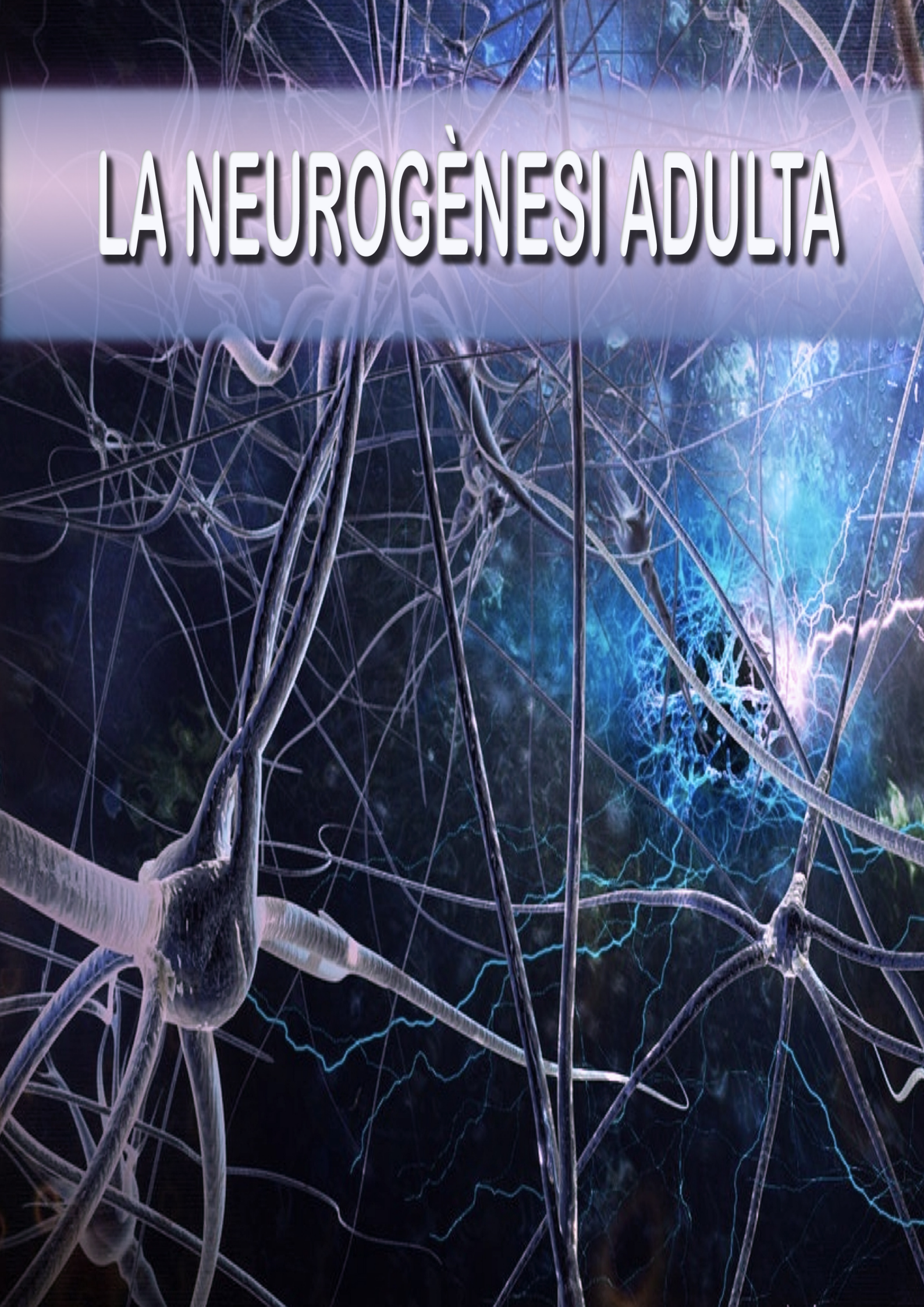


LA NEUROGENESI ADULTA



La neurogènesi adulta

Treball de recerca de batxillerat

Desembre 2014

ÍNDIX

1. Introducció.....6

FONAMENTS DEL SISTEMA NERVIÓS

2. El sistema nerviós8

2.1. Sistema nerviós central8

2.1.1. Encèfal.....8

2.1.2. Medul·la espinal.....10

2.2. Sistema nerviós perifèric.....10

3. El teixit nerviós11

3.1. Neurones11

3.1.1. Morfologia.....11

3.1.2. Tipus de neurones.....13

3.2. Neuròglies.....14

NEUROGÈNESI ADULTA

4. Neurogènesi adulta17

4.1. Mètodes d'estudi.....17

4.1.1. Anàlisi de la neurogènesi In vitro i Ex vivo.....19

4.1.2. Anàlisi de la neurogènesi In vivo.....20

4.2. Cèl·lules mare neuronals22

4.3. Regions cerebrals amb neurogènesi adulta en mamífers.....25

4.3.1. Zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp.....26

4.3.1.1. La formació hipocampal26

4.3.1.2. Tipus cel·lulars de la ZSG28

4.3.1.3. Procés de creació de noves neurones en l'hipocamp29

4.3.2. Zona subventricular (ZSV)30

4.3.2.1. Regions cerebrals que intervenen en la neurogènesi de la ZSV30

4.3.2.2. Tipus cel·lulars de la ZSV33

4.3.2.3. Procés de creació de noves neurones en la ZSV35

4.4. Funció i ús terapèutic37

PART EXPERIMENTAL

| | | |
|-----------|--------------------------------------|----|
| 5. | Marcatge de neurones immadures | 41 |
| 5.1. | Objectiu | 41 |
| 5.2. | Materials i mètode | 41 |
| 5.2.1. | Aparells | 41 |
| 5.2.2. | Utensilis..... | 47 |
| 5.2.3. | Animal d'experimentació..... | 48 |
| 5.2.4. | Substàncies químiques | 48 |
| 5.2.5. | Mètode..... | 49 |
| 5.3. | Resultats | 58 |
| 5.4. | Discussió | 63 |
| 6. | Conclusió..... | 64 |
| 7. | Bibliografia..... | 66 |
| 7.1. | Llibres | 66 |
| 7.2. | Articles..... | 66 |
| 7.3. | Webs..... | 68 |
| 7.4. | Figures | 74 |

ÍNDEX D'ABREVIACIONS

ABC: Complex avidina-biotina-peroxidasa

ADN: Àcid desoxiribonucleic

Ag: Antigen

BO: Bulb olfactori

BrdU: Bromodeoxiuridina

CCG: Capa de cèl·lules granulars

CCM: Capa de cèl·lules mitrals

CG: Capa glomerular

CNO: Capa dels nervis olfactoris

CPE: Capa plexiforme externa

CPI: Capa plexiforme interna

CPN: Cèl·lules progenitores neuronals

DAB: 3,3'-diaminobencidina

DCX: Doblecortina

GABA: Àcid γ -aminobutíric

GD: Gir dentat

Ig: Anticòs

PBS: Tampó fosfat salí

SNC: Sistema nerviós central

SNP: Sistema nerviós perifèric

VRM: Via rostral migratòria

ZSG: Zona subgranular

ZSV: Zona subventricular lateral

ZV: Zona ventricular

Agraïments

Primer de tot, vull agrair la immensa ajuda de la meva tutora, doctora de l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida. Sense ella la part experimental d'aquest treball no hauria estat possible. Aprofito també per donar gràcies a la resta d'investigadors de l'equip del *Desenvolupament i evolució del cervell*. Sens dubte, d'ells he après moltes més coses de les que exposo en aquestes pàgines. Evidentment, assistir a l'IRB ha estat una experiència molt enriquidora, fet que ha estat possible gràcies a la beca atorgada pel mateix Institut.

Una altra persona important ha estat la professora de biologia de l'institut, cotutora del treball. Ella m'ha ajudat a donar forma a la informació i coneixements que he anat adquirint al llarg de la investigació.

També mencionar els meus pares i la meva germana, que han seguit de ben a prop tots els petits avenços del meu treball, manifestant sincerament la seva opinió respecte la redacció d'aquest i animant-me en tot moment.

Realment, m'he sentit molt recolzada al llarg d'aquesta investigació i és per això que vull compartir el resultat amb tots vosaltres, doncs evidentment jo sola no hauria pogut tirar endavant un projecte com aquest.

1. INTRODUCCIÓ

Tots naixem amb bilions de neurones, al principi de l'embaràs aquestes es multipliquen a un ritme de 250.000 neurones per minut dins el fetus. Quan la persona supera els trenta anys, cada dia en moren més de 100.000 en el seu cervell. Només en una sola borratxera se n'arriben a perdre uns quants milions. Però, i si se'n poguessin regenerar?

Aquest és el dubte al voltant del qual es centra el meu treball de recerca. Per això intentaré aprofundir i investigar en el tema de la neurogènesi adulta.

Durant molts anys la creació de noves neurones en el cervell adult ha estat negada per grans científics. No ha estat fins als darrers cinquanta anys que s'ha qüestionat si el sistema nerviós central es pot regenerar.

Aquesta possibilitat obre la porta a tota una revolució científica. És aviat per dir-ho, però potser es podria arribar a aplicar en tractaments contra malalties neurodegeneratives.

Com potser ja he deixat intuir, la meua hipòtesi és comprovar que en el cervell adult es poden formar noves neurones.

El meu propòsit principal és intentar corroborar l'afirmació anterior mitjançant un estudi bibliogràfic i també experimental fet en un laboratori. Un altre objectiu, no tan contundent però no per això menys important, és arribar a comprendre el tema investigat, així com també saber-lo explicar de manera entenedora a persones no especialitzades en aquest àmbit.

El treball es divideix en dos grans apartats. En primer lloc hi ha una part teòrica, la qual em permetrà documentar-me alhora que transmetre, de manera més o menys sintetitzada, els coneixements adquirits. Aquesta secció consta d'un fragment introductori del sistema nerviós que precedeix el tema central del treball.

Posteriorment, la part experimental del treball es basa en la realització d'una pràctica tutoritzada al laboratori de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB) de Lleida. Mitjançant la tècnica de la immunohistoquímica, aquest experiment té l'objectiu de marcar neurones immadures (de nova producció) en el cervell d'un ratolí adult.

He escollit aquest tema per la curiositat que em desvetlla, ja que abans de sentir-ne a parlar aquest darrer any, creia que el sistema nerviós central adult no es podia regenerar.

Gràcies a l'oportunitat que he tingut de contactar amb la unitat d'investigació del *Desenvolupament i evolució del cervell* de l'IRB de Lleida, he pogut assabentar-me de la neurogènesi adulta. Sorprenentment, tot i haver cursat biologia en els cursos anteriors, mai l'havia vist mencionada en els llibres de text utilitzats.

FONAMENTS DEL SISTEMA NERVIÓS

2. EL SISTEMA NERVIÓS

Anatòmicament, el sistema nerviós dels éssers humans es divideix en dues parts:

2.1. El Sistema Nerviós Central (SNC)

Estructura biològica protegida per les meninges, el líquid cefaloraquídi i una coberta òssia constituïda pel crani i la columna vertebral. El SNC està format per:

2.1.1. L'encèfal

Òrgan que rep la informació recollida pel sistema nerviós perifèric, la processa i li dona resposta. Consta de tres parts (*figura 3*):

- a) **El prosencèfal o cervell:** la seva visió externa permet diferenciar dues grans masses anomenades hemisferis cerebrals (*figura 1*). Estan dividides per la **cissura interhemisfèrica** però alhora connectades en l'interior pel cos callós, regió formada per substància blanca¹.

La superfície dels hemisferis és el còrtex o l'escorça cerebral i està formada per substància grisa². Una porció d'aquesta substància gris queda ubicada en el seu interior, formant els **nuclis o ganglis basals**, encarregats de controlar l'activitat muscular, principalment els moviments involuntaris.

Cadascun d'aquests hemisferis presenta uns solcs que el divideixen en quatre lòbuls (*figura 2*): el **lòbul frontal** intervé en el llenguatge, les emocions, el moviment, el pensament, l'aprenentatge i el comportament. El **lòbul parietal** processa la informació sensorial i està relacionat amb l'atenció. El **lòbul occipital** està relacionat amb la visió i el **lòbul temporal** està implicat en l'audició, la memòria i les emocions.

En la part interna del prosencèfal, a més de trobar-hi els nuclis basals i la substància blanca, són de gran importància altres estructures com **l'hipotàlem**, **l'amígdala**, el **septum**, el **pretàlem** i el **tàlem**.

¹ **Substància blanca:** conjunt d'axons i beines de mielina de les neurones.

² **Substància grisa:** conjunt de cossos cel·lulars i dendrites de les neurones.

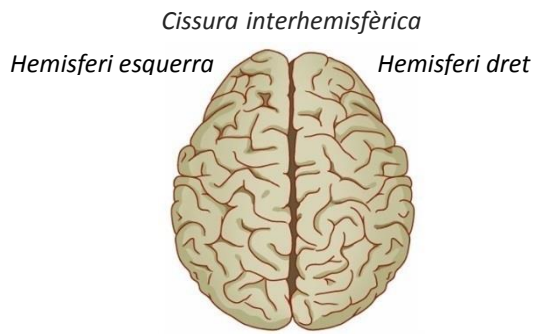


Figura 1. Hemisferis cerebrals

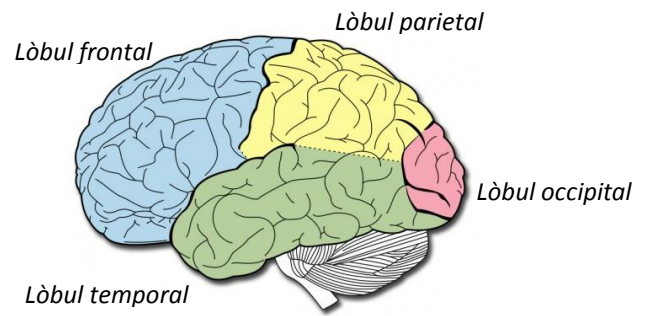


Figura 2. Lòbuls cerebrals

- b) El mesencèfal:** és la part situada damunt del tronc encefàlic³ encarregada de regular la temperatura corporal, donar resposta a la informació sensorial, processar i transmetre la informació entre el romboencèfal i el prosencèfal.
- c) El romboencèfal:** està format per:
- **El bulb raquidi:** és el segment inferior del tronc encefàlic, encarregat de controlar l'activitat reflexa involuntària, com per exemple el batec cardíac, la digestió, la respiració, etc.
 - **La protuberància anular o pont de Varoli:** és la porció del tronc encefàlic ubicada entre el bulb raquidi i el mesencèfal. Les seves funcions principals són: Actuar com una via de comunicació entre el cervell i el cerebel, o també entre les estructures inferiors del SNC com la medul·la o el bulb raquidi amb les estructures superiors com el cervell i el cerebel. Ajudar a transmetre els senyals originats pels nervis cranials, que neixen en el seu interior, al cervell, als ulls, a les orelles i als músculs facials. A més d'encarregar-se de controlar certes funcions involuntàries com la freqüència de la respiració, els reflexos, la consciència i els cicles de son.
 - **El cerebel:** és la regió situada darrera del tronc encefàlic i per sota el lòbul temporal. Originalment es creia que el cerebel només s'encarregava de la coordinació de les activitats motores voluntàries i de l'equilibri. No obstant, estudis recents mostren que a part d'això el cerebel també està implicat en altres processos neuronals com l'aprenentatge, el processament del llenguatge, les funcions cognitives, l'atenció i la resposta a estímuls ambientals.

³ **Tronc encefàlic:** porció de l'encèfal formada pel mesencèfal, la protuberància anular i el bulb raquidi.

2.1.2. La medul·la espinal

Part del SNC situada en l'interior de la columna vertebral. Neix en el bulb raquidi i s'estén fins la segona vèrtebra lumbar. Les seves funcions són transmetre la informació procedent del tronc, coll i extremitats cap al cervell i, la informació motora des del cervell cap a les motoneurons de la medul·la; a més a més intervé en respostes elementals com els actes reflexos.

En el seu interior trobem la substància grisa, que té una forma d'H, i al voltant d'aquesta hi ha la substància blanca.

2.2. El Sistema Nerviós Perifèric (SNP)

Està format pel conjunt de nervis i neurones que resideixen, s'estenen, es ramifiquen i es distribueixen per tot l'organisme exceptuant pel sistema nerviós central. (figura 4)

El conjunt de nervis consta de trenta-un parells de **nervis espinals** que surten de la medul·la i dotze parells de **nervis cranials** originats al tronc encefàlic. Tots ells s'encarreguen de conduir els estímuls nerviosos, podent transmetre'ls del SNC a la resta del cos (**nervis eferents o motors**) o bé en sentit invers (**nervis aferents o sensitius**).

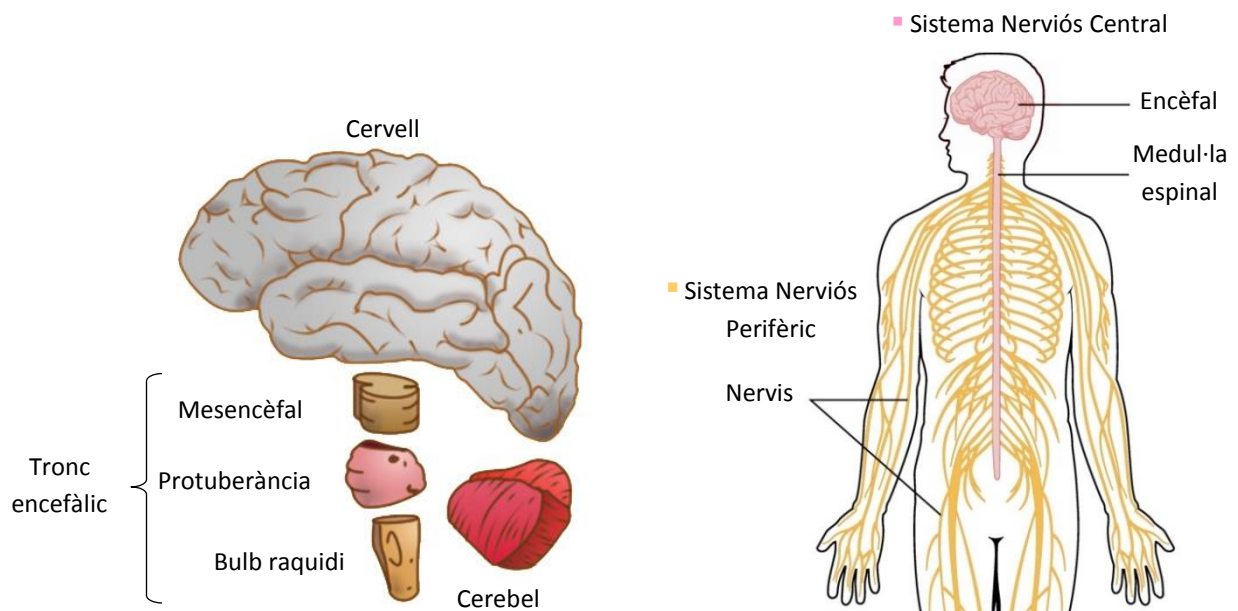


Figura 3. Parts de l'encèfal humà

Figura 4. Parts del sistema nerviós

3. EL TEIXIT NERVIÓS

Hi ha dos grans grups de cèl·lules que formen el teixit nerviós. Diferenciades principalment per la conductivitat de l'impuls nerviós.

3.1. La neurona

És la unitat bàsica estructural i funcional del Sistema Nerviós. Les neurones són cèl·lules excitable, especialitzades en rebre i conduir els impulsos nerviosos a gran velocitat i distància. La seva mida i forma varien segons el tipus de neurona, però totes elles estan constituïdes per les mateixes parts.

3.1.1. Morfologia

En les neurones es poden distingir tres parts fonamentals (*figura 5*):

a) **Soma o cos cel·lular:** és la porció de neurona en la qual hi ha el nucli i l'acumulació més gran de citoplasma. Els orgànuls que conté són els propis de qualsevol cèl·lula, encara que amb petits trets diferencials.

- **Cossos de Nissl:** són petits sacs de reticle endoplasmàtic rugós.
- **Ribosomes:** molt abundants. Tant aquests com els cossos de Nissl penetren a les dendrites però no a l'axó.
- **Complex de Golgi:** molt ben desenvolupat, és fàcilment visible mitjançant la tinció adequada.
- **Neurofilaments:** formen part del citoesquelet de la neurona, presents al soma i a les dendrites, són especialment abundants a l'axó.

b) **Dendrites:** són prolongacions cel·lulars que neixen del soma. La seva funció és conduir els impulsos, provinents d'altres cèl·lules, captats a través dels neurotransmissors durant la sinapsi⁴.

Generalment, presenten una ramificació abundant de tipus arborescent, tot i que també hi ha dendrites poc ramificades o fins i tot gens.

c) **Axó:** és la prolongació neuronal més llarga, iniciada en una zona del cos cel·lular anomenada **con axònic**. És l'encarregat de transmetre l'impuls elèctric des del soma fins als botons sinàptics; com a màxim pot haver-hi un axó per neurona.

⁴ **Sinapsi:** és la connexió, sense contacte físic, entre dues neurones mitjançant els neurotransmissors.

- **Botó sinàptic:** porció dilatada que es troba al final de l'axó. Intervé en la sinapsi alliberant els neurotransmissors.
- **Beina de mielina:** substància lipídica de color blanc que recobreix l'axó d'algunes neurones. Serveix per protegir-lo i millorar la velocitat de conducció dels impulsos. Està formada per les cèl·lules de Schwann, entre les quals hi ha un espai anomenat **nòdul de Ranvier**.

Les **fibres nervioses** que tenen aquest embolcall s'anomenen **mielíniques**, mentre que les que no en tenen es diuen **amielíniques**.

- **Neurilemma:** capa d'aïllament i protecció que rodeja la beina de mielina, només es troba present en la fibra nerviosa del sistema nerviós perifèric. Està formada a partir de les cèl·lules de Schwann.

