

humilde homenaje a su destacada carrera profesional.

Incorporación del Académico de Número Dr. Enrique Leo Portiansky

Conferencia

Neurogénesis en médula espinal durante el envejecimiento

Dr. Enrique Leo Portiansky

Quisiera hacer una sucinta descripción acerca del trabajo que venimos realizando en nuestro laboratorio en los últimos 10 años. Todo comenzó, unos años antes, cuando me anunciaron oficialmente que no podía seguir trabajando en temas de fiebre aftosa ya que la manipulación del virus iba a quedar restringida a laboratorios que contaran con alta seguridad. Me vi forzado entonces, a buscar una alternativa a mi trabajo. En ese momento yo trabajaba en el laboratorio del Dr. Laguens en la cátedra de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), pero mi actividad docente la desarrollaba en la Cátedra de Patología General, en la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la misma Universidad. Decidí entonces desarrollar todas mis actividades en la FCV y asociarme con el Dr. Gimeno en sus temas de investigación hasta tanto encontrara mi propio camino.

Para ese entonces, realizábamos trabajos tendientes a establecer el efecto del duraznillo blanco (*Solanum glaucophyllum*) en diferentes órganos y sistemas de la economía animal. Mientras tanto, la FCV había recibido ayuda financiera de JICA, la Agencia de cooperación del gobierno de Japón, para el reequipamiento de distintos laboratorios. De esa manera, nos vimos beneficiados con la llegada de un microscopio, una cámara de video y un programa de análisis de imágenes. Siendo que la informática estaba comenzando a aflorar a nivel popular, decidí que ese sería el medio con el cual iba a implementar el nuevo modelo, que todavía no había definido. Sabía que quería relacionar la biología con la informática, sabía que de alguna manera iba a dejar de lado la

inmunología, disciplina en la que me había especializado en el posgrado y había sido mi centro de investigación hasta ese momento y sabía también que las neurociencias comenzaban a tomar un nuevo rumbo en el mapa científico. Entre charlas con colegas y lecturas varias decidí que el camino estaba orientado al estudio de la médula espinal, un área poco explorada, con mucho potencial veterinario y médico.

Para comenzar, debíamos establecer la especie animal y reconocer la estructura normal del órgano en toda su extensión, analizar sus zonas anatómicas y funcionales y establecer sus parámetros morfométricos. Teníamos que elegir un modelo animal que nos permitiera repetitividad de los resultados así como facilidad de manejo y por ello seleccionamos a la rata.

Anatómicamente, la médula espinal se divide en tantos segmentos como vértebras del raquis. Cada uno de estos fue identificado en todas las médulas analizadas de las ratas macho de 12 meses de edad, generosamente provistas por el Dr. Goya. Allí pudimos observar que existen características diferenciales en el tamaño de los segmentos y la cantidad de sustancia gris y blanca que cada uno posee. Lo que más llamó nuestra atención es que no se distinguía un engrosamiento cervical, tal como se observa en la región lumbar y que se describe en la literatura para otras especies.

Dada dicha particularidad, decidimos hacer un análisis más pormenorizado de los ocho primeros segmentos, que corresponden a la región cervical. Siguiendo los esquemas realizados por Paxinos y Watson (1986), pudimos establecer los 10 sectores llamados *láminas*, que corresponden a agrupaciones de neuronas con determinadas características morfométricas y funcionales. Las cinco primeras láminas reciben impulsos aferentes sensitivos y constituyen el asta dorsal, las láminas 6 y 10 corresponden a la región media y las últimas láminas se agrupan dentro del asta ventral, siendo las responsables de generar impulsos eferentes motores.

Si bien toda la región cervical era de nuestro interés, para realizar un estudio morfométrico sistematizado de las neuronas, establecimos al segmento C5 como nuestro patrón. La selección se basó en que inerva a la mayoría de los músculos de la región (pectorales, torácicos, del cuello y del miembro anterior), forma parte del plexo braquial y brinda una

rama para la inervación del diafragma y, por lo tanto, debería tener una amplia gama de formas y tamaños celulares. Más aún, estos datos nos servirían para usar como base en futuros trabajos, donde se induciría un daño controlado de la región, en los que se pudiera analizar funcionalmente los aspectos sensitivo, motriz y respiratorio.

