas). Intercaladas, están las células azul oscuro con un proceso lateral (cabezas de flecha negras). Por debajo de la capa de células ependimarias (EC), una segunda capa compuesta por células gliales (puntas de flecha naranjas) limita el área periacueductal. (E) Ultraestructura de la DAN. Se pueden distinguir morfológicamente los somas de la DAN dentro de una capa interna. Esta capa incluye células mononucleadas de mayor tamaño (~7-10 μm de diámetro) con escaso citoplasma (en púrpura), células electrodensas ciliadas con un proceso que se proyecta hacia el lumen (en naranja), células binucleadas más pequeñas (~6-8 μm de diámetro, en rosa) que sugieren división celular, y pequeñas células nucleadas con múltiples mitocondrias y nucléolo electrodenso (~5 μm , en verde). Las EC son típicamente ciliadas o cuboides (en azul) y revisten las paredes del ventrículo. Entre las EC se observan varias células ciliadas no cuboides (en amarillo). La región exterior del DAN está formada por múltiples células pequeñas (somas de ~1-2 μm de diámetro) con un nucléolo compacto inmerso en una zona densa de elementos gliales como los astrocitos (flechas amarillas). Las imágenes ampliadas del DAN dorsal (F) y ventral (G) se indican en E con recuadros de líneas azules y rojas. Los desmosomas (flecha azul) y las uniones gap (puntas de flecha azules) son abundantes en la zona. Las células tienen múltiples mitocondrias (punta de flecha roja) y polirribosomas (punta de flecha verde). El color rosa destaca una célula biciliada. (G) En la línea media dorsal del AS las células ependimarias poseen numerosos cilios (puntas de flecha negras) y microvellosidades (flechas rojas). Barra de escala; 6 μm (E), 2 μm (F, G). Imágenes del DAN por TEM, muestra las diferentes uniones, zónulas adherentes (flechas rojas) y uniones estrechas (flechas amarillas) que se presentan entre las células (H-I). Y (J) organelos que caracterizan a las EC (asterisco rojo), incluyen el retículo endoplásmico rugoso (flecha), las mitocondrias (estrella) y las gotas de lípidos.

DISCUSIÓN

El acueducto de Silvio forma parte del sistema ventricular, es un canal que conecta el tercer y cuarto ventrículo del cerebro, por donde circula el líquido cefalorraquídeo. Está rodeado por la sustancia gris periacueductal, un área del mesencéfalo que participa en diversos procesos adaptativos especialmente en la transducción del dolor. Durante el desarrollo embrionario, se forman nichos de células madre en la zona periventricular del acueducto, sin embargo, se desconoce su persistencia en la vida adulta. Recientemente, en la región dorsal del acueducto se encontró un nicho novedoso de células que representa una continuación de los grupos celulares originalmente reportados en el techo del cuarto ventrículo, en el cerebelo (González-González et al 2017, Becerra-González et al 2019). El grupo de células en el techo del acueducto de Silvio las hemos denominado DAN o nicho del acueducto dorsal debido a que estas células tienen capacidad proliferativa al contrario de las descritas en el cuarto ventrículo, y en esta tesis se detalló su organización celular y su capacidad para incorporar BrdU.

En etapas embrionarias la glía radial funciona como progenitor neuronal y tiene la potencialidad para generar neuronas, astrocitos, células ependimales y oligodendrocitos, sin embargo, este proceso en etapas adultas solo persiste en los ventrículos laterales de la zona subventricular y es de especial interés porque este tipo de glía da a lugar a las células madre neuronales en la zona subventricular del adulto (Alvarez-Buylla et al., 2001). La glía radial expresa marcadores como GFAP, nestina y vimentina (Mori et al., 2006, Choi & Lapham, 1978).

Por otro lado, los tanicitos son un tipo de célula ependimaria especializada del hipotálamo, localizado en el tercer ventrículo y reportes recientes sugieren que estas células pueden dividirse para generar neuronas en la vida adulta. Los tanicitos hipotalámicos se parecen morfológicamente a las células gliales radiales embrionarias, son células alargadas y sus somas revisten el tercer ventrículo con un proceso distal que interactúa con los vasos sanguíneos portales. En base a su localización, función y ultraestructura se han descrito cuatro tipos de tanicitos ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$) (Rodríguez et al., 2005), y como se mencionó anteriormente son

positivos para marcadores como: GFAP, nestina, vimentina y GLAST (Haan et al., 2013, Lee et al., 2012, Chauvet et al., 1998 y Robins et al., 2013). Se han descrito otras células similares a los tanicitos en diferentes partes del sistema ventricular, por ejemplo, en el piso del tercer y cuarto ventrículo, las células denominadas E2 (biciladas) y E3 (uniciliadas) que se asemejan a los tanicitos hipotalámicos en cuanto a su morfología y expresión de marcadores de identidad (Mirzadeh et al., 2017). González-González y colaboradores en 2017, encontraron células ependimarias biciladas con una morfología similar a la de los tanicitos a lo largo del techo del cuarto ventrículo en los lóbulos I, II y X del cerebelo.

Nosotros encontramos que estas células se extienden hacia la región caudal del acueducto de Silvio dorsal donde forman un nicho a lo largo del eje anteroposterior del AS. Para definir la identidad de este grupo de células utilizamos anticuerpos selectivos de glía radial/tanicitos además de ratones transgénicos que expresan genes fluorescentes bajo el control del promotor del gen GLAST, un marcador de tanicitos que está implicado en el transporte de glutamato en la actividad neuroendocrina. El marcaje con GFAP y con el transgénico GFAP-EGFP mostró que las células del DAN tiene características morfológicas parecidas a los tanicitos, es decir, los somas están dirigidos hacia la luz del ventrículo y contienen un proceso largo que se extiende hacia el parénquima y hacia la región dorsal del PAG. La fluorescencia de GFAP-EGFP fue observada a lo largo del eje anteroposterior del AS, por lo tanto, facilitó a la identificación del nicho desde la región más posterior, la cual está en contacto con el techo del cuarto ventrículo, hasta la parte anterior cercana al tercer ventrículo (Figura 8A-C). También con este marcador se observaron varios astrocitos que están cerca del DAN, algunos contactando los largos procesos de las células similares a tanicitos. De manera interesante, con este marcador también encontramos en la pared lateral del AS dos tipos celulares no descritos en la literatura y que clasificamos como célula tipo A, la cual tiene un soma pequeño y un proceso principal, comparado con la célula tipo B que en tamaño es muy similar a la A, sin embargo, tiene un proceso principal que se bifurca en dos procesos secundarios. Con la técnica de Golgi, se confirmó la presencia de estos dos tipos celulares. A la fecha se ignora su función (Figura 8D, E, H).

