Integración del trasplante de células envolventes de bulbo olfatorio al hipocampo de rata.

Blanca Lilia Nuño Merín¹, Ureña Guerrero Mónica Elisa¹, Gudiño Cabrera Graciela².

¹Lab. de Neurobiología Celular, ²Lab. de Desarrollo y Regeneración del Sistema Nervioso, Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México, 45110.

Correos electrónicos de los autores: <u>lilia_merin@yahoo.com.mx</u>, <u>murena@cucba.udg.mx</u>, <u>ggudinoc@cucba.udg.mx</u>

Introducción

Las células gliales del sistema nervioso (SN) juegan un papel fundamental, no sólo en el mantenimiento metabólico y funcional de las neuronas y sus conexiones sinápticas, sino también en la respuesta a lesiones o procesos patológicos que lo afectan. Así, células gliales como los astrocitos y la microglía pueden impedir la regeneración neural después de una lesión (Wanner et al., 2008). Sin embargo, también existen células gliales que favorecen el crecimiento neuronal, algunas confinadas al sistema nervioso central (SNC), como los pituicitos de la hipófisis (Gudiño y Nieto-Sampedro, 2000), los tanicitos del hipotálamo y las células intersticiales de la glándula pineal; y otras, confinadas al sistema nervioso periférico (SNP), como las células de Shcwann (Van der Zee et al., 2008). Las células envolventes del bulbo olfatorio (CEO), también poseen capacidades regenerativas, forman parte de la glía *limitans* del nervio olfatorio y poseen la capacidad de distribuirse tanto a lo largo del epitelio olfatorio en el SNP, como dentro del SNC, en las capas de fibras olfativas y glomerular (Gudiño y Nieto-Sampedro, 1996); comparten características fenotípicas con los astrocitos y las células de Schwann (Vincent et al., 2005); y dentro del nervio olfatorio, estimulan la diferenciación de precursores neurales hacia neuronas olfatorias, capacitándolas para reconectarse con el bulbo olfatorio en SNC, después de una lesión (Fiarles y Barnett, 2005).

En los últimos años, los trasplantes de CEO se han empleado como una alternativa en la reparación y regeneración de lesiones anisomórficas del SNC (con destrucción de la barrera hematoencefálica y de la *glia limitans*), fundamentalmente a nivel de la médula espinal, causadas por: disección, hemisección y contusión mecánica. Los resultados obtenidos demuestran neuroprotección, regeneración y recuperación funcional parcial de la zona afectada (Mackay-Sim, 2005, Plant et al., 2003; Verdu et al., 2003; López-Vales et al., 2006). Sin embargo, su eficiencia regenerativa ha sido poco evaluada en lesiones isomórficas (sin daño a la *glia limitans* y destrucción mínima de la barrera hematoencefálica).

La muerte y la degeneración neuronal son fenómenos centrales durante el envejecimiento y ocurren de manera prematura en numerosos padecimientos neuronales (Peinado, 2000). Entre estos los más frecuentes y graves son: el accidente vascular cerebral (isquemia-anoxia), el traumatismo craneoencefálico, el traumatismo raquimedular, la epilepsia y las enfermedades neurodegenerativas: como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington y la enfermedad de Alzheimer, entre otras. Uno de los mecanismos de muerte neuronal que se ha relacionado con estas enfermedades es excitotoxicidad, condición estimulada por la sobre activación de receptores a aminoácidos excitadores, como el glutamato (Glu) y el aspartato (Corona y Tapia, 2005). El Glu es el neurotransmisor excitador más abundante dentro del SNC de mamíferos y además de participar en los procesos excitotóxicos, es determinante en la potenciación de la eficiencia sináptica a largo plazo que se presenta en el hipocampo durante el aprendizaje y la memoria (Platt, 2007). El hipocampo constituye una de las regiones cerebrales más susceptibles a los efectos excitotóxicos del Glu, y sus alteraciones pueden afectar el proceso de codificación de la memoria explícita (Allen et al., 2003).

En este trabajo se verificó la integración del trasplante de CEO obtenidas de ratas adultas, al hipocampo de ratas jóvenes como parte de las evaluaciones preliminares de un estudio donde se pretende evaluar la capacidad regenerativa del trasplante de CEO en el daño hipocampal producido por un daño excitotóxico neonatal y la recuperación de las capacidades de aprendizaje y memoria después del trasplante.

Objetivo

Evaluar la integración del trasplante de células envolventes olfatorias dentro del hipocampo de ratas jóvenes, 30 y 60 días después del trasplante, para posteriormente valorar su capacidad regenerativa en un modelo de daño excitotóxico neonatal.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación. Para este trabajo se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Wistar (Rattus norvergicus), las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio (ciclos luz-oscuridad 12h:12h, temperatura ambiental $22\pm2^{\circ}$ C y humedad relativa del 50±10%) con libre acceso al agua y al alimento durante todo el proceso experimental, de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 y NOM-033-ZOO-1995, que establecen las condiciones de cuidado y de menor sufrimiento posible para animales de experimentación.

