

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO DE RATONES ADULTOS
TRATADOS CON PROSTRATINA MEDIANTE
ADMINISTRACIÓN INTRANASAL**

Facultad de Medicina

Universidad de Cádiz



Alumna: **Patricia Braza Gómez**

Tutora: Dra. Carmen Castro García

Cotutor: Don Samuel Domínguez García

Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública
Área de Fisiología

Cádiz, 2018

Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública.
Área de Fisiología. Facultad de Medicina.
Universidad de Cádiz.

Dra. Carmen Castro González y Don Samuel Domínguez García certifican que: El presente trabajo "Neurogénesis en el cerebro de ratones adultos tratados con prostratina mediante administración intranasal" presentado por Dña. Patricia Braza Gómez, de la Universidad de Cádiz, ha sido realizado bajo su dirección, y, una vez revisado, no encuentran objeciones para que sea presentado para su lectura y defensa.

Y para que así conste, se firma el presente certificado en Cádiz, a de Mayo de 2018

Fdo. Dra. Carmen Castro González

Fdo. Don. Samuel Domínguez García.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN	5
PALABRAS CLAVE	6
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Neurogénesis	8
1.2. Células madres neurales	9
1.3. Neurogénesis en el cerebro adulto en condiciones fisiológicas.....	10
1.4. Otros nichos neurogénicos	11
1.5. Reposición neuronal a partir de células madre en lesiones cerebrales	11
1.6. Proteínas quinasa C (PKC)	13
1.7. PKC, neurogénesis y diterpenos.....	14
2. HIPÓTESIS.....	15
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo principal.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Diseño del estudio.....	15
4.2. Animales de experimentación	15
4.3. Tamaño muestral y procedimiento de muestreo	16
4.4. Preparación de las muestras.....	16
4.5. Inmunohistoquímica	16
4.6. Criterios de inclusión y exclusión.....	17
4.7. Variables (dependientes e independientes).....	18
4.8. Recogida de datos y fuentes de información	18
4.9. Análisis de datos, instrumentos e intervenciones	18
4.10. Dificultades y limitaciones del estudio	19
5. RESULTADOS	20
5.1 Efecto de la administración intranasal de prostratina durante 3 días sobre la proliferación de los precursores neurales en la SVZ.....	20
5.2 Efecto de la administración intranasal de prostratina durante 7 días sobre la proliferación de los precursores neurales en la SVZ.....	23
6. DISCUSIÓN.....	25
7. CONCLUSIONES.....	27
8. ASPECTOS ÉTICOS	28
9. BIBLIOGRAFÍA.....	29

ABREVIATURAS

aPKCs	Proteínas quinasa C atípicas.
BrdU	Bromodesoxiuridina.
BSA	Albúmina sérica bovina.
cPKCs	Proteínas quinasa C clásicas.
CPN	Células progenitoras neurales.
DAG	Diacilglicerol.
DCX	Doblecortina.
DG	Giro dentado del hipocampo.
HCL	Ácido clorhídrico
NPC	Precusores neurales.
nPKCs	Proteínas quinasa C noveles.
NSC	Célula madre neural.
PBS	Tampón fosfato salino.
PKC	Proteína quinasa C.
PMA	13-O-acetil-12-O-miristilforbol.
SNC	Sistema nervioso central.
SVZ	Zona subventricular.

NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO DE RATONES ADULTOS TRATADOS CON PROSTRATINA MEDIANTE ADMINISTRACIÓN INTRANASAL

RESUMEN

Introducción. Las lesiones cerebrales de cualquier etiología incluyendo las lesiones traumáticas o los accidentes cerebrovasculares o las causadas por enfermedades neurodegenerativas tienen una gran prevalencia y relevancia social, además a pesar de que mediante rehabilitación se puede conseguir en algunos casos que estructuras alternativas retomen las funciones de las neuronas dañadas, no existe actualmente un tratamiento curativo eficaz que permita reemplazar las neuronas dañadas. Recientes estudios han descubierto que existe reposición neuronal a partir de células madre neurales (NSC) en el sistema nervioso central (SNC) adulto, en dos regiones principales: el giro dentado del hipocampo (DG) y la zona subventricular (SVZ) esto ha supuesto un nuevo enfoque en el desarrollo de terapias para este tipo de lesiones cerebrales. Ante una lesión cerebral de cualquier etiología, se disparan mecanismos para regular la homeostasis y aparecen cerca de la lesión células con características de precursores neurales multipotentes (NPC) con alta capacidad proliferativa, que se han generado a partir de NSC, y que pueden generar nuevas neuronas. Estas células migran desde regiones neurogénicas o provienen de células madre que se activan en el perímetro de la lesión. La neurogénesis está regulada por señales intercelulares presentes en la región neurogénica que por un lado promueven la proliferación de los NPC y por otro su diferenciación a neuronas. Estas señales activan vías de transducción de señales intracelulares que desatan respuestas neurogénicas. A lo largo de estas vías de señalización intracelular podemos encontrar proteínas clave como son las quinasas de la familia de las proteínas quinasas de tipo C (PKC). Estas proteínas son intermediarios en las vías de transducción de señales y se conoce que su activación mediante la administración intracerebroventricular de diterpenos promueve la neurogénesis en la SVZ y DG. Sin embargo, el uso de este tipo de sustancias no sería aplicable en la clínica si no se encuentran métodos no invasivos de administración que permitan atravesar la barrera hematoencefálica. La administración intranasal de estos compuestos puede constituir una alternativa terapéutica.

Hipótesis. La administración intranasal de prostratina promueve la neurogénesis en la zona subventricular de ratones adultos.

Objetivo. Analizar *in vivo* el efecto de la administración intranasal de prostratina sobre la neurogénesis en el cerebro adulto de ratones.

Materiales y métodos. Realizaremos un estudio experimental, para ello se tomaran dos grupos de ratones CD1 adultos a los que se les administrará de manera intranasal prostatina, el primer grupo durante 3 días y el segundo grupo durante 7 días. Posteriormente se estudiará si existe un aumento significativo del número de neuroblastos y de neuronas maduras.

PALABRAS CLAVE

Neurogénesis, intranasal, neuroregeneración, neurona, nicho neurogénico, prostatina.

ABSTRACT

Introduction. Acute or chronic injuries may cause damage in the adult brain producing neuronal death and irreversible cognitive deficits or sensory-motor alteration. No effective treatment is currently available to eliminate or ameliorate neuronal loss, however, new therapeutic strategies are emerging most of them aimed to enhance endogenous repair mechanisms that promote the generation of new neurons from neural stem cells (NSC). Neuronal replacement in injured brain tissue is limited since signaling molecules released by the injured tissue activate pathways that promote gliogenesis at the expense of neurogenesis. Protein kinase C (PKC) is a family of intracellular kinases that participate in multiple signaling pathways and are involved in neurogenesis. Previous results show that activation of proteins of this family of kinases such as PKC β and PKC α with 12-deoxyphorbols such as prostratin stimulates neural progenitor cells (NPC) proliferation leading to the generation of neuroblasts and neurons.