Al utilizar anticuerpos anti-nestina en el ratón transgénico GFAP-EGFP, observamos tres poblaciones de células similares a tanicitos: la primera expresa solo nestina, la segunda es positiva solo para la proteína GFAP y el tercer tipo fue positiva para ambos marcadores (Figuras 9A-B). En la literatura está reportado que la nestina se utiliza como un marcador de células progenitoras neuronales, gliales o endoteliales, está clasificado como un filamento intermedio tipo VI y su expresión está nula cuando las células son maduras, es expresada en células madre y células progenitoras, precursores tipo glía radial, subgrupo de células endoteliales, precursores de células de Schwann en el sistema nervioso periférico. Células que co-expresan este marcador con GFAP en las regiones periventriculares tienen propiedades de células progenitoras (Bernal & Arranz., 2018, Furube et al., 2019).

La vimentina juega un papel importante en la migración durante el desarrollo (Lazarides, 1982). El anticuerpo para esta proteína marcó los procesos GFAP positivos de las células del DAN, encontrando mayor señal en las células que se encuentran en el ápice del AS (Figura 10A-C). Por otro lado, el ratón transgénico GLAST-CreERT2 mostró expresión del reportero en todas las células GFAP positivas del DAN. GLAST es expresado intensamente en tanicitos (Berger & Hediger, 2001) y en las membranas de los astrocitos maduros, por lo tanto, se puede inferir que las células del DAN podrían participar en actividad neuroendocrina ya que como se mencionó anteriormente los tanicitos participan en esta actividad, aunque en ausencia de organelos secretorios esta posibilidad es remota. Sabourin et al., 2009, mostraron que en la médula espinal existen células similares a las del DAN en cuanto a morfología y que también expresan marcadores como vimentina, nestina y GFAP que tienen propiedades de células madre neurales, las cuales pueden podrían participar en situaciones fisiológicas.

La identificación de los marcadores descritos anteriormente sugirió que posiblemente las células del DAN tienen el potencial para dividirse o migrar, similar a lo que ocurre con los tanicitos del hipotálamo (Clayton et al., 2022, Rojczyk-Gołębiewska et al., 2014, Yoo and Blackshaw, 2018).

Para conocer la organización de la vasculatura en el DAN, decidimos utilizar la carbocianina Dil, que se une a la membrana de las células endoteliales y puede ser observada por microscopía confocal. Existe una estrecha relación espacial de los tanicitos con los capilares del sistema portal hipotalámico y el LCR (Löfgren 1958, 1961). Los tanicitos transportan leptina y grelina a través de la barrera hematoencefálica, lo que permite que estas hormonas activen las neuronas hipotalámicas (Balland et al., 2014, Schaeffer et al., 2013). Además, los tanicitos detectan los nutrientes circulantes en el LCR, como la glucosa, los aminoácidos y los receptores de lípidos (Frayling et al., 2011, Orellana et al., 2012, Lazutkaite et al., 2017, Hofmann et al., 2017). Las células con los procesos positivos a GFAP similares a los tanicitos del acueducto dorsal tienen en una posición estratégica para transmitir señales entre el LCR y la vasculatura del PAG. La localización del DAN en contacto con el LCR y la aposición vascular de sus procesos apoya esta hipótesis (Figura 8A-C y Figura 8D y 12A-C).

Los tanicitos liberan grelina y leptina en el hipotálamo, regulando circuitos neuronales locales, además se ha demostrado que los tanicitos activan las neuronas del núcleo arcuato a través de la señalización del ATP (Bolborea et al., 2020). Aunque en este trabajo no encontramos evidencia de contactos de las células del DAN con neuronas del PAG, es interesante especular que pueden comunicarse con neuronas locales o de proyección, que son relevantes para la modulación del dolor y otros comportamientos.

Por otro lado, las células microgliales son el sistema de defensa innato en el SNC, regularmente se encuentran en las zonas subependimarias de los nichos neurogénicos y parecen ser funcionalmente diferentes de la microglía de otras áreas del cerebro (Ribeiro Xavier et al., 2015). Nosotros utilizamos un anticuerpo anti-Iba1 para marcar estas células y observamos que están presentes en diferentes posiciones a lo largo del DAN, algunas de ellas contactando con los procesos GFAP positivos de la región medial del acueducto (Figura 13). Aunque el papel de la microglía en la regulación de la neurogénesis aun no es definido, estudios en cultivo sugieren que el sobrenadante de cultivos microgliales induce la capacidad de las

células madre para autorrenovarse y formar neuroesferas multipotentes. Por ejemplo, en el hipocampo adulto participa en regular la actividad de los circuitos mediante la integración de nuevas neuronas o eliminando neuronas apoptóticas (Goings et al., 2006, Walton et al., 2006; Sierra et al., 2010, Sirerol-Piquer et al., 2019). En el DAN podrían estar participando como reguladores externos de la formación de nuevas células.

En nuestro estudio utilizamos una batería de anticuerpos además de los antes mencionados, para conocer si el DAN incluye células de origen oligodendroglial. Los oligodendrocitos son células formadoras de la vaina de mielina que recubre los axones neuronales. La expresión de marcadores de desarrollo identificado por anticuerpos selectivos se utiliza para reconocerlos en sus distintas etapas de diferenciación, que se caracterizan por sus habilidades migratorias, cambios en morfología y capacidad para proliferar. De acuerdo con los estadios de maduración los oligodendrocitos se dividen en cuatro diferentes etapas: células precursoras de oligodendrocitos (OPC), preoligodendrocitos, oligodendrocitos inmaduros y maduros (mielinizados) (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Barateiro & Fernandes, 2014).

Se considera a los OPC como células proliferativas con un elevado potencial migratorio y son positivos para PDGFR α , el cual es detectado en estadios muy tempranos del desarrollo de la maduración de las células gliales mielinizantes y para el proteoglicano NG2. En nuestros resultados se muestra que hay marcaje positivo para PDGFR α en la pared del AS en la sección mas dorsal y a lo largo de los procesos del DAN, además un porcentaje de estas células también colocaliza con Olig2 (Figura suplementaria 1). Las células NG2 positivas se encontraron en la capa endimaria y subendimaria, algunas de ellas en contacto con las células GFAP positivas. Las células que coexpresan estos marcadores oligodendrogiales sugieren que son una población joven de células que están en proceso de diferenciarse, posiblemente en respuesta a estímulos como la inflamación o la desmielinización. La evidencia reciente también sugiere que de acuerdo a la morfología presente en el DAN y la señal positiva a PDGFR α se pudiera tratar de

células leptomeningeaes (VLMCs) las cuales son una población de células similares a fibroblastos y que están ubicadas en la interfaz del endotelio y la capa del pie astrocítico que rodea al parénquima. Sin embargo no hay reportes de que estas células VLMC presenten potencial proliferativo (Zamboni et al., 2020). También realizamos inmunotinción para mielina pero solo observamos muy pocos contactos con los procesos de las células GFAP⁺ indicando que los oligodendrocitos maduros no forman parte del DAN (Figura 14).