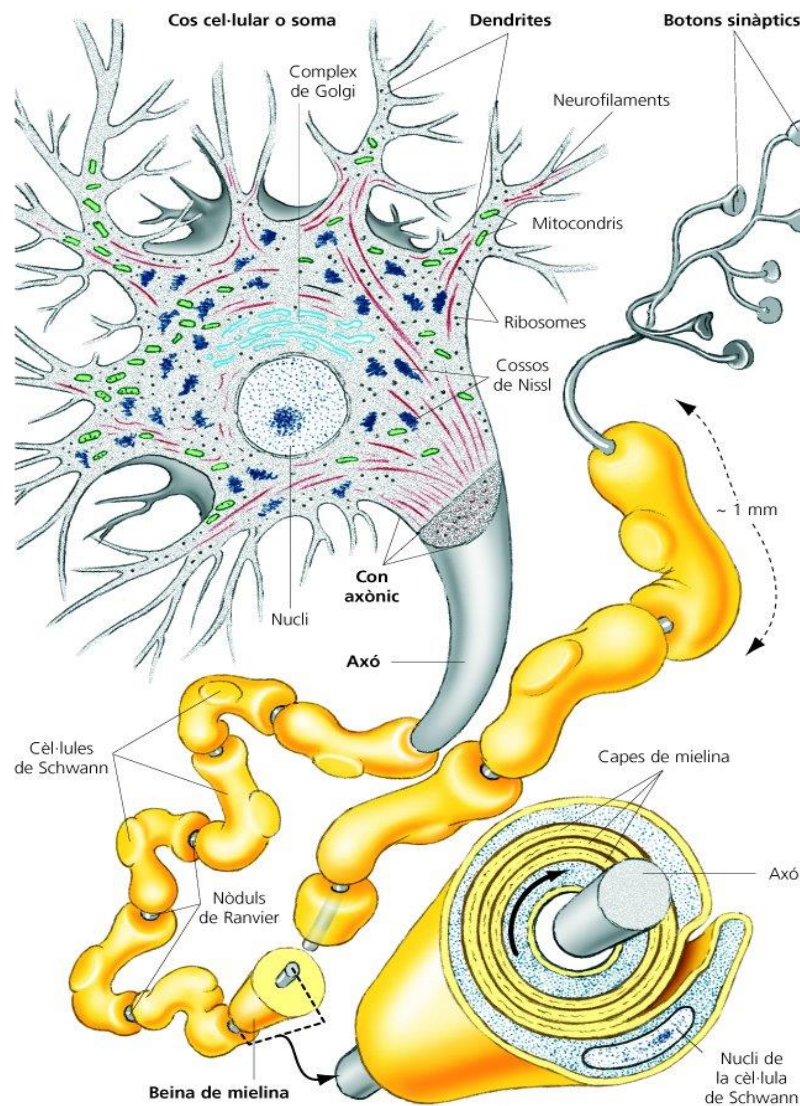


Figura 5. Morfologia d'una neurona

3.1.2. Tipus de neurones

Hi ha diferents criteris per classificar les neurones. Els principals són:

a) Segons el nombre de ramificacions (figura 6)

1. **Multipolars:** tenen moltes ramificacions o dendrites, com per exemple les motoneurones o algunes interneurones.
2. **Bipolars:** consten de dues prolongacions, un axó i un dendrita. Moltes d'elles són sensorials; es troben, per exemple, en la retina.
3. **Unipolars:** només tenen una prolongació, com les neurones sensibles dels ganglis dorsals espinals.

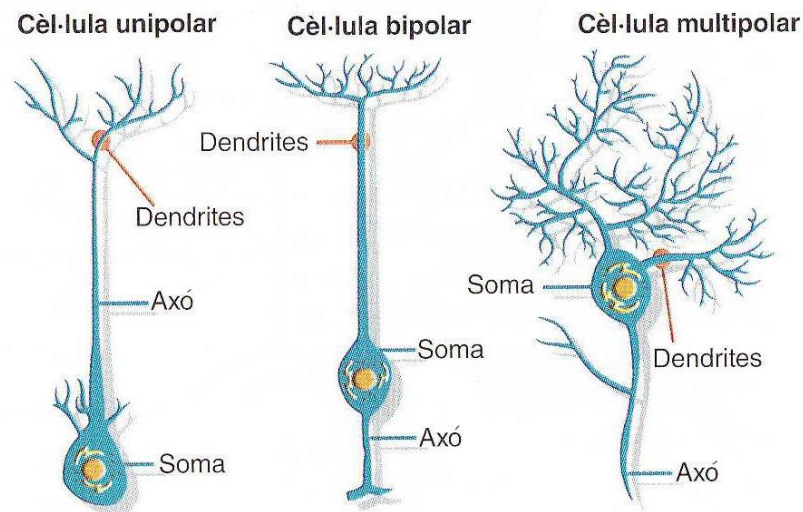


Figura 6. Tipus cel·lulars segons el nombre de ramificacions

b) Segons el tipus d'impuls que condueixen

1. **Sensitives, aferents o ascendents:** condueixen els impulsos des de tots els receptors del cos humà fins al SNC.
2. **Motoneurones, eferents o descendents:** transmeten la informació del SNC cap als músculs i les glàndules.
3. **Interneurones, centrals o d'associació:** condueixen els impulsos entre les motoneurones i les neurones sensibles.

c) Segons la forma del cos cel·lular

1. **Polièdriques:** com les motoneurons.
2. **Fusiformes:** presents en el còrtex central.
3. **Estrellades:** presents en el còrtex central i en el cerebel.
4. **Esfèriques:** recullen informació de les parts del cos més allunyades del SNC.
5. **Piramidals:** ubicades al còrtex cerebral, reben els estímuls nerviosos.

d) Segons la mida de l'axó

1. **Golgi tipus I:** axó mot llarg que es ramifica lluny del soma
2. **Golgi tipus II:** axó curt que es ramifica junt al cos cel·lular.
3. **Sense axó definit:** com les cèl·lules de la retina.
4. **Isodendrítiques:** amb dendrites rectilínies que es ramifiquen de manera que les branques filles són més llargues que les mares.

e) Segons el mediador químic o neurotransmissor

1. **Colinèrgiques:** alliberen acetilcolina.
2. **Noradrenèrgiques:** alliberen norepinefrina.
3. **Dopaminèrgiques:** alliberen dopamina.
4. **Serotoninèrgiques:** alliberen serotonina.
5. **Gabaèrgiques:** alliberen àcid γ -aminobutíric (GABA)
6. **Glutamatèrgiques:** sintetitzen el glutamat

3.2. La neuròglia

Són les cèl·lules mitòtiques que envolten les neurones i emplen els buits que queden entre elles, tant en el sistema nerviós central com en el perifèric. Són fonamentals en el desenvolupament d'aquestes ja que s'encarreguen de sostenir-les, protegir-les, alimentar-les. Tot i que no participen directament en les interaccions sinàptiques o en la transmissió de l'impuls nerviós, són de gran importància perquè ajuden a les neurones a poder-ho realitzar.

Segons la seva ubicació en el sistema nerviós es poden classificar en dos grans grups:

a) Glia central

Es troba en el Sistema Nerviós Central, formada per (figura 7):

- **Astròcits:** tenen funcions estructurals, de nutrició i manteniment de les condicions ambientals de les neurones. Si es troben en la substància blanca s'anomenen **Astròcits fibrosos**, però si formen part de la substància grisa són els **Astròcits protoplasmàtics**.
- **Oligodendròcits:** les seves prolongacions constitueix l'embolcall mielínic de diverses fibres nervioses (axons).
- **Cèl·lules de la microglia:** porten a terme funcions defensives i de neteja del teixit nerviós. Normalment es troben a les proximitats dels vasos sanguinis.
- **Cèl·lules de l'epèndima:** elaboren el líquid cefaloraquídi i cobreixen les superfícies de les cavitats internes tant del cervell com de la medul·la espinal.
- **Cèl·lules de Müller:** es troben a la retina⁵ i tenen una funció estructural, de protecció i nutrició.

b) Glia Perifèrica

Es troba en el Sistema Nerviós Perifèric, les principals cèl·lules constituents són:

- **Cèl·lules de Schwann:** formen la beina de mielina de les fibres nervioses perifèriques. Responsables de regenerar l'axó quan aquest pateix una agressió.
- **Cèl·lules satèl·lit:** proporcionen el suport físic, la protecció i la nutrició de les neurones dels ganglis.

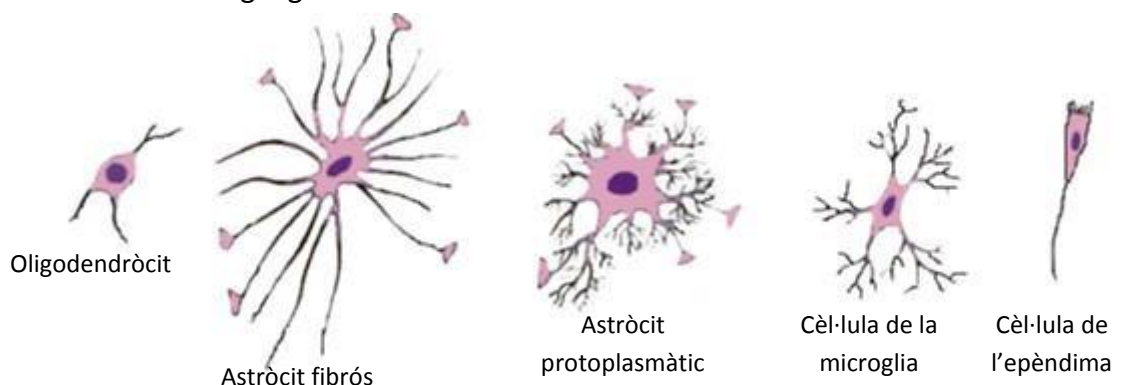


Figura 7. Cèl·lules de la glia central

⁵ **La retina:** per raons de desenvolupament embrionari es considera part del SNC

NEUROGÈNESI ADULTA

4. NEUROGÈNESI ADULTA

La neurogènesi adulta és el procés de formació de noves neurones en el sistema nerviós central adult a partir de cèl·lules progenitores neuronals. Implica la proliferació, diferenciació i maduració de noves cèl·lules nervioses durant l'etapa post-natal.

4.1. Mètodes d'estudi

Des del començament de la neurociència moderna, finals del segle XIX i principis del segle XX, es considerava que el sistema nerviós central no podia regenerar-se; tal i com havia afirmat Santiago Ramon i Cajal, l'any 1913, usant la tècnica de Golgi.

No obstant, la investigació científica de les últimes cinc dècades ha demostrat que existeix la neurogènesi adulta en el cervell d'alguns animals. Per arribar a aquesta conclusió s'han dut a terme una sèrie d'experiments que verifiquen la hipòtesi inicial.

A finals dels anys cinquanta es va crear un nou mètode per marcar cèl·lules que es dividien, mitjançant la $[H^3]$ -Timidina, un marcador que s'incorpora en la replicació de l'ADN durant la fase S del cicle cel·lular, i que es pot detectar amb una autoradiografia⁶.

En la dècada dels seixanta el *Dr. Joseph Altman* i el seu grup d'investigació, utilitzaren la $[H^3]$ -Timidina per mostrar la creació de noves cèl·lules, morfològicament iguals a les neurones, en la zona del bulb olfactori, l'hipocamp i el neocòrtex⁷ de rates i gats adults. Tanmateix el seu treball no fou acceptat per gran part de la comunitat científica perquè tenia un punt feble, el marcador utilitzat no permetia confirmar la naturalesa de les cèl·lules, les quals podien ser glials o bé neurones.

Posteriorment la idea d'Altman fou corroborada i complementada per *Kaplan*, que utilitzà la microscòpia electrònica per detectar neurones marcades amb $[H^3]$ -Timidina.

Gràcies als resultats obtinguts en aquest procés es pogué confirmar el tipus cel·lular de les cèl·lules marcades.

⁶ **Autoradiografia:** Tècnica que permet detectar molècules, components cel·lulars o òrgans corporals prèviament marcats amb elements radioactius amb una emulsió sensible o amb una pel·lícula fotogràfica.

⁷ Totes aquestes zones seran explicades detalladament en el següent apartat (4.3)

A principis dels vuitanta, a la Universitat de Rockefeller (EEUU), el grup del *Dr. Fernando Nottebohm* estudiava el dimorfisme sexual⁸ present en el patró de cant del canaris i l'efecte de les hormones sexuals sobre els nuclis cerebrals implicats en la producció del cant. Concretament, els estudis es basaven en l'administració de testosterona a les femelles, provocant el creixement del centre principal del cant, un dels nuclis cerebrals.

Per saber si aquest increment de dimensió era degut a la incorporació cel·lular de noves neurones, van utilitzar [H^3]-Timidina i van sacrificar els animals amb diferències de temps després de l'administració del marcador.

Van trobar que el centre principal del cant presentava cèl·lules marcades en els animals sacrificats setmanes després de l'administració del marcador. Malgrat això, en els animals sacrificats un o dos dies després de l'administració de Timidina tritiada no es va trobar cap marca en el centre principal del cant, però sí en els ventricles laterals, i van arribar a la conclusió que les noves cèl·lules naixien allí i migraven al centre principal del cant.

Als anys noranta es va desenvolupar un nou marcador cel·lular, la Bromodeoxiuridina (BrdU), un nucleòsid⁹ sintètic, anàleg a la Timidina. Això vol dir que la BrdU és un compost químic amb una estructura semblant a la Timidina, capaç d'incorporar-se a l'ADN durant la replicació dels cromosomes que té lloc durant la fase S. Malgrat la seva alta similitud química, poden tenir propietats físiques, bioquímiques o farmacològiques molt diferents. L'avantatge de la BrdU és que pot detectar-se amb la tècnica de la immunohistoquímica i d'altres que permeten precisar millor si la cèl·lula estudiada és una neurona.

Abans d'acabar el segle XX, es va poder observar la neurogènesi adulta en el cervell humà, gràcies a un estudi fet amb pacients malalts de càncer, als quals se'ls havia aplicat un tractament que contenia BrdU. Posteriorment aquest medicament es va deixar d'utilitzar degut a la seva ineficàcia i nocivitat, ja que la BrdU és una substància perjudicial per a la salut humana amb propietats citotòxiques, teratogèniques¹⁰ i mutàgenes.

Fins a dia d'avui totes les tècniques utilitzades en la investigació de la neurogènesi adulta es poden dividir en dos grans grups:

⁸ **Dimorfisme sexual:** diferències entre mascles i femelles

⁹ **Nucleòsid:** molècula constituïda per la unió d'una pentosa (sucre de cinc àtoms de carboni, com la ribosa o la desoxiribosa) i una base nitrogenada (Adenina, Guanina, Timidina, Citosina i Uracil)

¹⁰ **Teratogènic:** produeix malformacions en l'embrió o fetus.

4.1.1. Anàlisi de la neurogènesi In vivo

Aquests procediments es realitzen en l'organisme mentre aquest és viu (*figura 8*).

a) Incorporació de nucleòtids anàlegs durant la divisió cel·lular

Durant la fase S de la divisió cel·lular, quan es replica l'ADN, s'incorporen en aquest, nucleòtids exògens, com la $[H^3]$ -timidina o la BrdU, que permeten analitzar quantitativament la proliferació, diferenciació i supervivència de les noves cèl·lules. No obstant, hi ha algunes limitacions, per exemple no és gaire adequat per estudiar cèl·lules vives, ja que s'ha de desnaturalitzar l'ADN i la quantitat incorporada dels anàlegs es dilueix molt després de diverses divisions cel·lulars.

b) Marcatge genètic amb retrovirus¹¹

S'utilitzen alguns retrovirus perquè l'expressió dels seus transgens¹² requereix la integració del genoma¹³ retroviral en el genoma de l'hoste, fet que només es produeix durant la mitosi. Per tant, és un bon indicador de la divisió cel·lular.

c) Expressió d'un marcador específic

Les noves neurones poden ser identificades per la presència de marcadors immadurs (DCX) i l'absència de marcadors madurs (NeuN). Aquest mètode és utilitzat quan els anteriors procediments no són pràctics, com per exemple, en humans.

L'únic inconvenient és el fet que alguns d'aquests marcadors assenyalen cèl·lules que no són neurones o bé estan expressats en neurones preexistents.

d) Animals transgènics

Aquests animals, genèticament modificats, permeten una visualització més fàcil de la formació de noves neurones o bé dels precursors neuronals ja que porten incorporats en el seu ADN marcadors cel·lulars, com per exemple el GFP, una proteïna fluorescent de color verd. Per obtenir l'animal transgènic amb la proteïna desitjada és necessari preparar el transgen adequat que constarà de dues parts:

El *codificant* és la seqüència d'ADN portadora de la informació de la nova proteïna que es produirà; i la *seqüència promotora* determinarà on, quan i com s'expressarà el gen.

¹¹ **Retrovirus:** virus en què el seu genoma està format per ARN.

¹² **Transgen:** gen o material genètic que s'ha transferit de manera natural o artificial, mitjançant alguna tècnica d'enginyeria genètica, des d'un organisme a un altre.

¹³ **Genoma:** tot el material genètic contingut en els cromosomes d'un organisme en particular.

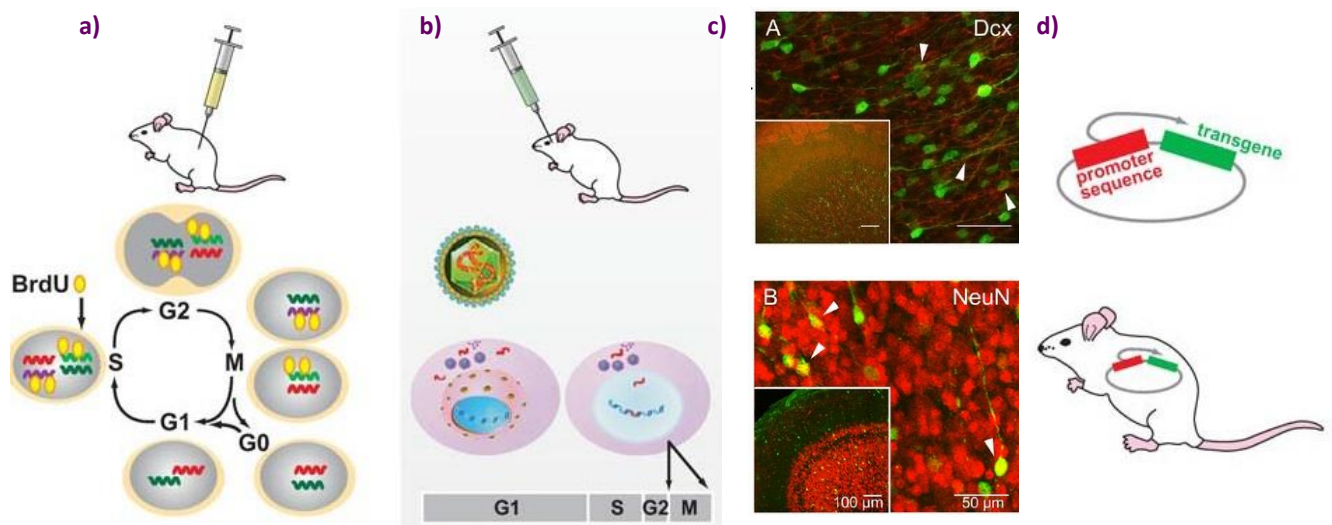


Figura 8. Metodologia per analitzar la neurogènesi In vivo.

4.1.2. Anàlisi de la neurogènesi In vitro i Ex vivo

Aquesta tècnica es basa en l'estudi de la neurogènesi a partir de les cèl·lules progenitores neuronals¹⁴ de diferents zones del cervell, extretes dels organismes i cultivades en medis controlats, normalment en condicions estèrils. En el procés d'Ex vivo les cèl·lules que s'han tractat In vitro (en cultiu) es tornen a introduir en l'animal (figura 9).

El primer pas per aïllar cèl·lules del mateix tipus a partir d'un teixit és separar la matriu extracel·lular que l'uneix, degradant les seves proteïnes mitjançant enzims.

Per separar la suspensió cel·lular obtinguda anteriorment hi ha diferents mètodes:

- La centrifugació, que permet separar les cèl·lules segons la seva densitat.
- La capacitat que tenen algunes cèl·lules d'adherir-se al vidre permet separar-les d'altres cèl·lules que no la tenen i que es troben a la superfície.
- Recentment s'ha desenvolupat una tècnica, la citometria de flux, que utilitza marcadors cel·lulars fluorescents, fonamentada en les propietats de les cèl·lules i en la identificació d'antígens de la superfície cel·lular.

Un cop aïllades les cèl·lules precursors neuronals, hi ha dues maneres de cultivar-les artificialment:

¹⁴ **Cèl·lules progenitores neuronals:** cèl·lules precursors de noves neurones. Veure explicació més extensa en l'apartat 4.2

- a) **Cultiu adhesiu In vitro:** les cèl·lules creixen i es multipliquen en una placa de cultiu fins a cobrir la superfície del recipient formant una monocapa (capa d'una cèl·lula d'espessor), gràcies a la presència d'alguns components de la matriu extracel·lular com el col·lagen¹⁵ i la laminina¹⁶. La neurogènesi s'examinarà en el cultiu de la placa.
- b) **Cultiu en suspensió Ex vivo:** els progenitors neuronals proliferen en un medi no adherent i formen agrupacions de cèl·lules en suspensió, les neuroesferes. Aquestes es trasplantaran en un animal adult, un fetus o un embrió, com per exemple de ratolí per analitzar la neurogènesi produïda i comprovar si les cèl·lules mare poden especialitzar-se en qualsevol tipus cel·lular de l'organisme.