Hypothesis. Intranasal administration of prostratin promotes neurogenesis in the subventricular zone and the dentate gyrus of the hippocampus of adult mice.

Objective. To analyze in vivo the effect of intranasal administration of prostratin on neurogenesis in the adult brain of mice studying proliferating cells, neuroblasts, glial progenitors and mature neurons and glial cells.

Materials and methods. We will perform an experimental study, in which two groups of adult CD1 mice will be intranasally administered the PKC activators prostratin, the first group for 3 days and the second group for 7 days. Later, it will be studied if there is a significant increase in the number of neuroblasts and mature neurons.

KEYWORDS

Neurogenesis, intranasal, neuroregeneration, neuron, neurogenic niche, prostratin.

1. INTRODUCCIÓN

Muchas enfermedades del sistema nervioso central, entre ellas algunas de las de mayor prevalencia, son de tipo neurodegenerativo, es decir se producen como consecuencia de la muerte neuronal. Entre ellas, las más frecuentes son la enfermedad de Alzheimer, con pérdida neuronal en el hipocampo y corteza cerebral fundamentalmente, la enfermedad de Parkinson, con muerte selectiva de neuronas en la sustancia negra, o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), con déficit de neuronas en la médula espinal. En otras entidades nosológicas de alta frecuencia, como los accidentes vasculares cerebrales, también se produce una destrucción neuronal, tanto durante el periodo de isquemia como durante el inicio de la reperfusión. Por último, la pérdida neuronal también ocurre en traumatizados, tanto en el cerebro como en la médula espinal.

Ninguna de las alteraciones del sistema nervioso central que cursan con pérdida de neuronas tiene tratamiento eficaz actualmente, siendo la búsqueda de opciones terapéuticas uno de los campos de investigación más activos en la biomedicina. En este sentido, el descubrimiento del papel de las células madre tanto en la generación inicial como en la regeneración de diversos tejidos ha abierto un nuevo enfoque en las perspectivas terapéuticas para estas enfermedades.

1.1. Neurogénesis

Se denomina neurogénesis al proceso de formación de nuevas neuronas a partir de células madre y progenitores neurales. Este fenómeno tiene lugar principalmente durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, pero además ocurre de forma fisiológica en el cerebro adulto como mecanismo para reemplazar neuronas y mantener la homeostasis.

En mamíferos adultos, la neurogénesis ocurre en condiciones fisiológicas en dos regiones neurogénicas principales: el giro dentado del hipocampo (DG) y la zona subventricular (SVZ) (3,4) y actualmente se ha postulado la existencia de neurogénesis en el cuerpo estriado de humanos y roedores (5-7). Ante una lesión cerebral de prácticamente cualquier etiología, se disparan mecanismos para regular la

homeostasis y aparecen en las inmediaciones de la lesión células con características de precursores neurales multipotentes (NPC) con alta capacidad proliferativa, que se han diferenciado a partir de NSC, y que pueden generar neuronas en respuesta a la lesión. La capacidad regenerativa del SNC es muy limitada y la reposición neuronal es muy baja (8-13).

1.2. Células madres neurales

Las NSC son multipotentes, por lo que pueden dar lugar a células de todos los fenotipos neurales: neuronas y células de la glía a través de la producción de precursores neurales (neuroblastos) y gliales (glioblastos). El destino de una célula madre hacia la neurogénesis para la formación de nuevas neuronas, o la gliogénesis para la generación de células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) depende de las señales presentes en el entorno.

Las NSC células poseen capacidad autorregenerativa; una vez activadas por señales presentes en el entorno pueden llevar a cabo divisiones asimétricas, produciendo una copia de sí mismas, generando además un precursor indiferenciado con alta capacidad proliferativa a partir del cual, también mediante divisiones asimétricas se producirán seguidamente precursores unipotenciales comprometidos con una de las dos estirpes neurales: neuronal o glial (Fig. 1) (14).

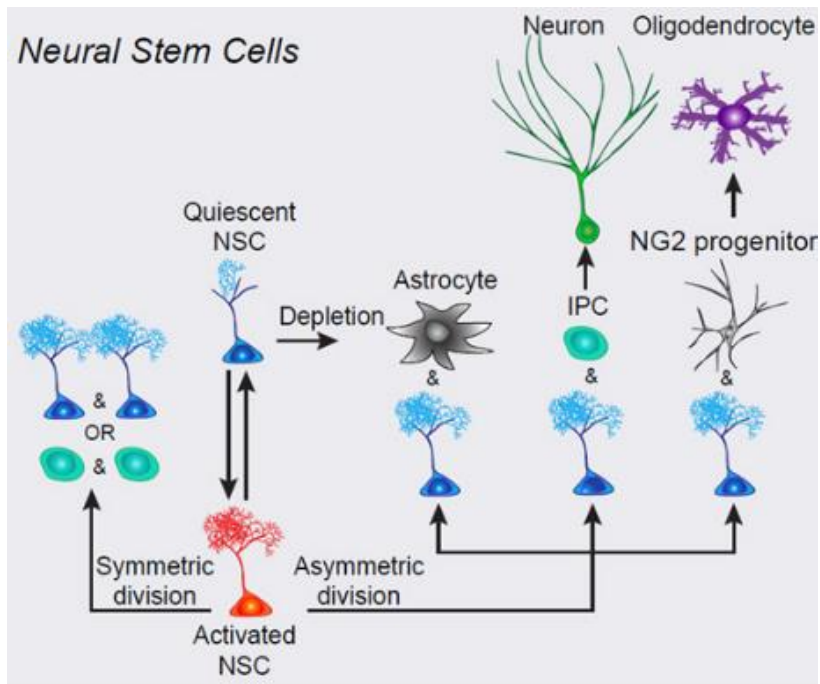


Figura 1: esquema de la células madre neurales y su diferenciación. Las células madre neurales son células multipotentes con capacidad de autorregenerarse y generar progenitores celulares, que según las circunstancias, generarán precursores comprometidos con una estirpe neural, ya sea glial o neuronal. Este precursor dará origen a la célula madura. Tomada y modificada de (Bond A.M, Gou-li M, Hongjun S. 2015) (15).

1.3. Neurogénesis en el cerebro adulto en condiciones fisiológicas

La sustitución neuronal en el SNC se lleva a cabo mediante las NSC. Éstas son células multipotentes que pueden diferenciarse a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Durante el desarrollo embrionario, la totalidad del tejido nervioso se genera a partir de NSC; en el cerebro adulto, poblaciones remanentes muy localizadas de NSC continúan produciendo nuevas neuronas a lo largo de toda la vida del individuo. Estas zonas donde se continúa la producción de neuronas son las llamadas regiones neurogénicas, principalmente dos, el DG y la SVZ. En estas regiones, las NSC se dividen asimétricamente con una baja frecuencia y generan NPC indiferenciados, altamente proliferativos, que posteriormente pueden formar precursores ya comprometidos con la estirpe neuronal, llamados neuroblastos, cuya diferenciación final da lugar a neuronas maduras (16,17).