Preparación de cultivos primarios de bulbo olfatorio. Los cultivos se prepararon a partir del bulbo olfatorio de ratas adultas (60-80 días de edad) como se describe en Gudiño y Nieto-Sampedro (1996); brevemente, se extrajeron los bulbos olfatorios y se disecaron las capas de fibras nerviosas y glomerulares (CFNG), se incubaron con tripsina y mecánicamente, se disociaron las células, las cuales se sembraron en frascos de cultivo de plástico, tratados con poli-L-lisina, donde se cultivaron inicialmente en medio D/F-10S, incubándose a 37°C, en atmósfera de 5% CO², renovando el medio tres veces por semana.

Purificación inmunomagnética de CEO. Cuando los cultivos primarios de las CFNG alcanzaron la confluencia, se purificaron con ayuda de "Dynabeads": microesferas de material ferromagnético recubiertas con IgG de cabra anti-ratón (DB; Dynal M-450, Oslo, Noruega) y anticuerpo monoclonal 192 anti-NGFR (Gudiño y Nieto-Sampedro, 1996). Las células gliales purificadas se marcaron con el colorante PKH26-GL (colorante

vital fluorescente; Sigma-Aldrich) y se conservaron en medio D/F para trasplantarse ó en medio DF-10S para sembrarse de nuevo.

Trasplante de GE. Ratas de 30 días de edad se sometieron a una cirugía estereotáxica bajo anestesia con halotano, se fijaron al marco estereotáxico con la barra de incisivos en 3.5 mm, se realizó una incisión en el eje longitudinal de la cabeza, se retiró el periostio y se ubicó el punto Bregma de las cisuras craneales, a partir del cual se identificaron las coordenadas correspondientes a la región CA1 del hipocampo derecho: -2 mm posterior; -2.5 mm lateral; y -2.5 mm ventral a partir de la superficie pial, se realizó la trepanación y se inyectaron 60 mil CEO vivas, suspendidas en 5 μ l de medio D/F y marcadas con PKH26.

Perfusión intracardiaca. Sesenta días después del trasplante de CEO, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico y perfundieron intracardiacamente con solución salina heparinizada, seguida de paraformaldehido al 4% en solución tampón fosfato, 0.1 M, pH 7.3. Se extrajeron los cerebros y se posfijaron paraformaldehido al 4% por 3 h, posteriormente se transfirieron a una solución de sacarosa al 20% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.3 durante al menos 16 h.

Tinción Inmunofluorescente. Desde la eminencia media hasta el tallo cerebral, se obtuvieron cortes coronales de 30 µm de espesor en un micrótomo de vibración (Leica VT-10000M). Las secciones se colectaron en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.3, posteriormente se incubaron por 30 min a temperatura ambiente en una solución con 2 % de suero normal de cabra y 0.2% de Tritón X-100 en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.3. Después se incubaron con el anticuerpo primario biotinilado por 16 h a 4°C. Enseguida se lavaron en tres ocasiones con tampón fosfato 0.1 M, pH 7.3; y se incubaron con la alexa 488 por 36 h a 4°C. Después se lavaron nuevamente y se montaron con una mezcla de PBS/glicerol en proporción 1/1, para observarse en el microscopio de fluorescencia, se verificó la integración y migración de las CEO y se tomaron las fotografías correspondientes. Los anticuerpos primarios empleados estuvieron dirigidos contra la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y el receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75.

Resultados y Discusión

Se obtuvieron los cultivos primarios de células de las capas de fibras nerviosas y glomerulares (CFNG) del bulbo olfatorio (Figura 1).

Mediante purificación inmunomagnética se obtuvieron las células de glía envolvente p75 + (Figura 2).



Figura 1. Cultivo primário de bulbo olfatorio



Figura 2. Cultivo purificado de CEO p75 +

Una vez purificadas las células se marcaron con el colorante PKH26-GL (Figuras 3 y 4). Por último se lavaron una vez con medio D/F, se resuspendieron en medio B27 y se mantuvieron en hielo hasta el trasplante.



Figura 3. CEO en contraste de fases



Figura 4. CEO visualizadas a través del PKH26-GL

Ratas de 30 días de edad se montaron en el marco estereotáxico tal y como se hace para animales adultos (Figura 5) y se sometieron a la cirugía para trasplantarles las CEO en el hipocampo en 3 subgrupos:

- 1. transplante de 30 000 CEO (n=2),
- 2. transplante de 60 000 CEO (n=2)
- 3. controles intactos (n=2)



Figura 5. Rata adulta colocada en el marco estereotáxico.

