

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CITOQUINAS SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS NEURALES EN RATONES ADULTOS

Trabajo Final de Grado
del alumno



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, Buenos Aires. Marzo 2018

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CITOQUINAS SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS
NEURALES EN RATONES ADULTOS**

Trabajo Final de Grado

del alumno

ALEJANDRO DAVID MORONI

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Evaluador

Evaluador

Evaluador

Dra. María Laura Palumbo
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, Buenos Aires. Marzo 2018

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA)**, por haberme brindado educación pública de calidad y permitir mi formación académica. A la **Ing. Agr. Susana Pistorale**, por su ayuda constante y desinteresada a los alumnos de la carrera. A los **docentes** de la Universidad, varios de los cuales sentaron las bases para que decida inclinarme hacia la investigación científica.

A mi directora de tesis, la **Dra. Laura Palumbo**, por su guía constante durante todo el proceso, su disponibilidad para lo que sea necesario y por haberme enseñado todo lo que aprendí sobre investigación en este tiempo, con gran dedicación, entusiasmo y sobre todo la (gran) paciencia necesaria que requiero muchas veces.

A toda la gente del **Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas (CIBA): Agus, Anto, Anyi, Caro, Dai D, Dai V, Fio, Gastón, Giani, Jose, Juli, Lau A, Martín, Moni, Na, Nati, Rodri, Sofi P, Sofi V y Vir**, por hacer del ambiente de trabajo un lugar donde uno quiere estar, se siente cómodo y además de trabajar tranquilo puede pasar un buen momento. Por la ayuda cada vez que fue requerida para evacuar cada duda sobre experimentos que fueron surgiendo.

A la **Dra. Laura Alaniz, Lic. Fiorella Spinelli** y la **Dra. Mariana García** por facilitarnos el uso del microscopio de fluorescencia del Hospital Universitario Austral, utilizado para analizar gran parte de los experimentos de este trabajo de tesis.

A mis amigos de toda la vida, **Cami, Fede, Guido, Richard y Santi**, por estar siempre presentes desde el colegio primario.

A mis compañeros con los que compartí cursadas durante la carrera y a la gran cantidad de amigos que me deja la Universidad. En especial a **Mati y Luján**, por todas las ayudas que me dieron durante la carrera y por abrirme las puertas de su casa en Pergamino cada vez que lo necesite. A **Anto y Ro**, un dúo de excelentes personas y

amigas. A **Guille**, amiga desde el secundario con quien tuve el gusto de compartir la Universidad. A **Estefi, Jose y Rami**, mi grupo de amigos de la Universidad, con quienes compartí muchísimas cosas y agradezco la ayuda de siempre.

A mi toda mi **familia**, por estar siempre en todo momento. A mis abuelos, **Blanca y Osvaldo**, que me acompañaron una buena parte de mi carrera.

A mi **hermana Vale**, por enseñarme que siempre se puede ser más ordenado. A mi **mamá**, por bancarme incondicionalmente desde que empecé la carrera, preocuparse por mí en todo momento y por ponerse la familia al hombro cuando todo se hizo cuesta arriba.

Por último, especialmente a mi **papá**, que fue la persona que con su esfuerzo me dio la posibilidad de estudiar una carrera universitaria, sin él no hubiese sido posible. Voy a estar eternamente agradecido.

Abreviaturas

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ANOVA: análisis de la varianza

BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro.

BFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico (del inglés *basic fibroblast growth factor*).

BHE: barrera hematoencefálica.

BrdU: 5'-bromo-2'-deoxiuridina.

CNPasa: del inglés *2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*.

DCX: doblecortina.

DG: giro dentado (del inglés *dentate gyrus*).

EA: enfermedad de Alzheimer.

EBSS: del inglés *Earl buffer salt solution*.

EGF: factor de crecimiento epidermal (del inglés *epidermal growth factor*).

EM: esclerosis múltiple.

GFAP: proteína glial fibrilar ácida (del inglés *glial fibrillary acidic protein*).

HBSS: del inglés *Hanks buffer salt solution*.

HHA: hipotálamo-hipófisis-adrenal.

IFN- γ : interferón-gamma.

IL: interleuquina.

NG2: anticuerpo neural-glial 2 (del inglés, *neural-glial antigen 2*).

NPCs: células progenitoras neurales (del inglés *neural progenitor cells*).

OPCs: células progenitoras de oligodendrocitos (del inglés *oligodendrocyte progenitor cells*).

PDGFRa: receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PDL: poli-d-lisina.

RGL: célula glial radial (del inglés *radial glia-like*).

RIP: del inglés *receptor interacting protein*.

RMS: corriente migratoria rostral (del inglés *rostral migratory stream*).

SGZ: zona subgranular (del inglés *subgranular zone*).

SI: sistema inmune.

SNC: sistema nervioso central.

SVZ: zona subventricular (del inglés *subventricular zone*).

TGF: factor de crecimiento transformante.

Th: linfocitos T colaboradores (del inglés *T helper cells*).

TNF: factor de necrosis tumoral.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Neurogénesis en el cerebro adulto.....	2
1.1.2 Neurogénesis en la SVZ.	3
1.2 Células progenitoras neurales.....	5
1.3 Neuronas.....	6
1.4 Células gliales.....	8
1.4.1 Astrocitos.....	8
1.4.2 Oligodendrocitos.....	9
1.5 Inmunomodulación en el SNC.....	12
1.5.1 Acción de las citoquinas sobre las NPCs.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1 Animales.....	18
2.2 Disección del hipocampo y muestras utilizadas.....	18
2.3 Cultivo de células progenitoras neurales.....	18
2.4 Determinación de la proliferación de células progenitoras neurales.....	19
2.4.1 Proliferación de las NPCs <i>in vitro</i>	19
2.4.2 Tratamientos.....	20
2.4.3 Inmunocitoquímica.....	20
2.5 Determinación de la diferenciación de las células progenitoras neurales.....	20
2.5.1 Diferenciación de las NPCs <i>in vitro</i>	20
2.5.2 Tratamientos.....	21

2.5.3 Inmunocitoquímica	21
2.6 Análisis de datos.....	21
2.7 Análisis estadístico	22
RESULTADOS	23
3.1 Puesta a punto de cultivo	24
3.2 Evaluación del efecto <i>in vitro</i> de las citoquinas sobre la proliferación de las NPCs hipocampales.	26
3.2.1 IFN- γ	27
3.2.2 IL-1 β	29
3.2.3 IL-4.....	29
3.2.4 IL-6.....	30
3.3 Evaluación del efecto <i>in vitro</i> de las citoquinas sobre la diferenciación de las NPCs hipocampales	32
3.3.1 IFN- γ	34
3.3.2 IL-1 β	35
3.3.3 IL-4.....	37
3.3.4 IL-6.....	38
DISCUSIÓN.....	40
Bibliografía.....	49

Resumen

La neurogénesis adulta, originada por las células progenitoras neurales (NPCs), ha sido observada en dos regiones del cerebro: la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular (SGZ) en el hipocampo. El hipocampo es una estructura involucrada en el aprendizaje y las memorias asociativas y espaciales. Las NPCs se caracterizan por autorrenovar su población celular a través de la proliferación y de generar las células del linaje neural, como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Los nichos neurogénicos están altamente regulados por varios factores, entre ellos, las citoquinas provenientes tanto del sistema inmune (SI) como del SNC. Así, las citoquinas han sido implicadas en procesos de proliferación, supervivencia, diferenciación y maduración de las NPCs relacionados con el aprendizaje y la memoria. Además, el IFN- γ , IL-1 β e IL-6 han sido implicadas en desordenes psiquiátricos. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que ratones Balb/c hembras expuestas a un modelo de estrés crónico presentaron una menor capacidad de aprendizaje y memoria y disminución de la neurogénesis, que se correlacionaron con alteraciones en el balance Th1/Th2. En este trabajo, nos planteamos como objetivo la puesta a punto del cultivo *in vitro* de NPCs hipocampales y la evaluación del efecto de las citoquinas IFN- γ , IL-1 β , IL-4 e IL-6 sobre la proliferación y diferenciación de estas células. Observamos que el IFN- γ induce una disminución en la proliferación de las NPCs en un rango de concentraciones de entre 1 y 50 ng/mL y no afectó significativamente la diferenciación de las NPCs. No encontramos diferencias significativas en cuanto a la proliferación y diferenciación de las NPCs estimuladas con distintas concentraciones de IL-1 β ni IL-4. La IL-6 indujo efectos opuestos sobre la proliferación de manera dosis dependiente. NPCs estimuladas con 1 ng/mL de IL-6 aumentó la proliferación mientras que 50 ng/mL de IL-6 la redujo significativamente. Más estudios son necesarios para determinar el papel de las citoquinas sobre los procesos de proliferación y diferenciación de las NPCs

adultas. Estos resultados podrían aportar herramientas para contribuir en un futuro a desarrollar posibles terapias contra patologías relacionadas con déficit cognitivos.

INTRODUCCIÓN

1.1 Neurogénesis en el cerebro adulto

Al contrario de lo que se pensaba originalmente y gracias a la utilización de nuevas técnicas, se pudo demostrar la generación de nuevas células en el cerebro de mamíferos adultos (Gross, 2000). La neurogénesis adulta, originada por las células progenitoras neurales (NPCs, del inglés neural progenitor cells), ha sido observada en dos regiones del cerebro: en la zona subventricular (SVZ, del inglés *subventricular zone*) del ventrículo lateral y la zona subgranular (SGZ, del inglés *subgranular zone*) del giro dentado (DG, del inglés *dentate gyrus*) en el hipocampo. Las nuevas neuronas generadas en la SVZ migran a través de la corriente migratoria rostral (RMS, del inglés *rostral migratory stream*) y maduran a neuronas granulares y periglomerulares en el bulbo olfatorio. Las neuronas generadas en la SGZ se diferencian e integran en la red neural local como células granulares del giro dentado (Deng *et al.*, 2010) (Figura 1).

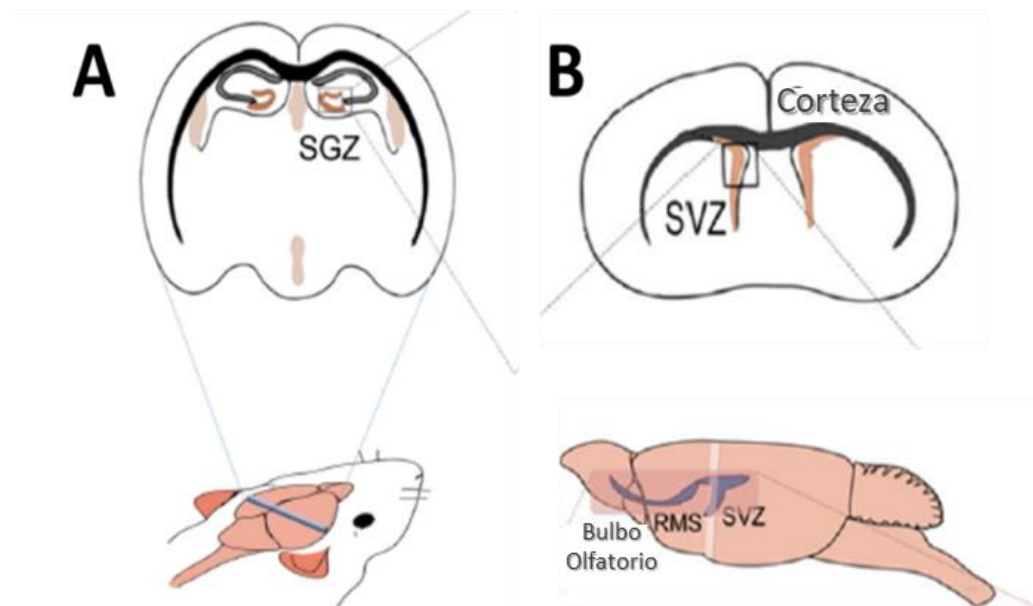


Figura 1: Zonas neurogénicas en el cerebro adulto de ratón. A) Esquema de un corte coronal de un cerebro de ratón a la altura del hipocampo resaltando la SGZ. B) Esquema de un corte coronal de un cerebro de ratón a la altura de la SVZ. C) Esquema de un corte sagital del cerebro de un ratón donde se señala la SVZ, la corriente migratoria rostral (RMS) y el bulbo olfatorio. Modificado de Gonzalez-Perez *et al.*, 2012

1.1.1 Neurogénesis en el hipocampo

Debido a que el hipocampo ha sido asociado con el aprendizaje y complejas formas de memorias asociativas y espaciales, se ha teorizado que la neurogénesis adulta podría cumplir un rol funcional en la cognición (Koehl y Abrous., 2011; Navarro-Sanchis *et al.*, 2017).

Las células progenitoras neurales, denominadas células RGLs de tipo 1 (del inglés *radial glia-like*) son encontradas en la SGZ donde el microambiente propio de esta zona permite a las células RGLs proliferar y mantener su población celular. Las células RGLs generan progenitores de amplificación transitorios (células de tipo 2a y 2b) y estos dan origen a los neuroblastos (células de tipo 3) que se diferencian en neuronas del DG (Figura 2). Además de neuronas, las células progenitoras neurales de la SGZ pueden generar una pequeña población de células gliales, como los astrocitos (Toda y Gage., 2017).

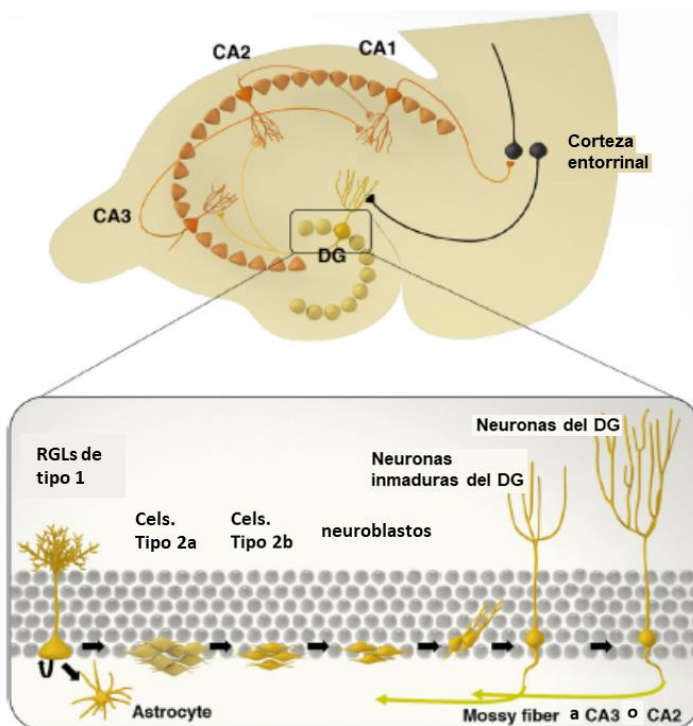


Figura 2: Neurogénesis en el hipocampo. Panel superior: esquema de corte sagital a la altura del hipocampo en donde se observa el giro dentado (DG). **Panel inferior:** esquema de los distintos estadios que atraviesan las RGLs de tipo 1 durante el proceso de diferenciación a neuronas maduras del DG. Modificado de de Toda y Gage., 2017

1.1.2 Neurogénesis en la SVZ.

A diferencia de los roedores, la neurogénesis en humanos adultos en la SVZ parece no tener un rol importante en condiciones normales, esto podría ser debido a la menor

importancia del estímulo olfatorio en humanos, comparado con otros sentidos como el de la vista, y la reducción de genes que codifican receptores olfatorios (Rusznák *et al.*, 2016; Toda y Gage., 2017).

En roedores, las células RGLs de la SVZ expresan marcadores de astrocitos como la proteína glial fibrilar ácida (GFAP, del inglés *glial fibrillary acidic protein*), Sox2 y Tlx. Este último requerido para mantener la capacidad de célula madre y suprimir la diferenciación en astrocitos. Las RGLs pueden estar en un estado activo o quiescente y la población activa se caracteriza por expresar Nestina, un filamento intermedio. Las RGLs originan progenitores de amplificación transitoria y estos últimos neuroblastos. Los neuroblastos migran a través de la corriente migratoria rostral, donde pueden proliferar, pero a una tasa muy reducida. Durante la migración, los neuroblastos comienzan la maduración neuronal y expresan marcadores de neuronas inmaduros como doblecortina (DCX) y β -tubulina III. La expresión de marcadores característicos de neuronas maduras no se produce hasta que las células alcancen el bulbo olfatorio (Figura 3). Los distintos marcadores que expresen durante su maduración final dependerán del tipo de neurona madura a la cual se diferencien (Farzanehfar, 2018; Lim y Alvarez-Buylla., 2016).