Además, los NPC pueden generar precursores comprometidos con la estirpe glial, que se diferenciarán a astrocitos u oligodendrocitos. Dichos procesos se conocen con el nombre de neurogénesis y gliogénesis, respectivamente. Para que exista neurogénesis

son fundamentales dos requisitos: i) deben existir NSC capaces de formar neuroblastos (4,18 y ii) estas células tienen que estar situadas en un entorno adecuado, que propicie la diferenciación hacia la estirpe neuronal. Al conjunto de factores que determinan este entorno se le denomina nicho neurogénico (19).

1.4. Otros nichos neurogénicos

Según varios estudios (20-22) cabe la posibilidad de que exista una población de precursores neurales con capacidad neurogénica en otros nichos diferentes. Recientemente se han descrito otras zonas neurogénicas como es el neocórtex (5), la amígdala (23), el estriado (24) y la sustancia negra (25). Sin embargo, en estas zonas la neurogénesis está inducida en la mayoría de los casos por factores no fisiológicos (lesiones, estrés o enfermedades neurodegenerativas).

1.5. Reposición neuronal a partir de células madre en lesiones cerebrales

Hay distintos tipos de lesiones cerebrales que se utilizan en el estudio de los mecanismos asociados a estas. Entre ellas destacan: lesiones traumáticas del cerebro, lesiones isquémicas ya sean difusas o focales, lesiones excitotóxicas y neurodegenerativas.

Como respuesta a este tipo de lesiones en el SNC se ha observado un aumento de la proliferación de los precursores neurales en la SVZ (29), provocando la formación de nuevos neuroblastos que pueden migrar dirigiéndose a la lesión. Por otro lado, en lesiones del SNC, a pesar de que existen las células madres neurales que se activan rápidamente y proliferan, éstas no forman neuronas sino células de glía contribuyendo a la formación de una cicatriz glial que rodea el área lesionada (30). En la cicatriz glial se pueden encontrar varios tipos celulares como: astrocitos, microglía, progenitores de oligodendrocitos y fibroblastos (31,32). La función de la misma es frenar el daño y que no se prolifere por el SNC.

Las células que la forman, componen una compleja matriz extracelular que impide la migración de nuevas neuronas y que estas formen axones (30,33,34). También se observa que la proliferación de células gliales aumenta considerablemente (35).

Se considera que las lesiones constituyen un nicho gliogénico y no neurogénico. Si modificásemos este nicho mediante la activación de genes que favorezcan la diferenciación a neuronas en vez de glía, se podría reparar el tejido dañado y por lo tanto emplearse como una futura terapia.

Actualmente los esfuerzos para poder facilitar la reposición de neuronas en una lesión cerebral se concentran en cuatro aspectos fundamentales:

1. Potenciar la proliferación de precursores neurales (7).
2. Redirigir el destino de estos progenitores a neuronas,
3. Transformar células de glía en NSC mediante la inducción de la expresión factores como NeuroD1 (36) o SOX2 (37,38)
4. Favorecer unas condiciones que aumenten la neurogénesis en regiones neurogénicas como la SVZ.

Referente al último aspecto, se ha comprobado en modelos animales que tras provocar una isquemia por bloqueo en la arteria cerebral media se estimula la neurogénesis en la SVZ y puede observarse una migración notable de neuroblastos hacia la corteza y el estriado, sin embargo, son muy pocos los que sobreviven y maduran dando lugar a neuronas. (8,13,39).

En definitiva, la reposición de las neuronas en una zona lesionada del SNC requiere modificar el microambiente de dicha región para asemejar a un nicho neurogénico donde tanto las NSC endógenas como las trasplantadas pudieran diferenciarse a neuronas maduras y funcionales.

Para ello, es necesario aclarar qué moléculas favorecen o impiden la neurogénesis.

Varios grupos, incluyendo nuestro grupo de investigación, han descrito numerosos factores de crecimiento y señales extracelulares en los nichos neurogénicos fisiológicos que permiten o contribuyen a la continua síntesis de nuevas neuronas (11,19,40).

En cambio, dichos factores a su vez actúan sobre rutas de señalización intracelulares que no están claramente descritas, pero sobre las que podría resultar más eficaz actuar a la hora de favorecer la neurogénesis. Entre las posibles nuevas dianas intracelulares sobre las que interferir para promover la neurogénesis están las kinasas de la familia de las PKC.

1.6. Proteínas quinasa C (PKC)

La familia de las PKC engloba unas diez serin-treonin quinastas muy similares entre sí. Según su estructura y mecanismos de activación, se clasifican en 3 grupos:

1. PKCs clásicas (cPKCs): engloban a la PKC α , β (β I y β II) y γ . Pueden activarse con diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina y ésteres de forbol. Poseen un sitio de unión a calcio en su segunda región constante, C2.
2. PKCs noveles (nPKCs): engloban a la PKC δ , ϵ , η y θ . No tienen C2 pero se activan con DAG, fosfatidilserina y ésteres de forbol.
3. PKCs atípicas (aPKCs): engloban a la PKC λ/ι y ζ . Carecen de la región C2 y se activan con fosfatidilserina (14).

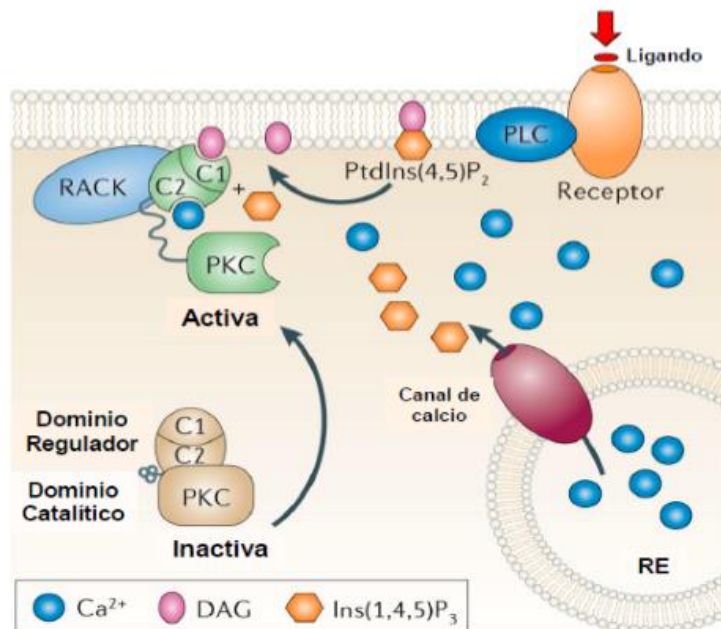


Figura 2. Mecanismo de activación de proteínas quinasa C (PKCs).

