



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultat de Ciències
Biològiques

**Estudio de la organización celular y
capacidad proliferativa en el tercer
ventrículo de mamíferos adultos.**

Tesis doctoral

María Durán Moreno

Dirigida por el Dr. D. José Manuel García Verdugo y

la Dra. Dña. Sara García Gil-Perotín

Valencia, 2015

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Facultat de Ciències Biològiques
Departament de Biologia Cel·lular i
Parasitologia



**“Estudio de la organización celular y
capacidad proliferativa en el tercer
ventrículo de mamíferos adultos.”**

Tesis doctoral presentada por D.^a María Durán Moreno y codirigida por el
Dr. D. José Manuel García Verdugo, Catedrático de la Universitat de
València y la Dra. D.^a Sara García Gil-Perotín, en el marco del programa de
doctorado de Neurociencias Básicas y Aplicadas.

Valencia, 2015



El Prof. Dr. D. José Manuel García Verdugo, Catedrático del Departamento de Biología Celular y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA

Que D.^a María Durán Moreno ha realizado en el Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universidad de Valencia, bajo su dirección, el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada “Estudio de la organización celular y capacidad proliferativa en el tercer ventrículo de mamíferos adultos”.

Revisado el trabajo, autorizo su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Valencia a 26 de octubre de 2015.

Firmado: José Manuel García Verdugo



La Dra. D.^a Sara García Gil-Perotín, investigadora posdoctoral de la Unidad Mixta de Esclerosis Múltiple y Neuroregeneración (Universidad de Valencia- La Fe),

CERTIFICA

Que D.^a María Durán Moreno ha realizado en el Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universidad de Valencia, bajo su dirección, el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada “Estudio de la organización celular y capacidad proliferativa en el tercer ventrículo de mamíferos adultos”.

Revisado el trabajo, autorizo su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Valencia a 26 de octubre de 2015.

Firmado: Sara García Gil-Perotín

Yo, María Durán Moreno, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación y que lo he realizado en el Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles, bajo la dirección del Dr. José Manuel García Verdugo, Catedrático de Biología Celular de la Universidad de Valencia, y de la Dra. Sara García Gil-Perotín.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Valencia a 26 de octubre de 2015.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a central horizontal stroke, positioned above the name.

Firmado: María Durán Moreno

El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto SAF2008-01274 y la ayuda para Formación de Profesorado Universitario AP-2009-4759 del Ministerio de Ciencia e Innovación y por el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Desde pequeña había querido dedicarme a la investigación y dirigí todos mis estudios hacia ello. Sin embargo, en los primeros años de universidad, mi ilusión se fue apagando al comprobar que no era tan fácil que te dieran una oportunidad en algún grupo para comenzar. Pero, en 2º de carrera me encontré con Sara, que no dudó en invitarme a conocer el laboratorio. Ahí empezó todo. Gracias a ella, pude comenzar a trabajar en el laboratorio y conocer la ciencia de verdad. A Verdugo lo conocí algún día después. Trabajar con alguien con su trayectoria científica me impuso respeto, pero poco a poco lo fui conociendo y me enseñó que lo esencial para la investigación, es trabajar con ilusión. Él me dio la oportunidad para comenzar mi carrera en la ciencia y ambos, me contagiaron su ilusión por ella, cada vez que los reveses típicos de la carrera investigadora me la robaban. Me han apoyado desde el principio, y cada uno con su personalidad y su manera de trabajar, me han enseñado, no sólo a cómo seguir un protocolo e interpretar los resultados, me han dado lecciones que no se aprenden estudiando y que me acompañarán toda la vida. Ante todo, valoro su apoyo en todo momento, sobre todo en esta última etapa, tan dura para todos, donde en varios momentos me planteaba incluso no continuar (esos pequeños momentos de desesperación...), pero sabía que teniéndolos al lado, eso no pasaría.

Agradezco a todos los miembros del laboratorio de Neurobiología Comparada su apoyo, compañía y amistad; y alguna que otra inmuno, inclusión o reconstrucción... En especial a Paula (Mi hermana separada al nacer. Tu llegada marcó un antes y un después para mí), a Arantxa, Patri, Susana y Vicente. Qué difícil va a ser encontrar compañeros así en el futuro. Qué buenos ratos nos pasamos en el laboratorio y fuera de él. Espero no perder nunca vuestra amistad. Además, sabéis que os necesito, el consejo de sabias (aunque incluye a Vicente, las mujeres somos mayoría) tiene que perdurar. Y no me olvido de Mariana, que a pesar de haber llegado la última y de tan lejos, ya es una más en el laboratorio.

También agradezco a antiguos miembros del laboratorio, Irene, Vivian, Clara, Mario, Jorge, Salomé, Vite y el resto de Bps, y gente venida desde lejos, como Noemi, que a pesar de convivir con nosotros apenas un año, nos une una gran amistad...porque todos y cada uno de ellos han participado de un modo u otro en este trabajo, ya que de todos he aprendido algo, además de algún que otro trabajo de bancada, como Jorge, del cual recuerdo sobre todo sus inicios, en los que pasamos buenos ratos en cultivos. O Mario, que conoce al electrónico mejor que la palma de su

mano, es capaz de solucionar cualquier problema con él, excepto cuando se funde el filamento...

Aquí, tengo que hacer un apartado especial para Irene, Vivian y Clara. Hace ya unos años que sus vidas profesionales se separaron del laboratorio de Verdugo. Bueno, no completamente, porque las colaboraciones y la sabiduría de Verdugo, siempre de gran ayuda, han mantenido el contacto. Y en lo que a mí respecta, nuestras vidas no se han separado y espero que sea para siempre, con gente como vosotras no puedo permitirme perder la amistad. Desde que empecé, me han apoyado en todo momento, con su sinceridad y buen criterio, me han enseñado mucho de ciencia, tanto de protocolos, como de todo lo demás que rodea la ciencia, que cuanto antes aprendas mejor. Sin embargo, Vivian merece una mención especial. Con ella, me une también Baltimore. Desde que se enteró que mi destino para la estancia era la misma ciudad en la que estaba haciendo el postdoc, se volcó en prestarme toda la ayuda que necesité. Y al llegar a Baltimore, desde que me recogió en el aeropuerto, no nos separamos. Ella y Alejandro me acogieron durante una larga temporada en su casa, aguantaron mis nervios de los primeros días en el laboratorio... qué duros los recuerdo. Tengo tanto que agradecerles... tantos buenos consejos... fueron mi familia a 10.000km de distancia. Como les dije, para mí, le dieron color a esa ciudad tan gris.

Por supuesto, también agradecerles a los miembros del laboratorio de Seth Blakcshaw. Desde mi llegada me acogieron como uno más. He aprendido mucha ciencia y lecciones de vida trabajando con ellos. Cómo se aprende de las cosas diferentes. He de decir, que no tuve una estancia dura. Fuera del laboratorio tenía a mi "familia" española, y dentro a Liz, Thuzar y Joe, pero sobre todo a Sooyeon, a los que les deseo lo mejor y espero que la vida nos vuelva a juntar.

Y a las nuevas generaciones, Laura C., Laura V. y José, a los que les deseo mucha suerte en el camino que comienzan. Espero que aprendan tanto como yo y que vivan la ciencia con ilusión y humildad. Y no me olvido de Peter, que aunque su pasión son los quirófanos, se nota que también disfruta en nuestro laboratorio,... Se ha ganado que nosotros también le apreciemos mucho.

Bueno, y lo más duro para mí (trae muchos recuerdos), agradecerles a mi familia todo lo que han hecho por mí. Soy lo que soy gracias a ellos. A mis padres, todo su apoyo, esfuerzo y sudor para darme la oportunidad de estudiar y que hiciera lo que yo quisiera en la vida. La verdad es que esto lo debería tener más presente en los momentos de baja moral. Tengo tanto que agradecerles... bueno, todo. La vida nos dio un duro revés. Qué duro es perder uno de los dos pilares de tu vida. A pesar de no

tenerte físicamente conmigo, sé que en todo lo que hago te tengo a mi lado, y la tesis no iba ser menos. Cómo cambia la vida de repente... Pero la entereza de mi madre nos hizo seguir a cada uno con nuestros proyectos y juntos vamos superándolo día a día. A mi madre, no sé cómo agradecerle todo. No puedo enumerar cada uno de los momentos en los que me siento tan protegida por ella. Es una madre, pero me entenderéis si digo que la mía es especial. Nadie como ella sabe lo que pienso, me comprende y sabe cómo levantarme. A mi hermano, el que por circunstancias de la vida, veo menos de lo que quisiera, pero no por ello lo siento lejos. Nunca me falta una llamada o mensaje para darme apoyo y preocuparse de mí. Y también de Irene, no me olvido de ella. Siempre ha sido un hermano protector y sigue siéndolo. Gracias a toda mi familia, me he sentido muy apoyada. Que no se acaben esos aperitivos de los fines de semana!

Y por supuesto, a Javi. Él y mi madre han sido los que me han aguantado de verdad durante la escritura de la tesis. Qué paciencia tiene para haberme aguantado, sobre todo, este verano, la recta final. Le agradezco su apoyo, su sensatez... Es capaz de soportar todo lo que conlleva tener una pareja científica. La vida del científico requiere algunos sacrificios importantes que afectan directamente a la persona con quien compartes tu vida. Todo el que tenga pareja científica lo sabe bien. Él no sólo los ha aceptado y los acepta sin rechistar, si no, que incluso, me aporta el arrojo que necesito para tomar decisiones difíciles en la vida, a pesar de que éstas no sean lo mejor para él.

Por último, les agradezco a todos los amigos, Jesús, María, Rocío, Rubén, Roberto, Alex, Julia... aunque parezca repetitiva, su apoyo. No han dejado de interesarse por mí, de verdad que no me esperaba tanto. Cada uno con sus líos, hay gente que preparaba una boda, otros con sus problemas laborales, en fin, con las cuestiones de la vida, que no es poco, y lo han dejado todo siempre que los he necesitado. Tranquilos que recuperaremos este verano de algún modo. Y a María P. qué tardes de tertulia!!!! Cómo sabes animarme, cómo me conoces, que por mucho tiempo que pase sin que nos veamos, es como si hubiese sido ayer. Puedo decir que te considero una hermana, parte de mi familia, los que no te abandonan en ninguna circunstancia, te apoyan, te dan buenos consejos, aunque duelan (esos son los mejores).

Bueno, al escribir estos agradecimientos, me doy cuenta de las personas tan maravillosas que me rodean. Espero sentirlos siempre tan cerca.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	xxi
INDICE DE TABLAS	xxiii
RESUMEN	xxv
ABREVIATURAS	xxvii
1 Introducción	3
1.1 Origen neuroepitelial de Sistema Nervioso Central. Desarrollo del Sistema Ventricular	3
1.2 Organización y capacidad proliferativa del sistema ventricular en postnatal adulto	9
1.2.1 Ventriculos laterales	9
1.2.2 Cuarto ventrículo	12
1.2.3 El canal central de la médula espinal	14
1.3 El tercer ventrículo	16
1.3.1 Localización, límites y descripción general de tercer ventrículo	16
1.3.2 Región caudoventral e hipotálamo mediobasal. La Eminencia Media	19
1.3.3 Los tanicitos	22
1.3.3.1 Definición de tanicito	22
1.3.3.2 Tipos de tanicitos descritos clásicamente.	22
1.3.3.3 Desarrollo de los tanicitos en el tercer ventrículo	26
1.3.3.4 Importancia de los tanicitos en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario	29
1.3.3.5 ¿Existe la neurogénesis en el 3V?	30
2 Hipótesis y objetivos	37
2.1 Hipótesis	37
2.2 Objetivos	37
3 Material y métodos	41
3.1 Animales	41
3.2 Fijaciones	43
3.3 Diseño experimental	44
3.3.1 Inyección de BrdU y ³ H-timidina	44
3.3.2 Activación de la expresión de GFP bajo el promotor de la vimentina o Rax.	46
3.4 Procesado histológico de las muestras	46
3.4.1 Microscopía electrónica de transmisión	46

3.4.1.1	Reconstrucciones tridimensionales	47
3.4.1.2	Autorradiografía	48
3.4.2	Microscopía electrónica de barrido	49
3.4.3	Inmunohistoquímica	49
3.4.3.1	Inmunohistoquímica general	49
3.4.3.2	Inmunofluorescencia sobre “whole mount”	50
3.4.3.3	Inmuno-oro “preembedding” en secciones coronales.....	51
3.4.3.4	Inmuno-oro “preembedding” en “whole mount”.....	52
3.4.3.5	Inmunohistoquímica “postembedding” en semifinos.....	52
3.4.3.6	Anticuerpos utilizados	53
Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en el presente trabajo.		53
Tabla 6. Tabla de anticuerpos secundarios utilizados en el presente trabajo		54
3.5	Cultivo de neuroesferas	54
3.6	Ensayo clonal	55
3.7	Cultivo organotípico.....	55
3.8	Recuentos y análisis de datos	56
3.8.1	Estudio de la capacidad proliferativa y capacidad de autorrenovación <i>in vitro</i>	56
3.8.2	Estudio de la capacidad proliferativa <i>in vivo</i>	56
3.8.3	Métodos estadísticos.....	56
4	Resultados	59
4.1	Descripción morfológica	59
4.1.1	La superficie de la pared ventricular. Microscopía electrónica de barrido. Establecimiento de los niveles de estudio	59
4.1.2	Nivel 4, los tunicitos.....	66
4.1.2.1	Microscopía óptica.....	66
4.1.2.2	Descripción ultraestructural de las diferentes regiones del epitelio del 3V y caracterización de los tipos celulares.....	70
4.1.1.1	Reconstrucción tridimensional del 3V	84
4.1.3	Otros niveles.....	91
4.2	Caracterización molecular de los tunicitos	93
4.2.1	Inmunofluorescencia	93
4.2.2	Marcaje con oro coloidal para el estudio molecular a nivel ultraestructural	96
4.2.3	El caso particular de la expresión de vimentina.....	99

4.3	El 3V es un nicho proliferativo	106
4.3.1	Las células derivadas del 3V proliferan <i>in vitro</i> y poseen autorrenovación..	106
4.3.2	Proliferación <i>in vivo</i> en el 3V.....	109
4.4	Trazado genético del linaje celular en 3V	115
4.5	Perfil morfológico de los tanicitos del 3V durante el desarrollo postnatal y envejecimiento	120
4.5.1	Desarrollo postnatal.....	120
4.5.2	Envejecimiento	123
4.6	Simetría	124
5	Discusión.....	129
5.1	Los tanicitos no son A + B. Una nueva clasificación.....	129
5.2	La naturaleza glial de los tanicitos y ruptura del dogma de la vimentina.....	132
5.3	¿Existe proliferación en el 3V? ¿Qué tanicito prolifera?	134
5.4	El linaje celular en el 3V ¿Gliogénesis, neurogénesis o ambos?.....	138
5.5	El cilio en constante remodelación	140
5.6	El papel del tanicito ventral en la función hipotalámica en relación con el fotoperiodo	142
5.7	¿Cómo se comunican los distintos tipos de tanicitos? ¿Cómo ejercen su función? Una visión desde la ultraestructura	143
5.8	La pared del 3V se distribuye en franjas y no en “pinwheels”	145
6.	Conclusiones	149
7.	Bibliografía	153

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Naturaleza glial de las células madre neurales en el desarrollo y en el adulto. .6	6
Figura 2. El sistema ventricular en el adulto.8	8
Figura 3. Ventriculos laterales de ratón adulto.9	9
Figura 4. Corpúsculos basales de los tipos celulares de la SVZ.....11	11
Figura 5. Organización de la pared de los ventriculos laterales.....12	12
Figura 6. Cuarto ventrículo.13	13
Figura 7. Suelo del 4V.13	13
Figura 8. Médula espinal.14	14
Figura 9. Diagramas de la organización del cc propuesta en el ratón, macaco y humano adulto.....16	16
Figura 10. Localización y morfología del 3V.18	18
Figura 11. El hipotálamo mediobasal.19	19
Figura 12. Eminencia media y pars tuberalis.21	21
Figura 13. Diagrama de un tanicito.23	23
Figura 14. Modelo para la acción de Rax y Lhx2 en el control del desarrollo de los tanicitos27	27
Figura 15 Protocolo de administración de BrdU y ³ H-timidina.....45	45
Figura 16. Reconstrucción tridimensional.47	47
Figura 17. Técnica de autorradiografía.48	48
Figura 18. Regionalización de la superficie del 3V.60	60
Figura 19. Estudio al SEM de la RCV y RRV.....63	63
Figura 20. Estudio al SEM de la RDM.....64	64
Figura 21. Niveles de estudio establecidos en el 3V.65	65
Figura 22. Estudio al microscopio óptico del N4.....68	68
Figura 23. Descripción ultraestructural del tanicito tipo1.73	73
Figura 24. Descripción ultraestructural del tanicito tipo 2.75	75
Figura 25. Tanicito tipo 2EM.....75	75
Figura 26. Tanicitos tipo 3 y 4 en la franja intermedia.78	78
Figura 27. Tanicito de la franja dorsal, el tipo 5.81	81
Figura 28. Descripción ultraestructural de la región dorsal multiciliada.83	83
Figura 29. Aparato ciliar tipo E1.84	84
Figura 30. Aparato ciliar tipo E2-1.85	85
Figura 31. Aparato ciliar tipo E2-2.....86	86
Figura 32. Aparato ciliar tipo E3.87	87
Figura 33. “En face”88	88
Figura 34. Ultraestructura de la EM.89	89
Figura 35. Célula indeterminada vimentina+.90	90
Figura 36. Distribución celular en los diferentes niveles establecidos en el 3V.....92	92
Figura 37. Caracterización molecular por inmunofluorescencia del 3V.94	94
Figura 38. Marcaje con oro coloidal del anticuerpo anti-nestina.97	97
Figura 39. Inmunomarcaje con oro coloidal del anticuerpo anti-GFAP.98	98
Figura 40. Inmunodetección con oro coloidal del anticuerpo anti-GLAST.99	99
Figura 41. El marcaje particular de la vimentina.103	103

Figura 42. Tanicito en contacto con neurona.....	103
Figura 43. VimCrER a tiempo corto.	104
Figura 44. Resumen de las características ultraestructurales de cada tipo celular.	105
Figura 45. Disección del 3V para cultivos.	106
Figura 46. Medida de la tasa de amplificación in vitro del 3V respecto a la SVZ.	109
Figura 47. Proliferación in vivo en el 3V. Detección mediante el marcador endógeno, Ki67.	110
Figura 48. Proliferación in vivo. Detección mediante el marcador exógeno BrdU.	112
Figura 49. Proliferación in vivo. Detección mediante el marcador exógeno 3H-timidina.	113
Figura 50. Mitosis en la EM.	114
Figura 51. Tipos celulares generados in vivo.....	115
Figura 52. Trazado genético del linaje celular Vim+,.....	117
Figura 53. Trazado genético del linaje celular Rax+.....	119
Figura 54. Caracterización ultraestructural de los tanicitos a los 7 días de desarrollo postnatal (7).	121
Figura 55. Caracterización ultraestructural de los tanicitos a los 15 días de desarrollo postnatal (P15).....	123
Figura 56. Caracterización ultraestructural de los tanicitos en el envejecimiento.	124
Figura 57. Simetría.	125
Figura 58. Cilio en formación.....	141

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Comparación entre las características de las células neuroepiteliales y la glía radial.....	5
Tabla 2. Poblaciones proliferativas del hipotálamo.	32
Tabla 3. Animales utilizados en el presente trabajo.	43
Tabla 4. Fijaciones empleadas en cada tipo de técnica.	44
Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en el presente trabajo.	53
Tabla 6. Tabla de anticuerpos secundarios utilizados en el presente trabajo	54

RESUMEN

Los tanicitos son células epiteliales que tapizan el tercer ventrículo del cerebro y envían un proceso basal hacia los núcleos neuronales hipotalámicos implicados en la regulación de diversas funciones endocrinas. Ese proceso basal le confiere apariencia de glía radial, célula de la que procede, contactando con la piamadre y capilares fenestrados. En el cerebro de ratón adulto, los tanicitos hipotalámicos, quiescentes en condiciones basales, proliferan *in vitro* e *in vivo* tras administración de dietas ricas en grasas, o por la adición intracerebroventricular de factores de crecimiento. Hasta la fecha los tanicitos se han clasificado en base a la localización que ocupan en la pared del 3V correspondiente al hipotálamo mediobasal como $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, y posteriormente, caracterizados por marcadores moleculares específicos, destacando que todos ellos compartían expresión del filamento vimentina.

En este trabajo describimos cinco nuevos tipos de tanicitos (del tipo 1 al 5), destacando al tipo 2, por no expresar vimentina y poseer un cilio del tipo 9+0 característico de las células madre; y al tipo 5, fuertemente positivo para el inmunomarcaje contra vimentina y GFAP, de citoplasma muy claro, con uno o dos cilios de estructura microtubular 9+2 y grandes corpúsculos basales.

La capacidad proliferativa fue detectada únicamente en tanicitos tipo 2, en la franja ventral; y tipo 1, en la eminencia media. En trabajos previos, se ha demostrado que los tanicitos de la región ventral (tanicitos β) presentan capacidad neurogénica. Los tanicitos tipo 5, mostraron capacidad gliogénica de recambio lento mediante experimentos con animales transgénicos *Vim::CreER^{T2}* y *Rax::CreER^{T2}*. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron ningún indicio de neurogénesis adulta en el tercer ventrículo.

Ultraestructuralmente pudimos diferenciar dos poblaciones de tanicitos bien diferenciadas funcionalmente y ultraestructuralmente, la formada por el tipo 1 y 2, y la formada por el tipo 3, 4 y 5. El primer grupo, localizado ventralmente, mantiene contacto con los capilares fenestrados del sistema porta gracias a su grueso proceso basal especializado en el transporte vesicular. Esto, sumado a las uniones estrechas que presentaban, suponía el establecimiento de una barrera hematoencefálica de aislamiento de la eminencia media respecto al resto del parénquima. Por el contrario, los tipo 3, 4 y 5 localizados dorsalmente a los

anteriores, mantenían una comunicación intercelular muy elevada gracias a las abundantes uniones GAP y “bocados” de clatrina que presentan. Además contactan directamente con neuronas atribuyéndoles un papel de señalización en la activación de la respuesta neuronal.

ABREVIATURAS

α-MSH	Hormona estimulante de melanocitos
AgRP	Proteína similar a <i>agouti</i> (“Agouti related protein”)
ARC	Núcleo arcuato
BLBP	Proteína de unión a lípidos cerebrales (“brain lipid binding protein”)
BrdU	5-Bromo-2'-deoxiuridina
BSA	Seroalbúmina bovina (“bovine seroalbumin”)
CC	Canal central de la médula
DAB	3,3'-diaminobencidina
DARP-32	Dopamine-cAMP-regulated phosphoprotein of 32kDa
DMH	Núcleo dorsomedial hipotalámico
E	Día embrionario
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (“epidermal growth factor”)
EM	Eminencia media
Fd	Franja dorsal
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico (“fibroblast growth factor”)
Fi	Franja intermedia
FoxJ1	Factor de transcripción J1
Fv	Franja ventral
GA	Glutaraldehído
GFAP	Proteína gliofibrilar ácida (“glial fibrillary acidic protein”)
GLAST	Transportador de glutamato de astrocitos (“glutamate aspartate transporter”)
Glt-1	Transportador de glutamato-1 (“glutamate transporter-1”)
GLUT-1	Transportador de glucosa-1 (“glucose transporter-1”)
GnRH	Hormona liberadora de hormona de gonadotropina (“Gonadotropin-releasing hormone”)
HFD	Dieta hipercalórica (“high fat diet”)
HMB	Hipotálamo mediobasal
HRP	Peroxidasa de rábano (“horseradish peroxidase”)
i.c.v	Intracerebroventricular
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina (“insulin-like growth factor-1”)
i.p.	Intraperitoneal
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Lhx2	LIM homeobox 2
NGS	Suero normal de cabra (“normal goat serum”)
NPY	Neuropéptido Y
NSO	Núcleo supraóptico
OX	Quiasma óptico
P	Día postnatal
PFA	Paraformaldehído
POMC	Pro-opiomelanocortina
RARRES2	Retinoic acid receptor responder 2
RAX	Retina and anterior neural fold homeobox transcription factor
RCV	Región caudoventral no multiciliada

RC2	Célula radial 2 (“radial cell 2”)
RDM	Región dorsal multiciliada
REL	Retículo endoplásmico liso
RER	Retículo endoplásmico rugoso
Ri	Receso infundibular
RRV	Región rostroventral no multiciliada
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SHH	Sonic Hedgehog
SNC	Sistema Nervioso Central
SVZ	Zona subventricular (“subventricular zone”)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
VL	Ventrículo lateral
VMH	Núcleo ventromedial hipotalámico
VZ	Zona ventricular (“ventricular zone”)
ZO-1	Zonula occludens-1
3V	Tercer ventrículo
4V	Cuarto ventrículo

Introducción

1 Introducción

1.1 Origen neuroepitelial de Sistema Nervioso Central. Desarrollo del Sistema Ventricular

El sistema nervioso central (SNC) deriva del neuroepitelio que forma la pared del tubo neural el cual se encuentra muy conservado en todos los vertebrados. En etapas embrionarias tempranas, el ectodermo sufre un engrosamiento que genera la placa neural que está formada por una capa de células columnares llamadas células neuroepiteliales. Debido a la inducción de la notocorda se produce el plegamiento de la placa neural, dando lugar a un surco central que finalmente se fusionará formando un cilindro llamado el tubo neural, proceso denominado neurulación (O'Rahilly & Müller 1994).

Las células neuroepiteliales presentan una organización bipolar. La zona apical contacta con el lumen de la cavidad, los futuros ventrículos, mostrando en superficie microvellosidades y un único cilio, mientras que basalmente, lanzan un pie terminal que contacta con la superficie del tubo (Chenn et al. 1998). Apicalmente, presentan uniones adherentes y estrechas (Dimou & Götz 2014) y expresan marcadores como CD133 (previamente denominada Prominina-1) en su membrana plasmática (Weigmann et al. 1997; Corbeil et al. 2001).

Tras el cierre del tubo neural, las células neuroepiteliales proliferan simétricamente y de forma masiva, generando una gruesa capa de epitelio pseudoestratificado (Chenn et al. 1998). Posteriormente, en estadio embrionario 9 (E9) de ratón, se cierran los extremos anterior y posterior, llamados poros neurales, y se produce un fenómeno de dilatación ventricular en el que el tubo neural se rellena del líquido cefalorraquídeo (LCR), producido por el neuroepitelio en este estadio, y se expande dando lugar a los primitivos ventrículos (Desmond & Jacobson 1977; Lowery & Sive 2009). Además de cumplir una función de amortiguación del cerebro, el LCR contribuye al mantenimiento de la presión intracraneal, al transporte de nutrientes y desechos/productos metabólicos y a la distribución de señales químicas implicadas en desarrollo y homeostasis (Mashayekhi et al. 2002; Segal 1993). Las uniones estrechas y adherentes de las células neuroepiteliales son necesarias para que el LCR cumpla su función durante el desarrollo, sin embargo las uniones estrechas en el epitelio ventricular del adulto son sustituidas por uniones tipo GAP o comunicantes (Whish et al.

2015; Jiménez et al. 2014). La cavidad ventricular se divide en este punto en anterior y posterior mediante un estrechamiento central. La zona anterior dará lugar al cerebro y la posterior a la médula.

Entre E13 y E15 en ratones, el neuroepitelio comienza a dividirse de forma asimétrica dando lugar a las primeras neuronas y al primer tipo de célula de soporte o glía, la llamada glía radial (Kriegstein & Götz 2003) (Figura 1). No será hasta E18 cuando se genere la mayor parte de la glía madura del SNC en la denominada fase gliogénica. La glía radial tapiza al ventrículo constituyendo la zona ventricular (VZ, del inglés *ventricular zone*) (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009). Éstas células mantienen algunas características de células neuroepiteliales como la expresión de nestina y RC2, que son filamentos intermedios típicos de células madre y progenitoras del SNC (Hartfuss et al. 2001; Lendahl et al. 1990); también mantienen el contacto apicalmente con la cavidad ventricular y basalmente el con la lámina basal mediante el pie terminal. Sin embargo, disminuyen ciertas características epiteliales como la polaridad de su membrana plasmática (Aaku-Saraste et al. 1997) y la cantidad de uniones estrechas, que llegan a desaparecer, junto a un aumento simultáneo en la cantidad de las uniones adherentes (Kriegstein & Götz 2003). Estas células adquieren gránulos de glucógeno (Gadisseux & Evrard 1985), comienza a expresar el transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST) (Shibata et al. 1997), la proteína de unión a Ca^{2+} S100 β (Götz & Huttner 2005), vimentina (Pixley & de Vellis 1984), la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP) (Feng & Heintz 1995) y la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), todos ellos elementos característicos de astrocitos. En algunos mamíferos la expresión de estos marcadores aparece en momentos diferentes del desarrollo, como la proteína GFAP que en primates aparece en estadios embrionarios tardíos (Levitt & Rakic 1980), mientras que en roedores lo hacen postnatalmente (Bignami & Dahl 1974; Rakic 2003) (Tabla 1).

La glía radial se divide simétricamente al inicio, para posteriormente, mediante divisiones asimétricas, dar lugar a células progenitoras tanto neurales como gliales, que se disponen basalmente a ellas generando la zona subventricular (SVZ del inglés *subventricular zone*). Las células progenitoras proliferan a una tasa mucho mayor que la glía radial y ayudan al rápido crecimiento del manto. De ellas procederán prácticamente la totalidad de las neuronas del SNC (Malatesta et al. 2003; Anthony et al. 2004; Huttner & Brand 1997; Noctor et al. 2008). La glía radial también generará el epéndimo destinado a tapizar prácticamente la totalidad de las cavidades ventriculares.

Tabla 1 Comparación entre las características de las células neuroepiteliales y la glía radial.

Características	Células neuroepiteliales	Células de glía radial
Migración nuclear intercinética	Apicobasal	Apicobasal hasta el límite de la VZ o SVZ
Superficie apical	Presente	Presente
Polaridad apicobasal	Presente	Presente, pero disminuida
Uniones estrechas	Presentes	Ausentes
Uniones adherentes	Presentes	Presentes
Contacto con la lámina basal	Presente	Presente
Gránulos de glucógeno	Ausentes	Presentes
Expresión de nestina	Presente	Presente
Expresión de vimentina	Ausente	Presente
Marcadores astrogliales (GLAST, S100β, GFAP)	Ausentes	Presentes
Neurogénesis	Si	Si

Sabemos que la endimogénesis en ratón sigue un patrón caudo-rostral comenzando en E14 por el cuarto ventrículo (4V) y el acueducto de Silvio, siguiendo en E16 por el tercer ventrículo (3V), y dándose el último pico de proliferación en los ventrículos laterales (VL) en E17 (Das 1979). Trabajos posteriores han identificado una pequeña endimogénesis en etapas tempranas del periodo postnatal tanto en los VL como en el 3V (Spassky et al. 2005; Walsh et al. 1978). Hasta la fecha, los VL han sido los más estudiados tanto a lo largo del desarrollo como en las etapas postnatal y adulta por su relación directa con la neurogénesis adulta. En ratones, la VZ el día 1 tras el nacimiento persiste, formada por glía radial mayoritariamente, pero con alguna célula endimaria multiciliada intercalada ya perfectamente diferenciada, y la SVZ engrosada repleta de progenitores similar al embrión. Durante la primera semana de vida, progresivamente, y en dirección caudoventral a rostródorsal, la glía radial va

diferenciándose a células endoteliales que todavía muestran signos de inmadurez (Spassky et al. 2005). Todo el epéndimo generado deriva de la glía radial, puesto que el epéndimo no prolifera y en consecuencia no tiene capacidad de amplificación (Tramontin et al. 2003). Esta diferenciación no sólo consiste en el paso de células uniciliadas a multiciliadas, sino también en el cambio de la estructura interna y función de los cilios. Pasamos de un único cilio inmóvil de estructura 9 pares de microtúbulos formando un cilindro (9+0), a múltiples cilios móviles de estructura 9 pares de microtúbulos formando un cilindro y un par central (9+2) (Marshall & Kintner 2008). Durante este proceso, las células contienen un gran número de centriolos que migran apicalmente y se anclan en la membrana plasmática, donde maduran para convertirse en los cuerpos basales de cilios móviles (Spassky et al. 2005). A día 15 postnatal (P15), la VZ está formada por un epitelio de células endoteliales multiciliadas maduras que coexisten con células de glía, los cuales ejercen de células madre neurales que proliferarán a lo largo de la vida adulta para poblar la zona subventricular (Spassky et al. 2005). Esta está organizada en focos discretos de células con capacidad proliferativa (Merkle et al. 2004; Tramontin et al. 2003) (Figura 1).

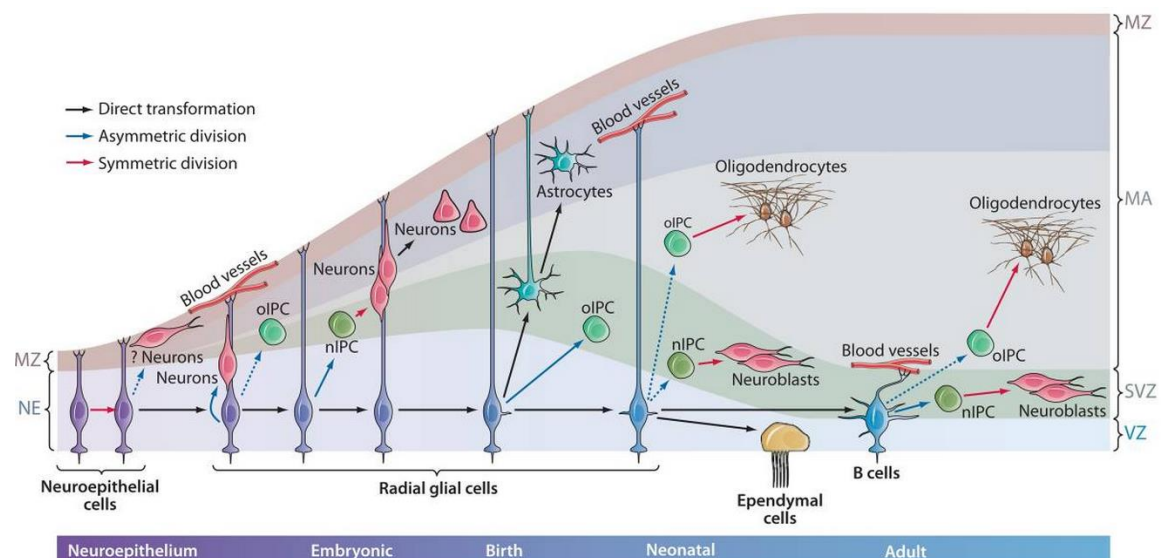


Figura 1. Naturaleza glial de las células madre neurales en el desarrollo y en el adulto. Las células neuroepiteliales localizadas en la VZ, se dividen simétricamente dando nuevas células neuroepiteliales y aumentando el tamaño del tubo neural, siendo probable que también generen algunas neuronas. Posteriormente el neuroepitelio se transforma en glía radial, que se divide asimétricamente dando lugar a neuronas, progenitores neuronales y gliales. Estos progenitores dan lugar a la SVZ y tienen una capacidad proliferativa mayor que la glía radial. Son los responsables de la explosión neuronal que engrosará el manto. La glía radial también se divide simétricamente aumentando la superficie de la cavidad ventricular. Finalmente, tras el nacimiento, en los ventrículos laterales la glía radial se transforma en células endoteliales y algunas quedan como astrocitos que actúan como células madre adultas o células tipo B. Flechas discontinuas: hipótesis no demostrada; flechas continuas: evidencia experimental. MA, manto; MZ, zona marginal; NE, neuroepitelio; nIPC, célula progenitora intermedia neuronal; oIPC, célula progenitora intermedia oligodendrocítica; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009).

Para la mayoría de los autores, la glía no endimaria que persiste asociada a los VL en etapas adultas ya no se puede considerar como glía radial propiamente dicha, aunque descienda directamente de éstas, por las características morfológicas que las diferencian. Sin embargo, se mantiene con la denominación de glía radial la que encontramos en el cerebelo (glía de Bergmann), en la retina (glía de Müller) y en el 3V y 4V denominados tanicitos, siendo todas células gliales alargadas relacionadas con el desarrollo del órgano o región en la que se encuentran.

La palabra “tanícito” deriva etimológicamente del griego *tanux* (alargado) (Horstmann 1954). Son por tanto, células alargadas consideradas por su morfología y características moleculares remanentes de la glía radial y aunque, antiguamente sólo se las consideraba células de transporte entre los vasos sanguíneos y el LCR, actualmente se ha descrito que puedan dar lugar a neuronas (Rodríguez et al. 2005; Xu et al. 2005; Kokoeva et al. 2007; Lee et al. 2012; S C Robins et al. 2013) y glía (Sarah C. Robins et al. 2013) aunque esto sólo se ha podido demostrar en condiciones muy concretas, usualmente tras estimulación o daño.

Además de los cambios que se producen a nivel celular, vemos que durante el desarrollo, la estructuración de los ventrículos va cambiando generando en último término, el sistema ventricular presente en el adulto. Este recorre el interior del SNC en forma de cavidades interconectadas llamadas ventrículos, que contienen en su interior al LCR (Figura 2A). Como hemos citado anteriormente, estos ventrículos son: los VL, simétricos y localizados cada uno en un hemisferio del telencéfalo (Figura 2B); el 3V, ubicado en el diencefalo (Figura 2C); el 4V, situado en el rombencéfalo (Figura 2D) y el canal central (CC) de la médula espinal (Figura 2E).

Durante el desarrollo, debido al engrosamiento del manto producido por la explosión neuronal y a fenómenos de apoptosis, se producen constricciones en las cavidades ventriculares que generarán los ventrículos definitivos. El prosencéfalo y el rombencéfalo se dividen generando cada uno dos cavidades más. El prosencéfalo dará lugar al telencéfalo y el diencefalo y el rombencéfalo al metencéfalo y mielencéfalo. La cavidad del telencéfalo dará lugar a los dos VL, dispuestos cada uno en un hemisferio y la cavidad del diencefalo al 3V. El mesencéfalo prácticamente no sufre constricciones a lo largo del desarrollo, las únicas modificaciones que experimenta son un engrosamiento de las paredes y el estrechamiento de la cavidad en la región caudal dando lugar al acueducto de Silvio, cavidad que une el 3V en su porción dorsal con el 4V. El metencéfalo dará lugar al cerebelo y el mielencéfalo al bulbo raquídeo, entre ellos se ubicará el futuro 4V, que tomará forma romboide debido al desarrollo neural.

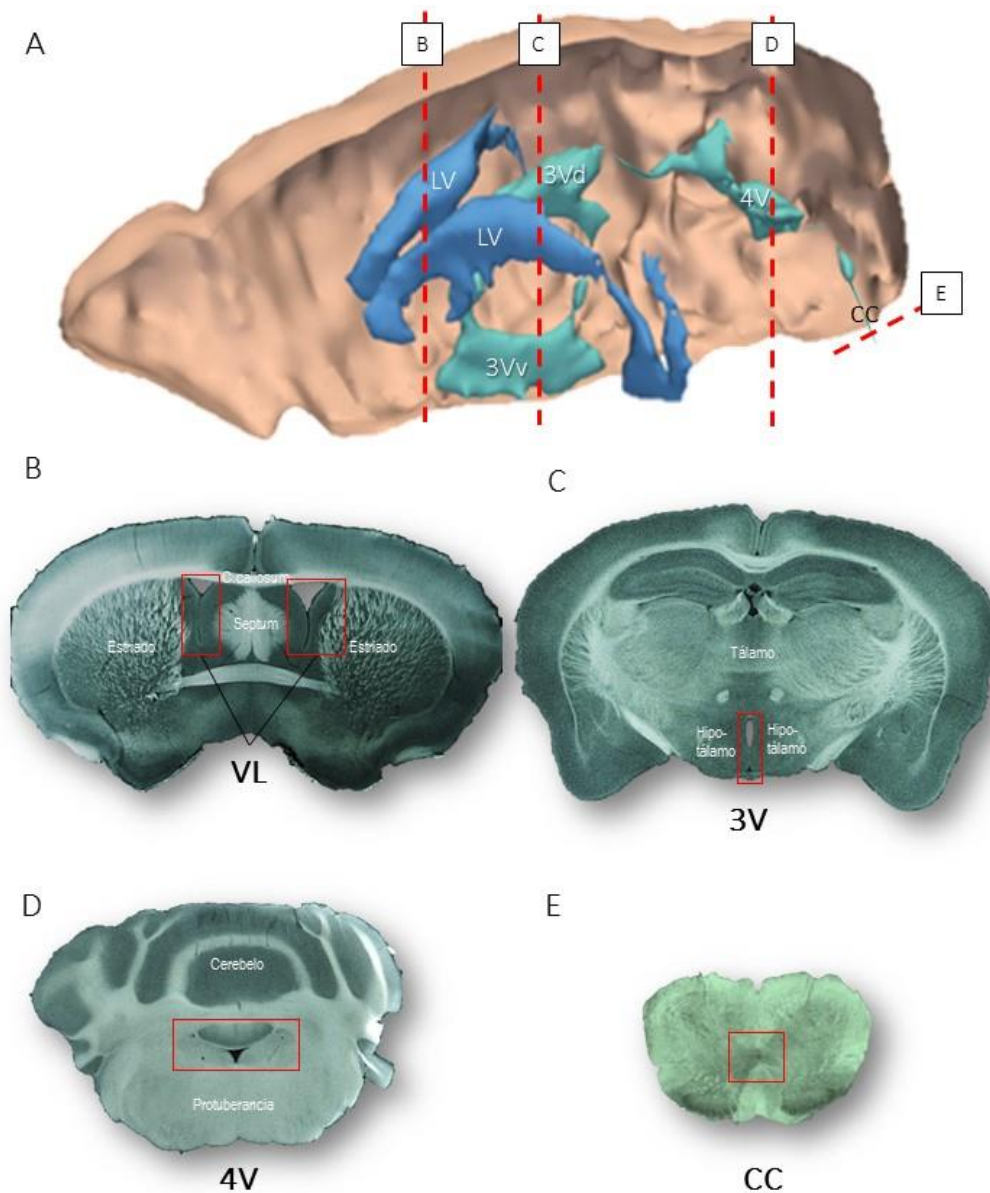


Figura 2. El sistema ventricular en el adulto. A) Diagrama donde se muestran las diferentes cavidades que forman el sistema ventricular de ratones adultos. B) Sección coronal de cerebro de ratón adulto donde se observan los VL. C) Sección coronal de cerebro de ratón adulto donde se aprecia tanto el 3V dorsal como el 3V ventral, resaltado sólo el ventral. D) Sección coronal de cerebro de ratón donde se abre el 4V. E) Sección coronal de la médula espinal de ratón en cuyo centro se sitúa el cc. Los recuadros rojos enmarcan las distintas cavidades ventriculares; cc, canal central de la médula espinal; VL, ventrículos laterales; 3V, tercer ventrículo; 3Vd, tercer ventrículo dorsal; 3Vv, tercer ventrículo ventral; 4V, cuarto ventrículo.

En el adulto, el LCR es generado por los plexos coroideos de los ventrículos, el cual se extravasa al espacio subaracnoideo por la abertura del 4V y finalmente es drenado por los gránulos de Pacchioni en las microvellosidades aracnoideas, donde

pasa al torrente sanguíneo y al sistema linfático. En los ventrículos, el LCR baña a las distintas poblaciones celulares que constituyen sus paredes y a los plexos coroideos que parecen flotar dentro de la cavidad ventricular. Los plexos coroideos se originan de la piamadre que rodea al 4V (Miyayama et al. 2003; Segal 1993) y constituyen un tejido laminar que en el interior de las cavidades de los VL, 3V y 4V está formado por células multiciliadas generadoras de la mayor parte del LCR. En el lumen ventricular también podemos encontrar algunas células libres y expansiones axónicas provenientes del núcleo del rafe (Tong et al. 2014).

1.2 Organización y capacidad proliferativa del sistema ventricular en postnatal adulto

1.2.1 Ventrículos laterales

Los VL limitan con el septum medialmente, el estriado en su pared lateral y el cuerpo calloso dorsalmente (Figura 3). Las células que cubren el septum y el cuerpo calloso son células endoteliales multiciliadas, sin embargo, en la pared adyacente al estriado encontramos también células gliales implicadas en la neurogénesis adulta, además de la SVZ que subyace al epitelio de la cavidad. La organización detallada de esta pared en ratones se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*), reconstrucciones tridimensionales y diversos marcadores moleculares (Doetsch et al. 1997).

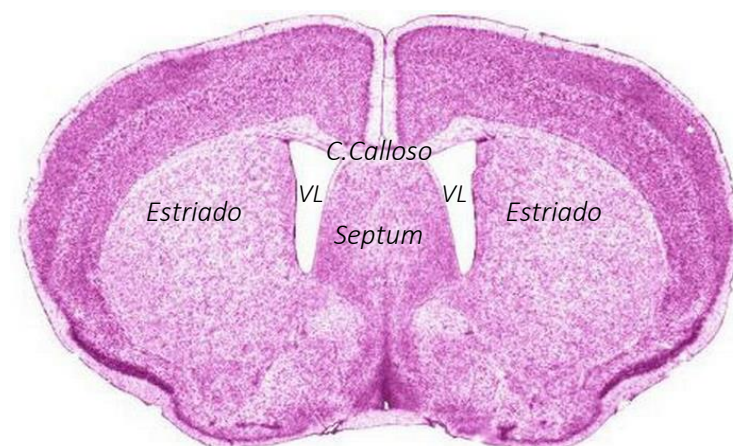


Figura 3. Ventrículos laterales de ratón adulto. Sección coronal donde se aprecian los ventrículos laterales que se encuentran flanqueados por el estriado en los laterales externos, por el septum en los laterales internos y por el cuerpo calloso dorsalmente. VL, ventrículos laterales.

En contacto con el ventrículo, formando la VZ, se han descrito 3 poblaciones celulares: las células endimarias multiciliadas (E1), células endimarias biciliadas (E2) y células uniciliadas o tipo B1, que se corresponden con las células madre. Estas poblaciones se organizan formando los denominados “pinwheels”, en los que las células E1 y ocasionalmente alguna E2, rodean a pequeñas agrupaciones de células B1 (Mirzadeh et al. 2008).

La mayor parte de la superficie epitelial de los VL están tapizadas por células E1 que, con el batido de sus cilios, mueven el LCR por el sistema ventricular (Ibañez-Tallon et al. 2003). Son células de forma cúbica, interdigitadas con las células vecinas y presentan numerosos complejos de unión. El citoplasma es poco denso y contiene pocos orgánulos, excepto apicalmente donde se observan numerosas mitocondrias en las proximidades de los corpúsculos basales de los cilios. El núcleo presenta cromatina laxa, con algunos grumos de heterocromatina asociada a la membrana nuclear. En ratones, estas células expresan CD24 y S100 β y presentan una amplia superficie apical con aproximadamente 30-40 cilios largos, de alrededor a 10 μ m de longitud, con estructura 9+2 (Ohata et al. 2014; Spassky et al. 2005; Doetsch et al. 1997; Mirzadeh et al. 2008).