Al ver que la cantidad de neuronas de la región tenía un número finito y eran fácilmente identificables, decidimos profundizar los estudios de normalidad, pero desde el punto de vista histoquímico. Para estos estudios utilizamos ratas hembra, ya que nos permitía trabajar con animales de hasta 32 meses de edad. Considerando que la rata difícilmente supere los 33 meses de edad aún en cautiverio, nos serviría como modelo para evidenciar las diferencias que pudieran observarse durante el envejecimiento. Si bien el envejecimiento es un proceso natural, surge aquí el interrogante acerca de considerarlo como un hecho fisiológico o patológico, que naturalmente finaliza con la muerte del individuo. Aprovechando la posibilidad de comparar dos puntos etarios separados, decidimos realizar comparaciones macro y microscópicas de estas médulas.

En primera instancia se observa que el largo aparente de estos órganos es similar en ambas edades. Entre ambas médulas se puede apreciar una pequeña diferencia en el largo, a la altura del segmento C3. También se observa que la región cervical de la médula vieja es similar a lo que se había observado en los machos de 12 meses, pero difiere de las médulas jóvenes, en donde sí se detecta una dilatación que corresponde al plexo braquial (Fig. 1).



Fig 1. Arriba: médula espinal de rata joven (5 meses). Abajo, médula espinal de

rata vieja (32 meses)

Tomando como referencia una vez más al segmento C5, observamos que tanto el área total, como la proporción de sustancia gris, se incrementaban con la edad (Fig. 2). El análisis de las láminas internas reveló que éstas también se incrementan de manera significativa al comparar las poblaciones jóvenes con las viejas.

Evidentemente, dentro de la sustancia gris algo estaba aumentando de tamaño o de cantidad, que pudiera justificar este incremento macro y microscópico. ¿Será posible que el envejecimiento se acompañe de un proceso inflamatorio en el que las neuronas que van muriendo generan un aumento de las células de la glía? Y a nivel de la sustancia blanca ¿se producirá algún proceso degenerativo de los axones que induzca el aumento de volumen? Para responder a estos interrogantes recurrimos a la determinación de la presencia de filamentos intermedios, por medio de técnicas de inmunohistoquímica.

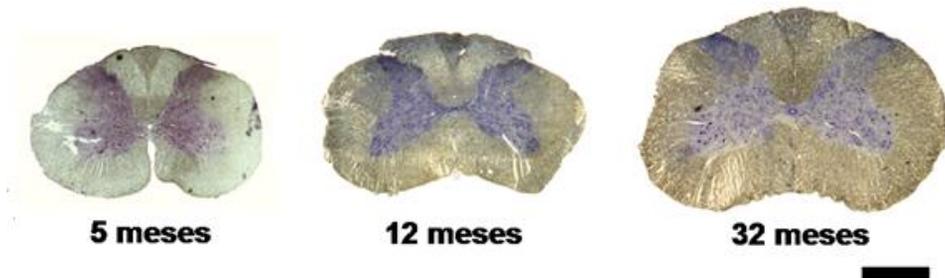


Fig 2. Modificación del tamaño del segmento C5 en corte transversal, con la edad. Tinción: violeta de cresilo. Barra = 1 mm.

Los filamentos intermedios son proteínas estructurales de las células, que se encuentran principalmente en el citoplasma. Están tan ampliamente distribuidos dentro de las diferentes células del organismo que son de fácil identificación. Existen diferentes filamentos intermedios que se encuentran en distintas células y, por lo tanto, sirven de base para su identificación general. La inmunohistoquímica para GFAP, un filamento intermedio presente en las células de la glía, no mostró mayores diferencias entre ambos grupos etarios (Fig. 3).