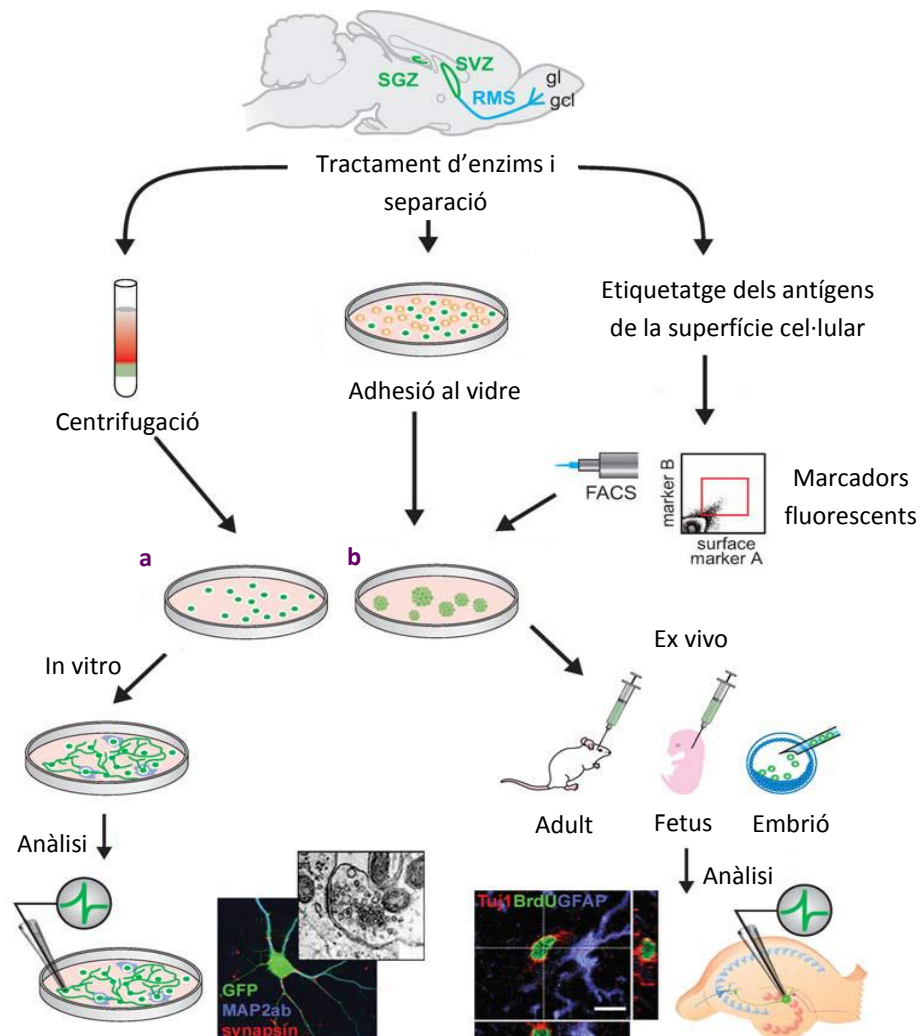


Figura 9. Metodologia per analitzar la neurogènesi adulta In vitro i Ex vivo

¹⁵ **Col·lagen:** molècula proteica que forma fibres presents en quasi tots els tipus de teixit conjuntiu.

¹⁶ **Laminina:** glicoproteïna que forma part de la làmina basal (capa de matriu extracel·lular que separa teixits) associada a altres proteïnes com el col·lagen.

4.2. Cèl·lules mare neuronals

Una cèl·lula mare o troncal (en anglès *stem cell*) pot definir-se com aquella cèl·lula indiferenciada que té la capacitat il·limitada d'autorenovar-se mitjançant una divisió simètrica, o bé si aquesta és asimètrica donarà lloc a una cèl·lula mare i un progenitor.

Depenent de la seva procedència es poden diferenciar en:

- **Cèl·lules mare embrionàries:** són totes les cèl·lules que formen l'embrió, des de la fecundació amb la formació del zigot fins a l'estadi de blastòcit. Són capaces de produir qualsevol tipus cel·lular.
- **Cèl·lules mare adultes:** són cèl·lules localitzades en organismes desenvolupats que mantenen la capacitat d'autorenovació i potencialitat. N'hi ha diferents tipus depenent del teixit del qual formen part, com per exemple cèl·lules mare hematopoètiques, mamàries, intestinals, neuronals...

Segons la seva capacitat de diferenciació es classifiquen en quatre grups:

- **Totipotents:** cèl·lules embrionàries que poden crear i formar un organisme complet, es poden especialitzar en qualsevol tipus cel·lular de l'organisme.
- **Pluripotents:** s'obtenen per mitosi de les cèl·lules totipotents, tot i que poden produir qualsevol tipus cel·lular no són capaces de generar un embrió complet.
- **Multipotents:** solament poden diferenciar-se en un grup de cèl·lules que pertanyin a la mateixa família. Un exemple són les cèl·lules mare neuronals.
- **Unipotents o progenitores:** es poden diferenciar en un sol tipus cel·lular, però mantenen la capacitat d'autorenovació a diferència de les cèl·lules especialitzades.

En les zones on es desenvolupa la neurogènesi adulta existeixen dos tipus de cèl·lules mare amb activitat mitòtica que són les precursors de les noves neurones (*figura 10*):

- a) **Les cèl·lules troncales adultes:** tenen la capacitat d'autorenovar-se i crear cèl·lules progenitores neuronals, per tant són cèl·lules multipotents que només poden originar tipus de cèl·lules específiques. Tenen un cicle cel·lular de vint-i-vuit dies.
- b) **Les cèl·lules progenitores neuronals (CPN):** al perdre la capacitat mitogènica donen lloc a neurones en etapes primerenques del desenvolupament, mentre que en etapes posteriors originen cèl·lules glials com els astròcits i els oligodendròcits. Tenen un cicle cel·lular de dotze hores.

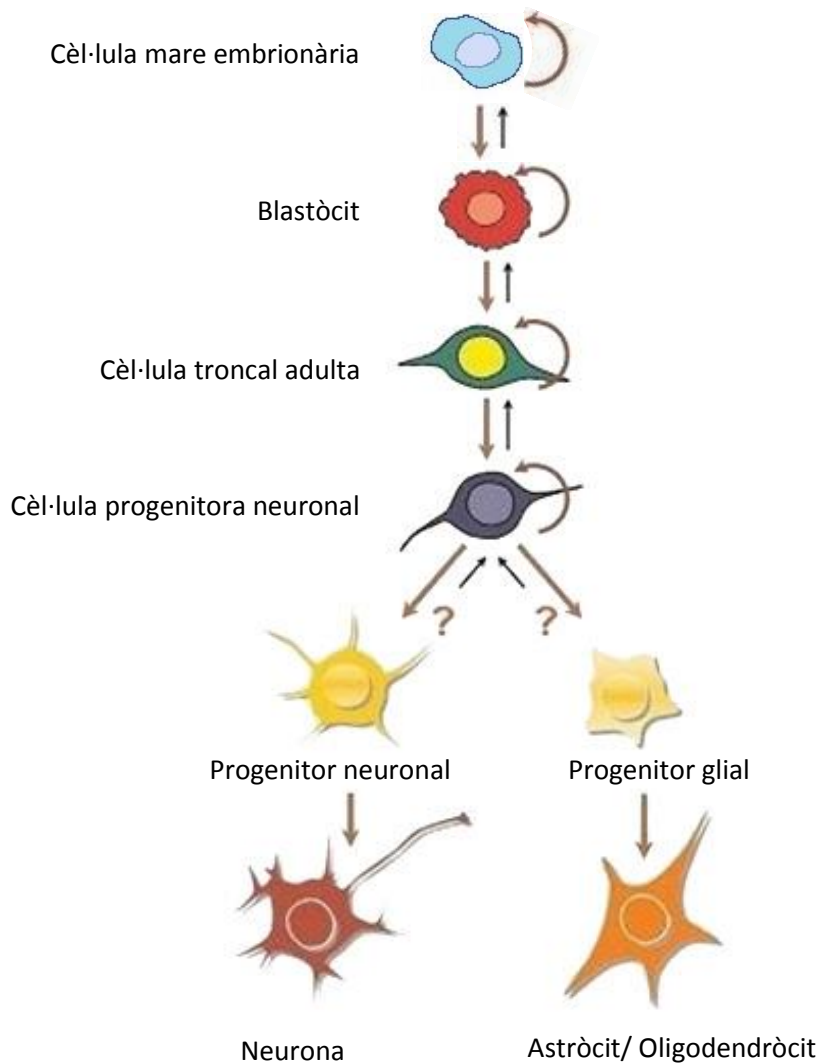


Figura 10. Cèl·lules precursors neuronals.

La major controvèrsia, fins a dia d'avui, ha estat determinar la naturalesa d'aquestes cèl·lules precursors. Existeixen dues teories respecte el seu origen:

- a) Provenen de cèl·lules endimàries¹⁷ que expressen nestina¹⁸
- b) Procedeixen de cèl·lules tipus B, que són astròcits.

La majoria dels estudis reforcen aquesta segona teoria per les principals zones neurogèniques. S'ha demostrat que una població específica de la glia radial, els astròcits, pot originar precursors neuronals, els quals donaran lloc a neurones i cèl·lules glials.

Un altre punt de debat era determinar si les noves neurones de l'adult provenen del mateix tipus de cèl·lules neuroepitelials que produeixen neurones durant el desenvolupament embrionari.

S'ha arribat a la conclusió que les cèl·lules precursors en l'adult són semblants però no equivalents al neuroepiteli embrionari, ja que al no conservar la pluripotència de les cèl·lules mare embrionàries són més especialitzades i solament generen un rang limitat de subtipus neuronals (cèl·lules multipotents).

¹⁷ **Cèl·lules endimàries:** formen el revestiment dels ventricles de l'encèfal i de la medul·la espinal.

¹⁸ **Nestina:** proteïna típica de les cèl·lules precursors nervioses. S'utilitza com a marcador de la proliferació i migració de les cèl·lules .

4.3. Regions cerebrals amb neurogènesi adulta en mamífers

Les àrees del cervell capaces de produir noves neurones es coneixen com a zones neurogèniques. Es caracteritzen per la presència d'una matriu germinativa, amb una producció significant de noves neurones al llarg de tota la vida, i un micro-ambient especial, també anomenat nínxol germinatiu o de les cèl·lules mare. Aquest promou el desenvolupament neuronal de les cèl·lules precursors, on es troben organitzades formant una unitat funcional que també engloba astròcits, cèl·lules endotelials¹⁹, microglia, macròfags i matriu extracel·lular.

En el cervell adult de diferents espècies animals s'han definit clarament dues àrees neurogèniques: la zona subventricular lateral (ZSV) i la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp (ZSG). Estudis recents, fets en ratolins, mostren la possibilitat de baixos nivells de neurogènesi adulta en el neocòrtex, el nucli estriat, el còrtex piriforme, el tubercle olfatori, l'amígdala, l'hipotàlem, la substància negra i el nucli vago. Encara que aquestes últimes dades estan sent molt debatudes degut a la controvèrsia d'evidències (*figura 11*).

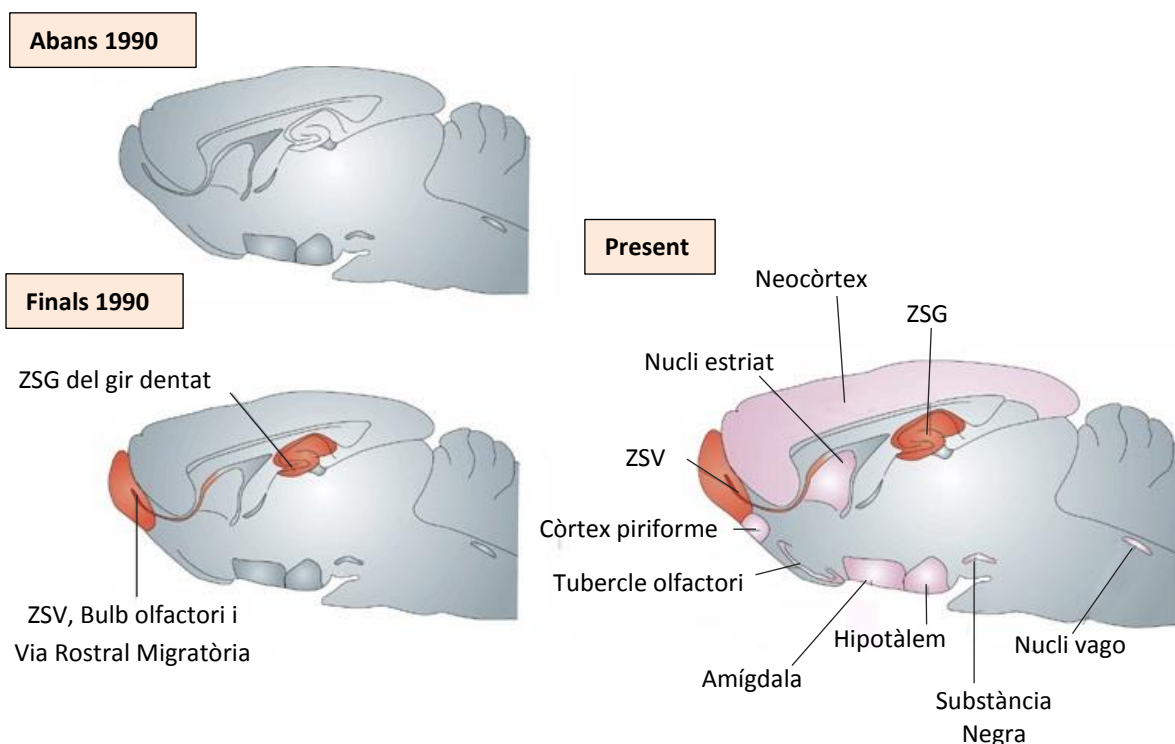


Figura 11. Canvis en el punt de vista de la neurogènesi adulta en mamífers al llarg dels últims 25 anys.

¹⁹ **Cèl·lula endotelial:** cèl·lula que recobreix l'interior dels vasos sanguinis i els capil·lars, formant la paret.

4.3.1. Zona Subgranular del gir dentat de l'hipocamp (ZSG)

És una capa estreta de cèl·lules formada per progenitors neuronals, astròcits, cèl·lules endotelials, vasos sanguinis i d'altres components. Tot ells ajuden a crear un micro-ambient adequat per regular la proliferació, migració i diferenciació de noves neurones. Es troba situada en el gir dentat de la formació hipocampal.

4.3.1.1. La formació hipocampal

La formació hipocampal és el conjunt de tres regions que pertanyen al sistema límbic. En els éssers humans i d'altres primats es troba situada en l'interior dels lòbuls temporals d'ambdós hemisferis cerebrals i té una forma similar al cavallet de mar, d'aquí li ve el nom (*hippocampus* en llatí). En canvi en les rates l'hipocamp es troba just per sota el còrtex cerebral (*figura 12*). Des del punt de vista funcional desenvolupa un important paper en els diferents tipus de memòria. Les seves regions són (*figura 13*):

- **El gir dentat (GD):** circumval·lació formada per una capa de petits somes densament empaquetats en columnes on resideixen les cèl·lules granulars (*capa granular, Gr*). Sota la fissura hipocampal (hif) hi ha la capa molecular (Mol) i, entre l'estrat més profund del GD, l'*hilus* i la Gr es troba la zona subgranular (*figura 14*).
- **L'hipocamp o banya d'Amón:** és una circumval·lació que comprèn les regions CA1, CA2 i CA3. La regió CA1 està formada per cèl·lules piramidals petites; en canvi les regions CA2 i la CA3 són riques en cèl·lules piramidals de gran mida.
- **L'escorça entorrinal:** és l'àrea del cervell que uneix l'hipocamp i el neocòrtex.

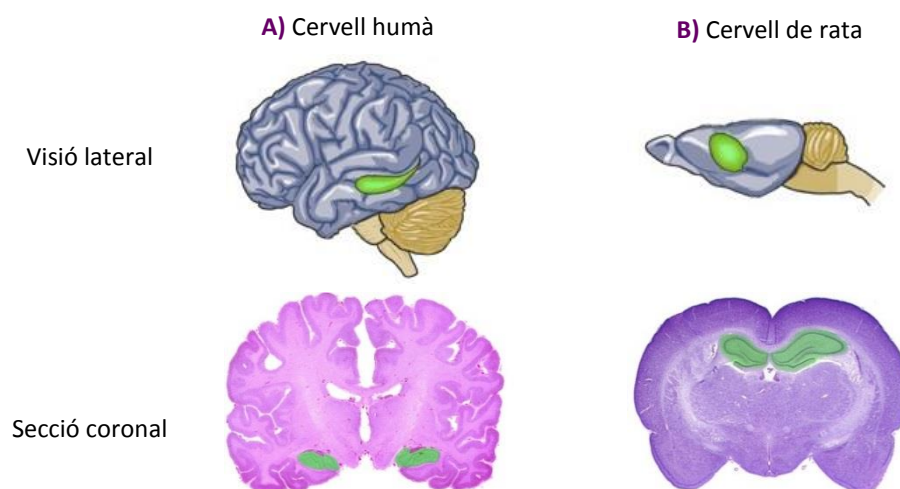


Figura 12. Formació hipocampal en el cervell humà (A) i en el cervell de rata (B)

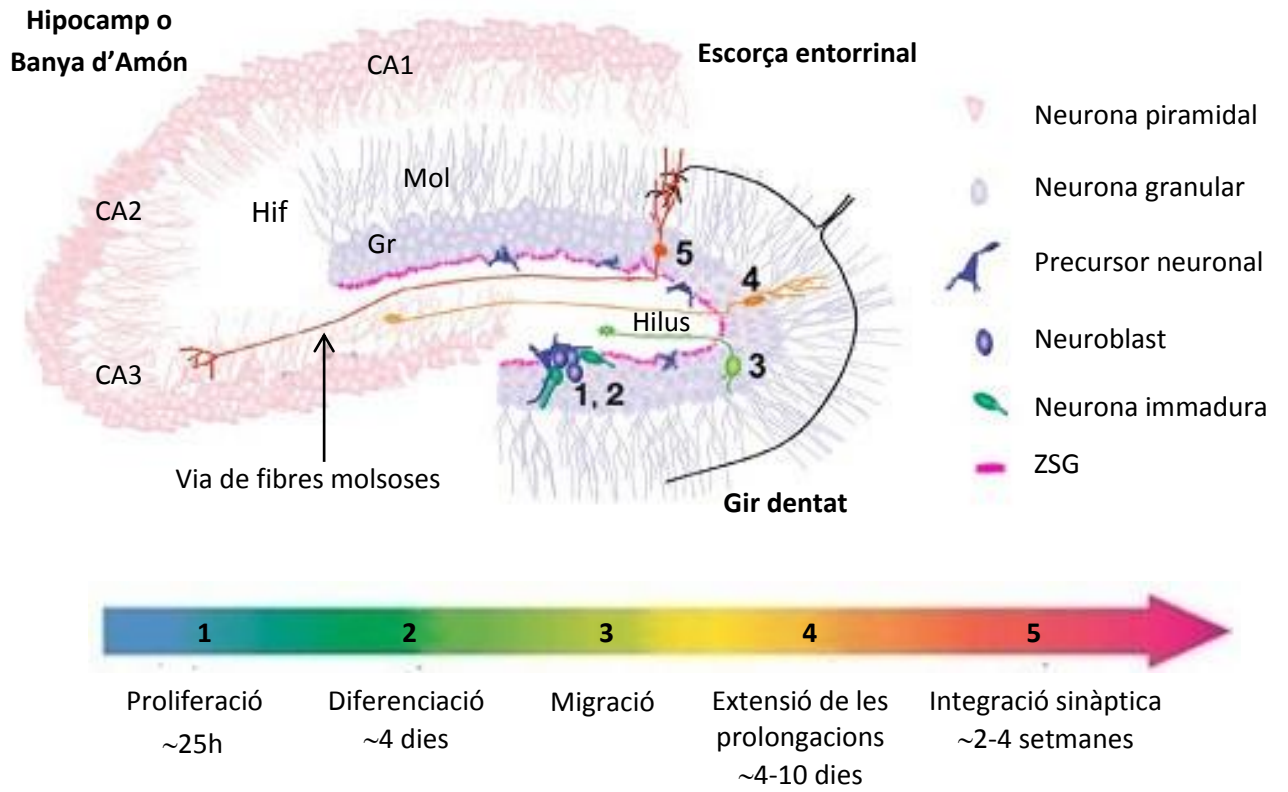


Figura 13. Zones de la formació hipocampal i procés de creació de noves neurones al Gir dentat

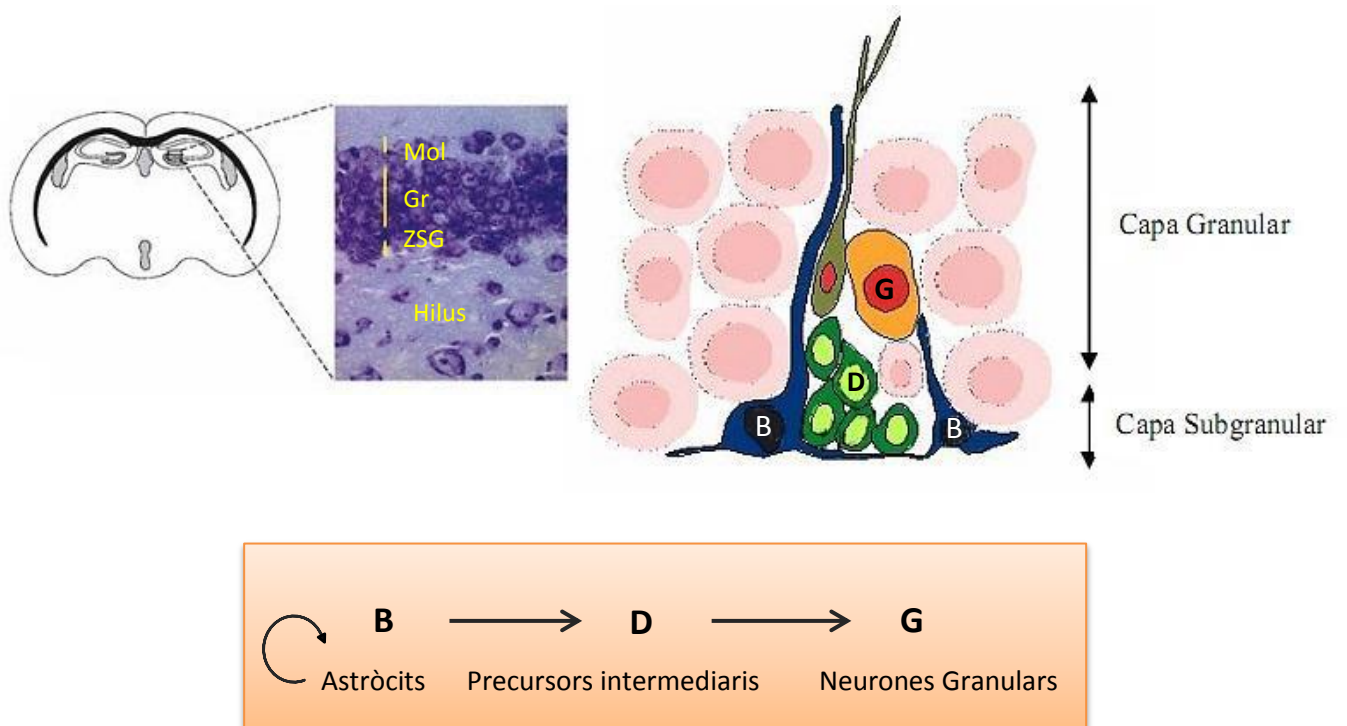


Figura 14. Organització i tipus cel·lulars de la Zona Subgranular.