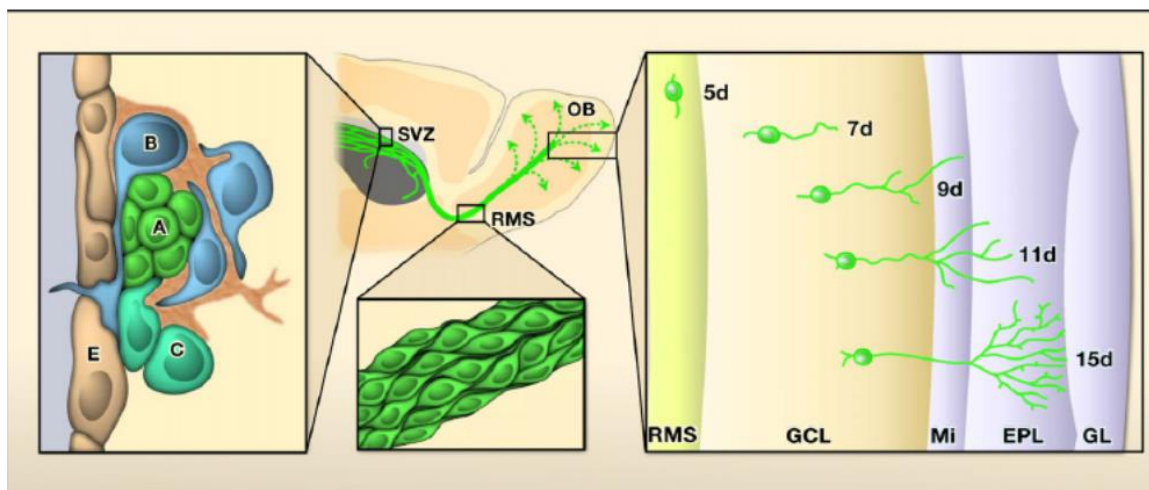


Figura 3: Neurogénesis en SVZ. **Panel izquierdo:** esquema de las distintas células que forman parte del nicho neurogénico de la SVZ. Adyacente a las células endociliales (E), se encuentran los progenitores de amplificación transitoria (B y C) y los neuroblastos (A) que son los que van a migrar al bulbo olfatorio. **Panel medio:** esquema del recorrido de los neuroblastos desde la SVZ a través de la corriente migratoria rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio (BO). **Panel derecho:** esquema de maduración de los neuroblastos en el bulbo olfatorio donde van a completar su maduración a neuronas funcionales. Se indica el tiempo de maduración en días y la ubicación de las células en las distintas capas que componen el bulbo olfatorio. GCL, capa celular granular; Mi, capa de células mitrales; EPL, capa plexiforme externa y GL, capa glomerular. Modificado de (Zhao *et al.*, 2008).

1.2 Células progenitoras neurales

Las NPCs están caracterizadas por tener la habilidad de autorrenovar su población celular a través de la proliferación y de generar las células del linaje neuronal, como lo son las neuronas, los astrocitos y los oligodendrocitos (Gage, 2000).

Los nichos neurogénicos están altamente regulados por varios factores que determinan los procesos de proliferación, diferenciación, supervivencia y maduración de las NPCs, entre ellos cabe mencionar a las neurotrofinas y citoquinas secretadas tanto por células del sistema nervioso central (SNC) como por células del sistema inmune (SI) (Ming y Song., 2011). Estos factores tienen un rol regulador crucial bajo condiciones neuropatológicas, por lo que el estudio de la neurogénesis adulta y su alteración han recibido un creciente interés.

La desregulación de la neurogénesis en el DG ha sido asociada con desordenes depresivos y de ansiedad. Así mismo, se ha observado una neurogénesis anormal en el DG y un deterioro en las propiedades de las NPCs en animales que contienen mutaciones para genes ligados a la Enfermedad de Alzheimer (Rodrigues *et al.*, 2017; Sacco *et al.*, 2018).

No existe un marcador único definitivo para detectar NPCs. El más ampliamente usado es Nestina, pero puede ser encontrado en otros tipos de células, por lo que la mejor práctica para detectar NPCs es la combinación de marcadores. Por ejemplo, las NPCs en la SGZ expresan GFAP y Nestina, GFAP y Sox2 o Pax6, GFAP y proteína de unión a lípido cerebral, entre otros (Kuhn *et al.*, 2016).

1.3 Neuronas

Las neuronas son células capaces de transmitir información a través de señales eléctricas y químicas. Estas señales se llevan a cabo mediante conexiones especializadas llamadas sinapsis. Las neuronas tienen una forma extendida, con un largo axón y dendritas ramificadas que se conectan mediante sinapsis con otras células (Figura 4) (Alberts, *et al.*, 2002).

Las neuronas, por más de cien años han sido el centro de atención en materia de estudios sobre el SNC. En un principio se propuso a la neurona individual como la unidad estructural y funcional del sistema nervioso. Esto fue parte de la denominada *doctrina de la neurona* y su mayor representante fue el español Santiago Ramón y Cajal. Usando métodos de microscopía y la tinción de Golgi se pudo observar con relativa integridad la morfología de las neuronas. Cajal fue capaz de distinguir dos tipos de contactos entre células nerviosas: conexiones con el cuerpo celular y conexiones con las dendritas, estas conexiones fueron llamadas articulaciones por Cajal para luego ser denominadas como sinapsis por Charles Sherrington (DeFelipe, 2015). Hoy en día existe evidencia de que las neuronas no funcionan de manera individual si no que el funcionamiento del circuito neuronal surge de la activación de un grupo de neuronas ensambladas. Las neuronas

reciben conexiones de entrada de distintas neuronas mientras que a su vez envían conexiones de salida a diferentes poblaciones celulares (Yuste, 2015).

La diversidad de tipos de células neuronales que existen en distintas regiones del SNC es muy grande y probablemente no sea conocida completamente, además de variar entre las distintas especies (Lodato y Arlotta., 2015). Hay tres categorías principales para clasificar a las neuronas: morfológica, fisiológica y molecularmente. En cuanto a características morfológicas, la forma de los axones, las dendritas y los patrones de ramificación han sido las características más utilizadas para clasificar a las neuronas. Las propiedades fisiológicas incluyen los potenciales de reposo, propiedades biofísicas y los rangos de generación de los potenciales de acción. De todas las propiedades moleculares que pueden ser consideradas, las más útiles son la composición de proteínas y ARNm. Igualmente hay que considerar que las células neurales no son homogéneas dentro de una misma categoría. Otra forma de clasificación de los tipos de células neuronales es la jerárquica donde existe una división en clases, subclases, tipos y subtipos. Como ejemplo de clases de neuronas tenemos neuronas sensoriales, interneuronas, de proyección, excitatorias e inhibitorias (Zeng y Sanes., 2017).

La generación de una nueva neurona madura involucra una serie de pasos incluyendo proliferación, salida del ciclo celular, determinación del linaje neuronal, maduración e integración funcional a los circuitos neuronales preexistentes. Estos estadios del desarrollo pueden distinguirse por la expresión de marcadores proteicos específicos de estado. Doblecortina (DCX) es una proteína de unión a microtúbulos y en adultos, está altamente expresada en neuronas inmaduras en el DG y la SVZ. Es comúnmente usada para distinguir neuronas inmaduras de precursores no neuronales y neuronas maduras. (Francis *et al.*, 1999; Priller *et al.*, 2013). Otra proteína utilizada como marcador del linaje neuronal y que se expresa conjuntamente con DCX es β -tubulina III. Esta proteína heterodimérica es la estructura principal de los microtúbulos (Korzhevskii *et al.*, 2012).

1.4 Células gliales

La glía está compuesta por un grupo heterogéneo de células que incluyen la microglía, astrocitos, células de Schwann y oligodendrocitos. A diferencia de las neuronas, las células gliales no poseen la capacidad de conducir potenciales de acción. Sin embargo, cumplen distintas funciones incluyendo el soporte de la neurotransmisión, mantenimiento del balance iónico en el espacio extracelular, formando una capa de mielina sobre los axones, entre otras. Las neuronas y las células gliales comparten un origen común, el neuroectodérmico, con excepción de la microglía, que es parte del SI y entra por la circulación sanguínea al cerebro en una etapa temprana del desarrollo del organismo. La microglía tiene capacidad fagocítica, de actuar frente a infecciones y daño, así como también de secretar moléculas como citoquinas pro y anti inflamatorias (Figura 4) (Allen y Barres., 2009).

1.4.1 Astrocitos

Los astrocitos constituyen una población celular predominante en el cerebro y han sido asociados con varias funciones vitales para el SNC como lo son la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BHE), sinaptogénesis, neurotransmisión, regulación metabólica entre otras (Molofsky y Deneen., 2015).

Los astrocitos son una población muy heterogénea, con distintas morfologías y propiedades. La división más grande que comúnmente se conoce separa a la población de astrocitos en dos clases denominados astrocitos protoplasmáticos y fibrosos. Los astrocitos protoplasmáticos son encontrados en la materia gris y están íntimamente asociados con los cuerpos de las células neuronales y la sinapsis. Los astrocitos fibrosos se encuentran en la materia blanca y poseen unas ramificaciones que van de bajas a moderadas y se relacionan con los axones neuronales. Se han identificado varias divisiones más de astrocitos, dependiendo de su morfología, función y región donde se encuentran, aunque en una misma región pueden coexistir distintos tipos de astrocitos. (Matyash y Kettenmann., 2010).

Entre las funciones destacadas de los astrocitos podemos mencionar que contribuyen a la homeostasis en el cerebro al proveer a las neuronas de energía y sustratos para la neurotransmisión. Además, actúan como barreras físicas entre las conexiones sinápticas, de hecho, un solo astrocito puede generar contacto con miles de sinapsis. También forman parte de la denominada sinapsis tripartita ya que establecen un contacto bidireccional con las neuronas al responder a la actividad sináptica, poseen receptores para neurotransmisores que activan cascadas de señalización basadas en calcio. Los astrocitos controlan el flujo sanguíneo ya que sus prolongaciones interactúan con los vasos sanguíneos (Figura 4) (Allen *et al.*, 2009).

Los astrocitos se caracterizan por la presencia de una proteína estructural única, la GFAP. La GFAP es una proteína tipo III de importancia para la formación de los filamentos intermedios de la estructura del citoesqueleto de las células gliales como los astrocitos, en el SNC y las células de Schwann en el sistema nervioso periférico. Está implicada en muchos procesos funcionales de la célula, tales como el mantenimiento de la estructura, el movimiento, la comunicación con neuronas vecinas y en el funcionamiento de la BHE. Por lo tanto, esta proteína se utiliza para la marcación específica de astrocitos utilizando anticuerpos contra la proteína GFAP (Yang y Wang., 2015). Además de la proteína GFAP, existen otros marcadores que pueden ser utilizados para identificar a los astrocitos. Estos se expresan diferencialmente dependiendo de la región donde se encuentre dicho astrocito, entre estos podemos citar al transportador de glutamato específico de astrocitos GLAST y GLT-1, la proteína de unión a Ca^{2+} S100 β o la glutamina sintasa (Kimmelberg, 2004).

1.4.2 Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos son las células de la glía encargadas de la mielinización en el SNC. La vaina de mielina es una extensión modificada de la membrana plasmática de los oligodendrocitos que se envuelve alrededor de los axones permitiendo una conducción nerviosa más rápida y manteniendo la integridad de los axones (Figura 4). También proveen

a los axones de soporte metabólico y contribuyen a la neuroplasticidad (Domingues *et al.*, 2016).

Fallas en el funcionamiento y/o desarrollo de los oligodendrocitos están relacionados al progreso de enfermedades neurodegenerativas. La disfunción de los oligodendrocitos conduce a una pérdida en las vainas de mielina que recubren a los axones neuronales que conlleva a la degradación neuronal (Tauheed *et al.*, 2016). Por ejemplo, la esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica desmielinizante del SNC. Es mediada por la activación de linfocitos T, macrófagos y la microglía. En la EM, el blanco de ataque por parte del SI son los oligodendrocitos (Cudrici *et al.*, 2006). Otra de las enfermedades relacionadas con una disfunción de los oligodendrocitos es la enfermedad de Alzheimer (EA). Los oligodendrocitos pueden producir diferentes isoformas del precursor de la proteína beta-amiloide en cultivo. La proteína beta-amiloide tóxica puede generar daño en la materia blanca *in vivo* y la muerte de los oligodendrocitos *in vitro*. En la materia blanca de pacientes con EA existe un aumento significativo de péptidos beta-amieloides y una disminución de la proteína mieloide básica (Liu y Zhou., 2013).

Durante el desarrollo, las NPCs proliferan y producen neuronas en un estadio embrionario temprano, para luego generar astrocitos y oligodendrocitos en los estadios embrionarios más tardíos. Las células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs del inglés, *oligodendrocyte progenitor cells*) representan un estadio intermedio en la oligodendrogénesis y persisten en la corteza adulta como células NG2+/Olig2+. Estas OPCs proliferan vigorosamente previo a su diferenciación en oligodendrocitos maduros (Naruse *et al.*, 2017). Como se mencionó anteriormente, las neuronas derivadas de la SVZ migran a través de la corriente migratoria rostral hacia el bulbo olfatorio en mamíferos o hacia el cuerpo estriado en humanos, mientras que los oligodendrocitos mayormente ocupan el cuerpo calloso adyacente. En contraste a la SVZ, las NPCs de la SGZ del

hipocampo parecen producir sólo neuronas a menos que sean reprogramadas genéticamente para inducir la oligodendrogénesis (Akkermann *et al.*, 2017).

Durante la diferenciación, el linaje de oligodendrocitos atraviesa varios estadios intermedios del desarrollo que son tanto morfológicamente como funcionalmente distintos y expresan componentes específicos en cada estadio que sirven como marcadores de progresión del linaje. Durante el desarrollo temprano, los progenitores de oligodendrocitos expresan el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRa) (Deng *et al.*, 2003). Conjuntamente con la expresión de PDGFRa se expresa NG2 (del inglés *neural-glia antigen 2*). Estas células PDGFRa+/NG2+ no expresan marcadores de otras poblaciones del SNC ni marcadores de oligodendrocitos maduros por lo que son útiles para detectar poblaciones en estadios tempranos del desarrollo de los oligodendrocitos (Dawson *et al.*, 2000). Un anticuerpo ampliamente utilizado para la detección de oligodendrocitos es RIP (del inglés *Receptor interacting protein*) (Friedman *et al.*, 1989). RIP reconoce a la proteína CNPasa (del inglés *2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*) que se expresa a partir de oligodendrocitos inmaduros. Esta CNPasa también se expresa conjuntamente con marcadores de oligodendrocitos maduros, como lo es la proteína básica de mielina y no se expresa en células que expresan otros marcadores de otros linajes celulares como por ejemplo GFAP, específica de astrocitos (Butt *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 2006).

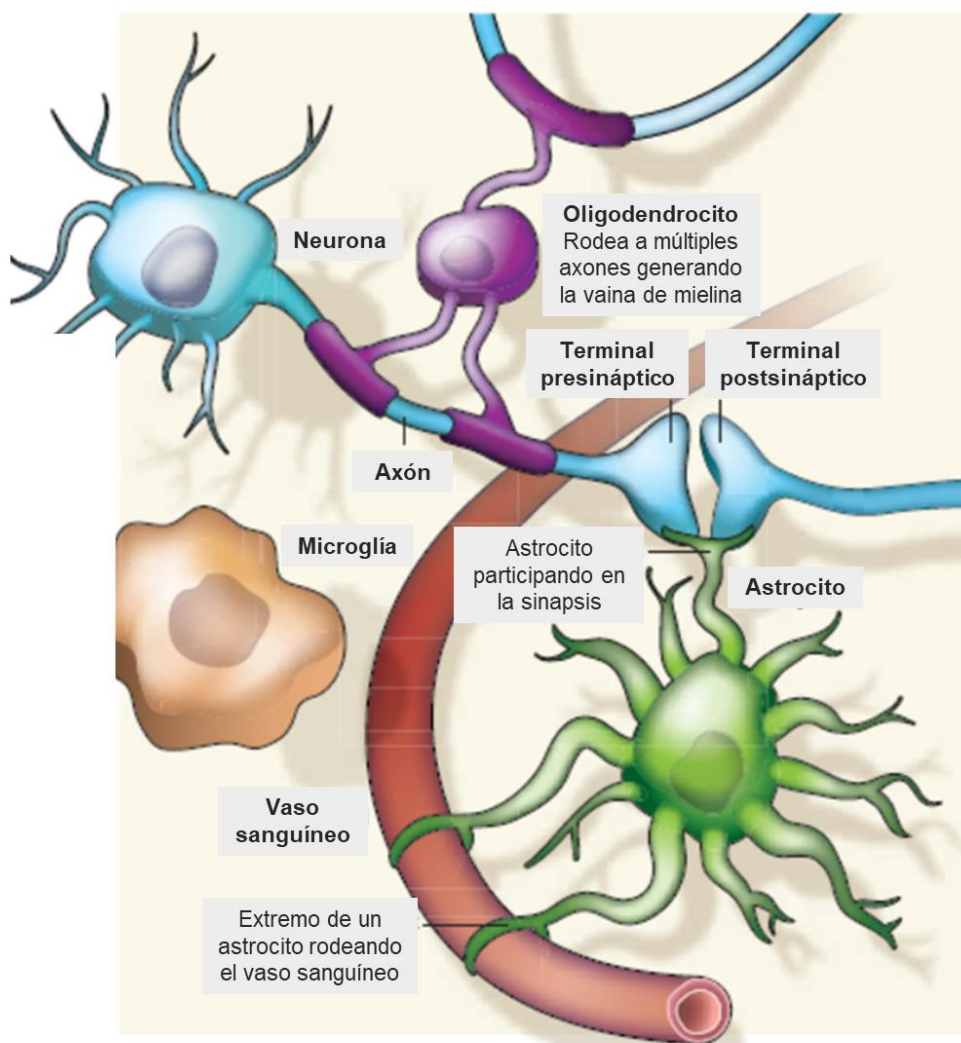


Figura 4. Interacción entre células del sistema nervioso central. Esquema representativo de las células que componen el SNC. Las neuronas, que transmiten impulsos eléctricos a través de los axones hacia otras neuronas. Oligodendrocitos que generan la vaina de mielina que rodea a los axones para acelerar la transmisión neuronal. Los astrocitos que extienden ramificaciones hacia los vasos sanguíneos y las sinapsis. La microglía mantiene la vigilancia en el cerebro en busca de daño o infección. Modificado de (Allen *et al.*, 2009).