Una población celular importante por analizar fueron las neuronas. De acuerdo con los resultados arrojados, el DAN no incluye una alta población de células de origen neuronal, ya que los dos anticuerpos utilizados (NeuN y DCX) no mostraron marca en la región dorsomedial periacueductal, solo se encuentran en las paredes laterales de esta región (Figura 15).

Considerando que en el DAN encontramos diferentes linajes de células gliales, incluyendo microglía y NG2 (un precursor de oligodendrocitos) que son mitóticamente activas durante la edad adulta (Walton et al., 2006; Nishiyama et al., 1999), planteamos la hipótesis de que el DAN podría incluir células en división o proliferación, por lo que analizamos la integración de BrdU. Encontramos que, en la región más caudal del AS, cercana a la interfaz con el cuarto ventrículo, la integración de BrdU está más extendida, sugiriendo la presencia de células en proceso de división. Adicionalmente, detectamos una población de células positiva a Ki67 (Figura 17), un marcador de proliferación celular. Estudios previos han sugerido la incorporación de BrdU y la expresión de Ki67 en los tanicitos hipotalámicos (Hendrickson et al., 2018; Bolborea y Dale 2013). Además, los experimentos de mapeo del destino de las células de la pared ventricular hipotalámica han mostrado tanicitos proliferantes que ayudan a diferentes progenies migrar a lo largo de los procesos de tanicitos (Pérez-Martín et al., 2020). Estas observaciones son relevantes en relación con nuestros hallazgos en el DAN, donde encontramos células BrdU-positivas en las capas ependimal y subependimal y un segmento de células Ki67 localizadas más dorsalmente a lo largo de los procesos

celulares GFAP+, lo que sugiere que algunas células pueden dividirse y ulteriormente proliferar dorsalmente siguiendo la pista de los procesos.

Como se ha reportado las células endimarias de la zona ventricular proyectan cilios hacia el acueducto. De acuerdo con lo reportado en el trabajo de Mizardeh 2017, las células endimales se dividen en tres tipos: células endimales multiciliadas E1, células E3 (con un cilio primario, similar a la glía radial Ki67+) y células E2 (con 1 ó 2 cilios largos). E2 y E3 participan regulando la actividad progenitora y detectando los metabolitos del líquido cerebroespinal. Datos recientes sugieren que las células E2 podrían corresponder a alpha tanicitos, mientras que las E3 a beta tanicitos, los cuales podrían retener un potencial proliferativo (Mizardeh et al., 2017). Nosotros decidimos estudiar la superficie del techo del acueducto mediante microscopia de barrido y transmisión para determinar la presencia o no de células ciliadas. En SEM encontramos numerosos cilios que por su posición anatómica y la relación con el LCR nos lleva a especular que podrían actuar en el intercambio de moléculas de señalización lo que podría inducir el proceso de neurogénesis tal y como ocurre en etapas embrionarias (Alonso et al., 2017). Sin embargo, no encontramos estructuras uniciliadas o biciliadas como en las células que tienen potencial proliferativo. No obstante, tuvimos dos hallazgos interesantes: 1) estructuras esféricas adosadas en la porción dorsal de la pared del AS y 2) una estructura esférica en la sección apical de varios cilios (Figura 18). Estas estructuras se asemejan a las reportadas en el techo del cuarto ventrículo por González-González en 2017 cuya función es desconocida, no obstante, podrían proporcionar un mecanismo osmoregulador.

Las observaciones al TEM mostraron con frecuencia células binucleadas en las capas endimaria y subendimaria del DAN (Figura 19E), lo que asemeja a los tanicitos y células E2 y E3. Esta observación fue apoyada por la integración basal de BrdU en las células de la capa endimaria, pero también en las células GFAP+ entremezcladas con los procesos celulares (Figura 16).

La presencia y organización de estas células en el acueducto es intrigante. Tenemos pruebas de que tienen el potencial de dividirse y proliferar, pero son

necesarios más estudios para determinar qué tipo de estímulo desencadena su división o incluso a qué tipos de células dan lugar. Su relación con el PAG y su papel en la modulación del dolor se podrán abordar en estudios posteriores. Nuestra propuesta de acuerdo a los resultados mostrados en esta tesis es que las células del DAN con capacidad proliferativa en el adulto sean de origen oligodendroglial además de la presencia de una población de células similares a tanicitos.