4.3.1.2. Tipus cel·lulars de la Zona Subgranular

Es distingeixen tres tipus cel·lulars diferents (*figura 14*):

- **Les cèl·lules tipus B (astròcits radials):** són les cèl·lules troncal neuronals, situades a la capa subgranular, tenen la capacitat d'autorenovar-se, generar astròcits horitzontals i cèl·lules tipus D. La seva morfologia i les propietats electrofisiològiques són semblants a les cèl·lules de la glia radial. Generalment, tenen un soma triangular, les prolongacions del qual arriben fins a la capa de cèl·lules granulars. A més es caracteritzen per l'expressió de marcadors cel·lulars com la Nestina⁺, GFAP⁺, BLBP, Sox-2 i l'absència del marcador S-100β⁻.

Hi ha un altre tipus de cèl·lules B anomenades **astròcits horitzontals** que no tenen les característiques de cèl·lules troncal però conserven l'activitat mitòtica i són els precursors dels oligodendròcits. Es distingeixen dels astròcits radials, els seus precursors, per la morfologia i determinats marcadors moleculars.

- **Les cèl·lules tipus D (precursors intermediaris o neuroblastos):** són cèl·lules altament proliferatives, provinents de la divisió dels astròcits radials i precursors de les noves neurones granulars. Poden diferenciar-se tres subtipus de cèl·lules D segons la seva ultraestructura i morfologia.

- **Les cèl·lules tipus G (neurones granulars):** són neurones situades entre la ZSG i la capa granular. El seu soma és rodo, amb un arborització dendrítica que creix fins la capa molecular i el seu axó es prolonga a través de la via de les fibres molsoses (freqüentment anomenades *mossy fiber pathway, en anglès*) fins fer la sinapsi amb les cèl·lules de la regió CA3 de l'hipocamp.

Tenen les característiques de neurones madures: són elèctricament actives, alliberen neurotransmissors, no són mitòtiques, presenten dendrites, axó i potencials d'acció.

No obstant, la funcionalitat d'aquestes neurones no és tan efectiva com l'observada en les neurones formades a partir de cèl·lules troncal embrionàries.

La seva funció es desconeix, tot i que es sap que reben informació d'altres àrees del cervell, especialment del sistema límbic.

Immunohistoquímicament són positives pels marcadors com: NeuN o Neuro-D.

4.3.1.3. Procés de creació de noves neurones en l'hipocamp

Aproximadament unes 250.000 noves neurones s'incorporen al mes en el gir dentat, que representa un 6% de la població cel·lular total d'aquesta estructura.

Des del seu naixement en la ZSG fins la finalització del procés de diferenciació i la integració funcional en circuits neuronals, la progènie de les cèl·lules B avança a través d'una sèrie d'etapes seqüenciades (*veure figura 13*).

- 1. Proliferació:** durant aproximadament unes 25 hores, els precursors neuronals, amb el cos cel·lular localitzat en l'interior de la ZSG del gir dentat, propaguen les seves terminacions a través de la capa granular alhora que es divideixen per mitosi i originen diversos neuroblastos²⁰.
- 2. Diferenciació:** els neuroblastos originats prèviament durant els següents quatre dies es diferenciarien en neurones immadures. La diferència entre aquests dos és que els neuroblastos encara poden patir mitosi mentre que les neurones no.
- 3. Migració:** les neurones immadures migren una curta distància fins l'interior de la capa granular.
- 4. Extensió de les prolongacions:** durant un període d'entre quatre i deu dies després de la divisió cel·lular, les neurones immadures ja ubicades en la capa granular, estenen el seu axó a través de la via de fibres molsoses fins arribar a les cèl·lules piramidals de la CA3. A més, projecten les seves dendrites en sentit oposat a l'axó, direcció a la capa molecular i al llarg de les següents pròximes dues setmanes aniran augmentant de mida, duent a terme un procés de maduració.
- 5. Integració sinàptica:** el procés de maduració finalitza quan les noves neurones granulars reben senyals d'entrada del còrtex entorrinal i emeten senyals de sortida cap a les zones del CA3 i l'hilus.

²⁰ **Neuroblast:** Cèl·lula embrionària dels vertebrats de la qual deriva una neurona.

4.3.2. Zona subventricular (ZSV)

Durant el desenvolupament del cervell dels mamífers es forma la **zona ventricular (ZV)** al llarg dels ventricles laterals. És una capa germinativa rica en cèl·lules progenitores neuronals, en ella s'originen neurones que migraran cap a totes les àrees del cervell.

Al final del desenvolupament embrionari es forma una segona capa de cèl·lules germinatives, s'anomena **zona subventricular (ZSV)**, la qual també produeix noves neurones.

Durant el desenvolupament postnatal disminueix progressivament la generació de neurones. Finalment, en el cervell adult desapareix la zona ventricular i es mantenen únicament els nínxols de proliferació en la ZSV. Les neurones creades en aquesta zona migren a través de la via rostral migratòria (VRM) fins al bulb olfactori, on finalitzat tot el procés es diferenciaren en dos tipus d'interneurones: granulars i periglomerulars.

4.3.2.1. Regions cerebrals que intervenen en la neurogènesi de la ZSV

- **Ventricles laterals:** són les dues cavitats anatòmiques del telencèfal, l'interior de les quals està cobert per un epiteli endimari (conjunt de cèl·lules glials). Constitueixen el sistema ventricular, un conjunt de quatre ventricles cerebrals interconnectats entre sí, per on circula el líquid cefaloraquídi.

Els ventricles laterals estan situats al llarg dels dos hemisferis cerebrals.

Cadascun d'ells té una forma de C i consta de tres astes o banyes: l'**asta anterior o frontal** s'estén cap al lòbul frontal, l'**asta posterior o occipital** s'estén cap al lòbul occipital i l'**asta inferior o temporal** s'estén cap al lòbul temporal (*figura 15*).

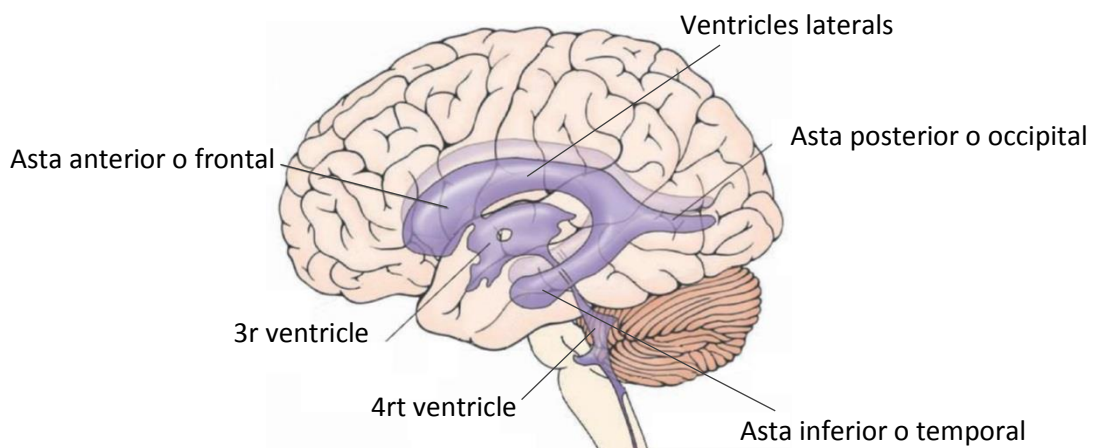


Figura 15. Ventricles cerebrals d'un cervell humà

- **Bulb olfactori (BO):** és una regió del SNC localitzada en la zona més rostral del telencèfal en el cas del ratolí, i en l'ésser humà es situa sota el còrtex. La seva mida és comparativament més gran en els ratolins que en els humans.

S'encarrega de processar la informació de l'epiteli olfactiu (la part anatòmica capaç de detectar els olors) i dirigir-la a estructures superiors del cervell.

El bulb olfactori consta d'una organització laminar en capes concèntriques. Les capes neuronals que s'observen en una secció transversal des de la més externa a la més interna són (figura 16):

Capa dels nervis olfactoris (CNO): formada pels axons de les neurones receptores olfactòries (NO) que s'introdueixen en els glomèruls de la següent capa.

Capa glomerular (CG): consta d'unes formacions esfèriques anomenades **glomèruls** (GL), on té lloc la sinapsi entre els axons de les neurones olfactòries amb les dendrites de les neurones mitrals (M) i empenatxades (E). Les neurones periglomerulars (P) es troben al voltant dels glomèruls i també participen en alguns tipus de sinapsi.

Capa plexiforme externa (CPE): formada per astròcits, interneurons i neurones amb les dendrites en forma de plomall (empenatxades) que rodegen els glomèruls.

Capa de cèl·lules mitrals (CCM): consta bàsicament de neurones mitrals, caracteritzades per la seva gran mida i forma de mitra²¹. Aquestes reben la informació sensorial de les neurones olfactivas i la transmeten fins el còrtex a través d'axons.

Capa plexiforme interna (CPI): formada principalment per fibres, corresponents als axons de les neurones mitrals i a algunes cèl·lules granulars.

Capa de cèl·lules granulars (CCG): consta d'una gran quantitat de cèl·lules granulars (Gr), unes interneurons de mida petita.

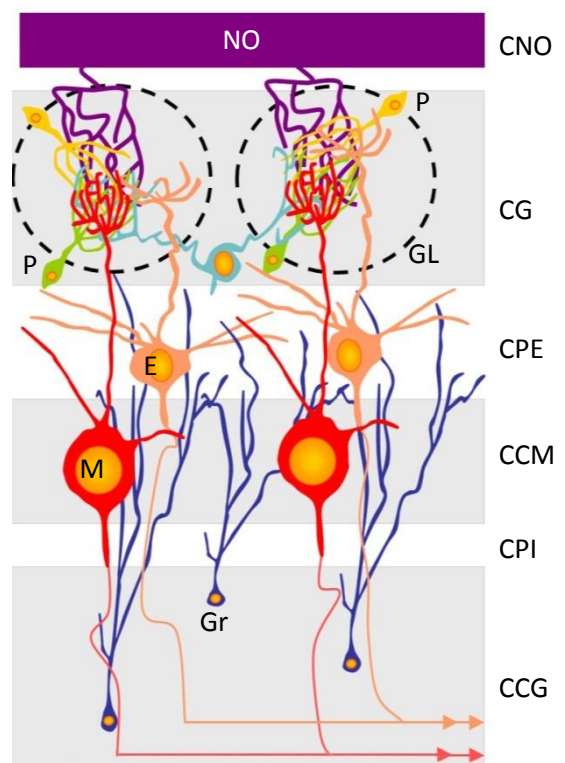


Figura 16. Capes del bulb olfactori.

²¹ **Mitra:** Lligadura alta i puntuda que en les grans solemnitats porten els bisbes, arquebisbes....

- **Via rostral migratòria (VRM):** és una ruta migratòria ben definida. S'inicia en la zona subventricular amb la partida dels neuroblastos i finalitza amb l'arribada d'aquests al bulb olfatori, on es diferenciarien en interneurons.

Consta d'unes estructures tubulars de cèl·lules glials per on circulen els neuroblastos. Aquestes estructures secreten factors de creixement que afavoreixen el procés de migració. També serveixen de suport direccional dels neuroblastos, evitant que surtin prematurament de les rutes de migració.

Tot i que en ratolins la VRM està àmpliament definida i caracteritzada (*figura 17*), en humans, actualment hi ha gran controvèrsia sobre la seva existència.

Per una banda hi ha investigadors que han descrit una extensió de la cavitat ventricular fins el BO a través de la qual es produeix la migració de les cèl·lules recent generades (*figura 18*). Per altra part, hi ha grups científics que neguen tant la migració com l'extensió de la cavitat ventricular en adults humans.

Aquestes qüestions són difícils d'abordar degut a la baixa qualitat i escassetat del material humà disponible, ja que post-mortem es deteriora ràpidament.

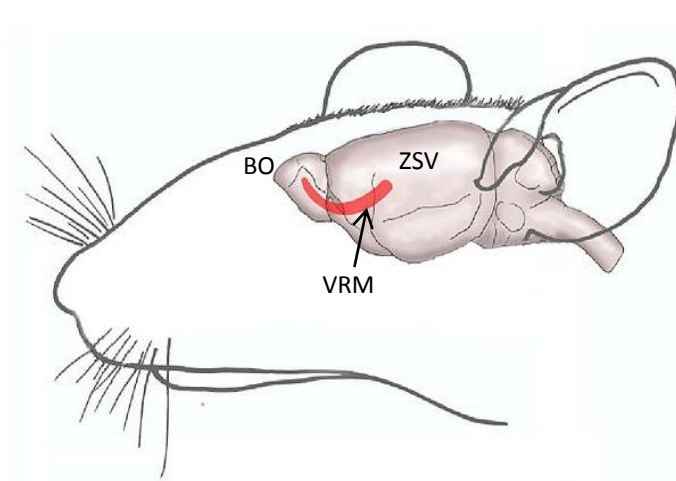


Figura 17. Regions cerebrals que intervenen en la neurogènesi de la ZSV, en cervell de ratolí

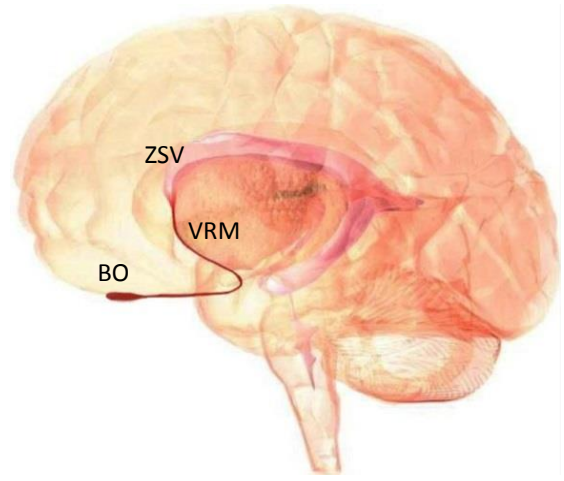


Figura 18. Regions cerebrals que intervenen en la neurogènesi de la ZSV, en cervell humà amb la possible via rostral migratòria marcada en vermell

4.3.2.2. Tipus cel·lulars de la Zona Subventricular (figura 19)

- **Cèl·lules tipus E:** són cèl·lules endimàries que es troben en contacte amb els ventricles laterals i els nínxols cel·lulars. Participen en la circulació del líquid cefaloraquídi i tenen un paper important en la migració de les noves neurones al bulb olfactori. No s'han observat processos mitòtics en elles.
- **Cèl·lules tipus B (astròcits):** són cèl·lules mare neuronals amb característiques semblants a les cèl·lules B²² de la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp. No obstant, es diferencien perquè els astròcits de la ZSV al dividir-se generen cèl·lules tipus C, o bé s'autorenoven.

Depenent del contacte amb els ventricles laterals hi ha dos tipus de cèl·lules B:

- **Cèl·lules tipus B1:** contacten amb la cavitat ventricular mitjançant uns cilis²³ curts i rectilinis que s'estenen a través de les cèl·lules tipus E.
 - **Cèl·lules tipus B2:** no contacten amb els ventricles.
- **Cèl·lules tipus C (transitòries amplificadores):** són cèl·lules altament proliferatives, provinents de la divisió dels astròcits B i precursors dels neuroblastos migratoris. Es troben formant grups de dos o tres cèl·lules adherides a les cadenes de cèl·lules tipus A.
 - **Cèl·lules tipus A (neuroblastos migratoris):** són neurones immadures provinents de les cèl·lules tipus C. Normalment apareixen en grups de cèl·lules formant cadenes que migren a través de la via rostral migratòria fins al bulb olfactori, on finalment es transformaran en interneurones. Durant el procés de migració mantenen la seva capacitat de proliferació. Aquest fet constitueix una diferència fonamental respecte al procés de neurogènesi adulta en l'hipocamp o al que succeeix al llarg del desenvolupament embrionari.

²² **Cèl·lules tipus B:** veure apartat 4.3.1.2 en la pàgina 28.

²³ **Cili:** prolongació citoplasmàtica de forma cilíndrica que emergeix de la superfície d'algunes cèl·lules.

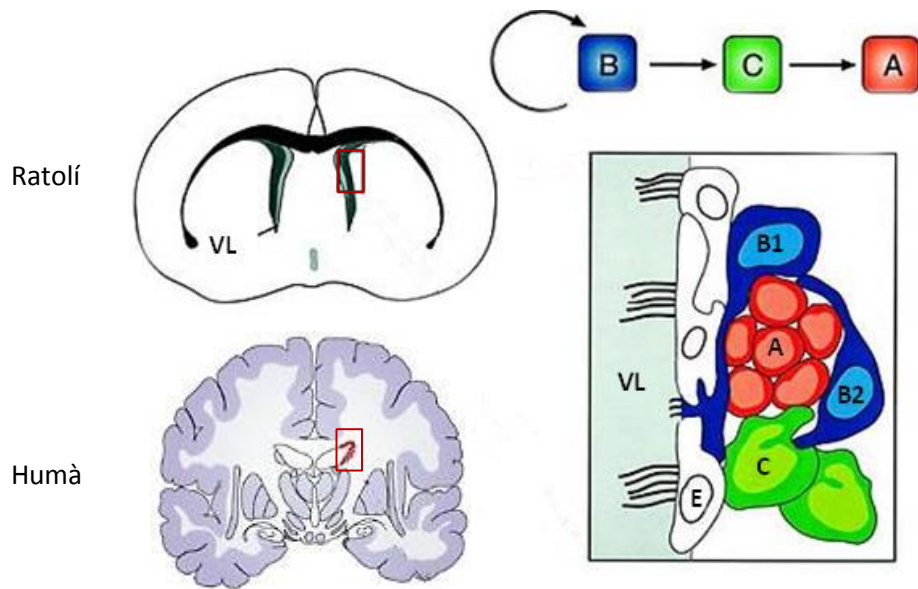


Figura 19. Organització i tipus cel·lulars de la ZSV en talls coronals de ratolí i d'humà.

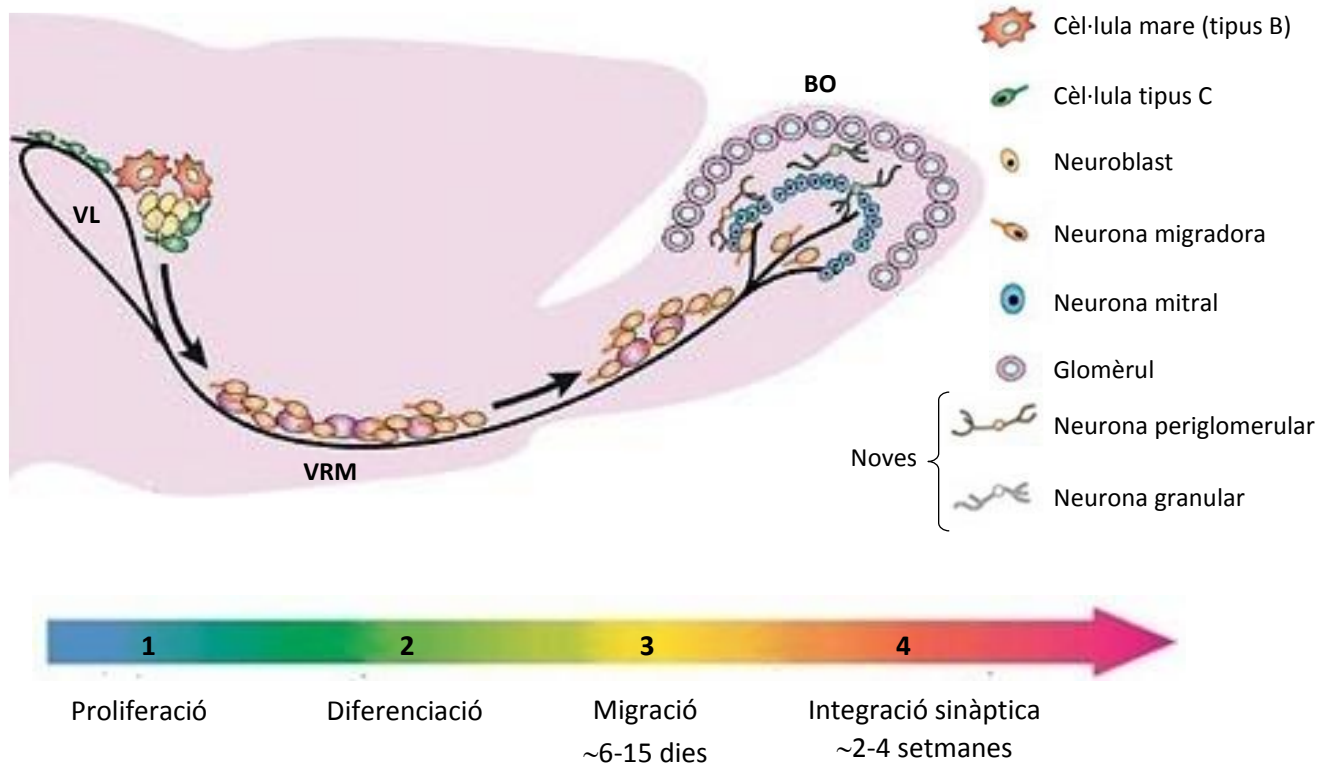


Figura 20. Procés de creació de noves neurones en la ZSV i el bulb olfactori.

4.3.2.3. Procés de creació de noves neurones en la ZSV (figura 20)

Estudis quantitius indiquen que la taxa de neurogènesi en la ZSV del cervell adult oscil·la entre 30.000-60.000 noves neurones granulars per dia. Això representa l'1% de la població total de cèl·lules granulars olfàctòries del bulb olfatori.

Tanmateix, una gran porció, al voltant del 50%, de les cèl·lules de nova generació que arriben al BO moren en un curt període de temps després d'haver madurat.

Tradicionalment es considerava que la paret dels ventricles laterals era l'única zona d'aquesta regió neurogènica que contenia progenitors neuronals. Posteriorment, s'ha comprovat que també existeixen algunes cèl·lules tipus B i C en la VRM i en el BO.

El procés descrit a continuació es basa en l'origen cel·lular que té lloc en la ZSV dels VL.

- 1. Proliferació:** les cèl·lules mare neuronals, astròcits tipus B, donen lloc a les cèl·lules tipus C en la ZSV.
- 2. Diferenciació:** les cèl·lules transitòries amplificadores o tipus C, són les progenitores dels nous neuroblastos també anomenats cèl·lules tipus A.
- 3. Migració:** els neuroblastos s'agrupen entre ells formant cadenes ja que els facilita la seva mobilitat. Al llarg d'un període d'entre 6 i 15 dies migren des de la ZSV fins al BO que és una distància considerable, al voltant de 5 mil·límetres en rosegadors i 20 mm en primats. Aquesta migració en cadena es caracteritza perquè les cèl·lules tipus A continuen dividint-se en el camí, tot i que la taxa de proliferació és menor que en la ZSV. Una vegada els neuroblastos han arribat a la part central del bulb olfatori es separen de les cadenes i es dispersen de forma radial.
- 4. Integració sinàptica:** a partir de la segona setmana des que s'inicià el procés de neurogènesi les neurones immadures, disperses en el BO, es converteixen finalment en interneurons. El temps que tarden en finalitzar el procés de maduració, consistent en l'extensió de les ramificacions dendrítiques, l'expressió dels neurotransmissors i l'activitat electrofisiològica, depèn del tipus d'interneurona en què es converteixi.