1.5 Inmunomodulación en el SNC

El cerebro no es un sitio inmunoprivilegiado como se pensaba originalmente. Bajo condiciones fisiológicas, células del SI (linfocitos T, macrófagos y células dendríticas) pueden atravesar la BHE e infiltrar el tejido cerebral y modular las poblaciones residentes del SNC (Kipnis y Filiano., 2017). El SI está involucrado en procesos neurocomportamentales normales. Las citoquinas y sus receptores son expresados, al menos a bajos niveles, en el cerebro sano, por lo que las neuronas y células gliales pueden

responder a la acción de estas proteínas. Esta actividad sobre las células del SNC puede regular la producción y secreción de neurotrofinas, neurotransmisores y otras citoquinas, lo que sugiere su actividad como neuromoduladores en funciones cognitivas normales como el sueño, las respuestas al dolor o estrés psicológico (Yirmiya y Goshen., 2011)

La inflamación es un proceso celular y molecular complejo en respuesta al estrés, infección o injuria que tiene como objetivo restaurar la homeostasis del organismo. Debido a daños que se pueden generar en el SNC se inicia un proceso de neuroinflamación por la activación de los astrocitos, la microglía, los macrófagos y linfocitos infiltrantes. Esto dispara una mayor infiltración de células del SI desde la periferia hacia el parénquima cerebral. Estos liberan mediadores pro y anti inflamatorios como el interferón-gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina-1 beta (IL-1 β), Interleuquina-18 (IL-18), interleuquina-6 (IL-6), quimoquinas, neurotransmisores y especies reactivas del oxígeno. Esto crea una retroalimentación positiva que atrae al SNC más células del SI y genera activación de más células de la microglía y astrocitos. Esta interacción entre el SI y el SNC pueden afectar varias funciones cerebrales, como la remodelación neural, plasticidad sináptica, liberación de neurotransmisores, respuesta asociada al estrés, progresión de enfermedades cognitivas. Todos estos procesos pueden tener consecuencias tanto positivas como negativas para la neurogénesis (Gonzalez-Perez *et al.*, 2012; Whitney *et al.*, 2009). Por lo tanto, entender los mecanismos moleculares y elementos claves que controlan el mantenimiento de los nichos neurogénicos puede contribuir al desarrollo de potenciales futuras terapias para desórdenes cerebrales.

Creciente evidencia indica que hay un aumento en la neurogénesis en el DG y la SVZ luego de que se produce un daño en el SNC. Luego de una isquemia, aumenta la proliferación de células en el DG y la SVZ demostrado mediante el aumento de células bromodeoxiuridina (BrdU)-positivas. Estas también son capaces de migrar a la capa granular en el caso de las células provenientes del DG y hacia el bulbo olfatorio, corteza y

cuerpo estriado en el caso de la SVZ. Además, la mayoría de estas células se diferencian en neuronas que se pueden integrar a los circuitos preexistentes (Parent, 2003; Whitney *et al.*, 2009). En el caso de la enfermedad de Alzheimer, que se caracteriza por la progresiva pérdida de neuronas, también se ha encontrado que en los estadios más tempranos de la enfermedad existe un aumento de la neurogénesis en el hipocampo, tal vez como un mecanismo que trata de compensar la pérdida de células neuronales. Sin embargo, en este caso las células no logran sobrevivir y completar su maduración a neuronas funcionales por lo que no pueden detener el deterioro progresivo que se genera (Chen *et al.*, 2008).

El estrés (definido como cualquier disrupción de la homeostasis de un organismo) es uno de los factores que pueden perturbar la interacción entre el SNC y el SI y conllevar a la aparición de alteraciones cognitivas. El estrés produce una respuesta por parte del sistema nervioso simpático y del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) por la liberación de una serie de mediadores, entre ellos hormonas, principalmente la hormona liberadora de corticotropina, adrenocorticotropina y glucocorticoides (Miller y O'Callaghan., 2002). El estrés también afecta al SI al afectar el balance de la respuesta Th1/Th2, que representan dos formas polarizadas de linfocitos T CD4⁺ y la clasificación está basada en los patrones de producción de citoquinas. El perfil Th1 mayormente produce IFN- γ , IL-2, IL-18 y el factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), mientras que el perfil Th2 se caracteriza por la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Schwarz *et al.*, 2001). El desbalance persistente en la producción de citoquinas debido al estrés genera alteraciones en la función de los neurotransmisores y en el comportamiento, lo que lleva al desarrollo de enfermedades como la esquizofrenia, la depresión mayor y la enfermedad de Alzheimer (Felger y Lotrich., 2013). Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que ratones Balb/c hembras expuestas a un modelo de estrés crónico presentaron una menor capacidad de aprendizaje y memoria en la prueba de campo abierto, evitación inhibitoria, laberinto en forma de Y y laberinto de Barnes y cambios neuroquímicos e

histológicos, que se correlacionaron con alteraciones en el balance Th1/Th2. Específicamente, se observó una disminución en los niveles de IFN- γ y un aumento en los niveles de IL-4, IL-10 e IL-6 que se correlacionó con una reducción en neurogénesis en ratones sometidos a este modelo de estrés (Palumbo *et al.*, 2007; 2010; 2012; 2017).

1.5.1 Acción de las citoquinas sobre las NPCs

Como se mencionó anteriormente, las citoquinas se perfilan en la actualidad como los mediadores de los efectos del SI sobre el SNC. Se ha demostrado que la exposición al estrés incrementa los niveles de IL-1 β en varias áreas del cerebro, incluyendo al hipocampo. La administración de esta citoquina produce una serie de efectos similares a los observados en modelos de estrés, incluyendo la activación del eje HHA, inhibición de la potenciación a largo plazo y menor expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en hipocampo. En contraste, el bloqueo del receptor de IL-1 β inhibe la supresión de la proliferación celular en hipocampo producida por el estrés agudo o crónico (Koo y Duman., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que la microglía puede determinar el destino de diferenciación de las NPCs, específicamente, la microglía activada con IFN- γ promueve la neurogénesis mientras que la microglía activada con IL-4 induce la vía de la oligodendrogénesis (Butovsky *et al.*, 2006). La IL-6 producida por la microglía activada induce la diferenciación de las NPCs hacia un linaje de astrocitos. Otro estudio ha demostrado que la IL-6 reduce la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores en el DG del hipocampo (Spooren *et al.*, 2011a).

Teniendo en cuenta los antecedentes reportados en la literatura y comentados en esta sección, planteamos para este trabajo final de grado la siguiente **hipótesis**: El balance de citoquinas hacia Th2 es el responsable de la disminución de la proliferación de las NPCs y su diferenciación a células no neuronales, lo que conlleva a la aparición del deterioro cognitivo observado en ratones estresados crónicamente. Particularmente, postulamos que las citoquinas IFN- γ (citoquina Th1) e IL-4 (citoquina Th2), cuyos niveles se observaron

alterados en ratones hembras BALB/c inducidas por estrés crónico moderado, afectan la proliferación de las NPCs aumentándola o disminuyéndola respectivamente. El IFN- γ provoca la diferenciación de las NPCs hacia un fenotipo neuronal mientras que la IL-4 conducirían a obtener oligodendrocitos o astrocitos. Además, las citoquinas IL-1 β e IL-6 participan en estos procesos de proliferación y diferenciación NPCs dependiendo de su concentración.

El **objetivo general** de este trabajo es estudiar *in vitro* el efecto de las citoquinas IFN- γ IL-1 β , IL-4 e IL-6 sobre la proliferación y diferenciación (a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos) de NPCs hipocampales provenientes de ratones hembras BALB/c adultos. El descubrimiento de estos mecanismos podría aportar nuevas herramientas para el abordaje de patologías relacionadas con déficit cognitivo para brindar a los pacientes tratamientos más eficaces y específicos.

Objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Poner a punto el cultivo de NPCs provenientes de hipocampo de ratones hembra Balb/c adultos y adquirir criterio sobre dicho cultivo.

Objetivo específico 2: Estudiar *in vitro* el efecto de diferentes concentraciones de las citoquinas IFN- γ IL-1 β , IL-4 e IL-6 sobre la proliferación de las NPCs del hipocampo provenientes de ratones BALB/c adultos.

Objetivo específico 3: Evaluar *in vitro* el efecto de las citoquinas IFN- γ , IL-1 β , IL-4 e IL-6 a distintas concentraciones sobre la diferenciación de las NPCs del hipocampo provenientes de ratones BALB/c adultos.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales

Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c adultos de dos meses mantenidas en condiciones controladas de humedad y temperatura, con un periodo de 12 horas de luz y suministro de agua y comida *ad libitum* en el bioterio del Centro de Investigación Básica y Aplicada (CIBA-UNNOBA). Todos los experimentos realizados con animales siguieron las normas éticas y de cuidado establecidas en la Guía para Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio establecidas por el Consejo Nacional de Investigaciones de EEUU ("*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*". NIH, 8th edition, 2011).

2.2 Disección del hipocampo y muestras utilizadas

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. A partir de cerebro de ratones adultos se disecó el hipocampo en PBS frío según el Atlas de anatomía del cerebro de ratón (Paxinos y Franklin, 2001). Se utilizaron diez ratones en total, seis para la puesta a punto de los cultivos de NPCs y cuatro para los cultivos que se utilizaron para realizar los experimentos. Las NPCs fueron obtenidas de dos cultivos independientes ($n = 2$) utilizando dos hipocampos para cada cultivo.

2.3 Cultivo de células progenitoras neurales

Los hipocampos se disgregaron con tijera y se homogeneizaron mecánicamente con pipeta en 5 mL de la solución HBSS-glucosa (Hanks buffer salt solution, D-glucosa, HEPES, tripsina y hialuronidasa) y se incubaron a 37°C durante 15 minutos para que actúen las enzimas. Se disgregó el tejido nuevamente con pipeta y se incubó 15 minutos a 37°C. Se agregó 5 mL de la solución BSA-EBSS-HEPES (BSA, Earl buffer salt solution, HEPES) para proteger las células y se resuspendió. Se pasaron las células por un colador de 70 μm (Falcon) y se centrifugaron durante 5 minutos a 1300 rpm a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se agregaron 10 mL de la solución HBSS-sucrosa para lavar las células y se centrifugó durante 15 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 mL de la solución BSA-EBSS-HEPES

y se agregaron 15 mL más de esta solución. Se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 mL de medio para neuroesferas (medio DMEM/F12-glutaMAX (Gibco) conteniendo suplemento B27 (Gibco), PSF antibiótico-antimicótico y Hepes buffer). Estas células fueron colocadas en botellas para cultivo y se les agregaron 20 ng/mL de factor de crecimiento fibroblástico básico (BFGF, del inglés *basic fibroblast growth factor*, PeproTech) y 20 ng/mL del factor de crecimiento epidermal (EGF, del inglés *epidermal growth factor*, PeproTech) (cultivo en suspensión). Se incubaron a 37°C con 5% CO₂. Cada dos días se agregó al cultivo los factores de crecimiento en las cantidades mencionadas anteriormente. Se hicieron pasajes de las neuroesferas cada 10 días para multiplicar las células. Para ello se pasaron las células a un tubo, se centrifugó a 500 rpm durante 5 minutos para obtener en el pellet las neuroesferas y se removió el medio. Se colocó 1 mL de Accutase (Milipore), se incubó durante 10 minutos y se disociaron las neuroesferas mecánicamente con pipeta. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se lavaron con 5 mL de PBS para remover el Accutase. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de medio para neuroesferas. La viabilidad celular se estimó de acuerdo al criterio de exclusión de azul tripán utilizando una cámara de Neubauer. De esta manera se determinó la cantidad de células que se colocaron en cada frasco (0,5x10⁵ células en frascos de cultivo de 25 cm²; 2x10⁵ células en frascos de cultivo de 75 cm²) de cultivo conteniendo medio neuroesfera y factores de crecimientos. (técnica modificada de Ray y Gage, 2006).

2.4 Determinación de la proliferación de células progenitoras neurales

2.4.1 Proliferación de las NPCs *in vitro*

La proliferación fue determinada en placas de 24 pocillos conteniendo cover slips tratados con poli-d-lisina (PDL, 10 µg/mL, Sigma) y laminina (5 µg/mL, Invitrogen). Se colocaron 1 x 10⁵ células por pocillo en un volumen final de 1 mL de medio para neuroesferas con factores de crecimiento (cultivo en monocapa y medio proliferativo) por

duplicado. Se incubaron durante 48 horas en ausencia o presencia de citoquinas en diferentes concentraciones. A cada pocillo se le agregó BrdU (5-bromo-2´deoxiuridina, 5µM) y se incubó durante 2 horas.

2.4.2 Tratamientos

Para evaluar el efecto de las citoquinas sobre la proliferación de las NPCs, se realizaron los siguientes tratamientos. IFN-γ: a concentraciones de 100 ng/mL; 50 ng/mL; 1 ng/mL y 0,1 ng/mL. IL-1β, IL-4 e IL-6: en concentraciones de 50 ng/mL; 1 ng/mL; 0,1 ng/mL y 0,01 ng/mL.

2.4.3 Inmunocitoquímica

Luego del cultivo, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con TBS 1X y luego se incubaron 15 minutos con 2N HCl a 37°C y 10 minutos con 0,1M de buffer borato. Se lavaron seis veces con TBS 1X, en total 90 minutos y se bloqueó con 1% de suero normal en TBS con 0,1% Tritón-X (TBS++) durante 1 hora. Se incubó con el anticuerpo primario anti-BrdU (hecho en rata, abcam ab6326, 1:500) en TBS++, toda la noche a 4°C. Luego de lavar se colocó el anticuerpo secundario anti-rat-Cy3 (JIR 712-165-153, 1:250) en TBS++ durante 2 horas a temperatura ambiente. Se marcaron los núcleos celulares con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) en TBS (1:10.000) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se montaron los cover slips y finalmente se observaron en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800, del Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT) del Hospital Universitario Austral.

2.5 Determinación de la diferenciación de las células progenitoras neurales

2.5.1 Diferenciación de las NPCs *in vitro*

En placas de 24 pocillos con cover slips conteniendo poli-d-lisina (PDL, 10 µg/ml, Sigma) y laminina (5 µg/ml, Invitrogen) se colocaron 1×10^5 células por pocillo en medio proliferativo

durante 48 horas a 37°C, 5% CO₂. Culminado este tiempo se reemplazó la mitad del medio por medio sin factores de crecimiento (medio de diferenciación), para ir removiendo los mismos y se agregaron las citoquinas a diferentes concentraciones. En el transcurso de los 4 días siguientes, se repitió este procedimiento y se le agregaron las citoquinas para mantener la concentración de las mismas. De esta manera se logró la diferenciación celular.

2.5.2 Tratamientos

Para evaluar el efecto de las citoquinas sobre la diferenciación de las NPCs, se realizaron los siguientes tratamientos: IFN- γ , IL1 β , IL4 e IL-6: en concentraciones de 1 ng/mL; 0,1 ng/mL y 0,01 ng/mL.

2.5.3 Inmunocitoquímica

Las células fueron fijadas con 4% de paraformaldehído en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con TBS 1X, se bloqueará con TBS++ durante 1 hora. y se incubaron con anticuerpos primarios en TBS++ para marcar los diferentes tipos celulares neurales, anti-DCX (hecho en ratón, abcam ab135349, 1:250): para neuronas, anti-GFAP (hecho en cabra, abcam ab53554, 1:1000): para astrocitos y anti-RIP (hecho en conejo, Cell Signaling D94C12, 1:50): para oligodendrocitos. Luego se incubaron con anticuerpos secundarios con distintos fluoróforos anti-ratón-Cy3 (Jackson Immuno Research (JIR) 712-165-153, 1:400), anti-cabra-FITC (JIR 705-095-147, 1:150) y anti-conejo-Cy5 (JIR 711-175-152, 1:250) y con DAPI en TBS (1:10.000), para marcar los núcleos. Se montaron los cover slips y se observaron en el servicio de microscopía del IBioBA- CONICET- MPSP en el Polo Científico Tecnológico utilizando un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 710-T-PMT.

2.6 Análisis de datos

Para los experimentos de proliferación se tomaron 6 imágenes representativas por preparado con un objetivo de 40x. Las imágenes analizadas poseen aproximadamente 150

células cada una. Para el análisis de las imágenes se utilizaron los softwares ImageJ y CellProlifer versión 2.1.1 y se utilizó Adobe Photoshop CS6 para la superposición de las mismas.

Las imágenes de microscopía correspondiente a los experimentos de diferenciación fueron tomadas con microscopio confocal Carl Zeiss LSM 710-T-PMT del IBioBA-CONICET- MPSP en el polo científico tecnológico. Para evaluar diferenciación, 5 imágenes representativas por preparado fueron tomadas con un objetivo 20x (aproximadamente 150 células por imagen) y se analizaron utilizando el software Fiji versión 1.51s.

2.7 Análisis estadístico

Para realizar las pruebas estadísticas que se mencionan a continuación se utilizaron los siguientes programas estadísticos: InfoStat y GraphPad Prims 5.00. Para verificar la distribución normal de los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks (modificado). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para verificar la igualdad de varianzas entre los grupos de datos a comparar. Las diferencias entre tres o más grupos de datos fueron evaluadas por ANOVA de un factor seguido por el método de Dunnett y Bonferroni para los experimentos de proliferación y diferenciación, respectivamente. Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media ($X \pm ES$). Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

3.1 Puesta a punto de cultivo

Para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo de tesis, lo primero a realizar fue la puesta a punto de la técnica de cultivo celular de NPCs. Las NPCs proliferan en suspensión formando neuroesferas (Figura 5 A) y en monocapa se adhieren cuando se les proporciona un sustrato adecuado (Figura 5 B).