Las células E2 han sido añadidas recientemente a las descripciones iniciales de la VZ. Son de un tamaño superior al de las E1 y presentan una amplia superficie de contacto con la cavidad ventricular, pero sólo exhiben dos largos cilios. Ultraestructuralmente presentan similitudes con las células E1, aunque hay pequeñas diferencias. Al igual que las anteriores, son de citoplasma claro y núcleo redondeado con cromatina laxa. Sin embargo, presentan interdigitaciones mucho más profundas con sus células vecinas. Las mitocondrias también son abundantes en la región apical, pero a diferencia de las E1, se ha visto en reconstrucciones que también hay un alto número de mitocondrias que rodean al núcleo. La característica más destacada en estas células son los dos grandes corpúsculos basales que presentan sus cilios. Éstos están formados de una densa estructura proteica que los rodea, lo que les confiere un aspecto de “donut” en un corte transversal de la superficie (Figura 4). La función de estas células es desconocida, lo único que sabemos es que parece ser que las células tipo E2 en la VZ no proliferan (Mirzadeh et al. 2008).

Las células tipo B1 presentan características de astrocitos, como son la presencia de filamentos intermedios de GFAP y una expansión basal que contacta con los vasos sanguíneos. Proceden de la glía radial embrionaria y son las células madre que dan lugar a toda la neurogénesis en el bulbo olfatorio (BO) adulto (Merkle et al. 2004). Su citoplasma es muy electrolúcido ya que, a excepción de la extensa red de filamentos intermedios, no presenta casi contenido citoplasmático, es decir, es pobre en orgánulos. Su núcleo, de cromatina condensada, suele presentar profundas invaginaciones con frecuentes fusiones de membrana nuclear. Estas células presentan un único cilio corto en su superficie. Se trata de un cilio primario, caracterizado por su estructura de microtúbulos 9+0 y que además posee un centriolo orientado perpendicularmente al corpúsculo basal (Doetsch et al. 1999; Doetsch et al. 1997; Mirzadeh et al. 2008).

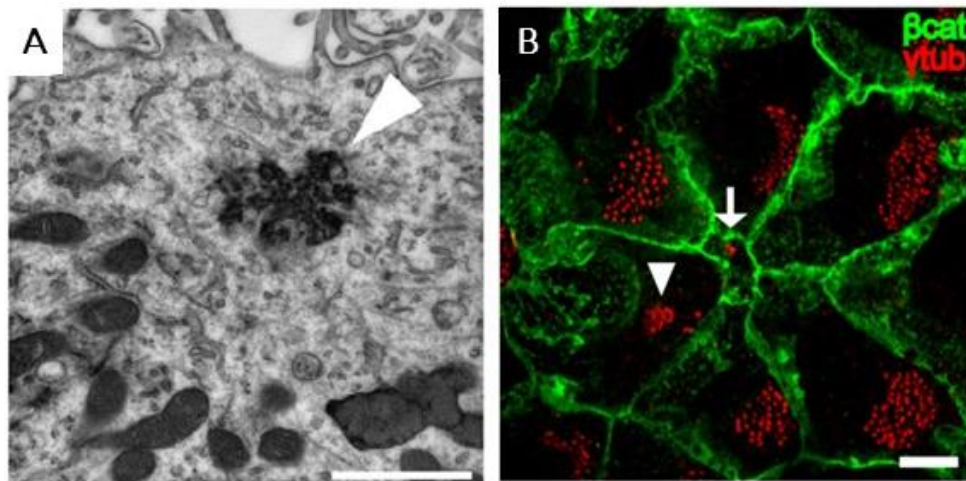


Figura 4. Corpúsculos basales de los tipos celulares de la SVZ. A) Detalle del grueso corpúsculo basal que presentan las células E2 en cada cilio. B) Imagen confocal de una inmunofluorescencia para γ tubulina (rojo), marcador de corpúsculos basales, y β -catenina, componente de las uniones adherentes. La imagen está tomada a partir de un "whole mount", técnica por la cual se puede estudiar las estructuras más apicales de las células. Se aprecia una estructura en "pinwheel", formada por una célula uniciliada central, rodeada mayoritariamente por células de abundantes corpúsculos basales, por lo tanto multiciliadas. Una de las células externas es una célula biciliada, fácilmente reconocible por el tamaño de sus corpúsculos basales (cabeza de flecha). Nótese la diferencia de tamaño con el corpúsculo basal de la célula uniciliada central (flecha) y sobretodo, con los de las multiciliadas. Modificado de Mirzadeh *et al.* 2008.

Como ya hemos mencionado, en la superficie de los VL encontramos axones que la recorren. Éstos son serotoninérgicos procedentes del núcleo del rafe. Recientemente, se ha descrito que dichos axones supraependimarios tienen una relación con el control de la proliferación de las B1, probablemente como sistema de anclaje. Estos axones son abrazados por las microvellosidades tanto de las células E1 como de las B1 (Tong et al. 2014).

Como ya comentamos, adyacente a la franja de la VZ se encuentra la SVZ donde encontramos a la descendencia de las células B1 en el adulto. Las células B1 dan lugar a los precursores intermedios (progenitores de amplificación transitoria) o células tipo C, que a su vez generan los neuroblastos o células tipo A. Los neuroblastos migran tangencialmente de 5 a 6 milímetros hasta llegar al BO, donde dan lugar a distintos tipos de interneuronas funcionales (Doetsch et al. 1997; Doetsch et al. 2002; Merkle et al. 2007) (Figura 5).

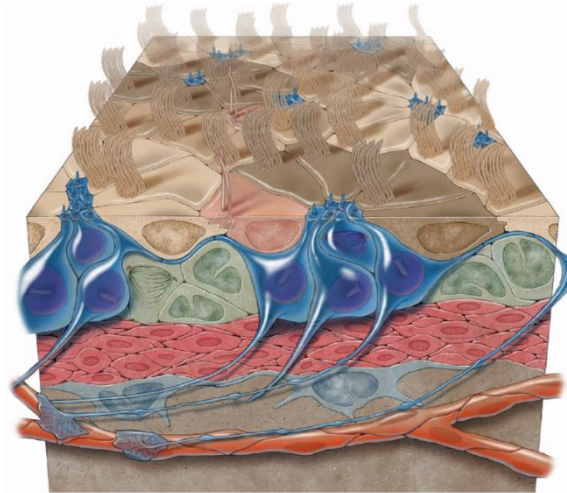


Figura 5. Organización de la pared de los ventrículos laterales. Modelo tridimensional de la pared ventricular que muestra la organización en "pinwheel" de los distintos tipos celulares que forman la VZ. Las células B1 (azul) forman pequeñas agrupaciones que exhiben una pequeña porción de superficie celular a la luz ventricular, suficiente para exponer su único cilio, rodeadas por las células E1 (marrón claro y oscuro) y alguna E2 (naranja). Subventricularmente se observa la disposición de los tipos celulares descendientes de las B1, las C (verde) y las A (rojo). Estas últimas forman cadenas migratorias rodeadas de astrocitos estructurales que forman los gliotubos, "autopistas" por donde viajan las migradoras hasta el bulbo olfatorio. Tomado de Mirzadeh *et al* 2008.

1.2.2 Cuarto ventrículo

El 4V tiene una morfología romboide visto desde las porciones anteriores hasta las posteriores. Dorsalmente, es decir el techo del ventrículo, se compone del velo medular superior e inferior. Este último se abre para permitir el paso de LCR a la cavidad subaracnoidea en la llamada abertura media y las aberturas laterales, aunque estas últimas son de mucho menor tamaño. El velo medular inferior se pliega formando la tela coroidea, que cubre por debajo al velo medular inferior. Ésta está formada por una prolongación de la piamadre y un epitelio multiciliado que la tapiza en su cara ventricular (Figura 6).

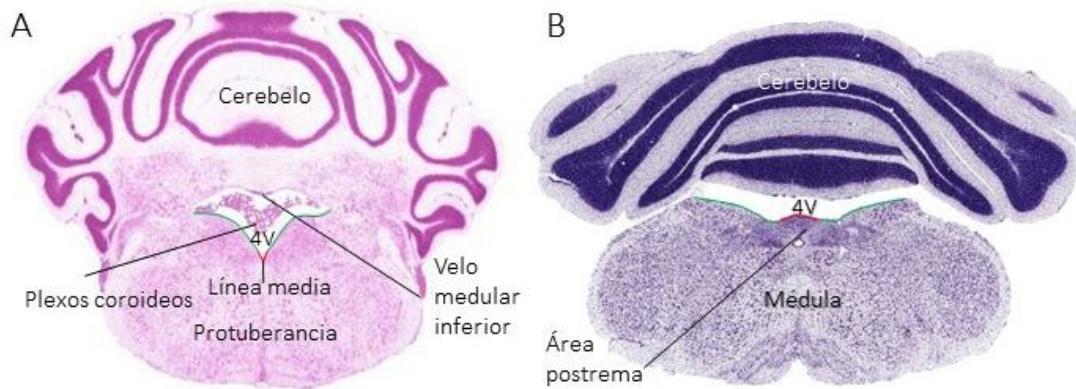


Figura 6. Cuarto ventrículo. A) Sección coronal de ratón adulto donde se aprecia la cavidad del 4V en un nivel anterior. Aquí todavía no se ha abierto lateralmente y se encuentra flanqueado por el cerebelo dorsalmente y por la protuberancia ventralmente. A este nivel la pared dorsal del 4V está formada por el velo medular inferior. También se pueden observar los plexos coroideos en el interior de la cavidad. B) Sección coronal de ratón adulto donde se encuentra el 4V en un nivel posterior. Aquí es la médula la que flanquea el límite inferior del 4V. En el suelo del 4V en este nivel se encuentra el área postrema, uno de los órganos circunventriculares que podemos encontrar en el cerebro. El límite dorsal sigue siendo el cerebelo.

El suelo del 4V tiene forma romboide y está recorrido por el centro a lo largo del eje anteroposterior por un surco llamado línea media (Figura 7). Esta línea media está tapizada por un epitelio pseudoestratificado formado por tanicitos que lanzan procesos basales que contactan con las neuronas de los núcleos monoaminérgicos (locus coeruleus) y serotoninérgicos (núcleos del rafe) (Felten et al. 1981), y hacia los vasos sanguíneos fenestrados del área postrema (AP) (Fanny. Langlet et al. 2013).

Estas células protruyen hacia la luz ventricular del 4V siendo su superficie muy densa en microvellosidades, entre las cuales emerge un cilio ocasionalmente, aunque los tanicitos más próximos al canal de la médula espinal carecen de microvellosidades.

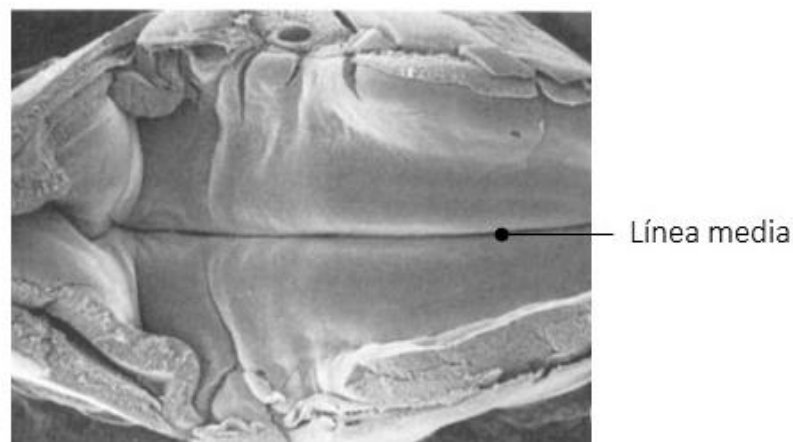


Figura 7. Suelo del 4V. Imagen de microscopía electrónica de barrido donde se observa que el suelo del 4V tiene forma romboide y presenta un surco central que lo recorre anteroposteriormente denominado línea media. Modificado de Tanaka *et al.* 1987.

En general, los tanicitos del 4V son células muy interdigitadas que presentan desmosomas apicales y subapicales, y pequeñas uniones estrechas (Felten et al. 1981). Fuera de la línea media, la superficie del 4V está tapizada por células endimarias multiciliadas, entre las cuales pueden ocasionalmente intercalarse tanicitos. También existen células supraependimarias, pero sólo se han observado sobre los tanicitos, no sobre las células multiciliadas (Collins 1989; Felten et al. 1981).

Aunque se ha considerado el 4V como un nicho neurogénico adulto, presenta una tasa de proliferación muy baja (Bennett et al. 2009). Estudios *in vitro* revelan que el suelo del 4V es capaz de generar neuroesferas tras la adición de EGF y FGF al medio de cultivo (Weiss et al. 1996; Bennett et al. 2009) y diferenciarse a neuronas y glía (Bennett et al. 2009). *In vivo*, la capacidad proliferativa se le ha atribuido a los tanicitos localizados en la línea media (Hourai & Miyata 2013). Mediante estudios de captación del análogo de la timidina, 5-bromo-2-deoxyuridina (BrdU), se muestra a tiempos largos que pueden dar lugar a neuronas (Bennett et al. 2009). Otros autores, por el contrario, opinan que las células que proliferan no son específicamente los tanicitos, sino células próximas a la cavidad y que no solamente se limitan a la línea media. Además, niegan que se estén formando neuronas, considerando la región del 4V sólo con capacidad gliogénica (Martens et al. 2002).

1.2.3 El canal central de la médula espinal

La médula espinal de ratones, en una sección transversal, contiene una porción interna de sustancia gris, en forma de mariposa, y una porción externa a la “mariposa” formada por sustancia blanca. Cada “ala” tiene una parte ventral, o asta anterior, y una dorsal, o asta posterior. En el punto de unión entre las dos “alas”, correspondiente al centro de la médula espinal, se encuentra el canal central (cc) o canal endimario, una cavidad

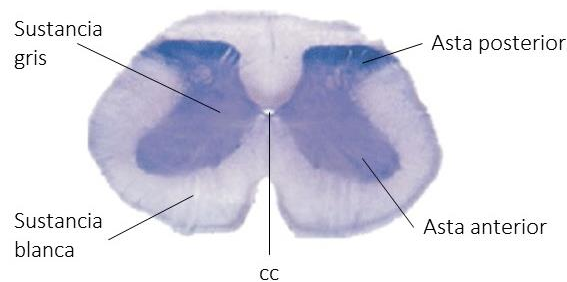


Figura 8. Médula espinal. Sección transversal de la médula espinal de ratón. En ella se aprecian la sustancia blanca (exterior), y la sustancia gris (interior), en forma de mariposa. En el centro se sitúa una pequeña abertura correspondiente al cc. Cc, canal central de la médula espinal.

ventricular, que es continuación del 4V (Figura 8).

El canal central del ratón adulto está constituido por un epitelio pseudoestratificado de células endimarias alargadas, astrocitos con cilio primario y neuronas (Kútna et al. 2014). Las células endimarias del cc se caracterizan por presentar de uno a cuatro cilios de estructura 9+2, siendo la célula biciliada el tipo celular más común (70%). Las células endimarias del cc son diferentes a las células endimarias clásicas descritas en los ventrículos laterales. Además de presentar un máximo de 4 cilios, en el canal las células endimarias son alargadas en vez de cúbicas y poseen un citoplasma más electrodense, aunque comparten la expresión de proteínas como vimentina, CD24 y FoxJ1. Sus corpúsculos basales también son diferentes a los de las multiciliadas, siendo en las células endimarias del cc más gruesos que los de las multiciliadas. Esto favorece la visualización del orificio central, por lo que se dice que tienen forma de “donut”, como los descritos en las células E2 de la SVZ. La distribución de estas células en el cc muestra una cierta regionalización, mientras que dorsal y ventralmente sólo aparecen preferentemente células uniciliadas y algunas biciliadas, en las porciones laterales, por el contrario, podemos encontrar principalmente células biciliadas (un 70% aproximadamente) y en menor proporción, tetraciliadas. Además, entre las células endimarias se encuentran astrocitos y neuronas en contacto con la cavidad ventricular (Alfaro-Cervello et al. 2012).

Curiosamente, la organización celular del cc difiere mucho entre mamíferos. Así, en el cc de primates, como el de *Macaca fascicularis* aparecen células multiciliadas en los laterales del cc, mientras que las uniciliadas y biciliadas se mantienen en los polos dorsal y ventral. Entre las células endimarias se encuentran, como en el ratón, astrocitos y neuronas que también contactan con la cavidad. Las células uniciliadas y biciliadas presentan cilios con corpúsculos basales en “donut” como los del ratón, y las células endimarias multiciliadas son similares a las descritas en los ventrículos laterales (Alfaro-Cervello et al. 2014).

En humanos adultos, el cc es una cavidad virtual, ya que se encuentra estenosada, y está formado por células E1 y biciliadas con cilios atípicos (Alfaro-Cervello et al. 2014; Garcia-Ovejero et al. 2015) (Figura 9). Trabajos recientes han demostrado en ratones, que son las células endimarias biciliadas del canal las principales responsables de la proliferación postnatal durante el crecimiento generando nuevas células endimarias.

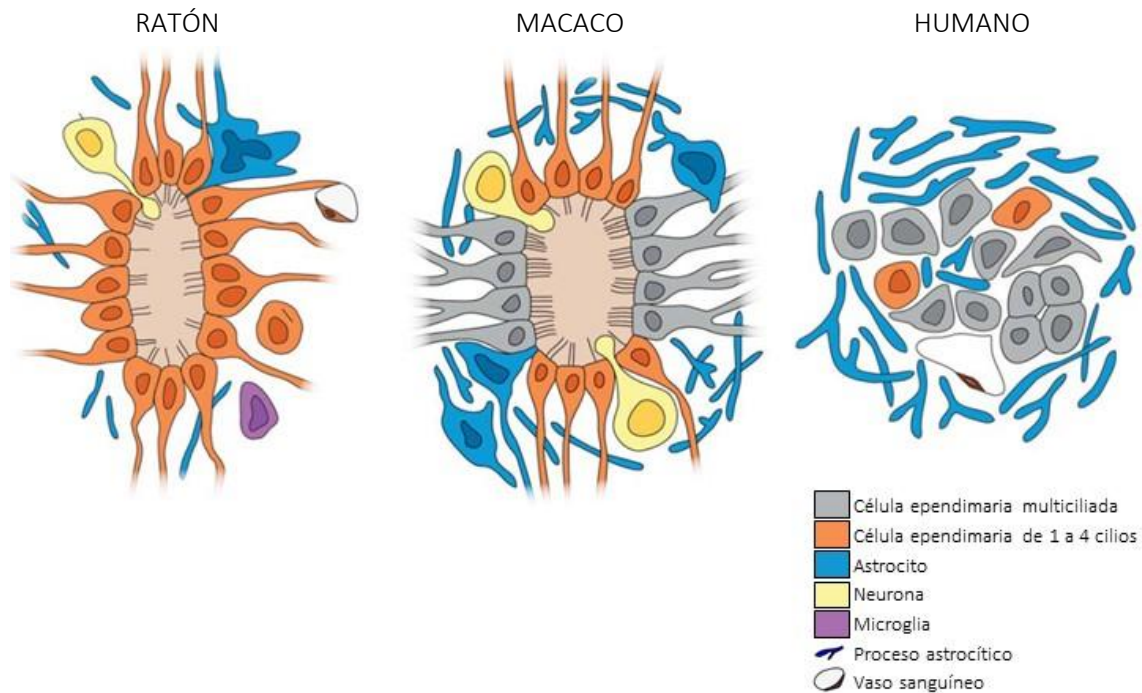


Figura 9. Diagramas de la organización del cc propuesta en el ratón, macaco y humano adulto. Visión coronal esquemática que muestra los distintos tipos celulares del cc y su organización. De izquierda a derecha: ratón, macaco y humano. En el ratón se encuentran células endimarias con hasta cuatro cilios, aunque la mayoría son biciliadas. Astrocitos y neuronas se intercalan entre las células endimarias y contactan con la luz del canal. En el macaco aparecen células endimarias multiciliadas en las paredes laterales del canal y uniciliadas o biciliadas en los polos. También se intercalan astrocitos y neuronas como en el ratón. El cc de la médula espinal humana se encuentra estenosado. Está formado por células endimarias multiciliadas y entre los grupos de células discurren gruesos haces de expansiones astrocitarias. Modificado de Alfaro- Cervelló *et al* 2014

1.3 El tercer ventrículo

1.3.1 Localización, límites y descripción general de tercer ventrículo

El 3V se localiza en el diencefalo, estructura del SNC constituida a su vez por tálamo e hipotálamo (Figura 10A). Consta de dos porciones, una dorsal (3Vd) y otra ventral (3Vv). La dorsal está conectada con el 4V y los VL y descansa sobre la adhesión intertalámica. De ella, surgen dos ramas que descienden hacia la porción ventral, una rostral y otra caudal rodeando la adhesión intertalámica. La porción ventral se encuentra flanqueada por el hipotálamo. Se trata de una cavidad estrecha trapezoidal en una sección sagital. Limita anteriormente con el órgano vascular de la lámina terminal (OVL), posteriormente con el área hipotalámica posterior y ventralmente con el quiasma óptico y la eminencia media (EM) (Figura 10B).

Clásicamente se ha descrito que la pared del 3V se encuentra tapizada por células endoteliales (multiciliadas) y células no ciliadas. La pared dorsolateral del 3V presenta un epéndimo multiciliado, sin embargo, el suelo y paredes del infundíbulo y el resto de la región caudoventral del 3V, presenta además células no multiciliadas. Existe una delgada zona de transición donde las células multiciliadas y no multiciliadas se entremezclan (Walsh et al. 1978), que posteriormente algunos autores han denominado como “overlapping zone” (zona de superposición) (Pérez-Martín et al. 2010). Además, en la región anterior del 3V constituida por parte del OVLT, la región preóptica y la región paraventricular también están tapizadas por epitelio no multiciliado (Mathew 2007). El OVLT junto con la EM, esta última localizada en el suelo del infundíbulo, son órganos circunventriculares. Los órganos circunventriculares son pequeñas estructuras que bordean las cavidades ventriculares implicadas en diferentes funciones homeostáticas. Se caracterizan por contener vasos sanguíneos fenestrados por lo que carecen de barrera hematoencefálica. Tapizándolos, contienen células más o menos alargadas, que contactan con estos vasos fenestrados y con el LCR formando una especie de barrera hematoencefálica. Estas células siempre son no multiciliadas y están consideradas cada vez por más autores como tanicitos. Sin embargo sólo se han aceptado completamente como tanicitos las células que tapizan la EM (Johnson & Gross 1993; Mathew 2008) (Figura 10C).

La cavidad del 3V se elonga ventralmente en lo que se ha denominado infundíbulo o receso infundibular, continuándose con el tallo hipofisario. Dicho receso presenta lateralmente dos invaginaciones que le dan al suelo del 3V en un corte coronal una apariencia biconvexa característica (Figura 10D).

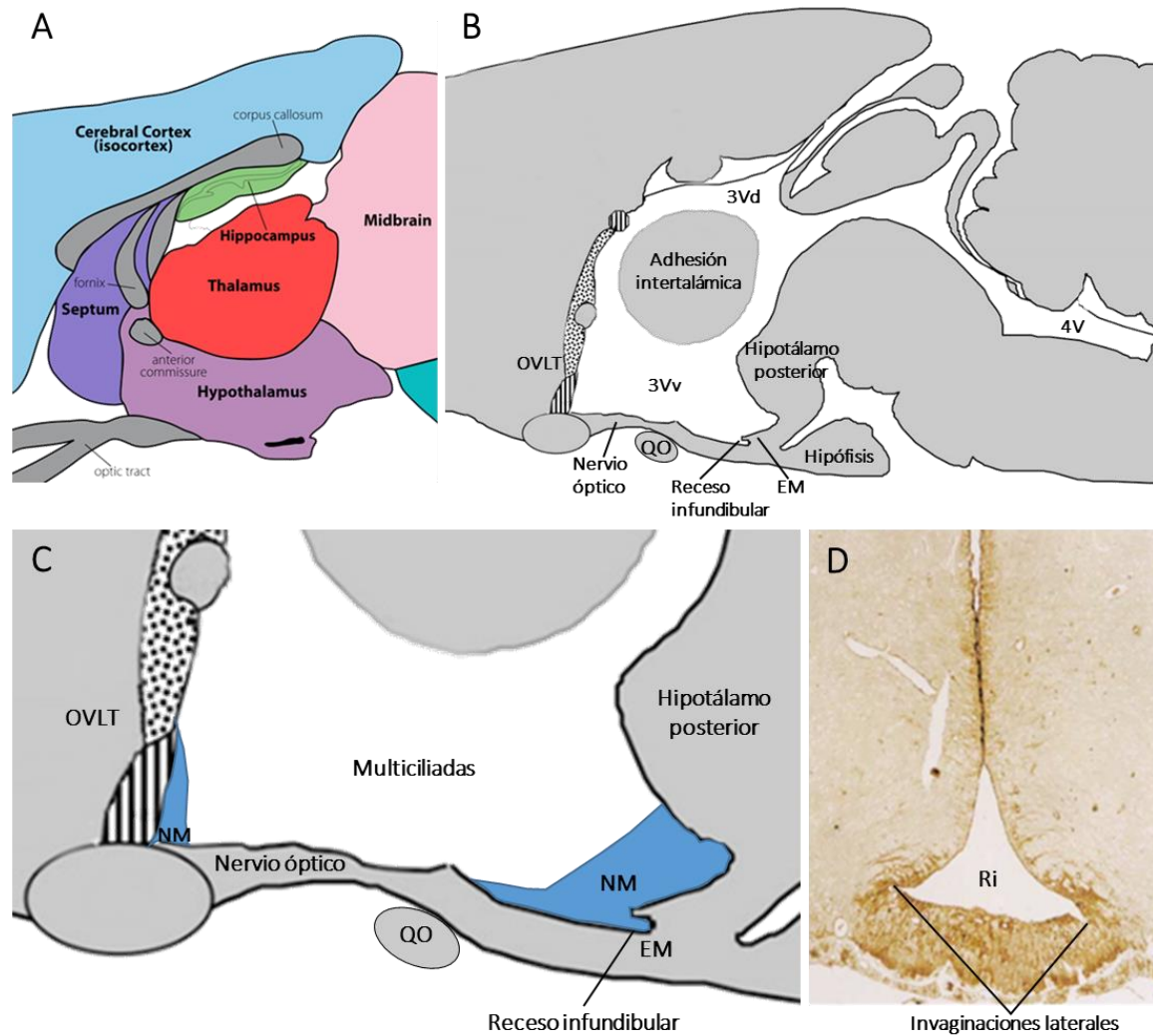


Figura 10. Localización y morfología del 3V. A) Diagrama de un corte sagital de cerebro de ratón, donde se puede localizar el hipotálamo (morado) y el tálamo (rojo). B) Diagrama de un corte sagital de cerebro de ratón donde se dibuja el recorrido del 3V constituido por dos porciones, la parte dorsal (3Vd), por encima de la adhesión intertalámica y localizada en el tálamo, y la ventral (3Vv), por debajo de la adhesión intertalámica y situada en el hipotálamo. La EM, localizada en el límite ventral posterior del 3Vv, se continúa con la hipófisis. C) Detalle del diagrama anterior en el que se muestra el 3Vv con sus límites. Éstos son, anterior, el OVLT, dorsal, la adhesión intertalámica, posterior, el hipotálamo posterior, y ventral, el nervio óptico y la EM. El 3Vv se continúa con la hipófisis por el receso infundibular, donde el 3Vv se estrecha y alarga ventralmente. La pared lateral del 3Vv se encuentra tapizada mayoritariamente por células multiciliadas (en blanco) y sólo rostral y caudalmente existen dos regiones tapizadas por células no multiciliadas (en azul). D) Detalle del receso infundibular en una sección coronal de cerebro de ratón. Se pueden observar las invaginaciones laterales en la porción ventral. El suelo del receso lo forma la EM. EM, eminencia media; NM, células no multiciliadas; OVLT, órgano vascular de la lámina terminal; QO, quiasma óptico; Ri, receso infundibular; 3Vd, tercer ventrículo dorsal; 3Vv, tercer ventrículo ventral.

1.3.2 Región caudoventral e hipotálamo mediobasal. La Eminencia Media

La región caudoventral del 3V se encuentra inmersa en el hipotálamo tuberal o mediobasal (HMB) (Figura 11A). El hipotálamo está formado por una amplia variedad de grupos neuronales con diferentes funciones, todos ellos implicados en la supervivencia del individuo, directa o indirectamente (Sternson 2013). Los núcleos hipotalámicos que contiene el HMB son el núcleo dorsomedial (DMH), el ventromedial (VMH) y el arcuato (ARC) (Schwartz et al. 2000) (Figura 11B).

El HMB guarda una estrecha relación con la hipófisis y parte de los axones de las neuronas que se circunscriben al 3V terminan en la neurohipófisis. También es sabido que los tanicitos de la EM se encuentran en contacto con los capilares del sistema porta de la adenohipófisis.

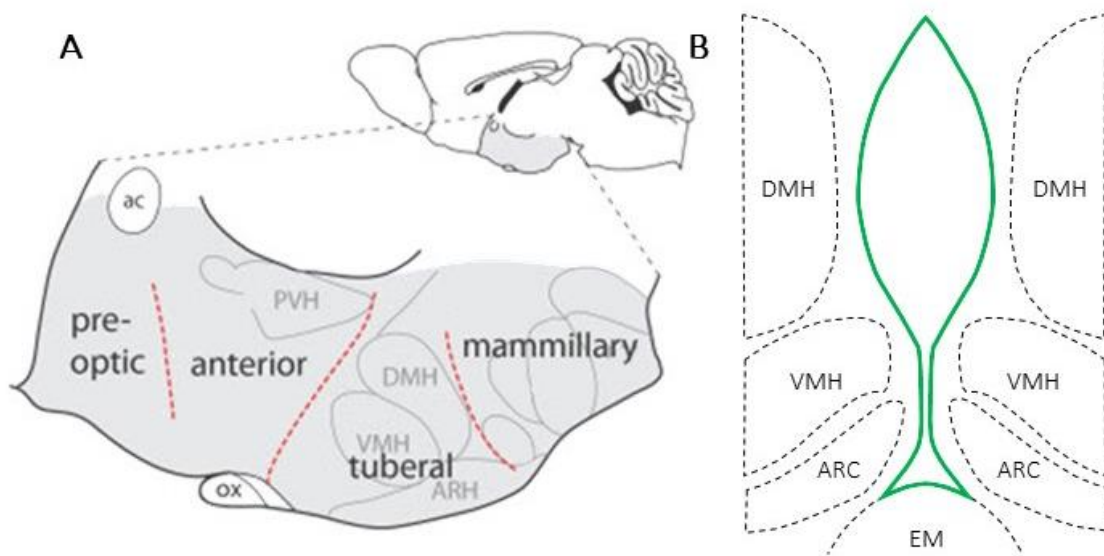


Figura 11. El hipotálamo mediobasal. A) Diagrama del hipotálamo en vista sagital. El 3V abarca desde mitad del área preóptica hasta el hipotálamo mamilar o posterior, el cual forma el límite posterior. La región caudoventral, donde se encuentran los tanicitos está situada en el hipotálamo tuberal o HMB. B) Diagrama del 3V de ratón en sección coronal a nivel del HMB. Los núcleos que rodean el 3V a este nivel son el DMH, el VMH el ARC y la EM, que forma el suelo del 3V. ARC, núcleo arcuato; DMH, núcleo dorsomedial hipotalámico; EM, eminencia media; HMB, hipotálamo medio basal; PVH, núcleo paraventricular hipotalámico; VMH, núcleo ventromedial hipotalámico.

La hipófisis consta de 2 lóbulos, la adenohipófisis y la neurohipófisis. La neurohipófisis se divide a su vez en la EM, el tallo infundibular y la *pars nervosa* y tiene su origen en el neuroectodermo, por lo que se considera como una prolongación del hipotálamo. Es por ello, que la EM se considera parte del hipotálamo y parte de la

neurohipófisis. La neurohipófisis recibe terminales axónicos de las neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico (NSO) que vierten sus neurohormonas, vasopresina (ADH) y oxitocina, directamente a la circulación sistémica. Éstos pasan a través de la EM recorriendo el tallo infundibular. La adenohipófisis, por el contrario, produce hormonas en respuesta a las neurohormonas que recibe de los núcleos hipotalámicos a través del sistema porta en la EM y no directamente de los terminales axónicos como ocurre en la neurohipófisis. En la EM se observa como una gruesa franja ligeramente arqueada compuesta por axones provenientes de diferentes núcleos hipotalámicos, algunos la atraviesan completamente hacia la neurohipófisis, como hemos visto, y otros terminan en la base de la EM, donde se localizan los capilares del sistema porta. Entre ellos existe una red de células gliales (tanto de células endoteliales, como astrocitos, microglía y oligodendrocitos) con abundantes expansiones, lo que la convierte en una región hipocelular. Dorsalmente, la EM está tapizada por tanicitos, donde se localizan los somas, y ventralmente, por una capa de vasos fenestrados, los capilares porta, con los que contactan los pies de los tanicitos y los terminales axónicos de las neuronas parvocelulares de los núcleos ARC, NPV y VMH (Figura 12A). Los capilares porta forman parte también de otra estructura, la *pars tuberalis*, formada por estos vasos fenestrados de la EM, una fina capa de tejido conectivo que se continúa con la meninge más externa o piamadre y un epitelio glandular que forma cisternas (Figura 12B). A través de la *pars tuberalis*, las neurohormonas llegan a la adenohipófisis y generan una respuesta en forma nuevas señales hormonales con distintos órganos diana.

El HMB está implicado en el balance energético. El ARC se compone de dos tipos neuronales distintos, las neuronas-POMC y las neuronas-AgRP/NPY, denominadas así en función del neuropéptido/s que producen. Las neuronas POMC producen el neuropéptido anorexigénico pro-opiomelanocortina (POMC) y su melanocortina derivada, la hormona α -melanocito estimulante (α -MSH, del inglés *Melanocyte Stimulating Hormone*). Ésta actúa en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVH), que desencadena la vía catabólica a través de la adenohipófisis, generando un efecto anorexigénico en el organismo que aumenta el gasto energético, aumenta la lipólisis y reduce la ingesta (Valassi et al. 2008; Sousa-Ferreira et al. 2011). Por el contrario, las neuronas NPY/AgRP producen los neuropéptidos orexigénicos neuropéptido Y (NPY) y la proteína similar a agouti (AgRP). Éstos se envían al núcleo PVH donde se activa la vía anabólica efectora, con el objetivo de reducir el gasto energético, aumentar la lipogénesis y la ingesta. Además, los péptidos orexígenos ejercen una retroalimentación negativa sobre el ARC, inhibiendo la producción de

POMC, es decir, inhibiendo la vía catabólica (Sousa-Ferreira et al. 2014; Blouet & Schwartz 2010). El organismo cuenta con estímulos anorexigénicos que actúan sobre el hipotálamo como la insulina, leptina y estrógenos, y otros orexigénicos como como la ghrelina y el factor de hormona del crecimiento (Valassi et al. 2008; Sousa-Ferreira et al. 2011). Debido a su estrecha relación a través de la EM con el sistema porta, actualmente numerosos estudios relacionan a los tanicitos con diferentes vías de regulación endocrinas, incluido el balance energético, como la reproducción, los ciclos circadianos o el sueño (Nakane & Yoshimura 2014; Lechan & Fekete 2007; Hanon et al. 2008; Bernal 2007).

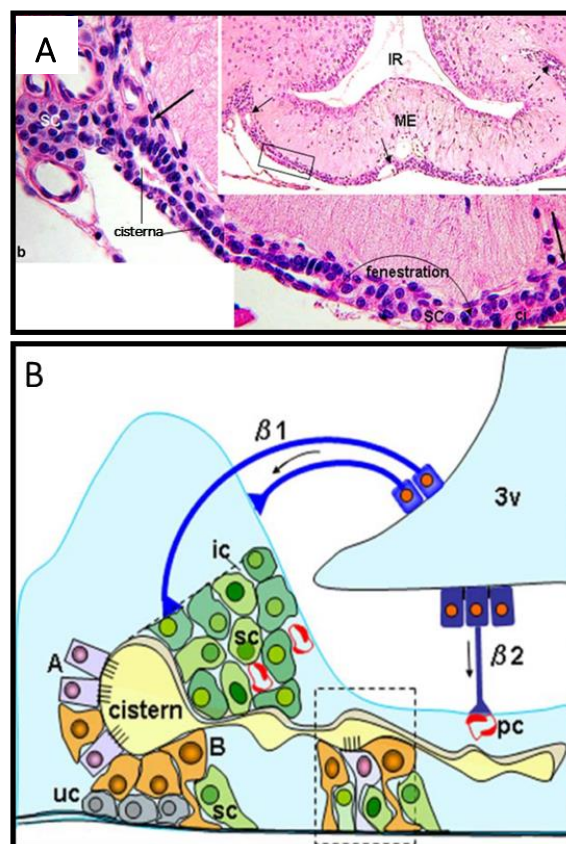


Figura 12. Eminencia media y *pars tuberalis*. A) Sección coronal del receso infundibular de rata y en detalle la *pars tuberalis*. El recuadro de arriba a la derecha muestra la imagen panorámica donde se puede observar la EM formando el suelo del receso infundibular. El resto de la imagen, abajo y a la izquierda, muestra en detalle la organización de la *pars tuberalis*. La base de la EM está en contacto con los capilares fenestrados, o capilares porta. Un tejido conectivo rodea las cisternas del tejido glandular formado por células secretoras, y un epitelio de células ciliadas y no ciliadas, que separa los vasos fenestrados de las cisternas. B) Diagrama de la organización de la *pars tuberalis* y su relación con los tanicitos. A, célula ciliada del epitelio glandular; B célula no ciliada del epitelio glandular; ci, células ciliadas; ic, canales intercelulares; IR, receso infundibular; ME, eminencia media; pc, capilar porta; sc, células secretoras; ta, terminal axónico; uc, célula indiferenciada; 3v, tercer ventrículo; $\beta 1$ y $\beta 2$ corresponden a dos tipos de tanicitos que más adelante desarrollaremos. Modificado de Guerra *et al.* 2010.

1.3.3 Los tanicitos

1.3.3.1 *Definición de tanicito*

Los tanicitos son células endoteliales polarizadas que contactan apicalmente con la cavidad ventricular y emiten un proceso basal largo que contacta con la superficie del cerebro o con los vasos sanguíneos (Horstmann 1954). En el 3V están localizados en el HMB tapizando las paredes ventral y ventrolateral (Akmayev et al. 1973). Los tanicitos que tapizan la pared ventrolateral emiten procesos que penetran en los núcleos adyacentes, el DMH, VMH y el ARC. Los tanicitos ventrales, contactan con los vasos sanguíneos fenestrados o capilares porta de la base de la EM y algunos de ellos también alcanzan la superficie del cerebro en su porción basal (Guerra et al. 2010) (Figura 13). Por su morfología, clásicamente se les ha considerado glía radial remanente. Comparten características morfológicas con la glía radial como el largo proceso basal y la polaridad, y características moleculares, como la expresión de GFAP, vimentina, nestina o GLAST. Sin embargo, no son completamente superponibles, ya que existen moléculas que se expresan en los tanicitos pero no en la glía radial o en los astrocitos. Por lo tanto, se ha llegado a la conclusión de que se trata de un linaje celular diferente. Incluso los tanicitos, no constituyen una población homogénea sino que se han descrito diferentes subtipos atendiendo a razones morfológicas y/o funcionales (Akmayev et al. 1973; Rodríguez et al. 2005).

1.3.3.2 *Tipos de tanicitos descritos clásicamente.*

Desde la década de los años 70 han sido descritos 4 tipos de tanicitos en rata, $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, $\beta 2$ basándose en la ubicación espacial que ocupan y hacia dónde lanzan su proceso basal. Los tanicitos $\alpha 1$ tapizan la pared del 3V a nivel del núcleo VMH y parte del DMH, intercalando su proceso basal entre las neuronas de estos núcleos. Los tanicitos $\alpha 2$ se sitúan a nivel del núcleo ARC y lanzan la mayoría de sus procesos basales dentro de este núcleo, algunos contactando con vasos sanguíneos (Akmayev et al. 1973; Bleier 1971; Akmayev & Popov 1977; Rodríguez et al. 1979). Hay controversia sobre si estos tanicitos contactan directamente con las neuronas de los núcleos mencionados, existiendo trabajos basados en la técnica de impregnación argéntica de Golgi tanto a favor como en contra (Rodríguez et al. 1979; Millhouse 1971). Desafortunadamente no existen datos ultraestructurales a este respecto. Por el contrario, sí se ha visto el contacto de estos tanicitos con los vasos sanguíneos que recorren dichos núcleos hipotalámicos. Los tanicitos $\beta 1$ tapizan las invaginaciones laterales en el receso

infundibular (Amat et al. 1999) y proyectan sus procesos a la superficie del cerebro en el límite externo de la EM, donde se localizan los capilares del sistema porta (Rodríguez et al. 2010). Estas proyecciones también contactan con la lámina basal de los vasos sanguíneos del ARC (Rodríguez et al. 2010). Por último, los tanicitos $\beta 2$ tapizan la superficie ventral del 3V en el receso infundibular y sus procesos basales terminan en los vasos fenestrados de la base de la EM (Rodríguez et al. 1979).

Ultraestructuralmente, en la literatura no se encuentran diferencias entre los $\alpha 1$ y 2, por lo que se refieren a ellas como tanicitos α . Son células cúbicas de núcleo redondeado y de cromatina laxa. Su citoplasma contiene abundantes polirribosomas, vesículas de clatrina, mitocondrias y aparatos de Golgi compuestos de pocos y pequeños dictiosomas. Superficialmente muestran abundantes microvellosidades y protrusiones bulbosas citoplasmáticas. Se han observado cuerpos multivesiculados en el interior de las protrusiones y en el citoplasma. Estas células se han definido como carentes de cilio y de uniones estrechas. Por el contrario, presentan abundantes uniones GAP. Sus procesos basales se caracterizan por contener abundantes mitocondrias, microtúbulos, filamentos intermedios y retículo endoplasmático liso (REL), en la zona proximal al soma. No reciben contactos sinápticos como tales, ni sinaptoides en el soma ni en los procesos basales (Rodríguez et al. 2005; Akmayev & Popov 1977).

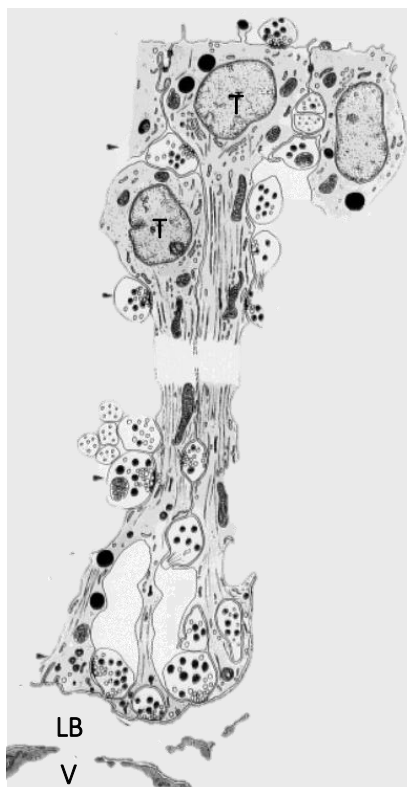


Figura 13. Diagrama de un tanicito. En la imagen se representan dos tanicitos, obviando la totalidad del proceso basal. Se puede observar el contacto con la luz ventricular apicalmente y basalmente con la lámina basal de un vaso sanguíneo. LB, lámina basal; T, tanicito; V, vaso sanguíneo. Modificado de Wittkowski, 1998.

Entre los tanicitos $\beta 1$ y $\beta 2$, por el contrario, los trabajos previos sí muestran diferencias morfológicas. Los $\beta 1$ son células cilíndricas de núcleo elongado que se disponen formando un epitelio pseudoestratificado en las invaginaciones laterales del receso infundibular. Contienen dictiosomas bien desarrollados, numerosas mitocondrias, son frecuentes las gotas lipídicas y cisternas de REL, junto al resto de elementos subcelulares de la vía endocítica, como, vesículas cubiertas y lisas y endosomas. La superficie en contacto con la luz ventricular muestra abundantes microvellosidades y protrusiones pequeñas, con endosomas en su interior o grandes protrusiones conteniendo abundantes polirribosomas. Una de las características que se ha definido en estas células es la presencia de amplias interdigitaciones. La parte proximal del proceso basal está ocupado por abundantes dictiosomas del aparato de Golgi, cisternas de REL, microtúbulos y filamentos intermedios (Rodríguez et al. 2005). La parte distal del proceso tiene un diámetro uniforme y es rico en polirribosomas, microtúbulos y filamentos intermedios pero desaparecen los dictiosomas. Las uniones estrechas han sido definidas únicamente a lo largo del proceso basal, estando ausentes apicalmente (Krisch & Leonhardt 1978; Mullier et al. 2010). También contienen uniones adherentes, pero en este caso, repartidas por toda la membrana celular, incluido el proceso basal y los pies terminales. Sus expansiones rodean terminales axónicos completamente, separándolos de la membrana externa limitante del cerebro y del espacio perivascular de los capilares porta. La trayectoria y disposición de los procesos basales coincide con las de los axones de las neuronas GnRH (Hormona liberadora de hormona de gonadotropina), pero sólo se han descrito contactos sinaptoides en la región preterminal del proceso basal (Akmayev & Popov 1977; Rodríguez et al. 1979; Wittkowski 1998).

Los tanicitos $\beta 2$ son células alargadas que tapizan el suelo del receso infundibular. A diferencia de los $\beta 1$, no presentan protrusiones en superficie, sólo microvellosidades, aunque en las primeras son más abundantes. Además sí muestran uniones estrechas apicalmente, junto con uniones adherentes, mientras que en las $\beta 1$ no se han encontrado uniones estrechas apicalmente. En el citoplasma apical presentan vesículas de clatrina de alrededor de 100 nm de diámetro, así como vesículas de superficie lisa de alrededor de 130 nm de diámetro distribuidas a lo largo de la membrana plasmática y en su citoplasma. Son también frecuentes aquí los cuerpos multivesiculares, las formaciones tubulares paralelas a la superficie celular y abundantes cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER). Aquí, el aparato de Golgi se localiza únicamente en la parte proximal del proceso basal y está bien desarrollado. En general, los procesos basales son similares a los de las $\beta 1$, aunque los de las $\beta 2$ contienen glucógeno y gotas lipídicas. Reciben contactos sinaptoides en toda la longitud del

proceso basal y no sólo en la región preterminal como en los tanicitos $\beta 1$. Los terminales de los tanicitos forman grupos unidos entre sí por uniones adherentes y contactan con los vasos sanguíneos fenestrados, o capilares porta, de la EM. Entre estos grupos de terminales, se intercalan los terminales nerviosos peptidérgicos y aminérgicos que contactan también con los capilares porta (Akmayev & Popov 1977; Peruzzo et al. 2004; Rodríguez et al. 2010).