Los receptores de membrana asociados a fosfolipasa C (PLC) son capaces de hidrolizar lípidos de membrana produciendo diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (Ins P₃) (1,4,5). El inositol trifosfato induce la liberación de calcio (Ca²⁺) de reservorios intracelulares. En presencia de altas concentraciones de DAG y calcio, las PKCs son translocadas a la membrana plasmática y sufren una serie de cambios conformacionales que las activan. Una vez activas las PKCs tienen la capacidad de regular la progresión del ciclo celular. Tomado y modificado de (Mochly-Rosen, Das et al. 2012) (41).

1.7. PKC, neurogénesis y diterpenos

Nuestro equipo de investigación ha demostrado que la activación de PKC tanto por PMA como por prostratina, un diterpeno activador de PKC no tumorigénico, fomenta la proliferación de los NPC *in vitro*. Incluso han identificado seis diterpenos con estructura de 12-desoxiforbol cuyo efecto sobre la proliferación de los NPC *in vitro* es mayor que el de prostratina y requiere de menores concentraciones (42).

En nuestro laboratorio hemos comprobado que *in vitro* uno de estos compuestos promueve la proliferación de los NPC y que el tratamiento de ratones *in vivo* mediante administración intracerebroventricular promueve la proliferación y la formación de neuroblastos tanto en la SVZ como en el DG de ratones adultos. Sin embargo, la administración intracerebroventricular de este compuesto es extremadamente invasiva y por este motivo, en este trabajo trataremos de comprobar si tienen algún efecto *in vivo* tras su administración intranasal.

2. HIPÓTESIS

La administración intranasal de prostratina promueve la neurogénesis en la zona subventricular de ratones adultos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Analizar *in vivo* el efecto de la administración intranasal de prostratina sobre la neurogénesis en el cerebro adulto de ratones.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Análisis del número de células proliferantes, precursores indiferenciados, células de la glía y neuroblastos, en la zona subventricular de ratones control o tratados con prostratina tras 3 días post-tratamiento

3.2.2. Análisis del número de células proliferantes, precursores indiferenciados, células de la glía y neuroblastos, en la zona subventricular de ratones control o tratados con prostratina tras 7 días post-tratamiento.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio

Estudio experimental basado en el efecto de la administración intranasal de prostratina en una población de ratones adultos.

4.2. Animales de experimentación

Se ha empleado ratones de la cepa CD1 adultos. Su cuidado y manipulación se realizó de acuerdo con la reglamentación actual recogida en el artículo 20.2 del Decreto 65/2012 del 13 de marzo y el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, para el uso y protección de animales de laboratorio. Los animales se colocaron en jaulas con pienso y agua *ad libitum* con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La temperatura se mantendrá a $21 \pm 1^{\circ}$ C.

4.3. Tamaño muestral y procedimiento de muestreo

Grupo 1:

Se les administró de manera intranasal prostratina a ratones adultos durante 3 días.

- 5 ratones control tratados con vehículo.
- 5 ratones tratados con prostratina.

Grupo 2:

Se les administró de manera intranasal prostratina a ratones adultos durante 7 días.

- 5 ratones control tratados con vehículo.
- 5 ratones tratados con prostratina.

Los animales del Grupo 1 recibieron al día una inyección intraperitoneal de bromodesoxiuridina (BrdU, 70 mg/kg), análogo de la timidina que se incorporó a las células proliferantes. Mientras que los animales del Grupo 2 recibieron una inyección de BrdU en días alternos. Por último todos los animales se sacrificaron 3 horas tras la inyección del último día.

4.4. Preparación de las muestras

Para una buena utilización de los tejidos, los animales se perfundieron y se postfijaron con paraformaldehído al 4%. Posteriormente se crioprotegieron con sacarosa al 30% y se cortaron en un criostato a 30 μm de grosor. Se conservaron a -20°C en PBS-Glicerol (1:1).

4.5. Inmunohistoquímica

Se seleccionaron los cortes que presentaron los nichos neurogénicos, (zona subventricular y el giro dentado del hipocampo). Primero se lavó con PBS 3 veces durante 5 minutos en agitación suave. A continuación, se trataron con HCL 2N durante 30 minutos a 37°C . Se neutralizó el ácido con tampón borato, 2 lavados de 5 minutos. Posteriormente se pasaron a PBS. Se bloquearon con PBS+ 0.2% Triton X-100+ 2.5% de

albúmina sérica bovina (BSA) durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios (ver tabla) específicos durante toda la noche en agitación a 4°C.

Anticuerpo Primario	Origen	Características del Antígeno	Dilución	Casa comercial
Anti-BrdU (Bromodeoxiuridina)	Ratón Monoclonal	BrdU, identifica núcleos proliferantes	1:100	Dako (Glostrup, Denmark)
Anti-DCX (Neural Migration Protein Doublecortin)	Cabra Policlonal	DCX, marcador de precursores neurales	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Los cortes se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavaron 3 veces con PBS. Se montaron los cortes sobre portaobjetos con fluoro-Gel® (Electron Microscopy Science).

Anticuerpo secundario	Origen	Fluoróforo	Dilución	Casa comercial
Anti-IgG de ratón	Burro	Alexa Fluor 488, verde	1:1000	Invitrogen
Anti-IgG de cabra	Burro	Alexa Fluor 594, rojo	1:1000	Invitrogen

4.6. Criterios de inclusión y exclusión

- Criterios de inclusión: los ratones tienen que ser machos y de la cepa CD1. Deben tener al menos 2 meses de vida.
- Criterios de exclusión: ratones hembra o algún ratón que sufra alguna lesión o daño durante el tratamiento será descartado del estudio.

4.7. Variables (dependientes e independientes)

Las variables que cuantificamos son el número de células positivas para los anticuerpos empleados en inmunohistoquímica.

- Cuantificación del número de células BrdU+ en los nichos neurogénicos (SVZ y DG) tanto en los animales control como en los tratados.
- Cuantificación del número de células Dcx+ en los nichos neurogénicos (SVZ y DG) tanto en los animales control como en los tratados.
- Cuantificación del número de células BrdU+/Dcx+ en nichos neurogénicos (SVZ y DG) tanto en los animales control como en los tratados.

De este modo hay seis variables dependientes:

- Número de células BrdU+
- Número de células Dcx+
- Número de células BrdU+/Dcx+

Cada una de estas variables se ha estudiado en función de las siguientes variables independientes:

1. Presencia o ausencia de tratamiento
2. Tiempo de tratamiento

4.8. Recogida de datos y fuentes de información

Tras la inmunohistoquímica, las secciones cerebrales se llevaron a un microscopio de epifluorescencia (BX60, Olympus, Center Valley, PA, EE.UU.). Con el cual se obtuvieron fotografías de los nichos neurogénicos, para su posterior cuantificación con el programa ImageJ.