Luego de realizado el protocolo de extracción del hipocampo y su posterior procesado, se procedió a establecer el reconocimiento de las NPCs y sus tiempos de proliferación como neuroesferas, para poder realizar los pasajes correspondientes para multiplicar las células a fin de obtener la cantidad necesaria para realizar los experimentos. Los tiempos de proliferación tienen que ser los óptimos, si son demasiado cortos, el rendimiento será bajo, por lo que en cada pasaje no se van a obtener suficientes células para realizar los experimentos. Si los tiempos de proliferación son largos, éstas crecerán demasiado, el centro de la neuroesfera se oscurecerá indicando que las células internas entrarán en un proceso de muerte celular por la falta de nutrientes. Establecimos el tiempo óptimo de proliferación de las NPCs de hipocampo creciendo en suspensión a los 10 días de iniciado el cultivo, teniendo en cuenta el tamaño promedio de las neuroesferas, su aspecto y su morfología (figura 5 A). Cada 10 días se realizaron pasajes para obtener la cantidad de células necesarias para realizar los experimentos.

Otro punto a tener en cuenta es la cantidad de pasajes que se les puede realizar a las células sin que modifiquen sus propiedades de células madres. Según datos bibliográficos, las NPCs pierden sus características de célula madre a medida que se realizan los pasajes de celulares (Vukicevic *et al.*, 2010). Según lo que observamos al microscopio, no es recomendable utilizar NPCs que superen el séptimo pasaje, ya que comienzan a expresar anomalías morfológicas, como extensión de filopodios y por lo tanto adhesión a la placa de manera espontánea. Teniendo en cuenta esto y la cantidad de células necesarias para

realizar los experimentos, para este trabajo de tesis se utilizaron NPCs provenientes de los pasajes de 3 al 6.

Una vez obtenida la cantidad adecuada de células, el paso siguiente consistió en cultivar las NPCs en monocapa en una placa de 24 pocillos con PDL y laminina como se mencionó en materiales y métodos. Para tal fin, se procedió a optimizar la cantidad de células a colocar por pocillo y los tiempos en los que las células van a permanecer en la placa. Esto se realizó sobre cultivos controles en medio con factores de crecimiento y sin citoquinas. Densidades bajas o altas de células hacen que estas no proliferen. Se estableció un óptimo de 100.000 células por pocillo. En cuanto a los tiempos, se evaluaron diferentes tiempos, 24, 48 y 72 hs. A las 24 horas, la proliferación de las NPCs no fue abundante debido a que no había una buena cantidad de células y esto impedía obtener buenas imágenes de microscopía como para realizar una cuantificación. A las 72 horas, al contrario de lo ocurrido a las 24 hs, la confluencia celular sobre la placa era casi total. A este tiempo las células dejan de proliferar y se incrementa la probabilidad de que se desprendan de la placa. Se estableció como óptimo el tiempo de 48 horas de cultivo, ya que a ese tiempo la confluencia de la placa es de alrededor del 80%, lo que se traduce en una buena cantidad de células en proceso de proliferación (figura 5 B).

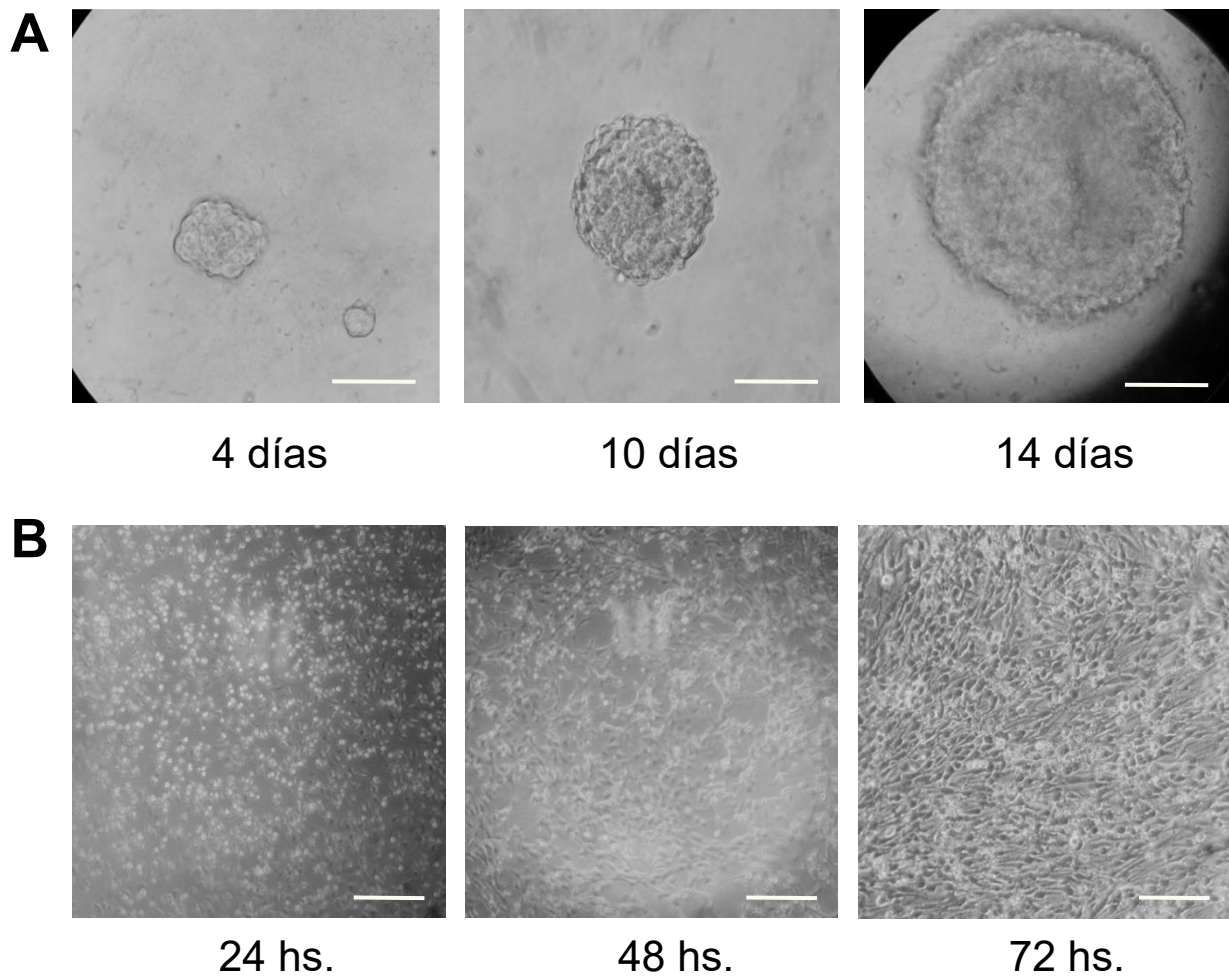


Figura 5. Proliferación de las NPCs en cultivo a través del tiempo. A) Cultivo de NPCs proliferando en suspensión. Imágenes representativas (40x) de neuroesferas en cultivo de 4, 10 y 14 días. Barra de escala = 50 μm **B)** Cultivo de NPCs proliferando en monocapa. Imágenes representativas (10x) de células en cultivo a las 24, 48 y 72 horas. Barra de escala = 50 μm

3.2 Evaluación del efecto *in vitro* de las citoquinas sobre la proliferación de las NPCs hipocampales.

In vivo, las NPCs están expuestas a un ambiente celular y factores que regulan el proceso de proliferación celular. Entre los factores que pueden modificar dicho proceso se encuentran las citoquinas. Con el fin de evaluar el efecto de las citoquinas sobre la proliferación de las NPCs hipocampales provenientes de ratones adultos *in vitro*, se cultivaron las células en placas de 24 pocillos conteniendo PDL y laminina para que las

NPCs proliferen en monocapa. En condiciones proliferativas (en presencia de factores de crecimiento) se agregaron distintas concentraciones de citoquinas y se incubaron durante 48 horas. Dos horas previas a la finalización del cultivo, se agregó BrdU, análogo de la base timidina, que se incorporó en las células que estaban proliferando. Se realizó la técnica de inmunocitoquímica, utilizando DAPI para teñir los núcleos y un anticuerpo anti-BrdU para identificar a las células que proliferaron. Mediante microscopía de fluorescencia se tomaron fotos representativas de los preparados celulares. Se consideró como célula proliferante aquella marcada con BrdU (BrdU+) y además teñida con DAPI. Se tomaron 6 imágenes por preparado y se calculó el porcentaje de células BrdU+ con respecto al total de núcleos teñidos con DAPI. En la figura 6 A se muestra una imagen representativa de un cultivo control observado con distintos filtros del microscopio de fluorescencia. La imagen de la izquierda muestra los núcleos teñidos con DAPI en azul, la imagen central las células BrdU+ en rojo y la imagen derecha la superposición de ambas imágenes.

3.2.1 IFN- γ

Al evaluar el efecto de las distintas concentraciones de IFN- γ sobre las NPCs, nuestros experimentos mostraron que altas concentraciones de IFN- γ producen una disminución significativa en la proliferación de las NPCs. Específicamente, concentraciones de 1 y 50 ng/mL de IFN- γ provocaron una disminución en la proliferación de aproximadamente de 6 veces respecto al control sin estimular ($p < 0,01$) mientras que a concentraciones de 100 ng/mL de IFN- γ , la reducción en la proliferación fue casi total ($p < 0,001$). A la concentración más baja estudiada de 0,1 ng/mL no se observaron diferencias significativas en los niveles de proliferación con respecto al control (Figura 6 C).

En la figura 6 B se muestran imágenes representativas de cultivos estimulados con las distintas concentraciones de IFN- γ (0,1, 1, 50 y 100 ng/mL) donde se observan en rojo las células que incorporaron el BrdU.

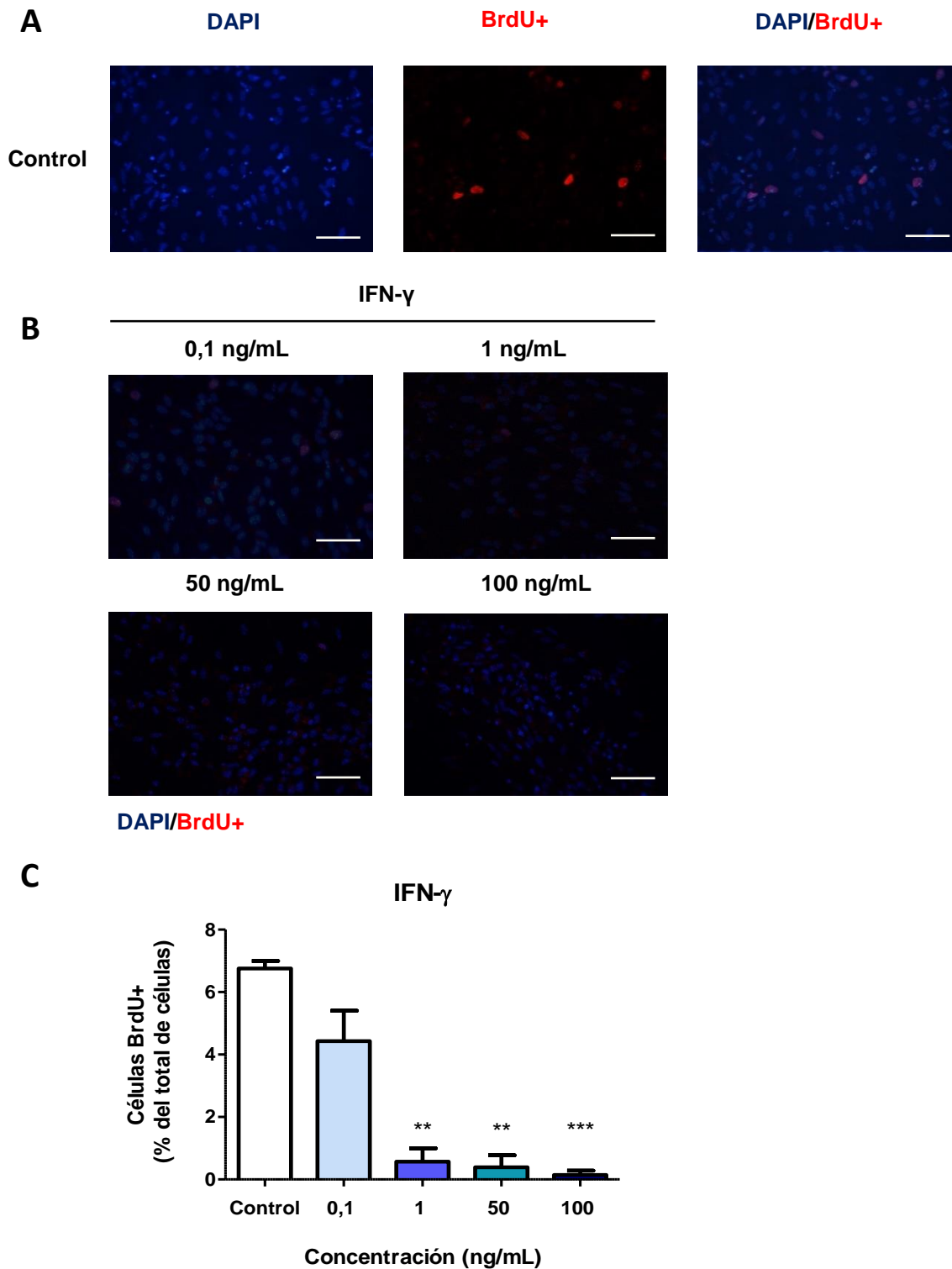


Figura 6. Evaluación del efecto del IFN- γ sobre la proliferación de las NPCs. A) Imágenes representativas con magnificación 40x de un control (sin estimular) donde se observan los núcleos teñidos con DAPI en azul, las células BrdU+ en rojo y la superposición de ambas imágenes. **B)** Se muestran fotos representativas a 40x (obtenidas por superposición de las imágenes obtenidas para DAPI y BrdU) de cultivos estimulados con 0,1; 1; 50 y 100 ng/mL de IFN- γ . **C)** Se grafica el porcentaje de células BrdU+ respecto del total de núcleos teñidos con DAPI. Las barras muestran la media \pm SEM de 2 experimentos independientes realizados por duplicado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ con respecto al control. Barras de escala = 50 μ m

3.2.2 IL-1 β

Al evaluar el efecto de las distintas concentraciones de IL-1 β (0,01; 0,1; 1 y 50 ng/mL) sobre la proliferación de las NPCs, no se observaron diferencias significativas respecto del control (Figura 7 A y B).