El recuento de células marcadas con S100, una proteína ligadora de calcio que permite identificar ciertas poblaciones de células gliales, no demostró la existencia de diferencias significativas entre ambos grupos en ninguno de los segmentos cervicales.

Cuando realizamos esta misma técnica para la identificación de Neurofilamentos, otro filamento intermedio, pero en este caso presente dentro de las neuronas, observamos un gran incremento de los mismos con el envejecimiento (Fig. 4). Esto significa que, al menos, existe un incremento del grosor de las prolongaciones nerviosas, tanto axones como dendritas, o un aumento del número de estas. Estas diferencias fueron significativas entre ambas edades y para todos los segmentos de la región cervical.

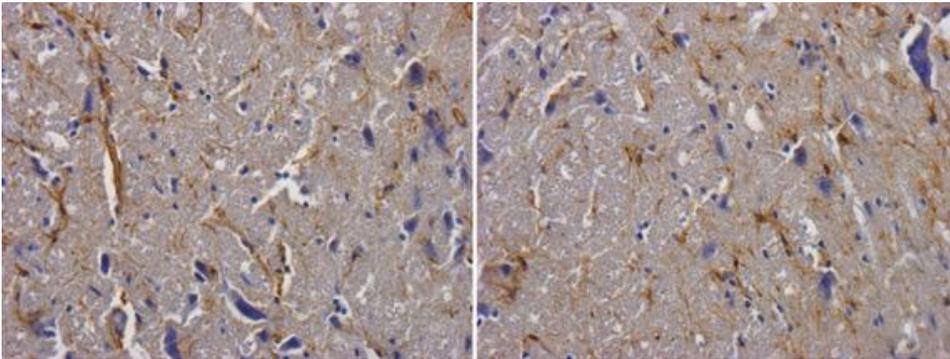


Fig. 3. Marcación inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-GFAP en animales jóvenes (izquierda) y viejos (derecha).

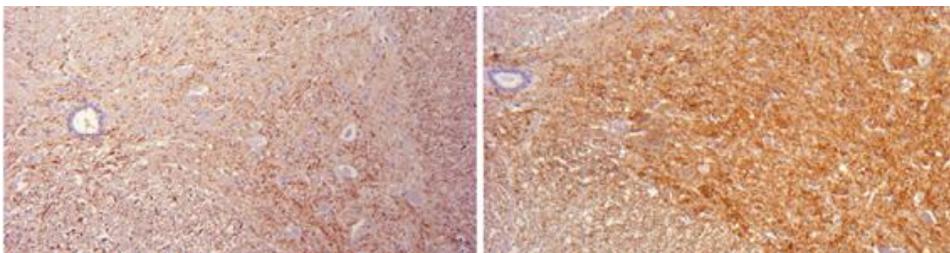


Fig. 4. Comparativa de la marcación inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-neurofilamentos en animales jóvenes (izquierda) y viejos (derecha). Barra = 0,2 mm.

La vimentina es otro filamento intermedio, pero se localiza en células de

origen mesodérmico. En la médula espinal, tiñe principalmente las células del epéndimo presentes en el canal central, donde se encuentran células neuroblásticas y células troncales (stem cells). Nuestros estudios determinaron que durante el envejecimiento existe una disminución en la expresión de vimentina (Fig. 5).