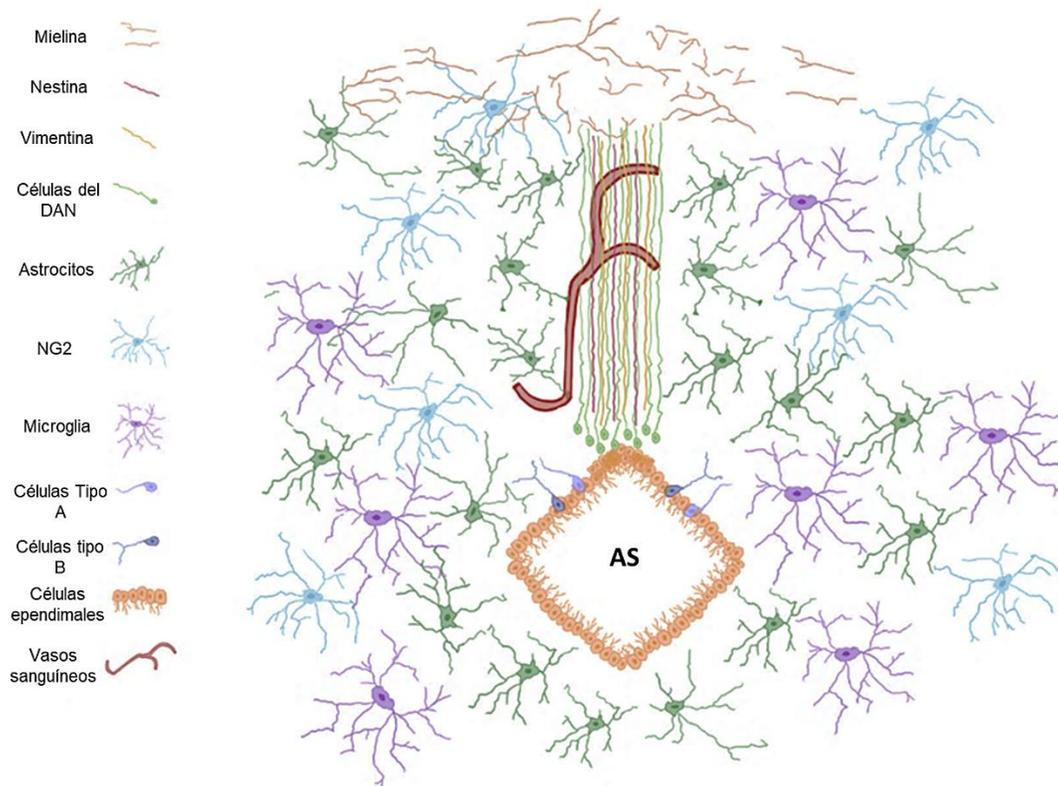


Figura 20. Resumen de la organización de un nuevo nicho celular en el acueducto dorsal (DAN). Las células del DAN similares a tanicitos poseen un pequeño soma en la zona subventricular del acueducto y un largo proceso que se proyecta hacia la sección dorsal del PAG, estas células expresan GFAP (verde), vimentina (amarillo), nestina (rosa) y el transportador de glutamato GLAST (no mostrado). Los procesos están en íntima relación con la vasculatura (rojo). Los astrocitos (en verde), la microglía (en morado) y las células NG2 (en azul) se entremezclan con las células de la región dorsal. En las paredes dorsolaterales del acueducto e intercaladas entre las células endodermiales, se pueden distinguir dos tipos celulares distintos: el tipo A, que posee un único proceso corto que se

proyecta hacia el parénquima, y el tipo B, que tiene un proceso que se bifurca en la sección distal. Ambos tipos de células muestran la expresión del gen GFAP.

CONCLUSIÓN

En este trabajo, se describió la presencia de un nuevo nicho de células dentro del sistema ventricular, en el ápice dorsomedial del acueducto de Silvio en el ratón adulto. Está ubicado desde la zona dorsal, cercana al cerebelo, hasta la parte anterior, próxima al tercer ventrículo. Son células similares a los tanicitos en morfología y en expresión de marcadores moleculares de identidad. Los somas se encuentran ubicados hacia la luz del ventrículo, contienen un solo y largo proceso dirigido hacia el parénquima que tiene contacto con la vasculatura; las células expresan marcadores como GFAP, nestina, PDGFR α , Ki67 e integran el marcador de proliferación BrdU; estos hallazgos señalan que tienen potencial proliferativo en condiciones basales. De acuerdo a estas características se le denominó DAN (nicho del acueducto dorsal) y está inmerso en la sección dorsal de la sustancia gris periacueductal (PAG), la cual está implicada en la modulación del dolor crónico. Sin embargo, se necesitan más estudios para saber de qué manera podría estar el DAN implicado en este proceso y su rol en la respuesta al dolor.

Por otro lado, también se describieron dos tipos de células denominadas tipo A y tipo B, estas expresan GFAP y están localizadas en las paredes laterales del acueducto de Silvio, e intercaladas entre las células ependimales. Ambos tipos celulares tienen el soma hacia el ventrículo, pero su diferencia reside en que las células tipo A, presentan un sólo proceso corto, mientras que las tipo B, presentan de igual manera un proceso corto pero que se bifurca en dos más. La función de estas células aún es desconocida.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

- Las células que conforman el DAN incluye precursores de oligodendrocitos y células similares a tanicitos, además de una pequeña población de microglía y neuronas.
- Las células similares a tanicitos tienen sus somas desplazados hacia la luz del ventrículo del AS y tienen procesos largos dirigidos hacia el parénquima, atravesando la región dorsal del PAG. Sus procesos tienen contacto con vasos sanguíneos, por lo que estas células forman una interfaz entre el ventrículo y la vasculatura.
- Las células similares a tanicitos se clasifican en al menos tres poblaciones: 1) positivas a nestina, 2) positivas a GFAP, 3) positivas a ambos marcadores. Una cuarta población es positiva a vimentina y GFAP, pero su número es muy limitado y están en contacto con el LCR.
- Las células similares a tanicitos del DAN son positivas para GLAST, un marcador de identidad de tanicitos.
- Las poblaciones de células NG2 y los progenitores de oligodendrocitos como PDGFR α se observaron en la luz del acueducto de Silvio, olig2 marcador de oligodendrocitos maduros a lo largo del DAN junto con PDGFR α .
- La microglía se observa en la región lateral del DAN contactando los somas y se observó también a lo largo de los procesos de las células similares a tanicitos.
- Algunas células del DAN integran BrdU y son positivas para Ki67 por lo que podrían tener potencial para dividirse y proliferar.

PERSPECTIVAS

- Conocer el linaje y expresión de marcadores de las células positivas a BrdU y Ki67.
- Estimular la inducción del DAN mediante lesiones experimentales del parénquima aledaño.
- Determinar si estas células entran en un proceso de división y diferenciación en el PAG y evaluar qué estímulos específicos detonan este proceso, de interés particular se considera su respuesta al dolor crónico.
- Evaluar si estas células se regeneran por señalización mediada desde el LCR (comunicación-acción-desecho).

REFERENCIAS

1. Alonso, M.I., Lamus, F., Carnicero, E., Moro, J.A., de la Mano, A., Fernández, J.M.F., Desmond, M.E., Gato, A. (2017). Embryonic Cerebrospinal Fluid Increases Neurogenic Activity in the Brain Ventricular-Subventricular Zone of Adult Mice. *Front Neuroanat.* 19;11:124. doi: 10.3389/fnana.2017.00124. PMID: 29311854; PMCID: PMC5742215.
2. Alvarez-Buylla, A., & García-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* 22(3), 629–634. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-03-00629.2002>.
3. Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., Tramontin, A.D. (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2:287–293.
4. Bagley, E.E., Ingram, S.L. (2020). Endogenous opioid peptides in the descending pain modulatory circuit. *Neuropharmacology.* 15;173:108131. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108131. Epub 2020 May 15. PMID: 32422213; PMCID: PMC7313723.
5. Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-morel, A., Anouar, Y., Trinquet, E., Jockers, R., Bouret, S.G., Prévot, V. (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metabolism.* 19 (2): 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.015>.
6. Bandler, R., Keay, K.A. (1996). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Prog Brain Res.* 107:285-300. doi: 10.1016/s0079-6123(08)61871-3. PMID: 8782526.
7. Barateiro, A., and Fernandes, A. (2014). Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1843 (9): 1917–1929. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.018>
8. Battaglia, R.A., Delic, S., Herrmann, H., Snider, N.T. (2018). Vimentin on the move: new developments in cell migration. *15:7 Faculty Rev-1796.* doi: 10.12688/f1000research.15967.1. PMID: 30505430; PMCID: PMC6241562.
9. Baumann, N., Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin

- in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 81(2):871-927. doi: 10.1152/physrev.2001.81.2.871. PMID: 11274346.
10. Becerra-González, M., Varman Durairaj, R., Ostos Valverde, A., Gualda, E.J., Loza-Alvarez, P., Portillo Martínez, W., Gómez-González, G.B., Buffo, A., Martínez-Torres, A. (2019). Response to Hypoxic Preconditioning of Glial Cells from the Roof of the Fourth Ventricle. *Neuroscience.* 439: 211–229. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.09.015>.
 11. Berger, U.V., and Hediger, M.A. (2001). Differential distribution of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in tanycytes of the third ventricle. *J Comp Neurol.* 433 (1): 101–114. <https://doi.org/10.1002/cne.1128>
 12. Bernal, A., and Arranz, L. (2018). Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Molec Life Sci.* 75 (12): 2177–2195. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2794-z>.
 13. Bolborea, M., & Dale, N. (2013). Hypothalamic tanycytes: Potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci.* 36:2, pp. 91–100). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.12.008>.
 14. Bolborea, M., Pollatzek, E., Benford, H., Sotelo-Hitschfeld, T., Dale, N. (2020). Hypothalamic tanycytes generate acute hyperphagia through activation of the arcuate neuronal network. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117 (25): 14473–14481. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919887117>.
 15. Carrive, P., Bandler, R., Dampney, R.A. (1987). Somatic and autonomic integration in the midbrain of the unanesthetized decerebrate cat: a distinctive pattern evoked by excitation of neurones in the subtentorial portion of the midbrain periaqueductal grey. *Brain Res.* 3;483(2):251-8. doi: 10.1016/0006-8993(89)90169-8. PMID: 2706518.
 16. Chauvet, N., Prieto, M., & Alonso, G. (1998). Tanycytes present in the adult rat mediobasal hypothalamus support the regeneration of monoaminergic axons. *Expe Neurol.* 151 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6784>.
 17. Choi, B.H., Lapham, L.W. (1978). Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study. *Brain Res.* 16;148(2):295-311. doi: 10.1016/0006-8993(78)90721-7. PMID: 77708.

18. Clayton, R.W., Lovell-Badge, R., Galichet, C. (2022). The Properties and Functions of Glial Cell Types of the Hypothalamic Median Eminence. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 27;13:953995. doi: 10.3389/fendo.2022.953995. eCollection 2022.
19. Đặng, T.C., Ishii, Y., Nguyen, V., Yamamoto, S., Hamashima, T., Okuno, N., Nguyen, Q.L., Sang, Y., Ohkawa, N., Saitoh, Y., Shehata, M., Takakura, N., Fujimori, T., Inokuchi, K., Mori, H., Andrae, J., Betsholtz, C., Sasahara, M. (2019). Powerful Homeostatic Control of Oligodendroglial Lineage by PDGFR α in Adult Brain. *Cell Rep*. 23;27(4):1073-1089.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.084. PMID: 31018125.
20. Das, G., Reuhl, K., Zhou, R. (2013). The Golgi-Cox method. *Methods Mol Biol* 1018: 313–321.
21. De Francesco, P. N., Castrogiovanni, D., Uriarte, M., Frassa, V., Agosti, F., Raingo, J., & Perello, M. (2017). A simple strategy for culturing morphologically-conserved rat hypothalamic tanycytes. *Cell Tissue Res*. 369(2), 369–380. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2608-x>
22. Frayling, C., Britton, R., & Dale, N. (2011). ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J Physiol*. 589 (9): 2275–2286. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202051>
23. Furube, E., Ishii, H., Nambu, Y., Kurganov, E., Nagaoka, S., Morita, M., Miyata, S. (2020). Neural stem cell phenotype of tanycyte-like ependymal cells in the circumventricular organs and central canal of adult mouse brain. *Sci Rep*. 10(1):2826. doi: 10.1038/s41598-020-59629-5. PMID: 32071335; PMCID: PMC7029029.
24. Gao, Z.R., Chen, W.Z., Liu, M.Z., Chen, X.J., Wan, L., Zhang, X.Y., Yuan, L., Lin, J.K., Wang, M., Zhou, L., Xu, X.H., Sun, Y.G. (2019). Tac1-Expressing Neurons in the Periaqueductal Gray Facilitate the Itch-Scratching Cycle via Descending Regulation. *Neuron*. 101 (1): 45-59.e9 <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.010>
25. George, D.T., Ameli, R., Koob, G.F. (2019). Periaqueductal Gray Sheds Light on Dark Areas of Psychopathology. *Trends Neurosci*. 42(5):349-360. doi:

- 10.1016/j.tins.2019.03.004. Epub 2019 Apr 4. PMID: 30955857.
26. Goings GE, Kozlowski DA, Szele FG. (2006). Differential activation of microglia in neurogenic versus non-neurogenic regions of the forebrain. *Glia* 54 (4): 329-42. doi: 10.1002/glia.20381. PMID: 16862532.
27. González-González, M.A., Gómez-González, G.B., Becerra-González, M., Martínez-Torres, A. (2017). Identification of novel cellular clusters define a specialized area in the cerebellar periventricular zone. *Scientific Reports*, 7: 40768. <https://doi.org/10.1038/srep40768>
28. González-Pérez, O., Quiñones-Hinojosa, A., García Verdugo, J.M. (2010). Immunological control of adult neural stem cells. *J Stem Cells*, 5, 23–31.
29. Goodman, T., and Hajihosseini, M.K. (2015). Hypothalamic tanycytes-masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Front Neurosci*. 9: 387. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00387>
30. Haan, N., Goodman, T., Najdi-Samiei, A., Stratford, C.M., Rice, R., Agha, E., Bellusci, S., Hajihosseini, M.K. (2013). Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *J Neurosci*. 33 (14): 6170–6180. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2437-12.2013>.
31. Hendrickson, M.L, Zutshi, I., Wield, A., Kalil, R.E. (2018). Nestin expression and in vivo proliferative potential of tanycytes and ependymal cells lining the walls of the third ventricle in the adult rat brain. *Europ J Neurosci*. (4): 284-293. doi: 10.1111/ejn.13834. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29359828
32. Hermann, A., Suess, C., Fauser, M., Kanzler, S., Witt, M., Fabel, K., Schwarz, J., Höglinger, GU., Storch, A., (2009). Rostro-caudal gradual loss of cellular diversity within the periventricular regions of the ventricular system. *Stem Cells*. 27(4):928-41. doi: 10.1002/stem.21. Erratum in: *Stem Cells*. 2010 Apr;28(4):843. PMID: 19353521.
33. Hirrlinger, P.G., Scheller, A., Braun, C., Hirrlinger, J., Kirchhoff, F. (2006). Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-inducible DNA recombinase variant CreERT2. *Glia*.54 (1): 11-20. doi: 10.1002/glia.20342. PMID: 16575885