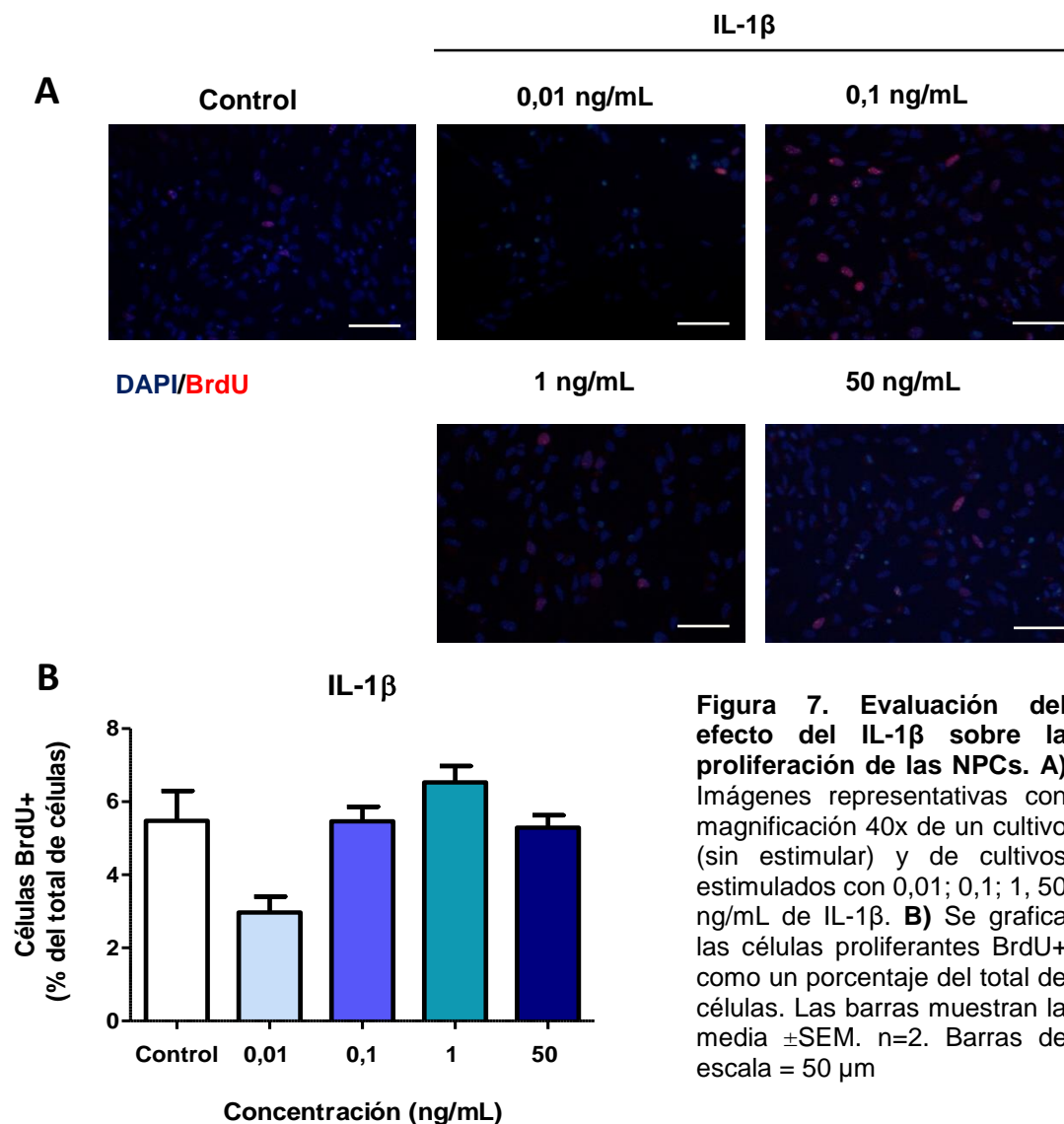
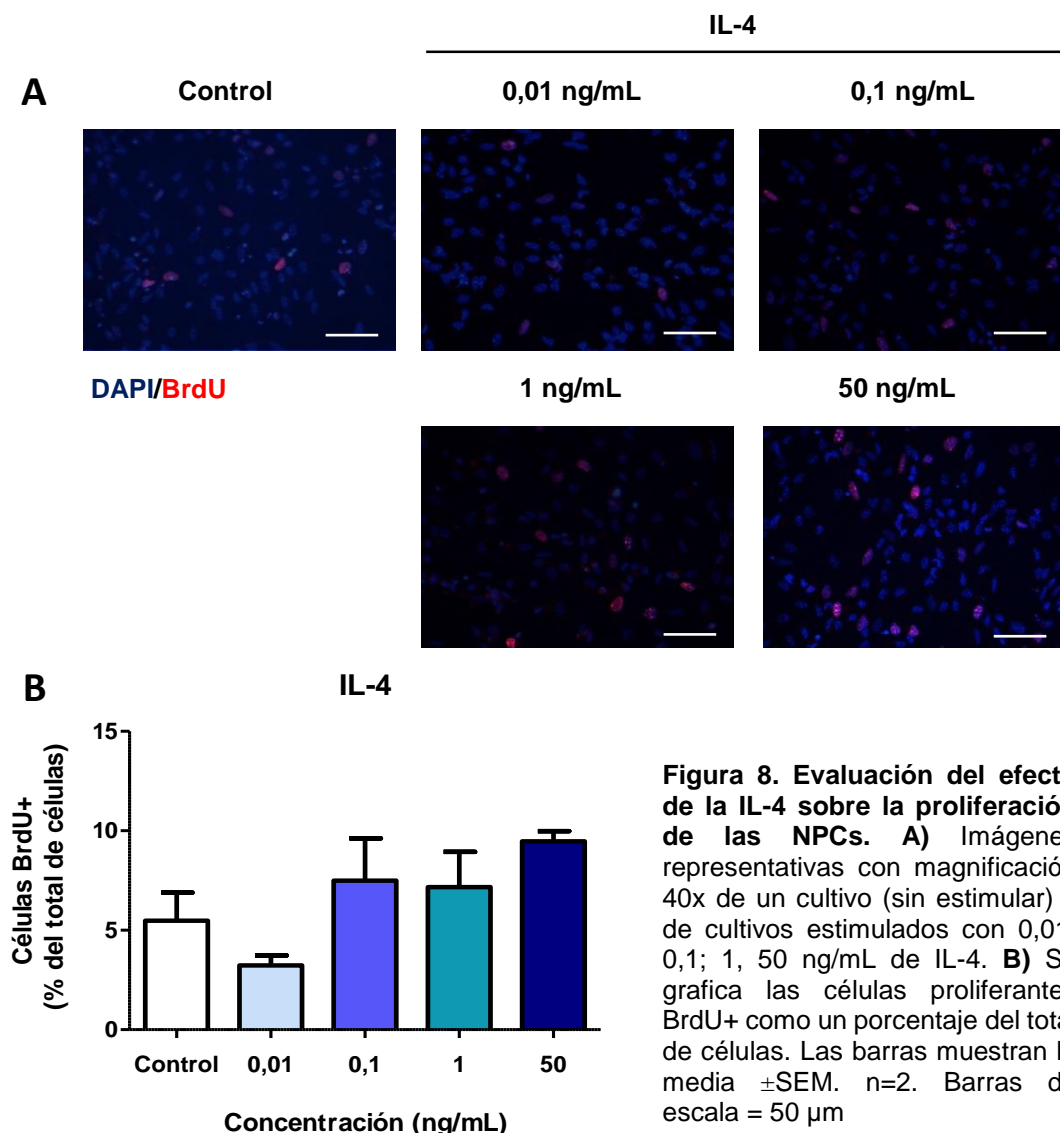


Figura 7. Evaluación del efecto del IL-1 β sobre la proliferación de las NPCs. A) Imágenes representativas con magnificación 40x de un cultivo (sin estimular) y de cultivos estimulados con 0,01; 0,1; 1, 50 ng/mL de IL-1 β . **B)** Se grafica las células proliferantes BrdU+ como un porcentaje del total de células. Las barras muestran la media \pm SEM. n=2. Barras de escala = 50 μ m

3.2.3 IL-4

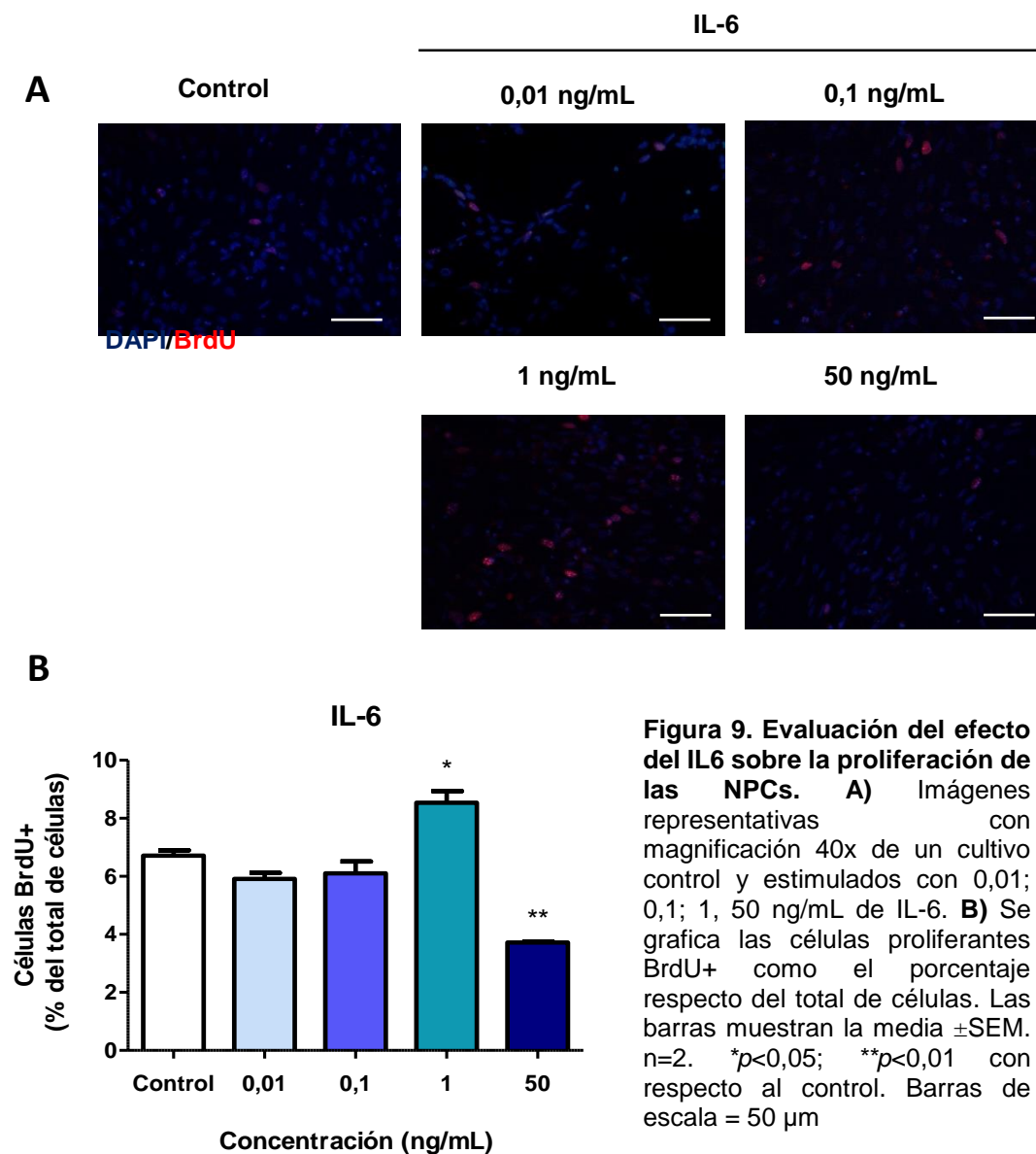
Con el objetivo de estudiar el efecto de la IL-4 sobre las NPCs, éstas se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de la citoquina durante 48 hs. Las células estimuladas con IL-4 no mostraron diferencias significativas comparadas con el cultivo

control en cuanto al porcentaje de proliferación. Cabe destacar que los cultivos estimulados con las tres concentraciones más altas utilizadas para estos experimentos (0,1; 1 y 50 ng/mL) tuvieron una tendencia de aumento en los niveles de proliferación. Cuando se estimularon con 50 ng/mL de IL-4 el porcentaje de proliferación de NPCs fue de 9,5% en promedio, comparado con el 5,5% promedio de proliferación en los cultivos sin estimular (Figura 8 B). Esto se puede observar también en la figura 8 A, donde se ven representadas imágenes (40x) de un cultivo control y cultivos tratados con 0,01; 0,1; 1 y 50 ng/mL de IL-4.



3.2.4 IL-6

Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de la citoquina IL-6 sobre la proliferación de las NPCs. Los experimentos estimulados con IL-6 mostraron efectos diversos. A bajas concentraciones de 0,01 y 0,1 ng/mL no hubo diferencias con respecto al control. La estimulación con 1 ng/mL produjo un aumento significativo en la proliferación de las NPCs ($p < 0.05$). Contrariamente, la concentración de 50 ng/mL indujo en las NPCs una disminución significativa en la proliferación de aproximadamente la mitad de lo observado en un cultivo control ($p < 0.01$) (figura 9).



3.3 Evaluación del efecto *in vitro* de las citoquinas sobre la diferenciación de las NPCs hipocampales

Para estudiar el efecto de las citoquinas sobre la diferenciación las NPCs se cultivaron estas células en monocapa durante 6 días (2 días en medio de proliferación y 4 en medio de diferenciación) en presencia de diferentes concentraciones de citoquinas. Se utilizaron distintos anticuerpos para identificar proteínas expresadas específicamente en los diferentes linajes celulares. El anticuerpo anti-GFAP para marcar a los progenitores de astrocitos, anti-DCX para los progenitores de neuronas y anti-RIP para identificar progenitores de oligodendrocitos. También se usó DAPI para teñir los núcleos celulares. A diferencia de la marca de BrdU utilizada en los experimentos de proliferación, estas tres marcas son citoplasmáticas y tienen morfología irregular. Se consideró como positiva la marca en los casos que presentaban una morfología similar a la encontrada en la bibliografía y a su vez estaban asociadas a un núcleo celular. Se representaron los porcentajes de los distintos linajes celulares con respecto al total de células.

En la Figura 10 se observan los criterios tomados en cuenta para la identificación de los distintos linajes celulares generados a partir de las NPCs. Se muestra en el panel izquierdo una imagen a 20x con los distintos filtros que permiten la visualización de las diferentes marcas específicas para los linajes, la tinción nuclear de DAPI se observa en azul; GFAP, proteína expresada en los astrocitos, en verde; DCX, expresado en progenitores de neuronas, en amarillo y RIP expresado en oligodendrocitos, en rojo. Abajo se muestra la superposición de las marcas. Las flechas blancas señalan células particulares donde se puede observar, en el panel derecho, la ampliación correspondiente la marca de los distintos tipos celulares que se consideraron como positivas en el análisis de los experimentos celulares. Las imágenes representativas pertenecen a un control sin estimulación.

Control

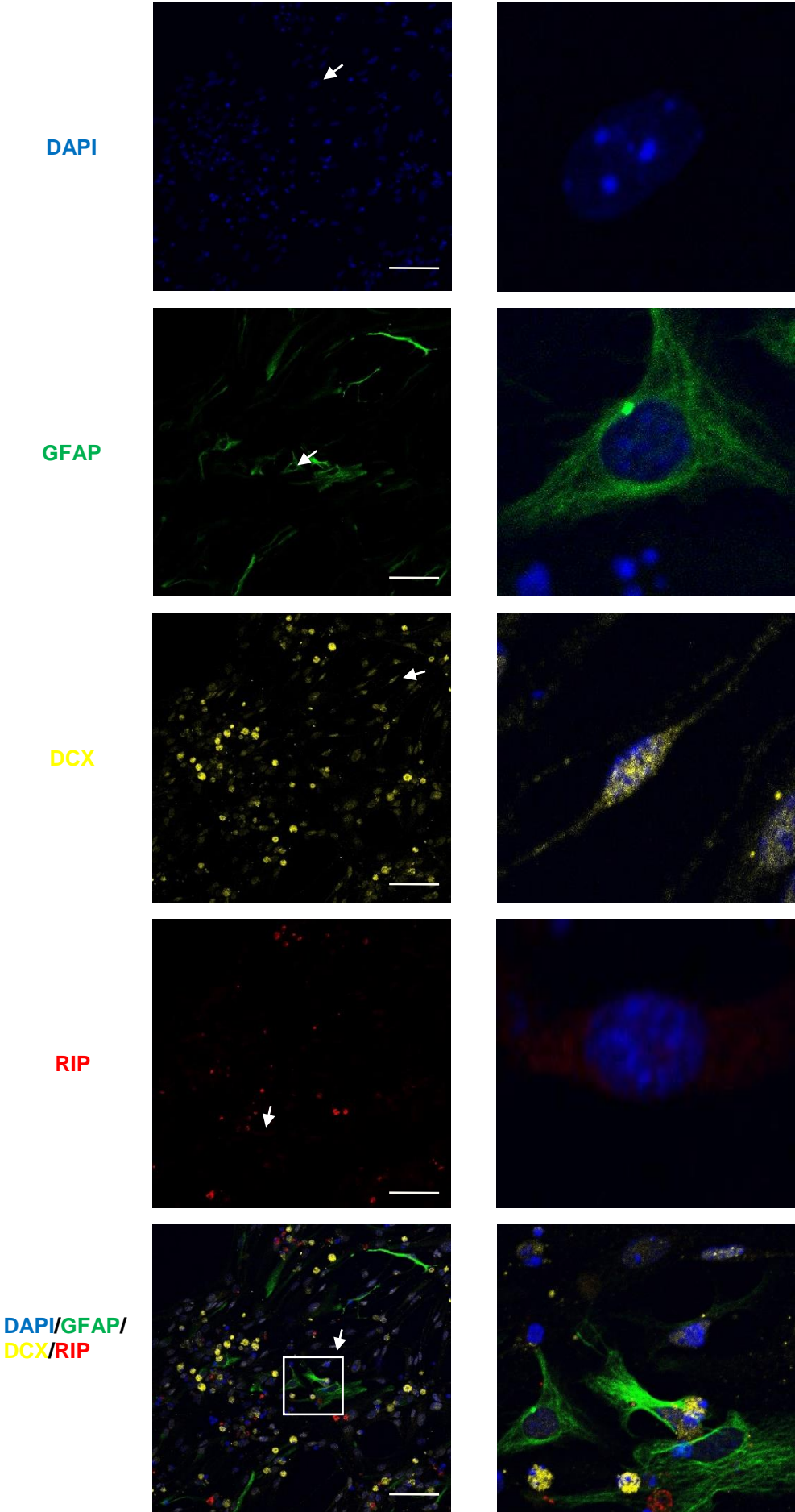


Figura 10. Diferenciación de las NPCs en cultivo. Imágenes representativas de un cultivo control luego de 4 días en medio de diferenciación. **Panel izquierdo:** imagen (20x) observada con distintos filtros que permiten la visualización de la marcación nuclear y linajes celulares. De arriba hacia abajo, DAPI, GFAP, DCX, RIP y la superposición de las mismas. Las flechas indican las células que se van a visualizar ampliadas en el **Panel derecho.** ampliación de las células indicadas con las flechas a la izquierda donde se pueden observar células en proceso de diferenciación expresando marcadores de linaje. Barra de escala = 100 μ m

3.3.1 IFN- γ

En la evaluación del efecto de diferentes concentraciones de IFN- γ sobre la diferenciación de las NPCs no se observaron diferencias significativas para ninguno de los linajes celulares. Sin embargo, es destacable que a medida que aumenta la concentración de IFN- γ utilizada se produce una disminución en el porcentaje de células que expresan el marcador de progenitores astrocíticos (células GFAP+). Para la concentración de 1 ng/mL de IFN- γ el porcentaje de células GFAP+ es similar al porcentaje de células que expresan el marcador de progenitores neuronales DCX (figura 11 B). Esto también se observa en la figura 11 C, en donde se grafica la relación entre las células GFAP+ sobre las DCX+, que es prácticamente 1 cuando la estimulación de las células se realizó con 1 ng/mL de IFN- γ . A concentraciones más bajas de IFN- γ la relación GFAP+/DCX+ aumenta a razón de 5 astrocitos por cada neurona cuando se estimuló con 0,01 ng/mL de IFN- γ y esta relación fue de 4 cuando se estimuló con 0,1 ng/mL. Si bien estos resultados no fueron estadísticamente significativos con respecto a su control, no descartaríamos que proporciones alteradas entre astrocitos y neuronas puedan tener alguna implicancia fisiológica. Prácticamente, no se detectaron progenitores de oligodendrocitos (RIP+) en ninguno de los cultivos realizados ya sean controles o estimulados con IFN- γ .