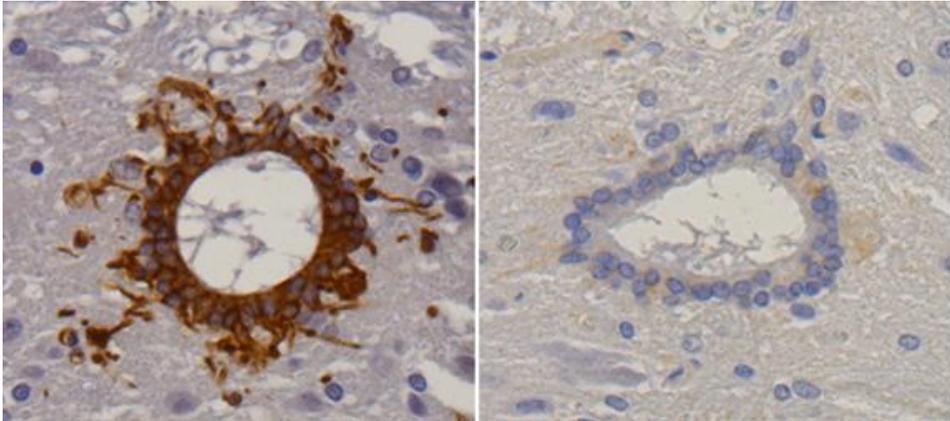


Fig. 5. Disminución de la expresión de vimentina en las ratas viejas (derecha) en comparación con las jóvenes (izquierda).

Si bien la intensidad de marcación disminuyó significativamente de forma pareja a lo largo de todo el segmento cervical, el decrecimiento del área marcada fue mayor en los últimos segmentos cervicales. Esto nos estaría indicando que no sólo disminuye la actividad de las células del epéndimo con el tiempo, sino que también disminuye el número de las mismas, siendo más pronunciado en los últimos segmentos cervicales.

Siguiendo con la caracterización de los cambios que se pudieran producir durante el envejecimiento, aplicamos la técnica de lectinohistoquímica para la identificación de residuos hidrocarbonados. Las lectinas son proteínas, principalmente de origen vegetal, que se utilizan para localizar, identificar y distinguir diferencias en la constitución de los carbohidratos celulares, con alta especificidad. Algunas lectinas se expresaron en los animales jóvenes y otras en los viejos; algunas de ellas se expresaron en ambos grupos etarios, pero en diferentes estructuras. A modo de ejemplo, la SBA, identificó los cuerpos neuronales y sus prolongaciones en el animal joven, pero no a las células endimarias, mientras que la misma lectina aplicada a los animales viejos sólo identificó a estas últimas

en su porción apical. Por su parte, la ConA marcó somas neuronales en ambas edades, pero las prolongaciones sólo fueron identificadas en los animales viejos. Como conclusión, más allá de cuál sea la expresión de la lectina en particular, este trabajo nos demuestra que durante el envejecimiento existen cambios que pueden ser de reorganización plástica, como en nuestro caso, o en respuesta a procesos degenerativos, como ocurre en el Alzheimer.

Uno de los marcadores considerados como altamente específicos para las neuronas es el NeuN que identifica a la proteína nuclear Fox-3. Es un conjunto de proteínas principalmente de ubicación nuclear pero que también se pueden expresar en el citoplasma. Esto es cierto para los animales jóvenes. Sin embargo, vimos que en los animales viejos no se expresaba en absoluto (Fig. 6). También pudimos ver que en los animales adultos (12 a 24 meses) se producía una reacción intermedia entre los jóvenes y viejos, es decir, algunas células se marcaban y otras no, o la intensidad observada estaba muy por debajo de lo observado en los jóvenes. Estos datos desestimarían el dogma impuesto para este marcador, al menos para la médula espinal en proceso de envejecimiento. Por otro lado, nos demuestran que esta proteína nuclear va mermando su expresión con el tiempo. Resta determinar su significación para la vida de las neuronas.