4.9. Análisis de datos, instrumentos e intervenciones

Los datos obtenidos tras la cuantificación de las fotografías se han almacenado en una base de datos de Excel y analizados mediante el programa IBM SPSS Statistics 22.

Con los resultados obtenidos de cuantificar estas variables en los diferentes grupos y condiciones experimentales se ha llevado a cabo un análisis de varianza donde se

contrastó la diferencia de neurogénesis entre el ratón tratado y no tratado. El análisis se realizó mediante el programa estadístico SPSS. La comparación entre las dos variables se estableció mediante un test t-de Student. Previamente, se contrastó la normalidad de los grupos mediante un test de Kolmogorov-Smirnoff.

Valores menores a 0.05 se considerarán estadísticamente significativos.

4.10. Dificultades y limitaciones del estudio

La limitación principal de este estudio es el escaso número de animales que se pretende utilizar. Este número está calculado en función de trabajos anteriores en los que se han realizado análisis similares y está aprobado por el Comité Ético de experimentación animal. La escasa variabilidad entre este tipo de muestras permite obtener normalidad con un número pequeño de animales. No obstante, sabemos que es una de las limitaciones de este tipo de estudios y trabajamos con el objetivo de cumplir con las denominadas “3 erres” de la experimentación animal (43,44):

- Reducir el número de animales.
- Reemplazar métodos que supongan el uso de animales por otros sin animales siempre que el resultado sea igual.
- Refinar los métodos para aliviar y evitar el sufrimiento de los animales de experimentación.

Además se ha atendido en todo momento a las guías de experimentación animal y de experimentación en farmacología previamente publicadas y donde se determina mediante análisis el número mínimo de animales y experimentos necesarios para realizar experimentos farmacológicos con animales (45,46).

5. RESULTADOS

La prostratina ha demostrado estimular la proliferación de los NPC en diversos estudios anteriores (42) La vía intranasal además de ser un método sencillo de administración de medicamentos, evitamos determinados procesos fisiológicos y metabólicos que interfieren de manera directa en la asimilación de los medicamentos por el organismo, como la barrera hematoencefálica, digestión gástrica, metabolismo hepático, etc. Con el fin de estudiar el efecto de la administración intranasal de prostratina sobre la neurogénesis en el cerebro de ratones adultos, se crearon dos grupos que se trataron con prostratina 5 μ M durante 3 días y otro grupo durante 7 días. Para determinar si existen precursores neurales proliferantes en la zona subventricular, se inyectaron BrdU en ambos grupos de ratones durante todos los días, excepto en el grupo de 7 días que se administró en días alternos. 3 horas después de la última inyección los animales fueron sacrificados.

El BrdU es un nucleótido similar a la deoxitimidina que se incorpora al DNA de las células que están en proceso de replicación de su material genético (fase S del ciclo celular) para dividirse. Así, las células en división pueden ser detectadas mediante anticuerpos específicos.

5.1 Efecto de la administración intranasal de prostratina durante 3 días sobre la proliferación de los precursores neurales en la SVZ

La inmunodetección de BrdU muestra la existencia de núcleos BrdU+ en la zona subventricular, indicando así la presencia de células que se están dividiendo activamente en las horas previas al sacrificio del animal. Al analizar los cortes cerebrales al microscopio para determinar el efecto que tiene el tratamiento con prostratina 5 μ M intranasal sobre la zona SVZ, pudimos observar que, en los animales tratados con el compuesto durante 3 días, el número de células proliferantes BrdU+ era cuantitativamente superior en los animales tratados con prostratina que en los que se les administró vehículo, pero dichos valores no son estadísticamente significativos. Podemos observar, por tanto la existencia de una tendencia a proliferar en los ratones tratados con prostratina, que no resulta estadísticamente significativa.

La detección de DCX nos permite identificar neuroblastos (células DCX+) en la zona subventricular. Al visualizar los cortes cerebrales al microscopio observamos que al comparar los animales tratados con el fármaco durante 3 días con los animales del grupo control no existen diferencias significativas en cuanto al área marcada con DCX respecto al área total de la SVZ.

Finalmente, se contabilizaron las células doblemente marcadas. En este caso se efectuó una mezcla de los canales de fluorescencia rojo y verde para determinar las células marcadas tanto con DCX como con BrdU respectivamente. Una célula doble marcada es aquella que se identifica como BrdU+ y que, a su vez, coincide en el área marcada con la proteína DCX. Esto nos indica qué cantidad de células en división son verdaderamente neuroblastos. En nuestro caso, no existen diferencias entre el grupo tratado con prostratina durante 3 días y el grupo control tratado con vehículo.