En la Figura 11 A se muestran imágenes representativas de células diferenciadas en cultivos estimulados con IFN- γ 0,01 y 1 ng/mL comparadas con su control. Es interesante resaltar la morfología de las células GFAP+ cuando fueron estimuladas en presencia de IFN- γ 1 ng/mL, donde se observa la marca para GFAP distribuida en largas y delgadas

prolongaciones en comparación con el control donde en general la marca se concentra rodeando al núcleo y más ramificada.

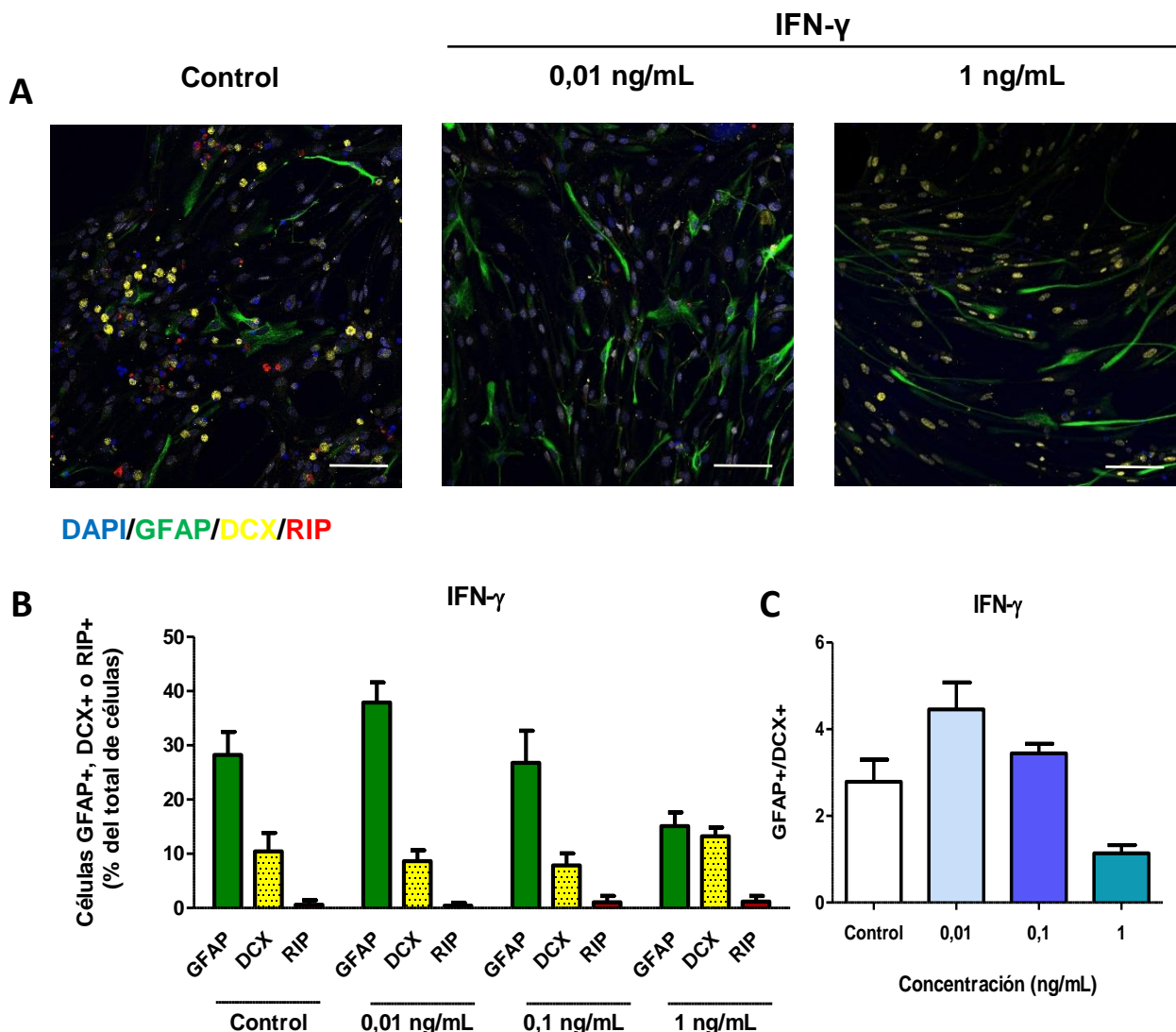


Figura 11. Efecto del IFN- γ sobre la diferenciación de las NPCs. **A)** Imágenes representativas (20x) de cultivos sin estimular y estimulados con 0,01 y 1 ng/mL de IFN- γ durante 5 días en medio de diferenciación. **B)** Se grafican el número de células GFAP+; DCX+ o RIP+ expresados como un porcentaje del total de células (DAPI+). **C)** Relación entre el porcentaje de progenitores de astrocitos y progenitores de neuronas (GFAP+/DCX+) a las distintas concentraciones de IFN- γ . Las barras muestran la media \pm SEM con un n=2. Barras de escala = 100 μ m.

3.3.2 IL-1 β

Cuando se evaluó el efecto de la IL-1 β sobre la diferenciación de las NPCs, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células GFAP+ para las concentraciones evaluadas y estos porcentajes fueron similares al control (Figura 12 B).

Con respecto al porcentaje de células DCX+, si bien no se observaron diferencias significativas para las concentraciones de IL-1 β estudiadas respecto al control, para la concentración de 1 ng/mL el porcentaje de células DCX+ disminuye (ns) con respecto a los cultivos sin estimular (figura 12 B). Esta disminución en el porcentaje de células que expresan DCX, sumado a que los niveles de GFAP que se mantuvieron sin variación, provocó un cambio significativo en la relación de GFAP+/DCX+, llegando a ser más de 15 astrocitos por cada neurona ($p < 0,001$) (figura 12 C).

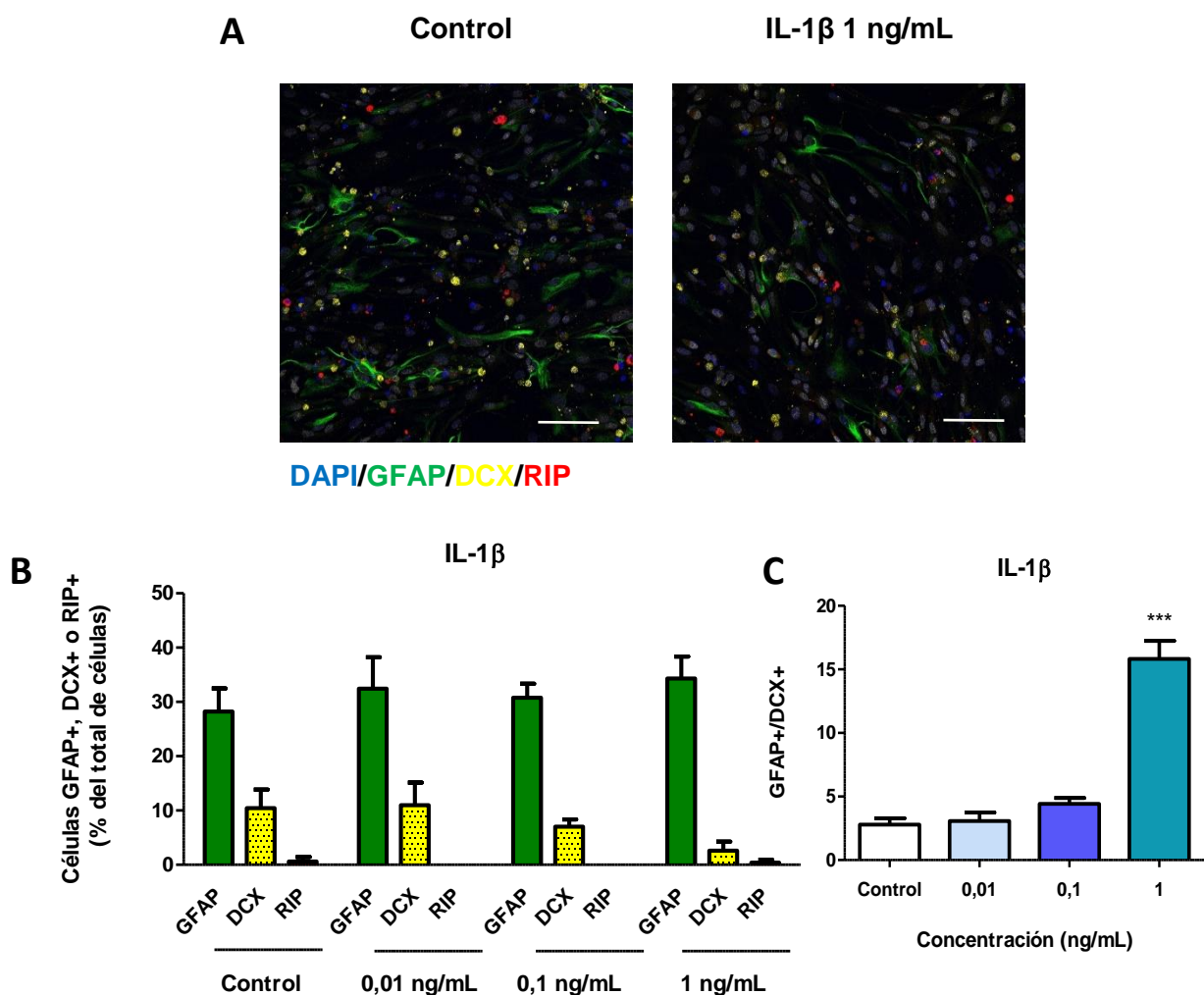


Figura 12. Evaluación del efecto de la IL-1 β . **A)** Imágenes representativas (20x) de cultivos sin estimular y estimulados con 1 ng/mL de IL-1 β . **B)** Porcentaje de células progenitoras de astrocitos (GFAP), neuronas (DCX) y oligodendrocitos (RIP). **C)** Relación entre el porcentaje de células GFAP+ sobre células DCX+ a las distintas concentraciones de IL-1 β . Las barras muestran la media \pm SEM con un $n=2$. Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al control (***) $p < 0,001$). Barras de escala = 100 μ m.

3.3.3 IL-4

Al investigar el efecto de las distintas concentraciones (0,01, 0,1 y 1 ng/mL) de IL-4 sobre la diferenciación de las NPCs, no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células GFAP+, DCX+ y RIP+ respecto al cultivo sin estimular (Figura 13 B). Por lo tanto, las relaciones entre células GFAP+/DCX+ fueron similares al control (ns) (Figura 13 C).

En la figura 13 A se muestra una imagen representativa de un cultivo estimulado con 0,1 ng/mL de IL-4 y control, ya que las imágenes obtenidas para el resto de las concentraciones de IL-4 fueron similares.

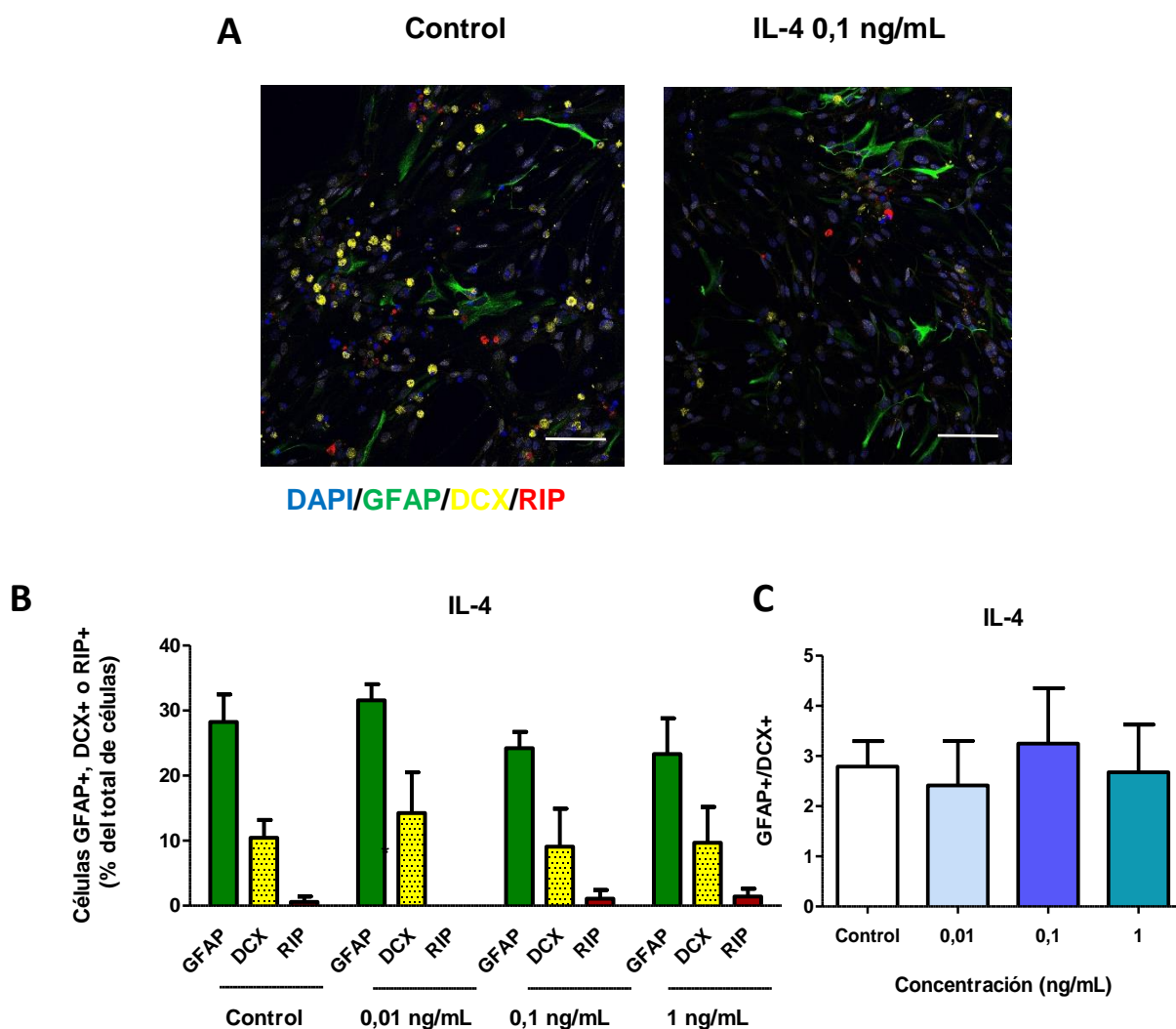


Figura 13. Evaluación del efecto de la IL-4 sobre la diferenciación de las NPCs. A) Imágenes representativas (20x) de un cultivo control y uno estimulado con 0,1 ng/mL de IL-4. **B)** Se grafican los porcentajes de células positivas para los marcadores de linaje. **C)** Relación entre el porcentaje de células GFAP+ sobre células DCX+ a las distintas concentraciones de IL-4. Barras de escala = 100 μ m.

3.3.4 IL-6

Cuando estudiamos el efecto de la IL-6 sobre la diferenciación de las NPCs, no se observaron cambios significativos en los porcentajes de células que expresaron GFAP o DCX en ninguna de las concentraciones evaluadas. Podemos destacar la disminución (ns) observada para las células DCX+ en los cultivos estimulados con 0,1 ng/mL de IL-6 (Figura 14 B). Esta disminución (ns) conlleva a encontrar un aumento significativo en la relación GFAP+/DCX+ en cultivos estimulados con 0,1 ng/mL de IL-6 (Figura 14 C).

En la figura 14 A se muestran imágenes representativas de cultivos estimulados con IL-6. Se puede observar una diferencia en la morfología de las células GFAP+, siendo más alargada cuando se estimularon con 1 ng/mL de IL-6, comparada la morfología radial en los cultivos estimulados con 0,01 ng/mL de IL-6 y en el cultivo sin estimular.