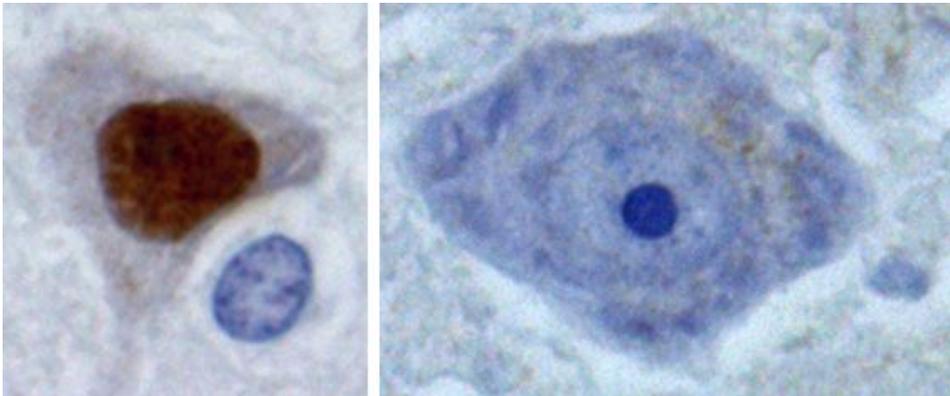


Fig. 6. Marcación inmunohistoquímica para la identificación de NeuN. La expresión en las neuronas jóvenes (izquierda) se pierde con la edad (derecha). El pigmento amarillo que se observa dentro del citoplasma de la neurona vieja corresponde a lipofuscina.

Vimos que hay mayor cantidad de prolongaciones neuronales, indirectamente identificadas a través de la expresión de los neurofilamentos. Faltaba establecer si éstas eran las únicas responsables del aumento de la sustancia gris medular durante el envejecimiento. Para ello, realizamos un estudio morfométrico de las neuronas de cada una de las láminas. En términos generales y por la metodología seleccionada para determinarlo, pudimos observar que existe un aumento de la superficie neuronal, que acompaña de manera proporcional al aumento de la sustancia gris.

Existen dos posibilidades a considerar que justifiquen el aumento del área neuronal: una de ellas es el aumento del tamaño de los somas neuronales. Una de las características observadas en las neuronas de los animales viejos fue la presencia del pigmento lipofucsina, que se produce como consecuencia de la acumulación de organoides no eliminados por la célula. Su ubicación citoplasmática puede ser perinuclear o en acúmulos. La acumulación del pigmento podría ser la responsable del aumento del área anteriormente mencionado. Para establecerlo, se tomaron diferentes parámetros morfométricos que darían idea de las variaciones producidas en las formas durante el envejecimiento. Realizadas las mediciones, pudimos establecer que ciertamente se producen modificaciones en los parámetros morfométricos analizados, pero éstos no se producen en todas las neuronas y las variaciones encontradas no justificaban el aumento del área neuronal previamente mencionado.

La única opción remanente, aunque difícil de pensar, sería el aumento del número de neuronas. Si bien históricamente se estableció que las neuronas que desaparecen de manera natural no son reemplazadas por otras neuronas, desde hace unos años se demostró que, en ciertas regiones de cerebro, más precisamente el hipocampo y el giro sigmoideo, existen procesos de neurogénesis espontánea. Este proceso no pudo ser demostrado en ninguna otra localización del sistema nervioso central, incluida la médula espinal.

Hasta ahora habíamos visto que existen diferencias significativas en las áreas de los segmentos cervicales de ambos grupos. También observamos que, en algunos casos, existe una diferencia significativa en la cantidad de materia gris. Sin embargo, la proporción entre materia gris y blanca se mantiene inalterada. Asimismo, vimos que, en los animales viejos, el área neuronal total se incrementa significativamente con

respecto a la de los jóvenes. Sin embargo, salvo para un par de segmentos, el valor promedio de las neuronas se mantiene inalterado. No teníamos otra alternativa que contar el número de neuronas y en este caso vimos que existe una diferencia significativa de las mismas con la edad, para todos los segmentos analizados.

La pregunta que surgía inmediatamente era acerca del origen de dicha diferencia en el número de neuronas. Para ello, diseñamos un protocolo que nos permitiría saber si se trataba de células de nueva formación o procedentes de otras regiones. Para nosotros resultaba un desafío poder demostrarlo. Mediante marcación inmunohistoquímica simple y doble pudimos observar diferentes tipos de células (neuronas y células de la glía) en diferentes láminas medulares. También se realizó la técnica de inmunofluorescencia para demostrar los marcadores de división dentro de los diferentes tipos celulares (Fig. 7).