La morfología de las células y la estratégica disposición de las uniones intercelulares otorgan a los tanicitos β una característica funcional de la que carecen los tanicitos α , el establecimiento de una barrera de aislamiento físico entre la EM y el LCR del 3V, y entre la EM y la región del núcleo ARC gracias a las extensas uniones estrechas que abarcan desde las porciones basales hasta las apicales. Esto se ha comprobado mediante la infusión de peroxidasa de rábano (HRP) en el ventrículo, que difundía en el neuropilo alrededor del 3V excepto en la región de la EM (Brightman & Reese 1969; Peruzzo et al. 2000). Por el contrario, al administrar por vía intravenosa HRP, sólo era detectada en la EM, sin difundir al LCR ni al núcleo ARC (Mullier et al. 2010). La morfología y distribución de las uniones estrechas en los tanicitos β , sumado a que la EM carece de barrera hematoencefálica, explica los resultados obtenidos (Rodríguez et al. 2010).

Molecularmente los cuatro tipos de tanicitos también presentan diferencias, lo que podría implicar también diferencias funcionales. Los tanicitos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$ expresan el transportador de glucosa 1 (GLUT-1), mientras que los tanicitos $\beta 2$ no lo expresan (Peruzzo et al. 2004). Los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST también se expresan de forma diferencial, mientras los tanicitos α expresan GLT-1 los β expresan GLAST (Berger & Hediger 2001). Los $\beta 1$ pero no los $\beta 2$ expresan el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-IR) (Cardona-Gómez et al. 2000). Además, varias proteínas de las vías endocítica y transcitótica difieren de unos tipos a otros. Los tanicitos β expresan caveolina-1 en el polo apical y en sus terminales de contacto de los capilares porta, pero los α no, lo que sugiere que la endocitosis dependiente de caveolina sólo ocurre en los tanicitos β (Peruzzo et al. 2004). El estado fisiológico puede hacer variar la expresión de determinadas proteínas en los tanicitos, sugiriendo la participación de los tanicitos en funciones hipotalámicas diversas (García-Segura et al. 1994). Además, la edad también es un factor que influye en la expresión de determinadas proteínas por los tanicitos (Zoli et al. 1995).

1.3.3.3 Desarrollo de los tanicitos en el tercer ventrículo.

En el 3V, los tanicitos comienzan su desarrollo en rata en estadio embrionario 18/19 (E18-E19). Esta datación conlleva mucha controversia debido al parecido ultraestructural y molecular con la glía radial. Algunos autores consideran que la diferenciación a tanicito comienza postnatalmente y que las células que tapizan ventralmente el HMB prenatalmente son glía radial y no tanicitos (Altman & Bayer 1978b; Altman & Bayer 1986). Tanto los tanicitos como las células endimarias finalizarán su desarrollo y maduración postnatalmente (Schachenmayr 1967; Walsh et al. 1978; Altman & Bayer 1978a; Altman & Bayer 1978b).

Los tanicitos tienen su origen en la misma matriz de la que surgen las neuronas de los núcleos tuberomamilar hipofisiotrópico y núcleo ARC (Altman & Bayer 1978b), es decir, que la diferenciación de los tanicitos va ligada estrechamente a la diferenciación de los núcleos hipotalámicos. Se han descrito más de 1000 genes implicados en la especificación de los diferentes núcleos hipotalámicos. Algunos de estos genes son expresados por los tanicitos en el adulto. Trabajos recientes han demostrado que dos de estos genes, *Rax* y *Lhx2*, son también esenciales para la diferenciación de los tanicitos. En primer lugar, *Rax* determina que los tanicitos se localicen ventralmente en el 3V del hipotálamo tuberal o mediobasal, dado que la expresión de *Rax* bloquea la expresión de *Rarres2*, un gen expresado específicamente por el linaje de epéndimo multiciliado, por lo que la expresión de ambos es complementaria. El ratón haploinsuficiente *Rax* +/- muestra la transformación parcial de los tanicitos hacia células multiciliadas (Miranda-Angulo et al. 2014), mientras que los ratones que carecen de forma selectiva de *Rax* en los progenitores tempranos hipotalámicos pierden la expresión de todos los genes específicos de tanicito (Salvatierra et al. 2014). Por otro lado, se ha identificado a *Lhx2* como un regulador clave de la diferenciación intrínseca de los tanicitos tanto en etapas embrionarias como postnatales, manteniendo la activación dependiente de *Rax* de genes de determinación a tanicito a la vez que la inhibe la expresión de genes específicos de células endimarias como *Rarres2* o *FoxJ1*. Si eliminamos *Lhx2* específicamente del hipotálamo tuberal en etapas embrionarias tardías, la expresión de *Rax* desaparece y los tanicitos β adquieren un fenotipo intermedio, ya que presentan morfología radial típica de los tanicitos, pero además, activan de forma ectópica la expresión de *FoxJ1*, convirtiéndose en multiciliadas (Figura 14).

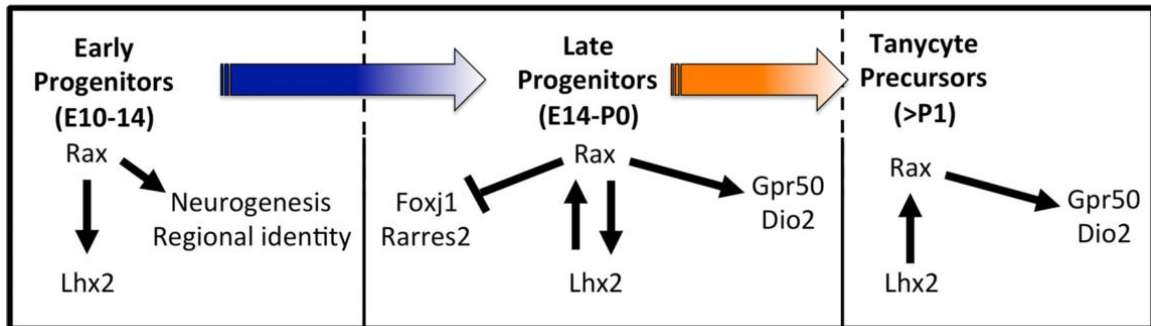


Figura 14. Modelo para la acción de Rax y Lhx2 en el control del desarrollo de los tanicitos. Rax se requiere para la expresión inicial de Lhx2 en los progenitores del hipotálamo ventrobasal. Posteriormente, Lhx2 es necesario para mantener la expresión directa Rax en los progenitores, y finalmente actúa para promover la diferenciación hacia tanicito mientras reprime la diferenciación hacia células ependimarias multiciliadas. Los defectos en el desarrollo de los tanicitos resultantes tras la pérdida de Lhx2, se deben parcialmente a la expresión defectuosa de Rax

En conclusión, el gen Lhx2 es necesario para activar la expresión de Rax en los progenitores neurales desencadenando su especificación hacia tanicitos. Por otro lado, Rax inhibe la expresión de FoxJ1 y Rarres2, genes de determinación hacia células multiciliadas. Tras el nacimiento, Lhx2 continúa siendo necesario para el mantenimiento de la especificación hacia tanicito activando la expresión de Rax en los precursores de tanicitos.

Como hemos avanzado, el desarrollo de los tanicitos va estrechamente ligado al de los núcleos hipotalámicos. Todavía no se conoce bien el desarrollo del hipotálamo y descifrarlo ayudará a entender la citoarquitectura de sus núcleos y las conexiones entre ellos, lo que facilitará el entendimiento de su funcionamiento. Así por ejemplo, siguiendo con uno de los genes protagonistas del apartado anterior, se ha comprobado que el gen Rax juega un papel clave en el establecimiento de los núcleos VMH y ARC (Lu et al. 2013). Mediante estudios de linaje celular, se demostró que las neuronas de estos núcleos derivaban del neuroepitelio que expresa Rax (Lu et al. 2013). Es interesante resaltar que los tanicitos en el adulto mantienen la expresión de Rax (Miranda-Angulo et al. 2014).

Volviendo a los tanicitos, el desarrollo postnatal fue más profundamente estudiado por Walsh et al. en ratas de día postnatal de P0 a P10, demostraron que los tanicitos localizados a nivel del núcleo ARC y en la EM no presentaban diferencias con los de ejemplares adultos. Por el contrario, los tanicitos localizados en la pared adyacente al núcleo VMH presentaban en P0 una morfología similar a la de los tanicitos ventrales pero, con la edad, iban adquiriendo características que los diferencian de éstos, como el aumento de las interdigitaciones o la disminución de microtúbulos en el proceso basal y su sustitución por filamentos intermedios. Además, la superficie celular

expuesta al lumen del ventrículo exhibe mayor número de protrusiones celulares. Por otro lado, también vieron que incrementaban el número de uniones GAP, escasas a P0, donde mayoritariamente presentaban uniones adherentes (Walsh et al. 1978). Hay autores que defienden que la maduración completa de los tanicitos en rata se da a día postnatal P21 (Bruni et al. 1983) mientras que otros autores defienden que se da a día P34 (Schachenmayr 1967).

Aunque las células endimarias multiciliadas comienzan a aparecer entre E14 y E16, aún persisten focos de endimogénesis en el periodo postnatal de aspecto pseudestratificado. Progresivamente estas nuevas células se van organizando en monocapa y van desarrollando los cilios característicos de las células endimarias maduras. Esta incorporación de células endimarias provoca el crecimiento de la cavidad y el aumento de la región ocupada por éstas con lo que se da una expansión ventral de la porción multiciliada (Walsh et al. 1978).

Inmunohistoquímicamente, el epitelio que reviste la cavidad ventricular del 3V en P2-P3 expresa de forma generalizada Sox2. Sox2 es un factor de transcripción implicado en el mantenimiento de la autorrenovación de las células madre, y se expresa en las células madre neurales multipotenciales derivadas de células madre embrionarias, en el embrión o el adulto (Ellis et al. 2004). Esto implica, en cierta manera, que los tanicitos a días P2-P3 no han terminado su maduración (Dahiya et al. 2011). Por otro lado, a P2-P3 el epitelio no expresa GFAP ni nestina, dos marcadores de células madre neurales, que posteriormente se expresarán en algunos subtipos de tanicitos en el adulto (Dahiya et al. 2011).

Sobre el envejecimiento del epéndimo del 3V hay poca información. En la senescencia, aumenta considerablemente el número de gotas lipídicas en el epéndimo, tanto en células multiciliadas como en los tanicitos (Brawer & Walsh 1982). Además, también se encuentran diferencias a nivel molecular, y mientras unas proteínas aumentan su expresión, otras la disminuyen. Por ejemplo, dos de las proteínas expresadas en los tanicitos como son la GFAP y la DARPP-32 (Dopamine-cAMP-regulated phosphoprotein of 32kDa) tienen una evolución opuesta en el envejecimiento, mientras la DARPP-32 disminuye su expresión en ratas de 24 meses, la GFAP aumenta un 300% (Zoli et al. 1995).

1.3.3.4 Importancia de los tanicitos en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario

Los tanicitos se han relacionado por su localización, su morfología y sus marcadores moleculares con la regulación del eje hipotálamo-hipofisario. Se ha estudiado más intensamente su papel regulador en el balance energético, por lo que nos centraremos en él. Son células capaces de recibir información del estado del organismo mediante receptores localizados en su membrana apical, como es el caso de receptores de la glucosa. Además, pueden transmitir segundos mensajeros como Ca^{2+} al igual que la glía radial. Por último, transmiten la señal a las neuronas del ARC, por ejemplo, mediante ATP activando la vía ERK. Se ha visto que los tanicitos de las paredes ventrolaterales, son capaces de transmitir la señal a otros tanicitos contiguos rápidamente gracias a las uniones comunicantes que contienen en sus membranas. De esta forma funcionan como un grupo coordinado de señalización (Frayling et al. 2011; Bolborea & Dale 2013). Los tanicitos también intervienen en la regulación del metabolismo energético y en el control de la reproducción por acción sobre la glándula tiroidea, ya que la hormona tiroidea juega un papel crítico en la respuesta de las gónadas al fotoperiodo. Los tanicitos contienen las enzimas DIO2 y DIO3. DIO2 transforma la hormona tiroidea T4 (prohormona) en T3 (triiodotironina) implicada en el control de la reproducción (por secreción de GnRH) y en el control del balance energético por reducción del gasto y aumento de las reservas en periodos de días cortos. DIO3, a la inversa, transforma T3 en T2 (forma inactiva). Estudios de genómica funcional han demostrado que la luz del día induce la producción de hormona estimulante de la tiroides (TSH), que actúa sobre los tanicitos aumentando la expresión de DIO2. De esta forma, cuanto más largos son los días, mayor la cantidad de DIO2 y por tanto mayor cantidad de T3. En definitiva, mediante la regulación de la expresión de DIO2 y DIO3 los tanicitos regulan el efecto del fotoperiodo en la reproducción y el metabolismo energético (Hanon et al. 2008; Nakane & Yoshimura 2014).

Además, la simple morfología de los tanicitos es la que les ayuda a ser partícipes de la función hipotalámica. A los capilares portales llegan los pies de los tanicitos de la EM y los terminales axónicos de neuronas hipotalámicas. Estos pies de tanicitos tienen una gran capacidad de remodelación y se ha observado que pueden permitir o bloquear el contacto de los axones con los capilares a modo de regulación del vertido de las neurohormonas hipotalámicas (Wittkowski 1998). Por otro lado, además de regular la salida de sustancias también regulan la entrada. Mediante el uso de leptina fluorescente, se ha demostrado que los tanicitos presentan receptores de leptina en el extremo del proceso basal, en contacto con los capilares portales, donde capta la leptina

y mediante el importante aparataje de transporte vesicular la transporta hacia el LCR por el interior de los tanicitos $\beta 1$. Después la señal es transmitida a las neuronas del ARC mediante la detección de los tanicitos adyacentes al ARC o directamente difundiendo al parénquima, ya que no presentan uniones estrechas a este nivel (Balland et al. 2014).

Las uniones estrechas también están implicadas en el siguiente mecanismo propuesto. Los tanicitos ventrales presentan uniones estrechas apicalmente, lo que separa el medio intersticial de la EM del LCR (Mullier et al. 2010). Las moléculas señalizadores que llegan a los capilares porta difunden por el parénquima de la EM, encontrándose bloqueada su salida al LCR por las uniones estrechas de los tanicitos aquí localizados. En una situación de ayuno, la ghrelina producida por el estómago induce que estas uniones asciendan por la pared ventricular, llegando a presentarlas tanicitos de las paredes del ARC. Además aumenta el tamaño de los vasos capilares porta que ascienden por el parénquima hasta el ARC. Mediante estos dos fenómenos se conseguiría que el nivel de estas hormonas llegue hasta el ARC, bañando directamente estas neuronas con ghrelina y desencadenando la respuesta catabólica y de ingesta (Fanny Langlet et al. 2013).

1.3.3.5 ¿Existe la neurogénesis en el 3V?

Numerosos trabajos han atribuido a los tanicitos la capacidad de proliferar e incluso de generar nuevas neuronas en condiciones fisiológicas, pero siempre a tasas muy bajas. Sin embargo, diferentes estímulos como cambios en las condiciones fisiológicas, dietas ricas en grasa, el fotoperiodo (días cortos de invierno), el ejercicio (Lee et al. 2012; Niwa et al. 2015; Huang et al. 1998) y/o la administración de factores de crecimiento (Pérez-Martín et al. 2010; Xu et al. 2005; Kokoeva et al. 2005) son capaces de elevar esa tasa. Esta característica ha llevado a pensar a diversos investigadores que se trate de células madre quiescentes. Numerosos autores se han aprovechado de esta capacidad para activarse para estudiar la capacidad proliferativa de los tanicitos.

A pesar de todos los estudios existentes, todavía hay mucha controversia respecto a la relevancia de la función proliferativa de los tanicitos en condiciones fisiológicas. Se sabe que los tanicitos son células proliferativas, con capacidad de autorrenovación y multipotenciales, es decir, tienen propiedades de célula madre. En este sentido, Xu y colaboradores, separaron el epéndimo del 3V con Dil y vGFP (Green fluorescence protein) y obtuvieron neuroesferas (administrando factores de crecimiento *in vitro*) que se diferenciaron a neuronas y astrocitos (Xu et al. 2005). Sin embargo, la baja tasa proliferativa del tanicito pone en duda si su aportación como célula madre

constitutiva es significativa y hacia qué linajes dan lugar *in vivo*. Tampoco se ha alcanzado un consenso en cuanto a qué tipo de tanicito es el responsable de la proliferación (Lee et al. 2012; S C Robins et al. 2013). Quizá debido al uso de diferentes formas y factores para activar la proliferación, encontremos la activación de un tipo diferente de tanicito en cada caso. Por ejemplo, la estimulación mediante una dieta hipercalórica activa a los tanicitos β 2 y por el contrario, la administración de factores como el IGF-I y el FGF estimula la proliferación de los tanicitos α en la vecindad del VMH (Pérez-Martín et al. 2010; Xu et al. 2005). Por último, los protocolos de administración de BrdU para compensar la baja capacidad de división suelen ser muy prolongados, de varios días, con lo que nunca tenemos la certeza de que se estén detectando células progenitoras y/o su progenie.

Es por ello que actualmente se están utilizando animales transgénicos, en los que sus células expresan GFP (Green Fluorescence Protein) bajo un promotor determinado, con lo que cuando expresen la proteína de interés, se expresará la GFP quedando marcadas de color verde. Estos modelos permiten el establecimiento de linajes celulares siguiendo las células verdes a distintos tiempos desde el momento de expresión de la GFP. Mediante el uso de animales *GLAST::CreER^{T2}* se concluyó que el tanicito que actuaba como célula progenitora era el tipo α 2 dorsales, GLAST+, mientras que utilizando animales *FGF10::CreER^{T2}* eran los tanicitos β los que poseían capacidad neurogénica (S C Robins et al. 2013; Haan et al. 2013) (Tabla 2).

Tabla 2. Poblaciones proliferativas del hipotálamo. Modificado de Bolborea & Dale 2013.

Identidad celular	Estimulación de la proliferación	Método marcaje	Diferenciación	Proliferación /peso animal	Edad	Ref.
Tanicitos α	bFGF y EGF	BrdU	Neuroesferas, neuronas y astrocitos	ND	Adulto	(Xu et al. 2005)
	FC: estimula FL: inhibe EGF: estimula AR: inhibe	BrdU, Ki67	NE	Proliferación asociada a \downarrow peso animal.	Adulto	(Shearer et al. 2012)
Tanicitos α , astrocitos subepend.	IGF-1	BrdU	Neuronas	NE	P60	(Pérez-Martín et al. 2010)
Células en EM, Arc, VMH. Tanicitos $\alpha\beta$, astrocitos subepend.	Constitutiva	BrdU	NE	NE	Adulto	(Cifuentes et al. 2011)
Células en Arc y pocos tanicitos α .	Degeneración de neuronas NPY	BrdU, Ki67, PCNA	Neuronas AgRP y POMC	Proliferación asociada a mantenimiento o peso corp.	P84	(Pierce & Xu 2010)
Células en Arc, VMH. Pocos tanicitos α y β	CNTF constitutiva y	BrdU	Neuronas NPY y POMC; oligodendrocitos	Proliferación asociada a \downarrow peso animal.	Adulto	(Kokoeva et al. 2005)
	Constitutiva	BrdU, Ki67	Neuronas en VMH	NE	Adulto	(Kokoeva et al. 2007)
Tanicitos β 2, posibilidad en parénquima	Estimulado por HFD	BrdU, Linaje-Cre	Neuronas en EM y algo en Arc	Proliferación asociada a \uparrow peso animal.	P35–P75	(Lee et al. 2012)
Tanicitos α y β 1, células en parénquima del Arc	Inhibido por HFD crónica	BrdU, Linaje-Cre	Neuroesferas, neuronas, glia, oligodendrocitos	Pérdida de células madre lleva a obesidad	Adulto	(Li et al. 2012)
Tanicitos α 2	FGFb	BrdU, Linaje-Cre	Neuroesferas, neuronas, glia, oligodendrocitos	NE	Adulto	(S C Robins et al. 2013)
Tanicitos β 1 y β 2	Constitutiva.	BrdU, Linaje-Cre	Astrocitos y neuronas en Arc, VMH y DMH.	Nuevas neuronas responden a ayuno/leptina	Adulto	(Haan et al. 2013)

AgRP péptido relacionado con agoutí; AR, ácido retinoico; Arc, núcleo arcuato; FGFb, factor de crecimiento fibroblástico básico; EGF, factor de crecimiento de crecimiento epidérmico; FC, fotoperiodo corto; FL, fotoperiodo largo; HFD, dieta hipercalórica; IGF-1, factor de crecimiento similar a la insulina factor-1; ME, eminencia media; NE, no estudiado; PCNA, antígeno nuclear de proliferación celular; POMC, pro-opiomelanocortina; VMH, núcleo ventromedial hipotalámico.

En este trabajo establecemos una nueva clasificación de los tanicitos del 3V, detallando de forma exhaustiva su ultraestructura, el sistema ciliar y sus marcadores moleculares específicos. Por primera vez describimos la existencia de tanicitos que no expresan marcadores gliales, como la vimentina. Además intentaremos esclarecer el linaje celular en el 3V en condiciones fisiológicas, mediante estudios de proliferación y trazado genético, para dar luz a la controversia establecida hasta el momento.

Hipótesis y objetivos

2 Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

En este trabajo partimos de la hipótesis de que existen diferentes tipos de tanicitos tapizando las paredes del 3V en base a su ultraestructura y que éstos tienen características diferentes en cuanto a su capacidad proliferativa y de diferenciación.

2.2 Objetivos

El objetivo general del proyecto es, por tanto, caracterizar la pared del 3V de ratón adulto y durante el desarrollo, determinando los criterios diferenciales de los distintos subtipos de tanicitos y establecer aquél que posee capacidad proliferativa y de diferenciación gliogénica y/o neurogénica. Por último, pretendemos establecer la relación entre los mismos estableciendo un posible linaje celular.

Los objetivos, podríamos enumerarlos como:

OB1. Caracterización morfológica y molecular del 3V en ratones adultos. Clasificación y descripción detallada de los tipos de tanicitos que forman la pared del 3V.

OB2. Caracterización morfológica de las paredes del 3V en el desarrollo y el envejecimiento.

OB3. Estudio de las propiedades proliferativas *in vitro* e *in vivo* de los diferentes tipos celulares de la pared del 3V y su capacidad de diferenciación en el tiempo.

OB4. Estudio temporal de la remodelación de las paredes del 3V y la relación de linaje que existe entre los diferentes tipos de tanicitos en el ratón adulto.

Material y métodos

3 Material y métodos

3.1 Animales

En el presente trabajo se han utilizado un total de 123 ratones, 91 CD1 macho, 12 ratones *VimCreERT;mtdTom-mGFPflox/+* macho proporcionados por el Dr. Stefan Engelhardt (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Technische Universität München (TUM), München, Germany) y 12 *Rax::CreER^{T2}-mGFP* (*Rax::CreER^{T2}*) macho proporcionados por el Dr. Seth Blackshaw (Department of Neuroscience, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA).

El mantenimiento y la utilización de todos los animales se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la Unión Europea (86/609/EEC) y de España (RD1201/2005), siguiendo protocolos aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Valencia y la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural.

Estos animales fueron distribuidos de acuerdo a los objetivos previstos (Tabla 3):

OB.1. La caracterización morfológica de la pared del 3V de ratón se llevó a cabo en 8 ratones CD1 macho P60 mediante el análisis ultraestructural de secciones coronales empleando el microscopio electrónico de transmisión (TEM). Otros 3 ratones también fueron estudiados al TEM pero tras un seccionado especial llamado “en face”, en el que se comienza a cortar con la superficie del ventrículo paralela a la cuchilla, con el objetivo de estudiar los tanicitos desde su superficie. 3 ejemplares, también CD1 machos P60, fueron empleados para el estudio de la superficie ventricular con el microscopio electrónico de barrido (SEM).

La caracterización molecular se llevó a cabo en 37 ratones macho CD1 P60 y 3 *VimCreERT;mtdTom-mGFPflox/+* (desde ahora, *Vim::CreER^{T2}*). 25 ratones macho CD1 P60 se estudiaron mediante inmunofluorescencia con diversos marcadores (ver tabla de marcadores). De éstos, en 19 se realizaron secciones coronales y los 6 restantes se procesaron para la técnica “whole mount”, en la que se disecciona el 3V, dejando la pared ventricular expuesta, sobre la que se realiza la inmunofluorescencia. Para microscopia electrónica de inmuno-oro se utilizaron 10 ratones (ver tabla marcadores) en secciones coronales y 2 en “whole mount”, que fueron cortados en “en face” para su estudio al TEM. Por último, se emplearon 3 ratones *Vim::CreER^{T2}* con tiempos cortos de inducción de la expresión de GFP para el estudio molecular, como otro abordaje para la detección de la proteína vimentina.

OB2. Para el estudio de desarrollo se realizó una caracterización morfológica mediante el análisis al TEM de 3 ratones para cada una de las siguientes edades, P7, P15 y P60.

OB3. Para el estudio de las propiedades proliferativas *in vivo* e *in vitro* de los diferentes tipos celulares de la pared del 3V y su capacidad de diferenciación en el tiempo se emplearon un total de 38 ratones macho CD1 P60.

Para el estudio de la proliferación *in vivo* se utilizaron protocolos con tiempos cortos de supervivencia tras la administración de marcadores exógenos y el análisis de marcadores endógenos. 9 fueron empleados para detectar la 5-bromo-2-deoxyuridina (BrdU) (marcador exógeno), 4 para la técnica de autorradiografía mediante la timidina tritiada (^3H -timidina) (marcador exógeno) y 5 para la detección de la proteína Ki67 (marcador endógeno). De ellos 3 fueron destinados a inmunofluorescencia y 2 a inmuno "postembedding" en cortes semifinos.

Para el estudio de la capacidad proliferativa *in vitro* se llevaron a cabo cultivos de neuroesferas a partir de 10 ratones P60 CD1 macho, un ensayo clonal a partir de 4 ratones también P60 CD1 macho y cultivos organotípicos a partir de 3 ratones de las mismas características para la activación *in vitro* de la proliferación de la pared del 3V.

Para el estudio de diferenciación *in vivo* se llevaron a cabo protocolos de trazado celular mediante la administración de análogos de la timidina (BrdU y ^3H -timidina) con periodos de supervivencia de 10 días. Se administró BrdU a 3 ratones P60 y ^3H -timidina a 2 ratones para su revelado mediante autorradiografía.

OB4. Utilizamos la técnica del linaje genético con animales CreRT, mediante protocolos de pulso y caza para determinar la relación entre los diferentes tipos de tanicitos como estirpe. Seguimos el linaje de los tanicitos vimentina mediante el ratón *Vim::CreER^{T2}* y de los tanicitos Rax mediante el ratón *Rax::CreER^{T2}*. Se les administró tamoxifeno (4-OHT) para inducir la expresión de GFP bajo los diferentes promotores, y se sacrificaron a distintos tiempos; tiempos corto (no más de 5 días) y largo (un mes). Para cada linaje se utilizaron 12 ratones (3 para tiempo corto, 3 para tiempo largo y 3 controles en cada caso).

Tabla 3. Animales utilizados en el presente trabajo.

Técnica	Animales	Estudio
TEM P60	8	OB1 Caracterización morfológica en el adulto
TEM P60, “ <i>en face</i> ”	3	
TEM P7	3	OB2 Caracterización morfológica en el desarrollo
TEM P15	3	
TEM P660	3	OB2 Caracterización morfológica en el envejecimiento
SEM	3	OB1 Caracterización morfológica en el adulto
Inmunofluorescencia en secciones	19	OB1 Caracterización molecular en el adulto
Inmunofluorescencia en “Whole Mount”	6	
Inmuno-oro en secciones	9	
Inmuno-oro en “whole mount”	2	
Ki67 Inmunofluorescencia	3	OB3 Proliferación <i>in vivo</i> . Marcador endógeno
Ki67 Inmuno. en semifinos	2	
BrdU 1d s0	3	OB3 Proliferación <i>in vivo</i> . Marcadores exógenos
BrdU 5d s0	3	
BrdU 10d s0	3	
³ H-timidina 1d s0	3	
³ H-timidina 10d s0	2	
BrdU 10d s10	3	
³ H-timidina 10ds10	2	OB3 Potencial de diferenciación <i>in vivo</i> .
Cultivos de neuroesferas	10	OB3 Proliferación <i>in vitro</i>
Ensayo clonal	4	OB3 Proliferación <i>in vitro</i>
Cultivo organotípico	3	OB3 Proliferación <i>in vitro</i>
<i>Vim::CreER^{T2}</i>	12	OB4 Linajes
<i>Rax::CreER^{T2}</i>	12	OB4 Linajes

3.2 Fijaciones

A excepción de los animales empleados para la realización de técnicas *in vitro*, los animales fueron fijados principalmente por perfusión empleando distintas soluciones fijadoras, según el estudio a realizar, que se especifican en la tabla siguiente. Los animales empleados para el “whole mounts” fueron perfundidos con solución salina 0.9% y posteriormente fijadas por inmersión durante 12 horas a 4°C, para preservar la integridad de la superficie celular (Tabla 4). La técnica de la perfusión se explica más adelante en el apartado de procesado histológico de las muestras.

Tabla 4. Fijaciones empleadas en cada tipo de técnica.

Tipo de estudio	Edad	Fijación	Fijador
Morfología (TEM)	P60, P7, P15, P660	Perfusión	PFA 2% GA 2,5%
Morfología (SEM)	P60	Inmersión	PFA 2% GA 2,5%
Inmunohistoquímica "postembedding" (semifinos)	P60	Perfusión	PFA 4% GA0,5%
Inmuno-oro "preembedding"	P60	Perfusión	PFA 4% GA0,5%
Inmunofluorescencia sobre "whole mount"	P60	Inmersión.	PFA 4%
Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	P60	Perfusión	PFA 4%
Inmuno-oro "preembedding" sobre "whole mount"	P60	Inmersión.	PFA 4% GA0,5%

3.3 Diseño experimental

3.3.1 Inyección de BrdU y ³H-timidina

Para el estudio de la proliferación *in vivo* se inyectó intraperitonealmente (i.p) BrdU a una concentración de 50mg/Kg (Sigma Aldrich) por dosis, para inmunohistoquímica, y ³H-timidina a una concentración de 1.67ul/g de una solución con una actividad específica 1mCi/ml (Perkin Elmer) por dosis, para autorradiografía. El número de dosis administradas se especifican en los protocolos de administración siguientes.

Se llevaron a cabo tres diseños experimentales distintos para estudiar la proliferación *in vivo* en inmunohistoquímica. Se realizó un estudio de la proliferación a corto plazo en el que 3 ratones recibieron 4 inyecciones a intervalos de 2 horas y se sacrificaron 2 horas tras la última inyección (Grupo BrdU 1d s0). En el segundo protocolo para el estudio de proliferación *in vivo* aumentamos el número de dosis consistiendo en, una dosis de BrdU i.p cada 12 horas durante 10 días a 3 ratones y sacrificio 12 horas después de la última inyección, para aumentar el número de células marcadas (Grupo BrdU 10d s0). Dado que observamos una localización específica a los 10 días de inyecciones, quisimos ver qué sucedía a mitad de tiempo, con lo que

inyectamos cada 12 horas durante 5 días a 3 ratones más, y sacrificamos 12 horas después de la última inyección (Grupo BrdU 5d s0).

Para detectar células de nueva generación mediante inmunohistoquímica, realizamos el protocolo de una inyección cada 12 horas durante 10 días, y sacrificio a los 10 días (Grupo BrdU 10d s10).

Los protocolos de administración de 4 inyecciones a intervalos de 2 horas y sacrificio 2 horas tras la última inyección (Grupo ^3H -timidina 1d s0), de inyecciones durante 10 días (dos inyecciones por día, una cada 12 horas) y sacrificio a las 12 horas tras la última inyección (Grupo ^3H -timidina 10d s0), o tras 10 días de supervivencia después del mismo protocolo de administración anterior (Grupo ^3H -timidina 10d s10), se repitieron administrando ahora ^3H -timidina en 2 ratones por grupo para su estudio al TEM por autorradiografía (Figura 15).

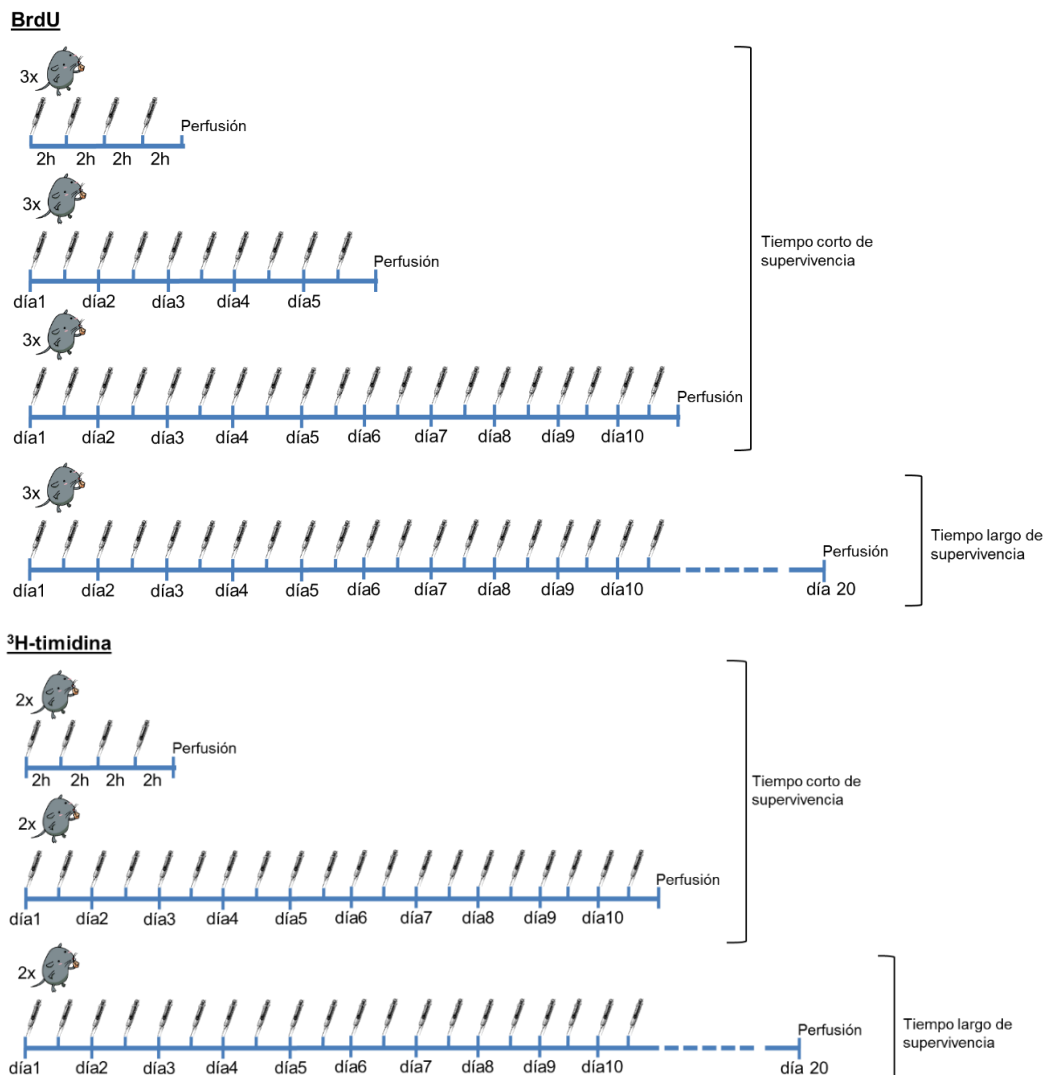


Figura 15 Protocolo de administración de BrdU y ^3H -timidina.

3.3.2 Activación de la expresión de GFP bajo el promotor de la vimentina o Rax.

Para el protocolo de “tiempo corto”, los ratones *Vim::CreER^{T2}* recibieron una inyección cada 24h de tamoxifeno (4-OHT) durante 5 días para activar la expresión de GFP en las células que expresaban vimentina y se sacrificaron a los 5 días tras la última inyección. Para el protocolo de “tiempo largo”, los animales recibieron también una inyección cada 24 horas de 4-OHT durante 5 días y se sacrificaron a los 30 días tras la última inyección.

En el caso del linaje Rax, a los ratones *Rax::CreER^{T2}* se les administró 4-OHT cada 24 horas durante 5 días y se sacrificaron tras 3 días después de la última inyección para el estudio de “tiempo corto”. Otro grupo de ratones *Rax::CreER^{T2}* recibieron la misma administración de 4-OHT con supervivencia de 30 días para el estudio de “tiempo largo”.

En todos los casos, el 4-OHT se administró diluido en “corn oil” vía i.p. a una concentración de 75mg/kg.

3.4 Procesado histológico de las muestras

3.4.1 Microscopía electrónica de transmisión

Los ratones fueron anestesiados profundamente hasta el nivel de inconsciencia mediante la inyección de una dosis subletal del pentobarbital sódico (Eutanax) antes de la perfusión. Los ratones fueron fijados por perfusión intracardiaca con una solución de paraformaldehído (PFA) 2% y glutaraldehído (GA) 2,5% en tampón fosfato (PB) 0,1M. Previo a la perfusión con la solución fijadora, los ratones se exanguinaron mediante perfusión con solución salina. Los cerebros se extrajeron y postfijaron 12 horas en la misma solución a 4°C. Posteriormente fueron lavados con PB 0,1M.

Los cerebros se cortaron en secciones transversales de 200 µm en el vibrátomo (VT 1000M Leica) y se postfijaron en osmio al 2% en PB 0,1M durante 1,5 horas, lavados con agua destilada, deshidratados en soluciones de concentración creciente de etanol y contrastados con acetato de uranilo al 2% en etanol al 70% durante 2 horas. Tras concluir la deshidratación con etanol absoluto, las piezas se sumergieron en óxido de propileno 20 minutos, las secciones fueron incluidas en resina epoxi (Sigma Aldrich). Tras la polimerización a 70°C durante 72 horas, las piezas fueron cortadas con el ultramicrotomo (EM UC6 Leica) utilizando una cuchilla de diamante secciones semifinas

(1,5 μm). Éstas se tiñeron con azul de toluidina al 1% a 70°C. Posteriormente se realizaron secciones ultrafinas que se recogieron en rejillas de ojal y se contrastaron con citrato de plomo (Solución de Reynolds). Las secciones semifinas fueron estudiadas al microscopio óptico ECLIPSE E800 (NIKON) y los ultrafinos al TEM (Spirit FEI Tecnai). Las imágenes se tomaron con la cámara digital modelo “Morada” (Soft Imaging System, Olympus).

3.4.1.1 Reconstrucciones tridimensionales

Para tener una visión completa de cada tipo celular presente en las regiones de estudio (ventral y ventrolateral del hipotálamo mediobasal), realizamos un estudio tridimensional en 3 animales diferentes. Para ello se realizaron cortes ultrafinos de 60-70 nm de grosor que se colocaron de forma consecutiva en rejillas de ojal (Figura 16), llegando a obtener una media 200 ultrafinos por región de estudio y animal. Se escogieron células aleatoriamente de los ultrafinos centrales de la serie completa para cada región de estudio, las cuales fueron fotografiadas en todos los ultrafinos consecutivos hasta su reconstrucción completa, o en el caso de reconstrucción de cilios, hasta que perdieron el contacto con la luz ventricular. De esta forma obtuvimos información de su morfología tridimensional, número de cilios, etc., como complemento a la caracterización ultraestructural que obtuvimos analizando un solo plano mediante el estudio al TEM convencional. Fueron reconstruidas un total de 31 células.

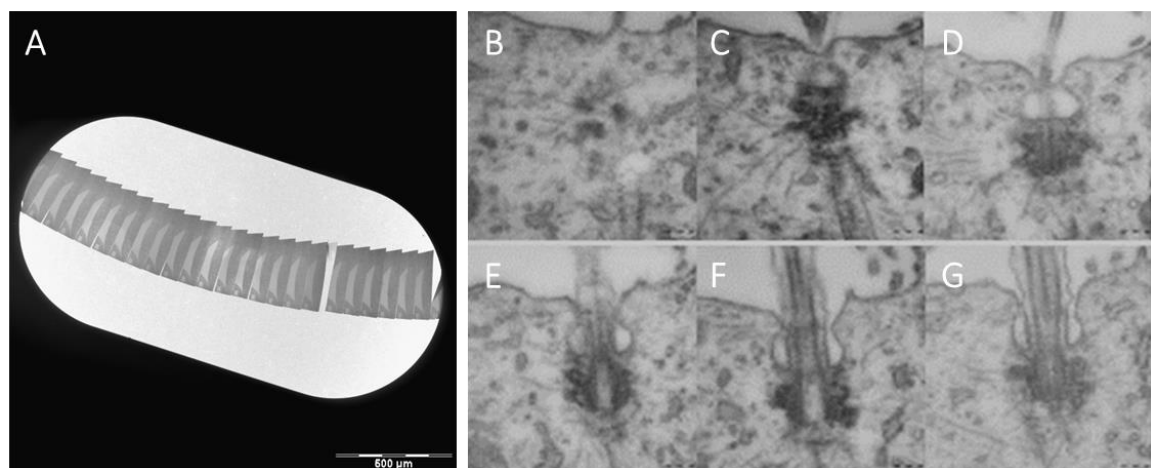


Figura 16. Reconstrucción tridimensional. A) En la imagen se muestra el ojal de una rejilla donde se pueden apreciar 25 secciones ultrafinas contiguas. B-G) Un aparato ciliar, fotografiado en ultrafinos consecutivos, de modo que, podemos apreciar su estructura completa en 3D.

3.4.1.2 Autorradiografía

Los ratones inyectados con ^3H -timidina fueron procesados del mismo modo que los destinados a microscopía electrónica de transmisión, tal y como se describe en el apartado 3.4.1. Se cortaron secciones semifinas (1,5 μm) que se cubrieron en oscuridad con emulsión autorradiográfica tipo NTB (Kodak), previamente atemperada a 40°C. Los portaobjetos cubiertos de emulsión, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 12 horas y se incubaron un mes a 4°C en cajas opacas con silicagel para evitar el exceso de humedad y favorecer el secado de la emulsión, manteniéndolos en todo momento en oscuridad. Posteriormente, la emulsión fue revelada siguiendo el proceso tradicional de revelador (revelador G-150, AGFA) – agua - solución fijadora (tiosulfato sódico al 30% en agua). Tras lavarlos bien con agua corriente, se dejaron secar a temperatura ambiente y los semifinos fueron teñidos con azul de toluidina. Los autorradiogramas obtenidos fueron analizados bajo el microscopio óptico Nikon (E800, Eclipse) para determinar la presencia de células marcadas con ^3H -timidina, considerando como tales aquellas que presentaban marcaje en el núcleo en más de tres cortes semifinos consecutivos y al menos 3 granos. Se tomaron fotografías panorámicas y de detalle (100x) de las células seleccionadas, se pegaron bloques polimerizados de resina epoxi con cianocrilato a cada semifino y se transfirieron los semifinos a los nuevos bloques por contraste brusco de temperatura. A partir de ellos se cortaron ultrafinos para estudiar cada célula al TEM que fue reconocida gracias a las imágenes de microscopía óptica que fueron tomadas previamente en los semifinos (Doetsch et al. 1999). (Figura 17).

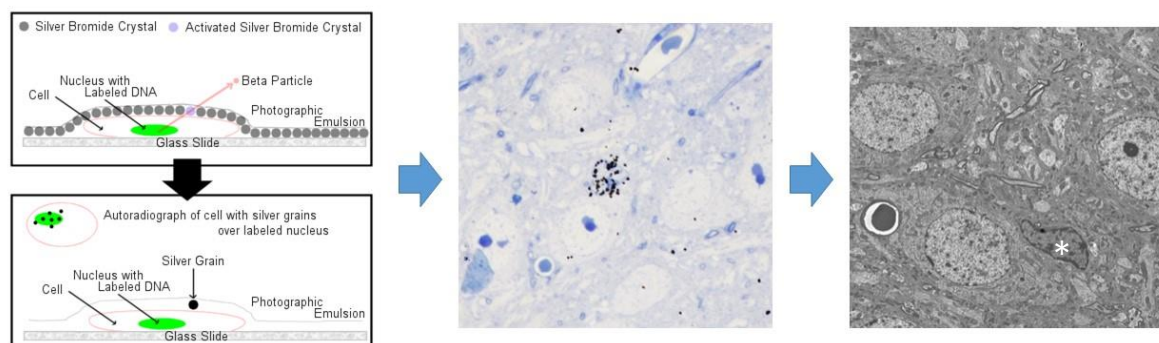


Figura 17. Técnica de autorradiografía. A) En el diagrama se explica el revelado de la marca radiactiva incorporada por una célula en fase S. Tras bañar con emulsión fotográfica el portaobjetos, precipitan gránulos de plata en dicha emulsión localizada sobre la célula que ha incorporado partículas radiactivas, debido a la emisión beta de esas partículas radiactivas. B) Semifino en el que se observan los gránulos de plata sobre la célula marcada. C) Ultrafino donde podemos reconocer la célula que veíamos marcada en el semifino (asterisco). Es necesario orientarse con el semifino, ya que en el ultrafino la emulsión la perdemos.

3.4.2 Microscopía electrónica de barrido

Para la técnica del SEM, los ratones fueron perfundidos con solución salina y se les extrajo el cerebro para diseccionar el 3V. La disección se realiza rápidamente para poder fijar cuanto antes el tejido y quede lo más aproximado a cuando el animal estaba vivo. Para la disección se realizó un corte coronal entre el cerebelo y el resto del encéfalo para dejar expuesto el acueducto, y otro corte coronal rostral, anterior a los ventrículos laterales con la finalidad de conseguir una superficie plana para poder apoyarlo en dicha superficie. Seguidamente fijamos el cerebro a una placa con base de silicona mediante alfileres entomológicos de manera que el acueducto quede en la parte superior. Desde la cavidad expuesta, con ayuda de un microbisturí, realizamos varios cortes en la parte dorsal de la cavidad. Con la ayuda de los alfileres entomológicos vamos abriendo la cavidad conforme cortamos hasta que llegamos a la cavidad del 3V. Éste lo abrimos también dorsalmente, así nos aseguramos no tocar la pared lateral y evitamos dañar la superficie, y finalmente realizamos un único corte ventral para separar las dos paredes laterales del ventrículo. El tejido diseccionado se fijó entonces por inmersión en PFA al 2% y glutaraldehído al 2,5% durante una hora. A continuación las muestras se postfijaron en osmio al 1% durante 45 minutos y tras varios lavados, se deshidrataron con soluciones crecientes de etanol, concluyendo con el punto crítico con CO₂. Tras el sombreado con oro paladio, se observaron en al SEM (S-4100, Hitachi) (Ohata et al. 2015).

3.4.3 Inmunohistoquímica

3.4.3.1 Inmunohistoquímica general

Los ratones se perfundieron con solución salina seguida de PFA al 4% tras ser profundamente anestesiados. Los cerebros fueron postfijados en la misma solución fijadora 12 horas a 4°C. Tras lavarlos con PB 0,1M, los cerebros fueron deshidratados mediante soluciones de concentración creciente de alcohol y tras un último lavado en xileno, fueron incluidos en parafina. Cada cerebro se cortó en secciones de 7µm, completando 6 series con cada uno.