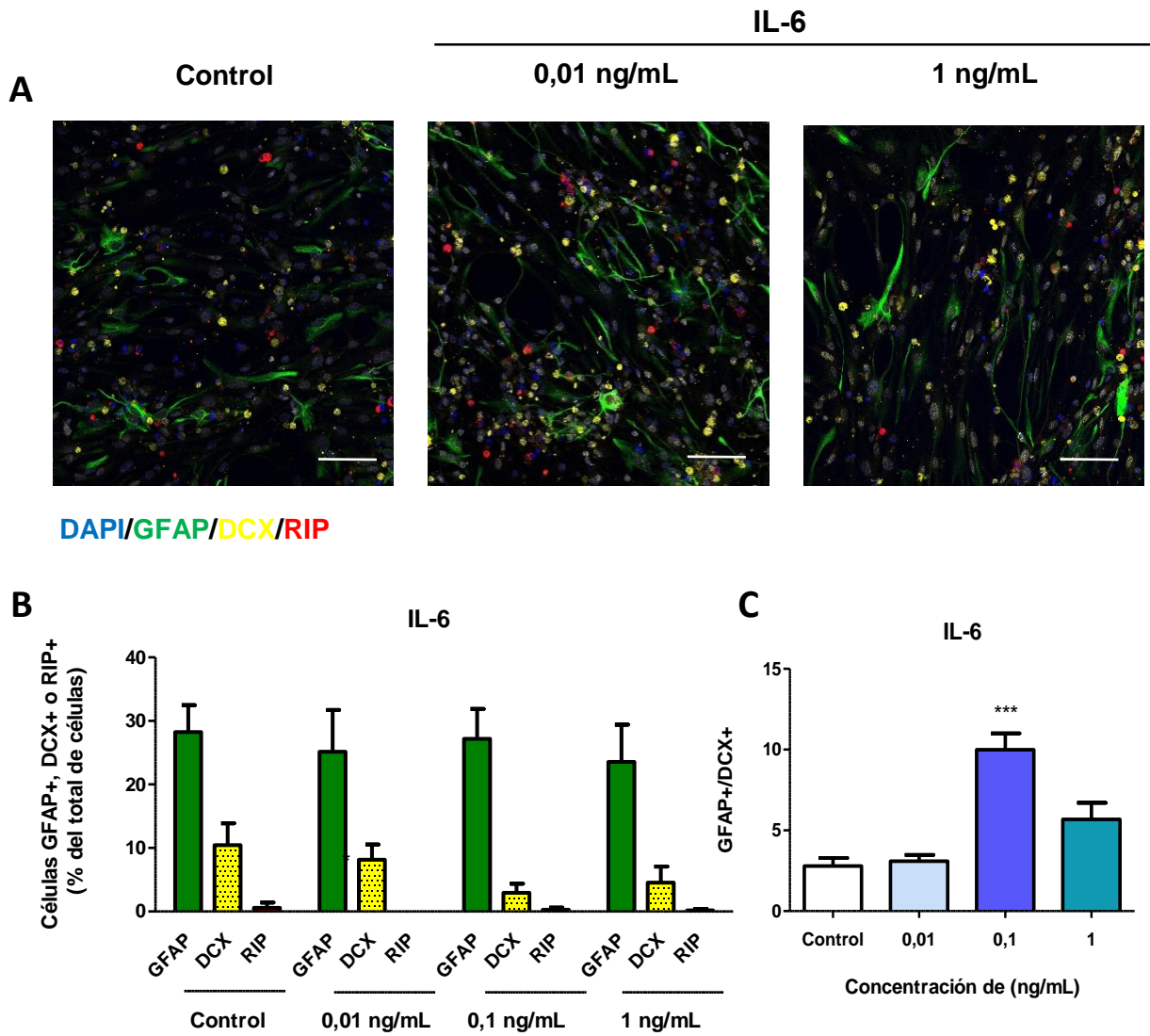


Figura 14. Evaluación de la diferenciación de las NPCs estimuladas con IL-6. **A)** Imágenes representativas (20x) de cultivos sin estimular y estimulados con 0,01 y 1 ng/mL de IL-6 durante 5 días en medio de diferenciación. **B)** Se grafican el número de células GFAP+; DCX+ o RIP+ expresados como un porcentaje del total de células **C)** Relación entre el porcentaje de progenitores de astrocitos y progenitores de neuronas a las distintas concentraciones de IFN- γ . Las barras muestran la media \pm SEM con un n=2. Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al control (***) $p < 0,001$). Barras de escala = 100 μ m.

DISCUSIÓN

En las últimas décadas ha emergido creciente evidencia de que la neurogénesis hipocampal adulta es funcionalmente relevante y juega un papel clave en el aprendizaje y la memoria (Deng *et al.*, 2010; Koehl Y Abrous., 2011; van Praag *et al.*, 2002). Si bien las zonas neurogénicas no son abundantes, los modelos para estudiar a las NPCs y los abordajes experimentales pueden ser muy variables entre sí. Las NPCs pueden ser obtenidas tanto de hipocampo como SVZ y de distintos modelos animales, siendo los más utilizados la rata y el ratón (sin contar la variabilidad que agregan las distintas cepas de estos animales). Además, hay que tener en cuenta la procedencia de las NPCs que pueden ser de etapas embrionarias, post-natal o adultas, ya que las características de dichas células y la forma de respuesta ante un estímulo pueden ser muy diferentes.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de citoquinas sobre la proliferación y diferenciación de las NPCs. Para esto nos planteamos como primer objetivo la puesta a punto del cultivo de NPCs hipocampales provenientes de ratones BALB/c adultos. Para tal fin, se determinaron los criterios para la correcta expansión de NPCs provenientes de hipocampo en cultivo siguiendo el protocolo aprendido por la Dra. Palumbo en el laboratorio de Adult Neurogenesis del Institute for Developmental Genetics en el Helmholtz Zentrum München en Munich, Alemania.

Basándonos en la bibliografía y en la experiencia adquirida, establecimos como tiempo óptimo 10 días para cada pasaje de neuroesferas creciendo en suspensión. A este tiempo el tamaño promedio de las neuroesferas fue de aproximadamente 100 μm . Si son demasiado pequeñas (< a 50 μm), no se obtiene una buena cantidad de NPCs. En cambio, si las neuroesferas tienen un tamaño muy grande (> a 200 μm), su centro se oscurece, las células en el interior de la neuroesfera sufren muerte celular (por falta de nutrientes y oxígeno), se adhieren espontáneamente a la placa de cultivo y se diferencian (Walker y Kempermann., 2014). Pudimos observar una viabilidad reducida al momento de contar la

cantidad de células utilizando el método de exclusión por azul tripán en cultivos de 14 días o más.

Otro punto a tener en cuenta fue el número de pasajes utilizados. En este trabajo determinamos la utilización de NPCs provenientes del pasaje 3 al 6. Antes del tercer pasaje no se logró obtener la cantidad de células requeridas para realizar los experimentos. Posterior al sexto pasaje, comenzamos a ver que las células mostraron adhesión espontánea a la placa y a extender filopodios. Esto es consistente con trabajos de otros autores donde recomiendan utilizar NPCs provenientes de no más de 6 o 7 pasajes (Theus *et al.*, 2012). Vukicevic y colaboradores (2010) han demostrado las alteraciones genéticas que se producen en los cultivos de NPCs a largo plazo y sus consecuencias sobre el potencial de proliferación y diferenciación.

Además, fue importante establecer la cantidad de células y el tiempo en que las NPCs se cultivaron en monocapa para realizar los experimentos de proliferación y diferenciación, ya que un número inadecuado de células y/o tiempo pueden afectar dichos procesos. Para tal fin, se fijó la cantidad de células a colocar en placas de 24 pocillos en 1×10^5 células/pocillo. Colocando este número de células en condiciones de proliferación (en presencia de factores de crecimiento) e incubadas durante 48 horas, obtuvimos alrededor del 80% de confluencia por pocillo. Tiempos más largos de incubación y/o alta densidad celular dieron como resultado un porcentaje de confluencia superior al 90% donde las células dejan de proliferar, aumentando la probabilidad de desprendimiento de la placa y muerte celular (Caldwell, 2000; Walker y Kempermann., 2014). Cuando colocamos una cantidad menor de células que 1×10^5 células/pocillo, las NPCs se disponían de manera muy heterogénea sobre la placa, no se adherían y terminaban muriendo.

En cuanto a las concentraciones de citoquinas utilizadas para nuestros experimentos decidimos utilizar concentraciones de 0,01 a 50 ng/mL (de 0,1 a 100 ng/mL para IFN- γ) como una primera aproximación para investigar su efecto sobre nuestro modelo de estudio

de NPCs adultas. Los trabajos publicados, en general, usan concentraciones de citoquinas de 10 a 100 ng/ml. Por lo tanto, nos resultó interesante evaluar el efecto de concentraciones menores que podrían representar una mejor aproximación a las condiciones fisiológicas.

Las NPCs, que se encuentran en el giro dentado del hipocampo de mamíferos, son capaces de proliferar y diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage, 2000; Gross, 2000). Los nichos neurogénicos están altamente regulados por varios factores que modifican los procesos de supervivencia, proliferación, diferenciación y maduración de las NPCs (Ming y Song., 2011). Entre los factores que afectan a las NPCs se pueden mencionar: componentes de la matriz extracelular (Imbeault *et al.*, 2009), factores de crecimiento (Palmer *et al.*, 1999), citoquinas (Gonzalez-Perez *et al.*, 2012), la microglía (Butovsky *et al.*, 2006), el envejecimiento (Limke y Rao., 2002), el estrés (McEwen, 2001; Scarante *et al.*, 2017), entre otros. Previamente, nuestro grupo demostró en ratones hembra Balb/c expuestos a un modelo de estrés crónico moderado un deterioro en el aprendizaje y la memoria evaluado por diferentes pruebas comportamentales (Palumbo *et al.*, 2007; 2010; 2017; Pascuan *et al.*, 2015). Este déficit cognitivo fue debido a una disminución en la neurogénesis hipocampal que se correlacionó con el desbalance en los niveles de citoquinas Th1/Th2 (Palumbo *et al.*, 2012). Además, alteraciones en los niveles de citoquinas tanto a nivel periférico como del hipocampo fueron encontradas en el modelo de estrés crónico (Palumbo *et al.*, 2010; 2017). Teniendo en cuenta los antecedentes de nuestro grupo y de otros autores donde demostraron el papel de las citoquinas sobre el aprendizaje y la memoria, así como su relación con los procesos de proliferación y diferenciación de las NPCs en diversas patologías (Whitney *et al.*, 2009), nos resultó interesante estudiar el efecto directo de las citoquinas sobre estos procesos en NPCs provenientes de ratones adultos.

Reportes previos sobre el estudio del efecto directo o indirecto del IFN- γ en distintos modelos experimentales han relacionado a esta citoquina proinflamatoria con la neurogénesis y diferenciación de las NPCs. Wong (2004) observó que la adición de IFN- γ a cultivos de neuroesferas provenientes de la SVZ de ratones C57 provocó una disminución significativa en la proliferación de las mismas. En cuanto a la diferenciación, demostró que las NPCs estimuladas con IFN- γ se diferencian hacia un fenotipo neuronal a la vez que reduce la población de células GFAP. Otro estudio realizado en NPCs embrionarias encontró que el IFN- γ reduce la proliferación de estas células a las 48 horas, así también como reduce la diferenciación tanto a neuronas como a astrocitos (Walter *et al.*, 2011). Nuestros resultados se mostraron acordes con estos antecedentes (al menos en parte) ya que, en nuestro modelo de estudio, el IFN- γ induce una disminución en la proliferación de las NPCs hipocampales a las 48 horas. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la diferenciación de las NPCs hacia un fenotipo neuronal, observando una tendencia a disminuir el porcentaje de células GFAP+ a medida que aumenta la concentración de IFN- γ . Según lo demostrado en el modelo de estrés crónico, que desde hace años estudiamos en nuestro grupo, hipotetizamos que la estimulación de las NPCs con IFN- γ induciría la proliferación y la vía de diferenciación a un fenotipo neuronal. Esto no fue así para la proliferación, donde observamos que el IFN- γ afecta negativamente la proliferación en un rango de concentraciones de IFN- γ entre 1 y 100 ng/mL. Hay que tener en cuenta que este modelo experimental *in vitro* evaluó el efecto directo del IFN- γ sobre las NPCs simplificando las variables que se encuentran en los modelos *in vivo*. Butovsky (2006) demostró que la microglía activada con IFN- γ tiene un efecto pro-neurogénico sobre las NPCs (provenientes de la SVZ de ratones C57), sin afectar la proliferación. Este es un ejemplo claro del efecto indirecto del IFN- γ sobre las NPCs. Además, observamos una tendencia de reducción en la relación de células GFAP+/DCX+ en cultivos estimulados con 1 ng/mL de IFN- γ , debido a la baja en el porcentaje de células GFAP+. Actualmente, se

conoce que los astrocitos son esenciales para el funcionamiento óptimo neuronal, formando parte activa en la plasticidad sináptica. La reducción en la astrogliogénesis y la consecuente reducción de la relación de astrocitos/neuronas generados resulta en un pobre microambiente para las nuevas neuronas que se generan en el DG (Komitova et al., 2002). Por lo tanto, esta tendencia a la baja en la relación GFAP+/DCX+, sumado a la significativa disminución en la proliferación, podría generar un ambiente desfavorable para el desarrollo de nuevas neuronas funcionales en el DG cuando aumentan los niveles de IFN- γ en el hipocampo.

Respecto a la IL-1 β , una citoquina proinflamatoria, se ha demostrado que su receptor se encuentra expresado en NPCs del DG del hipocampo pero no en la SVZ (Gonzalez-Perez et al., 2012). Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la proliferación de las NPCs estimuladas con distintas concentraciones de IL-1 β durante 48 horas. Otro trabajo, utilizando como modelo de estudio neuroesferas provenientes del DG de ratas adultas y estimulando con 10 y 100 ng/mL de IL-1 β , tampoco observó diferencias en la proliferación de las neuroesferas a las 24 horas. Cuando adicionaron 100 ng/mL de IL-1 β durante 7 días obtuvieron una reducción significativa en la proliferación (Ryan et al., 2013). Estudios previos han demostrado que la exposición a un estrés agudo, incrementa los niveles de IL-1 β en distintas regiones del cerebro incluido el hipocampo (Nguyen et al., 1998). Koo y Duman (2008) comprobaron, en un modelo *in vivo* de rata, que la administración directa vía cánula en el hipocampo de 20 y 100 ng por rata de IL1- β , disminuye la proliferación de las células del DG. Además, este grupo estimuló progenitores obtenidos de hipocampo de ratas y observaron que a las 2 horas de incubar las células con 10 y 100 ng/mL de IL-1 β había una disminución significativa en la proliferación de los progenitores hipocampales, sin afectar la muerte celular. Respecto a la diferenciación de las NPCs, Monje y colaboradores (2003), han reportado que la IL-1 β no afecta el proceso

de diferenciación de las NPCs obtenidas de hipocampo de rata. Este estudio es coherente con nuestros resultados, donde la estimulación con IL-1 β no produjo cambios significativos en los niveles de los distintos linajes celulares. Sin embargo, cuando analizamos la relación de células GFAP+/DCX+ en cultivos estimulados con 1 ng/mL de IL-1 β esta fue de 15 progenitores de astrocitos por progenitor neuronal. Este aumento de dicha relación podría deberse por la tendencia a la disminución en el porcentaje de células DCX+.

La citoquina anti-inflamatoria IL-4 puede incrementar la migración de las NPCs al aumentar la expresión de moléculas de adhesión y receptores de quemoquinas (Guan *et al.*, 2008). La microglía activada por IL-4 induce un fenotipo denominado protector que, si bien no afecta a la proliferación o supervivencia de las NPCs, promueve tanto la neurogénesis como la oligodendrogénesis de estas células (SVZ de ratones adultos C57Bl6/J). Este efecto sobre la diferenciación no se observó cuando las NPCs fueron tratadas directamente con IL-4 (Butovsky *et al.*, 2006). Acorde con estos antecedentes, no encontramos diferencias significativas en la proliferación de las NPCs hipocampales estimuladas con IL-4. Aunque si podemos destacar que hubo una tendencia a aumentar la proliferación cuando la estimulación se realizó con concentraciones de IL-4 altas. En nuestro modelo de estudio, y de acuerdo con el antecedente citado, no observamos un efecto en la diferenciación de las NPCs cuando se estimularon directamente con IL-4 a ninguna de las concentraciones estudiadas.

Estudios previos han señalado que la IL-6 tiene un rol clave en la neuroinflamación. La expresión no controlada de esta citoquina en el SNC está asociada a patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Galimberti *et al.*, 2008) y la depresión (Dowlati *et al.*, 2010). En el cerebro, la fuente principal de IL-6 son los astrocitos

(Spooren *et al.*, 2011b). Un estudio *in vivo* demostró que se reduce la proliferación, supervivencia y neurogénesis de las células en el DG en un modelo de ratón transgénico donde la expresión de IL-6 está bajo control del promotor de GFAP (Vallières *et al.*, 2002). McPherson y colaboradores (2011) demostraron que las NPCs hipocampales expresan el receptor de IL-6 y que la estimulación con 10 ng/mL de IL-6 reduce significativamente las colonias de neuroesferas provenientes de hipocampo en ratones de 21 días y un año. En nuestros experimentos también observamos una disminución significativa de la proliferación de las NPCs estimuladas con IL-6 pero sólo a la concentración más alta evaluada (50 ng/mL). Este resultado está en línea con trabajos previos de nuestro grupo donde encontramos en linfocitos provenientes de ratones estresados crónicamente un gran aumento de IL-6 que se relacionó con una disminución en la neurogénesis (Palumbo *et al.*, 2012). Interesantemente, obtuvimos un aumento significativo en la proliferación cuando estimulamos con 1 ng/mL. Esta diferencia podría deberse a que la proliferación de las NPCs bajo estimulación de IL-6 es dosis dependiente, siendo perjudicial la sobreexpresión de esta citoquina en el hipocampo y beneficiosa a bajas concentraciones. Además de lo mencionado anteriormente, Monje y colaboradores (2003) demostraron que el co-cultivo de microglía activada con lipopolisacárido reduce significativamente la neurogénesis de NPCs provenientes de hipocampo de rata, sin afectar a la gliogénesis. Este efecto fue revertido con la adición de un anticuerpo bloqueante de IL-6. Nuestros experimentos de evaluación de la diferenciación estimulando NPCs con IL-6 no afectaron los porcentajes de células de la glía. Tampoco observamos diferencias significativas en el porcentaje de células DCX+, sólo una leve tendencia a disminuir cuando se estimuló con 0,1 ng/mL de IL-6 que, junto con el porcentaje de células GFAP+ que se mantuvieron estables, conllevó a un aumento significativo en la relación de células GFAP+ sobre las DCX+. Estos resultados, señalan a la IL-6 como un blanco interesante para profundizar los estudios sobre las NPCs adultas.