Els principals tipus d'interneurones generades de forma contínua en la neurogènesi adulta del bulb olfatori són:

- **Neurones periglomerulars:** són interneurons de mida petita, tenen el soma rodó, un axó curt i les seves dendrites solen ramificar-se al voltant d'un únic glomèrul on estableixen sinapsi. La informació olfactiva que reben en el glomèrul pot ser de manera directa, mitjançant els nervis olfactoris; o bé de forma indirecta a través de les dendrites de les cèl·lules mitrals i les cèl·lules empenatxades.

Hi ha tres tipus de neurones periglomerulars depenent de la manera en què reben la informació i de la seva naturalesa neuroquímica.

Tipus 1: contacten directament amb els nervis olfactoris i són gabaèrgiques.

Tipus 2: ni contacten amb els nervis olfactoris ni són gabaèrgiques.

Tipus 3: contacten amb els nervis olfactoris però no són gabaèrgiques.

Tal i com es veu en la classificació anterior, la població de neurones periglomerulars és heterogènia des del punt de vista neuroquímic. Evidències immunohistoquímiques indiquen que la majoria d'aquestes cèl·lules són gabaèrgiques, tot i que algunes són dopaminèrgiques i d'altres expressen els dos neurotransmissors alhora, GABA i dopamina.

Des de l'inici del procés de la seva creació, les neurones periglomerulars tarden al voltant de quatre setmanes en integrar-se sinàpticament i desenvolupar la seva estructura dendrítica i axonal completa.

- **Neurones granulars:** són el tipus cel·lular que es produeix en major quantitat en la neurogènesi adulta. Tarden aproximadament dues setmanes a mostrar-se morfològicament madures.

Són interneurons gabaèrgiques de mida petita, amb un cos cel·lular de forma triangular o esfèrica. Poden regular el processament de la informació sensorial del bulb olfactivi. Les seves dendrites basals²⁴ es ramifiquen en la capa de cèl·lules granulars, i les dendrites apicals²⁵ s'estenen per la capa plexiforme externa, on estableixen connexions sinàptiques amb cèl·lules mitrals i empenatxades.

²⁴ **Dendrita basal:** es dirigeix cap a la base o a la zona inferior respecte la seva localització.

²⁵ **Dendrita apical:** s'estén cap a la superfície més externa respecte la seva posició.

4.4. Funció i ús terapèutic

La investigació en neurogènesi, generada al llarg dels últims anys, ha permès acceptar la formació de noves neurones en el cervell adult d'alguns animals. No obstant, la importància funcional que té aquest procés encara no es coneix amb certesa.

Les teories que descriuen el paper de la neurogènesi adulta estan fortament influenciades per la funció de la regió del cervell on aquesta té lloc. Per exemple, gran part de la recerca està enfocada a descobrir com influeix la neurogènesi en el procés d'aprenentatge i memòria, ja que una de les zones més importants on aquesta es produeix, l'hipocamp, té entre altres aquestes funcions.

Diversos estudis, la majoria fets en ratolins, mostren com algunes activitats i situacions concretes afecten la producció de noves neurones.

Els animals que viuen en un ambient enriquit, el qual provoca l'estimulació del cervell tant per l'entorn físic com social, tenen un increment de noves neurones que els afavoreix en l'obtenció de millors resultats en tasques d'aprenentatge i memòria espacial. Així mateix, l'aprenentatge induïx l'activació de les neurones recent nascudes, incrementant la seva supervivència i incorporació en circuits neuronals.

Uns altres factors que augmenten considerablement la neurogènesi són: l'època reproductiva i de cria dels mamífers i la realització d'activitat física. Es creu que fer esport induïx la proliferació cel·lular de la zona subgranular (ZSG). S'ha comprovat en estudis duts a terme amb ratolins que aquells que havien estat corrent es desenvolupaven millor en el laberint d'aigua de Morris²⁶ que els ratolins sedentaris.

Per contra l'envelliment, les situacions d'estrès, l'actitud depressiva i la consumició de drogues fan reduir significativament el volum de noves neurones en l'hipocamp.

Actualment encara és aviat per concretar la funció general de la neurogènesi ja que s'ha d'estudiar detalladament com afecta la creació de noves neurones en diverses regions del cervell. Tanmateix, hi ha diverses hipòtesis sobre ella, algunes de les quals són:

²⁶ **Laberint d'aigua de Morris:** és un procediment de comportament àmpliament utilitzat en la neurociència conductual per estudiar l'aprenentatge espacial i la memòria.

- La funció de la neurogènesi pot oscil·lar entre el simple reemplaçament de neurones mortes o desenvolupar una tasca més especialitzada incorporant-se en una xarxa neuronal ja existent, generant noves connexions. Aquestes noves incorporacions millorarien la plasticitat cerebral i el processament de la informació i memòria emmagatzemada prèviament.
- Les noves neurones podrien tenir funcions i propietats fisiològiques diferents segons l'estat de maduració en què es troben. Les neurones joves, a més de tenir l'habilitat de migrar i estendre els axons i dendrites en ambients hostils i inhibitoris per les neurones madures, tenen més plasticitat neuronal que aquestes. Fet que permetria induir i augmentar amb més facilitat la potenciació a llarg termini²⁷.
- Les neurones recent creades en la ZSG modificarien el circuit hipocampal per tal d'augmentar la seva capacitat de processar informació que seria emmagatzemada eventualment com a memòria en el neocòrtex. La integració de neurones immadures en el gir dentat permetria a l'hipocamp guardar algunes connexions entre esdeveniments processats anteriorment. Així com també facilitaria l'aprenentatge i la memòria per associació d'elements.
- Estudis recents investiguen la possibilitat que la neurogènesi hipocampal podria estar implicada en processos de transformació del comportament i de les conductes animals. Per exemple, s'ha observat que en l'edat de l'adolescència o en l'època de l'embaràs hi ha un important augment de la neurogènesi, probablement influenciat pels forts canvis hormonals.
- Respecte a la funció de la neurogènesi en el bulb olfactori està bàsicament implicada en un aprenentatge olfatiu, el qual és molt important pels animals que fan un gran ús d'aquest sentit, com per exemple la majoria dels mamífers.

²⁷ **Potenciació a llarg termini (LTP):** és un increment persistent en la transmissió de senyals entre dues neurones que resulta de la seva estimulació. És considerada un dels principals mecanismes cel·lulars influent en l'aprenentatge i la memòria.

Actualment no hi ha suficients evidències de què la neurogènesi estigui implicada en l'emmagatzematge de la memòria, tal i com exposaven algunes de les anteriors hipòtesis. Més aviat es creu que s'encarrega d'ajustar la xarxa sinàptica hipocampal, dur a terme un possible paper protector i actuar com un mecanisme compensador.

Aquestes afirmacions es podrien corroborar amb el fet de què quan el cervell sofreix algun tipus de trauma, com una isquèmia, o bé l'individu pateix una malaltia neurodegenerativa, es produeix un augment de neurogènesi per intentar compensar la pèrdua de neurones. No obstant, això no és suficient per a la recuperació dels danys i, a més a més, no sempre resulta un mecanisme profitós. S'ha vist que l'increment de neurogènesi en el gir dentat durant les crisis epilèptiques no contribueix a la regeneració neuronal i possiblement podria originar nous atacs epilèptics.

L'existència de zones cerebrals capaces de produir neurones durant tota la vida de l'animal, obre la porta a l'esperança de regenerar aquelles zones del cervell humà en què, per malaltia o trauma, es produeix una pèrdua important de neurones.

Actualment, s'estan investigant els possibles trasplantaments de cèl·lules progenitores neuronals en les regions lesionades del cervell. En un principi, es creia que no podien regenerar-se fora de la seva regió d'origen.

Tanmateix, s'ha observat que en aquests trasplantaments s'han produït noves neurones de manera molt limitada, de morfologia diferent de les neurones del lloc de la trasplantació.

A dia d'avui, encara no es poden reemplaçar eficaçment les neurones perdudes en les lesions neurològiques mitjançant cèl·lules derivades de la zona subventricular ni subgranular. Ara bé, la recerca científica continua investigant la manera d'incrementar el potencial d'aquestes cèl·lules per dividir-se i desplaçar-se pel sistema nerviós, així com aconseguir que es diferenciïn en els tipus neuronals necessaris per reparar les àrees lesionades.

PRÀCTIQUES DE LABORATORI

5. MARCATGE DE NEURONES IMMADURES

5.1. Objectiu

Els objectius de l'apartat pràctic són els següents:

- Veure experimentalment alguns dels conceptes estudiats prèviament en l'apartat teòric del treball.
- Dur a terme una pràctica d'immunohistoquímica en un cervell de ratolí adult, amb l'ajut d'investigadors especialitzats.
- Comprovar si utilitzant l'anticòs Doblecortina es poden veure neurones immadures en les principals regions neurogèniques (la ZSV i el gir dentat).
- Finalment, estudiar l'expressió de Doblecortina en altres àrees cerebrals no considerades en estudis de neurogènesi adulta.

5.2. Materials i mètode

Al llarg de tot el procés experimental han estat utilitzats diferents aparells, utensilis, mesclres i substàncies químiques.

5.2.1. Aparells

- **Bany termostàtic: Precisdig capacitat 20 litres, sèrie 0490852, J.P.Selecta**
Té el mateix funcionament que un bany maria. S'utilitza per mantenir una substància, ja sigui líquida o sòlida, a una temperatura constant o bé per escalfar-la lentament. Hi ha banys termostàtics de diferents mides, amb agitació de l'aigua o sense i poden tenir una tapa per reduir l'evaporació. Concretament, el bany utilitzat té una capacitat de 20 litres, una tapa i no fa moviments d'agitació (*figura 21*).



Figura 21. Bany termostàtica Precisdig, J.P.Selecta

- **Micròtom de fulla vibrant VT 1000 S, Leica**

Concretament aquest aparell és un **vibràtom**, que és un tipus específic de micròtom. S'utilitza per tallar el teixit animal en seccions d'un gruix oscil·lable entre 40 i diversos centenars de μm .

Consta d'una cubeta (1), una fulla d'afaitar (2), un porta-mostres (3), una lupa (4), dos focus de llum (5) i un comandament de velocitat i vibració (6) (figures 22 i 23).

Una de les seves característiques és la cubeta regulable en altura, dins la qual es situa la mostra (7), empegada en el bloc porta-mostres, juntament amb una solució aquosa, normalment salina o tamponada (8).

Les mostres que es desitgen tallar poden ser col·locades directament en l'instrument o bé encastades prèviament en un bloc d'agarosa²⁸. No obstant, no totes les mostres són apropiades per ser tallades en vibràtom, ja que si són massa toves, dures o elàstiques són arrossegades per la fulla.

L'altra característica és la fulla d'afaitar, que a més d'avançar horitzontalment, té un moviment de vibració lateral que facilita el tall i evita emportar-se el teixit.



Figura 22. Micròtom de fulla vibrant VT 1000 S, Leica

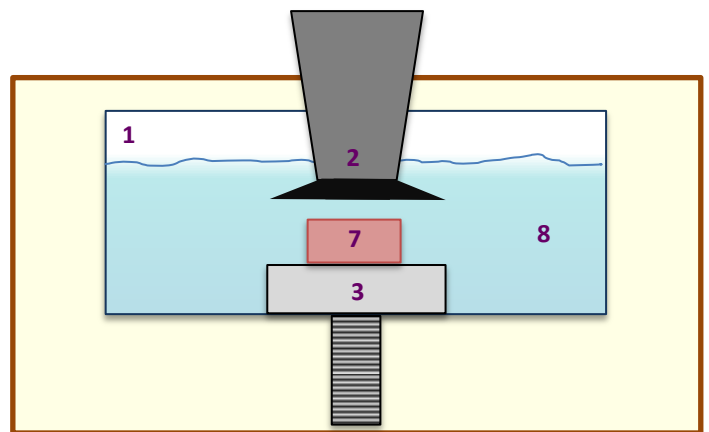


Figura 23. Esquema de les parts del micròtom de fulla vibrant

²⁸ **L'agarosa:** és un polisacàrid format per galactosa α i β extreta d'algues marines. S'utilitza per crear blocs on s'introdueix i es fixa un teixit. Veure preparació d'un bloc d'agarosa (pàg. 52)

- **Lupa binocular o estereomicroscopi: Stemi 2000, Zeiss**

És un instrument òptic que produeix una imatge augmentada de l'objecte que s'observa a través d'ella, sense necessitat d'una preparació especial.

Els augments que proporciona tan sols són d'un 10 a un 50% més de la mida original de l'observació. Per tant, la seva precisió és inferior a la d'un microscopi, tot i que el camp de visió és molt més gran.

La lupa binocular rep aquest nom perquè té dos sistemes oculars que permeten observar l'objecte amb els dos ulls a la vegada. Fet que dona una visió estereoscòpica, amb relleu. Està formada per dues parts (*figura 24*):

La part òptica:

Proporciona la llum necessària i augmenta la imatge de la mostra. Consta de:

- **Font d'il·luminació externa:** subministra la llum per il·luminar l'objecte.
- Dos sistemes de lents. Les dues més pròximes als ulls de l'observador s'anomenen **oculars (1)** i les altres dues **objectius (2)**.
- **Prismes inversors:** dos grups de lents que no proporcionen augments, però inverteixen la imatge perquè es percebi en la seva posició correcta.

La part mecànica:

Suporta l'estructura de la lupa i permet el moviment de les parts. Consta de:

- 3. Base
- 4. Columna
- 5. Platina
- 6. Pincers (opcional)
- 7. Zoom
- 8. Cos dels oculars
- 9. Cargol d'enfocament



Figura 24. Lupa binocular Stemi 2000, Zeiss

- **Lupa dual: Wild TYP 355110, Heerbrugg Swiss**

Té el mateix funcionament que la lupa binocular, amb la diferència que aquesta té un altre parell de lents oculars, de tal manera que poden haver dos observadors mirant la mateixa mostra.



Figura 25. Wild TYP 355110, Heerbrugg Swiss

- **Microscopi DMR, Leica**

El microscopi és un aparell òptic que serveix per observar de prop objectes molt petits, que no són visibles a ull nu. Concretament, el que es veu al microscopi òptic és la llum que travessa l'objecte, per la qual cosa és necessari obtenir una preparació per poder-ho visualitzar correctament. Les característiques més importants que definiran la qualitat de les seves imatges són els augments i el poder de resolució. La resolució en un microscopi és la capacitat d'oferir el detall, té un valor màxim de 0,2 micròmetres (μm). Els components s'agrupen en (figura 26):

Elements òptics:

1. **Condensador:** sistema de lents que concentra el feix de rajos lluminosos procedents de la font d'il·luminació, els quals són regulats pel **diafragma**
2. **Ocular**
3. **Objectiu**
4. **Font d'il·luminació**
5. **Prisma de desviació** (situat a l'interior)

Elements mecànics:

6. **Peu**
7. **Braç**
8. **Platina**
9. **Revòlver o portaobjectius**
10. **Tub òptic**
11. **Cargol macromètric**
12. **Cargol micromètric**

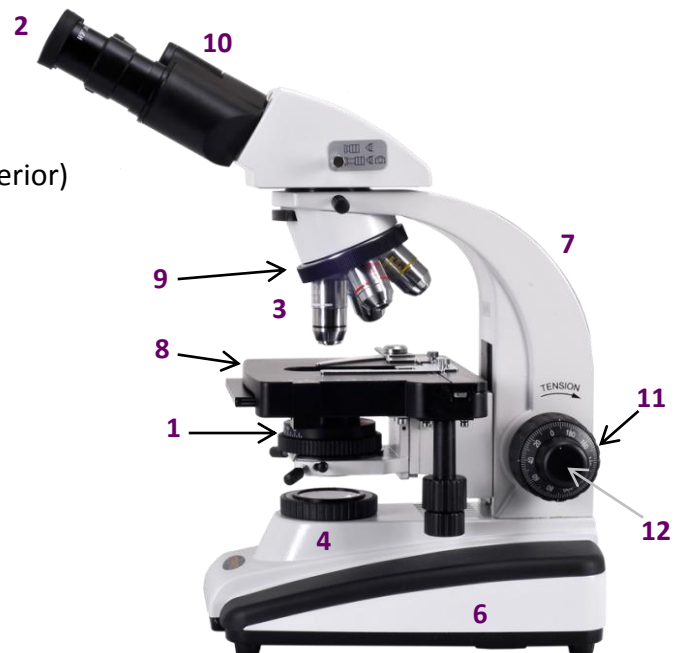


Figura 26. Parts d'un microscopi òptic

- **AxioCam HR 13 megapixel, Zeiss**

En alguns microscopis es pot incorporar, en la part superior, una càmera digital especial per poder fer fotografies a les mostres. La càmera AxioCAM HR és un dispositiu d'alta resolució amb un sensor que capta cada detall en els canals de vermell, verd i blau.



Figura 27. AxioCam HR 13 megapixel, Zeiss

- **Software ZEN 2012, Zeiss**

És un programa d'ordinador que permet modificar les imatges digitals capturades prèviament amb la càmera del microscopi.

- **Agitador mini orbital shaker SSM1, Stuart**

Consta d'una safata amb un motor incorporat per sota, el qual li permet un moviment circular uniforme amb una òrbita de 16 mm. L'acció d'agitació és ideal per a mostres de 0,5 a 5 ml mantinguts en plaques i altres recipients. Les dimensions de la plataforma són de 220 x 220 mm. Té un rang de velocitat variable de 30 a 300 rpm. La càrrega màxima que pot suportar és de 3kg. Es pot utilitzar en incubadores i càmeres ambientals, fins a 40 °C i 80% d'humitat (*figura 28*).



Figura 28. Agitador mini orbital shaker SSM1, Stuart

- **Agitador magnètic: Agimatic-N amb calefacció, J.P.Selecta**

És una placa sobre la qual es col·loca un recipient de base plana (matràs, vas de precipitats...) en el que prèviament s'introdueixen, junt amb la solució líquida, un petit imant recobert de tefló²⁹. Aquest imant, anomenat mosca, palometa, peix... agita la suspensió; és mogut per un altre imant situat sota la placa i impulsat per un motor. Alguns agitadors magnètics, com l'Agimatic-N, disposen d'un calefactor que permet escalfar la solució alhora que s'agita (*figura 29*).



Figura 29. Agimatic-N amb calefacció, Selecta

- **Agitador Vòrtex³⁰ 3, IKA**

És un dispositiu utilitzat per mesclar i homogeneïtzar el contingut de petits tubs o flascons de líquid. Es compon d'un motor elèctric amb l'eix de transmissió orientat verticalment i un tros de goma o cautxú on es recolza el recipient (*figura 30*). .



Figura 30. Agitador Vortex 3, IKA

²⁹ **Tefló o politetrafluoroetilè:** polímer similar al polietilè, on els àtoms d'hidrogen estan substituïts per fluor. És molt utilitzat en l'àmbit científic gràcies a què no reacciona amb substàncies o teixits.

³⁰ **Vòrtex:** és un flux giratori turbulent en rotació espiral, amb trajectòries de corrent tancades.

5.2.2. Utensilis

Gran part del material del laboratori està format per vidre o plàstic, ja que aquests dos materials tenen característiques pròpies que els fan útils i adients per a la investigació.

El vidre té poca reactivitat davant la gran majoria de productes químics, acostuma a tenir bona resistència tèrmica, és transparent, fet que permet observar les barreges o reaccions i el seu preu és raonable.

Per altra banda el plàstic, un material més modern, pesa molt poc, és resistent als cops i gràcies al seu preu baix acostuma a tenir un sol ús. A diferència del vidre, és menys precís en volumetria.

Els utensilis i estris que concretament hem utilitzat han estat:

- Proveta graduada
- Vas de precipitats
- Erlenmeyer
- Placa de petri
- Cristal·litzador
- Vareta de vidre
- Tubs d'assaigs de plàstic
- Graella
- Plaques de 6 vasets
- Pipetes Pasteur de plàstic
- Micropipetes
- Flascó netejador
- Tisores de dissecció
- Pincers fines i grosses
- Pincers dent de ratolí
- Guants de làtex
- Bisturí
- Tubs falcon
- Xeringues
- Pinzells de punta fina
- Portaobjectes
- Cobreobjectes

5.2.3. Animal d'experimentació

Per dur a terme aquesta pràctica s'ha utilitzat una femella albina de ratolí de laboratori, de l'espècie *Mus musculus*, (Muridae, Rodentia; Mammalia) que es trobava al dotzè dia de gestació. En un ratolí d'aquesta espècie la durada de la gestació és de divuit dies i dona lloc a una camada d'entre sis i dotze cries. El motiu pel qual utilitzarem una femella embarassada era perquè d'altres científics del grup necessitaven els embrions per a les seves investigacions. D'aquesta manera aprofitàvem el cervell de la mare i evitàvem el sacrifici d'un altre animal.



Figura 31. Ratolí albí de laboratori de l'espècie *Mus musculus*.

5.2.4. Substàncies químiques

- Anticòs Primari: Doublecortina o DCX (C-18): sc-8066, *Santa Cruz Biotechnology*
- Anticòs Secundari: Biotinylated Anti-Goat IgG (H+L), *Vector Laboratoris*
- Tampó PBS 1x, 10x
- Tritó
- Tris (0,05M)
- Tampó PBS·Tritó (0,3%)
- Aigua oxigenada (H₂O₂)
- PBS·Tritó+H₂O₂ (0,9%)
- Agarosa D1 Low EEO (per fer el bloc)
- Glycerol gelatin (GG1-15ml)
- DAB: 3,3'-diaminobencidina
- Kit complex ABC, *Vector Laboratoris*
- Paraformaldehid
- Halotà líquid
- Pentobarbital

5.2.5. Mètode

Per realitzar la tècnica de la immunohistoquímica vam seguir una sèrie de processos i protocols que ens permeteren obtenir uns resultats posteriorment analitzats.

a) Perfusió del ratolí (figura 32)

No he pogut participar activament en aquest procés, ja que per manipular animals en el laboratori cal tenir una formació específica, però vaig poder observar tot el procediment. Aquest requisit és recull en el *Real Decret del 1021/2005 sobre “La protecció dels animals utilitzats per l’experimentació i altres fins científics”*.