34. Hofmann, K., Lamberz, C., Piotrowitz, K., Offermann, N., But, D., Scheller, A., Al-Amoudi, A., Kuerschner, L. (2017). Tanycytes and a differential fatty acid metabolism in the hypothalamus. *Glia*. 65 (2): 231–249. <https://doi.org/10.1002/glia.23088>
35. Hol, E.M., Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*. 32:121-30. doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.004. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25726916.
36. Horstmann, E. (1954). Die Faserglia des Selachiergehirns (The fiber glia of selacean brain). *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 39(6):588-617. German. PMID: 13206296.
37. Jung, J., Nam, J.H., Park, H.W., Oh, U., Yoon, J.H., Lee, M.G. (2013). Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO₃⁽⁻⁾ permeability by Ca²⁺/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (1): 360-5. doi: 10.1073/pnas.1211594110. Epub 2012
38. Kommata, V., & Dermon, C. R. (2018). Transient vimentin expression during the embryonic development of the chicken cerebellum. *Intern J Develop Neurosci*. 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.10.003>.
39. Lazarides, E. (1982). Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem*. 51:219-50. doi: 10.1146/annurev.bi.51.070182.001251. PMID: 6180679.
40. Lazutkaite, G., Soldà, A., Lossow, K., Meyerhof, W., Dale, N. (2017). Amino acid sensing in hypothalamic tanycytes via umami taste receptors. *Mol Metab*. 6 (11): 1480–1492. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.08.015>.
41. Lee, D.A., Bedont, J.L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., Takiar, V., Charubhumi, V., Balordi, F., Takebayashi, H., Aja, S., Ford, E., Fishell, G., Blackshaw, S. (2012). Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci*. 15 (5): 700–702. <https://doi.org/10.1038/nn.3079>
42. Li, P., Du, F., Yuelling, L.W., Lin, T., Muradimova, R.E., Tricarico, R., Wang,

- J., Enikolopov, G., Bellacosa, A., Wechsler-Reya, R.J., Yang, Z.J. (2013). A population of Nestin-expressing progenitors in the cerebellum exhibits increased tumorigenicity. *Nat Neurosci.* 16(12):1737-44. doi: 10.1038/nn.3553. Epub 2013 Oct 20. PMID: 24141309; PMCID: PMC3845444.
43. Li, Y., Song, Y., Zhao, L., Gaidosh, G., Laties, A.M., Wen, R. (2008). Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye Dil. *Nat. Protoc.* 3 (11): 1703-8. doi: 10.1038/nprot.2008.172
44. Lin, R., Iacovitti, L. (2015). Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. *Brain Res.* 2;1628(Pt B):327-342. doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.029. Epub 2015 Apr 28. PMID: 25931262.
45. Lofgren, F. (1958). A new theory on the relationship between the hypothalamus and the adenohypophysis. *Lunds Universitets Arsskrift* 2 (54): 1–15.
46. Lofgren, F. (1961). The glial–vascular apparatus in the floor of the infundibular cavity: Further studies on the transport mechanism between the hypothalamus and the anterior pituitary. *Lunds Universitets Arsskrift* 2 (57): 1–18.
47. Lowery, Anne Laura., Sive Hazel. (2009). Totally Tubular: The Mystery behind Function and Origin of the Brain Ventricular System. *Bioessays*, 31(4): 446–458.
48. Lun, M. P., Monuki, E. S., and Lehtinen, M. K. (2015). Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 445–457. doi: 10.1038/nrn3921.
49. Marshall, G.P., Demir, M., Steindler, D.A., Laywell, E.D. (2008). Subventricular zone microglia possess a unique capacity for massive in vitro expansion. *Glia* 56 (16): 1799–1808. <https://doi.org/10.1002/glia.20730>.
50. Mirzadeh, Z., Kusne, Y., Duran-Moreno, M., Cabrales, E., Gil-Perotin, S., Ortiz, C., Chen, B., Garcia-Verdugo, J. M., Sanai, N., & Alvarez-Buylla, A. (2017). Bi- and unciliated ependymal cells define continuous floor-plate-derived tanycytic territories. *Nat Commun.* 8: 1–12.

<https://doi.org/10.1038/ncomms13759>

51. Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kühn, R., Götz, M. (2006). Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia*. 54 (1): 21-34. doi: 10.1002/glia.20350. PMID: 16652340.
52. Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S., van der Kooy, D. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*. 13(5):1071-82. doi: 10.1016/0896-6273(94)90046-9. PMID: 7946346.
53. Mortazavi, M.M., Adeeb, N., Griessenauer, C.J., Sheikh, H., Shahidi, S., Tubbs, R.I., Tubbs, R.S. (2014). The ventricular system of the brain: A comprehensive review of its history, anatomy, histology, embryology, and surgical considerations. *Child's Nerv Syst*. 30 (1): 19–35. <https://doi.org/10.1007/s00381-013-2321-3>.
54. Nishiyama, A., Chang, A., Trapp, B.D. (1999). NG2+ glial cells: a novel glial cell population in the adult brain. *J Neuropath Exp Neurol* 58 (11): 1113-24. doi: 10.1097/00005072-199911000-00001. PMID: 10560654.
55. Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.K., Kirchhoff, F., Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia*. 33: 72–86.
56. Orellana, J.A., Sáez, P.J., Cortés-Campos, C., Elizondo, R.J., Shoji, K.F., Contreras-Duarte, S., Figueroa, V., Velarde, V., Jiang, J.X., Nualart, F., Sáez, J.C., García, M.A. (2012). Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia*. 60 (1): 53-68. doi: 10.1002/glia.21246.
57. Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R., Pistón, D.W. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J*. 73:2782–2790.

58. Paxinos, G., & Franklin, K.B.J. 2001. *The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates* 2nd edn, (Academic Press).
59. Pérez-Martín, M., Cifuentes, M., Grondona, J.M., López-Avalos, M.D., Gómez-Pinedo, U., García-Verdugo, J.M., Fernández-Llebrez, P. (2020). IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. *Eur J Neurosci.* 31(9):1533-48. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07220.x. PMID: 20525067.
60. Peruzzo, B., Pastor, F.E., Blázquez, J.L., Amat, P., Rodríguez, E.M. (2004). Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat. *Cell Tissue Res.* 317 (2): 147–164. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0899-1>.
61. Recabal, A., Caprile, T., & García-Robles, M. de los A. (2017). Hypothalamic neurogenesis as an adaptive metabolic mechanism. *Frontiers Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00190>.
62. Ribeiro Xavier, A.L., Kress, B.T., Goldman, S.A., Lacerda Menezes, J.R., Nedergaard, M. (2015). A distinct population of microglia supports adult neurogenesis in the subventricular zone. *J Neurosci.* 35 (34): 11848–11861. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1217-15.2015>.
63. Ridge, K.M., Eriksson, J.E., Pekny, M., Goldman, R.D. (2022). Roles of vimentin in health and disease. *Genes Dev.* 1;36(7-8):391-407. doi: 10.1101/gad.349358.122. PMID: 35487686; PMCID: PMC9067405.
64. Robins, S.C., Stewart, I., McNay, D.E., Taylor, V., Giachino, C., Goetz, M., Ninkovic, J., Briancon, N., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., Kokoeva, M.V., Placzek, M. (2013). α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat Communi.* 4: 2049. <https://doi.org/10.1038/ncomms3049>.
65. Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., Pastor, F. E., Peláez, B., Peña, P., Peruzzo, B., & Amat, P. (2005). Hypothalamic tanycytes: A key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol.* 247(05), 89–164. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)47003-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)47003-5).
66. Rodríguez, E., Guerra, M., Peruzzo, B., Blázquez, J.L. (2019). Tanycytes: A