Para las inmunofluorescencias, llevadas a cabo para la detección de CD24, FGF-10, GFAP, EAAT1, Acsa-1, Ki67, nestina, S100β y vimentina; las secciones fueron previamente desparafinadas e hidratadas. A continuación, se llevó a cabo el proceso de desenmascaramiento de antígeno incubando las secciones en una solución de Inmunosaver (EMS) 1:200, durante 20 minutos a 120°C y 103kPa en el “Retriever”

(EMS). Se bloqueó el tejido en una solución de NGS 5%, caseína 1% en PBS con Triton X-100 al 0,2% y BSA al 1% (PTA) durante 1 hora. Los anticuerpos primarios se incubaron en PB 0,1M con 1% de NGS 12 horas a 4°C. Tras lavar reiteradamente, se incubaron los anticuerpos secundarios, conjugados con marcadores fluorescentes, en PTA con 5% de NGS durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, las secciones fueron lavadas e incubadas 10 minutos en DAPI a una concentración 1:1000 y finalmente montadas con Fluorsave (Calbiochem).

Para la inmunocitoquímica contra BrdU, una vez desparafinadas e hidratadas las secciones, se incubaron en HCl 2N durante 20 minutos a 37°C, seguido de 15 minutos en tampón borato (pH 8.5) consiguiendo la desnaturalización del ADN para que el anticuerpo pudiera acceder a la BrdU. Posteriormente se bloqueó el tejido con una solución de PTA con NGS al 5% y caseína al 1% durante 1 hora. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con marcadores fluorescentes o biotinilados. En el caso de los fluorescentes, se incubó el anticuerpo 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente las secciones fueron incubadas 10 minutos en DAPI 1:1000 y montadas con Fluorsave. En el caso de utilizar anticuerpos secundarios biotinilados, las secciones se incubaron en H₂O₂ al 3% antes del tampón bloqueo. El anticuerpo secundario biotinilado también se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Tras ello se hizo una amplificación de la señal con el Complejo Avidina/Biotina (ABC, Vector) y se reveló con 3,3'-Diaminobenzidina 0,05% (DAB, Sigma Aldrich). A continuación, los cortes fueron deshidratados con concentraciones crecientes de etanol y xileno para finalmente ser montadas con Eukitt (Deltalab).

Las secciones se estudiaron bajo el microscopio óptico Nikon Eclipse 80i de fluorescencia y el microscopio confocal FV1000 Olympus. Las imágenes tomadas al confocal se analizaron con el programa Olympus Fluoview versión 3.1.

3.4.3.2 Inmunofluorescencia sobre “whole mount”

Los ratones fueron perfundidos con solución salina, tras ser previamente anestesiados. Se extrajo el cerebro de cada ratón, se diseccionó el 3V del mismo modo que para el estudio al SEM y finalmente fue fijado por inmersión en PFA al 4% con Triton X-100 0,5% a 4°C durante 12 horas. Tras varios lavados con PBS se diseccionó finamente la pared del 3V con el fin de reducir el grosor de la muestra para facilitar su montaje posterior. Se bloqueó el tejido en PBS con Triton X-100 0.5% y 10% NGS durante 1 hora. El mismo tampón bloqueo se utilizó para incubar los anticuerpos primarios durante 48 horas a 4°C. Los anticuerpos secundarios, conjugados con marcadores

fluorescentes, se incubaron también en el mismo tampón durante 24 horas a 4°C. Finalmente, se incubó el tejido en DAPI 1:1000 durante 10 minutos, y se procedió a su montaje en Mowiol-4-88 (Polysciences, Inc.). Para ello ideamos y patentamos (Código de patente: 000549) un dispositivo utilizando una impresora 3D, que posee el tamaño de un cubreobjetos de (24 mm x 60 mm) y 5mm de grosor (algo menor que el grosor de las muestras), el cuál presenta dos orificios de 1 cm de diámetro y separados entre ellos por 1 cm. El montaje que se llevó a cabo era el siguiente, sobre un cubreobjetos fijábamos mediante cianocrilato el dispositivo en el centro del mismo. Colocamos la muestra en uno de los orificios con la superficie ciliada hacia arriba, rellenamos con Mowiol, y gracias a que este endurece, tras haber puesto el cubreobjetos y añadir algo de peso, se quedaba fijado y la superficie ventricular quedaba en contacto con el cubreobjetos. De este modo conseguíamos corregir la curvatura de la superficie y era posible enfocarla por completo. Las proteínas detectadas en inmunofluorescencia en “whole mount” fueron, la γ -tubulina y la vimentina.

3.4.3.3 Inmuno-oro “preembedding” en secciones coronales

Los animales se perfundieron con solución salina al 0,9% seguida de PFA al 4% - GA 0,5%. Los cerebros se postfijaron en la misma solución fijadora durante 12 horas. Tras lavarlos con PB 0,1M se cortaron secciones de 100 μ m en el vibrátomo, se lavaron en PB 0,1M y se crioprotegieron en sacarosa al 25%. Las secciones se sometieron a 4 ciclos de congelación-descongelación en metilbutano a -60°C con el fin de permeabilizar el tejido. A continuación, las secciones se lavaron en PB 0,1M, se bloquearon en seroalbumina bovina-c (BSA-c, Aurion) y se incubaron en el anticuerpo primario en tampón bloqueo durante 72 horas a 4°C. Los anticuerpos utilizados en inmuno-oro fueron, vimentina, Acsa-1, EAAT1, GFAP, GFP, y nestina, todos ellos incluidos en la tabla 5 de Anticuerpos primarios utilizados, pero la concentración utilizada para esta técnica fue el doble de la indicada en la tabla. Las secciones se lavaron en PB 0,1M, se bloquearon en BSA-c al 0,5% y gelatina de pescado al 0,1% durante 1 hora y se incubaron en el anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal (1:50) durante 24 horas. Las secciones se lavaron en PB y en acetato sódico al 2%. Luego se realizó una intensificación con plata empleando el kit del fabricante (Aurion), y las secciones se lavaron de nuevo con acetato sódico al 2%. Para estabilizar las partículas de plata, se incubaron las secciones con cloruro de oro al 0,05% durante 10 minutos a 4°C y se fijaron con tiosulfato sódico al 0,03% y con PB 0,1M. Finalmente, las secciones se postfijaron en glutaraldehído al 2% durante 30 minutos, se lavaron en PB 0,1M. A

continuación se llevó a cabo el procesado para TEM con la única salvedad de que la postfijación se realizó con Osmio al 1% con glucosa al 7% para evitar que se oscurecieran demasiado y dejarnos ver la marca de la inmuno-oro. Todo el procesado posterior fue similar hasta la obtención de semifinos. Tras seleccionar en el microscopio óptico los semifinos con el marcaje de interés, éstos se transfirieron a nuevos bloques de resina epoxi y se cortaron ultrafinos que se examinaron en el TEM.

3.4.3.4 Inmuno-oro “preembedding” en “whole mount”

Para esta inmuno-oro, partimos de disecciones del 3V iguales a las utilizadas para la inmunofluorescencia en “whole mount”. La inmuno-oro también siguió el mismo protocolo que para una inmuno-oro convencional hasta su inclusión en resina epoxi.

“En face”

El seccionado de la inmuno-oro del “whole mount” es especial, dado que hay que orientar la cuchilla de diamante enfrentada a la superficie ventricular, lo que llamamos “en face”. En primer lugar se cortaron secciones de 1,5 µm y se seleccionaron los cortes de interés. Se transfirieron a bloques de resina epoxi para cortar secciones ultrafinas agotando por completo el semifino.

3.4.3.5 Inmunohistoquímica “postembedding” en semifinos.

Los ratones se perfundieron con solución salina al 0,9% seguida de PFA 4% - GA 0,5%. Se cortaron en el vibrátomo secciones de 200 µm, se contrastaron con osmio al 1% y glucosa al 7% y se incluyeron en resina epoxi. Se cortaron secciones semifinas de 1 µm y se realizó la inmunocitoquímica según Crespo et al. (Crespo et al., 2000). En primer lugar se eliminó la resina epoxi mediante la incubación durante 12 minutos en una mezcla de etóxido, acetona y tolueno. Las muestras se hidrataron e incubaron en metaperyodato al 1% durante 10 minutos. Tras lavar con PB, se incubaron en borohidruro sódico al 1%, se bloquearon en NGS al 10% durante 30 minutos y se incubaron en el anticuerpo primario durante 12 horas a temperatura ambiente. Al día siguiente, las secciones se incubaron en el anticuerpo secundario conjugado con un marcador fluorescente o biotinilado durante 1 hora. En el caso del secundario biotinilado, se reveló con el kit ABC (Vector) seguido del DAB al 0,05% y H₂O₂ al 0,01%. Tras deshidratar con alcoholes crecientes, las secciones se montaron con Eukitt. Si fue utilizado el secundario fluorescente, se montó directamente con Fluorsave.

3.4.3.6 Anticuerpos utilizados

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en el presente trabajo.

Antígeno	Inmunógeno	Tipo	Casa comercial y referencia	Dilución
BrdU	Detalles no disponibles	Rata monoclonal, IgG	Abcam, AB6326	1:200
CD24	Linfocitos T esplénicos de ratón C57BL/10	Rata monoclonal (clon M1/69), IgG2b	BD PharMingen, 557436	1:500
FGF-10	Péptido lineal conjugado a KLH de FGF-10 humano	Conejo policlonal	Millipore, ABN44	1:100
GFAP	GFAP aislado de médula espinal de vaca	Conejo policlonal, fracción de Ig	Dako, Z 0334	1:500
GFP	GFP recombinante purificada, emulsión en adyuvante de Freund	Pollo policlonal, fracción IgY	Aves Lab, GFP-1020	1:200
GLAST (EAAT1)	Péptido sintético correspondiente a 20 residuos del extremo C-terminal de la proteína EAAT1 de rata.	Conejo policlonal, IgG	Abcam, Ab416	1:100
GLAST (Acsa-1)	Detalles no disponibles	Ratón, IgG2a	Miltenyi Biotec, 130-095-822	1:50
Ki67	Proteína de fusión recombinante (fragmento de 1086bp de cDNA conteniendo el motivo Ki67)	Ratón policlonal, IgG	Novacastra, NCL-Ki67-MM1	1:100
Nestina	Péptido sintético correspondiente a los residuos 254-270 de nestina humano. Esta secuencia es al 93% idéntica en la rata	Conejo policlonal	Sigma Aldrich, N5413	1:200
S100β	Proteína S100	Conejo policlonal	ImmunoStar, 22520	1
Vimentina	Vimentina humana recombinante purificada de E. coli.	Pollo policlonal, IgG	Abcam, ab73159	1:300
γ-tubulina	Péptido sintético (región N-terminal de γ -tubulina humana, aa. 38-53, con lisina C-terminal) conjugado a KLH	Conejo policlonal, IgG	Sigma Aldrich, T5192	1:500

Tabla 6. Tabla de anticuerpos secundarios utilizados en el presente trabajo

<i>Especie diana</i>	<i>Especie productora</i>	<i>Conjugación</i>	<i>Casa comercial y referencia</i>	<i>Dilución</i>
Rata	Cabra	Biotinilado	Vector, BA9400	1:400
Rata	Cabra	Fluorescente Alexa488	Invitrogen, A11006	1:500
Rata	Cabra	Fluorescente Alexa555	Invitrogen, A21434	1:500
Rata	Cabra	Oro coloidal 0,8nm	EMS, 25181	1:50
Conejo	Cabra	Fluorescente Alexa488	Invitrogen, A11008	1:500
Conejo	Cabra	Fluorescente Alexa555	Invitrogen, A21428	1:500
Conejo	Cabra	Fluorescente Alexa647	Invitrogen, A21245	1:500
Conejo	Cabra	Oro coloidal 0,8nm	EMS, 25100	1:50
Pollo	Cabra	Fluorescente Alexa488	Invitrogen, A11039	1:500
Pollo	Cabra	Oro coloidal 0,8nm	EMS, 25585	1:50
Ratón	Cabra	Biotinilado	Vector, BA9200	1:200
Ratón	Cabra	Fluorescente Alexa488	Invitrogen, A11001	1:500
Ratón	Cabra	Fluorescente Alexa555	Invitrogen, A21424	1:500
Ratón	Mono	Fluorescente Alexa647	Invitrogen, A31571	1:500
Ratón	Cabra	Oro coloidal 0,8nm	EMS, 25121	1:50

3.5 Cultivo de neuroesferas

Los ratones empleados en este ensayo fueron sacrificados mediante dislocación cervical. El 3V se diseccionó de un modo similar al realizado en el “whole mount” y se dividió por el quiasma óptico en dos partes para cultivarlas por separado, dando lugar a una parte anterior (3Va) y una posterior (3Vp). Las SVZ de cada animal también fueron diseccionadas y cultivadas como control. Todas las disecciones se realizaron en PBS Dulbecco estéril y reservadas en DMEM estéril a 4°C hasta completar las disecciones. Siguiendo el protocolo empleado por Reynolds y Weiss (Reynolds and Weiss, 1992), se procedió a digerir el tejido con papaína (Worthington). Las células fueron disociadas y sembradas en medio control (DMEM/F12, L-glutamina 2mM, glucosa 0.6%, putrescina 9.6 mg/ml, progesterona 6.3 ng/ml, sodio selenito 5.2 ng/ml, insulina 0.025 mg/ml, transferrina 0.1 mg/ml, heparina 2mg/ml y antibiótico/antimicótico) suplementado con

EGF recombinante humano (20 ng/ml, Invitrogen Life Technologies) y FGF recombinante humano (20 ng/ml, Sigma Aldrich) (Gritti et al., 1999). La concentración de los factores fue establecida según la bibliografía reciente (Markakis et al. 2004; Bennett et al. 2009; Xu et al. 2005; S C Robins et al. 2013). Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera saturada de humedad y CO₂ al 5%. Con el fin de cambiar el medio y ampliar el número de células, se realizó un pase celular cada 7 días, manteniendo las células hasta el cuarto pase para todos los estudios *in vitro*, tanto para establecer la tasa de amplificación, como el tamaño medio de neuroesferas y la tasa de autorrenovación.

3.6 Ensayo clonal

Para el ensayo clonal se utilizaron 4 ratones macho CD1 P60. A partir de cada uno se realizó un cultivo de neuroesferas derivado del 3V. Tras tres pases, se disgregaron las neuroesferas y se sembró en una placa de 96 pocillos, 10 pocillos por animal, con 1 célula por pocillo. Esto se consiguió diluyendo el cultivo de partida hasta una concentración de 10 células/ml. Repartimos esos 1000 µl en los 10 pocillos y lo incubamos 7 días a 37°C en atmósfera saturada de humedad y CO₂ al 5%. Transcurrido ese tiempo, se estudió la placa analizando en qué pocillos se habían generado neuroesferas y en cuáles no.

3.7 Cultivo organotípico

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les extrajo el cerebro. Se diseccionó el 3V en medio HBSS suplementado con penicilina y estreptomycin, tomando un cubo de tejido que lo englobase por completo. Utilizando agar de bajo punto de fusión (Sigma Aldrich) al 3% preparado en agua estéril, se encastró el cubo de tejido y se cortaron, siempre en frío, secciones coronales del 3V de 200 µm con el vibrátomo. Se lavaron las secciones con la misma solución de disección para eliminar las enzimas líticas.

En una placa de 6 pocillos se colocaron insertos de 0.035mm de poro (Miltenyi Biotech) y 1ml de medio control suplementado con FGF (20ng/ml), de modo que no cubriese el tejido. Se depositaron tres cortes por pocillo e incubaron 24h a 37°C en atmósfera saturada de humedad y CO₂ al 5%. Transcurrido este tiempo, las secciones se fijaron con PFA4% por inmersión.

3.8 Recuentos y análisis de datos

3.8.1 Estudio de la capacidad proliferativa y capacidad de autorrenovación *in vitro*

A día 7 de cultivo (7DIV), con el fin de medir el tamaño medio de neuroesfera de los cultivos, se tomaban diez fotografías de cada cultivo mediante un muestreo sistemático con la ayuda de una plantilla transparente. Para ello se utilizó una cámara fotográfica acoplada a un microscopio invertido de contraste de fases modelo IMT-2 (Olympus Optical Co.) y se tomaron las medidas de área con el programa Image Tool (Evans Technology).

En cada pase se llevó a cabo un recuento del número de células de cada cultivo mediante una cámara de Neubauer y se sembró a una densidad de 10.000 células/cm². Estos recuentos los utilizamos para calcular la tasa de amplificación dividiendo en cada pase las células obtenidas por las células de partida sembradas inicialmente.

La capacidad de autorrenovación se estudió con el ensayo clonal, en el cual, a los 7DIV a partir de la siembra en la placa de 96 pocillos, se analizó al microscopio invertido de contraste de fases modelo IMT-2 (Olympus Optical Co.) en qué pocillos se había generado una neuroesfera y qué pocillos no. Se contaron y se realizó la media en base al número de pocillos totales sembrados.

3.8.2 Estudio de la capacidad proliferativa *in vivo*

In vivo no se realizó estadística, puesto que el número de células marcadas y en contacto con la luz ventricular, tanto para marcadores endógenos como exógenos, fue de 1 a 2 células por animal. Se calculó una aproximación de células en proliferación por volumen.

3.8.3 Métodos estadísticos

Los datos se analizaron con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 22. Todos los valores de p son bilaterales y se consideró estadísticamente significativo $p < 0,05$ (*). Se utilizó el test de Levene para comprobar la homogeneidad de varianzas, seguido del análisis de la varianza (ANOVA) de un factor. Para detectar las diferencias entre grupos (cultivo de las SVZ, 3Va y 3Vp), se utilizó el test de Games-Howell como análisis *post-hoc*.

Resultados

4 Resultados

4.1 Descripción morfológica

4.1.1 La superficie de la pared ventricular. Microscopía electrónica de barrido. Establecimiento de los niveles de estudio

La cavidad del 3V, en una visión tridimensional, constituye un elipsoide en los niveles más anteriores, y progresivamente adquiere una forma triangular invertida a medida que avanzamos hacia niveles más posteriores. Sus paredes no están constituidas por una superficie homogénea de células sino que, por el contrario, presentan una heterogeneidad muy marcada. Esta superficie puede verse globalmente si realizamos un estudio empleando el SEM (Figura 18). En esta imagen se pueden distinguir tres regiones, una central formada por células multiciliadas, que abarca alrededor de 2/3 de la superficie que hemos denominado región dorsal multiciliada (RDM); y dos regiones constituidas predominantemente por células uniciliadas, una anterior que hemos denominado región rostroventral (RRV) y una posterior, más amplia, que hemos denominado región caudoventral (RCV) y que se prolonga sobre la eminencia media (EM). En conjunto estas dos regiones predominantemente uniciliadas conforman el tercio restante (Figura 18).

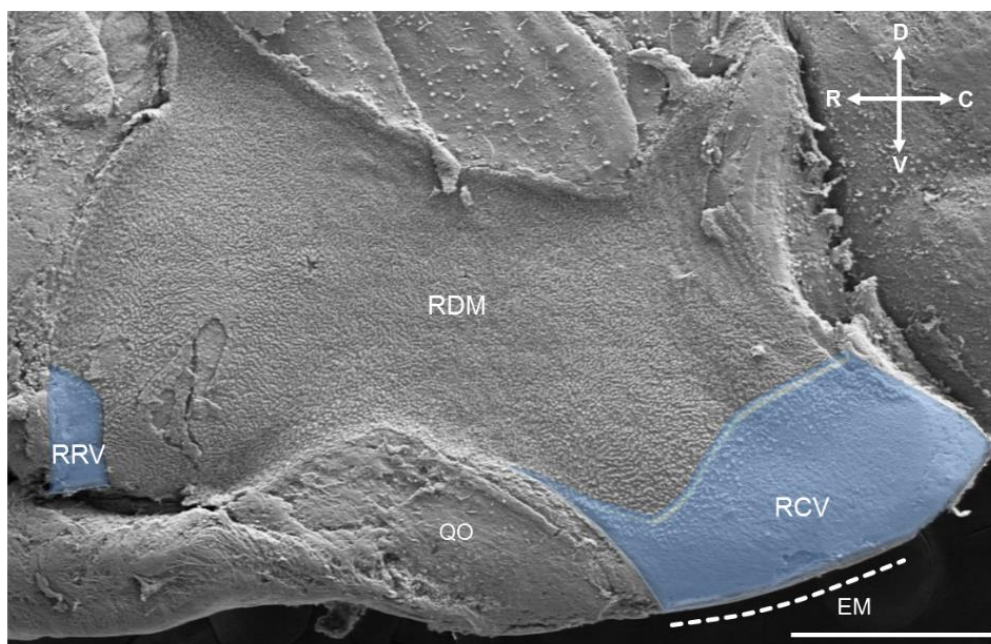


Figura 18. Regionalización de la superficie del 3V. Fotografía panorámica de SEM donde se muestra la superficie lateral del 3V. Los polígonos azules delimitan las dos regiones no multiciliadas que se pueden observar. Rostralmente se localiza la región rostroventral (RRV) no multiciliada y caudalmente la región caudoventral (RCV) no multiciliada. La línea discontinua indica donde se situaría la eminencia media (EM), cuyo epéndimo lo consideramos parte de la RCV, continuándose con ella ventralmente. Dada la disposición de ésta, no es posible mostrarla en la misma fotografía. El resto de la superficie del 3V constituye la región dorsal multiciliada (RDM) y se encuentra tapizada por células multiciliadas. C, caudal; D, dorsal; EM, eminencia media; R, rostral; RCV, región caudoventral; RDM, región dorsal multiciliada; RRV, región rostroventral; QO, quiasma óptico; V, ventral. Barra de calibración, 50µm.

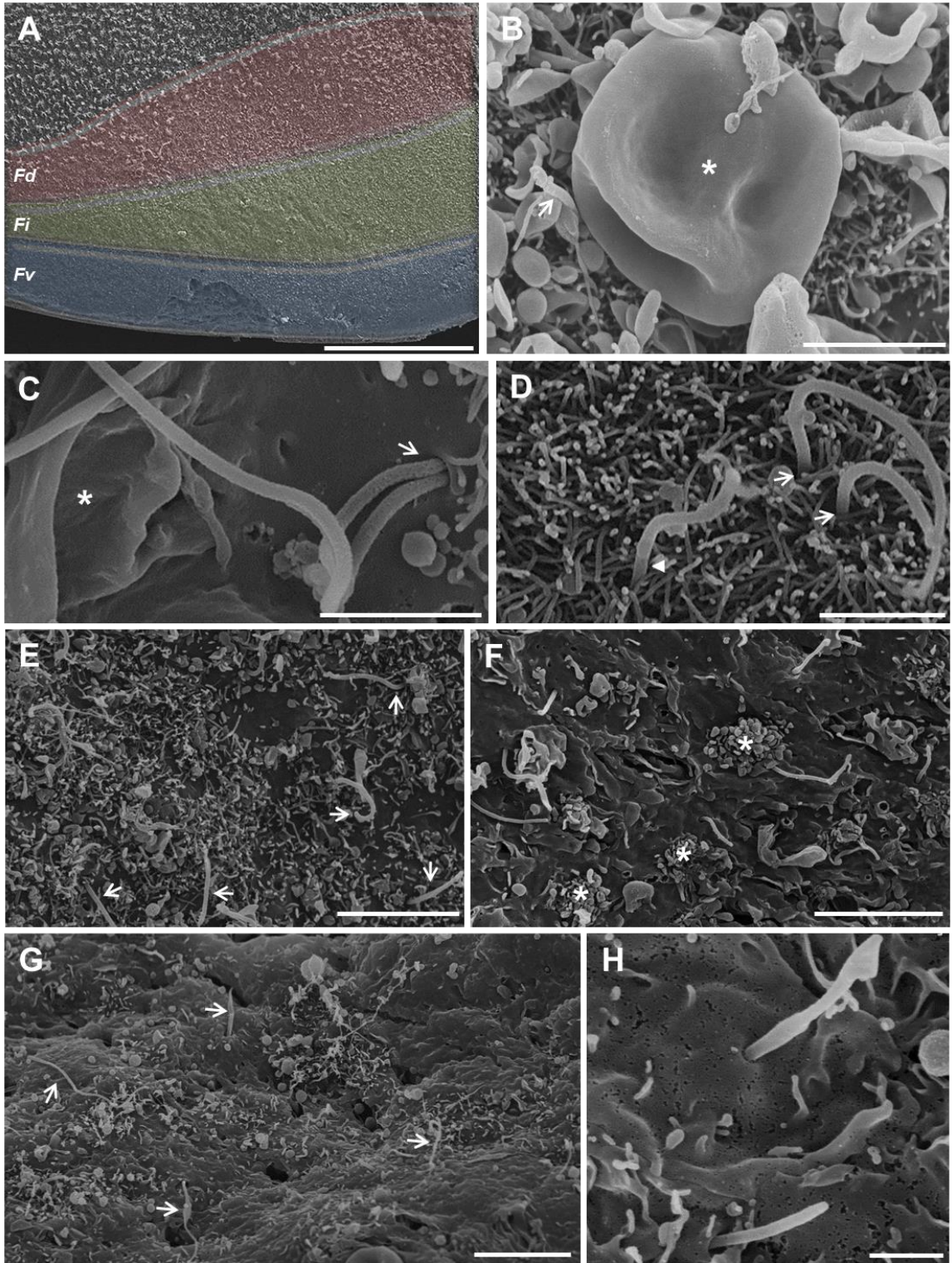
La **región caudoventral** a su vez, muestra tres franjas horizontales en base a la distribución de los tipos celulares, aunque los límites entre franjas son difusos. Estas franjas se distinguen fácilmente por el número y distribución de los cilios, microvellosidades y expansiones citoplasmáticas (Figura 19A). Atendiendo a estos elementos, se han denominado *franja ventral*, *franja intermedia* y *franja dorsal*.

La **franja dorsal** se caracteriza por la presencia de células con grandes expansiones citoplasmáticas a modo de “burbuja” o *blebs* (Figura 19B, asterisco). Las células responsables de estas expansiones suelen contener pocas microvellosidades y las que se encuentran son en general cortas. Hay tanto células uniciliadas, de cilio corto (Figura 19B, flecha), como biciliadas de cilios largos, en una proporción similar (Figura 19C, flecha). Estas células comparten localización con células de abundantes microvellosidades, pero que en este caso no emiten *blebs*, o son pequeños. Al igual que las otras células, pueden ser uniciliadas (Figura 19D, punta de flecha) o biciliadas, en ambos casos de cilios largos (Figura 19D, flechas).

La **franja intermedia** se caracteriza por la ausencia de grandes *blebs* estando sólo presentes las células de abundantes microvellosidades, tanto uniciliadas como biciliadas (Figura 19E), aunque son más predominantes las células uniciliadas, frente a las biciliadas. Además, de forma puntual hemos observado células tetraciliadas.

La **franja ventral** la componen células que carecen de *blebs* y que son en un alto porcentaje células uniciliadas, apareciendo rara vez células biciliadas. En esta franja podemos encontrar células uniciliadas tanto de cilio corto como largo, sin embargo los cilios de las células biciliadas son siempre largos. Otro elemento característico de las células de esta franja es la presencia de un penacho central de pequeñas expansiones citoplasmáticas pero que no corresponden a microvellosidades (Figura 19F). Las microvellosidades, por su parte son poco abundantes, pero aumenta su número según nos acercamos a la *franja intermedia*. La *franja ventral* se continúa con la **EM**, cuya superficie está formada por células uniciliadas de largos cilios y pocas microvellosidades (Figura 19G, flechas).

La **región rostroventral** es la de menor superficie de las tres regiones en que hemos subdividido la pared del ventrículo, y se sitúa en el extremo más anterior y basal del 3V, no mostrando una distribución en franjas. Se compone principalmente de células uniciliadas de superficie generalmente lisa, es decir, con escasas microvellosidades y expansiones citoplasmáticas (Figura 19H). Sin embargo, en el extremo más rostral, abundan las células con grandes *blebs* expuestos hacia la cavidad ventricular.



Por último, la **región dorsal multiciliada** es muy homogénea y como su nombre indica se compone básicamente de células multiciliadas. Aunque no hemos realizado un estudio de la polaridad planar de los cilios (Mirzadeh et al. 2010), observamos que existe una tendencia a adoptar la misma dirección en cada una de las células. Sin embargo, si hacemos un análisis de la preferencia de dirección global, de todas las células multiciliadas en conjunto, sí que se observan grupos con tendencia a una misma dirección de batido de sus cilios, a modo de corrientes (Figura 20A, flechas). Los cilios de cada célula pueden estar libres (Figura 20B), pero en ocasiones los encontramos unidos por su extremo distal (Figura 20C), y curiosamente se encuentran agrupadas las de un tipo y otro. Eventualmente encontramos células uniciliadas entre las multiciliadas (Figura 20D, flecha). Sobre la superficie de las células multiciliadas, pueden observarse redes de axones no vistas en el resto de superficies del 3V. Estos axones pueden encontrarse tanto aislados como agrupados. En el caso de encontrarse aislados, están rodeados casi por completo de microvellosidades que los abrazan a modo de anclaje (Figura 20E, puntas de flecha).

En base a la información que se obtuvo de los estudios de SEM, mantuvimos estas tres grandes regiones para los estudios coronales, pero debido a la importancia de la región caudoventral (RCV), la subdividimos a su vez en tres niveles; anterior, medio y posterior; resultando un total de cinco niveles (Figura 21A). El nivel 1 (N1), en Brg 0.3 mm, comprende la región rostroventral de células no multiciliadas (Figura 21C). El nivel 2 (N2), en Brg -0,5 mm, representa la amplia y homogénea región de células multiciliadas, la región dorsal multiciliada (RDM) (Figura 21D y E). El nivel 3 (N3) corresponde a la sección coronal, en Brg -1mm, donde se encuentra el inicio de la RCV (Figura 21F, flechas). El nivel 4 (N4), abarca desde Brg -1,70mm a -2,30mm, contiene prácticamente la totalidad de la RCV, distribuida en las tres franjas descritas anteriormente. Este nivel engloba desde la eminencia media ventralmente hasta parte de la RDM (Figura 21G). A este nivel el 3V se denomina también receso infundibular,

Figura 19. Estudio al SEM de la RCV y RRV. A) Imagen panorámica de las 3 franjas en las que se divide la RCV. La franja dorsal (roja), en contacto con la RDM, la franja intermedia (verde), y por último, la franja ventral (azul). B) Detalle de la franja dorsal, donde se observa la célula característica de esta franja. Ésta presenta un gran y único *bleb* en superficie, de la base del cual surge un único cilio (flecha). C) Célula de un gran *bleb*, en este caso colapsado (asterisco), y biciliada (flecha), también localizada en la franja dorsal. D) Detalle de la franja dorsal. En esta franja coexisten las características células de grandes *blebs*, uniciliadas y biciliadas, con células de superficie repleta de microvellosidades, biciliadas (flechas, señalando cada cilio) o uniciliadas (punta de flecha). E) Detalle de la franja intermedia, donde se muestra la superficie cubierta predominantemente por células de abundantes microvellosidades. Estas células son en su mayoría uniciliadas. Las flechas señalan el cilio de cada célula. F) Detalle de la franja ventral, en el que se observan los penachos de pequeños *blebs* (asteriscos) localizados en el centro de la superficie de las células características de esta franja. G) Imagen de la superficie de la EM, donde vemos células que presentan escasas microvellosidades y un cilio largo (flechas). H) Detalle de la superficie de la RRV, en el cual las células que la componen son de superficie lisa y uniciliadas. Fd, franja dorsal; Fi, franja intermedia; Fv, franja ventral; RCV, región caudoventral; RDM, región dorsal multiciliada; RRV, región rostroventral. Barra de calibración en A, 200µm; B, C y D, 2µm; E, F y G, 5µm; H, 1µm.

pues sufre aquí una elongación que se continúa con la hipófisis, apreciable en una vista sagital. Por último, el nivel 5 (N5) se sitúa en Brg -2,5mm y se corresponde con el extremo posterior de la RCV (Figura 21H).

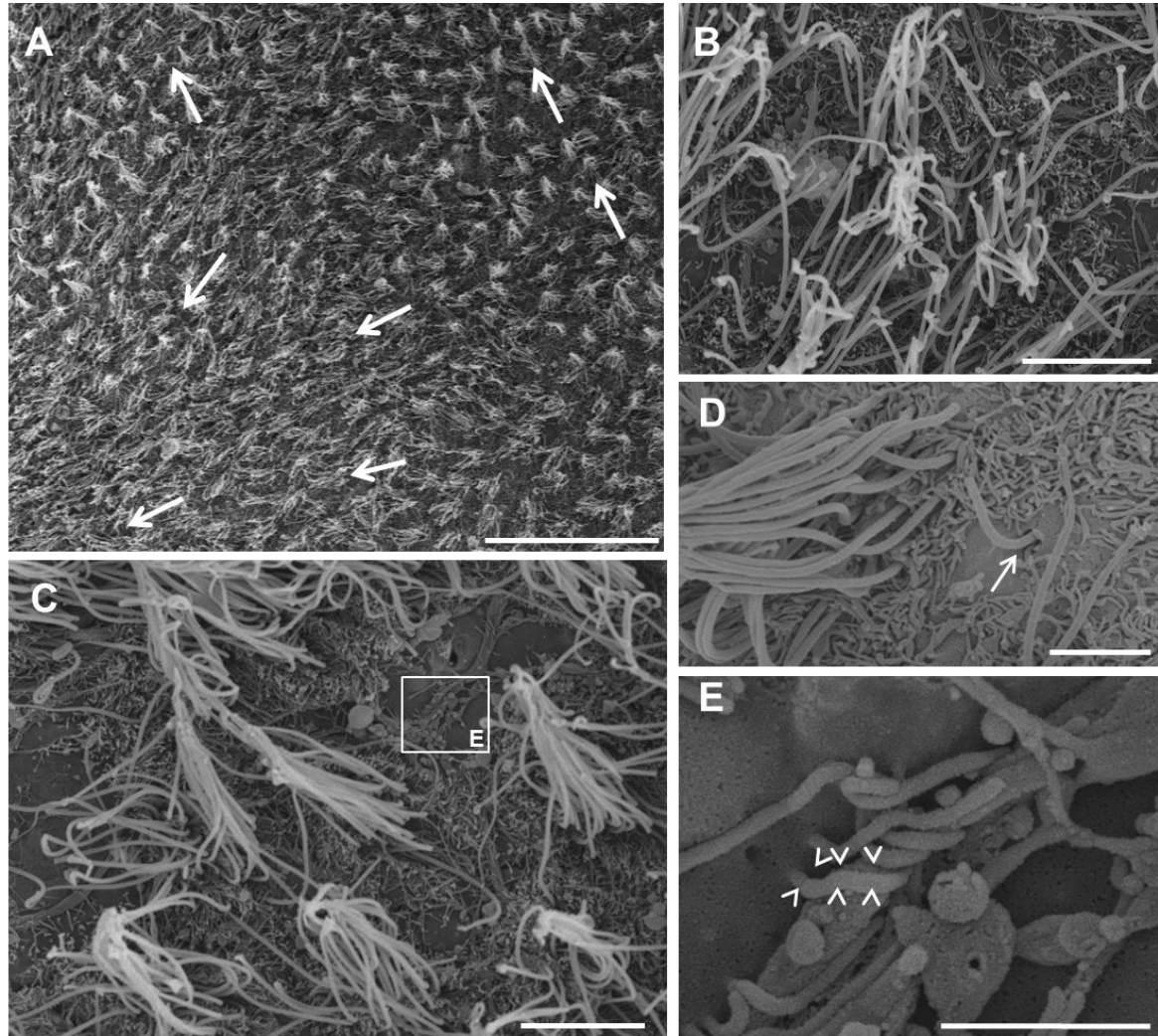


Figura 20. Estudio al SEM de la RDM. A) Panorámica de la porción central de la RDM donde vemos que las células multiciliadas muestran la misma dirección de batido de sus cilios por grupos, a modo de corrientes (flechas). B) Detalle de un grupo de células ependimarias de cilios libres. C) Detalle de un grupo de células ependimarias de cilios unidos por los extremos. E) Detalle de una fibra axónica individual rodeada por microvellosidades (puntas de flecha). RDM, región dorsal multiciliada; SEM, microscopia electrónica de barrido. Barra de calibración en; A, 5 μ m; B y C, 5 μ m; D, 2 μ m y E, 1 μ m.

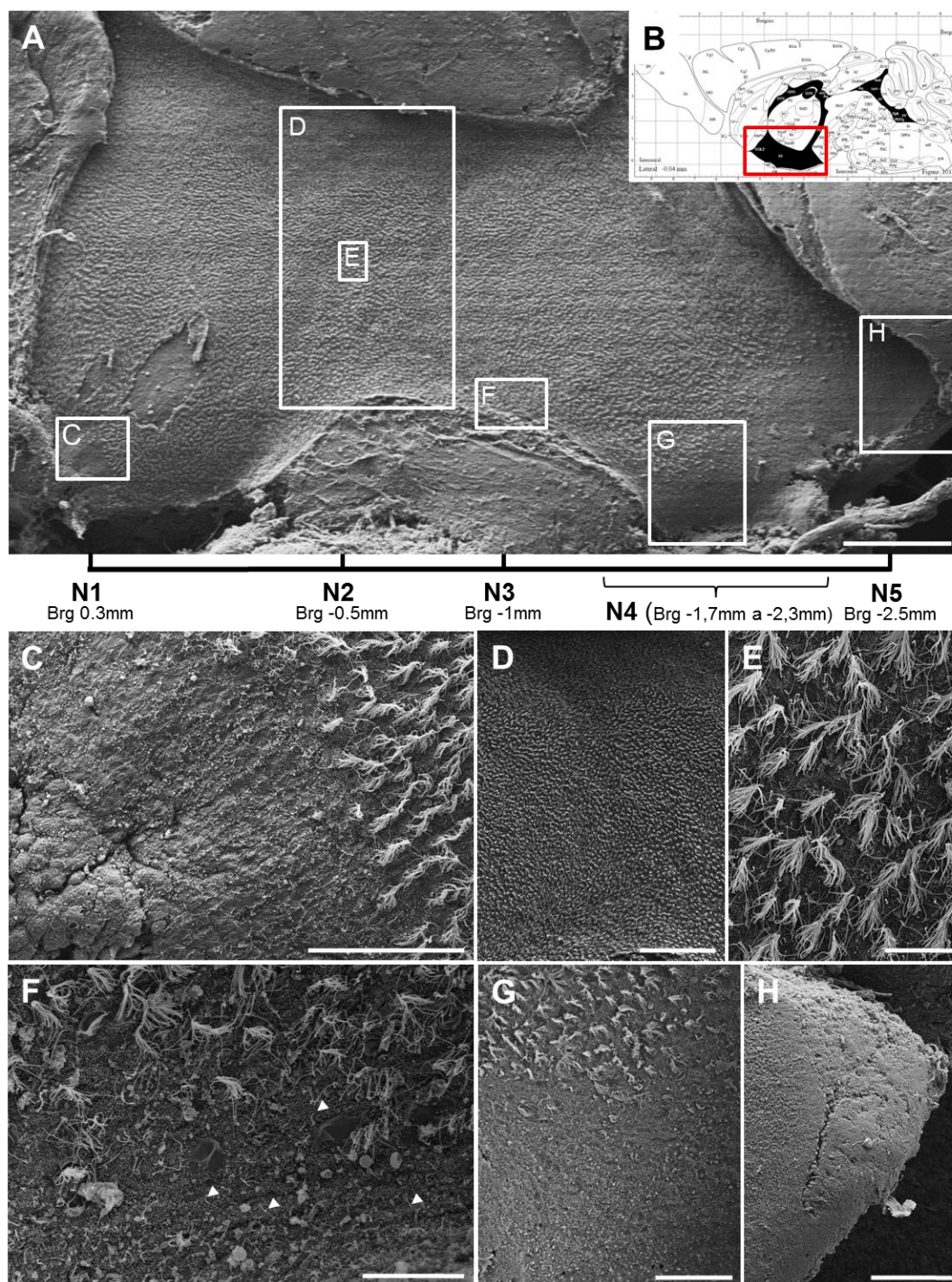


Figura 21. Niveles de estudio establecidos en el 3V. A) Panorámica de la superficie del 3V donde se localizan, mediante la barra inferior, los niveles establecidos y el bregma al que corresponden. Nótese que el N4 abarca un rango desde bregma -1,7mm hasta bregma -2,3mm. B) Esquema de un corte sagital de cerebro de ratón correspondiente al atlas de Paxinos donde se señala la localización del 3V (Recuadro rojo). C) Detalle de la RRV, donde se aprecia una zona de células de superficie lisa y a la derecha, parte de la región multiciliada con la que limita. D) Panorámica de la porción más central de la RDM. E) Detalle de la RDM, donde se aprecian los agregados de cilios de las células multiciliadas. F) Detalle de la porción más ventral del N3, caracterizado por la aparición aquí de células no multiciliadas correspondientes al inicio de la RCV. Nótese el contraste entre las células multiciliadas localizadas dorsalmente con la escasez de cilios (puntas de flecha) de la porción ventral. G) Detalle de la porción ventral correspondiente al N4, donde se encuentran los tanocitos. Se aprecia cómo dorsalmente se localizan células multiciliadas ya que este nivel (sección coronal) incluye la RCV y dorsalmente la porción más caudal de la RDM. H) Panorámica del N5 correspondiente al extremo caudal de la pared del 3V. Esta región carece de células multiciliadas y forma parte de la RCV. Brg, Bregma; RRC, región rostroventral no multiciliada; RDM, región dorsal multiciliada; RCV, región caudoventral no multiciliada. Barra de calibración en A, 250 μ m; C, 50 μ m; D, 150 μ m; E, 15 μ m;

4.1.2 Nivel 4, los tanicitos

Este nivel está comprendido entre bregma -1,70mm hasta -2,30mm, y contiene la región caudoventral que integra la EM, las tres franjas definidas al SEM, así como parte de la región multiciliada dorsal. Hemos centrado nuestro estudio en el N4 con la intención de describir la morfología de los tanicitos de forma exhaustiva, desvelar de algún modo la función que puedan ejercer en el 3V e intentar dilucidar su papel como nicho proliferativo. Finalmente repasaremos algunos aspectos relevantes del resto de niveles, así como el desarrollo y envejecimiento de los tanicitos.

4.1.2.1 Microscopía óptica

En cortes semifinos coronales teñidos con azul de toluidina, observamos que la cavidad del 3V en N4 muestra un estrechamiento en la porción central donde llegan a contactar ambas paredes ventriculares, generalmente a nivel de la *franja dorsal* y *franja intermedia*. La cavidad se enclava en el centro de un área muy densa en somas neuronales que se corresponden con los núcleos hipotalámicos dorsomedial (DMH), ventromedial (VMH) y Arcuato (ARC). Ventralmente, sin embargo, se encuentra una gruesa franja hipocelular que constituye la EM. A ambos lados del límite dorsal de la EM existen dos invaginaciones laterales que corresponden al denominado receso infundibular (Figura 22A).

La EM es una estructura biconvexa flanqueada dorsalmente por un epéndimo formado por los somas de los tanicitos y ventralmente por la *pars tuberalis*. El neuropilo está formado principalmente por expansiones celulares, tanto neuronales (axones procedentes de las neuronas de diversos núcleos hipotalámicos) como procesos basales de tanicitos, pero con pocos somas libres. Éstos se corresponden con células de soma fusiforme (Figura 22B, flecha negra), neuronas (Figura 22B, flecha blanca) y células muy densas y pequeñas con forma irregular (Figura 22B, flechas negras). Además, pequeños axones mielínicos salpican el neuropilo de la EM sin una distribución uniforme (Figura 22B, flechas negras). En el límite ventral, la *pars tuberalis* es una estructura laminar formada por abundantes vasos sanguíneos (Figura 22C, asteriscos), una fina capa de tejido conectivo que se continúa con la piamadre y un epitelio de tipo glandular que forma cisternas (Figura 22C, Cs). Su función es conectar la EM con la adenohipófisis.

El suelo de la RCV es el epéndimo que recubre la EM y está formado por una monocapa de somas triangulares o alargados con una expansión ventral o proceso

basal (Figura 22D, puntas de flecha). El núcleo, de contorno irregular y cromatina condensada, puede ser redondeado o alargado (Figura 22D). Ocasionalmente presenta profundas invaginaciones. Es frecuente encontrar grandes vasos sanguíneos junto a los somas (Figura 22D, asteriscos). Esta organización celular cambia cuando nos acercamos a los bordes de la EM, donde observamos que las células están en una mayor densidad formando un epitelio pseudoestratificado. Aquí los tanicitos son alargados, emiten un proceso basal (Figura 22E, puntas de flecha) y poseen núcleos alargados con cromatina condensada (Figura 22E). También en esta región se pueden ver vasos sanguíneos junto a los somas.

La banda de células de la EM se continúa con la franja ventral. Se trata de un epitelio monoestratificado adyacente al núcleo ARC, aunque en ocasiones puede presentar puntuales engrosamientos formados por varias capas de células. Los tanicitos se caracterizan por ser oscuros y de morfología alargada o cúbica. Emiten un proceso basal “en arco” en dirección latero-ventral, que en ocasiones es muy corto al contactar con vasos dispuestos inmediatamente tras ellas (Figura 22F, asterisco). Algunas de las neuronas del ARC se sitúan muy próximas a los somas de los tanicitos, obligando a éstos incluso a desviar su proceso basal (Figura 22F, N). Los núcleos son de contorno muy irregular, cromatina condensada y ocasionalmente invaginados. En superficie, se aprecian pequeñas protuberancias citoplasmáticas características de las células que ocupan esta franja (Figura 22F, puntas de flecha).

La franja intermedia también está flanqueada por el núcleo ARC, pero separado de él por una delgada capa hipocelular. El epitelio es monoestratificado y está compuesto por dos tipos de tanicitos dispuestos uno ventral y otro dorsalmente, aunque pueden aparecer de forma ocasional unos tanicitos intercalados en la zona del otro. Ambos son claros, aunque los más dorsales presentan el citoplasma más lúcido. En la zona ventral predominan los tanicitos alargados, los cuales poseen un núcleo también alargado que muestra contorno irregular, cromatina condensada y está frecuentemente invaginado. No se aprecia proceso basal (Figura 22G). El tanicito del extremo dorsal también es alargado pero sus núcleos más son redondeados u ovalados, con cromatina laxa, de contorno liso e invaginado ocasionalmente. (Figura 22H).