En primer lloc, per tal d’estalviar-li el sofriment, el ratolí és introduït en un recipient tancat, on hi ha un paper humitejat amb halotà (2-Bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoroetano). L’halotà és un líquid volàtil i incolor que s’empra com un anestèsic per inhalació.

Un cop el ratolí està adormit, se’l col·loca de panxa enlaire i se li injecta una sobredosi de Pentobarbital, una droga utilitzada com anestèsic per animals, que li causa la mort.

D’aquesta manera s’evita que l’animal es desperti durant la manipulació, fet que li podria causar un patiment innecessari.

A continuació, se li fa una incisió lateral a la paret abdominal que es prolonga al llarg de tota la caixa toràcica fins a la clavícula. Amb l’ajut de les tisores i les pinces se li aixeca la caixa toràcica per l’estèrnum i es talla acuradament qualsevol teixit connectat amb el cor.

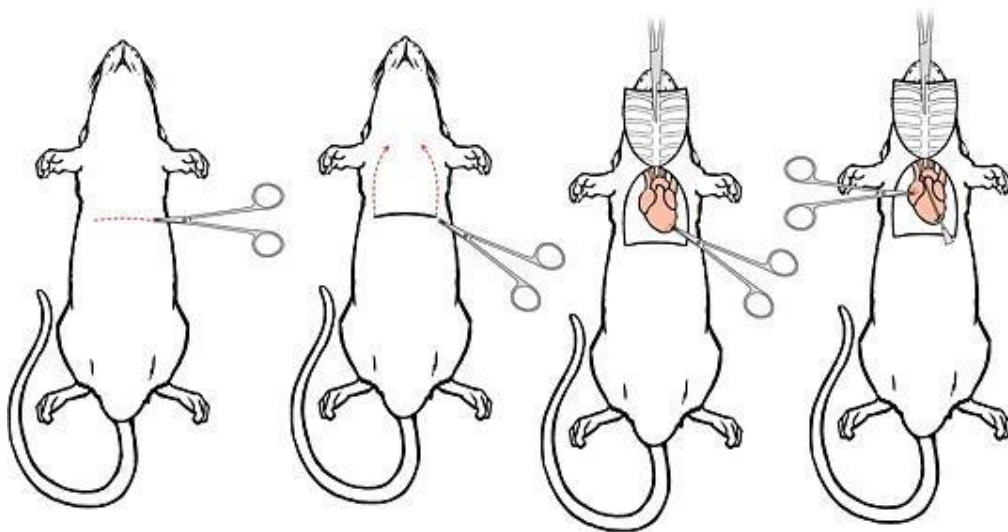


Figura 32. Obertura de la caixa toràcica d'un ratolí per dur a terme una perfusió.

Tot seguit se li fa una obertura a l'aurícula dreta i en el ventricle l'esquerra se li injecta una solució salina per drenar-li tota la sang que sortirà per l'obertura de l'aurícula.

Posteriorment, se li introdueix a través del ventricle una solució fixadora, paraformaldehid al 4% en PBS 1x, que circularà pel sistema sanguini (exceptuant el circuit pulmonar) i arribarà a totes les cèl·lules i teixits irrigats. La funció de la solució fixadora és evitar la degradació del teixit i intentar preservar les seves característiques, morfològiques i moleculars, més semblants a les que posseiria si fos viu.

Aquest mètode de fixació es pot dur a terme mitjançant una bomba peristàltica, que regula la pressió en la que s'ha d'introduir les solucions, o bé fer-ho manualment amb una xeringa, tal i com ho vam fer nosaltres. És molt important la pressió amb què s'introdueix la solució fixadora ja que si fos massa baixa no arribaria a totes les parts de l'estructura; per contra si fos molt elevada podria provocar ruptures en els teixits.

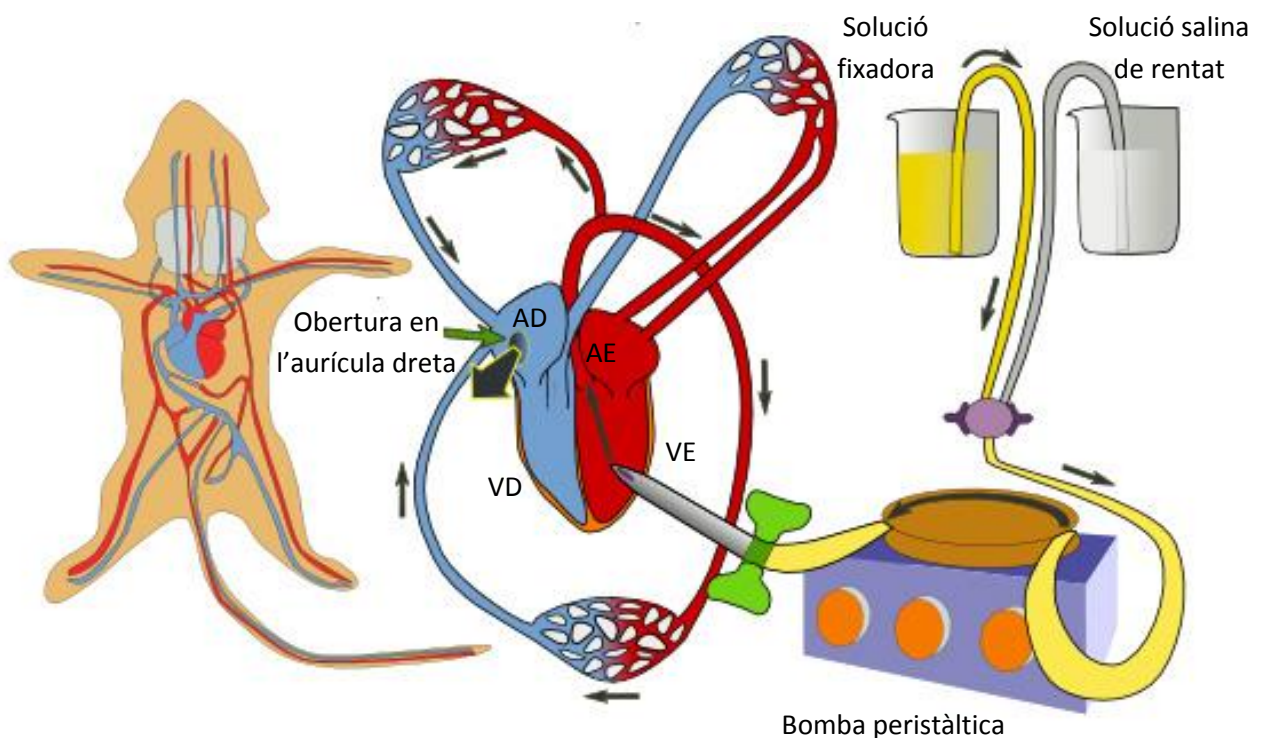


Figura 33. Fixació per perfusió d'un organisme complet de ratolí.

b) Extracció del cervell (figura 34)

Primer es separa el cap amb un parell de tisores (1). A continuació es fa una incisió a la pell al llarg de la línia central, des del coll fins al nas (2), i s'obre de tal manera que queda el crani exposat. Després es retalla el múscul del coll restant per poder accedir al forat magne, una obertura situada en la part occipital del cervell (3). Curosament s'insereix la punta afilada de les tisores pel forat magne, es fan uns talls a cada lateral (4) i utilitzant les pinces s'extreu el crani al voltant del cerebel (5). Posteriorment es fan lliscar les tisores al llarg de la superfície interna del crani, evitant tocar el cervell per no causar danys en la seva estructura. Amb l'ajut de les pinces s'acaba de treure la part restant del crani i quedarà tot el cervell a la vista (6). Finalment es tallen les connexions dels nervis cranials i amb una espàtula es treu el cervell fent palanca.

Acabada l'extracció, el cervell es fixa per immersió amb paraformaldehid al 4% en PBS 1x en un pH de 7,4 durant 12-48 hores. Passades aquestes hores s'extreu el cervell de la solució fixadora, es col·loca en PBS 1x i es guarda a la nevera o a la càmera de 4°C fins que s'utilitzi.

És recomanable que aquest cervell no estigui més d'una setmana a la nevera si s'ha d'usar per fer una tècnica d'immunohistoquímica.

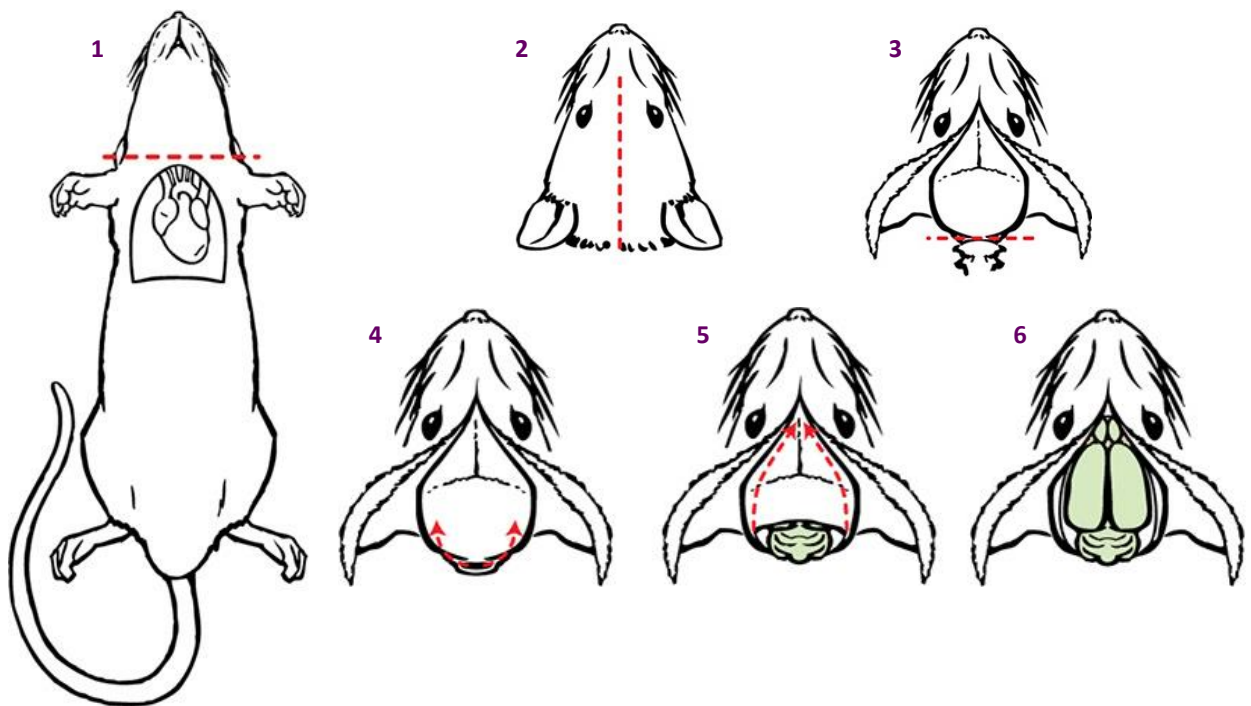


Figura 34. Procés d'extracció del cervell en un ratolí de laboratori.

c) Preparació dels tampons PBS 10x

Un tampó químic és la mescla d'un àcid dèbil i la seva base conjugada. Tenen la propietat de mantenir estable el pH d'una dissolució enfront a l'addició de petites quantitats d'àcids o bases forts. Concretament, el tampó fosfat salí (PBS) conté una concentració d'ions molt semblant al líquid extracel·lular dels mamífers, motiu pel qual s'utilitza en la investigació biològica. Per fer una preparació de 500 ml de PBS 10x es necessita:

- 40g de clorur de sodi (NaCl)
- 1g de clorur de potassi (KCl)
- 7,2 g de fosfat disòdic (Na_2HPO_4)
- 1,2g de fosfat de monopotassi (KH_2PO_4)

A continuació s'enrasa amb aigua *Milli-Q*, una aigua purificada i desionitzada per un sistema de purificació fabricat per *Millipore Corporation*. Finalment s'ajusta el pH a 7,4 amb l'ajut d'un pH-metre, instrument electrònic que mesura el pH.

Si es desitja preparar el tampó PBS 1x, es necessitaran 10 vegades menys de components.

d) Preparació d'un bloc d'agarosa

Per tallar el cervell en un vibràtom és aconsellable encastar-lo en un bloc d'agarosa.

Com que només hi ha una mostra, amb una placa de cultiu de 25 ml és suficient.

El procediment per a la preparació d'un bloc d'agarosa de 25ml al 4% és el següent:

- S'introdueix en un matràs aforat 1g d'Agarosa D1 Low EEO, i es dilueix en 25g de PBS 1x³¹.
- S'escalfa la mescla al microones perquè es dissolgui l'agarosa. Per obtenir un bon resultat és recomanable escalfar-la fins que surtin bombolles, tarda molt poc temps, deixar-la reposar uns segons i repetir aquest procés dues vegades més.
- Una vegada dissolt, es tapa el matràs amb paper d'alumini i es posa en el bany maria a uns 70-80°C perquè marxin les bombolles de l'interior.

Quan ja han desaparegut totes les bombolles, col·loquem la mescla en la placa de cultiu i la deixem refredar abans d'introduir-hi el cervell.

³¹ L'aigua té una densitat molecular de $1\text{g}/\text{cm}^3$. El PBS 1x té una densitat molt similar a l'aigua; per tant, aproximadament un 1ml de PBS 1x pesa 1g.

e) Laminació del cervell en el vibràtom

Abans de començar a tallar el cervell s'ha de preparar el bloc on es troba. En primer lloc es retalla el bloc per donar-li forma de prisma rectangular, orientant l'eix major del prisma amb l'eix major de l'encèfal. Després s'enganxa el bloc restant en el porta-mostres del vibràtom, pensant quins tipus de talls vols fer en el cervell.

Nosaltres vam crear la base del bloc en el bulb olfactiu perquè decidírem fer talls coronals a l'encèfal del ratolí.

Tot seguit s'introdueix el porta-mostres en la cubeta i es cobreix amb PBS fred, es neteja la fulla i es col·loca. Per mantenir la preparació a baixa temperatura es pot posar dues bossetes de gel al cantó de la cubeta, les quals s'hauran de canviar conforme es desfacin.

Els nostres talls han estat fets a un grossor de 100 μm i a una velocitat del tall de 3,5 mm/s. Conforme el vibràtom ha tallat les làmines, aquestes han estat recollides amb l'ajuda d'un pinzell i dipositades consecutivament en quatre plaques de cultiu de 25 ml.



Figura 35. Tauler de control del vibràtom Leica



Figura 36. Plaques de cultiu amb els talls del cervell



Figura 37. Mostra d'un tall coronal de cervell de ratolí

f) Protocol d'immunohistoquímica

La **immunohistoquímica** (ICH) és una tècnica que utilitza la interacció anticòs-antigen per identificar proteïnes específiques en cèl·lules o seccions de teixit. Generalment, l'anticòs es combina amb altres molècules, com enzims o substàncies fluorescents, per ajudar i millorar la visualització. Hi ha dos mètodes de tinció immunohistoquímica:

- **El mètode directe:** l'anticòs (Ig) primari etiquetat, conjugat amb un enzim o un marcador fluorescent, s'adhereix a l'antigen (Ag). És senzill de realitzar però la tinció pot sofrir falta de sensibilitat.
- **El mètode indirecte:** utilitza un anticòs secundari, conjugat amb un enzim o un marcador fluorescent, que s'uneix amb l'Ig primari, el qual fa interacció amb l'Ag.

Els **anticossos (Ig)**, també coneguts com **immunoglobulines**, són proteïnes sintetitzades pel sistema immunitari per identificar i neutralitzar elements estranys al cos.

En histoquímica s'empren per examinar l'expressió de proteïnes en seccions de teixits o localitzar-les en l'interior de les cèl·lules amb un microscopi. Hi ha dos tipus d'anticossos:

- **Anticòs monoclonal:** reconeix un únic epítop³² antigènic en concret. És considerat més específic que l'anticòs policlonal.
- **Anticòs policlonal:** és una mescla complexa i heterogènia d'anticossos, generalment purificats, que reconeixen diversos epítops antigènics.

En aquesta pràctica s'ha emprat anticossos policlonals IgG³³ i el mètode de tinció indirecte amb enzims i amb el complex ABC (*veure pàgina 56*).

L'Anticòs primari usat ha estat la Doblecortina (C-18): sc-8066 de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology. Aquest Ig concret, obtingut d'una cabra, és recomanat per detectar la C-terminal³⁴ de la proteïna Doblecortina (DCX) en ratolins, rates, humans i altres espècies com els èquids, canins, bovins, porcins i aviram. La proteïna **Doblecortina (DCX)** s'expressa en neurones immadures, en neurones que estan migrant o bé que es troben en una etapa primerenca del procés de diferenciació.

³² **Epítop:** també anomenat **determinant antigènic** és la part més petita de la molècula d'antigen capaç de suscitar la resposta del sistema immunològic.

³³ **IgG:** són un tipus específic d'anticossos.

³⁴ **C-terminal:** es refereix a l'extrem d'una proteïna que té un grup carboxil lliure (-COOH).

El procés comença quan s'extreuen els talls de la nevera, que reposaven en PBS 1x, i es segueixen un passos determinats:

- Es fan 3 rentats³⁵ en PBS·Tritó (0,3%) deixant-ho 10 minuts en agitació (56 rpm) després de fer cadascun d'ells.

El **Tritó** és un compost químic, soluble en aigua a 25°C, líquid, transparent i viscos.

Té diferents utilitats en els laboratoris biològics, però en aquesta tècnica s'empra perquè solubilitza proteïnes de la membrana citoplasmàtica fent que les molècules exògenes entrin fàcilment a través d'ella.

- Es fa 1 rentat en PBS·Tritó (0,3%)+H₂O₂ (0,9%) i s'agita durant 15 minuts a una velocitat més suau (50 rpm). És important tapar la placa amb paper d'alumini mentre s'agita.

L'aigua oxigenada o peròxid d'hidrogen (H₂O₂) s'utilitza per desactivar la peroxidasa endògena i evitar soroll de fons durant el revelat degut a l'acció d'aquesta peroxidasa endògena. La **peroxidasa** és un enzim³⁶ que catalitza l'oxidació d'un ampli número de substrats orgànics i inorgànics, emprant el poder oxidant del peròxid d'hidrogen. En aquesta tècnica s'utilitza com un revelador.



- Es tornen a fer 3 rentats en PBS·Tritó (0,3%) amb 10 minuts d'agitació (56 rpm) després de cada rentat.

- S'afegeix l'anticòs primari (DCX) i s'incuba 2-3 nits a 4°C en agitació suau (33 rpm)

L'anticòs primari s'ha dissolt en PBS·Tritó (0.3%) a una concentració de 1:100.

Els anticossos primaris poden reutilitzar-se fins a 5 vegades si es conserven a 4°C.

- Es fan 3 rentats, per treure l'anticòs primari que no ha reaccionat, en PBS·Tritó (0,3%) amb agitació (56 rpm) de 15 minuts cadascuna.

És aconsellable fer més rentats en cas de dubtar si les mostres han quedat completament netes de l'Ac primari.

- S'afegeix l'anticòs secundari i s'incuba durant 1,5 hores i amb agitació suau (50 rpm).

L'anticòs secundari utilitzat és Anti-Cabra Biotinilat IgG (H+L) extret de conill. La seva dissolució en PBS·Tritó (0,3%) té una concentració de 1: 200.

³⁵ **Rentat:** canvi del líquid inicial que contenia una mostra per una altra solució líquida.

³⁶ **Enzim:** proteïna que catalitza les reaccions químiques (és a dir, n'augmenta la velocitat de reacció)

- Fer dos rentats en PBS·Tritó (0,3%) amb agitació (56 rpm) de 10 minuts cadascuna.
- Durant l'estona d'espera en què reposa l'anticòs secundari, és aconsellable preparar el complex ABC, ja que com ha mínim ha d'estar preparat 30 minuts abans del seu ús.

El **complex ABC** o també anomenat **Avidina-Biotina-Peroxidasa** és un mètode per millorar la intensitat de tinció de les tècniques immunohistoquímiques, ja que l'avidina i la biotina formen complexos que amplifiquen la senyal. Per preparar aquest complex es necessita:

13,3 µl Avidina

13,3 µl Biotina

4 ml Tritó (0,3%)

L'Avidina: glicoproteïna³⁷ d'alt pes molecular (67.000 D), produïda en l'oviducte³⁸ dels ocells, rèptils i amfibis que es diposita en la clara de l'ou. Presenta quatre llocs d'unió amb la Biotina i pot conjuguar-se amb diversos marcadors.

La Biotina: vitamina de baix pes molecular (244 D), que presenta una forta afinitat per l'avidina. Es troba distribuïda en els ronyons, fetge, teixit adipós i glàndules mamàries dels mamífers. Procedeix de la dieta i de les bacteries intestinals.

La unió avidina-biotina es caracteritza per ser 10⁶ vegades més estable que la presentada per l'antigen (Ag) en front l'anticòs (Ac); a més és una interacció ràpida i pràcticament irreversible, a diferència de la unió Ag-Ac.

- Deixar la mostra amb l'ABC durant 1 hora en agitació.
- Fer 1 rentat en PBS·Tritó (0,3%) amb agitació (56 rpm) de 10 minuts i descartar l'ABC.
- Fer 2 rentats en Tris (0,05M) amb agitació (56 rpm) durant 10 minuts.

Els **Tris** és un compost orgànic, (CH₂OH)₃CNH₂, que s'utilitza com a component per preparar tampons i per alterar l'activitat enzimàtica.

- Preparar i aplicar el revelador DAB.

El **DAB** o **3,3'-diaminobencidina** és un compost orgànic derivat del benzè, soluble en aigua que quan s'oxida es torna de color marró.

³⁷ **Glicoproteïna:** biomolècula formada per una proteïna i un carbohidrat.

³⁸ **Oviducte:** via de pas des dels ovaris fins a l'exterior del cos, es per on es desplacen els ous.

És utilitzat en la tinció dels àcids nucleics i de les proteïnes, sobretot en tècniques immunohistoquímiques. En aquests procediments el DAB és catalitzat fàcilment a la seva forma oxidada (de color marró) degut a la presència de la peroxidasa, que és l'enzim del complex ABC. S'ha de controlar el temps en què està en contacte amb les mostres perquè produeix un revelat molt ràpid.

Com que és un compost cancerigen s'ha de manejar amb compte i tot el que toqui ha d'anar a unes escombraries especials.