- rich morphological history to underpin future molecular and physiological investigations. *J Neuroendocrinol.* 31(3):e12690. doi: 10.1111/jne.12690. Epub 2019 Mar 10. PMID: 30697830.
67. Rodríguez-Arzate, C.A., Martínez-Mendoza, M.L., Rocha-Mendoza, I., Luna-Palacios, Y., Licea-Rodríguez, J., Martínez-Torres, A. (2021). Morphological and Calcium Signaling Alterations of Neuroglial Cells in Cerebellar Cortical Dysplasia Induced by Carmustine. *Cells.* 10 (7): 1581. doi: 10.3390/cells10071581. PMID: 34201497; PMCID: PMC8304447.
68. Rojczyk-Gołębiewska, E., Pałasz, A., Wiaderkiewicz, R. (2014). Hypothalamic subependymal niche: a novel site of the adult neurogenesis. *Cell Mol Neurobiol.* 34(5):631-42. doi: 10.1007/s10571-014-0058-5
69. Sabourin, J.C., Ackema, K.B., Ohayon, D., Guichet, P.O., Perrin, F.E., Garces, A., Ripoll, C., Charité, J., Simonneau, L., Kettenmann, H., Zine, A., Privat, A., Valmier, J., Pattyn, A., Hugnot, J.P. (2009). A mesenchymal-like ZEB1(+) niche harbors dorsal radial glial fibrillary acidic protein-positive stem cells in the spinal cord. *Stem Cells.* 27(11):2722-33. doi: 10.1002/stem.226. PMID: 19785035.
70. Schaeffer, M., Langlet, F., Lafont, C., Molino, F., Hodson, D.J., Roux, T., Lamarque, L., Verdié, P., Bourrier, E., Dehouck, B., Banéres, J.L., Martinez, J., Méry, P.F., Marie, J., Trinquet, E., Fehrentz, J.A., Prévot, V., Mollard, P. (2013). Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110 (4): 1512–1517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212137110>.
71. Šerý, O., Sultana, N., Kashem, M.A., Pow, D.V., Balcar, V.J. (2015). GLAST But Not Least--Distribution, Function, Genetics and Epigenetics of L-Glutamate Transport in Brain--Focus on GLAST/EAAT1. *Neurochem Res.* 40(12):2461-72. doi: 10.1007/s11064-015-1605-2. Epub 2015 May 14. PMID: 25972039.
72. Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K., Inoue, Y. (1997). Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J Neurosci.*

- 1;17(23):9212-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-23-09212.1997. PMID: 9364068; PMCID: PMC6573593.
73. Shiga, T., Ichikawa, M., Hirata, Y. (1983). A Golgi study of Bergmann glial cells in developing rat cerebellum. *Anat Embryol.* 191-201
74. Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell.* 8;7(4):483-95. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.014. PMID: 20887954; PMCID: PMC4008496.
75. Sirerol-Piquer, M.S., Belenguer, G., Morante-Redolat, J.M., Duart-Abadia, P., Perez-Villalba, A., Fariñas, I. (2019). Physiological Interactions between Microglia and Neural Stem Cells in the Adult Subependymal Niche. *Neuroscience.* 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.009>
76. Su X, Guan W, Yu YC, Fu Y. 2014. Cerebellar stem cells do not produce neurons and astrocytes in adult Mouse. *Biochem Bioph Res Co*, 450, 378–383.
77. Vijayan, V.K., Lee, Y.L., Eng, L.F. (1990). Increase in glial fibrillary acidic protein following neural trauma. *Mol Chem Neuropathol* 13:107– 118.
78. Walton, N.M., Sutter, B.M., Laywell, E.D., Levkoff, L.H., Kearns, S.M., Marshall, G.P., Scheffler, B., Steindler, D.A. (2006). Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia.* 54 (8): 815-25. doi: 10.1002/glia.20419. PMID: 16977605.
79. Yoo, S., Blackshaw, S. (2018). Regulation and function of neurogenesis in the adult mammalian hypothalamus. *Prog Neurobiol.* 170:53-66. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.04.001.
80. Zamboni, M., Llorens-Bobadilla, E., Magnusson, J.P., Frisén, J. (2020). A Widespread Neurogenic Potential of Neocortical Astrocytes Is Induced by Injury. *Cell Stem Cell.* 1;27(4):605-617.e5. doi: 10.1016/j.stem.2020.07.006. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32758425; PMCID: PMC7534841.
81. Zhuo, L., Sun, B., Zhang, C.L., Fine, A., Chiu, S.Y., Messing, A. (1997). Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice.

Develop Biol. 187:36–42.

82. Zilkha-Falb, R., Kaushansky, N., Ben-Nun, A. (2020). The Median Eminence, A New Oligodendrogenic Niche in the Adult Mouse Brain. *Stem Cell Reports* 14 (6): 1076-1092. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.04.005.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema ventricular

Figura 2. Organización y linaje en la zona subventricular

Figura 3. Esquema de la localización de los tanicitos

Figura 4. Organización de las células GFAP⁺/nestina⁺ en la preparación de libro abierto

Figura 5. Imagen de microscopía confocal de un corte coronal de cerebelo del ratón GFAP-eGFP

Figura 6. Cúmulo celular del techo del cuarto ventrículo

Figura 7. Atlas del cerebro de ratón

Figura 8. Cortes coronales a nivel del PAG muestran un novedoso nicho celular.

Figura 9. Nestina

Figura 10. Marcaje de vimentina.

Figura 11. GLAST

Figura 12. Interacción del DAN con las vasculatura

Figura 13. Microglía

Figura 14. Linaje de oligodendrocitos en el DAN

Figure 15. Células de linaje neuronal en el DAN

Figura 16. Incorporación de BrdU

Figura 17. Marcaje Ki67

Figura 18. Superficie del AS por SEM

Figura 19. DAN con tinción de toluidina

Figura 20. Resumen de la organización de un nuevo nicho celular en el acueducto dorsal

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1. Distribución de preoligodendrocitos y microglía en la región dorsal del PAG

Figura suplementaria 2. BrdU control

LISTA DE TABLAS

- 1. Marcadores de identidad de tanicitos y su clasificación.**
- 2. Filamentos intermedios**

Suplementaria 1. Lista de anticuerpos para inmunofluorescencias

Suplementaria 2. Líneas transgénicas.