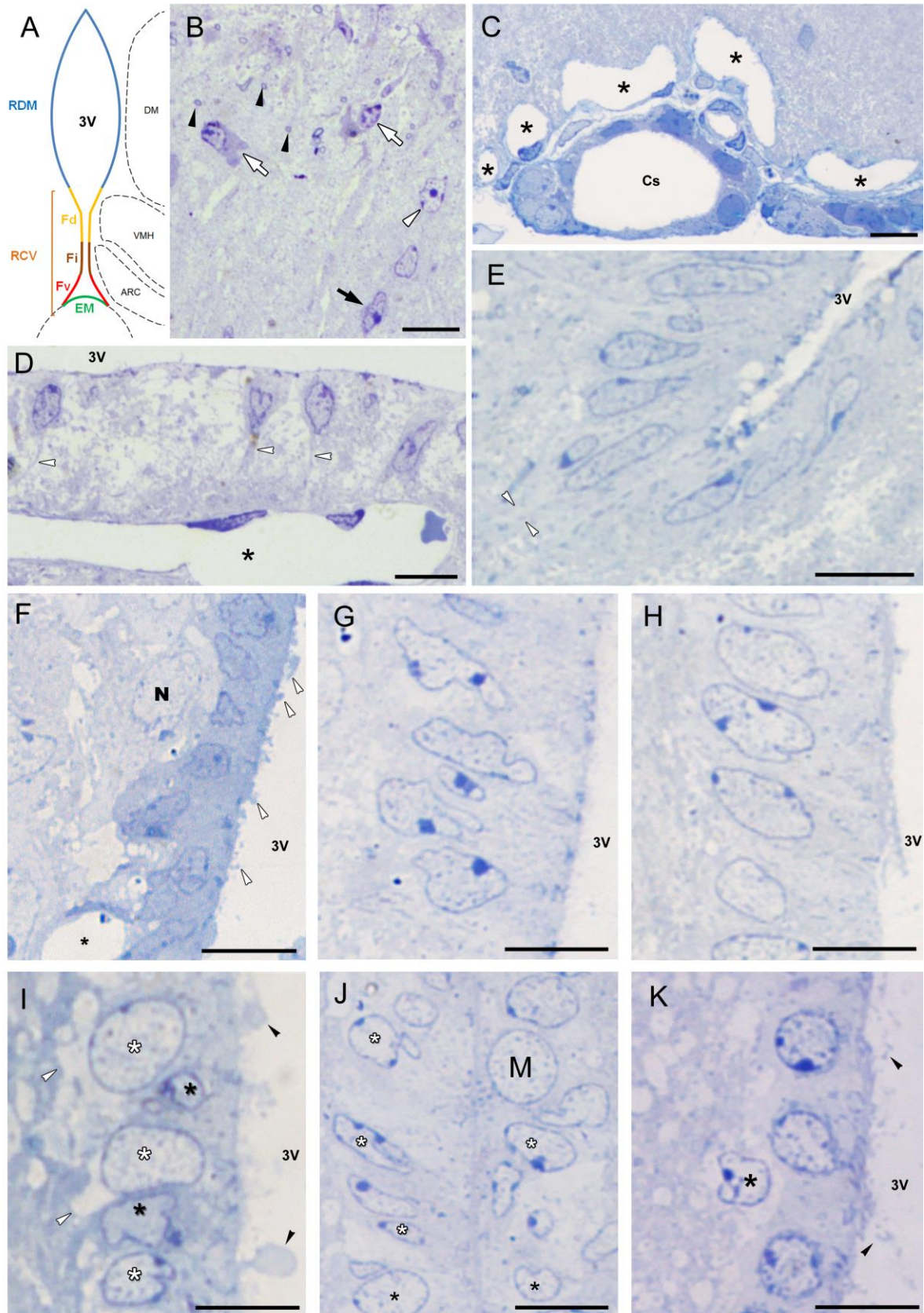
La franja dorsal, relacionada lateralmente con el núcleo VMH, está formada principalmente por un epitelio monoestratificado. La componen tanicitos y células multiciliadas que se intercalan en la porción dorsal de la franja dado que limita con la RDM y los límites son algo difusos. Dicha porción dorsal se ha denominado de “overlap” en referencia a esa mezcla entre tanicitos y células multiciliadas. El tanicito que caracteriza a esta franja presenta grandes *blebs* (Figura 22I, puntas de flecha negras),

el citosol, más claro que los anteriores, es de morfología cúbica (Figura 22I, asteriscos blancos). No presentan proceso basal radial (Figura 22I, puntas de flecha blancas). Poseen núcleos redondeados y de cromatina muy laxa con algún pequeño grumo (Figura 22I, asteriscos blancos). Entre los tanicitos claros encontramos tanicitos de características similares a los localizados en la porción más dorsal de la *franja intermedia* (Figura 22I, asteriscos negros). Esto concuerda con la variabilidad encontrada en superficie por SEM.

En el extremo dorsal del 3V las células multiciliadas constituyen la única población celular que se encuentra tapizando la cavidad, ya que se corresponde con la región dorsal multiciliada (RDM). Esta zona se encuentra flanqueada por el núcleo DMH. Está formada por un epitelio monoestratificado de células con gran cantidad de cilios en superficie (Figura 22J, puntas de flecha). Son células cúbicas, aunque en el vértice dorsal de la cavidad, donde se unen las dos paredes laterales del ventrículo, suelen ser aplanadas. El núcleo es redondeado, de cromatina condensada y carente de invaginaciones. No poseen proceso basal. En la región multiciliada, tras el epitelio encontramos la misma capa formada de expansiones claras y débilmente teñidas que

Figura 22. Estudio al microscopio óptico del N4. A) Diagrama de la organización de las diferentes regiones en el N4. Cada región se muestra en un color, RDM en azul, Fd en amarillo, Fi en marrón, Fv en rojo y EM en verde. A este nivel la cavidad se suele estrechar llegando a contactar las paredes laterales de la Fd y Fi. La cavidad presenta ventralmente dos invaginaciones laterales. Se indica en la porción derecha del diagrama los núcleos hipotalámicos que rodean el 3V en este nivel. B) Detalle del parénquima de la EM, donde vemos que se trata de una franja formada principalmente por expansiones gliales y neuronales. Los pocos somas que se encuentran son pequeños, oscuros y de morfología irregular (flechas blancas); fusiformes (flecha negra); neuronas (flecha blanca) y pequeños axones mielínicos (flechas negras). C) Detalle del límite ventral de la EM, donde se observa una línea formada por vasos sanguíneos (asteriscos) y bajo ellos cisternas de tejido glandular (Cs). D) Detalle del epéndimo de la EM, el suelo de la RCV. Se trata de un epitelio monoestratificado hipocelular. Los tanicitos que lo forman son de soma alargado o triangular y proyectan un proceso basal (flechas). El núcleo es alargado o redondeado, de cromatina condensada y en ocasiones invaginado. En niveles posteriores habitualmente se localizan vasos sanguíneos contiguos a los somas de los tanicitos (asterisco). E) El epéndimo de las invaginaciones laterales es más denso y los tanicitos adquieren una forma muy alargada y emiten un proceso basal más grueso (flechas). Los núcleos son alargados y de cromatina condensada. F) Detalle del epéndimo de la Fv. Los tanicitos que forman este epéndimo son mucho más oscuros, tienen forma cúbica o alargada y proyectan pequeñas expansiones a la cavidad ventricular (flechas). Los núcleos son de contorno muy irregular, cromatina condensada y ocasionalmente invaginados. Subyacentes a los somas es frecuente encontrar vasos sanguíneos (asterisco) y neuronas (N). G y H) Detalles de la Fi. El semifino en G corresponde a la porción más ventral de la Fi donde los tanicitos aquí son más alargados, de núcleos irregulares y cromatina condensada. En H se muestra la porción dorsal de la Fi, donde los tanicitos son algo más cúbicos de núcleo redondeado y cromatina más laxa. I y J) Detalles de la Fd. En I se muestra la porción ventral de la Fd. En el semifino se observa el tipo característico de esta franja que protruye grandes *blebs* a la cavidad ventricular (flechas negras). Son cúbicas de citoplasma claro y núcleo redondeado de cromatina muy laxa (asteriscos blancos). Presentan expansiones basales gruesas e irregulares (flechas blancas). En esta franja también podemos encontrar células de citoplasma oscuro y núcleos irregulares de cromatina condensada (asteriscos negros). En J se muestra la porción dorsal de la Fd, llamada también "overlap" por la mezcla entre tanicitos y células ependimarias multiciliadas. Los tanicitos que podemos encontrar en este epéndimo son claros de núcleos redondeados y cromatina laxa (asteriscos negros), o alargados de núcleos irregulares e invaginados de cromatina condensada (asteriscos blancos). Las multiciliadas tienen forma cúbica y presentan un núcleo redondeado sin invaginaciones. En su citoplasma, apicalmente, se pueden apreciar partículas muy oscuras que corresponden a las mitocondrias y/o corpúsculos basales (M). K) Detalle de la RDM, formada por células multiciliadas como la descrita anteriormente. Aquí es posible apreciar los cilios hacia la cavidad ventricular (flechas negras). En el semifino se aprecia la capa hipocelular subyacente también a las Fd y Fi. Ocasionalmente se encuentran soma de citoplasma muy claro y núcleo irregular de cromatina laxa con algún grueso grumo (asterisco). ARC, núcleo arcuato; Cs, cisterna; DMH, núcleo dorsomedial hipotalámico; EM, eminencia media; Fd, franja dorsal; Fi, franja intermedia; Fv, franja ventral; M, célula ependimaria multiciliada; N, neurona; RCV, región caudoventral no multiciliada; RDM, región dorsal multiciliada; VMH, núcleo ventromedial hipotalámico; 3V, tercer ventrículo. Barra de calibración en B, C, D, E, F, G, H, I, J y K 10µm.

veíamos en las *franja intermedia* y *franja dorsal*, pero aquí engrosada y conteniendo algunos somas celulares de citoplasma muy claro (Figura 22K, asterisco).



4.1.2.2 Descripción ultraestructural de las diferentes regiones del epitelio del 3V y caracterización de los tipos celulares

Una vez descritas en semifinos la región caudoventral que integra la EM y las tres franjas definidas al SEM, así como parte de la región multiciliada dorsal, decidimos realizar un estudio ultraestructural.

Tanicito tipo 1 o tanicito de la EM

El epitelio de la EM está compuesto por un único tipo de tanicito, que hemos denominado tipo 1. Está localizado en la zona central y en las invaginaciones laterales del receso infundibular (Figura 23A), existiendo entre los localizados en cada zona, sutiles diferencias. Ambos tipos de tanicitos corresponden al tanicito β descrito en la literatura.

El tanicito tipo 1 de localización más central (clásicamente llamado tanicito β 2) es una célula polarizada cuyo soma está en contacto con la luz ventricular y emite un único pero prominente proceso basal que contacta con los vasos sanguíneos del sistema porta de la *pars tuberalis*. Debido a la baja densidad celular y las uniones puntuales que presentan a lo largo del soma, se generan grandes espacios intercelulares (Figura 23B, asteriscos). Son células que carecen de microvellosidades mostrando una superficie lisa, interrumpida ocasionalmente por vesículas de clatrina y vesículas no recubiertas fusionadas con la membrana. El núcleo es alargado y ligeramente invaginado, aunque eventualmente pueden presentar profundas invaginaciones y abundantes “fusiones nucleares”. Éstas últimas aparecen como invaginaciones en las que las membranas nucleares internas casi llegan a contactar. La cromatina se encuentra condensada en grandes grumos libres, además de formar una densa banda adherida a la membrana nuclear (Figura 23B). En los bordes apicales se aprecian densos complejos de unión correspondientes a uniones adherentes y uniones estrechas, aunque estas últimas también las podemos encontrar en el resto de la membrana celular correspondiente al soma, como comprobamos mediante la inmunodetección de ZO1 con oro coloidal (Figura 23C). Esta proteína está presente en las uniones estrechas, lo que nos permite diferenciar las uniones GAP o comunicantes de las estrechas.

Estas células reciben abundantes contactos sinaptoides, principalmente a nivel del soma, pero también los podemos encontrar a lo largo del proceso basal, disminuyendo la frecuencia cuanto más distalmente nos encontremos. Los contactos sinaptoides son estructuras especializadas similares a las sinapsis pero cuyo terminal

contiene sustancias peptidérgicas (neurohormonas). Los tanicitos abrazan con delgadas expansiones citoplasmáticas estos contactos (Figura 23D y E). El citoplasma de las células tipo 1 es electrodenso, con abundantes mitocondrias de crestas compactas distribuidas por toda la célula. Con regularidad, contienen gotas lipídicas en el soma (Figura 23F, asteriscos), abundantes polirribosomas y cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER). Cabe destacar que las cisternas de RER, esporádicamente forman parejas y junto con escasos cuerpos multivesiculados, cuerpos densos y grandes dictiosomas del aparato de Golgi, conforman el resto de contenido citoplasmático a nivel del soma. Los dictiosomas se sitúan lateralmente al núcleo desde la zona más apical del soma hasta la más ventral, alargándose hasta intercalarse entre los microtúbulos al inicio del proceso basal. El proceso basal está especializado en el transporte vesicular ya que presenta abundantes microtúbulos (Figura 23G, puntas de flecha) con cisternas de REL intercaladas (Figura 23G, flecha), vesículas desprendidas del aparato de Golgi, y grandes mitocondrias que generalmente se posicionan en la periferia del proceso basal (Figura 23G, asterisco). En cuanto a la estructura ciliar, son células uniciliadas de cilio generalmente superficial y largo (Figura 23H).

Los tanicitos tipo 1 de las invaginaciones laterales son alargados y estrechos debido al poco espacio del que disponen en contacto con el 3V. Emiten largos procesos basales, que contactan con la base de la EM (Figura 23I). Se trata del proceso basal más desarrollado de todos los tanicitos (Figura 23I, flecha). Es el de mayor diámetro y el que más densidad de microtúbulos presenta. Dispone de todos los elementos implicados en el tráfico vesicular como microtúbulos (Figura 23J, puntas de flecha), mitocondrias y aparato de Golgi (Figura 23J, asterisco), además de cuerpos multivesiculares, vesículas no recubiertas fusionadas en ocasiones con la membrana apical, vesículas de clatrina y endosomas. La superficie de contacto con la luz ventricular es muy pequeña, pero suficiente para emitir un único cilio. Las uniones densas están bien desarrolladas, que sumadas a la gran interdigitación que presentan estas células, hacen que se vean como gruesas masas muy electrodensas (Figura 23K, flechas). Estas células también presentan marcaje ZO1, es decir, uniones estrechas.

Ambos tipos de células tipo1 constituyen una “barrera” que aísla a la EM de las estructuras circundantes, la separa, en el caso de la región central, del LCR y en las regiones laterales, del núcleo ARC.

La región ventral uniciliada tapizada por tanicitos tipo 1 se continúa dorsalmente con la pared lateral de la RCV, distribuida en las tres franjas descritas anteriormente. Aquí clásicamente se ha identificado la existencia de un único tipo de tanicito en toda su extensión, el tanicito α , pero el estudio ultraestructural, a diferencia de lo que se

pensaba, muestra distintos tipos celulares. De forma sistemática y para mayor simplicidad, hemos estudiado la morfología de cada franja separadamente.

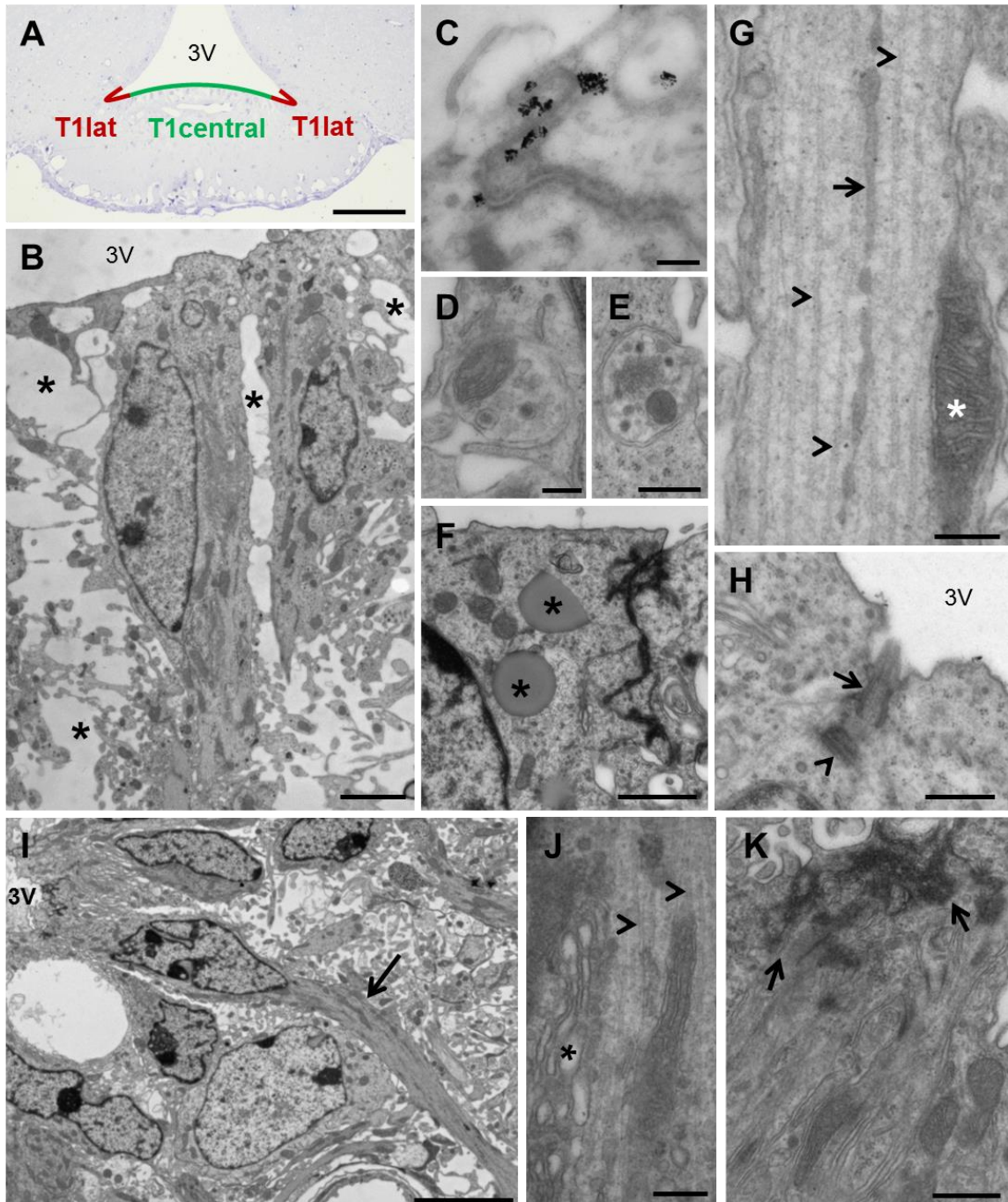


Figura 23. Descripción ultraestructural del tanicito tipo1. A) Detalle de la porción ventral del N4 en semifino. Sobre él se indica mediante una línea verde la localización de los tanicitos tipo1 centrales y en líneas rojas, los tanicitos tipo1 laterales, los cuales se encuentran cubriendo las invaginaciones laterales del receso infundibular. B) Célula tipo1 caracterizada por su morfología alargada tanto del soma como del núcleo. El núcleo es de cromatina condensada, presentando grumos y una densa banda adherida a la membrana nuclear. Se aprecia el alto contenido en mitocondrias de gran tamaño. Este epéndimo habitualmente presenta grandes espacios intercelulares (asteriscos). C) Detalle de la inmunodetección mediante oro coloidal de la proteína ZO1, presente en las uniones estrechas. D y E) Detalles de los contactos sinápticos que reciben estas células. En ocasiones los rodean mediante expansiones citoplasmáticas delgadas (D) y otras veces se genera una cavidad alrededor del contacto sináptico (E). F) Detalle del citoplasma de la célula tipo 1 central, donde se pueden observar gotas lipídicas, frecuentes en este tipo celular, mitocondrias de crestas compactas y los densos complejos de unión. G) Detalle de la ultraestructura del proceso basal del tipo 1 central. En él los se observa una densa red de microtúbulos (puntas de flecha) entre los que se intercala cisternas de REL (flecha) y una mitocondria excéntrica (asterisco). H) Detalle del aparato ciliar del tipo 1 central, localizado muy superficial y formado por un corpúsculo basal (flecha) y un centriolo perpendicular (punta de flecha). I) Células tipo1 laterales. Son células alargadas, generalmente más electrodensas que los tanicitos tipo 1 centrales. El núcleo, también alargado presenta la cromatina condensada en grandes grumos y también adherida a la membrana, presenta invaginaciones frecuentemente. Emiten un grueso proceso basal (flecha) donde se puede apreciar el alto contenido en mitocondrias. J) Detalle del contenido del proceso basal del tipo 1 lateral, muy rico en microtúbulos (puntas de flecha) y dictiosomas del aparato de Golgi (asterisco), entre otros orgánulos que no se aprecian en la fotografía. K) Detalle de los densos complejos de unión presentes en las células tipo 1 laterales (flechas). La abundancia en interdigitaciones apicales de éstas células, contribuyen a la alta densidad de las uniones. T1central, tanicito tipo 1 central; T1lat, tanicito tipo 1 lateral; 3V, tercer ventrículo. Barra de calibración en A, 100µm; B, 2 µm; C, D, G y J, 200nm; E, H, y K, 500nm; F, 1µm; I, 5µm.

Tanicito tipo 2 o tanicito de la *franja ventral*

La franja ventral se compone de un morfotipo característico de tanicitos que hemos denominado tanicito **tipo 2**. Los tanicitos tipo 2 constituyen un grupo de células muy electrodensas con pequeñas y abundantes expansiones citoplasmáticas hacia la cavidad ventricular, que ya se observaban en el SEM, y que carecen de microvellosidades o son muy escasas (Figura 25A). Generalmente están organizados como un epitelio monoestratificado, aunque es frecuente que presenten pequeñas porciones pseudoestratificadas, sobre todo en zonas cercanas a las invaginaciones laterales del receso infundibular. El núcleo ARC se sitúa adyacente a la franja ventral y sus neuronas llegan a contactar directamente con los somas de tanicitos tipo 2, incrustándose entre ellos (Figura 25A). Las células se encuentran muy imbricadas entre ellas mediante delgadas interdigitaciones verticales, es decir, de trayectoria perpendicular a la superficie ventricular. Es común observar pequeñas áreas repletas de estas interdigitaciones delgadas con uniones densas muy desarrolladas. Sus núcleos son de borde irregular, encontrándose ocasionalmente profundamente invaginados. Contienen cromatina condensada formando grandes grumos intranucleares y adheridos a la membrana nuclear y grandes nucleolos. El soma presenta una morfología irregular y alargada con un proceso basal muy desarrollado por el que contactan con los vasos sanguíneos que penetran desde las invaginaciones externas de la EM (Figura 25B). Estas células contienen gran densidad de orgánulos, fundamentalmente mitocondrias, localizadas apicalmente, muy electrodensas y de crestas compactas (Figura 25C,

asteriscos), además de abundantes dictiosomas del aparato de Golgi (Figura 25C). Es común encontrar RER de doble cisterna (Figura 25D, puntas de flecha). Por último, es posible observar un único cilio, en una posición muy superficial de la célula con centriolo perpendicular a su corpúsculo basal (Figura 25E).

El proceso basal es de longitud variable, dependiendo de lo alejados que se encuentren los vasos sanguíneos con los que contactan (Figura 25F). Estos vasos, observados al TEM son fenestrados, por tanto no poseen barrera hematoencefálica. El proceso contiene un denso citoesqueleto formado por microtúbulos (Figura 25F, puntas de flecha blancas) donde se intercalan mitocondrias (Figura 25F, asteriscos), cisternas de REL (Figura 25F, flecha negra), dictiosomas del aparato de Golgi y vesículas de transporte. Los dictiosomas van disminuyendo en número conforme avanzamos hacia el polo basal de la célula.

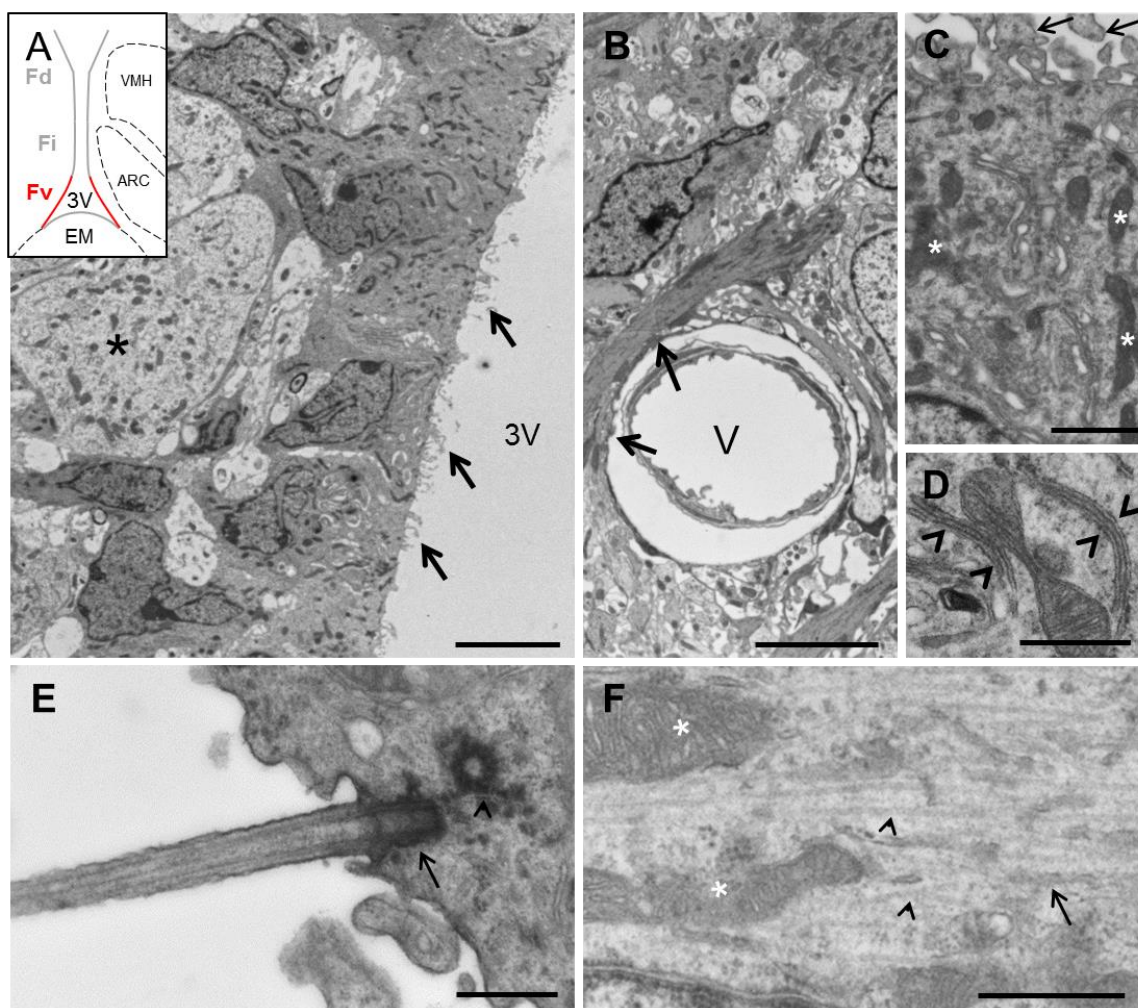


Figura 25. Descripción ultraestructural del tanicito tipo 2. A) Los tanicitos tipo 2 se localizan en la Fv, en rojo en el diagrama inserto, a los que subyace el núcleo ARC. Este tipo forma un epitelio monoestratificado o pseudoestratificado puntualmente, como se puede observar en la fotografía encontrándose tanicitos tipo 2 en segunda fila. Son células cúbicas o alargadas, de contorno irregular y citoplasma muy oscuro. Emiten pequeñas expansiones citoplasmáticas a la cavidad ventricular (flechas). El núcleo es también de contorno irregular, presenta abundantes invaginaciones y cromatina condensada en grandes grumos y adherida a la membrana. Las neuronas del núcleo ARC se localizan habitualmente muy cercanas al epéndimo, obligando a estos tanicitos a desviarse, abriendo espacios en el epéndimo pseudoestratificado. En la fotografía se aprecia un soma neuronal (asterisco) incrustándose entre los tanicitos tipo2, pero en ningún caso llegan a contactar con la cavidad ventricular. B) Detalle del contacto del proceso basal de estos tanicitos con los vasos fenestrados que se localizan cercanos al núcleo ARC (flechas). Estos vasos pertenecen a la *pars tuberalis*, que en los bregmas posteriores del N4, se invaginan sus extremos laterales penetrando hasta dicho núcleo. C) Detalle del citoplasma de un tanicito tipo 2. En ellos abundan grandes dictiosomas del aparato de Golgi y las mitocondrias (asteriscos blancos). Se pueden apreciar en superficie las pequeñas pero abundantes expansiones citoplasmáticas hacia la luz ventricular (flechas). D) Fotografía de grandes aumentos donde se aprecian las dobles cisternas de RER encontradas frecuentemente en este tipo celular. E) Fotografía que muestra el cilio único que presentan estas células. El corpúsculo (flecha) y el centriolo (punta de flecha) son pequeños y con poca materia proteica adherida. F) Detalle del contenido del proceso basal de estas células. Se trata de un proceso basal prominente y especializado en el transporte vesicular. Contiene una red densa de microtúbulos (puntas de flecha), cisternas de REL (flecha) y mitocondrias muy abundantes (asterisco). Además, numerosas vesículas acompañan a las estructuras anteriores. ARC, núcleo arcuato; DMH, núcleo dorsomedial hipotalámico; EM, eminencia media; Fd, franja dorsal; Fi, franja intermedia; Fv, franja ventral; V, vaso sanguíneo; VMH, núcleo ventromedial hipotalámico. Barra de calibración en A y B, 5µm; C, 1µm; D, E y F, 500nm; G, 2µm.

En ocasiones, hemos detectado en la región de la EM un tipo celular de morfología similar al **tanicito tipo 2 (2^{EM})**. Este tipo celular es hallado frecuentemente en el periodo postnatal temprano, en un pequeño porcentaje de los animales adultos jóvenes (P60) estudiados en condiciones habituales de estabulación y en ausencia de estrés, y muy abundante en casos de lesión del núcleo ARC tras administración de glutamato monosódico (tóxico para el núcleo ARC) (datos no publicados laboratorio Prof. Blackshaw) (Figura 24). Destaca la abundancia de ribosomas y polirribosomas, algo mayor que en el tipo 2 común.

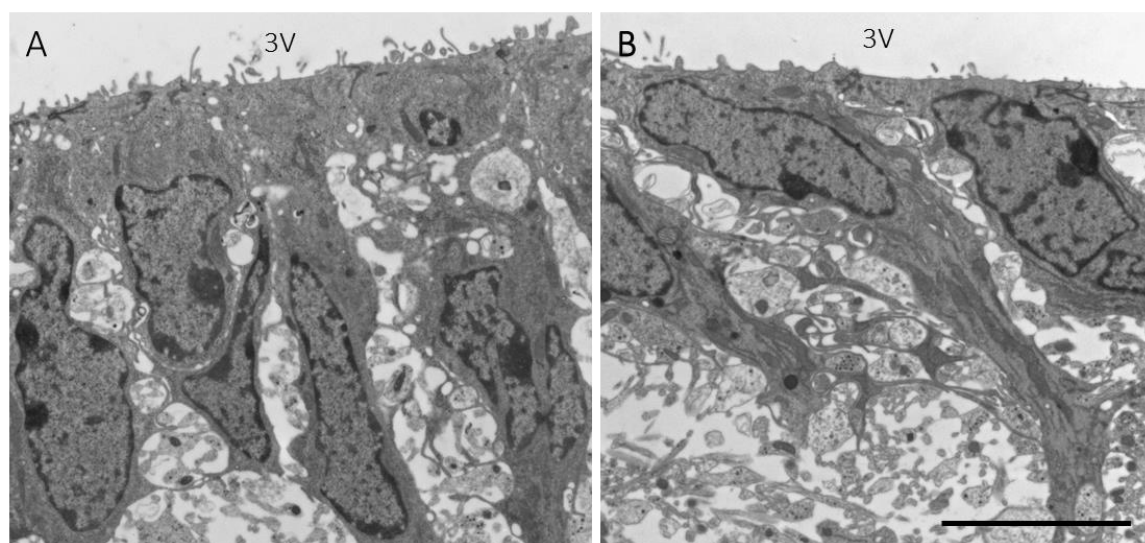


Figura 24. Tanicito tipo 2EM. A) Epéndimo de la EM de un ratón P7, formado por el tanicito tipo 2EM. B) Epéndimo de un ratón P35 que fue tratado con MSG a la edad de P4, formado también por el tanicito tipo 2EM. MSG, glutamato monosódico; 3V, tercer ventrículo. Barra de calibración en A y B, 5µm.

Tanicitos tipo 3 y 4 de las franjas intermedia y dorsal

La franja intermedia está formada por los tanicitos **tipo 3 y 4**, y la dorsal por los tanicitos **tipo 3, 4 y 5**. Por ser los únicos tipos que conforman la franja intermedia, y por su parecido morfológico vamos a describir en primer lugar los **tipos 3 y 4**. El **tipo 5** lo trataremos en el apartado siguiente, pues es exclusivo de la franja dorsal. En la franja intermedia, el **tipo 3** se sitúa predominantemente en la zona ventral, colindante a la franja ventral, y el **tipo 4** es fundamentalmente dorsal, existiendo entre ellos una gradación fenotípica de modo que, los fenotipos más distales son más divergentes, pero en regiones centrales comparten muchas características. Ambos se caracterizan por presentar abundantes microvellosidades. En la franja dorsal, sin embargo se encuentran entremezclados entre ellos y con el **tipo 5**.

Los **tanicitos tipo 3**, son células alargadas de citoplasma oscuro. En superficie muestran largas microvellosidades y escasas expansiones citoplasmáticas. El núcleo es alargado y en determinados casos, estos tanicitos presentan núcleos profundamente invaginados aunque no es la norma. Tienen alto contenido en heterocromatina, aunque ligeramente menor a las células tipo 2, formando grandes grumos y adherida a la membrana nuclear (Figura 26A, asteriscos). Los somas presentan interdigitaciones horizontales, es decir, de trayectoria paralela a la superficie celular, que aumentan en los localizados más dorsalmente. En las interdigitaciones predominan las uniones comunicantes o GAP, uniones especializadas, negativas para el marcaje con anti-ZO1. En ocasiones se observan vesículas intracitoplásmicas rodeadas de uniones GAP, que hemos denominado anillos comunicantes (Figura 26B). Se trata de estructuras en anillo, de 500 nm de diámetro de doble membrana conectadas por uniones GAP, y se corresponden a esferas formadas a partir de plegamientos de membrana citoplasmática que contiene una larga unión GAP, mediados por clatrina (Piehl et al. 2007). Carecen de orgánulos en su interior, observándose únicamente pequeños gránulos. Los anillos se establecen con tanicitos tipo 4 y tipo 5, no entre ellas. Apicalmente presentan uniones densas tipo adherente. También en relación con la comunicación intercelular, estas células presentan vesículas de endocitosis de doble membrana, recubiertas de clatrina (Figura 26C, flechas), mediante las que endocitan pequeñas porciones de citoplasma de las células vecinas.

El citoplasma de estas células es ligeramente menos denso a los electrones, pero con una densidad de orgánulos comparable al tanicito tipo 2. Destacan principalmente los grandes dictiosomas del aparato de Golgi distribuidos por todo el soma (Figura 26D, flechas) que se adentran en el proceso basal. Contienen cisternas de RER de tamaño medio y abundantes polirribosomas distribuidos por el citoplasma,

aunque con mayor prevalencia en el área alrededor del núcleo. El proceso basal de los tanicitos **tipo 3** ventrales está más desarrollado, pero en general, sólo se aprecia el inicio, ya que no cursa paralelo al plano de corte. Cuando es posible observarlo, presenta un entramado formado por gran cantidad de microtúbulos, dictiosomas del aparato de Golgi, mitocondrias y REL destinado al tráfico vesicular. Las mitocondrias presentan aspecto electrodenso con crestas muy empaquetadas, aunque esto va disminuyendo en células más dorsales. Estos tanicitos, disponen de otros elementos implicados en el tráfico vesicular como cuerpos multivesiculares (Figura 26E, flechas negras), vesículas no recubiertas fusionadas en ocasiones con la membrana apical, vesículas de clatrina y endosomas. Los tanicitos tipo 3 son uniciliadas, y ocasionalmente el cilio emitido parte desde gran profundidad de la célula respecto a la cavidad ventricular. Es muy frecuente encontrar estas células formando grupos o parejas intercaladas en la pared ventricular.

El **tanicito tipo 4**, es de morfología casi cúbica, generalmente de mayor diámetro que los tipo 3. Emiten un proceso basal estrecho y ramificado. Superficialmente presentan abundantes microvellosidades y pequeñas expansiones citoplasmáticas. Se encuentran muy interdigitadas, sobretodo mediante interdigitaciones horizontales (Figura 26F, flechas). Las uniones adherentes son cortas y las comunicantes aumentan y, con ellas, los anillos. El núcleo de estas células tiene bordes más redondeados con escasas invaginaciones, cromatina laxa y ocasionales fusiones nucleares (Figura 26F). Presenta un citoplasma más electrolúcido que el anterior con abundantes polirribosomas y un aparato de Golgi apical de tamaño medio (Figura 26G). También es más frecuente observar vesículas de clatrina en la membrana citoplasmática captando porciones de citoplasma de las células vecinas (Figura 26H, flechas). Las mitocondrias, menos abundantes, son pequeñas, claras y de crestas ligeramente dilatadas (Figura 26H, asterisco). El RER está bastante desarrollado con cisternas de gran tamaño, en la periferia del núcleo cercano al proceso basal (Figura 26I, flechas). El citoesqueleto está compuesto por abundantes filamentos intermedios y microtúbulos aislados, a diferencia del tanicito tipo 3 que no presentaba filamentos intermedios o eran muy escasos (Figura 26J). Son células uniciliadas o biciliadas.

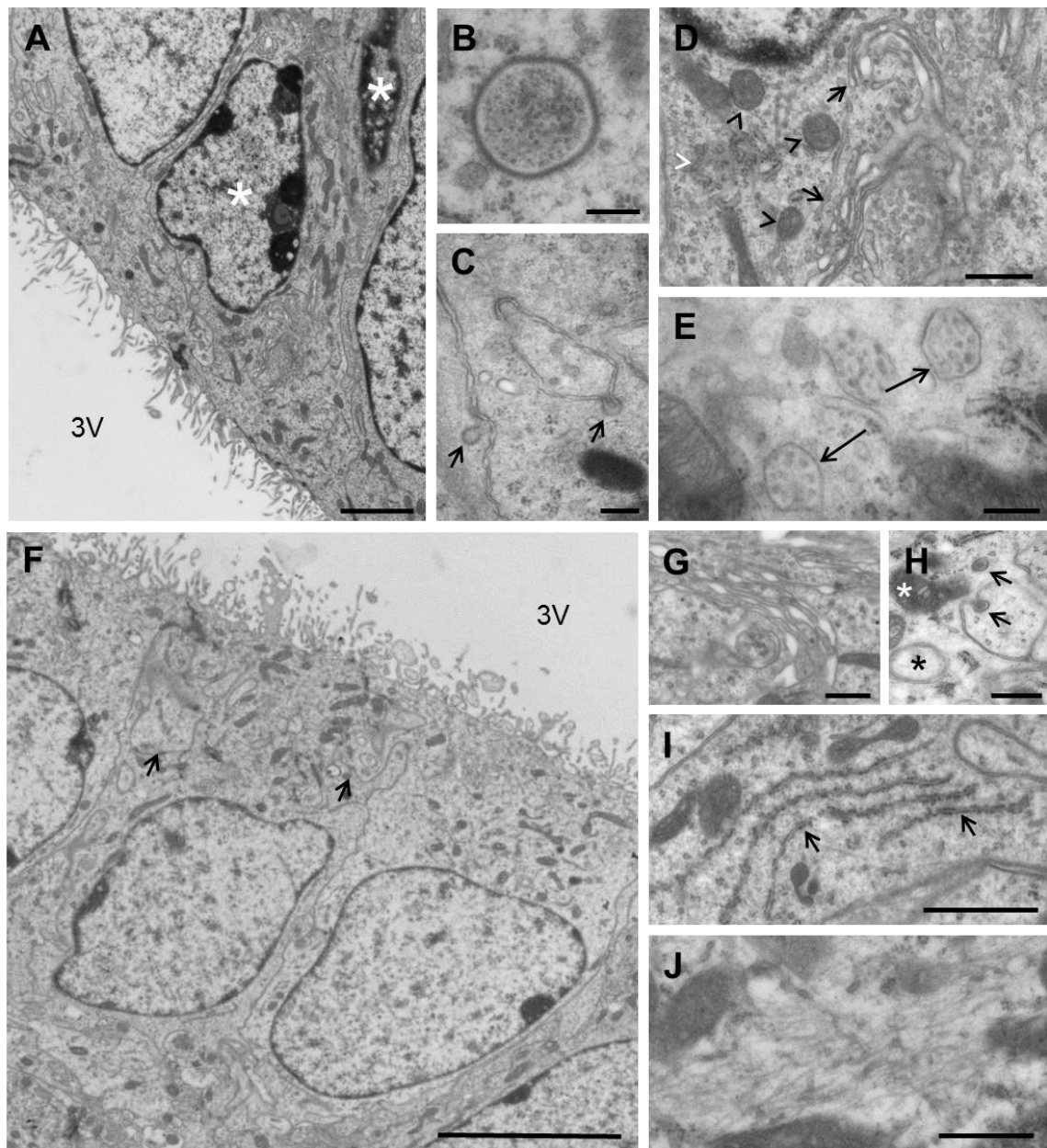


Figura 26. Tanicitos tipo 3 y 4 en la franja intermedia. A) Imagen de pequeños aumentos donde se pueden ver dos tanicitos tipo 3 (asteriscos), uno de ellos, el más alejado de la cavidad ventricular, incipiente pues se ha cortado muy tangencial. Son electrodensos de abundantes mitocondrias y núcleos de contorno irregular con cromatina muy condensada formando grandes grumos. B) Detalle del citoplasma de un tanicito tipo 3 donde se observa un anillo comunicante. C) Fotografía de grandes aumentos donde aparecen varias vesículas de clatrina en la membrana citoplasmática (flechas). Una de ellas contiene parte del citoplasma de las células vecinas. D) Detalles del citoplasma de un tanicito tipo 3. En él se aprecian grandes dictiosomas del aparato de Golgi (flechas), mitocondrias de crestas compactas (puntas de flecha negras), y pequeñas cisternas del RER (puntas de flecha blancas). Son abundantes los polirribosomas y las vesículas desprendidas del aparato de Golgi. E) En este tipo celular es frecuente encontrar cuerpos multivesiculados (flechas). F) Imagen de pequeños aumentos donde se pueden ver tanicitos tipo 4. Son células de morfología cúbica algo alargada, con interdigitaciones horizontales entre ellas (flechas). Emiten microvellosidades abundantes y pequeñas expansiones citoplasmáticas a la luz ventricular. El citoplasma es claro y se aprecian pequeñas mitocondrias. Los núcleos, redondeados y de bordes suaves, contienen cromatina laxa, con pequeños grumos condensados. G) Detalle de dictiosomas del aparato de Golgi, generalmente no muy desarrollados. H) Gran magnificación de una porción de citoplasma del tanicito tipo 4. Se puede ver apreciar más frecuentemente que en las anteriores vesículas de clatrina con contenido citoplasmático de las células vecinas (flechas), anillos comunicantes (asterisco negro). Las mitocondrias de estas células presentan crestas algo dilatadas (asterisco blanco). I) Fotografía donde se observan largas cisternas de RER (flechas). J) Detalle de la red de filamentos intermedios presentes en estas células de forma recuente. 3V, tercer ventrículo. Barra de calibración en A, 2 μ m; B, C y E, 200nm; D, G, y J, 500nm; F,

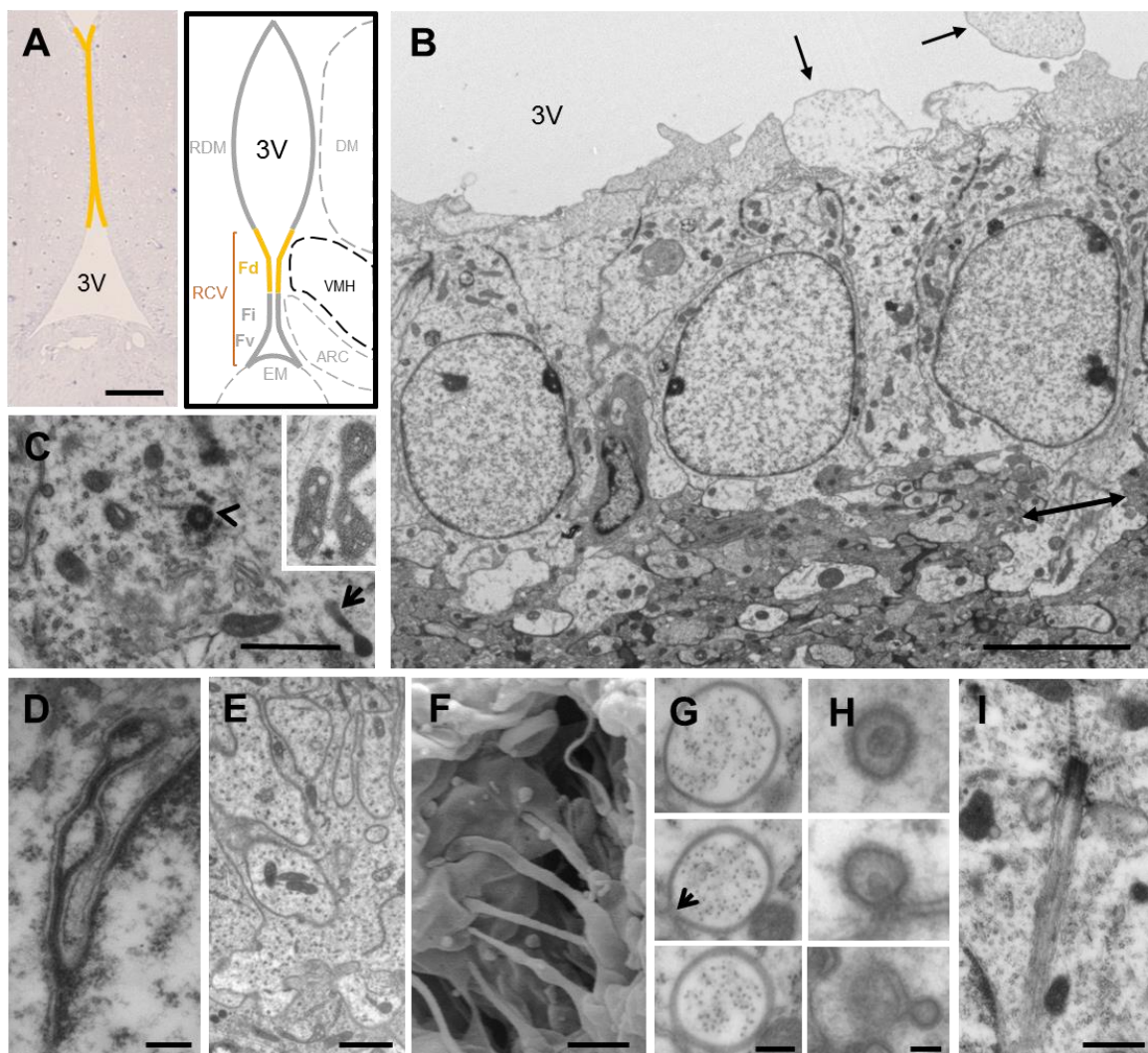
Tanicito tipo 5 o tanicito de la *franja dorsal*

El tanicito tipo 5 se localiza exclusivamente en la franja dorsal (Figura 27A). En la porción ventral forman una agrupación de unas 6 células en un corte transversal, sin embargo, dorsalmente se encuentran entremezcladas con el resto de tipos celulares que coexisten en la franja, léase, los tanicitos tipo 3 y 4 y las células endimarias. Es una célula cúbica con escasas microvellosidades y grandes expansiones citoplasmáticas en superficie (Figura 27B, flechas). Posee núcleo redondeado, con la cromatina más laxa de todos los tipos de tanicitos descritos. Su citoplasma es muy electrolúcido, es decir, muy claro, probablemente porque son células pobres en orgánulos. Es muy frecuente la presencia de pequeños cuerpos densos, sobretodo en la región más apical de la célula. El aparato de Golgi es pequeño y de pocos dictiosomas, generalmente asociado al cilio (Figura 27C). Contienen mitocondrias de pequeño tamaño y crestas dilatadas (Figura 27C). El núcleo de las células es grande y redondeado, de cromatina muy laxa, con escasas y pequeñas condensaciones. Habitualmente presenta pequeñas fusiones nucleares localizadas generalmente muy superficiales, es decir, sin romper la forma redondeada del núcleo (Figura 27D). Esporádicamente, podemos encontrar algún núcleo de este tipo celular profundamente invaginado y fusionado. En estos casos la cromatina se encuentra más condensada, sobre todo en las zonas más estrechas.