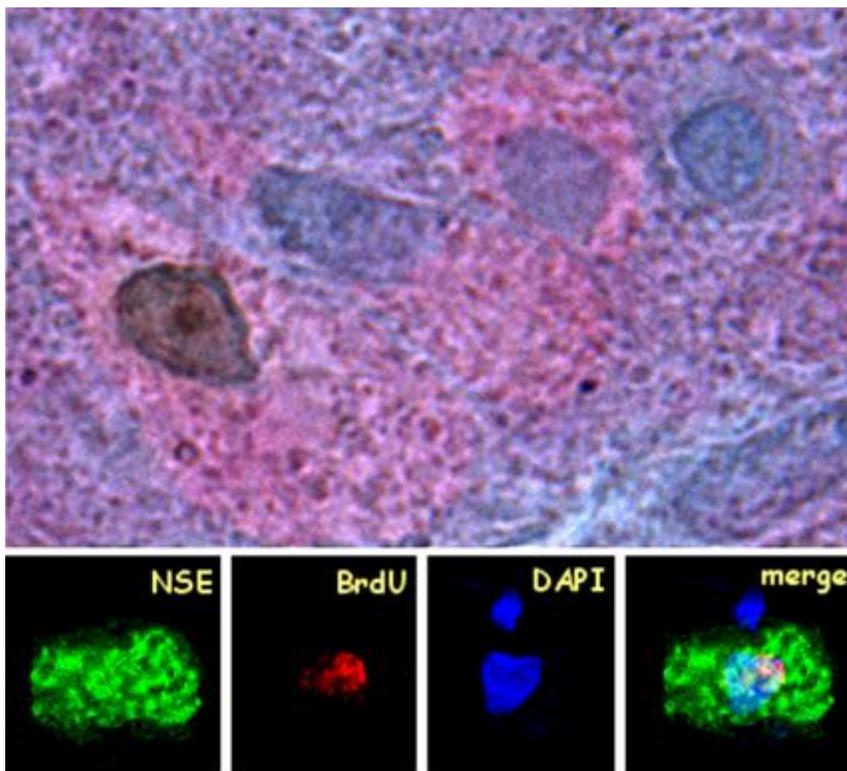


Fig. 7. Arriba: la doble marcación inmunohistoquímica (BrdU + enolasa) demostró que la neurona positiva corresponde a una célula de nueva formación y se encuentra al lado de otras neuronas maduras. Abajo: la neurona identificada con el marcador intracitoplasmático para enolasa (NSE) (verde)

muestra la marcación para BrdU (rojo) dentro del núcleo identificado con el fluoróforo DAPI (azul). Esta neurona de noviformación contacta con una célula glial, solo identificada por su tinción nuclear.

Observaciones minuciosas de los cortes medulares nos permitieron identificar células binucleadas, tanto en animales jóvenes como viejos (Fig. 8). Las células binucleadas podrían representar un paso previo a la escisión del citoplasma para formar dos células hijas, pero aparentemente este no sería el caso en la médula espinal. Estas neuronas se observan a lo largo de toda la médula espinal, aunque se encuentran con mayor frecuencia en C5 y C6. La frecuencia de aparición de este tipo de células es similar en ambos grupos etarios, con lo que no podría responder a una demanda de mayor cantidad de células en los animales envejecidos. Sea cual fuera la explicación, su presencia no justificaría el aumento del área de la masa neuronal.

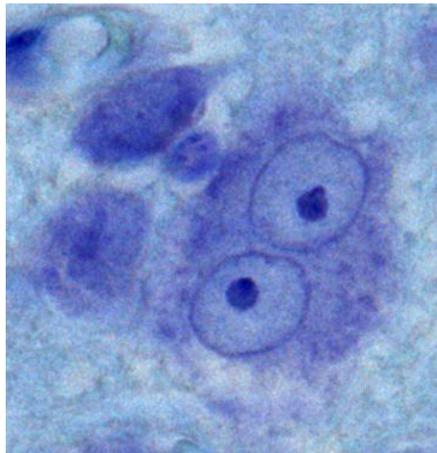


Fig. 8. Neurona binucleada presente en la médula espinal de ratas jóvenes. Junto a otras dos neuronas, comparte a una célula de la glía central. Tinción: violeta de cresilo.