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Tabla Suplementaria 1. Lista de anticuerpos para inmunofluorescencias

NOMBRE	HOST	DILUCIÓN	ID	COMPAÑÍA
ANTICUERPOS PRIMARIOS				
GFAP (2E1)	Mouse	1:200	sc-33673	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
VIMENTIN (V9)	Mouse	1:200	sc-6260	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
NESTIN	Mouse	1:200	sc-33677	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
ANTI-NEURONAL NUCLEI (NEUN)	Mouse	1:200	MAB377	Millipore
BRDU	Rat	1:1000	ab6326	Abcam
CD31	Mouse	1:100	632496	BD PHARMINGEN
KI67	Mouse	1:500	PA5-19462	Invitrogen
OLIG2	Mouse	1:1000	AB9610	Abcam
PDGFRA	Mouse	1:1000	AF1062	R&D Systems
DCX	Guinea Pig	1:6000	AB2253	Millipore
IBA1	Rabbit	1:200	019-19741	Wako
NG2	Goat	1:200	30923	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
ANTI-GFP (PARA REPORTERO GCAMP3)	Goat	1:1000		Rockland, Limerick, PA, USA

ANTICUERPOS SECUNDARIOS					
ALEXA 594	FLUOR	Anti- Mouse	1:200	A-21203	Molecular Probes
ALEXA 488	FLUOR	Anti- Mouse	1:200	A-11001	Molecular Probes
ALEXA 488	FLUOR	Anti- Rat	1:200	A-11006	Molecular Probes

Tabla suplementaria 2. Líneas transgénicas.

Línea transgénica	Inducción por tamoxifeno	Descripción	Referencia
TgN(hGFAP-CreERT2)	Sí	Expresión inducible por la variante cre, CreERT2 en astrocitos.	(Hirrlinger et al., 2005)
TgH(GLAST-CreERT2)	Sí	Expresión inducible por la variante cre, CreERT2 en astrocitos.	(Mori et al., 2006)
TgN(hGFAP-EGFP)	No	Expresión en astrocitos.	(Nolte et al., 2001)
TgH(CX₃CR₁-EGFP)	No	EGFP en microglia	(Jung et al., 2000)

Figura suplementaria 1

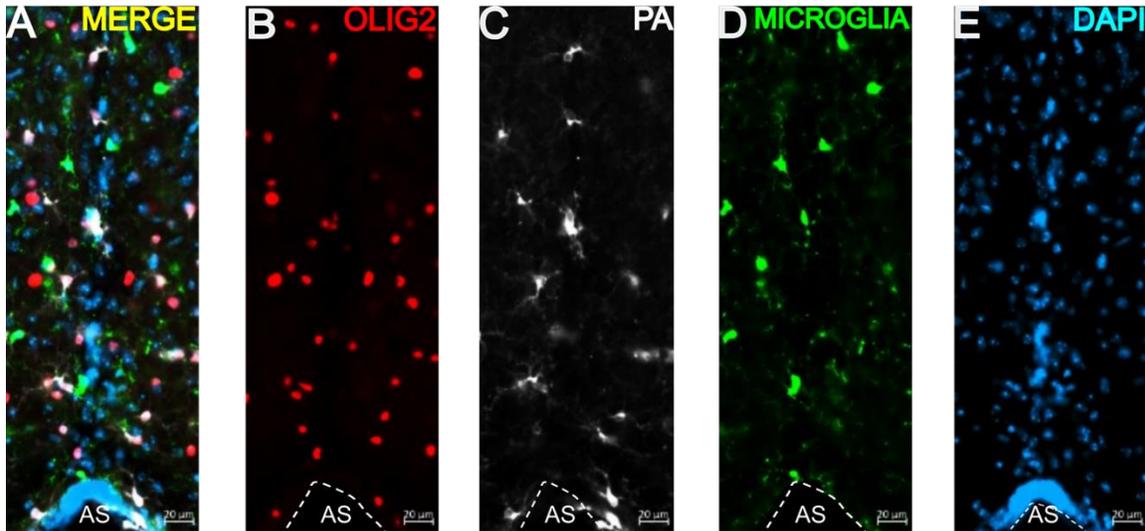


Figura suplementaria 1. Distribución de preoligodendrocitos y microglía en la región dorsal del PAG. A) Triple tinción de microglía (TgH CX₃CR₁-EGFP, verde) y preoligodendrocitos (Olig2, rojo y PA, PDGRF α , blanco), B y C. La mayoría de las células preoligodendrocíticas están distribuidas cerca de los procesos del DAN. D) Las células microgliales se encontraron de manera intercalada en los procesos del DAN (como en la figura 9D). E) DAPI.

Figura suplementaria 2

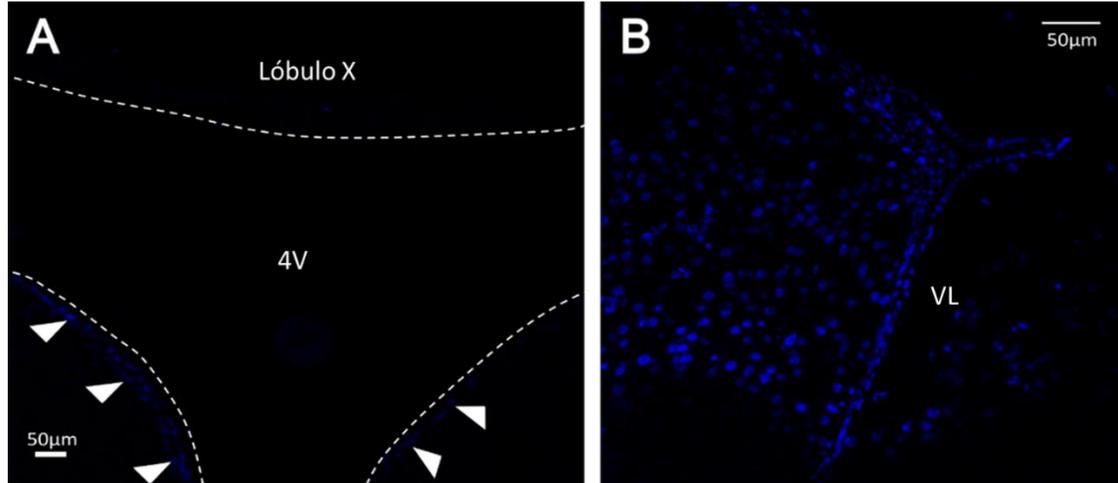


Figura suplementaria 2. BrdU control. A. Cortes coronales a nivel del cuarto ventrículo (4V) que muestran la incorporación de BrdU en la región periventricular del bulbo (cabezas de fleche blancas). B. Incorporación de BrdU en los ventrículos laterales (VL). Las imágenes corresponden a cortes del mismo ratón usado en la Figura 13.