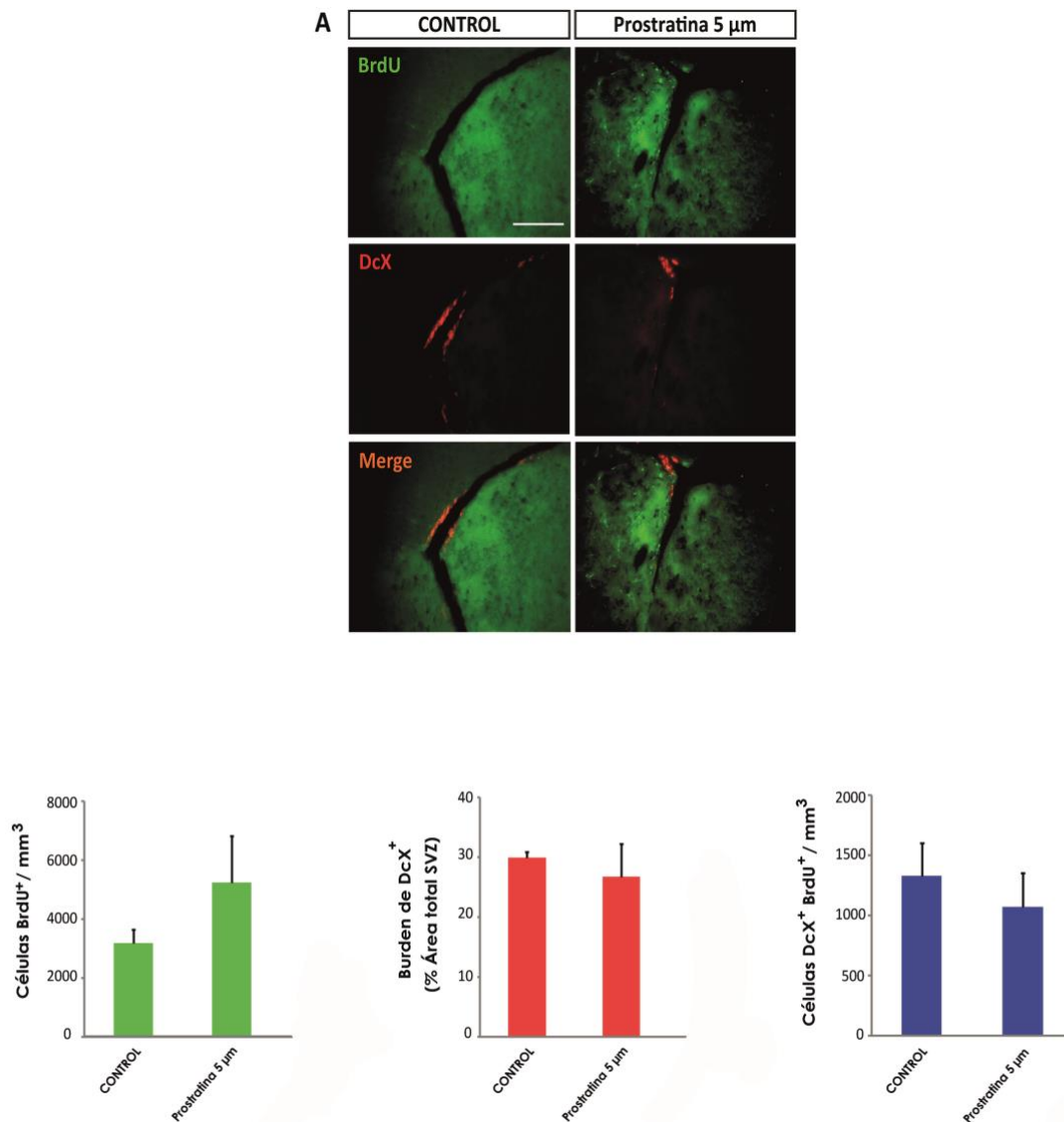


Figura 3. Efecto de la prostratina administrada intranasalmente sobre la zona ventricular de ratones adultos tratados durante 3 días. (A) Las microfotografías muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de secciones coronales de la corteza cerebral de ratón adulto tras la administración intranasal de prostratina 5 μ M durante 3 días de tratamiento, procesadas para la detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación BrdU y el marcador de neuroblastos doblecortina (DCX). **(B)** El gráfico representa el número de células positivas para el marcador de proliferación BrdU por mm³ en SVZ. **(C)** El gráfico muestra el número de neuroblastos positivos para el marcador DCX, por mm³ en SVZ. Cada barra representa la media \pm error estándar de al menos 4 animales por condición.

5.2 Efecto de la administración intranasal de prostratina durante 7 días sobre la proliferación de los precursores neurales en la SVZ

La existencia de BrdU muestra la presencia de núcleos BrdU+ en la zona subventricular, en este grupo los ratones han sido tratados con prostratina 5 μ M de mediante administración intranasal durante 7 días. Podemos decir que no hay un incremento del número de células proliferantes, entre el grupo control tratado con vehículo y el grupo de administración del compuesto.

La DCX nos marca los neuroblastos (DCX+). Observando los cortes cerebrales al microscopio vemos que tanto en los animales tratados con el fármaco durante 7 días como en los del grupo control no hay diferencias significativas.

Al finalizar el conteo de las células doblemente marcadas (tanto con DCX como con BrdU respectivamente), pudimos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con prostratina durante 7 días y el grupo control tratado con vehículo.

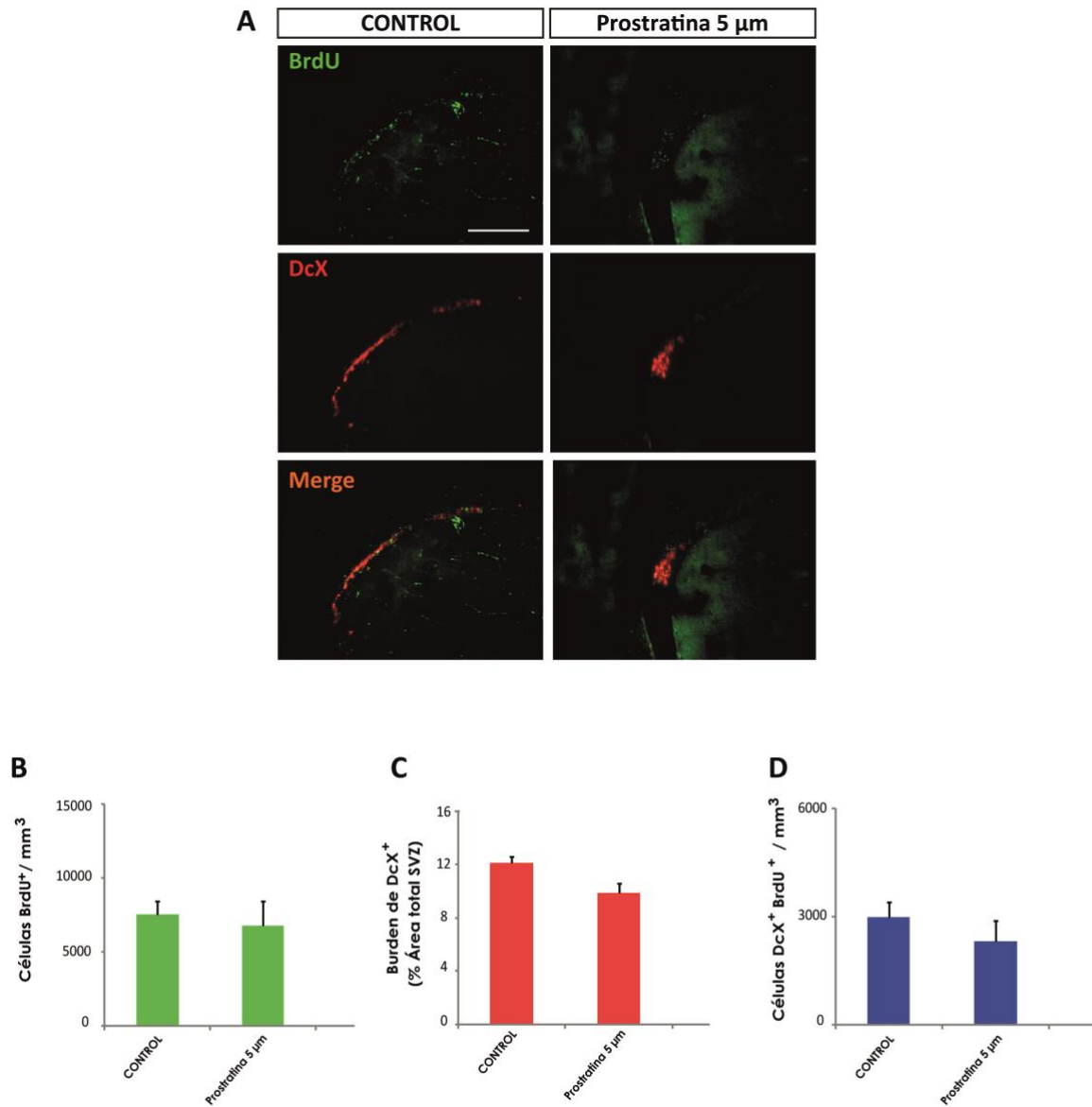


Figura 4. Efecto de la prostratina administrada intranasalmente sobre la zona ventricular de ratones adultos tratados durante 7 días. (A) Las microfotografías muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de secciones coronales de la corteza cerebral de ratón adulto tras la administración intranasal de prostratina 5 μM durante 7 días de tratamiento, procesadas para la detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación BrdU y el marcador de neuroblastos doblecortina (DCX). (B) El gráfico representa el número de células positivas para el marcador de proliferación BrdU por mm³ en SVZ. (C) El gráfico muestra el número de neuroblastos positivos para el marcador DCX, por mm³ en SVZ. Cada barra representa la media \pm error estándar de al menos 4 animales por condición.