Lo cierto es que, si bien observamos neuronas de nueva formación tanto en animales jóvenes como viejos, la cantidad encontrada difícilmente podría justificar el aumento significativo del número de estas células durante el envejecimiento. Recurrimos entonces a la determinación de PTEN, una proteína supresora tumoral, que limita la replicación y regula el tamaño celular. De acuerdo a nuestros resultados,

la cantidad de PTEN celular disminuye con la edad (Fig. 9). Esto podría justificar, por un lado, el aumento del tamaño de algunas neuronas y por otro, podría ser un gatillo para inducir la maduración de los neuroblastos presentes en el epéndimo medular, lo que explicaría el aumento del número de neuronas.

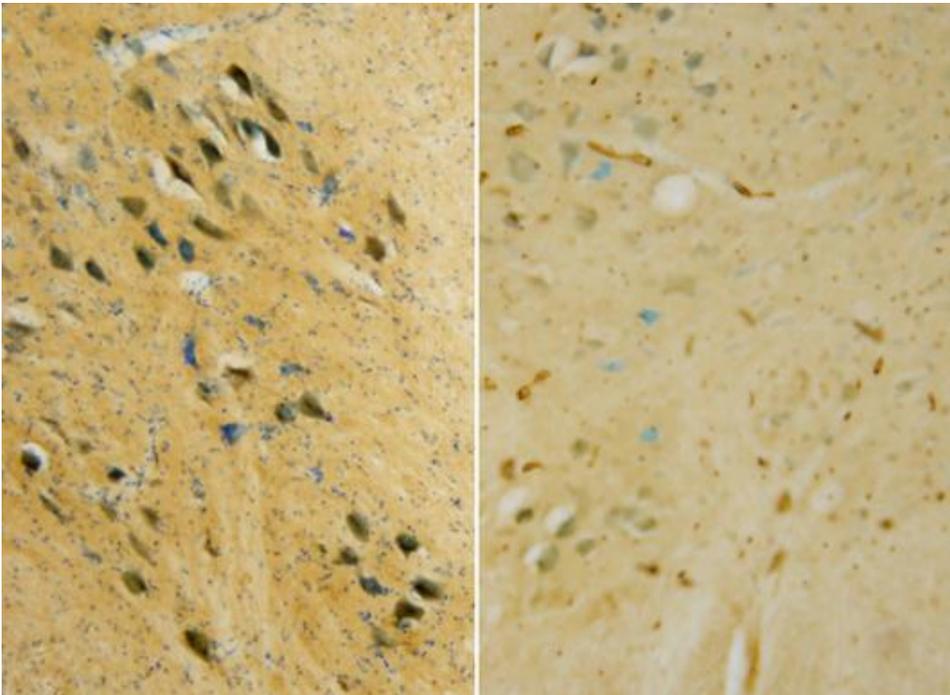


Fig. 9. Expresión de PTEN en C5 de animales jóvenes (izquierda) y viejos (derecha).

Surge entonces una nueva pregunta: ¿El organismo está preparado para albergar una médula espinal creciente dentro del raquis o el crecimiento medular induce el desarrollo vertebral? Nuestros estudios recientes revelan que el canal raquídeo no sufre cambios en la forma ni en el tamaño con la edad, con lo cual se puede afirmar que está preparado desde la joven edad para contener el crecimiento medular. Esto significa que existen mecanismos reguladores a través de genes o factores de crecimiento y regulación que modulan el número creciente de neuronas. Si se pudieran aislar estos componentes, estaríamos frente a un hecho fundamental para las terapias reparadoras del sistema nervioso.