En cuanto a las células marcadas con RIP, marcador de oligodendocitos, en este trabajo detectamos niveles de expresión muy bajos para dicha proteína, tanto en cultivos controles como en cultivos estimulados con citoquinas. Probablemente se deba a problemas relacionados con el anticuerpo primario utilizado. Si bien RIP se expresa tanto en oligodendrocitos maduros como inmaduros y su expresión es específica de este tipo celular, ya que no marca ni astrocitos ni neuronas (Friedman *et al.*, 1989; Hsieh *et al.*, 2004). Actualmente, existen otros marcadores específicos de oligodendrocitos inmaduros empleados en investigación como NG2, O4 y PDGFR α (De Castro *et al.*, 2005).

Para concluir, en este trabajo se logró la puesta a punto del cultivo de NPCs hipocampales de ratones adultos. La importancia de poder estudiar estas células radica en que el hipocampo, a diferencia de la SVZ ampliamente utilizado, está relacionado directamente con los procesos de aprendizaje y memoria. Además, debido a que la capacidad de respuesta de las NPCs ante un estímulo es muy diferente dependiendo de su procedencia, nos resultó interesante estudiar el efecto de las citoquinas sobre esta población celular adulta. Nuestros resultados contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la modulación de los procesos de proliferación y diferenciación de las NPCs adultas. Estos conocimientos podrían aportar nuevas herramientas para el diseño de terapias eficaces para el tratamiento de patologías con déficit cognitivo.

Bibliografía

Akkermann, R., Beyer, F., y Küry, P. (2017). Heterogeneous populations of neural stem cells contribute to myelin repair. *Neural Regeneration Research*, 12(4), 509-517. doi:10.4103/1673-5374.204999

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Neural Development

Allen, N. J., y Barres, B. A. (2009). Glia — more than just brain glue. *Nature*, 457, 675. doi:10.1038/457675a

Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A. E., Pluchino, S., Schwartz, M. (2006). Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(1), 149-160. doi:10.1016/j.mcn.2005.10.006

Butt, A. M., Ibrahim, M., Ruge, F. M., y Berry, M. (1995). Biochemical subtypes of oligodendrocyte in the anterior medullary velum of the rat as revealed by the monoclonal antibody rip. *Glia*, 14(3), 185-197. doi:10.1002/glia.440140304

Caldwell, M. A. (2000). Recent advances in neural stem cell technologies. *Trends in neurosciences*, 24(2), 72-74. doi:10.1016/S0166-2236(00)01725-2

Cudrici, C., Niculescu, T., Niculescu, F., Shin, M. L., y Rus, H. (2006). Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: Protection of oligodendrocytes from apoptosis by complement. *Journal of Rehabilitation Research & Development*, 43, 123 - 132. doi:10.1682/JRRD.2004.08.0111

Chen, Q., Nakajima, A., Choi, S. H., Xiong, X., Sisodia, S. S., y Tang, Y.-P. (2008). Adult neurogenesis is functionally associated with AD-like neurodegeneration. *Neurobiology of disease*, 29(2), 316-326. doi:10.1016/j.nbd.2007.09.005

Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E.K., Lanctot, K.L., 2010. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol. Psychiatry* 67, 446–457.

Dawson, M. R. L., Levine, J. M., y Reynolds, R. (2000). NG2-expressing cells in the central nervous system: Are they oligodendroglial progenitors? *Journal of Neuroscience Research*, 61(5), 471-479. doi:10.1002/1097-4547(20000901)61:5<471::AID-JNR1>3.0.CO;2-N

De Castro, F., y Bribián, A. (2005). The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Research Reviews*, 49(2), 227-241. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.12.034

DeFelipe, J. (2015). The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 14. doi:10.3389/fnana.2015.00014

Deng, W., Aimone, J. B., y Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 11(5), 339-350. doi:10.1038/nrn2822

Deng, W., y Poretz, R. D. (2003). Oligodendroglia in Developmental Neurotoxicity. *NeuroToxicology*, 24(2), 161-178. doi:[https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(02\)00196-1](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(02)00196-1)

Domingues, H. S., Portugal, C. C., Socodato, R., y Relvas, J. B. (2016). Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4. doi:10.3389/fcell.2016.00071

Farzanehfar, P. (2018). Comparative review of adult midbrain and striatum neurogenesis with classical neurogenesis. *Neuroscience Research*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.01.002>

Felger, J. C., y Lotrich, F. E. (2013). Inflammatory Cytokines in Depression: Neurobiological Mechanisms and Therapeutic Implications. *Neuroscience*, 246, 199-229. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.060

Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.-C., . . . Chelly, J. (1999). Doublecortin Is a Developmentally Regulated, Microtubule-Associated Protein Expressed in Migrating and Differentiating Neurons. *Neuron*, 23(2), 247-256. doi:[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80777-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80777-1)

Friedman, B., Hockfield, S., Black, J. A., Woodruff, K. A., y Waxman, S. G. (1989). In situ demonstration of mature oligodendrocytes and their processes: An immunocytochemical study with a new monoclonal antibody, Rip. *Glia*, 2(5), 380-390. doi:10.1002/glia.440020510

Gage, F. H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438. doi:10.1126/science.287.5457.1433

Galimberti, D., Venturelli, E., Fenoglio, C., Guidi, I., Villa, C., Bergamaschini, L., Cortini, F., Scalabrini, D., Baron, P., Vergani, C., Bresolin, N., Scarpini, E., 2008. Intrathecal levels of IL-6, IL-11 and LIF in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *J. Neurol.* 255, 539–544.

Gonzalez-Perez, O., Gutierrez-Fernandez, F., Lopez-Virgen, V., Collas-Aguilar, J., Quinones-Hinojosa, A., y Garcia-Verdugo, J. M. (2012). Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience*, 226, 270-281. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.08.053

Gross, C. G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: Death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience*, 1, 67. doi:10.1038/35036235

Guan, Y., Jiang, Z., Ciric, B., Rostami, A. M., y Zhang, G.-X. (2008). Upregulation of chemokine receptor expression by IL-10/IL-4 in adult neural stem cells. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(3), 232-236. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.07.003>

Hsieh, J., Aimone, J. B., Kaspar, B. K., Kuwabara, T., Nakashima, K., y Gage, F. H. (2004). IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *The Journal of Cell Biology*, 164(1), 111-122. doi:10.1083/jcb.200308101

Imbeault, S., Gauvin, L. G., Toeg, H. D., Pettit, A., Sorbara, C. D., Migahed, L., . . . Bennett, S. A. L. (2009). The extracellular matrix controls gap junction protein expression

and function in postnatal hippocampal neural progenitor cells. *BMC Neuroscience*, 10(1), 13. doi:10.1186/1471-2202-10-13

Kimelberg, H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry International*, 45(2), 191-202. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.08.015>

Kipnis, J., y Filiano, A. J. (2017). The central nervous system: privileged by immune connections. *Nature Reviews Immunology*, 18, 83. doi:10.1038/nri.2017.152

Koehl, M., y Abrous, D. N. (2011). A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1101-1114. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07609.x

Koo, J. W., y Duman, R. S. (2008). IL-1 β is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), 751-756. doi:10.1073/pnas.0708092105

Korzhevskii, D. E., Karpenko, M. N., y Kirik, O. V. (2012). Microtubule-Associated Proteins as Indicators of Differentiation and the Functional State of Nerve Cells. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 42(3), 215-222. doi:10.1007/s11055-012-9556-4

Kuhn, H. G., Eisch, A. J., Spalding, K., y Peterson, D. A. (2016). Detection and Phenotypic Characterization of Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(3). doi:10.1101/cshperspect.a025981

Lim, D. A., y Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular–Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5). doi:10.1101/cshperspect.a018820

Limke, T. L., y Rao, M. S. (2002). Neural stem cells in aging and disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 6(4), 475-496. doi:10.1111/j.1582-4934.2002.tb00451.x

Liu, Y., y Zhou, J. (2013). Oligodendrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Biology*, 8(2), 127-133. doi:10.1007/s11515-013-1260-4

Lodato, S., y Arlotta, P. (2015). Generating Neuronal Diversity in the Mammalian Cerebral Cortex. *Annual review of cell and developmental biology*, 31, 699-720. doi:10.1146/annurev-cellbio-100814-125353

Matyash, V., y Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews*, 63(1), 2-10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.001>

McEwen, B. S. (2001). Plasticity of the Hippocampus: Adaptation to Chronic Stress and Allostatic Load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 933(1), 265-277. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb05830.x

McPherson, C. A., Aoyama, M., y Harry, G. J. (2011). Interleukin (IL)-1 and IL-6 regulation of neural progenitor cell proliferation with hippocampal injury: Differential regulatory pathways in the subgranular zone (SGZ) of the adolescent and mature mouse brain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(5), 850-862. doi:10.1016/j.bbi.2010.09.003

- Miller, D. B., y O'Callaghan, J. P. (2002). Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism*, 51(6), 5-10. doi:10.1053/meta.2002.33184
- Ming, G.-I., y Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, 70(4), 687-702. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.001
- Molofsky, A. V., y Deneen, B. (2015). Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia*, 63(8), 1320-1329. doi:10.1002/glia.22836
- Monje, M. L., Toda, H., y Palmer, T. D. (2003). Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science*, 302(5651), 1760-1765. doi:10.1126/science.1088417
- Naruse, M., Ishizaki, Y., Ikenaka, K., Tanaka, A., y Hitoshi, S. (2017). Origin of oligodendrocytes in mammalian forebrains: a revised perspective. *The Journal of Physiological Sciences*, 67(1), 63-70. doi:10.1007/s12576-016-0479-7
- Navarro-Sanchis, C., Brock, O., Winsky-Sommerer, R., y Thuret, S. (2017). Modulation of Adult Hippocampal Neurogenesis by Sleep: Impact on Mental Health. *Frontiers in Neural Circuits*, 11, 74. doi:10.3389/fncir.2017.00074
- Nguyen, K. T., Deak, T., Owens, S. M., Kohno, T., Fleshner, M., Watkins, L. R., y Maier, S. F. (1998). Exposure to Acute Stress Induces Brain Interleukin-1 β Protein in the Rat. *The Journal of Neuroscience*, 18(6), 2239-2246.
- Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F., y Gage, F. H. (1999). Fibroblast Growth Factor-2 Activates a Latent Neurogenic Program in Neural Stem Cells from Diverse Regions of the Adult CNS. *The Journal of Neuroscience*, 19(19), 8487-8497.
- Palumbo, M. L., Fosser, N. S., Rios, H., Zubilete, M. A. Z., Guelman, L. R., Cremaschi, G. A., y Genaro, A. M. (2007). Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory. *Journal of Neurochemistry*, 102(1), 261-274. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04528.x
- Palumbo, M. L., Canzobre, M. C., Pascuan, C. G., Ríos, H., Wald, M., y Genaro, A. M. (2010). Stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57Bl/6 mice. *Journal of Neuroimmunology*, 218(1), 12-20. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.11.005
- Palumbo, M. L., Trincherio, M. F., Zorrilla-Zubilete, M. A., Schinder, A. F., y Genaro, A. M. (2012). Glatiramer acetate reverts stress-induced alterations on adult neurogenesis and behavior. Involvement of Th1/Th2 balance. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(3), 429-438. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.12.006>
- Palumbo, M. L., Di Rosso, M. E., Simon, E. H., Gonzalez Murano, M. R., y Genaro, A. M. (2017). Altered interferon- γ expression in lymphocytes as a potential peripheral marker of chronic stress-induced cognitive deficit. *Cytokine*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.11.010>
- Parent, J. M. (2003). Injury-Induced Neurogenesis in the Adult Mammalian Brain. *The Neuroscientist*, 9(4), 261-272. doi:10.1177/1073858403252680

Pascuan, C. G., Simon, E. H., Genaro, A. M., y Palumbo, M. L. (2015). Involvement of nitric oxide in improving stress-induced behavioural alteration by glatiramer acetate treatment in female BALB/c mice. *Psychopharmacology*, 232(9), 1595-1605. doi:10.1007/s00213-014-3791-z

Paxinos G., Franklin K.B.J. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. 2nd.

Priller, J., Merz, K., y Lie, D. C. (2013). Evidence that Doublecortin Is Dispensable for the Development of Adult Born Neurons in Mice. *PLoS ONE*, 8(5), e62693. doi:10.1371/journal.pone.0062693

Rodrigues, R. S., Ribeiro, F. F., Ferreira, F., Vaz, S. H., Sebastião, A. M., y Xapelli, S. (2017). Interaction between Cannabinoid Type 1 and Type 2 Receptors in the Modulation of Subventricular Zone and Dentate Gyrus Neurogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 8. doi:10.3389/fphar.2017.00516

Rusznák, Z., Henskens, W., Schofield, E., Kim, W. S., y Fu, Y. (2016). Adult Neurogenesis and Gliogenesis: Possible Mechanisms for Neurorestoration. *Experimental Neurobiology*, 25(3), 103-112. doi:10.5607/en.2016.25.3.103

Ryan, S. M., O'Keefe, G. W., O'Connor, C., Keeshan, K., y Nolan, Y. M. (2013). Negative regulation of TLX by IL-1 β correlates with an inhibition of adult hippocampal neural precursor cell proliferation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 33, 7-13. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.03.005>

Sacco, R., Cacci, E., y Novarino, G. (2018). Neural stem cells in neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 48, 131-138. doi:<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.12.005>

Scarante, F. F., Vila-Verde, C., Detoni, V. L., Ferreira-Junior, N. C., Guimarães, F. S., y Campos, A. C. (2017). Cannabinoid Modulation of the Stressed Hippocampus. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 411. doi:10.3389/fnmol.2017.00411

Schwarz, M. J., Chiang, S., Müller, N., y Ackenheil, M. (2001). T-helper-1 and T-helper-2 Responses in Psychiatric Disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 15(4), 340-370. doi:10.1006/brbi.2001.0647

Spooren, A., Kolmus, K., Laureys, G., Clinckers, R., De Keyser, J., Haegeman, G., y Gerlo, S. (2011a). Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Research Reviews*, 67(1-2), 157-183. doi:10.1016/j.brainresrev.2011.01.002

Spooren, A., Mestdagh, P., Rondou, P., Kolmus, K., Haegeman, G., y Gerlo, S. (2011b). IL-1 β potently stabilizes IL-6 mRNA in human astrocytes. *Biochemical Pharmacology*, 81(8), 1004-1015. doi:10.1016/j.bcp.2011.01.019

Tauheed, A. M., Ayo, J. O., y Kawu, M. U. (2016). Regulation of oligodendrocyte differentiation: Insights and approaches for the management of neurodegenerative disease. *Pathophysiology*, 23(3), 203-210. doi:10.1016/j.pathophys.2016.05.007

Theus, M. H., Ricard, J., y Liebl, D. J. (2012). Reproducible Expansion and Characterization of Mouse Neural Stem/Progenitor Cells in Adherent Cultures Derived from the Adult Subventricular Zone. doi:10.1002/9780470151808.sc02d08s20

Toda, T., y Gage, F. H. (2017). Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell and Tissue Research*. doi:10.1007/s00441-017-2735-4

Vallières, L., Campbell, I. L., Gage, F. H., y Sawchenko, P. E. (2002). Reduced Hippocampal Neurogenesis in Adult Transgenic Mice with Chronic Astrocytic Production of Interleukin-6. *The Journal of Neuroscience*, 22(2), 486-492.

van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., y Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415, 1030. doi:10.1038/4151030a

Vukicevic, V., Jauch, A., Dinger, T. C., Gebauer, L., Hornich, V., Bornstein, S. R., . . . Müller, A. M. (2010). Genetic instability and diminished differentiation capacity in long-term cultured mouse neurosphere cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(2), 124-132. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.01.001>

Walker, T. L., y Kempermann, G. (2014). One Mouse, Two Cultures: Isolation and Culture of Adult Neural Stem Cells from the Two Neurogenic Zones of Individual Mice. *Journal of Visualized Experiments*(84). doi:10.3791/51225

Walter, J., Honsek, S- D., Illes, S., Wellen, J. M., Hartung, H., Rose, C. R. y Dihné, M (2011). A new role for interferon gamma in neural stem/precursor cell dysregulation. *Molecular Neurodegeneration*, 1750-1326. doi: 10.1186/1750-1326-6-18

Watanabe, M., Sakurai, Y., Ichinose, T., Aikawa, Y., Kotani, M., y Itoh, K. (2006). Monoclonal antibody Rip specifically recognizes 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 84(3), 525-533. doi:10.1002/jnr.20950

Whitney, N. P., Eidem, T. M., Peng, H., Huang, Y., y Zheng, J. C. (2009). Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: Relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry*, 108(6), 1343-1359. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05886.x

Yang, Z., y Wang, K. K. W. (2015). Glial Fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in neurosciences*, 38(6), 364-374. doi:10.1016/j.tins.2015.04.003

Yirmiya, R., y Goshen, I. (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(2), 181-213. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.015>

Yuste, R. (2015). From the neuron doctrine to neural networks. *Nature Reviews Neuroscience*, 16, 487. doi:10.1038/nrn3962

Zeng, H., y Sanes, J. R. (2017). Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. *Nature Reviews Neuroscience*, 18, 530. doi:10.1038/nrn.2017.85