6. DISCUSIÓN

Existe un número elevado de enfermedades del SNC que cursan con una pérdida neuronal. Lamentablemente, ninguna de estas alteraciones tiene un tratamiento eficaz, a pesar de que se están investigando múltiples estrategias para abordar e intentar paliar el deterioro producido en las regiones dañadas, tratando de estimular y favorecer la neurogénesis. En el cerebro adulto, solamente existen dos regiones con capacidad neurogénica, la SVZ y el DG; sin embargo, diversos estudios han demostrado que hay reposición neuronal en zonas lesionadas, aunque es muy limitada (3).

Una de las estrategias para tratar de recuperar el tejido lesionado, es aumentar la neurogénesis empleando compuestos, cuya finalidad es modular la actividad de las PKC y así aumentar la proliferación de los NPC para posteriormente decantar su diferenciación hacia la vía neuronal.

Anteriormente en nuestro laboratorio, se demostró que la prostratina, un diterpeno activador de PKC no tumorigénico, promueve la proliferación de los NPC tanto *in vitro* como *in vivo* (42). Pero el inconveniente de la administración a los ratones se hacía mediante inyecciones intracerebroventriculares, un método muy invasivo por lo tanto inviable su aplicación en la clínica. Por ello decidimos probar una vía de administración mucho menos invasiva y que tenga una futura aplicabilidad en la clínica, como lo es la administración intranasal. Este tipo de administración cuenta con la gran ventaja de no ser invasiva, y también la ventaja de la barrera hematoencefálica en el bulbo olfatorio es mucho más fina, por lo que nos permitiría administrar compuestos que no son capaces de atravesar dicha barrera cuando son inyectados en sangre.

Si comparamos los resultados obtenidos tras la administración intranasal de prostratina con los resultados obtenidos anteriormente por nuestro laboratorio de la administración intracerebroventricular de prostratina, observamos que el efecto proliferativo que esta ejerce al ser administrada por vía intranasal es mucho menor que en la administración intracerebroventricular. Esto puede deberse a que la administración intranasal es mucho más indirecta, ya que la prostratina tiene que llegar desde el bulbo olfatorio hasta la SVZ, mientras que en la inyección intracerebroventricular se deja la prostratina directamente en la SVZ (42,47).

Alternativamente, podríamos pensar que la falta de efecto pueda deberse a que este compuesto no está llegando al cerebro a través de esta vía. En relación con esto, no creemos que éste sea el problema, pues compuesto de estructura similar (como el 12-desoxiforbol ER272) se han administrado por vía intranasal en nuestro laboratorio a ratones adultos incrementando unas 3-4 veces la neurogénesis tanto a los tres como a los siete días (no se muestran pues pertenecen al trabajo de fin de grado del Alumno Jesús Rubio Úbeda). Estos resultados no son sorprendentes pues estudios previos demuestran que el efecto de la administración intracerebroventricular de 12-desoxiforboles no es idéntico para todos ellos y que el efecto de prostratina, el 12-desoxiforbol comercial es el menos efectivo de todos ellos (42). Por un lado, se requiere una dosis mayor de prostratina que de otros desoxiforboles para conseguir un aumento de la neurogénesis y por otro el aumento inducido con prostratina es mucho menor (42).

Podría pensarse que la dosis de prostratina no ha sido suficiente, sin embargo, se ha demostrado que dosis mayores llegan a ser tóxicas para las células madre y los progenitores neurales (42) y no es una opción su uso a tan alta concentración. Adicionalmente, un tratamiento de estas características a tan alta concentración no resultaría de utilidad pues sería económicamente muy costoso.

Es interesante observar que en ningún caso la prostratina ejerció un efecto diferenciador alterando la generación de neuroblastos, o la proliferación de los neuroblastos por lo que estos resultados corroboran los observados anteriormente por Geribaldi-Doldán y col (42) en los que la prostratina no modifica la capacidad neurogénica de los precursores neurales.

Por tanto, a pesar de que la prostratina se ha propuesto como tratamiento para otras patologías que requieren de la activación de PKC como es la reactivación del virus de sida (VIH) previa al tratamiento con fármacos antivirales, (48) podemos decir que, no es un buen compuesto para diseñar un tratamiento farmacológico que promueva la regeneración de lesiones cerebrales.

7. CONCLUSIONES

- La prostratina administrada mediante la vía intranasal parece no ejercer el mismo efecto proliferativo que el uso de la vía intracerebroventricular.

8. ASPECTOS ÉTICOS

La experimentación de este trabajo implica el uso de animales de experimentación. Los protocolos establecidos para el uso de animales de experimentación están recogidos en el Artículo 20.2 del Decreto 65/2012 de 13 de marzo por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales y Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Para la realización de este trabajo se ha diseñado una estrategia experimental acorde con la regulación recogida en el Real Decreto 53/2013 y se han tomado unas medidas básicas.

Los animales que se utilizaron son ratones CD1 criados para fines experimentales en el Servicio Central de Experimentación y Producción Animal (SEPA) de la Universidad de Cádiz por criadores acreditados.

Considerando la necesidad de la experimentación e investigación animal para el progreso científico, asumimos que no es motivo suficiente para justificar cualquier tipo de experimento. En este sentido, el número de animales empleados en cada grupo se ajustará para que la “n” final sea la más pequeña posible. Así mismo todos los procedimientos quirúrgicos se llevarán a cabo bajo un estricto seguimiento de “no dolor” que continuará en el postoperatorio. Únicamente no se actuará sobre el estrés causado por su individualización en la estabulación tras la administración. Se han realizado maniobras diarias de “handling” que reducirán o anularán el estrés por manipulación y administración de los tratamientos. Todos los procedimientos se llevarán a cabo en las instalaciones del SEPA.

La actuación sobre los animales la realizaron investigadores capacitados y acreditados conforme a la normativa vigente.