Su citoesqueleto, está compuesto fundamentalmente por una red no muy densa de filamentos intermedios, aunque es posible encontrar microtúbulos aislados. Los filamentos intermedios son más abundantes en el proceso basal y asociados a la membrana celular. Las células tipo 5 se encuentran profundamente conectadas a lo largo del soma con interdigitaciones gruesas, redondeadas y orientación horizontal, muy abundantes (Figura 27E). Estas interdigitaciones horizontales también pudimos observarlas al SEM (Figura 27F). En la región apical siempre encontramos uniones adherentes y en las interdigitaciones existen abundantes uniones intercelulares que por su ultraestructura parecerían estrechas, que no se marcan con ZO-1, por lo tanto, de tipo comunicante. Los anillos de uniones comunicantes, son enormemente abundantes en este tipo de tanicito, lo que las diferencia del resto de tanicitos (Figura 27G). También presentan abundantes vesículas de clatrina en la membrana lateral (Figura 27H). Estas células pueden ser uniciliadas, biciliadas (lo más frecuente), y ocasionalmente tetraciliadas. Proyectan un proceso basal grueso al inicio, de trayectoria irregular que se intercala en el neuropilo del núcleo VMH (Figura 27B, flecha de doble punta). Estos procesos son ricos en filamentos intermedios y puede verse entre ellos algún microtúbulo, pero muy escasos. El conjunto de estas expansiones o procesos basales

inicial genera inmediatamente detrás de la pared ventricular una capa rica en expansiones y pobre en células de grosor variable. Es muy frecuente encontrar el cilio proyectado hacia el interior del parénquima en los tunicitos tipo 3, 4 y 5 (Figura 27I). En el límite entre la franja dorsal y la región multiciliada se entremezclan los tunicitos con las células multiciliadas, en la llamada zona de “overlap”.

La **región multiciliada** se compone únicamente de células multiciliadas llamadas células endimarias. Las células endimarias son células cúbicas poco interdigitadas con las células vecinas (Figura 28A). Las interdigitaciones son sobre todo horizontales con uniones comunicantes y por tanto también forman anillos comunicantes (Figura 28B). Apicalmente encontramos uniones adherentes (Figura 28C). Su núcleo, de cromatina condensada en abundantes y pequeños grumos, es redondo y carente de invaginaciones. El citoplasma contiene numerosas mitocondrias en la zona apical y rodeando al núcleo. Anclados a las mitocondrias apicales, se encuentran los procesos basales de los cilios mediante las raicillas ciliares (Figura 28D). También son frecuentes pequeños dictiosomas del aparato de Golgi cerca del núcleo, pequeños cuerpos densos



y grandes gotas lipídicas (Figura 28E). En superficie, la célula presenta abundantes cilios largos y gran cantidad de microvellosidades. Carecen de proceso basal, tienen simplemente una pequeña expansión citoplasmática basal (Figura 28F). La capa hipocelular subyacente a las células endimarias es la continuación a la ya vista en las franjas intermedia y dorsal, pero ésta presenta mayor grosor. Esta capa hipocelular está constituida por las expansiones de células endimarias y astrocitos y, ocasionalmente también de somas astrocitarios. Estos astrocitos llegan a contactar la cavidad ventricular (Figura 28G y H). Las células endimarias cercanas a la franja dorsal presentan un citoplasma más claro y mitocondrias en su región basal. Además, es frecuente que la célula pierda su forma cúbica y presente formas muy irregulares. En regiones más dorsales son cúbicas y presentan un citoplasma más oscuro.

Figura 27. Tanicito de la franja dorsal, el tipo 5. A) Semifino donde las líneas amarillas indican la localización de la franja dorsal, donde se encuentran los tanicitos tipo 5. El diagrama sitúa espacialmente la franja y los núcleos hipotalámicos de referencia. B) Panorámica donde se observan 3 células tipo 5, correspondientes a la porción ventral de la franja dorsal, donde suelen aparecer agrupadas. Son células cúbicas de citoplasma claro pobre en orgánulos y núcleo redondeado de cromatina muy laxa. Emiten grandes expansiones citoplasmáticas, *blebs*, a la luz ventricular (flechas). C) Detalle del citoplasma de un tanicito tipo 5. Es pobre en orgánulos y se pueden distinguir pequeñas mitocondrias, un pequeño aparato de Golgi cerca del aparato ciliar (punta de flecha), cuerpos densos (flecha) y polirribosomas dispersos. Se puede apreciar en la membrana de la izquierda una vesícula de clatrina captando un pedazo de la célula vecina. En el inserto arriba a la derecha, se muestran dos mitocondrias de crestas dilatadas, típicas de este tipo celular. D) Detalle de una “fusión nuclear”, muy superficiales en este tipo celular. E) En la imagen se muestra una pequeña porción de citoplasma de un tanicito tipo 5 repleto de invaginaciones horizontales. F) Invaginaciones laterales observadas al SEM. G) Reconstrucción de un anillo comunicante que muestra que está unida a la membrana (flecha). Todos los reconstruidos mostraban esa unión. También nos permitió averiguar el diámetro medio de estas “esferas”, 500nm. H) Reconstrucción de una vesícula de clatrina en la membrana celular. Al reconstruirla determinamos que el diámetro medio es de 90nm. I) Detalle de un cilio internalizado en el citoplasma. En este caso corresponde a un tanicito tipo 5. 3V, tercer ventrículo; RDM, región dorsal multiciliada; RCV, región caudoventral no multiciliada; EM, eminencia media; Fd, franja dorsal; Fi, franja intermedia; Fv, franja ventral; DMH, núcleo hipotalámico dorsal; VMH, núcleo ventromedial hipotalámico; ARC, núcleo arcuato. Barra de calibración en A, 200µm; B, 5µm, C, E y F, 1µm; D y G 200nm; H, 100nm; I, 500nm.

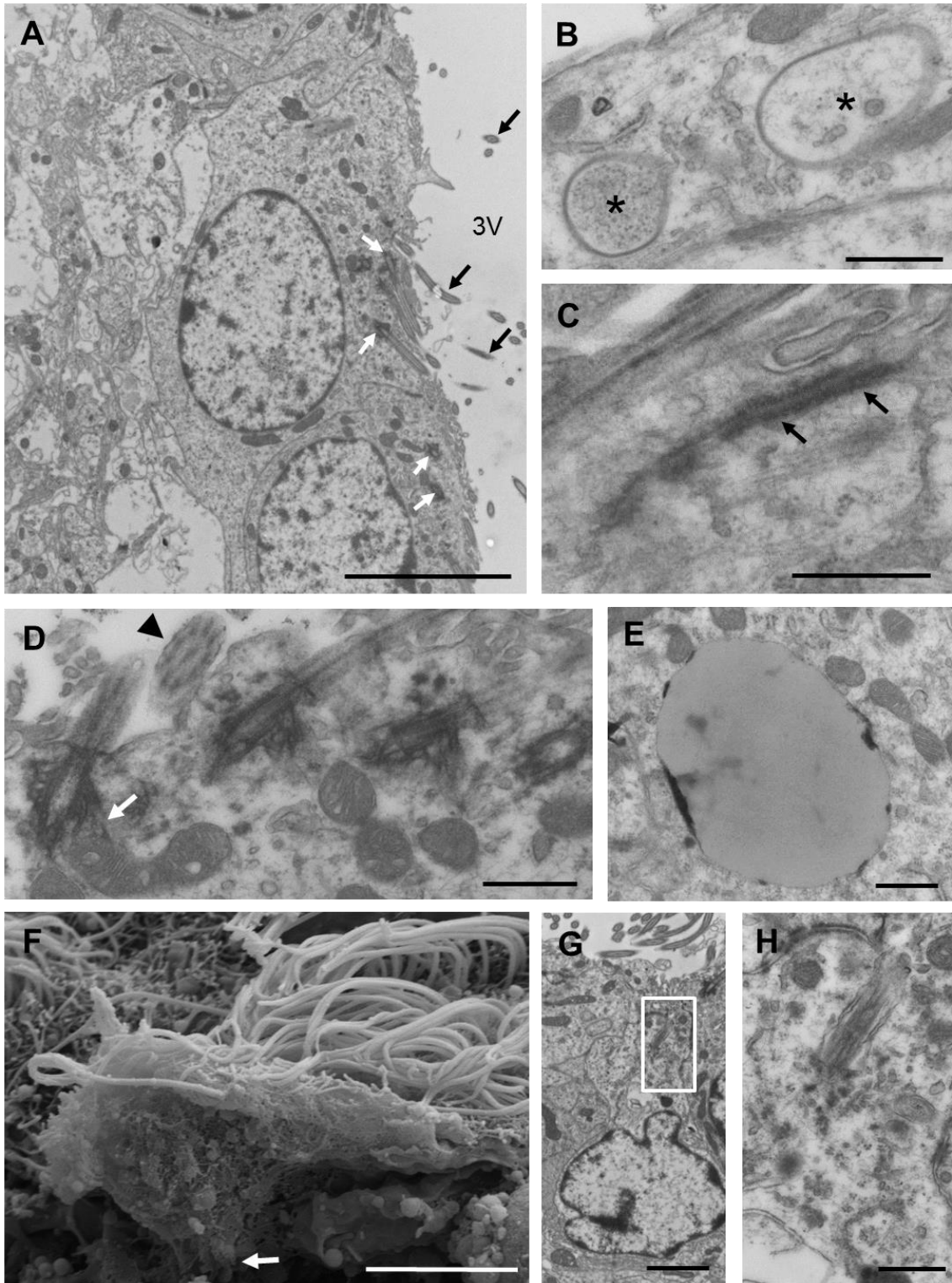


Figura 28. Descripción ultraestructural de la región dorsal multiciliada. A) Imagen del epéndimo multiciliado que conforma la pared de la RDM. Las células multiciliadas son cúbicas, de núcleo redondeado y cromatina laxa con pequeños grumos muchos adheridos a la membrana nuclear. Se observan partículas electrodensas acumuladas apicalmente que corresponden a mitocondrias y los corpúsculos basales de los cilios (flechas blancas). Se aprecian los cilios en la luz ventricular (flechas negras). B) Anillos comunicantes encontrados también en las células multiciliadas (asteriscos). C) Imagen de grandes aumentos de una unión densa, localizadas apicalmente en este tipo celular. D) Corpúsculos basales de una célula ependimaria donde se aprecia la íntima relación entre éstos y las mitocondrias (flecha) localizadas en la porción apical de la célula. Los cilios son de estructura 9+2 (puna de flecha) y están orientados todos en una misma dirección. E) Detalle de una gota lipídica, muy frecuentes en este tipo celular. F) Vista lateral de una célula ependimaria al SEM, fácilmente reconocibles por el abundante número de cilios que muestran en superficie. Se observa la morfología aplanada que adquieren estas células en las porciones más dorsales. Carecen de proceso basal, únicamente presentan una corta y delgada expansión hacia el parénquima (flecha) que forma parte de la capa hipocelular subyacente al epéndimo. G) Astrocito subependimario. En la RDM del N4 los astrocitos subependimarios se intercalan entre las células ependimarias. Presentan un citoplasma claro y un núcleo de cromatina condensada en escasos grandes grumos y adherida a la membrana nuclear. Se encuentra frecuentemente invaginado. H) Estos astrocitos llegan a contactar con la cavidad ventricular con una pequeña superficie por donde sale el único cilio que presentan. Mantiene uniones densas con las células ependimarias. 3V, tercer ventrículo. Barra de calibración en A y F, 5µm; B, 1µm; C, D, E y H, 500nm; G, 2µm.

4.1.1.1 Reconstrucción tridimensional del 3V

Tras la descripción exhaustiva y el establecimiento de criterios ultraestructurales para diferenciar los tipos de tanicitos, nos dimos cuenta que era necesario estudiar en mayor detalle la estructura y disposición de los cilios y sus corpúsculos basales. De hecho, pudimos observar que distintos tipos de tanicitos presentaban aparatos ciliares de características particulares.

Se han descrito en la literatura tres tipos de células “ependimarias” en función del número de cilios y los corpúsculos basales asociados. En el 3V encontramos estos tres tipos celulares y hemos realizado un estudio tridimensional del que se extraen las siguientes descripciones:

El tipo E1 está compuesto por numerosos cilios de estructura 9+2, sin asociar centriolos y cuyos corpúsculos basales se encuentran muy desarrollados. Mediante raicillas ciliares que parten de la base de los corpúsculos basales, se anclan a mitocondrias del polo apical de la célula. (Figura 29). Este tipo celular es el que comúnmente denominamos célula ependimaria, y que en el 3V corresponde a la región multiciliada dorsal.

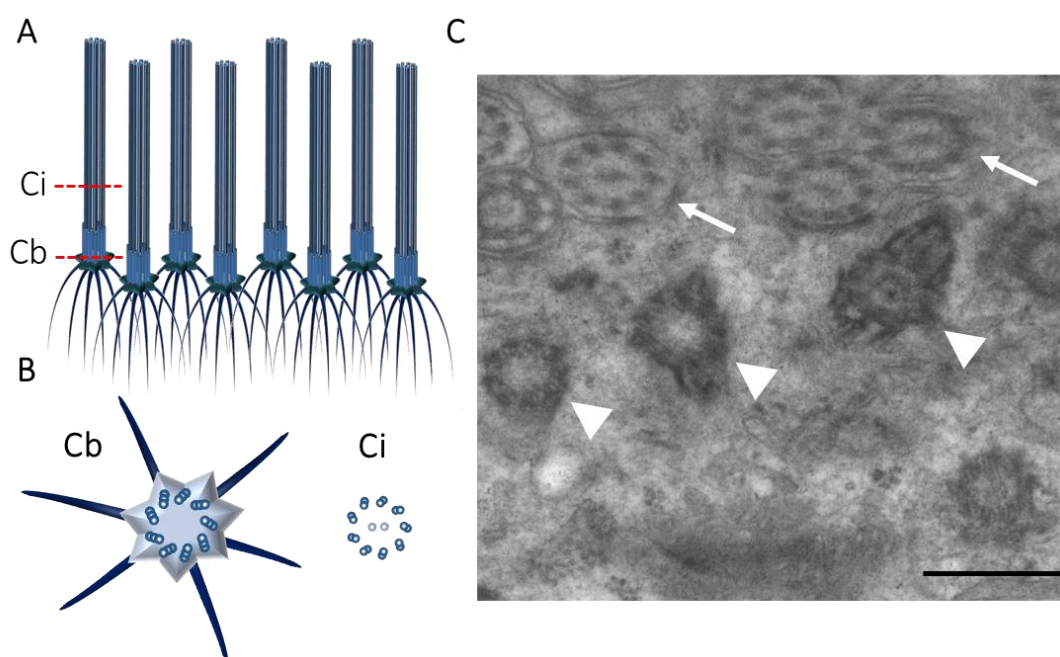


Figura 29. Aparato ciliar tipo E1. A) Diagrama tridimensional representativo del aparato ciliar E1. Está formado por múltiples cilios. Cada uno de ellos se compone de un corpúsculo basal con raicillas del que parte un cilio 9+2. B) Vista en planta de cada una de las estructuras que componen el aparato ciliar. El corpúsculo basal está compuesto por las raicillas ciliares, proteínas asociadas a la base del corpúsculo basal a modo de apéndices radiales y 9 tripletes de microtúbulos que forman un corto cilindro. El cilio está formado por 9 pares de microtúbulos que forman un cilindro y un par central (9+2). C) Detalle al TEM de varios cilios cortados transversalmente (flechas) y varios corpúsculos basales también seccionados transversalmente (puntas de flecha). Los cilios presentan una estructura 9+2. Ci, cilio; Cb, corpúsculo basal. Barra de calibración en C, 500nm.

El tipo E2 presenta dos corpúsculos basales también muy desarrollados y rodeados de una densa estructura proteica. Si sólo nace un cilio a partir de uno de los corpúsculos estamos ante una célula que se ha denominado tipo E2-1. El cilio suele ser largo y de estructura 9+2. El segundo corpúsculo basal, sin cilio, se encuentra alejado, generalmente muy próximo al núcleo. Ambos presentan raicillas ciliares en uno de los extremos (Figura 30). En alguna ocasión el corpúsculo basal sin cilio se localiza muy cerca y asociado estrechamente al corpúsculo basal asociado a cilio asemejándose a un diplosoma. En el 3V estas estructuras se han visto en los tanicitos tipo 1, 3, 4 y 5.

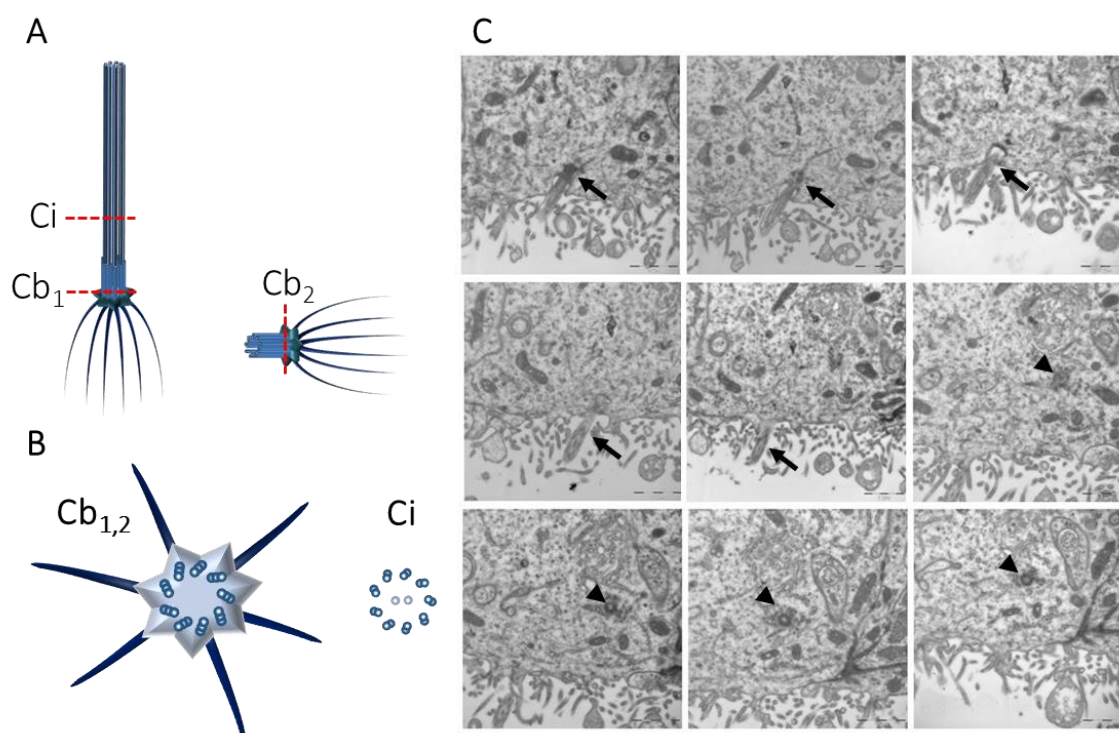


Figura 30. Aparato ciliar tipo E2-1. A) Diagrama tridimensional representativo del aparato ciliar E2-1. Se compone de un corpúsculo basal con raicillas del que parte un cilio 9+2. Generalmente alejado del cilio, presenta otro corpúsculo basal carente de cilio. B) Vista en planta de cada una de las estructuras que componen el aparato ciliar. El corpúsculo basal está compuesto por las raicillas ciliares, proteínas asociadas a la base del corpúsculo basal a modo de apéndices radiales y 9 tripletes de microtúbulos que forman un corto cilindro, y es igual para ambos corpúsculos basales. El cilio está formado por 9 pares de microtúbulos que forman un cilindro y un par central (9+2). C) Reconstrucción al TEM de una célula E2-1, donde podemos seguir la evolución del cilio con su corpúsculo basal (flecha) y el corpúsculo basal sin cilio (punta de flecha). Desde la segunda fotografía podemos apreciar la estructura 9+2 del cilio. Ci, cilio; Cb1, corpúsculo basal con cilio; Cb2, Corpúsculo basal sin cilio.

Si nacen dos cilios de ambos corpúsculos basales, la célula se denomina E2-2, es una célula biciliada. Presentan dos corpúsculos basales idénticos a los del tipo E2-1, pero en este caso de ambos parte dos largos cilios de estructura 9+2. La célula E2 carece de centriolo (Figura 31). Este tipo celular está representado en su mayor parte por el tanicito tipo 5 y muy puntualmente en el tanicito tipo 4 dorsal.

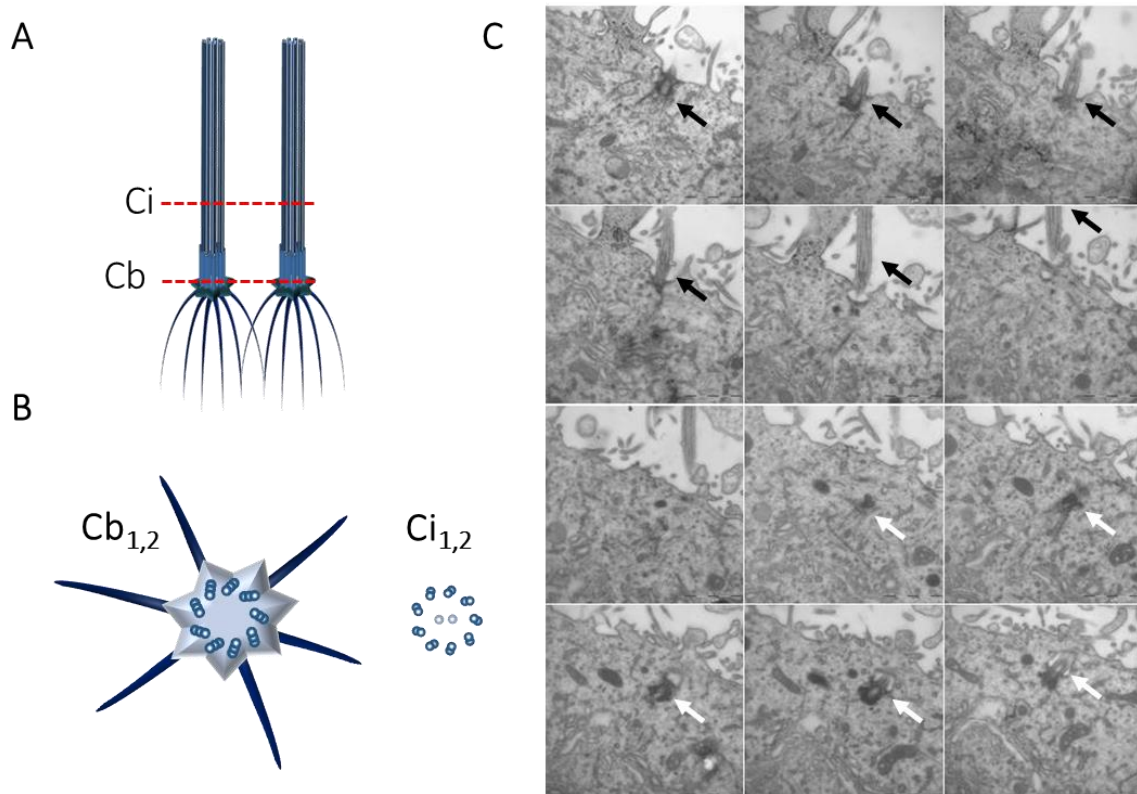


Figura 31. Aparato ciliar tipo E2-2. A) Diagrama tridimensional representativo del aparato ciliar E2-2. Se compone de dos cilios con sus corpúsculos basales del que parten las raicillas ciliares. B) Vista en planta de cada una de las estructuras que componen el aparato ciliar. El corpúsculo basal está compuesto por las raicillas ciliares, proteínas asociadas a la base del corpúsculo basal a modo de apéndices radiales y 9 tripletes de microtúbulos que forman un corto cilindro, y es igual para ambos cilios. El cilio está formado por 9 pares de microtúbulos que forman un cilindro y un par central (9+2). C) Reconstrucción al TEM de una célula E2-2, donde podemos seguir la evolución de ambos cilios (flechas negra y blanca), muy próximos el uno del otro. En la tercera fotografía podemos apreciar la estructura 9+2 de uno de los cilios. Ci1, primer cilio; Ci2, segundo cilio; Cb1, corpúsculo basal del primer cilio; Cb2, corpúsculo basal del segundo cilio.

Finalmente, existe un tercer tipo de célula “ependimaria”, el tipo E3, formado por un único cilio corto de estructura 9+0 asociado a un centriolo perpendicular al corpúsculo basal. Centriolo y corpúsculo se encuentran menos desarrollados que los tipos anteriores, y raicillas ciliares muy pobres (Figura 32). Este tipo celular se encuentra representado en el 3V por los tanicitos tipo 2 y 2^{EM}.

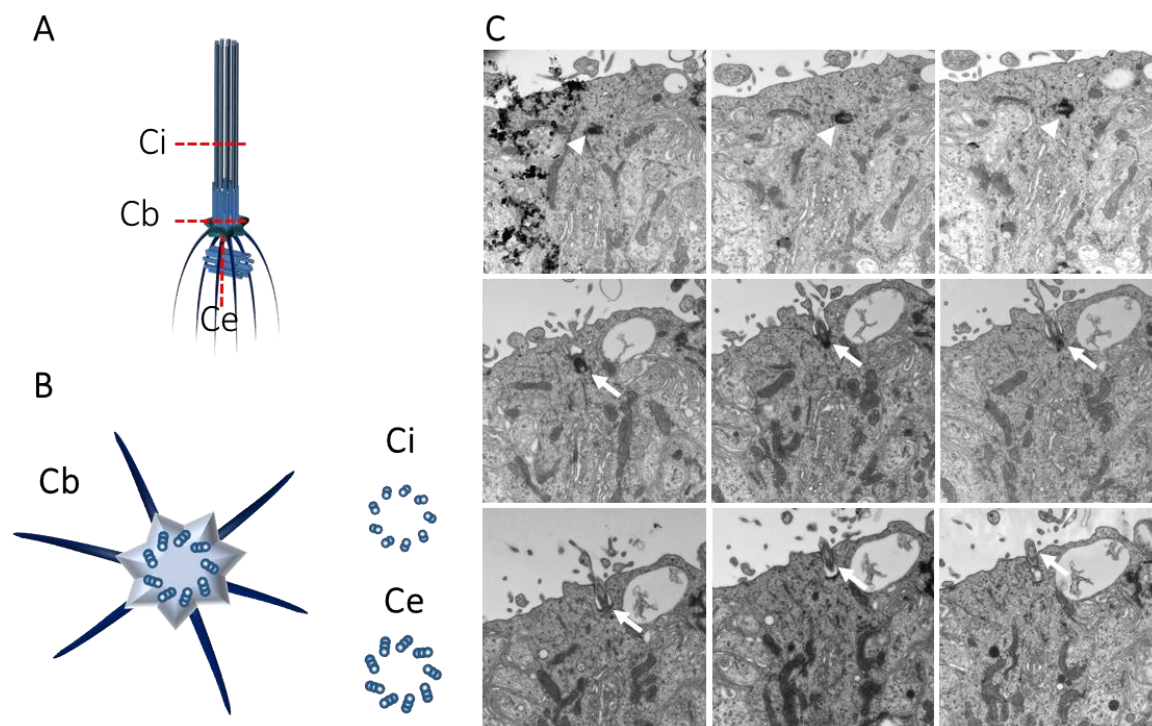


Figura 32. Aparato ciliar tipo E3. A) Diagrama tridimensional representativo del aparato ciliar E3. Se compone de un corpúsculo basal con raicillas del que parte un cilio 9+0. En la base y perpendicular al corpúsculo basal se encuentra el centriolo. B) Vista en planta de cada una de las estructuras que componen el aparato ciliar. El corpúsculo basal está compuesto por las raicillas ciliares, proteínas asociadas a la base del corpúsculo basal a modo de apéndices radiales y 9 tripletes de microtúbulos que forman un corto cilindro. El cilio está formado por 9 pares de microtúbulos que forman un cilindro (9+0). Por último, el centriolo, carente de raicillas y apéndices, es una estructura cilíndrica también de 9 tripletes de microtúbulos. C) Reconstrucción al TEM de una célula E3, donde se puede seguir la evolución del centriolo (punta de flecha) y el cilio (flecha). Nótese la estructura más pobre en proteínas del centriolo, comparado con los corpúsculos basales sin cilio de las tipo E2-1. En la última fotografía podemos apreciar la estructura 9+0 del cilio. Ci, cilio; Cb, corpúsculo basal; Ce, centriolo.

La técnica de “en face” consiste en realizar secciones paralelas a la superficie del 3V, profundizando desde los cilios hacia el citoplasma. Nos permitió establecer la relación entre los tanicitos de la RCV y analizar en mayor profundidad las estructuras ciliares. Observamos la gran interdigitación existente entre las células, formando mediante invaginaciones de membrana estructuras en “pétalos de flor” (Figura 33A). Es posible en ocasiones encontrar los corpúsculos basales de la célula tipo E2 (Figura 33B).

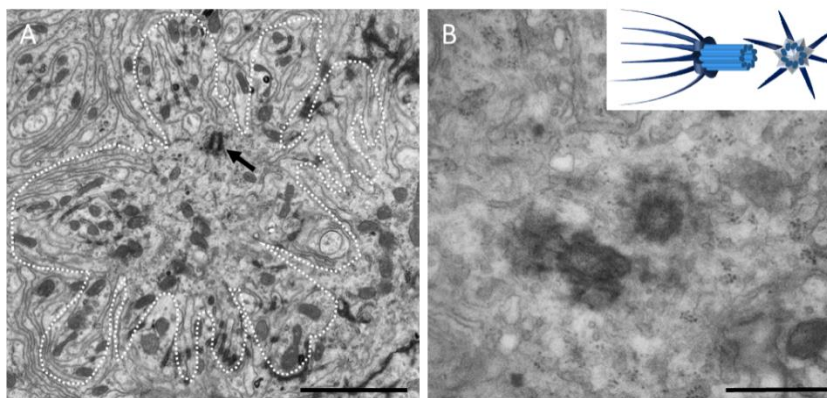


Figura 33. “En face”. A) Visión de un tanicito de la pared del 3V en una sección paralela a la superficie, en “en face”. Se aprecian las profundas interdigitaciones horizontales con las células vecinas que le dan un aspecto de “pétalos de flor”. Se observa un corpúsculo basal algo excéntrico (flecha). B) Detalle de un aparato ciliar seccionado en “en face”. En él podemos observar dos corpúsculos basales ricos en proteínas adheridas. Se trata de una célula E2, sin especificar entre E2-2 o E2-1 puesto que no sabemos si de ambos parte un cilio o solamente de uno de los dos. Cabe destacar que se disponen uno perpendicular al otro, por lo que podría decirse que se trata de una E2-1. El diagrama inserto arriba a la derecha, muestra la disposición del cilio con su corpúsculo basal y el corpúsculo basal en perpendicular de las células E2-1 visto en planta, al igual que la sección en “en face”. Barra de calibración en A, 2 μ m; en B, 500 nm.

Eminencia media

La EM merece una mención aparte ya que es una región de comunicación neuroendocrina implicada en la función hipotalámica, y puede aportarnos información sobre el rol de los tanicitos en esta comunicación. Por ello estudiamos su ultraestructura, muy heterogénea en cuanto a tipos celulares y diana de numerosas expansiones. El parénquima está formado principalmente por las prolongaciones de los tanicitos, axones de neuronas del núcleo ARC y algunos pequeños vasos sanguíneos. Entre los escasos somas se encuentran oligodendrocitos, neuronas maduras, y células oscuras que no hemos podido identificar. Son células electrodensas, pequeñas y estrelladas. Su núcleo es pequeño, invaginado y de cromatina muy condensada (Figura 34A). Presentan gruesas mitocondrias (Figura 34B, asterisco), abundantes filamentos intermedios que se distribuyen en forma de paquetes densos (Figura 34C) y acúmulos de grumos de glucógeno (Figura 34D). Las expansiones llegan a ser muy finas, de 60nm de diámetro, pero presentan ensanchamientos que contienen lisosomas (Figura 34E), gránulos de glucógeno y grandes mitocondrias. Rodean axones (Figura 34F), sinapsis (Figura 34, flechas) y somas neuronales (Figura 34H). Mediante inmuno-oro anti-GFAP algunas de estas expansiones se marcaban con oro, pero no todas las células presentaban inmunopositividad a GFAP (Figura 34F).

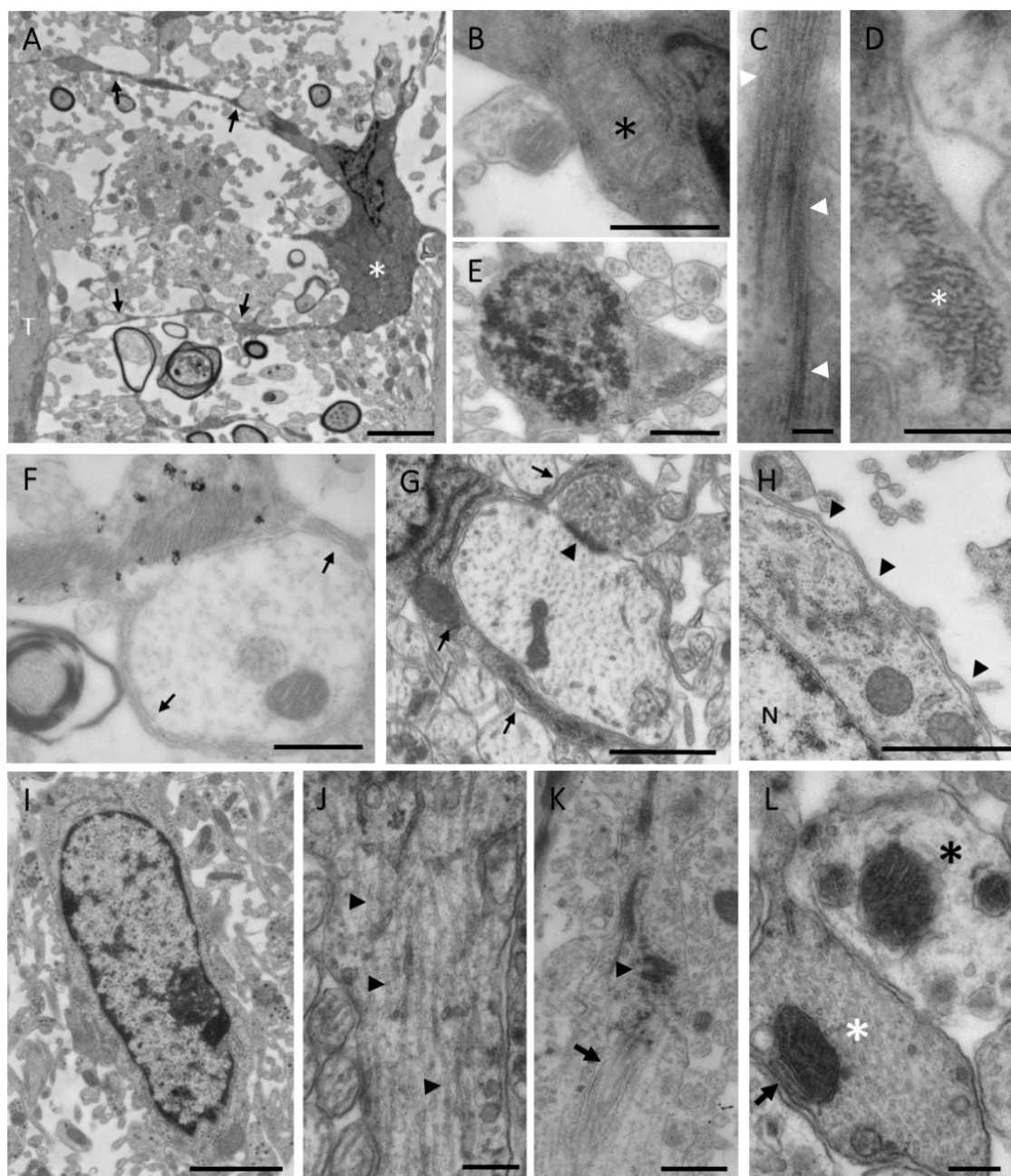


Figura 34. Ultraestructura de la EM. A) Astrocito característico de la EM (asterisco) que contacta mediante dos finas expansiones con un proceso basal de tanicito (T). Presenta un pequeño núcleo de cromatina muy condensada. B) Las mitocondrias de estas células (asterisco) son de gran tamaño y crestas dispuestas en paralelo. C) El citoplasma y las expansiones citoplasmáticas contienen densos paquetes de filamentos intermedios (puntas de flecha). D) Estos astrocitos presentan acúmulos de gránulos de glucógeno (asterisco). E) Lisosoma, de contenido heterogéneo, localizado en una expansión citoplasmática de estas células. F) Estas células presentan marcaje con oro coloidal de la proteína GFAP. En la imagen, la fina expansión que parte del citoplasma GFAP+ (flechas) rodea un axón neuronal. G) Estas expansiones (flechas) rodean las sinapsis (punta de flecha) de la EM (flechas). H) Las expansiones de los astrocitos rodean los somas neuronales (puntas de flecha). I) Soma de una célula indeterminada de la EM. Son células alargadas con núcleos ovalados de cromatina condensada en grumos libres y adherida a la membrana. J) Expansión citoplasmática en su porción proximal de una célula indeterminada, los cuales contienen una densa red de microtúbulos (puntas de flecha). K) Aparato ciliar tipo E2-1 en las células indeterminadas, generalmente orientado hacia la base de la EM (flecha). Dos expansiones en sección transversal, siendo una el proceso basal de un cilio (asterisco blanco), con una densa trama de microtúbulos, y un axón (asterisco negro) donde la densidad de microtúbulos es mucho menor, lo que lo hace más electrolúcido. Ambos contienen mitocondrias, situadas habitualmente en la periferia en el caso de los procesos basales (flecha). EM, eminencia media; N, soma neuronal; T, proceso basal de tanicito. Barra de calibración en A e I, 2 μ m; B, E, F y K, 500 nm; C, 100 nm; D, J y L, 200 nm; G y H 1 μ m.

Entre los procesos basales de los tanicitos y los axones de la neuronas de los núcleos hipotalámicos encontramos otro tipo celular que hemos “denominado células indeterminadas” por no poder determinar a qué tipo celular se corresponden. Contienen un núcleo ovalado, en ocasiones invaginado y con cromatina condensada en la envoltura nuclear (Figura 34I). Se caracteriza por contener abundantes ribosomas libres, cisternas de RER, aparato de Golgi y abundantes microtúbulos dispuestos de forma organizada (Figura 34J). Presentan además estructura ciliar de célula tipo E2 con raicillas y prominentes corpúsculos basales (Figura 34K). Este tipo celular es casi indistinguible del tanicito tipo 1, a excepción de su localización parenquimal. Curiosamente, estas células resultaron ser células que expresaban vimentina (Figura 35).

Es relativamente fácil distinguir entre las expansiones de origen neuronal y las de tanicitos, pues a pesar de que ambas contienen microtúbulos, en los tanicitos son mucho más numerosos y densamente empaquetados, siendo la expansión más oscura (Figura 34L, asterisco blanco) y la más clara, un axón (Figura 34L, asterisco negro).

La base está compuesta por vasos sanguíneos fenestrados, carentes de barrera hematoencefálica, sobre el *sistema porta (pars tuberalis)* de la hipófisis. Estos vasos sanguíneos están rodeados por dos láminas basales entre las cuales se sitúa el espacio perivascular. Sobre la lámina más externa contactan los pies de tanicitos y terminales axónicas tapizándolos por completo. Las láminas basales contienen fibras de colágeno. En los niveles más posteriores incluso subyacen a la pared ventricular.

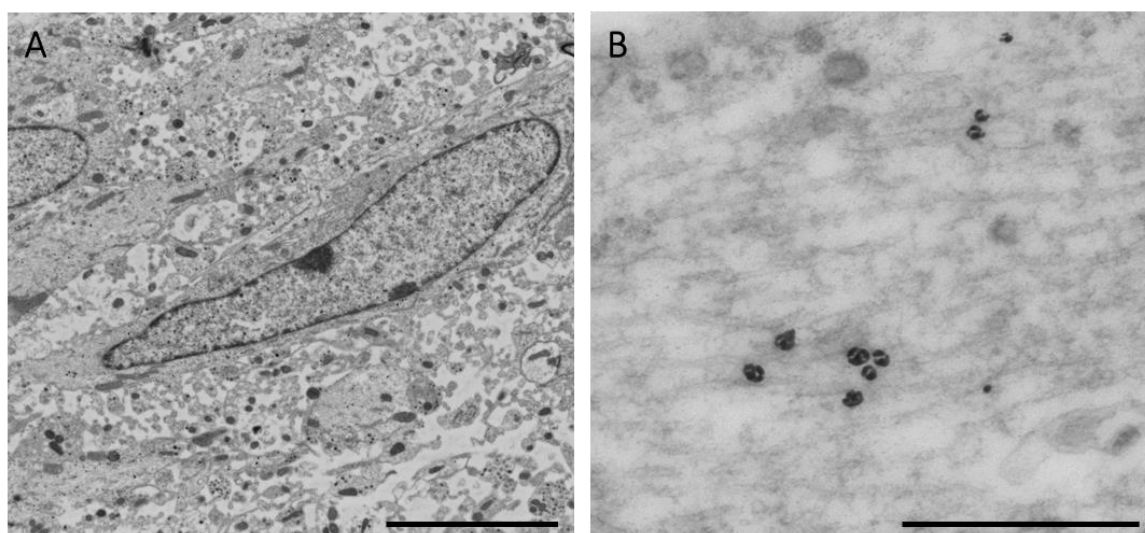


Figura 35. Célula indeterminada vimentina+. Inmudetección de vimentina con oro coloidal en el que se refleja que las células indeterminadas de la EM expresan vimentina. Barra de calibración en A, 5 μ m y B, 500nm.

4.1.3 Otros niveles

Tras haber analizado en profundidad el N4 y haber establecido los tipos celulares, estudiamos el resto de la cavidad ventricular al microscopio óptico y al microscopio electrónico, tanto de barrido como de transmisión.

En el primer nivel, N1 (Bregma -0,3), encontramos células endimarias en la porción dorsal e intermedia y células similares a tanicitos tipo 3 o tipo 4 y a tanicitos tipo 5 en la porción ventral. Las similares al tipo 5 son de citoplasma claro, como las encontradas en el N4, pero en este caso las uniones GAP son muy escasas. Estas células ventrales presentan un proceso basal ramificado y en dirección perpendicular al plano de corte, por lo que no se aprecia la longitud de los mismos. El N2 (Brg -0,5) se encuentra tapizado por células endimarias. Aunque esporádicamente puede aparecer alguna célula uniciliada aislada. En esta región abundan los axones supraependimarios como vimos en la descripción al SEM de la pared del 3V. En N3 (Bregma -1), la pared está formada principalmente por células endimarias, sin embargo, ventralmente se sitúa el inicio de la RCV, que continuará en el N4. Aparece un pequeño grupo de alrededor de 10 células no multiciliadas claras (tipo 5), y oscuras (tipo 3), apareciendo algunas intermedias, correspondientes a los tipo 4; todas de forma más o menos alargada y con proceso basal. Las claras son de mayor tamaño, de núcleo redondeado y escasas invaginaciones. En este nivel si presentan uniones GAP e incluso anillos comunicantes. Las oscuras son más estrechas y de contorno irregular. El núcleo invaginado y de cromatina condensada. Dado que el presente trabajo se centra en la descripción del N4 (Bregma -1,70 a -2,3), aquí simplemente nombraremos los tipos encontrados, dado que ya fue descrito profundamente. Lo componen, dorsalmente, células multiciliadas, correspondientes a la RDM. Ventralmente lo componen tanicitos tipo 1, 2, 3, 4 y 5, correspondientes a la RCV. En el N5 (Bregma -2,5) encontramos la distribución opuesta al N3. Se encuentra tapizado principalmente por células no multiciliadas, que forman parte del extremo caudal de la RCV; y dorsalmente aparece un pequeño grupo de células endimarias. Las células no multiciliadas corresponden a los tanicitos tipo 3, tipo 4 y tipo 5, pero en este caso se encuentran extremadamente interdigitadas formando un epéndimo pseudoestratificado. En la figura indicamos la distribución de los diferentes tipos celulares a lo largo del 3V (Figura 36).