Per fer la preparació es mescla en un flascó de laboratori 5ml d'aigua molecular (H₂O), una tableta d'urea i una tableta de DAB (ja ve tot preparat). A continuació es tapa el flascó, es cobreix amb paper d'alumini i s'agita vigorosament, es pot fer anar el vòrtex.

- Es fan 2 o 3 rentats en Tris (0,05M) i després es posa en agitació durant 10 minuts.
El líquid sobrant (que conté residus de DAB) s'ha de mesclar amb lleixiu i tirar en un recipient especial.
- Es fan 2 rentats en PBS 1x i es deixen els talls amb PARA (Paraformaldehid) al 4% en un frigorífic a 4°C fins al seu posterior muntatge.

g) Preparació de les mostres

En primer lloc s'escalfa la gelatina, el glicerol i es netegen els portaobjectes amb alcohol.

S'agafen les mostres curosament amb un pinzell i es depositen en el portaobjectes.

En el nostre experiment, degut a la grandària dels talls, tan sols vam fer una única fila a cada portaobjectes. Una vegada ja estan col·locats s'humitegen amb unes gotes de gelatina i es deixen assecar uns minuts. A continuació es posa en la part central del portaobjectes i del cobreobjectes una tira de glicerol, procurant que no hi quedin bombolles. Abans que es refredi el glicerol s'uneixen el portaobjectes i el cobreobjectes.

Per ajudar a què el glicerol s'expandeixi per tot el portaobjectes es pot escalfar uns segons en l'agitador magnètic amb calefacció. Finalment es retolen les mostres.

5.3. Resultats

En aquesta pràctica experimental d'immunohistoquímica es pretenia observar el marcatge de neurones immadures en el cervell d'una femella albina de ratolí de laboratori, de l'espècie *Mus musculus*, utilitzant l'anticòs per a la doblecortina (DCX), una proteïna citoplasmàtica que s'associa als microtúbuls de les neurones joves amb capacitat migratòria.

Aquest anticòs dóna un marcatge de tot el citoplasma cel·lular, això permet observar la morfologia de les cèl·lules i en alguns casos, diferenciar entre neuroblastos en migració i neurones joves. Fins i tot, és possible observar alguns axons tenyits.

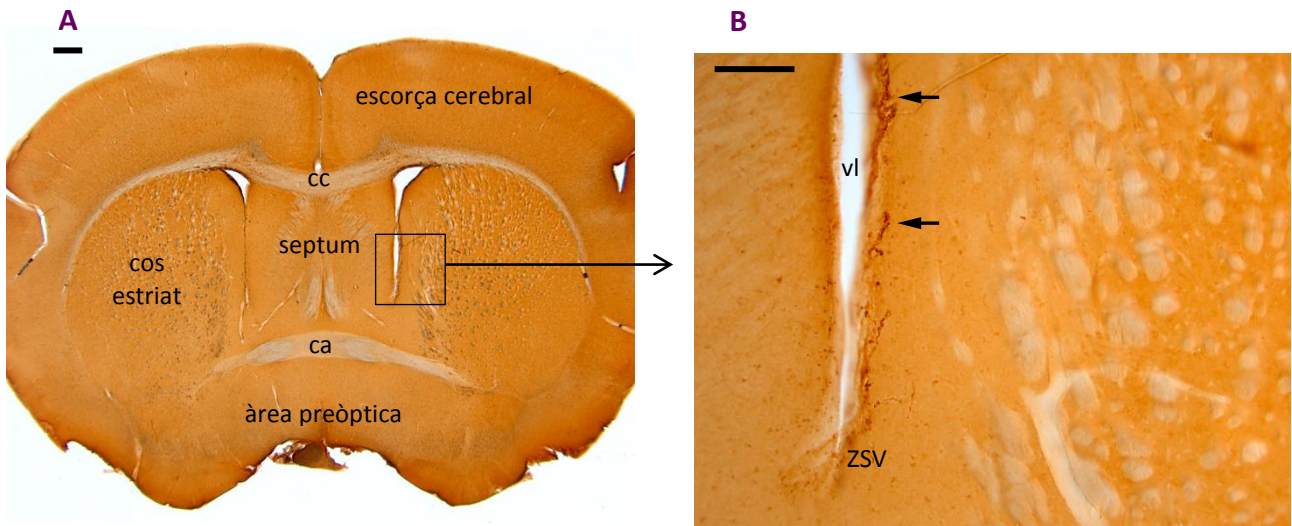
En el nostre material s'observen cèl·lules marcades, algunes amb morfologia de neuroblastos en migració, en la zona subventricular (ZSV) i la via rostral migratòria (Figura 38 A,B,C,D), i la zona subgranular de la formació hipocampal (ZSG) (Figura 39 A,B,C,D); i cèl·lules marcades amb morfologia neuronal en les zones en què prèviament s'ha descrit neurogènesi adulta, com són els bulbs olfactors (Figura 38 E,F) i la fàscia dentada de l'hipocamp (Figura 39 A,B,C,D). A més a més, hem observat cèl·lules marcades amb morfologia clarament neuronal en zones de l'escorça piriforme i entorrinal en les que no s'ha descrit neurogènesi adulta en estudis previs (Figura 39 E,F).

Les dues figures que acompanyen aquesta secció de resultats mostren una selecció d'imatges representatives de les àrees d'estudi, obtingudes amb el microscopi òptic.

A continuació faig una descripció detallada de cadascuna d'elles.

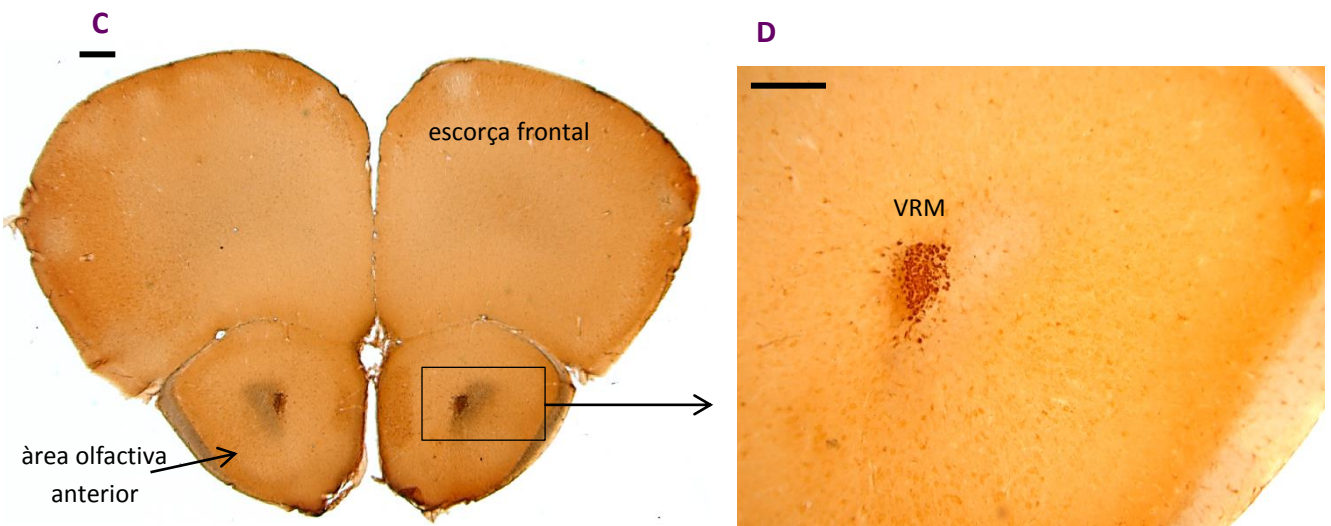
Figura 38.

Aquesta figura mostra sis talls coronals que pertanyen a les diferents regions cerebrals involucrades en el procés de neurogènesi adulta del bulb olfatori principal. L'escala gràfica de les imatges **A, C, E** representa 0,5 mm, i en les seves respectives ampliacions **B, D, F**, el segment de referència de l'escala gràfica és igual a 0,25 mm.



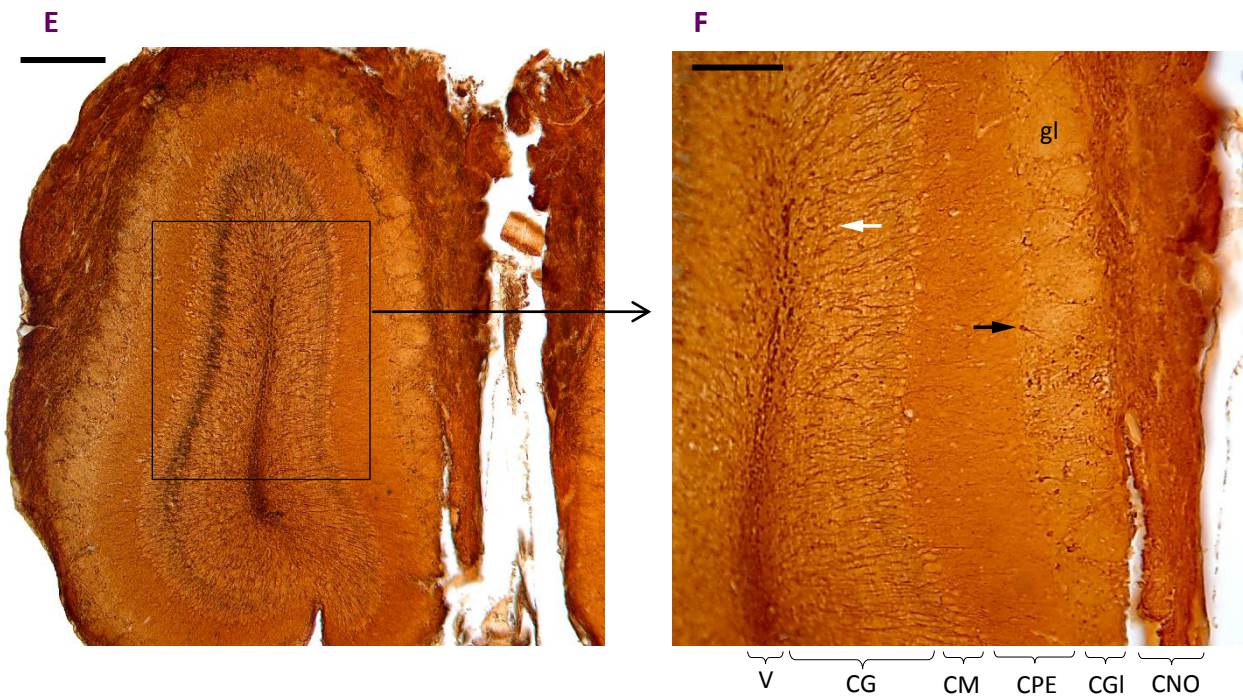
En **A** s'observa un tall coronal, en la part superior del qual hi ha l'escorça cerebral. Per sota seu, s'estén horitzontalment el cos callós (cc) entre els dos hemisferis cerebrals. En el centre es troba situat el Septum, delimitat inferiorment per la comissura anterior (ca) i l'àrea preòptica, i lateralment pels ventricles laterals (vl) i el cos estriat.

En **B**, ampliació de la zona ventral del ventricle lateral, al voltant del qual s'estén la ZSV, es pot observar la presència de cadenes de dos o tres neuroblastos marcats amb l'anticòs anti-DCX (assenyalats amb una fletxa). Els neuroblastos s'agrupen en cadenes per migrar a través de la via rostral migratòria (VRM).



En **C**, àrea rostral posterior als bulbs olfactoris, s'observen: l'escorça frontal, l'àrea olfactiva anterior i la VRM al centre d'aquesta. En la VRM tant en **C** com en **D** s'observen cèl·lules marcades (DCX+) de color més fosc, que són els neuroblastos que estan migrant des de la ZSV fins als bulbs olfactoris.

En **D** es distingeixen clarament els neuroblastos, de forma ovalada o circular degut a què han sigut seccionats transversalment.



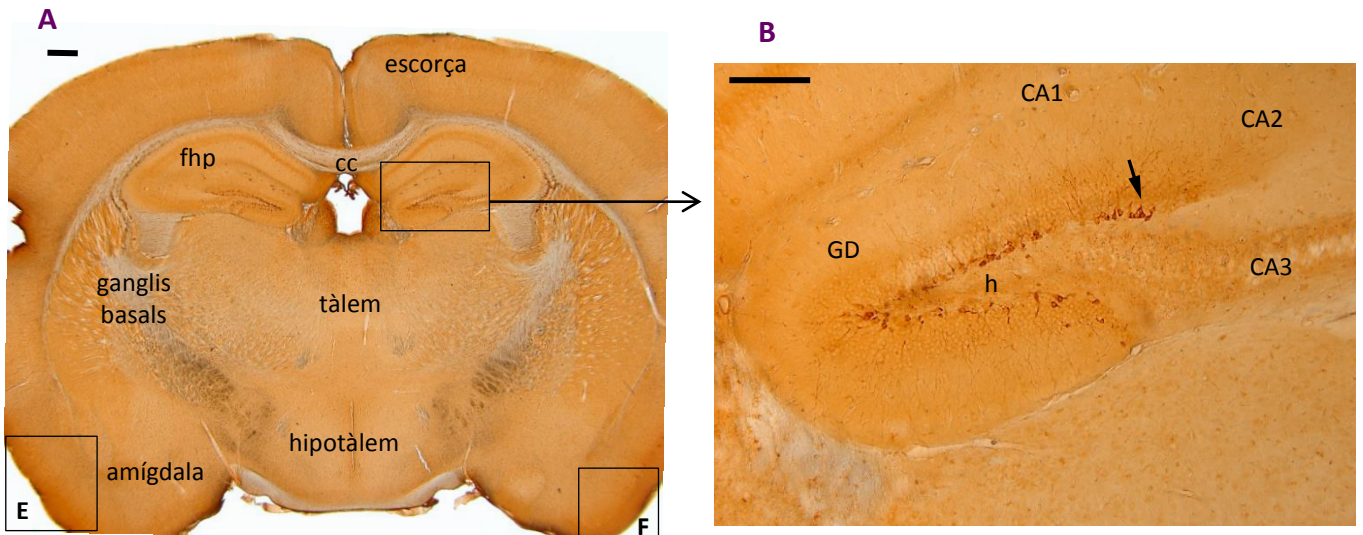
En **E** es mostra un pla general del bulb olfatori que és ampliat amb més detall en **F**, on s'aprecien les diferents capes concèntriques, la més interna és la ventricular (v), posteriorment la capa granular (CG), la capa mitral (CM), la capa plexiforme externa (CPE), la capa glomerular (CGI) i finalment la capa dels nervis olfactoris (CNO).

Moltes de les neurones granulars, situades radialment al voltant de la zona ventricular, es troben marcades (DCX+). Les seves prolongacions dendrítiques s'estenen radialment per la capa plexiforme externa, assenyalades en la imatge mitjançant un fletxa blanca.

D'un color més clar i en forma ovalada, s'aprecien el glomèruls (gl), al voltant dels quals hi ha algunes neurones periglomerulars marcades, indicades amb un fletxa negra.

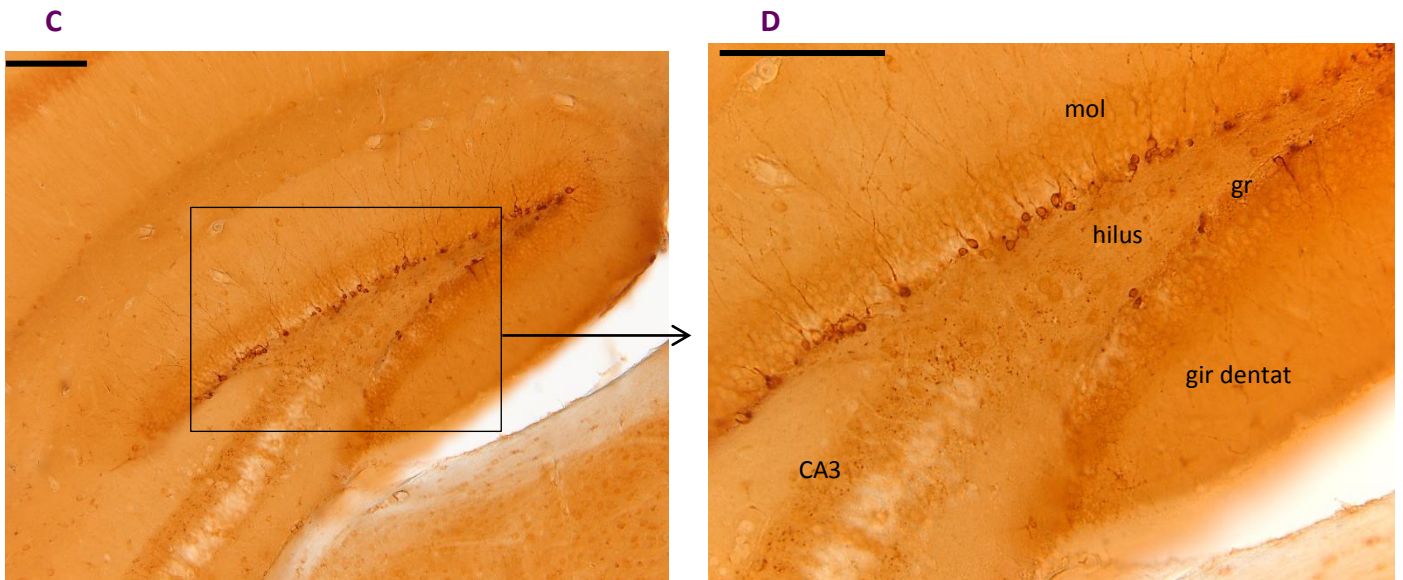
Figura 39.

Aquesta figura mostra sis talls coronals corresponents a nivells telencefàlics caudals a la comissura anterior. El segment de referència de l'escala gràfica de la imatge **A** representa 0,5 mm, i en les seves respectives ampliacions **B**, **E**, **F** junt amb **C** i **D** és igual a 0,25 mm.

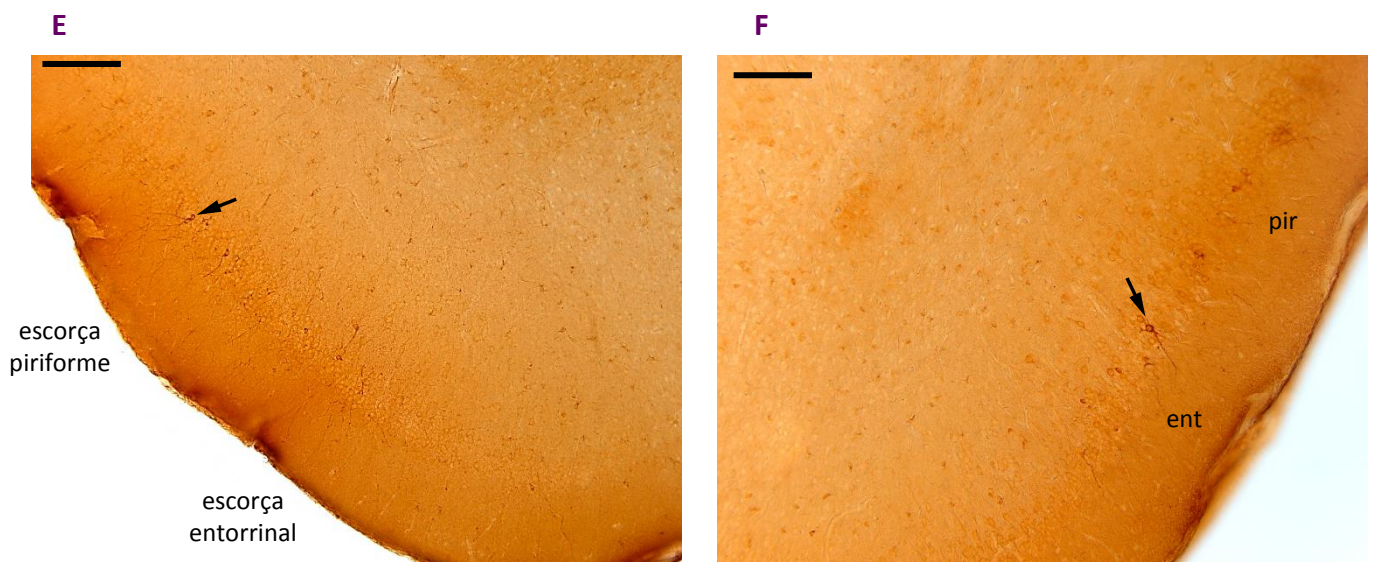


En **A** s'observa l'escorça cerebral en la part superior. Per sota seu, s'estén horitzontalment el cos callós (cc) entre els dos hemisferis cerebrals. A continuació, hi ha la formació hipocampal (fhp) una a cada hemisferi, formant una imatge especular. En el centre d'aquesta secció es troba situat el tàlem i l'hipotàlem (ca), i lateralment es situen els ganglis basals i l'amígdala.

En **B**, ampliació d'**A**, s'aprecia amb més detall la formació hipocampal on es diferencien el gir dentat (GD), l'hilus (h), i les regions CA1, CA2 i CA3. Aquesta mateixa àrea també es troba fotografiada en les imatges **C** i **D**.



En **D**, es poden distingir amb més precisió totes les zones. En la zona granular (gr) del gir dentat estan marcades les neurones immadures que ja han migrat una curta distància des de la ZSG. Aquestes neurones han estès els seus axons fins arribar a les cèl·lules piramidals de la CA3, on es poden apreciar uns petits puntets que són els seus botons sinàptics. A més les noves neurones projecten les seves dendrites en sentit oposat a l'axó, direcció a la capa molecular (mol).



En **E** i **F**, ampliacions de la part ventro-lateral d'**A**, corresponent al lòbul temporal, es mostra part de l'escorça piriforme i de l'escorça entorrinal. En ambdues zones hi ha algunes neurones marcades.

5.4. Discussió

Totes aquestes imatges han servit per confirmar que les dues zones principals del cervell amb neurogènesi en l'edat adulta són el bulb olfactiu i l'hipocamp, en les quals hi ha un alt grau d'incorporació de neuroblastos.

Fins i tot en els bulbs olfactoris sembla excessiva la gran quantitat de neurones que han sortit marcades en la immunohistoquímica. Aquest fet podria ser degut a què l'animal emprat en la pràctica era una femella de l'espècie *Mus musculus* que es trobava al dotzè dia de gestació. Tal com mostren alguns estudis, durant el període de l'embaràs la neurogènesi en els bulbs olfactius pot arribar a incrementar-se fins a un 65%, provocada pels forts canvis hormonals. Bàsicament es produeixen més interneurons, que implica una millora de la capacitat olfactiva. Aquest procés sembla ser molt important per la conducta maternal ja que la informació olfactiva és fonamental per al reconeixement dels fills i l'exhibició de comportaments maternals.