Al ser un trabajo encuadrado en el tipo II de los establecidos en el Real Decreto 53/2013, se ha obtenido previamente la aprobación al Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la UCA y de la Junta de Andalucía.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. *Neuron*. 2012; 76(5): 886-899.
2. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14(2): 128-142.
3. Gage FH, Ray J, Fisher LJ. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci*. 1995; 18: 159-192.
4. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. 1997; 17(13): 5046-5061.
5. Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol*. 2005; 168(3): 415-427.
6. Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. 2014; 156(5): 1072-1083.
7. Luzzati F, Nato G, Oboti L, Vigna E, Rolando C, Armentano M, et al. Quiescent neuronal progenitors are activated in the juvenile guinea pig lateral striatum and give rise to transient neurons. *Development*. 2014; 141(21): 4065-4075.
8. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 1997; 17(10): 3727-3738.

9. Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci*. 1998; 18(19): 7768-7778.
10. Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl AcadSci (USA)*. 2001; 98(8): 4710-4715.
11. Romero-Grimaldi C, Murillo-Carretero M, Lopez-Toledano MA, Carrasco M, Castro C, Estrada C. ADAM-17/tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme inhibits neurogenesis and promotes gliogenesis from neural stem cells. *Stem Cells*. 2011; 29(10): 1628-1639.
12. Saha B, Peron S, Murray K, Jaber M, Gaillard A. Cortical lesion stimulates adult subventricular zone neural progenitor cell proliferation and migration to the site of injury. *Stem Cell Res*. 2013; 11(3): 965-977.
13. Moraga A, Pradillo JM, Cuartero MI, Hernandez-Jimenez M, Oses M, Moro MA, et al. Toll-like receptor 4 modulates cell migration and cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia. *FASEB J*. 2014; 28(11): 4710-4718.
14. Domínguez García S. Regeneración neuronal en lesiones de la corteza cerebral mediante productos naturales [Trabajo fin de máster]. Cádiz: Universidad de Cádiz; 2015.
15. Bond AM, Gou-li M, Hongjun S. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*. 2015; 17(4): 385-395.
16. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*. 2002; 22(3): 629-63.
17. Goldman S. Glia as neural progenitor cells. *Trends Neurosci* 2003; 26(11): 590-596.

18. Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(5): 515-528.
19. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 2004; 41(5): 683-686.
20. Perez-Martin M, Cifuentes M, Grondona JM, Lopez-Avalos MD, Gomez-Pinedo U, Garcia-Verdugo JM, et al. IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. *Eur J Neurosci*. 2010; 31(9): 1533-1548.
21. Lee DA, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Miranda-Angulo A, et al. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci*. 2012; 15(5): 700-702.
22. Robins SC, Stewart I, McNay DE, Taylor V, Giachino G, Goetz M, et al. (2013). alpha-Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors." *Nat Commun*. 2013; 4: 2049.
23. Fowler CD, Liu Y, Ouimet C, Wang Z. The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole." *J Neurobiol*. 2002; 51(2): 115-128.
24. Bedard A, Gravel C, Parent A. Chemical characterization of newly generated neurons in the striatum of adult primates. *Exp Brain Res*. 2006; 170(4): 501-512.
25. Zhao M, Momba S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 2003; 100(13): 7925-7930.

26. Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol.* 1999; 46(6): 867-877.
27. Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1993; 90(5): 2074-2077.
28. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999; 97(6): 703-716.
29. Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, et al. In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 2000; 97(26): 14686-14691.
30. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999; 49(6): 377-391.
31. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1): 7-35.
32. Kawano HJ, Kimura-Kuroda Y, Komuta N, Yoshioka, Li HP, Kawamura K, et al. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 2012; 349(1): 169-180.
33. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5(2): 146-156.
34. Carulli D, Laabs T, Geller HM, Fawcett JW. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2005; 15(1): 116-120.

35. Liu L, Rudin M, Kozlova EN. Glial cell proliferation in the spinal cord after dorsal rhizotomy or sciatic nerve transection in the adult rat. *Exp Brain Res.* 2000; 131(1): 64-73.
36. Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y, Wang F, Chen G. In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell.* 2014; 14(2): 188-202.
37. Heinrich C, Bergami M, Gascon S, Lepier A, Vigano F, Dimou L, et al. Sox2-mediated conversion of NG2 glia into induced neurons in the injured adult cerebral cortex. *Stem Cell Reports.* 2014; 3(6): 1000-1014.
38. Niu W, Zang T, Smith DK, Vue TY, Zou Y, Bachoo R, et al. SOX2 Reprograms Resident Astrocytes into Neural Progenitors in the Adult Brain. *Stem Cell Reports.* 2015; 4(5): 780-794.
39. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.* 2002; 8(9): 963-970.
40. Lee C, Hu J, Ralls S, Kitamura T, Loh YP, Yang Y, et al. The molecular profiles of neural stem cell niche in the adult subventricular zone. *PLoS One.* 2012; 7(11): e50501.
41. Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. Protein kinase C, an elusive therapeutic target?. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11(12): 937-957.
42. Geribaldi-Doldán N, Flores-Giubi E, Murillo-Carretero M, García-Bernal FJ, Macías-Sánchez AJ, Carrasco M, et al. 12-Deoxyphorbols promote adult neurogenesis by

- inducing neural progenitor cell proliferation via PKC activation. *Int J Neuropsychopharmacology*. 2015; 19(1): pyv085.
43. Ilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: Reporting *in vivo* experiments: The ARRIVE guidelines. *British Journal of Pharmacology*. 2010; 160: 1577–1579.
44. McGrath JC, McLachlan EM, Zeller R. Transparency in Research involving Animals: The Basel Declaration and new principles for reporting research in BJP manuscripts. *Br J Pharmacol*. 2015; 172: 2427–2432.
45. Curtis MJ, Abernethy DR. Advice on statistical analysis, and new journal guidance for experimental design and analysis. *Pharmacol Res Perspect*. 2015; 3(1): e00095.
46. Curtis MJ, Bond RA, Spina D, Ahluwalia A, Alexander SP, Giembycz MA, et al. Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br J Pharmacol*. 2015; 172(14): 3461-71
47. Murillo-Carretero M, Geribaldi-Doldán N, Flores-Giubi E, García-Bernal F, Navarro-Quiroz EA, Carrasco M, et al. ELAC (3,12-di-O-acetyl-8-O-tigloilingol), a plant-derived lathyrane diterpene, induces subventricular zone neural progenitor cell proliferation through PKC β activation. *Br J Pharmacol*. 2017; 174(14): 2373-2392.
48. Beans EJ, Fournogerakis D, Gauntlett C, Heumann LV, Kramer R, Marsden MD, et al. Highly potent, synthetically accessible prostratin analogs induce latent HIV expression *in vitro* and *ex vivo*. *Proc Natl Acad Sci*. 2013; 110(29): 11698-703.