	N1		N2		N3		N4		N5	
Porción dorsal	RDM	Epend.	RDM	Epend.	RDM	Epend.	RDM	Epend.	RDM	Epend.
Porción Intermedia							RCV	T1,T2,T3,T4,T5	RCV	T3,T4,T5
Porción ventral	RRV	T3, T4, T5	RCV (inicio)	T3, T4, T5	RCV	T3,T4,T5				

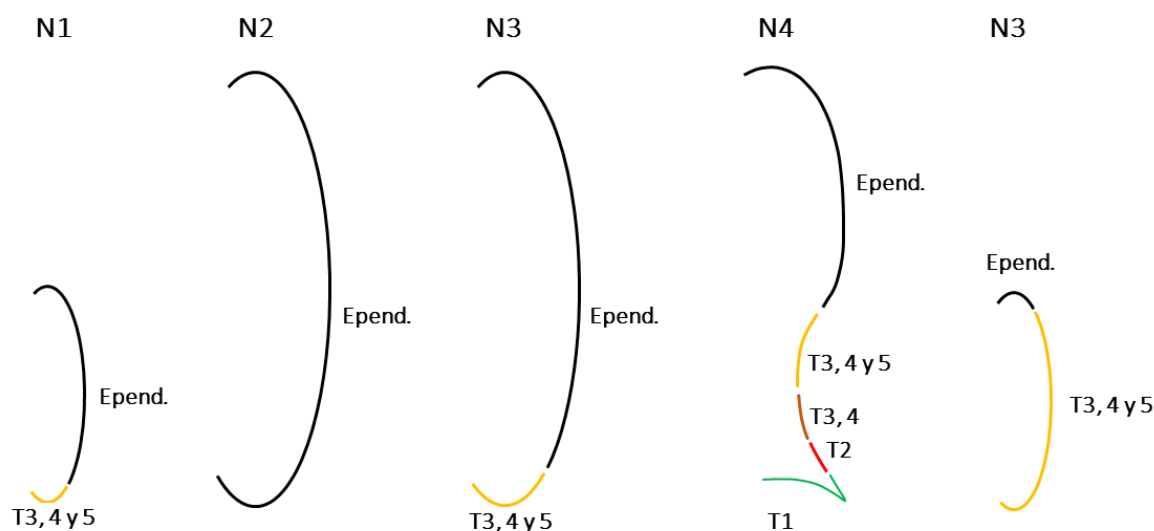


Figura 36. Distribución celular en los diferentes niveles establecidos en el 3V. En la tabla se indica las divisiones por regiones de cada nivel, RDM, RRV y RCV, la localización de las mismas en el eje dorsoventral; porción dorsal, intermedia y ventral; y los tipos celulares que encontramos en las distintas regiones de cada nivel. Los diagramas muestran gráficamente dicha información, representando secciones transversales de los 5 niveles estudiados. N1) (Bregma -0,3). Aquí encontramos células endoteliales en la porción dorsal e intermedia, y células similares a tanicitos T3 o T4, y a tanicitos tipo T5 en la porción ventral. N2) (Brg -0,5) La pared esta tapizada por células endoteliales con alguna célula uniciliada aislada intercalada. N3) (Bregma -1). A este nivel, la pared está formada principalmente por células endoteliales pero ventralmente contiene un pequeño grupo de alrededor de 10 células no multiciliadas T3, T4 y T5, correspondiente al inicio de la RCV. N4) (Bregma -1,70 a -2,3) formado por células multiciliadas dorsalmente (RDM), y los cinco tipos de tanicitos, T1, T2, T3, T4 y T5. N5) (Bregma -2,5). Está tapizado principalmente por tanicitos T3, T4 y T5 (extremo de la RCV). Dorsalmente aparece un pequeño grupo de células endoteliales. RDM, región dorsal multiciliada; RRV, región rostroventral no multiciliada; RCV, región caudoventral no multiciliada; N1, N2, N3, N4 y N5, nivel 1, 2, 3, 4 y 5; T1, tanicito tipo1; T2, tanicito tipo2; T3, tanicito tipo3; T4, tanicito tipo4 y T5, tanicito tipo5.

4.2 Caracterización molecular de los tanicitos

4.2.1 Inmunofluorescencia

En paralelo a la descripción ultraestructural, se realizó el estudio molecular del nivel 4 con diversos marcadores de glía, ya que el tanicito es una célula a la que se ha relacionado con la glía radial. Posteriormente, realizamos una correlación de los morfotipos ultraestructurales con los distintos marcadores detectados.

Nestina

La nestina es un filamento intermedio característico de células madre o progenitoras del SNC (Dahlstrand et al. 1995; Kálmán & Ajtai 2001; Lendahl et al. 1990; Morshead et al. 1994). Las células endimarias no se marcan con anticuerpos anti-nestina. En cambio, en la RCV sí que existe marcaje aunque heterogéneo (Figura 37A). La franja dorsal, en la zona de “overlap” presenta alternancia en el marcaje con tanicitos positivos (con proceso basal marcado) intercalados con células negativas. La franja intermedia se marca de forma más generalizada (Figura 37B). Curiosamente, en todos los animales estudiados, la franja ventral resultó negativa o muy débilmente marcada (Figura 37C, puntas de flecha). La EM se marca en su mayoría pero existen espacios sin inmunomarcaje, que podría indicar la existencia de células negativas. Esto no lo podemos confirmar con esta técnica, pues en esos espacios, aparece marcaje flanqueándolo y no podemos determinar si pertenece a ella o a células vecinas positivas. (Figura 37D y E, puntas de flecha).

GFAP

La proteína GFAP (del inglés *Glial Fibrillary Astrocytic Protein*) es un filamento intermedio característico de los astrocitos. Es un marcador que está presente en la célula madre neural adulta de la SVZ. En el 3V, el inmunomarcaje contra GFAP muestra invariablemente positividad en una agrupación celular bien delimitada dentro de la franja dorsal, en su porción ventral (Figura 37F y G, puntas de flecha). Aquí, las células que expresan GFAP lanzan un proceso basal en dirección dorsal, nunca en trayectoria ventral. En la franja intermedia hay células aisladas que expresan GFAP, y en la EM también existen aunque son muy escasas (Figura 37H, punta de flecha). Es decir, no todos los tanicitos expresan GFAP. El parénquima de la EM muestra somas de aspecto estrellado (Figura 37H, flecha) y una densa red de expansiones GFAP positivas. En el “overlap” el marcaje es denso, intercalado con células negativas, atribuibles a las células endimarias (Figura 37I). Por último, en la región multiciliada existe gran cantidad de astrocitos subependimarios que se encuentran rodeando el ventrículo en este dominio,

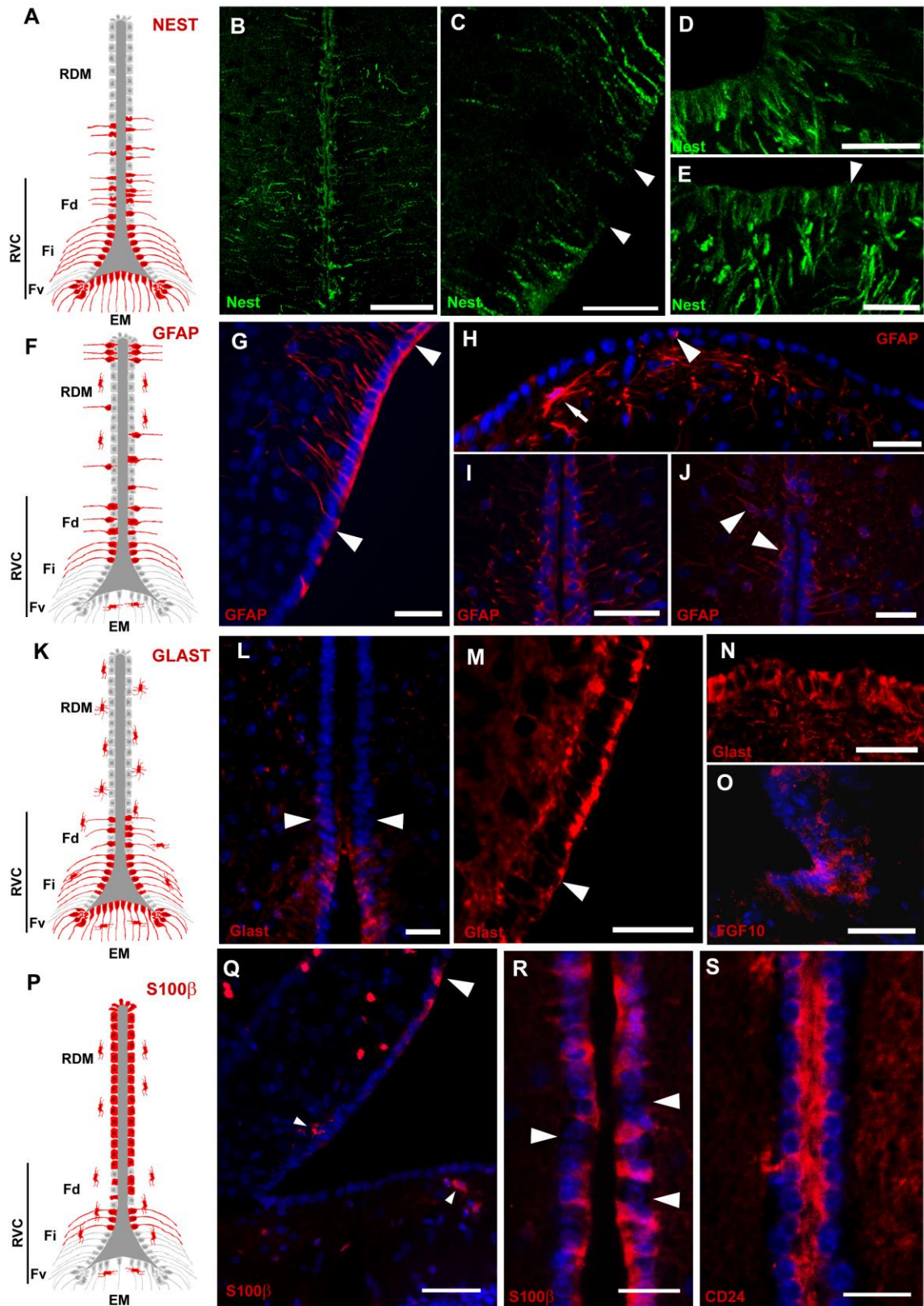
incluso emitiendo pequeños procesos apicales que se intercalan entre las células endoteliales, tal y como vimos al TEM, y que en ocasiones contactan con el ventrículo (Figura 37J, puntas de flecha).

GLAST (ACSA1 monoclonal/ EAAT1 policlonal)

El GLAST es el transportador de glutamato presente en la glía, localizado en su membrana, y es marcador de glía radial y astrocitos (Shibata et al. 1997). Es interesante destacar que en trabajos recientes, mediante inmunohistoquímica y trazado genético (*lineage tracing*) se consideró al tanicito GLAST+ como gliogénico, regeneradora de tanicitos, y origen de nuevas neuronas, pero muy escasas, en el núcleo ARC (S C Robins et al. 2013).

En el 3V, el GLAST no se expresa en células endoteliales (Figura 37L, dorsal a las puntas de flecha). En la franja dorsal, donde se intercalan células endoteliales con tanicitos, el marcaje es discontinuo (Figura 37L, ventral a las puntas de flecha). El marcaje es coincidente al de GFAP en la franja dorsal (Figura 37M, dorsal a la punta de flecha). Existe una región no marcada en la franja ventral, curiosamente la misma región no marcada para nestina. Sin embargo, en las invaginaciones laterales del receso infundibular y en la EM, el marcaje es generalizado (Figura 37N).

Figura 37. Caracterización molecular por inmunofluorescencia del 3V. A) Diagrama explicativo donde se muestra la localización del marcaje de nestina. Los tanicitos nestina es positivos se localizan en la RCV y algunos intercalados en el "overlap" y RDM. Son negativos los localizados en la Fv de la RCV. B) Inmunofluorescencia anti-nestina del extremo dorsal de la Fd y "overlap" donde hay un marcaje bastante generalizado, con algunas células negativas intercaladas. C) Inmunofluorescencia anti-nestina donde se observa la negatividad para los tanicitos localizados en la Fv. D y E) Epéndimo de la EM, suelo de la RCV, donde los tanicitos son inmunorreactivos para nestina, a excepción de algunos intercalados (punta de flecha). F) Diagrama explicativo donde se muestra la localización del marcaje de GFAP. Destaca la ausencia de marcaje en la RCV, a excepción de los tanicitos de la Fd. En la RDM es frecuente el marcaje subependimario que contacta con la cavidad y el marcaje parenquimático. G) Detalle del intenso marcaje de los tanicitos localizados al inicio de la Fd (puntas de flecha). H) El suelo de la RCV, la EM, es principalmente negativo para el marcaje contra GFAP. Sólo se encuentran tanicitos aislados positivos (punta de flecha). Destaca el intenso marcaje parenquimático. I) Detalle del "overlap" donde se observa un marcaje alterno. J) La RDM es principalmente negativa, pero destaca el intenso marcaje subependimario. Estas células suelen presentar un corto proceso basal (puntas de flecha). K) Diagrama explicativo donde se muestra la localización del marcaje de GLAST, que está presente principalmente en la RCV, siendo negativa siempre la Fv. L) Las células endoteliales no expresan GLAST, por lo que la RDM se presenta negativa (dorsal a las puntas de flecha). M) El marcaje en la Fd coincide con la localización de la expresión de GFAP, siendo en GLAST algo más ventral. Sin embargo, se mantiene siempre la Fv negativa para GLAST (ventral a la punta de flecha). N) La EM muestra un marcaje generalizado del epéndimo. O) Inmunofluorescencia anti-FGF10. Detalle de la invaginación lateral del receso infundibular, donde los tanicitos son inmunorreactivos para dicho marcaje. P) Diagrama explicativo donde se muestra la localización del marcaje de S100 β . Éste es expresado por las células endoteliales (RDM) y por los tanicitos localizados en la porción más ventral de la Fd, es decir, coincidiendo con el marcaje de GFAP. Además hay un cierto marcaje parenquimático. Q) Inmunofluorescencia anti-S100 β de la RCV, excluyendo la porción dorsal de la Fd. Se observa un epéndimo prácticamente negativo, a excepción de alguna célula subependimaria (punta de flecha pequeña) y tanicitos de la porción ventral de la Fd (punta de flecha grande). En el parénquima se localizan algunas células inmunorreactivas para S100 β . R) Detalle de la porción dorsal de la Fd, donde se encuentra el "overlap", en la que el marcaje es alterno, encontrándose células positivas y negativas (puntas de flecha) para S100 β . S) Inmunofluorescencia anti-CD24. Este marcaje se restringe a la RDM, donde se encuentran las células multiciliadas. EM, eminencia media; Fd, franja dorsal; Fi, franja intermedia; Fv, franja ventral; RCV, región caudoventral no multiciliada; RDM, región dorsal multiciliada. Barra de calibración en B, 50 μ m; C, 25 μ m; D, 30 μ m; G, H, I, J, L, M, N, O v Q 50 μ m; R v S. 20 μ m.



Fgf-10

FGF-10 es un miembro de la familia FGF, la cual está implicada en la señalización durante el desarrollo, participando en diferentes procesos como la laminación del córtex, la formación de oligodendrocitos o la sinaptogénesis. El FGF-10, en concreto, se ha descrito que mantiene la función de las células madre/progenitores en tejido no nervioso (Mailleux et al. 2005; Yokohama-Tamaki et al. 2006; Nyeng et al. 2007) y que regula la formación de la glía radial cortical (Sahara & O'Leary 2009). Haan et al. describe al tanicito FGF-10+ como una célula neurogénica y gliogénica, localizada en la EM, así como en nuestra recién establecida franja ventral de la RCV. En el 3V, nosotros constatamos que FGF-10 se expresaba en la RCV en general de forma puntual, aunque de forma más intensa en las invaginaciones laterales del receso infundibular (Figura 37O).

S100 β y CD24

Por último, dado que la pared del 3V tiene una importante presencia de células endimarias, utilizamos los marcadores de células endimarias S100 β y CD24. La primera proteína es expresada tanto por células endimarias como por astrocitos y ciertos tanicitos (Figura 37P). Estos tanicitos S100 β + se sitúan en el extremo ventral de la franja dorsal (Figura 37Q, punta de flecha grande), y en la zona "overlap" de forma discontinua (Figura 37R). Algunas células subendimarias de la franja ventral y de la EM también son S100 β + (Figura 37Q, puntas de flecha pequeñas). El marcaje anti-CD24 mostró un patrón similar a S100 β en la región multiciliada dorsal, dado que las células multiciliadas expresan CD24 (Figura 37S).

4.2.2 Marcaje con oro coloidal para el estudio molecular a nivel ultraestructural

Sabiendo qué zonas del 3V expresan unos u otros marcadores moleculares, el marcaje con oro coloidal nos ha permitido correlacionar cada uno de ellos con un tipo celular de los descritos anteriormente.

Nestina

La nestina es expresada por todos los tanicitos del 3V excepto los tanicitos tipo 2 y 2^{EM} (Figura 38A). Al ser células tan interdigitadas, podemos ver cómo entre el citoplasma de tanicitos tipo 3 aparecen expansiones oscuras negativas de células tipo 2 (Figura 38B). Los tanicitos tipo 5 expresan intensamente nestina (Figura 38C). Los tanicitos tipo 1

presentan también un marcaje intenso, pero menor que el de los tipo 5. Este patrón coincide con la ausencia de marcaje en la franja ventral observada en la inmunofluorescencia. Las células ependimarias no expresan nestina.

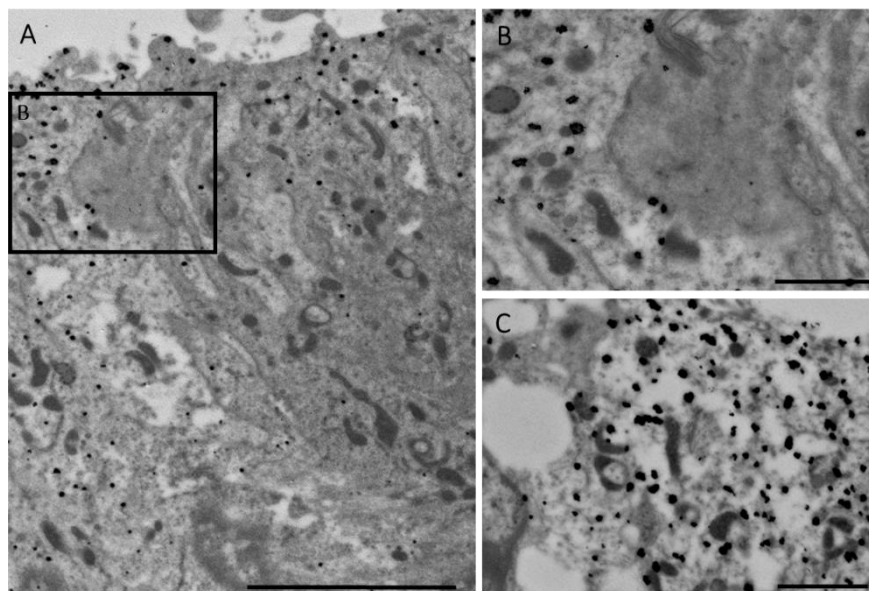


Figura 38. Marcaje con oro coloidal del anticuerpo anti-nestina. A) Imagen al TEM del marcaje anti-nestina donde se observan dos citoplasmas muy interdigitados. El menos electrodensos corresponde a un tanicito tipo 3, y el más electrodensos, a uno tipo 2. Nótese que el marcaje, visto como precipitados opacos para los electrones, se restringe al tanicito tipo 3. B) detalle del marcaje negativo para el tanicito tipo 2 y positivo para el tipo 3. C) Detalle del citoplasma de un tanicito tipo 5, los cuales presentan un intenso marcaje. Barra de calibración en A, 5 μm ; B, 1 μm ; C, 2 μm .

GFAP

La expresión en el 3V se caracteriza por un marcaje muy intenso al inicio (ventral) de la franja dorsal, como se observó en fluorescencia. Las células que muestran este marcaje tan intenso se corresponden con las células tipo 5 (Figura 39A). Estas células son muy ricas en filamentos intermedios tanto en el proceso basal (Figura 39, flechas) como en el soma (Figura 39B) donde podemos observar el marcaje en un citoplasma con los característicos anillos comunicantes de este tipo celular. Las células tipo 2 y tipo 3 son negativas, y las tipo 4 dorsales ligeramente positivas, con lo que la franja intermedia presenta un marcaje leve (Figura 39C). Las células tipo 5, intensamente marcadas, observadas en “whole mount” (en face) aparecían muy interdigitadas con las células circundantes (Figura 39D). En muchas ocasiones se observaron dos cilios 9+2 con corpúsculos basales prominentes partiendo juntos de la célula (Figura 39E). Se observaron incluso células GFAP+ tetraciliadas (Figura 39F). Curiosamente, muchas células multiciliadas localizadas junto al tipo 5 son positivas para GFAP siempre coincidiendo con un citoplasma electrolúcido (Figura 39G).

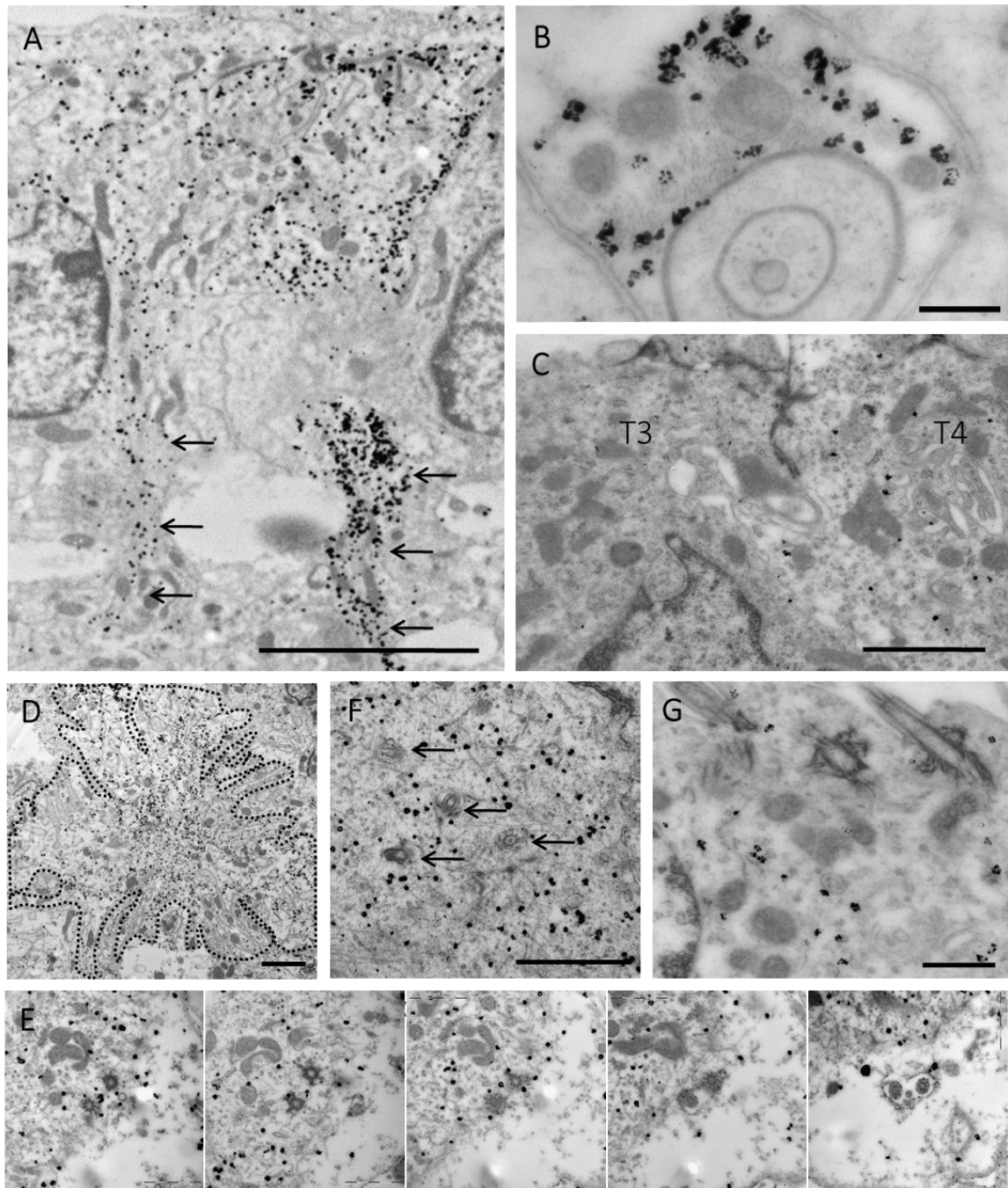


Figura 39. Inmunomarcaje con oro coloidal del anticuerpo anti-GFAP. A) Porción ventral de la Fd donde se observa el intenso marcaje anti-GFAP para los tanicitos tipo 5. Las flechas indican el fuerte marcaje de los procesos basales. B) Detalle del citoplasma de un tanicito tipo 5 que contiene un anillo comunicante típico de estas células. D) Inmunodetección de la proteína GFAP con oro coloidal en "whole mount", la sección en "en face" de esta preparación, revela la morfología en pétalos de flor de las células GFAP+. E) Los tanicitos tipo 5 son mayoritariamente biciliados, la reconstrucción muestra uno de estos tanicitos, GFAP+, con sus dos prominentes corpúsculos basales reconstruidos, de los que parten dos cilios de estructura 9+2. F) En ocasiones hemos encontrado células GFAP+ tetraciliadas (comprobado mediante reconstrucción tridimensional). Se muestra una imagen representativa, donde las flechas indican los cuatro cilios. G) Las células multiciliadas cercanas a la Fd fueron habitualmente GFAP+. T3, tanicito tipo3; T4, tanicito tipo4. Barra de calibración en A; 5 μ m; B; 200 nm; C y G, 1 μ m; D y F, 2 μ m.

GLAST (ACSA1 monoclonal/ EAAT1 policlonal)

Se marcaron los tanicitos tipo 3 y 4 con un marcaje escaso, y muy intensamente el tipo 1 y 5 (Figura 40A y B). Por el contrario, el tipo 2 no mostró marcaje para GLAST. El marcaje se restringía a la membrana celular, aunque con el anticuerpo policlonal, en las células de la EM y las células tipo 5 el marcaje era de membrana y citoplásmico. Los astrocitos subependimarios y sus expansiones también fueron positivos para GLAST (Figura 40C, flechas). Las células endoteliales nunca expresaron GLAST.

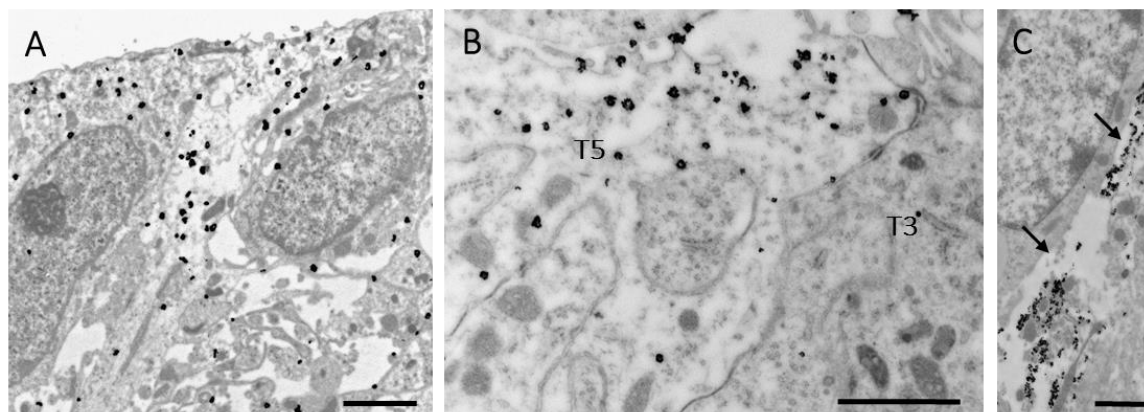


Figura 40. Inmunodetección con oro coloidal del anticuerpo anti-GLAST. A) Tanicitos de tipo 1 intensamente marcados con GLAST. B) En la imagen se muestran dos citoplasmas, uno correspondiente a un tanicito tipo 5, intensamente marcado, y otro a un tanicito tipo 3, no marcado. Éstos últimos solían mostrar un débil marcaje. C) Cabe destacar el marcaje intenso de los astrocitos subependimarios para GLAST. También los parenquimáticos se encontraban marcados, lo que explica el ruido de fondo encontrado en las inmunofluorescencias para este marcaje. T5, tanicito tipo 5; T3, tanicito tipo 3. Barra de calibración en A y C, 1 μ m; B, 2 μ m.

4.2.3 El caso particular de la expresión de vimentina

Desde la primera descripción molecular del 3V, la vimentina ha sido el marcador más utilizado y ampliamente aceptado de tanicitos (Rodríguez et al. 2005). La inmunofluorescencia contra vimentina muestra un marcaje universal de los tanicitos, que son células vimentina+. Nuestro trabajo aceptaba esta premisa como cierta. Sin embargo, en ocasiones, parecía que algunas regiones de la franja ventral del 3V quedaban vacías de marcaje, pero lo atribuíamos a un artefacto de la técnica (Figura 42A, flechas). La inmunofluorescencia sobre semifinos de 1,5 micras de grosor confirmaba la existencia de células no marcadas (Figura 42B).

La inmunofluorescencia doble anti-vimentina/anti-gammatubulina en “whole mount” nos dio una visión de la superficie del ventrículo (Figura 42C). La gammatubulina es parte integrante de los corpúsculos basales de los cilios. Esta técnica nos permitía asociar la presencia de vimentina con el número de corpúsculos pudiendo distinguir

entre células E1, E2 o E3. La vimentina se expresaba en células endimarias de la región dorsal multiciliada del 3V y constituía un nido de filamentos en la región apical de dichas células (Figura 42D, círculo), que además presentaban múltiples corpúsculos basales, como corresponde a una célula multiciliada. Las células con dos o cuatro corpúsculos basales gruesos presentaban unos penachos vimentina+ menos prominentes. En regiones ventrales se aprecian regiones con un corpúsculo basal con escaso o nulo marcaje para vimentina (Figura 42E, círculos).

Finalmente, al realizar marcaje con oro y observar los ultrafinos consecutivos al TEM, confirmamos que existían células que no se marcaban con vimentina que se correspondían en todos los casos con el tanicito tipo 2 (Figura 42F). La célula tipo 5 se marcaba intensamente, y las células tipo 3 y 4 eran un fenotipo intermedio con marcaje tenue para vimentina. Dado que los procesos basales de estas células también eran vimentina+, comprobamos que los procesos de estas células contactaban con neuronas de los núcleos hipotalámicos subyacentes. En general, el marcaje de vimentina era más intenso en los procesos basales (Figura 41A y B). En muestras procesadas para marcaje con oro sobre “whole mount”, en corte “en face”, observamos células vimentina+ uni- y biciliadas (Figura 42G y H).

Dado que la existencia de tanicitos que no expresan vimentina es un resultado que difiere de lo descrito hasta el momento, decidimos comprobar este dato mediante dos experimentos adicionales: a) la detección ultraestructural de mRNA de vimentina; técnica realizada por la estudiante Laura Cubas Núñez b) el estudio de animales transgénicos con creERT bajo el promotor de vimentina. a) Tras la optimización y puesta a punto del protocolo de RT-PCR *in situ* con anticuerpos de oro coloidal, se realizó la RT sobre el tejido para convertir mRNA en cDNA, y en un segundo paso, se llevó a cabo la PCR con cebadores de vimentina (diseñados sobre regiones exón-exón) y nucleótidos marcados con biotina. Posteriormente se realizó inmunomarcaje con oro coloidal contra biotina y se procesaron las muestras de forma convencional para TEM. Las imágenes mostraron células tipo 1 y 5 con marcaje de oro (Figura 42I), mientras que las células tipo 2 no se marcaron. En segundo lugar, utilizamos un ratón transgénico *Vim::CreERT²;mtdTom-mGFPflox/+* (que para abreviar hemos llamado, *Vim::CreERT²*). Este animal, tras la administración de tamoxifeno, expresaba GFP asociado a membrana (mGFP) en las células que estaban transcribiendo activamente vimentina, y RFP (Tomato) en el resto de células. A tiempo corto tras administración de tamoxifeno, la fluorescencia de GFP se correspondía de forma indirecta, a la expresión de vimentina, como comprobamos con fluorescencia doble GFP/vimentina (Figura 43A). La inmunodetección de la proteína GFP con anticuerpos conjugados con oro para su

estudio bajo el microscopio electrónico confirmaron lo observado reiteradamente, los tanicitos tipo 5 eran los que mayor expresión de vimentina presentaban (Figura 43B) y los tanicitos tipo 2 no expresaban vimentina (Figura 43C).

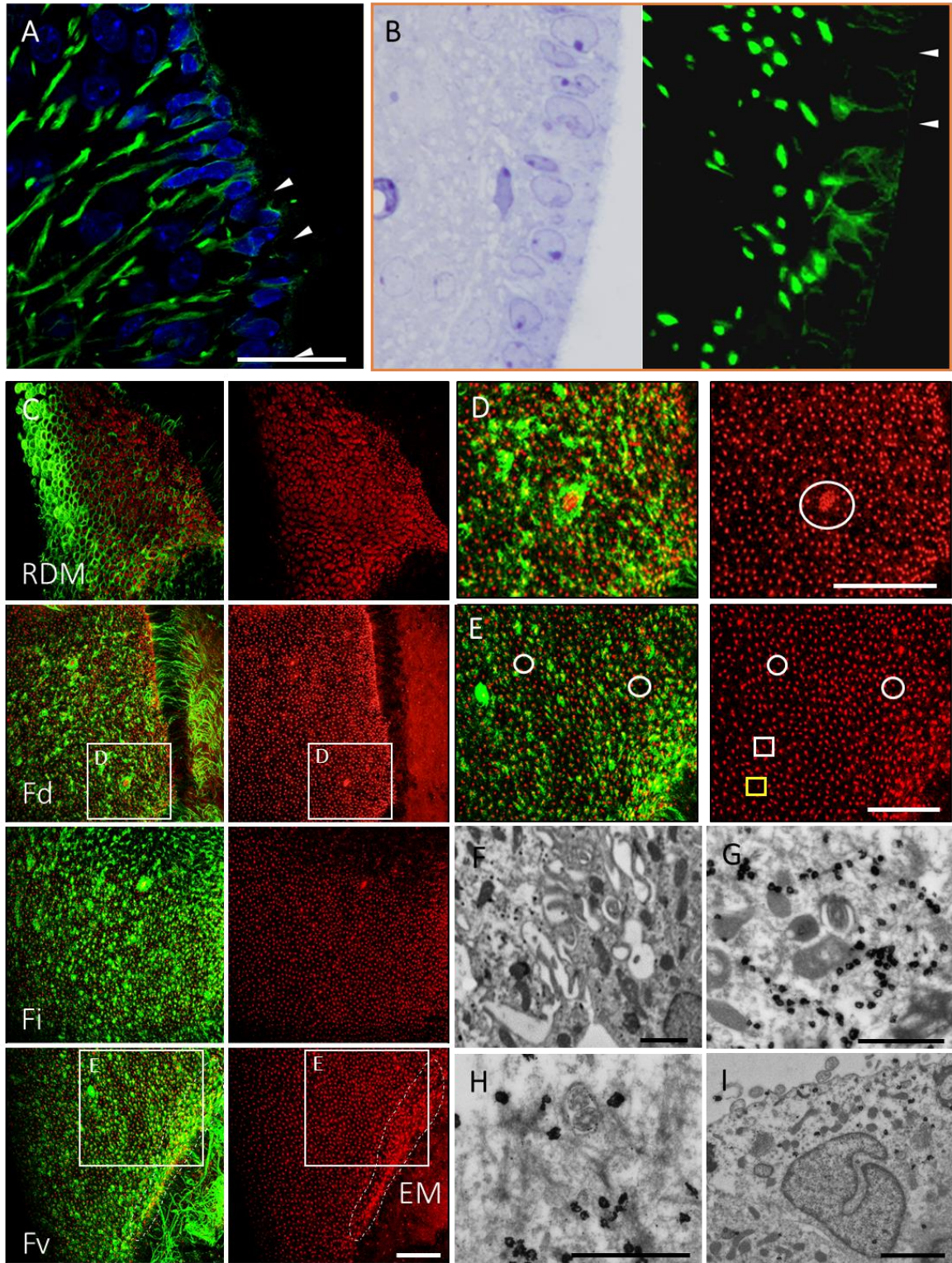


Figura 42. El marcaje particular de la vimentina. A) Imagen de confocal de la Fv donde se aprecian pequeñas zonas con aparente ausencia de marcaje. B) Inmunofluorescencia “postembedding” sobre semifino. El semifino presenta muy poco grosor (1,5µm) por lo que el resultado se asemeja a una imagen de confocal. A la izquierda se localiza el semifino anterior al semifino donde se realizó la inmunodetección con el fin de correlacionar el marcaje con las células existentes. La gran interdigitación existente en el epéndimo del 3V, no nos permite identificar la célula poseedora real de la expresión de la proteína detectada. Las puntas de flecha indican dos espacios libres de marcaje. C) Imágenes de confocal de inmunofluorescencia en “whole mount” de vimentina y γ -tubulina, contiguas en el eje dorsoventral, desde la RDM hasta la EM. En la fotografía correspondiente a la RDM se aprecia la práctica exclusividad de células endimarias (multiciliadas) que cubren la superficie del ventrículo. Ventralmente a ésta, la Fd, perteneciente a la RCV, presenta una mayoría de células E2, sin poder distinguir entre E2-1 y E2-2, pues sólo se marcan los corpúsculos basales. Recordemos que los tanicitos tipo 5 son en su mayoría E2-2 y se localizan exclusivamente en esta franja. Son de morfología prominente, lo que nos permite diferenciarlos de las células uniciliadas E3. En esta franja se intercalan células endimarias (recuadro D), intensamente positivas para vimentina. La Fi, contigua a la Fd, también se encuentra tapizada por células E2, que como vimos en el TEM se trata de tanicitos tipo3 y 4 exclusivamente. Aquí encontramos células de intensamente positivas para vimentina, intercaladas con células de escaso marcaje. Por último, la Fv se continua con al EM, que por su disposición, nos permite ver los procesos basales de los tanicitos vimentina+. Al igual que en las franjas anteriores, se aprecian grupos de células de marcaje débil o nulo para vimentina. Aquí las células son principalmente E2. D) Detalle de la Fd donde se observa una célula endimaria (círculo) que muestra un intenso marcaje para la proteína vimentina. El resto de células presentan gruesos corpúsculos basales, correspondientes a células E2. E) Detalle de la Fv donde se observa la composición en células E2 (corpúsculos gruesos, cuadrado blanco) y E3 (corpúsculos pequeños, cuadrado amarillo). Los círculos blancos muestran células escasamente marcadas con vimentina. F) Detalle de un tanicito tipo 2 negativo para vimentina (a la derecha), al lado de uno tipo 3 vimentina+ (célula de la izquierda). G) Inmuno-oro anti-vimentina en “whole mount” seccionada en “en face”, donde se observa una célula uniciliada vimentina positiva, correspondiente a un tanicito E2-1. Al inicio los cilios son 9+0, y adquieren el par central unos nanómetros tras la salida. H) En la imagen se muestra en este caso, mediante la misma técnica anterior, una célula biciliada (E2-2) vimentina+. Nótese que uno de los cilios todavía presenta una estructura 9+0. I) Tanicito localizado en la Fi que muestra marcaje mediante la técnica de RT-PCR *in situ* con el cebador de vimentina y detección del marcaje con oro coloidal. EM, eminencia media; Fd, franja dorsal; Fi, franja intermedia; Fv, franja ventral; RDM, región dorsal multiciliada. Barra de calibración en A, 50µm, B, 25µm; C, D y E 100µm; F, G y H, 1µm; I, 2µm.

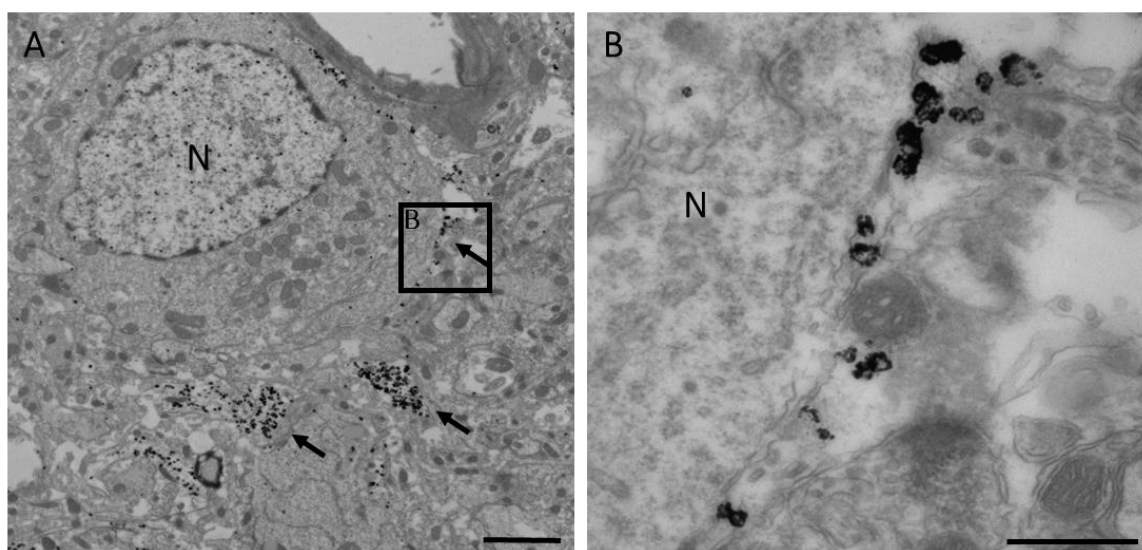


Figura 41. Tanicito en contacto con neurona. A) Imagen panorámica en la que se observa una neurona (N) con expansiones que expresan el marcaje vimentina (flechas), por lo tanto correspondientes a un tanicito, rodeándola. B) Detalle en el que se observa el contacto directo de una expansión vimentina+ con la membrana de la neurona. Barra de calibración en A, 2µm y B, 500nm.

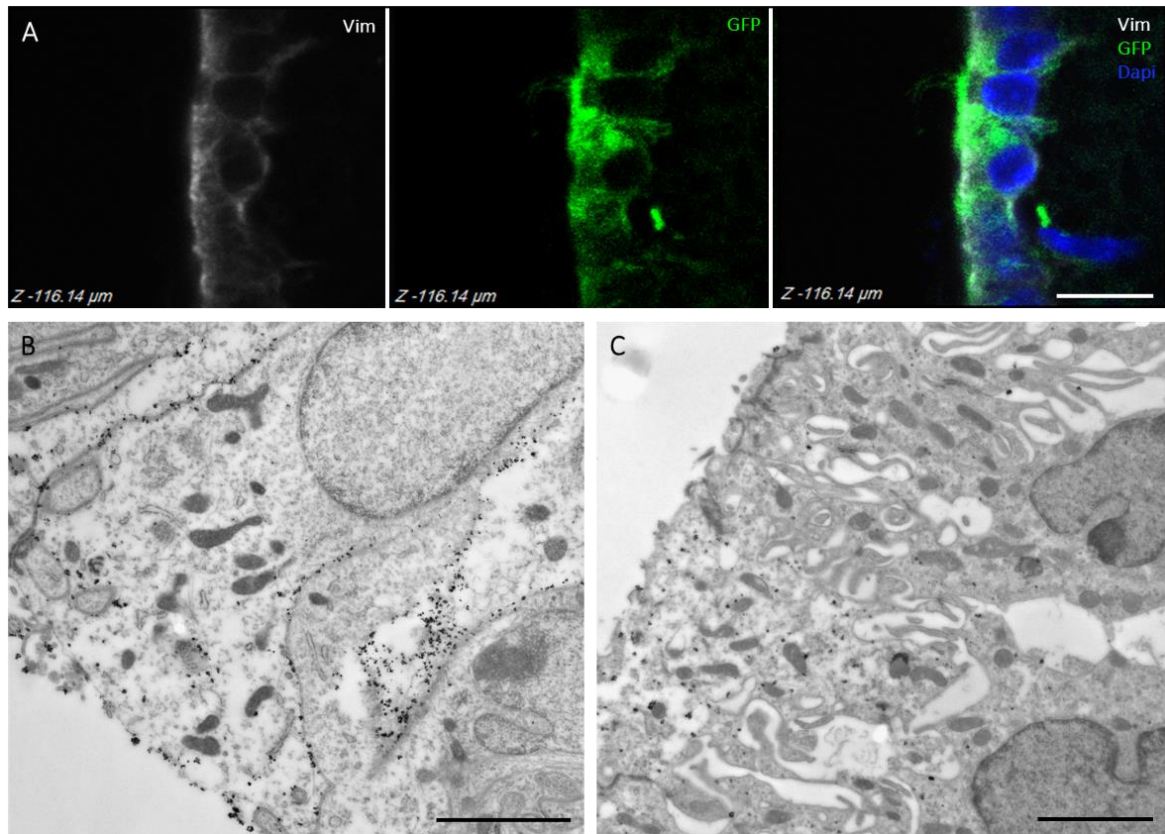
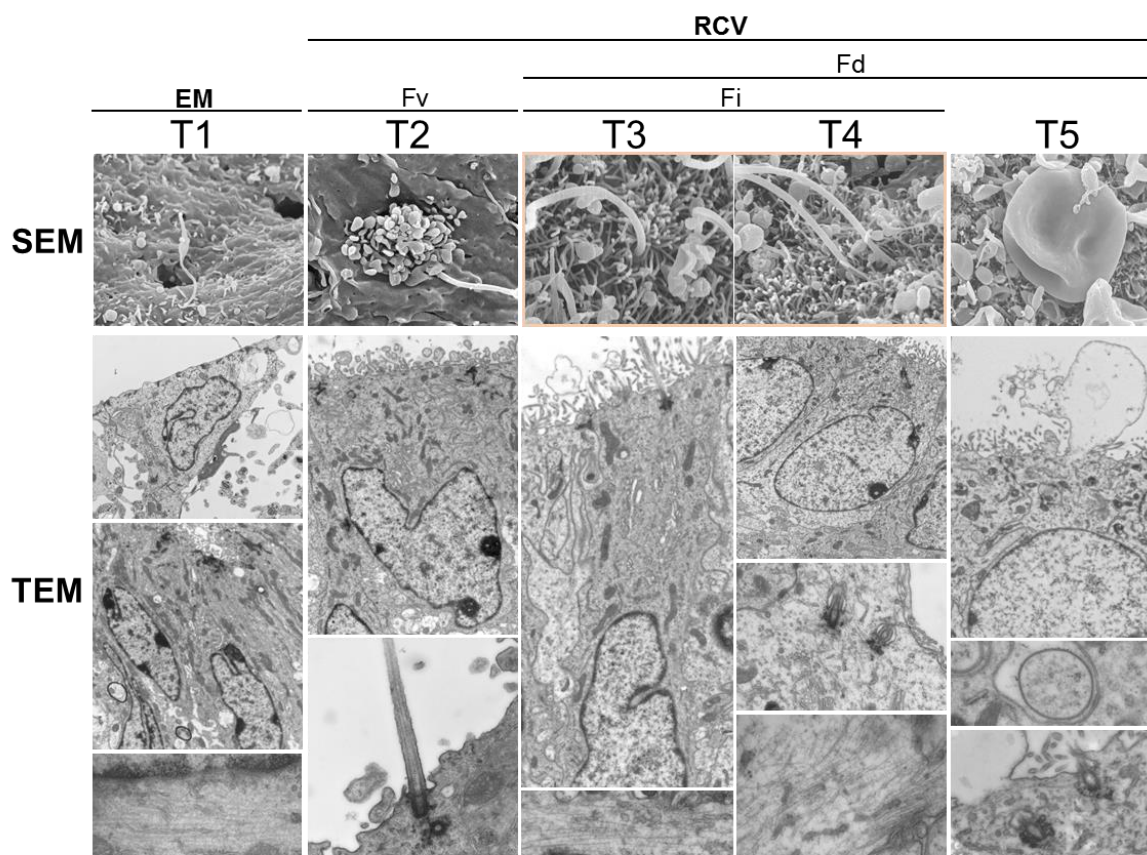


Figura 43. VimCrER a tiempo corto. A) Confirmación de que las células vimentina+ expresaban GFP a tiempo corto. B) Tancito tipo 5 que muestra un intenso marcaje GFP revelado con oro coloidal. C) Detalle de la Fv donde se encuentran los tancitos tipo 2, negativos para vimentina, y por tanto para GFP a tiempos cortos. Entre ellos se intercalan citoplasmas de otros tancitos, tancitos tipo 3, que sí expresan GFP, y que en fluorescencia dan la apariencia de positividad en los tancitos tipo 2. Barra de calibración en A, 10 μ m, B y C, 2 μ m.