Una altra dada molt interessant i sorprenent és l'aparició de neurones marcades tant en l'escorça piriforme com en l'escorça entorrinal. No es pot assegurar amb certesa que siguin neurones de nova producció ja que la proteïna doblecortina també s'ha relacionat amb remodelacions sinàptiques i processos de plasticitat. Per confirmar-ho es pot utilitzar a més de la DCX, algun marcador de proliferació cel·lular com per exemple la BrdU.

Tant en el cas de què aquestes neurones marcades fossin noves, com en el que el marcatge indiqués remodelació sinàptica, es podria relacionar amb el fet que l'escorça piriforme i l'entorrinal reben informació directa des dels bulbs olfactoris, i per tant participen en el processament de la informació olfactiva. Concretament, l'escorça piriforme està involucrada en la percepció olfactiva; mentre que l'escorça entorrinal és la principal via d'entrada d'informació a l'hipocamp i està relacionada amb processos de memòria.

6. CONCLUSIÓ

Una vegada finalitzat el treball, després d'haver fet una recerca teòrica sobre el tema de la neurogènesi i dut a terme una pràctica experimental per comprovar personalment la seva existència, he arribat a les següents conclusions:

- Durant l'etapa post-natal continua havent proliferació, diferenciació i maduració de noves cèl·lules nervioses. Aquest descobriment, corroborat actualment per molts científics, ha significat la ruptura d'un dels dogmes fonamentals de la neurociència mantingut fins fa poques dècades.
- Les àrees cerebrals amb major activitat neurogènica en l'edat adulta són la zona subventricular (ZSV) i la zona subgranular (ZSG). Tot i que també hi ha d'altres regions amb una baixa producció de noves neurones, com per exemple algunes zones de l'escorça, concretament en el nostre treball l'escorça piriforme i l'entorrinal.
- La neurogènesi de la ZSV i de la ZSG tenen característiques comunes: les cèl·lules mare neuronals són els astròcits, anomenats cèl·lules tipus B, i les noves neurones abans d'integrar-se sinàpticament i finalitzar el procés de maduració, segueixen una sèrie d'etapes seqüenciades.
- La taxa de neurogènesi en el cervell adult disminueix amb l'edat. No obstant, en algunes etapes de la vida en les quals hi ha forts canvis hormonals, com per exemple l'adolescència i el període de gestació de les femelles, hi ha un increment de la proliferació, especialment en la ZSV.
- La fixació i extracció del cervell de ratolí per utilitzar en una pràctica experimental, és un procés molt delicat, en el qual s'ha de seguir uns passos concrets per evitar el sofriment de l'animal i que el teixit cerebral es degradi .
- La utilització de l'anticòs Doblecortina (DCX) per observar neurogènesi en un cervell adult és eficaç, però no del tot precisa. Hi ha la possibilitat que el DCX a més d'expressar-se en neurones immadures, que estan migrant o bé que es troben en una etapa primerenca del procés de diferenciació, es manifesti també en neurones que estan fent remodelacions sinàptiques. En qualsevol cas es pot considerar un bon marcador de plasticitat neuronal.

Personalment, considero que aquest treball ha estat un projecte molt interessant, enriquidor i especialment gratificant, sobretot tenint en compte que el procés no ha estat gens fàcil.

En el moment d'iniciar la part teòrica no tenia cap coneixement previ de la neurogènesi adulta, fins i tot en desconeixia la seva existència. Respecte a la part pràctica, em trobava en una situació similar d'inexperiència.

És per això que em sento especialment satisfeta d'haver sigut capaç d'entendre el tema. No descarto en un futur aprofundir els meus coneixements en aquest àmbit si se'm presenta l'oportunitat de fer-ho.

D'altra banda, m'he adonat de la importància de tenir fluïdesa en l'ús de la llengua anglesa perquè la major part dels documents científics estan escrits en aquest idioma.

Finalment, esmentar la gran oportunitat de fer pràctiques en un laboratori de renom, on he pogut entrar en contacte amb la terminologia específica, familiaritzar-me amb els estris i tècniques utilitzades, conèixer professors de la UdL i alumnes en pràctiques. Tot plegat m'ha permès fer-me una idea de cap on vull encarar els meus futurs estudis.

7. BIBLIOGRAFIA

7.1. Llibres

- BRÍO, M^a Angeles; RIERA, Pedro. Manual de bases teórico-prácticas de inmunocitoquímica. Oviedo: Universidad de Oviedo, 1995.
- CUELLO, Josep; DOMÍNGUEZ, Antoni; PONS, Jordi. *Biología 1r Batxillerat*. Barcelona: Barcanova, 2008.
- DOMÍNGUEZ, Laura. “Efectos de la cocaína y del tolueno sobre la neurogénesis en el hipocampo de rata”. Tesis doctoral. Universitat de València, 2010.
- ESCUADERO, Bibiana. [et al.]. *Estructura y función del cuerpo humano*. 2a ed. Madrid: McGraw-Hill, 2002.
- FUSTER, Almudena. “Estudio de la neurogénesis adulta en un modelo murino de sobreexpresión condicional de la glucógeno sintasa quinasa-3 β ”. Tesis doctoral. Madrid, 2011.
- GARCÍA, M^a José; SILVA, M^a del Carmen. *Manual del Técnico Superior de Laboratorio de Análisis Clínicos*. Sevilla: MAD, 2004.
- GELONCH, Núria; SERRA, M. Mercè. *Biología humana*. Barcelona: Castellnou, 1999.
- GONZÁLEZ, Gloria. “Neurogénesis y gliogénesis en el cerebro rostral del ratón adulto heterocigoto para Pax6”. Tesis doctoral (Salamanca, 2010).
- GUNTIÑAS, E. [et al.]. *Biología 1*. Barcelona: Casals, 2008.
- RÍOS, Joaquín [et al.]. *El treball de recerca*. Barcelona: Rosa Sensat, 2008.
- VERGAÑO, Eva. “Generación de interneuronas gabaérgicas y dopaminérgicas a partir de células madre y precursores de bulbo olfatorio embrionario y adulto”. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, Madrid 2006.
- WATSON, Charles [et al.]. *The Brain: An Introduction to Functional Neuroanatomy*. London: Elsevier, 2010.

7.2. Articles

- AMREIN, I.; LIPP, H.P. “Adult hippocampal neurogenesis of mammals: evolution and life history”. *Biology Letters* (february 2009), vol. 5 (1), p. 141-144.
- Arch Neurocién Mex* 2011; 16(4), p. 193-199.
- ARIAS-CARRIÓN, O; DRUCKER-COLÍN, R. “Neurogénesis como estrategia terapéutica para regenerar el sistema nervioso central”. *Revista de neurología*, ISSN 0210-0010, Vol. 45, Nº. 12, (2007), p. 739-745.
- ARIAS-CARRIÓN, O; OLIVARES-BAÑUELOS, T; DRUCKER-COLÍN, R. “Neurogénesis en el cerebro adulto”. *Revista de neurología*, ISSN 0210-0010, Vol. 44, Nº. 9, (2007), p. 541-550.
- CURTIS, M.A., Kam, M. and Faull, R. L. M. “Neurogenesis in humans”. *European Journal of Neuroscience* (2011), vol. 33, p. 1170–1174. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07616.x

- DE PABLO, Flora. "Células madre neurales, neurogénesis y neuroprotección". En: *Células Madre y Terapia Regenerativa*, F. de Pablo y M. Cascales Angosto (eds.) Monografía XXVII, Real Academia Nacional de Farmacia, (2009), p. 101-130.
- ERIKSSON, Peter [et al.]. "Neurogenesis in the adult human hippocampus". *Nature Medicine* 4, p. 1313-1317 (november 1998). doi:10.1038/3305
- FERRETTI, Patrizia. "Is there a relationship between adult neurogenesis and neuron generation following injury across evolution?". *European Journal of Neuroscience* [London: Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing], vol. 34, (juliol 2011), p. 951-962.
- GAGE, Fred H. "Neurogenesis in the adult brain". *Journal of Neuroscience* (February 2002). 22(3), p. 612-613.
- GHEUSI, G.; ORTEGA-PEREZ, I.; MURRAY, K.; LLEDO, P.M. "A niche for adult neurogenesis in social behavior". Elsevier. *Behavioural Brain Research* (June 2009), Vol. 200, Issue 2, p. 315-322.
- GÖTZ, Magdalena; B. HUTTNER, Wieland. "The cell biology of neurogenesis". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, p. 777-788 (October 2005)
- GOULD, Elizabeth. "How widespread is adult neurogenesis in mammals?" *Nature Reviews, Neuroscience*. Volume 8 p. 481-488 (June 2007)
- HERNÁNDEZ-RABAZA, Vicente; ROSEL, Jesús; CANALES, Juan José. "Neurogènesi en el cervell adult i salut mental". *Anuari de l'Agrupació Borrianenca de Cultura: revista de recerca humanística i científica* (2011); XXII, p. 51-68
- LINDSEY, B.W.; TROPEPE, V. "A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis". Elsevier. *Progress in Neurobiology* (December 2006), Vol. 80, Issue 6, p. 281-307.
- MING, Guo-li; SONG, Hongjun. "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." *Annu. Rev. Neurosci.* 28 (2005): 223-250.
- MORENO MONTOYA, Margarita; NIETO ESCAMEZ, Francisco A. "Neurogénesi en el giro dentado del hipocampo: implicaciones para el aprendizaje y la memoria en el cerebro adulto".
- PIATTI, Verónica del Carmen. "Maduración neuronal en el giro dentado del hipocampo adulto". Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, 2009
- RODRÍGUEZ, Sara "Activación de la neurogénesi en el hipocampo de ratón adulto por factores embrionarios" Máster en investigació biomèdica, Universidad de Valladolid.
- SANTOS-MARCIAL, Edgar. "Neurogénesi de células progenitoras de la zona subventricular". *Revista Mexicana de Neurociencia*, 2008; 9(3), p. 202-205.
- SMULDERS, T.V. "The relevance of brain evolution for the biomedical sciences". *Biology Letters* (February 2009), vol. 5 (1), p.138-140.

7.3. Webs

Totes les pàgines web que es citen a continuació s'han consultat entre el juny i el desembre de 2014.

MOLIST, Pilar; POMBAL, Manuel Ángel; MEGÍAS; Manuel. *Atlas de histología vegetal y animal* [en línia]. Actualització: 29-06-2014. <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>

GAGE, Gregory; KIPLER, Daryl; SHAIN, William. *JOVE: Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents* [en línia]. Cambridge 2013. <http://www.jove.com/video/3564/whole-animal-perfusion-fixation-for-rodents>

AIMONE, James; JESSBERGER, Sebastian; GAGE, Fred. *Adult neurogenesis. Scholarpedia* [en línia] 2007; Disponible a: <http://www.scholarpedia.org/article/Neurogenesis>

Agarosa [en línia]. Viquipèdia. 2014. Disponible a: <http://ca.wikipedia.org/w/index.php?title=Agarosa&oldid=13876513>

Allen Brain Atlas [en línia]. 2014 Disponible a: <http://www.brain-map.org/>

Dr. KRISTEN Harris. *Anatomy, 3D reconstructions* [En línia]. 2010 [citat 29 novembre 2014]. Disponible a: <http://synapses.clm.utexas.edu/anatomy/index.stm>

Universidad de la Frontera. *Apuntes Neuroanatomia-UFRO* [en línia]. 2009. Disponible a: http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/index_archivos/Page391.htm

Asociación Educar: *Ciencias i Neurociencias* [en línia]. Actualització 2014 Disponible a: <http://asociacioneducar.com/>

Corteza cerebral [en línia]. Wikipedia. 2014. Disponible a: http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Corteza_cerebral&oldid=77507007

Junta de Andalucía. *El Sistema Nervioso*. [en línia]. Disponible a: <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/~29701428/salud/nervio.htm>

RAMÍREZ, Gerardo [et al.]. *Las zonas neurogénicas en el adulto y su relación con las enfermedades neuropsiquiátricas. Salud mental* [en línia]. Actualització 2013. Disponible a: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0185-33252013000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

ARGENBIO. *Los cultivos celulares* [en línia]. Biotecnología. 2007. Disponible a: <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=98>

Química Laboratorios SAC. *Materiales de Laboratorio* [en línia]. 2012. Disponible a: <http://www.materialesdelaboratorio.net/>

Neuroglia [En línia]. Disponible a: http://www.herrera.unt.edu.ar/bioingenieria/temas_inves/sist_nervioso/pagina2.htm

Neuron [en línia]. Wikipedia. Actualitzat 27-10-2014. Disponible a: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Neuron&oldid=635633799>

Olfactory bulb [en línia]. Wikipedia, the free encyclopedia. Actualitzat 2014. Disponible a: http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Olfactory_bulb&oldid=633118605

- RAMOS Merche. *Our Brain: Tipos de cortes* [en línia]. 2012 Disponible a: <http://our-brain.blogspot.com.es/2012/08/tipos-de-cortes.html>
- SISTEMA NERVIOSO [en línia]. 2007 Disponible a: http://www.herrera.unt.edu.ar/bioingenieria/temas_inves/sist_nervioso/pagina1.htm
- MEGÍAS, Manuel, MOLIST, Pilar; ÁNGEL, Diego. *Técnicas Hitológicas: Métodos de fijación*. [en línia]. 2014. Disponible a: <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-metodos-fijacion.php>
- TERMCAT: Diccionari de neurociència [en línia]. Disponible a: http://www.termcat.cat/es/Diccionaris_En_Linia/140/Fitxes/catal%3%A0/F/40/
- DUBUC, Bruno. The Brain from Top to Bottom Blog [En línia]. 2002. Disponible a: <http://www.blog-thebrain.org/>
- ANISSIMOV, Michael. What Is the Cerebellum? [en línia]. wiseGEEK. 2014. Disponible a: <http://www.wisegeek.org/what-is-the-cerebellum.htm>
- ANISSIMOV, Michael. What Is the Function of the Pons? [en línia]. wiseGEEK. 2003. Disponible a: <http://www.wisegeek.org/what-is-the-function-of-the-pons.htm>

7.4. Figures

Imatge de la portada:

GEEKOWSKI, Filip. “*Wszyscy będziemy uczciwi i prawdomówni*” [en línia]. Disponible a: <http://www.geekweek.pl/aktualnosc/20302/wszyscy-bedziemy-uczciwi-i-prawdomowni>

1) Hemisferis cerebrals

PINO, Javier [et al.]. *Enciclopedia Salud: Los dos hemisferios del cerebro humano* [en línia]. 2014. Disponible a: <http://www.encyclopediasalud.com/categorias/cerebro-y-sistema-nervioso/articulos/los-dos-hemisferios-del-cerebro-humano>

2) Lòbuls cerebrals

Cervell [en línia]. Viquipèdia, l'enciclopèdia lliure. 2014. Disponible a: <http://ca.wikipedia.org/w/index.php?title=Cervell&oldid=14354850>

3) Parts de l'encèfal humà

Encéfalo [en línia]. Wikipedia, la enciclopedia libre. 21-07-2014. Disponible a: <http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Enc%C3%A9falo&oldid=78275263>

4) Parts del sistema nerviós

Central nervous system [en línia]. Wikipedia. 3-06-2014. Disponible a: http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Central_nervous_system&oldid=636502415

5) Morfologia d'una neurona

GUNTIÑAS, E. [et al.]. *Biología 1*. Barcelona: Casals, 2008.

6) Tipus cel·lulars segons el número de ramificacions

GUNTIÑAS, E. [et al.]. *Biología 1*. Barcelona: Casals, 2008.

7) Cèl·lules de la glia central

DIAZ, Silvina; SÁNCHEZ, Adelaida. "Histología: Sistema Nervioso" [en línia]. 2006. Disponible a: <http://es.scribd.com/doc/225145344/Sistema-Nervioso-2>

8) Metodologia per analitzar la neurogènesi In vivo

MING, Guo-li; SONG, Hongjun. "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." Annu. Rev. Neurosci. 28 (2005): 223-250.

9) Metodologia per analitzar la neurogènesi adulta In Vitro i Ex vivo

Mateixa font que la figura 8.

10) Cèl·lules precursors neuronals

ARIAS-CARRIÓN, O; OLIVARES-BAÑUELOS, T; DRUCKER-COLÍN, R. "Neurogénesis en el cerebro adulto". Revista de neurología, ISSN 0210-0010, Vol. 44, Nº. 9, (2007), p. 541-550.

11) Canvis en el punt de vista de la neurogènesi al llarg dels últims 25 anys.

GOULD, Elizabeth. "How widespread is adult neurogenesis in mammals?" Nature Reviews, Neuroscience. Volume 8 p. 481-488 (June 2007)

12) Formació hipocampal en el cervell humà (A) i en el cervell de rata (B)

MARTÍN, V. *Comparación entre el cerebro humano y el de rata*. WeSapiens [en línia]. 30-12-2011; Disponible a: <http://www.wesapiens.org/es/file/3401005/Comparaci%C3%B3n+entre+el+cerebro+humano+y+el+de+rata>

HILLER, S [et al.]. *What Can Be Learned From Animal Models* [en línia]. Disponible a: <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh284/213-221.htm>

13) Zones de la formació hipocampal i procés de creació de noves neurones al GD

Mateixa font que la figura 8.

14) Organització i tipus cel·lulars de la Zona Subgranular.

DOMÍNGUEZ, Laura. "Efectos de la cocaína y del tolueno sobre la neurogénesis en el hipocampo de rata". Tesis doctoral. Universitat de València, 2010.

15) Ventricles cerebrals d'un cervell humà

Overview of the Central Nervous System [en línia]. Disponible a: <http://what-when-how.com/neuroscience/overview-of-the-central-nervous-system-gross-anatomy-of-the-brain-part-2/>

16) Capes del bulb olfatori

GONZÁLEZ, Gloria. "Neurogénesis y gliogénesis en el cerebro rostral del ratón adulto heterocigoto para Pax6". Tesis doctoral (Salamanca, 2010).

17) Regions cerebrals que intervenen en la neurogènesi de la ZSV, en cervell de ratolí

Rostral migratory stream [en línia]. Wikipedia. 2014 [6-12-2014]. Disponible a: http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Rostral_migratory_stream&oldid=633137391

18) Regions cerebrals que intervenen en la neurogènesi de la ZSV, en cervell humà

MEUCCI, Ingrid. *La Neurogenèse est-elle présente chez l'enfant et l'adulte ?* [en línia]. 2012. Disponible a: <http://www.ingridneuro.fr/neurogenese-presente-enfant-adulte/>

19) Organització i tipus cel·lulars de la ZSV en talls coronals de ratolí i d'humà.

HERNÁNDEZ-RABAZA, Vicente; ROSEL, Jesús; CANALES, Juan José. "Neurogènesi en el cervell adult i salut mental". Anuari de l'Agrupació Borriana de Cultura (2011); XXII, p. 51-68

20) Procés de creació de noves neurones en la ZSV i el bulb olfatori.

Ídem que la figura 8.

21) Bany termostàtica Precisdig, J.P.Selecta

J.P.Selecta. *Water Baths - Catalogue - Grupo-Selecta* [en línia]. Disponible a: <http://www.grupo-selecta.com/en/catalogo/productos/47/Water%20-%20oil%20digital%20control%20baths>

22) Micròtom de fulla vibrant VT 1000 S, Leica

Leica Biosystems. *Micròtomo de cuchilla vibrante Leica VT1000 S* [en línia]. Disponible a: <http://www.leicabiosystems.com/es/preparacion-de-muestras/seccionado/microtomos-de-cuchillas-vibrantes/detalles/product/leica-vt1000-s/>

23) Esquema de les parts del micròtom de fulla vibrant (esquema propi).

24) Lupa binocular Stemi 2000, Zeiss

DirectIndustry. *Estereomicroscopio - ZEISS Stemi 2000* [en línia]. Disponible a: <http://www.directindustry.es/prod/carl-zeiss-microscopy/estereomicroscopios-20796-497493.html>

25) Wild TYP 355110, Heerbrugg Swiss

Government Liquidation. Wild Heerbrugg 355110 Dual View Microscope [en línia]. 2001. Disponible a: <http://www.govliquidation.com/auction/view?auctionId=7112317>

26) Parts d'un microscopi òptic

QReserve. *Commercial Partner Program* [en línia]. Disponible a: <https://www.qreserve.com/commercialprogram>

27) AxioCam HR 13 megapixel, Zeiss

ZEISS International. AxioCam HR 13 Megapixel [en línia]. Disponible a: http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/products/microscope-cameras/axiocam-hr-.html

28) Agitador mini orbital shaker SSM1, Stuart

Bibby Scientific. *Stuart Orbital shakers SSM1* [en línia]. Disponible a: <http://www.stuart-equipment.com/product.asp?dsl=77>

29) Agimatic-N amb calefacció, J.P.Selecta

J.P.Selecta. *Agitadores magnéticos «Agimatic» y «Agiman»* [en línia]. Disponible a: <http://www.grupo-selecta.com/pdfs/es/pages/issu-29.pdf#page=1&zoom=auto,-128,902>

30) Agitador Vortex 3, IKA

IKA. *VORTEX 3* [En línia]. Disponible a:

http://www.ika.com/owa/ika/catalog.product_detail?iProduct=3340000

31) Ratolí albí de laboratori de l'espècie *Mus musculus*.

Mus musculus [en línia]. <http://www.grandesimágenes.com/mus-musculus/>

32) Obertura de la caixa toràtica d'un ratolí per dur a terme una perfusió

GAGE, Gregory; KIPLE, Daryl; SHAIN, William. *JOVE: Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents* [en línia]. Cambridge 2013. <http://www.jove.com/video/3564/whole-animal-perfusion-fixation-for-rodents>

33) Fixació per perfusió d'un organisme complet de ratolí

MOLIST, Pilar; POMBAL, Manuel Ángel; MEGÍAS, Manuel. *Atlas de histología vegetal y animal* [en línia]. Actualització: 29-06-2014. <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>

34) Procés d'extracció del cervell en un ratolí de laboratori

Mateixa font que la figura 32.

35) Tauler de control del vibràtom Leica (Imatge pròpia)

36) Plaques de cultiu amb els talls del cervell (Imatge pròpia)

37) Mostra d'un tall coronal de cervell de ratolí (Imatge pròpia)

38) Imatges del laboratori corresponents a la ZSV (Imatge pròpia)

39) Imatges del laboratori corresponents a la ZSG (Imatge pròpia)