A modo de resumen podemos concluir esta disertación diciendo que durante el envejecimiento aumenta el área de los segmentos cervicales, aumenta la expresión de Neurofilamentos, se incrementa el número de neuronas, se pierde el marcador NeuN, se incrementa el tamaño de las neuronas de algunas láminas, se observan neuronas binucleadas, disminuye la expresión de vimentina, disminuye la expresión de Pten y cambia la expresión de algunas lectinas. Todos estos cambios tendrían una regulación genética o a través de factores de crecimiento.

Todos estos resultados fueron compilados y publicados en revistas de alcance internacional específicas del tema, las que se listan entre las referencias.

Referencias

- Fontana PA; Barbeito CG; Goya RG; Gimeno EJ; Portiansky EL. Impact of very old age on the expression of cervical spinal cord cell markers in rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 37:98-104. 2009.
- Lozza FA; Chinchilla LA; Barbeito CG; Goya RG; Gimeno EJ; Portiansky EL. Changes in carbohydrate expression in the cervical spinal cord of rats during aging. *Neuropathology*. 29:258-262. 2009.
- Nishida F; Barbeito J; Barbeito CG; Portiansky EL. Is the vertebral canal prepared to host the aged spinal cord? A morphometric assessment. *Zoomorphology*. 133:219-225. 2014.
- Paxinos G; Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd edition. Academic Press. Sydney. 1986.
- Portiansky EL, Nishida F, Barbeito CG, Gimeno EJ, Goya RG. Increased number of neurons in the cervical spinal cord of aged female rats. *PLoS ONE* 6(7):e22537. doi:10.1371/journal.pone.0022537. 2011.
- Portiansky EL; Barbeito CG; Goya RG; Gimeno EJ; Zuccolilli GO. Morphometry of cervical segments grey matter in the male rat spinal cord. *Journal of Neuroscience Methods*. 139:217-229. 2004.
- Portiansky EL; Barbeito CG; Flamini MA; Gimeno EJ; Goya RG. Presence of binucleate neurons in the spinal cord of young and senile rats. *Acta Neuropathologica*. 112:647-649. 2006.
- Portiansky EL; Barbeito CG; Gimeno EJ; Zuccolilli GO; Goya RG. Loss of NeuN immunoreactivity in rat spinal cord neurons during aging. *Experimental*

Neurology. 202:519-521. 2006.

- Rodrigues De Amorim MA; García-Segura LM; Goya RG; Portiansky EL. Decrease in PTEN and increase in Akt expression and neuron size in aged rat spinal cord. *Experimental Gerontology*. 45:457-463. 2010.

Incorporación del Académico Correspondiente Dr. Víctor Hugo Trucco

Presentación del Dr. Víctor Hugo Trucco

Ing. Agr. Roberto R. Casas

Sesión Pública Extraordinaria, Septiembre de 2014

El Dr. Víctor Hugo Trucco nació en Las Petacas, Provincia de Santa Fe. Es casado, tiene seis hijos y vive en la ciudad de San Jorge, en la provincia de la cual es oriundo. En 1969 egresó de la Universidad Nacional de Rosario con el título de Bioquímico, obteniendo en 1971 el título de Doctor en Bioquímica en la misma Universidad.

En la década de 1970, participó en actividades académicas y científicas como Profesor Titular en la Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario, siendo miembro de la carrera de Investigador del Consejo de Investigaciones de la misma universidad.

En su proficua trayectoria, se destaca principalmente su aporte a la institucionalidad en el sector agropecuario. En 1989 fue uno de los fundadores de la Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (AAPRESID), institución que ha sido el pilar fundamental para la difusión y la adopción de esta tecnología, de la que fue Presidente desde su fundación hasta el año 2004, continuando en la actualidad como Presidente Honorario.

En el período 1993-1995 tuvo un breve paso por la función pública, desempeñándose como Subsecretario de Recursos Naturales de la Provincia de Santa Fe. Su accionar en favor de la producción sustentable trascendió las fronteras de nuestro país, alcanzando a un importante número de países americanos por su trabajo en pos de la fundación de la