Sesenta días después del trasplante los animales se sacrificaron por perfusión intracardiaca, se extrajeron los cerebros y se crioprotegieron en una solución de sacarosa al 20%.

Los cerebros se cortaron en un micrótomo de vibración (Leica VT-10000M) en secciones de 30 µm de espesor y se procesaron para su inmunodetección, lo que nos permitió observar la migración de las CEO a través del hipocampo hacia los ventrículos cerebrales en sentido antero-posterior (Figuras 6).



Contraste de fase

pkh26

p75



pkh26

GFAP



Figura 6. Fotografías del hipocampo de rata donde se muestra la integración de las CEO. (a) imágenes en contraste de fases donde se visualizan dynabites (esferas rojizas) empleadas para la purificación de células p75+; (b) imágenes que muestran la fluorescencia generada por PKH26-GL de las CEO trasplantadas; y (c) imágenes que muestran la fluorescencia de la alexa 488 asociada al marcaje anti-GFAP y anti-p75.

A través del análisis de las secciones obtenidas de los hipocampos trasplantados se confirmó el sitio del transplante y se decidió utilizar el trasplante en número de 60,000 CEO para evaluaciones futuras, ya que en esta cantidad, aún sesenta días después del trasplante, encontramos células viables integradas a la región de interés, lo que nos permitirá evaluar posteriormente su posible capacidad regenerativa. Los resultados obtenidos son fundamentales para la continuación de los estudios diseñados para evaluar la capacidad regenerativa del trasplante de CEO en el hipocampo después de un daño neonatal excitotóxico.

Conclusión

Las CEO obtenidas de ratas adultas y trasplantadas al hipocampo de ratas jóvenes se integran a la región, atravesándola y alcanzando los ventrículos cerebrales en sentido antero-posterior, permaneciendo viables aún sesenta días después del trasplante.

Agradecimientos

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (CONACyT) quien a través del Apoyo No. 48002 otorgado al Cuerpo Académico de Neurobiología UDG-414 y de la Beca No. 219744/206760 otorgado a Blanca Nuño ha propiciado la realización de este trabajo.

Bibliografía

- Allen, D. F., Berrios, G. E., Hodges, J. R. 2003. Trastornos de memoria en la práctica psiquiátrica. Psiquiatría Médica. Barcelona: *Masson*.
- Fiarles R. y Barnett, S. 2005. Olfactory ensheathing cells: their role in central nervous system repair. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37: 693-699.
- **Gudiño, C. G. y Nieto-Sampedro, M.** 1996. Ensheathing cells: Large scale purification from adult olfactory bulb, freeze- preservation and migration of transplanted cells in adult brain. *Research in Neurology and Neuroscience* 10: 25-34.
- Gudiño, C. G. y Nieto-Sampedro, M. 2000. Schwann-like macroglia in adult rat brain. *Glia* 30(1):49-63.
- Corona J. C. y Tapia R. 2005. Mecanismos de neurodegeneración. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXIX, pp 17-28.
- Lopez-Vales, R., Fores, J., Verdu, E., Navarro, X. 2006. Acute and delayed transplantation of olfactory ensheathing cells promote partial recovery after complete transection of the spinal cord. *Neurobiology Diseases* 21, 57–68.
- Mackay-Sim, A. 2005. Olfactory ensheathing cell and spinal cordon repair. *Keio Journal of Medicine* 54 (1): 8-14.
- Plant, G. W., Currier, P. F., Cuervo, E. P., Bates, M. L., Pressman, Y., Bunge, M. B., Wood, P. M. 2002. Purified adult ensheathing glia fail to myelinate axons under culture conditions that enable Schwann cells to form myelin. *Journal* of Neuroscience 22:6083–6091.
- **Platt, S. R.** 2007. The role of glutamate in central nervous system health and disease A review. *The Veterinary Journal* 173: 278-286.
- Van der Zee, C. E., Kreft, M., Beckers, G., Kuipers, A., Sonnenberg, A. 2008. Conditional deletion of the Itgb4 integrin gene in Schwann cells leads to delayed peripheral nerve regeneration. *Journal of Neuroscience* 28(44):11292-303.
- **Verdu, E., Garcia-Alias, G., Flores, J., Lopez-Vales, R., Navarro, X.** 2003. Olfactory ensheathing cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. *Glia* 42, 275–286.
- Vincent, A. J., West, A.K., Chuah, M. I. 2005. Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. *Journal of Neurocytology* 34:65-80.

Wanner, I. B., Deik, A., Torres, M., Rosendahl, A., Neary, J. T., Lemmon, V.P., Bixby, J.L. 2008. A new in vitro model of the glial scar inhibits axon growth. *Glia* 56(15):1691-709.