En la figura 43 se recoge la información ultraestructural anterior (Figura 44).



Caracterización molecular

Nest.	++	-	+	++	+++
GFAP	-	-	-	-	+++
Glast	+++	-	+	+	+++
Vim.	+++	-	++	++	+++

Aparato ciliar

E2-1	Si	No	Si (frecuente)	Si (frecuente)	Si (menos frec.)
E2-2	No	No	Si (menos frec.)	Si (menos frec.)	Si (frecuente)
E3	No	Si (frecuente)	No	No	No

Figura 44. Resumen de las características ultraestructurales de cada tipo celular. En la lámina se recoge la localización en primer lugar, la característica más destacada de la superficie celular (SEM), la morfología observada al TEM, la expresión molecular y el aparato ciliar, en ocasiones más de uno, que presenta cada tipo celular. EM, eminencia media; Fd, franja dorsal; Fi, franja intermedia; Fv, franja ventral; Nest, nestina; RCV, región caudoventral no multiciliada; Vim, vimentina.

4.3 El 3V es un nicho proliferativo

4.3.1 Las células derivadas del 3V proliferan *in vitro* y poseen autorrenovación

Inicialmente, y basándonos en estudios de otros nichos neurogénicos como la SVZ, decidimos realizar el cultivo de células derivadas del 3V para la obtención de neuroesferas. El cultivo de células de 3V ventral completo, con factores de crecimiento produjo clones de neuroesferas. Como sabemos que en la SVZ las células que proliferan son uniciliadas, optamos por cultivar por separado las dos regiones que contienen células uniciliadas, la región rostroventral (RRV) y la región caudoventral (RCV). Esta separación fue posible tras diseccionar en primer lugar el 3Vv por completo y seccionarlo en dos partes con un microbisturí a nivel del quiasma óptico. De este modo, la sección posterior (3Vp) recogía la RCV, pero también la amplia extensión de multiciliadas que se sitúa dorsalmente, mientras que la sección anterior (3Va), recogía la RRV, y también parte de la RDM (Figura 45). Como control de proliferación se cultivaron las SVZ de los mismos ratones.

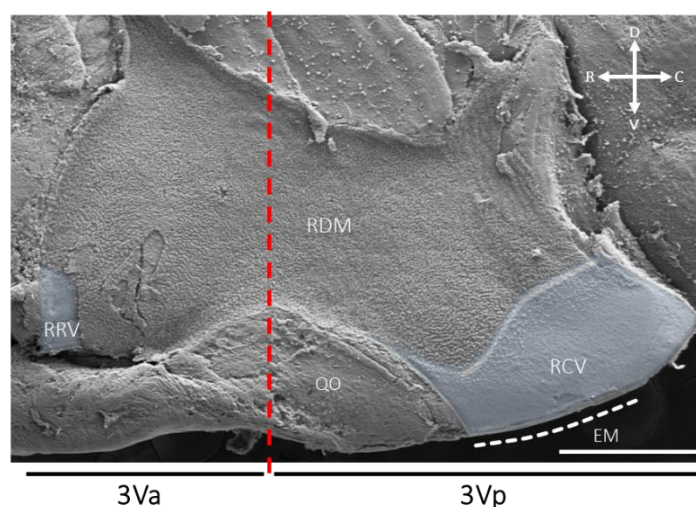


Figura 45. Disección del 3V para cultivos. Imagen de SEM de la pared del 3V donde se ha indicado mediante una línea roja discontinua el lugar de corte con un microbisturí para separar el 3Va, que contiene la RRV, del 3Vp que contiene la RCV, que cultivamos por separado. C, caudal; D, dorsal; EM, eminencia media; R, rostral; RCV, región caudoventral no multiciliada; RDM, región dorsal multiciliada; RRV, región rostroventral no multiciliada; QO, quiasma óptico; V, ventral; 3Va, tercer ventrículo anterior; 3Vp, tercer ventrículo posterior. Barra de calibración 500 nm.

Tasa de amplificación

Como medida de proliferación se utilizó la tasa de amplificación. En diez cultivos diferentes, calculamos la tasa de amplificación entre pases celulares como el cociente entre el recuento de células obtenidas al día 7 *in vitro* (DIV) y las células sembradas tras el pase anterior comenzando el cálculo de dicha tasa en el 2º pase. El estudio se prolongó hasta el 5º pase para obtener tres tasas de crecimiento. La siembra siempre se realizaba a una densidad de 10.000 células/cm² para evitar el efecto de la densidad celular sobre la proliferación. Tras estos estudios, determinamos en primer lugar, que el 3Va crece a una tasa de amplificación $0,78 \pm 0,16$, es decir menos crecimiento del necesario para el mantenimiento del cultivo (la tasa necesaria para el mantenimiento sería, al menos 1) (Figura 46, 3Va). Una tasa muy baja que hacía que los cultivos se agotaran alrededor del 4º pase. Se observaban junto a escasas neuroesferas, abundantes células individuales que no formaban clones, y “debris” sugestivo de muerte celular. Por el contrario, el 3Vp se amplificaba a una tasa similar a la de la SVZ (3Vp: $1,9 \pm 0,3$ vs SVZ: $1,4 \pm 0,13$. Games-Howell, $p=0,279$) (Figura 46A, 3Vp/SVZ). Sin embargo, a pesar de que el crecimiento era similar, la SVZ siguió amplificándose en pases consecutivos mientras que el 3Vp fue perdiendo capacidad de crecimiento con los pases (Figura 46B).

Mediante el ANOVA de un factor se analizó si existían diferencias en la tasa de amplificación entre grupos, determinando que sí ($p=0,011$). De modo que, utilizando el test *post hoc* de Games-Howell, al no poder asumir la igualdad de varianzas (Test de Levene, $p=0,033$), se hicieron comparaciones entre grupos que mostraron diferencias en la tasa de amplificación entre la porción rostroventral y la caudoventral (3Va vs. 3Vp, $p=0,005$). Comparando los resultados del 3V con el control (SVZ), encontramos el 3Vp creció con una tasa de amplificación similar a la SVZ (3Vp vs. SVZ, $p=0,279$), mientras que el 3Va, creció con una tasa de amplificación significativamente menor (3Va vs. SVZ, $p=0,017$) (Figura 46A).

El tamaño de las neuroesferas generadas también nos informaría del crecimiento celular de forma indirecta, de modo que hicimos mediciones del área de diferentes neuroesferas, sobre fotografías aleatorias en los distintos cultivos a pase 4. El 3Va presentaba neuroesferas de un tamaño medio de $128 \pm 25 \mu\text{m}^2$ ($n=28$). Por el contrario el 3Vp es capaz de generar neuroesferas de un tamaño medio 6 veces mayor, $857 \pm 157 \mu\text{m}^2$ ($n=24$) (3Va vs 3Vp; $p=0,00012$) y similar al de las generadas por la SVZ, $929 \pm 123 \mu\text{m}^2$ ($n=71$) (3Vp vs SVZ; $p=0,931$). Todas estas comparaciones se realizaron utilizando el test *post hoc* de Games-Howell; al no poder asumir, de nuevo, la igualdad de varianzas (Test de Levene, $p=0,000$) (Figura 46C-D).

Autorrenovación

Para conocer la autorrenovación, es decir, la capacidad de las células que formaban una neuroesfera para generar nuevos clones en pases subsiguientes, característica de las células madre, se hizo un ensayo clonal mediante el cual se sembraban células procedentes de neuroesferas disgregadas a densidad de una célula por pocillo de una placa de 96-wells y se constataba si se había formado una neuroesfera o no. El resultado mostró que, de media, aproximadamente en la mitad de pocillos sí que se había formado una neuroesfera, es decir, las células derivadas del 3V, en este caso completo, poseían capacidad de autorrenovación (tasa= 0,43) (Figura 46E).

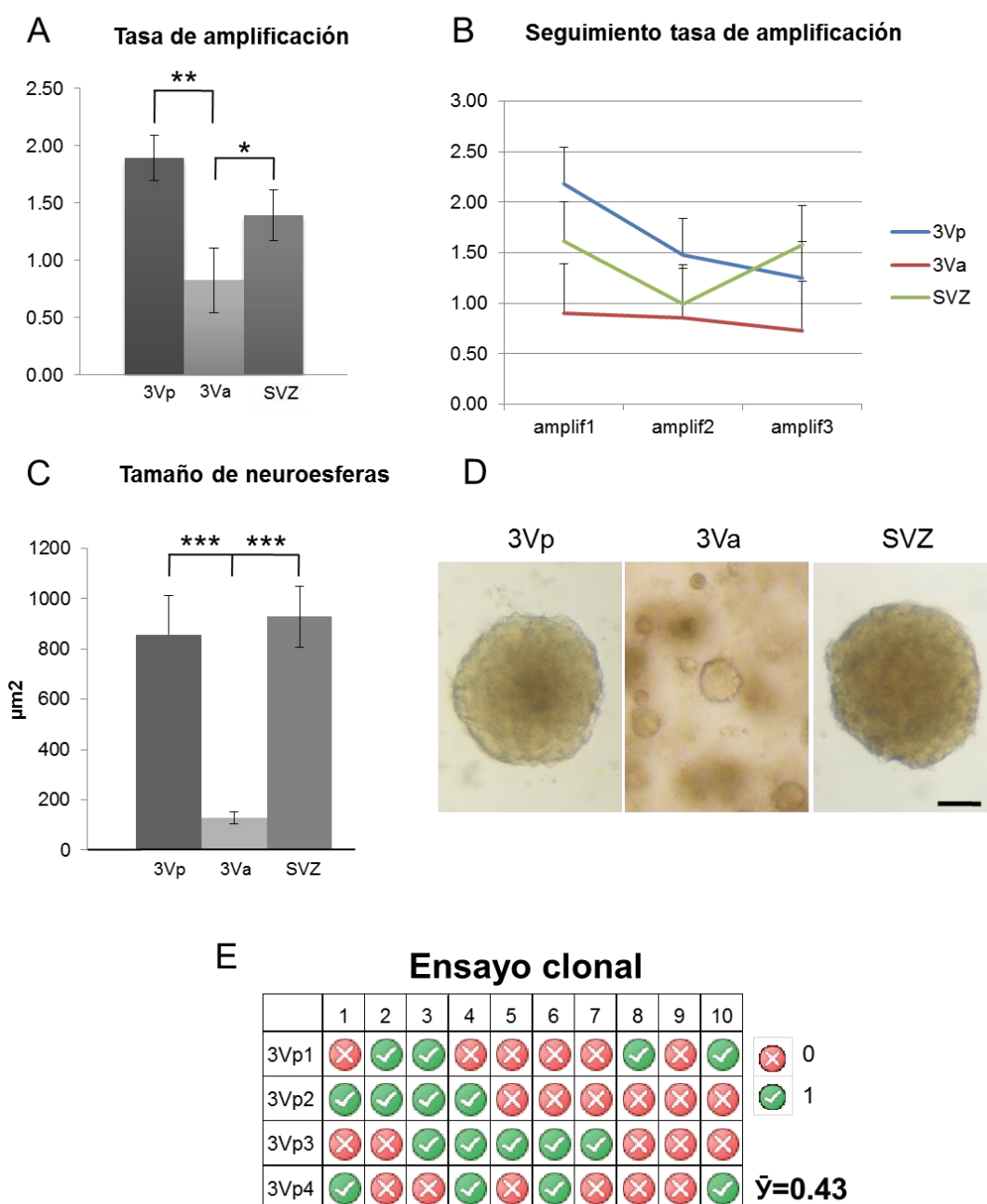


Figura 46. Medida de la tasa de amplificación *in vitro* del 3V respecto a la SVZ. A) La gráfica muestra la tasa de amplificación media según el origen del cultivo, 3Vp, 3Va y SVZ, durante 4 pases sucesivos, a partir del pase 1. Calculada a partir del cociente entre las células obtenidas tras 7DIV y las células sembradas tras el pase anterior, un valor de 1 significaba el mantenimiento del cultivo. Valores por debajo de 1 significaban un crecimiento negativo y por encima, positivo. Mediante la ANOVA de un factor, se determinó que existían diferencias entre la tasa de amplificación según el origen del cultivo ($p=0,011$, $*P<0,05$). Comparando por parejas, mediante el test de Games-Howell, al no poder asumir igualdad de varianzas (test de Levene, $p=0,033$; $*P=0,05$), se determinó que el 3Vp y la SVZ crecieron a una tasa similar (3Vp: $1,9\pm 0,3$ vs SVZ: $1,4\pm 0,13$. $p=0,279$, $*P<0,05$), mientras que el 3Va obtuvo una tasa de amplificación media de $0,78 \pm 0,16$, significativamente menor a la del 3Vp (3Vp: $1,9\pm 0,3$ vs 3Va: $0,78 \pm 0,16$. $p=0,005$, $**P<0,01$) y a la SVZ (SVZ: $1,4\pm 0,13$ vs 3Va: $0,78 \pm 0,16$. $p=0,017$, $*P=0,05$). B) Seguimiento de la tasa de crecimiento durante los 4 primeros pases. El 3Vp, a pesar de tener una tasa de amplificación media similar a la de la SVZ, iba disminuyendo con la evolución del cultivo. Tras el primer pase, sufría una ampliación muy grande y a partir de ahí, la tasa de amplificación disminuía, intuyéndose un agotamiento del cultivo en los sucesivos pases a partir del 4º. La SVZ, sin embargo, experimentaba un descenso de la tasa de crecimiento hasta el pase 3º, para remontar a partir del pase 4º. El 3Va mostraba una tasa de amplificación inferior a 1 en cada pase y a pase 4º se encontraba prácticamente agotado. C) Tamaño medio de las neuroesferas de cada tipo de cultivo. El tamaño medio de las neuroesferas derivadas de la SVZ y del 3Vp era prácticamente idéntico (3Vp: $857 \pm 157\mu\text{m}^2$ ($n=24$) vs SVZ: $929 \pm 122\mu\text{m}^2$ ($n=71$) $p=0,931$, $*P<0,05$). Por el contrario, el 3Va presentó un tamaño medio de neuroesfera significativamente muy inferior al de los dos anteriores, 3Va: $128 \pm 25\mu\text{m}^2$ ($n=28$) (3Va: $128 \pm 25\mu\text{m}^2$ ($n=28$) vs. 3Vp: $857 \pm 157\mu\text{m}^2$ ($n=24$); $p=0,00012$ ($***P<0,001$); 3Va: $128 \pm 25\mu\text{m}^2$ ($n=28$) vs SVZ: $929 \pm 122\mu\text{m}^2$ ($n=71$) $p=1,24025\text{E}-08$, $***P<0,001$), analizado mediante el test *post hoc* Games-Howell, al no poder asumir igualdad de varianzas (test de Levene, $p=0,000$; $*P=0,05$). E) Mediante el ensayo clonal medimos la capacidad de autorrenovación de las células con capacidad proliferativa provenientes del 3Vp. El estudio consiste en sembrar células procedentes de neuroesferas disgregadas a densidad de una célula por pocillo de 96-wells y se constata si se forma una neuroesfera o no tras 7DIV. Se sembraron 10 pocillos por cultivo y se hicieron cuatro réplicas. Tras este tiempo, observamos que, de media, la mitad de las células sembradas formaron neuroesferas. ($\bar{y}=0,43$). Rojo: 0 neuroesferas tras 7DIV; verde, 1 neuroesfera tras 7DIV; 3Va, porción anterior del tercer ventrículo a partir hasta el quiasma óptico. Contiene la región rostroventral no multiciliada. 3Vp, porción posterior del tercer ventrículo a partir del quiasma óptico. Contiene la región caudoventral no multiciliada; SVZ, zona subventricular. Barra de calibración en D, 50 μm .

4.3.2 Proliferación *in vivo* en el 3V

El epitelio del 3V se ha considerado una región que retiene capacidad proliferativa, aunque con cierta controversia dado que lo hace a tasas muy bajas en condiciones basales. Los estudios *in vivo* al respecto, analizan el 3V habitualmente bajo los efectos de un estímulo proliferativo, ya sea la administración de factores de crecimiento mitogénicos, como la administración de dietas ricas en grasa, el ejercicio o tras lesión. En este trabajo, hemos analizado el 3V en su estado fisiológico y, por tanto, la proliferación, aunque existe, es mínima. Los estudios de capacidad proliferativa *in vivo* del 3V se realizaron mediante la detección de marcadores de proliferación endógenos (Ki67) y exógenos, BrdU y ^3H -timidina. Hay que destacar que en ningún caso se observaron células marcadas en la región dorsal multiciliada, y que, sin embargo, se observaron múltiples células parenquimales positivas para los diferentes marcadores en núcleo ARC y en EM.

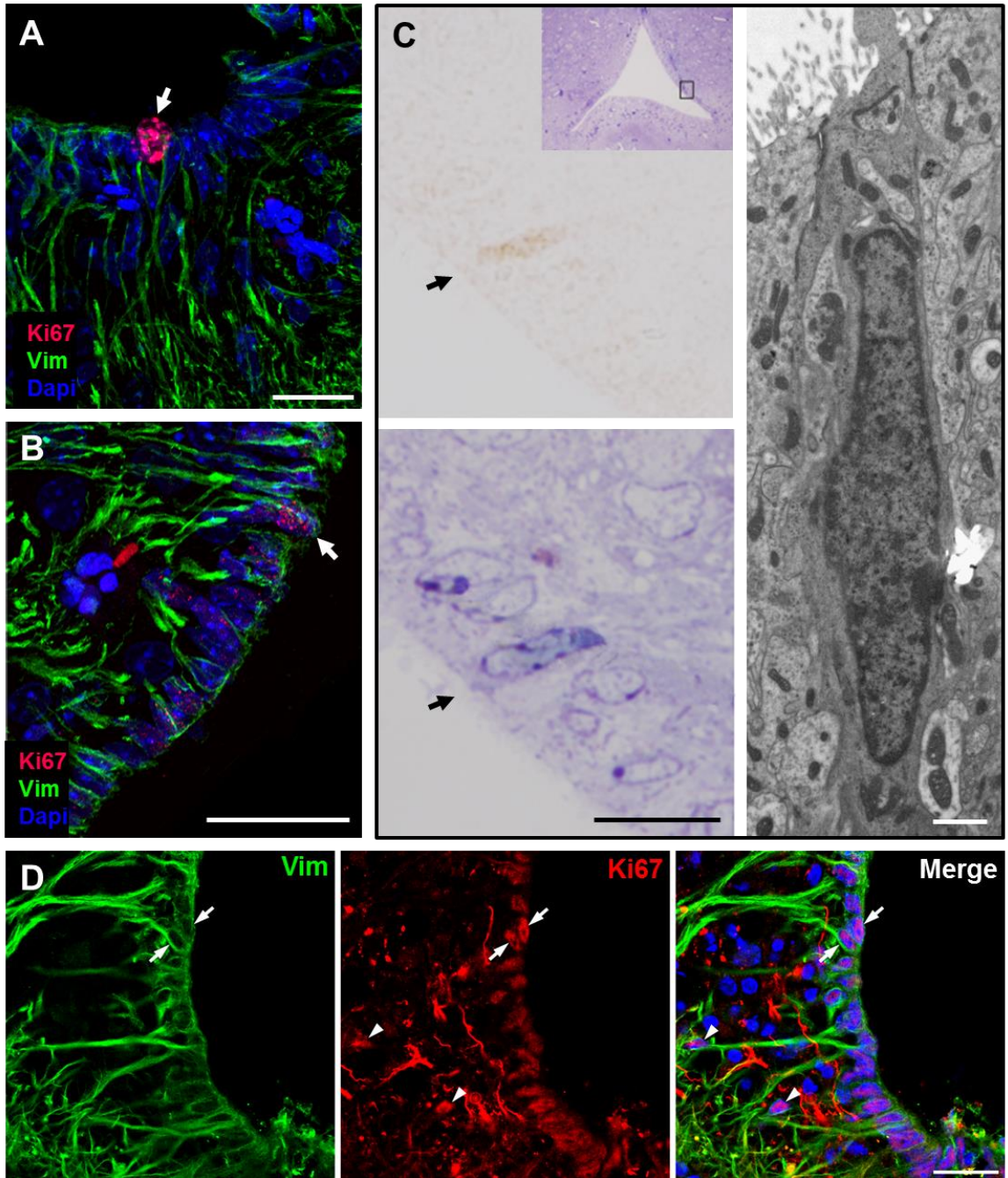
Ki67

El marcador Ki67 fue estudiado al óptico mediante inmunofluorescencia combinado con el marcador vimentina. Detectamos entre 1-2 células Ki67+ en contacto con la luz ventricular por serie estudiada (rango de profundidad= 170 μm). El marcaje encontrado se localizó en todos los casos en la franja ventral o intermedia ventral y en la EM (Figura 47). No pudimos confirmar o descartar que el marcaje de vimentina se daba en las células Ki67+, debido a las limitaciones de la inmunodetección al óptico de las que hablamos anteriormente (Figura 47A y B).

Se realizó inmunocitoquímica sobre cortes semifinos del 3V (1,5 μm). En este caso, al ser cortes tan finos, la probabilidad de encontrar células marcadas se reducía. Pese a ello, se detectó una célula Ki67+ en el límite entre las franjas ventral e intermedia. La ventaja de esta técnica era que podía re-incluirse el semifino y así, estudiarse la ultraestructura de dicha célula marcada. Esta célula presentaba un núcleo alargado, con cromatina condensada, citoplasma electrodensito, con abundantes interdigitaciones en la porción apical (Figura 47C, TEM). Ultraestructuralmente y por localización se trataba de un tanicito tipo 2 y se encontraba flanqueada por células tipo 3.

Para aumentar el rendimiento de la inmunohistoquímica de Ki67 realizamos cultivo de cortes organotípicos con medio al que añadimos el factor de crecimiento FGF. El marcaje de Ki67 se generalizó a la región ventral en 24 horas de tratamiento (EM, franja ventral), indicando que las células en esta región estaban preparadas para entrar en el ciclo ante el estímulo (Figura 47D). Cabe destacar, que a pesar de que en condiciones basales, sólo hemos encontrado tanicitos tipo 1 y 2 en proliferación, en el caso de estimulación con los factores de crecimiento, parece que más tipos de tanicitos puedan activar su proliferación, ya que, parece que todos los tanicitos expresen vimentina. Por otro lado, hay que recordar que por la intensa interdigitación de los tanicitos, células vimentina negativas pueden parecer positivas.

Figura 47. Proliferación *in vivo* en el 3V. Detección mediante el marcador endógeno, Ki67. A) Célula Ki67+ localizada en la pared de la EM. B) Célula Ki67+ localizada en la Fv. C) Detección de la proteína Ki67 en cortes semifinos. La imagen de arriba a la izquierda muestra el semifino tras la inmunodetección y revelado con DAB de la proteína Ki67. Debajo, se encuentra el semifino contiguo al que se realizó la inmunodetección, utilizado, a partir del cual se obtendrán ultrafinos para la identificación de la célula al TEM. A la derecha se muestra una imagen de la célula positiva para Ki67, identificada como tanicito tipo 2. D) Estimulación con FGF del 3V *in vitro*. Se realizó un cultivo organotípico de una sección coronal del 3V al que se le administró con el medio de cultivo FGF. Tras 24h, se fijó y realizó la inmunodetección de la proteína Ki67 y vimentina, viendo que todas las células de la pared en la Fi, Fv y EM, fueron positivas para Ki67 y alguna célula parenquimática (puntas de flecha), es decir, se produjo una hiperactivación. Encontramos células formando parejas en paralelo a la superficie del 3V (flechas) que recuerdan a una división asimétrica. Nótese la especificidad del marcaje Ki67 puesto que la mayoría de las células parenquimáticas fueron negativas para Ki67. Barra de calibración en A y B, 50 μm ; C, semifinos, 20 μm ; C, TEM, 1 μm ; D, 20 μm .



BrdU

En cuanto a los marcadores exógenos, en primer lugar estudiamos la incorporación de la BrdU. Mediante un único pulso de 50 mg/Kg de BrdU y sacrificio tras una hora, no detectamos ninguna célula BrdU+ en contacto con la cavidad ventricular. Ampliando el espectro de caza (4 inyecciones en 8h, una cada 2h con sacrificio 2h tras la última inyección) sólo detectamos 1 célula BrdU+ junto al 3V. Esta expresaba GFAP y se localizaba en el extremo ventral de la franja intermedia (Figura 48A). Con el objetivo de ampliar más el rango de tiempo de detección de células en fase S, incrementamos el

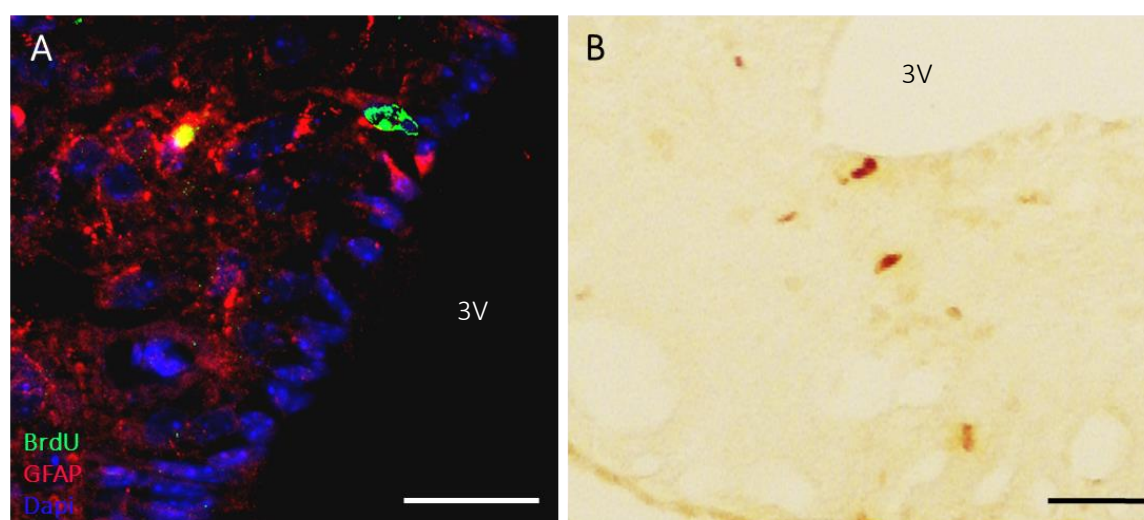


Figura 48. Proliferación in vivo. Detección mediante el marcador exógeno BrdU. A) Inmunofluorescencia anti-BrdU y anti-GFAP. El protocolo de pulso y caza en este caso fue de 4 inyecciones cada 2h durante 8h. En la imagen se muestra una célula BrdU+ localizada en la Fi GFAP+. B) Mediante el protocolo de inyecciones de 10 días de inyecciones, una cada 12h, y sacrificio 12h después de la última inyección. El número de células marcadas en contacto con la cavidad ventricular aumentó cuatro veces con respecto al protocolo anterior. Todas las células se localizaban en la EM y Fv. Barra de calibración en A y B 50 µm.

número y tiempo de administración de la BrdU, similar a protocolos de inyección de otros trabajos publicados (Lee et al. 2012; Pérez-Martín et al. 2010). Seguimos dos protocolos distintos, donde, en el primero, administramos BrdU durante 5 días mediante una inyección de 50 mg/kg cada 12h y sacrificamos a las 12h después de la última inyección. Aquí no encontramos células marcadas en contacto con el 3V. El segundo protocolo ampliaba el rango de 5 a 10 días de inyecciones, 1 cada 12 horas. En este caso se encontraron 4 células marcadas en contacto con el 3V, solo localizadas en la EM (Figura 48B).

³H-timidina y mitosis

Tras los protocolos de administración de ³H-timidina cada dos horas, durante 8 horas y sacrificio dos horas tras la última inyección (3H-timidina 1d S0), no se observaron células marcadas tapizando el 3V. En protocolos de inyección de 10 días, siguiendo el protocolo de una inyección cada 12 horas y sacrificio a las 12 horas, sólo localizamos una célula en contacto con la luz ventricular en la EM y se trataba de la célula tipo 1 central (Figura 49).

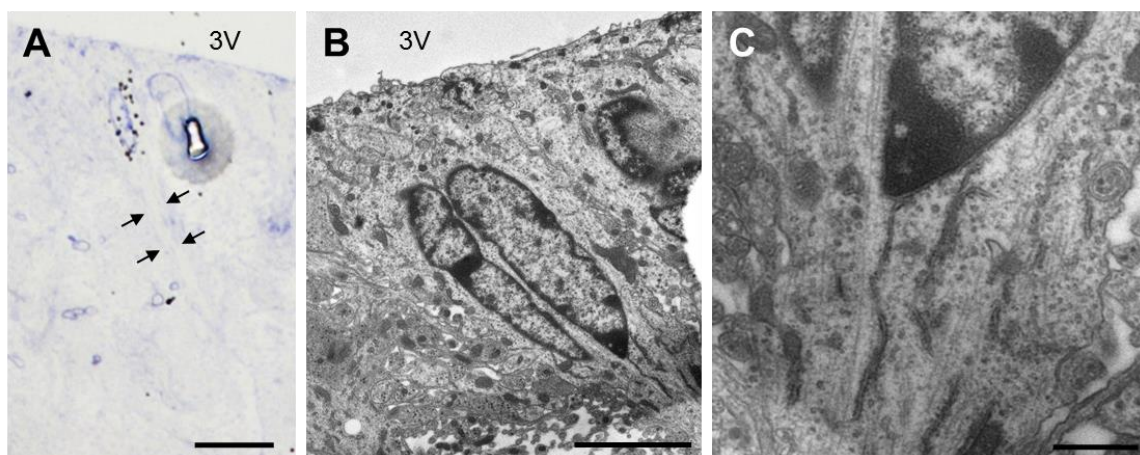


Figura 49. Proliferación *in vivo*. Detección mediante el marcador exógeno 3H-timidina. A) Semifino del 3V de un ratón inyectado con ³H-timidina durante 10 días, (una inyección cada 12 horas y sacrificio 12 horas tras la última inyección), donde se realizó autorradiografía para revelar las células que habían incorporado la ³H-timidina, por encontrarse en fase S en el momento de la administración de la misma. Con este protocolo de inyecciones, esta fue la única célula marcada con granos de plata en contacto con la luz ventricular. Se encontraba en la pared de la EM y se trataba de una célula alargada con un grueso proceso basal (flechas). B) Imagen al TEM de la célula marcada con ³H-timidina. Se trataba de un tanicito tipo1, con la típica morfología alargada y núcleo alargado que presentaba una profunda invaginación, viéndose en como dos porciones separadas de núcleo. La cromatina se encontraba condensada en grandes grumos y adherida a la membrana. C) Detalle de la porción proximal del proceso basal, repleto de microtúbulos, vesículas y cisternas de RER, típico de un tanicito tipo1. EM, eminencia media; 3V, tercer ventrículo. Barra de calibración en A, 10 μ m; B, 5 μ m; C, 1 μ m.

En todos los ejemplares estudiados con microscopía electrónica, sólo se encontró una célula en fase M (mitosis), y ésta se localizaba en la EM, muy cerca de la cavidad ventricular, *peri* sin llegar a contactar con ella (Figura 50). Esta célula se marcaba con partículas de oro con anticuerpos primarios contra la proteína vimentina.

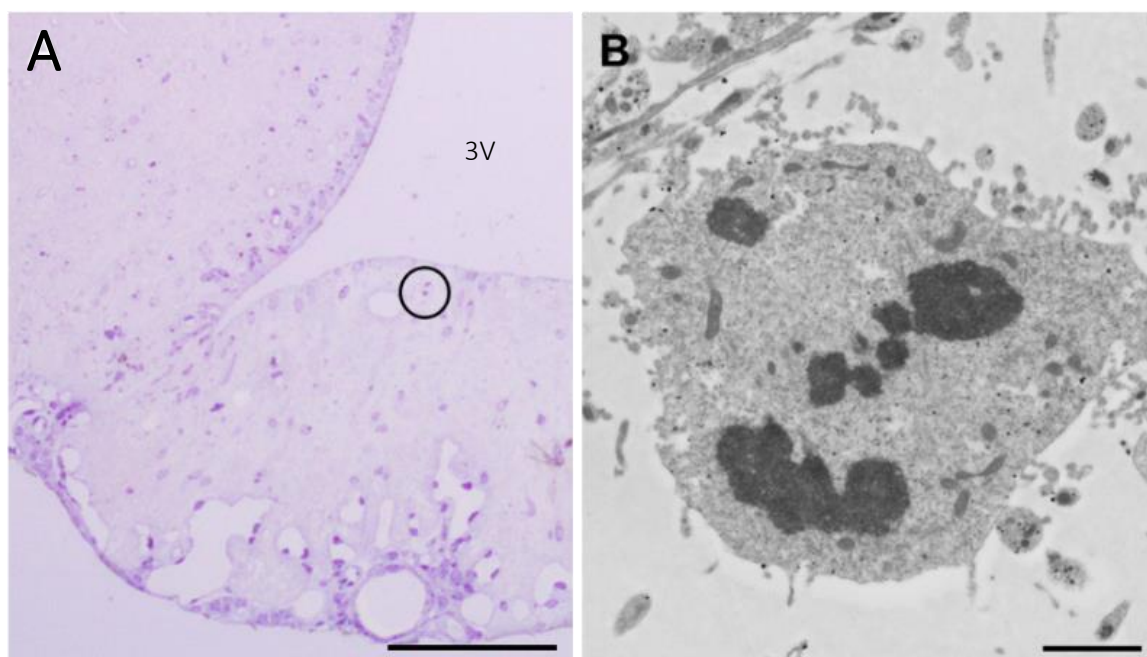


Figura 50. Mitosis en la EM. A) Sección semifina del marcaje con oro de la detección de la proteína vimentina. En ella se encontró la única mitosis detectada en la totalidad del presente estudio. Esta se localizó en la EM, muy próxima al lumen del 3V (círculo). B) Imagen al TEM de la célula en mitosis. Se aprecia un tenue marcaje de oro, resultado de la detección con anticuerpos de la proteína vimentina. 3V, tercer ventrículo. Barra de calibración en A, 100 μ m; B, 2 μ m.

Estudios de supervivencia

Dado que la capacidad proliferativa de la pared del 3V reviste mucha controversia, a qué tipo o tipos celulares es capaz de generar está todavía más discutido.

Siguiendo el protocolo de administración durante diez días de administración (dos inyecciones por día separadas entre ellas por 12 horas) de los marcadores exógenos de la proliferación antes utilizados, BrdU, para los estudios inmunohistoquímicos, o ^3H -timidina, para los estudios de autorradiografía, y esperando diez días tras la última inyección (respectivamente BrdU d10 s10 y ^3H -timidina d10 s10), protocolos que denominamos como “de tiempo largo de supervivencia”, podíamos aproximarnos a la progenie de las células que habían incorporado los marcadores. Con la BrdU, se triplicó el número de células marcadas en contacto con la luz ventricular, pero siempre en la EM. Con ^3H -timidina no se identificaron células marcadas en contacto con la luz ventricular, sino que encontraban en el parénquima de la EM, en concreto eran células similares a tanticitos tipo 1 centrales, las que denominamos previamente como “células indeterminadas”. Estas células se caracterizaban por tener una morfología alargada, contenían un núcleo ovalado de cromatina condensada en

grupos y su citoplasma contenía una densa red de microtúbulos (Figura 51A). También se marcaron a tiempos abundantes células de microglía que acompañaban a neuronas de los distintos núcleos hipotalámicos de alrededor (Figura 51B).

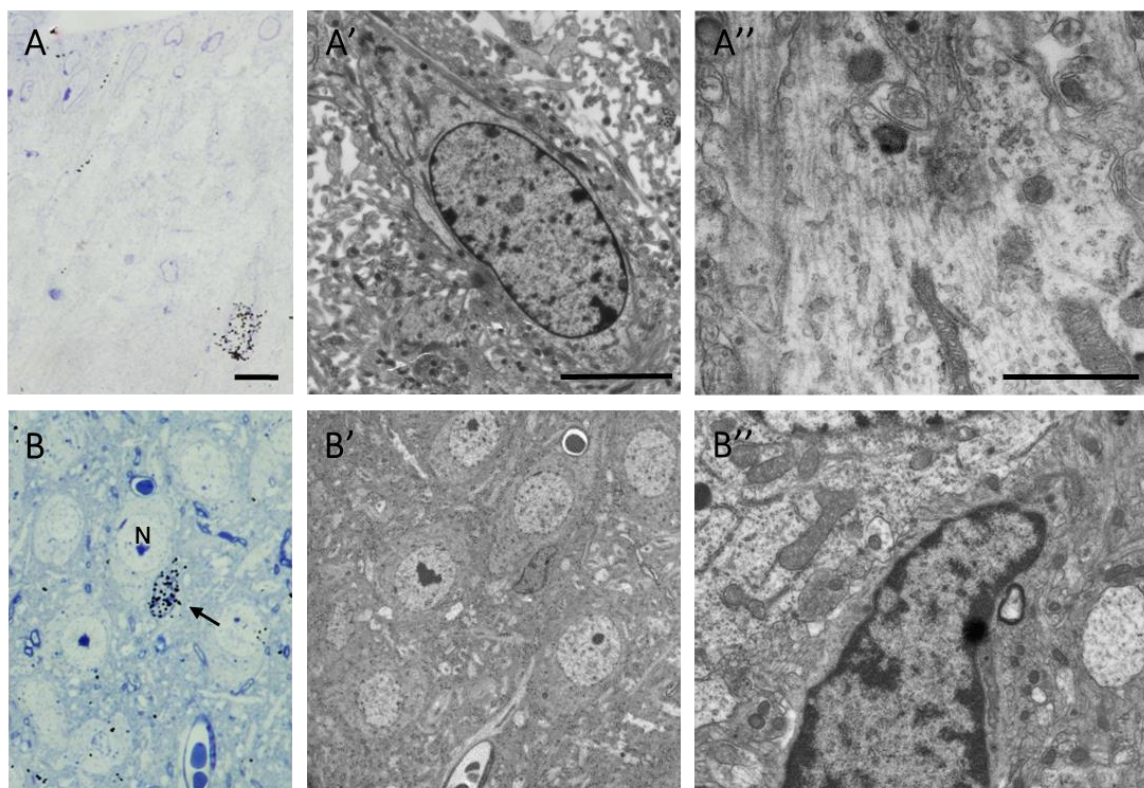


Figura 51. Tipos celulares generados in vivo. A) Tras diez días de inyecciones (una inyección cada 12h) y sacrificio diez días después de la última inyección, detectamos abundantes células marcadas en el parénquima de la EM. A') Al observarlas al TEM, muchas de ellas correspondían a las células indeterminadas de la EM, de soma alargado y núcleo ovalado, que muestran características similares a los tanicitos tipo 1, sin contactar con la cavidad ventricular. A'') Cuando las observamos en detalle, se hace patente el parecido con dichos tanicitos, pues presentan una gruesa prolongación citoplasmática que comienza con una densa red de microtúbulos donde se intercalan cisternas de RER, vesículas y mitocondrias. B) El otro tipo mayoritario detectado fueron pequeñas células (flecha) que acompañaban a las neuronas del núcleo ARC (N) que identificamos como microglía. B') Se trata de células oscuras de morfología fusiforme. B'') Estas presentan un escaso citoplasma oscuro, en el que resulta difícil distinguir orgánulos, apenas contienen pequeñas mitocondrias, cuerpos densos y polirribosomas. El núcleo es alargado y de cromatina condensada en pequeños grumos y adherida a la membrana nuclear. N, neurona. Barra de calibración en A y B, 10 μm ; A', 5 μm ; C, 1 μm ; B', 25 μm ; B'', 2 μm .

4.4 Trazado genético del linaje celular en 3V

Sabiendo que existía proliferación, aunque en pequeña magnitud, y que existían distintos tipos de tanicitos distinguibles por morfología y marcadores moleculares, consideramos de gran interés utilizar animales transgénicos para realizar un trazado genético del linaje celular. Basándonos en lo que sabemos de otros nichos neurogénicos, como la SVZ, parece que la naturaleza de las células madre neurales adultas es glial, concretamente se trata de astrocitos GFAP+.

En el 3V, las células GFAP+, expresan intensamente vimentina y GLAST. En animales *Vim::CreER^{T2}*, a tiempos cortos de supervivencia tras inducción de mGFP con tamoxifeno, detectamos que las células que activamente expresaban vimentina, eran los tanicitos tipo 1 y 5 (Figura 52A) y las células multiciliadas (Figura 52B) en gran cantidad (Vim^{HI}), los tipo 3-4, en menor cantidad (Vim^{LO}), y nada los tanicitos tipo 2 (Figura 52C). En las células Vim^{HI} , aunque mGFP se asociaba a membrana plasmática, también encontrábamos partículas de oro en el citoplasma. En las células endimarias, además, el marcaje se encontró en los cilios. Comparando tiempos cortos (5 días) con tiempos largos (30 días post-inducción) intentamos predecir el curso del linaje celular. A tiempos largos, el marcaje disminuía, pero todavía era posible observar que las células Vim^{HI} continuaban estando marcadas (Figura 52D), aunque existía un aumento de la marca en la franja intermedia, donde se ubicaban las células tipo 3-4, como si se diera un movimiento descendente de las células marcadas intensamente en tiempos cortos. Las células tipo 2 continuaban sin presentar marcaje GFP a tiempos largos (Figura 52E). Según este análisis y, según los tiempos de “pulso y caza” utilizados, las células tipo 2 no procederían de la célula vimentina+ (Vim^{HI} o Vim^{LO}) (Figura 52F).

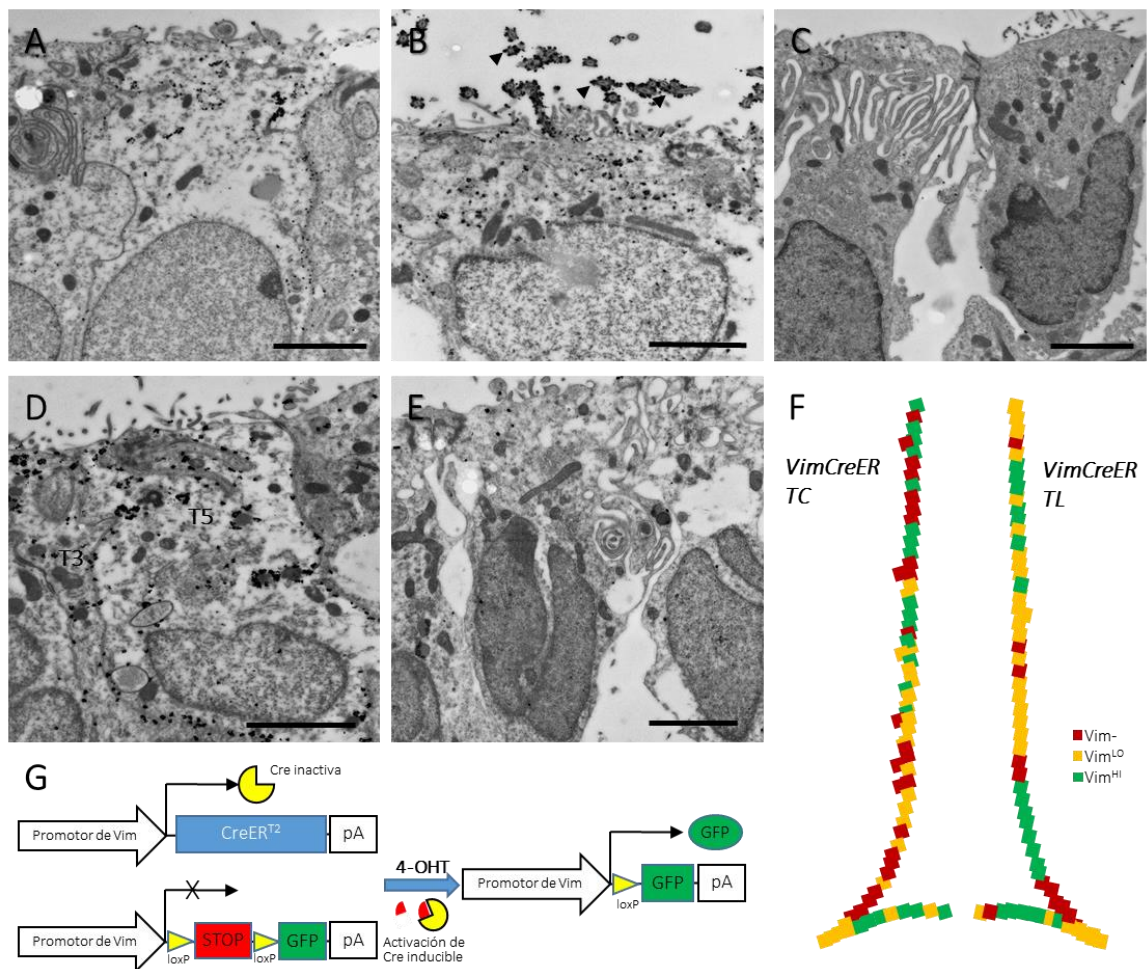


Figura 52. Trazado genético del linaje celular Vim+. A) Tras un periodo corto (TC) de inducción, los tanicitos T5 se encuentran intensamente marcados. B) Tras el mismo periodo, las células ependimarias también resultaban GFP+, mostrando un intenso marcaje en los cilios, algo que ya era visible en fluorescencia. (puntas de flecha). C) Mientras, los tanicitos T2 fueron negativos para GFP. D) Tras un periodo de tiempo largo (TL) después de la inducción, los tanicitos T5 permanecían marcados, y aumentaba el número de tanicitos T3 y T4 marcados. E) Por el contrario, los tanicitos T2 continuaban sin mostrar marcaje GFP. F) Representación gráfica del marcaje obtenido el TC vs TL. Destaca la mayor intensidad en marcaje en la Fi donde se situarían los tanicitos T3 y T4, y la reducción en la intensidad de marcaje dorsalmente, desde el inicio de la Fd, donde se encuentran los tanicitos T5. G) El ratón *Vim::CreERT²* expresa GFP en las células dónde y cuándo se expresa la proteína vimentina en el momento de inducir con tamoxifeno. T3, tanicito tipo 3; T4, tanicito tipo 4; T5, tanicito tipo 5, TC, tiempo corto tras la inducción; TL, tiempo largo tras la inducción, Vim-, ausencia de marcaje GFP; Vim^{LO}, marcaje débil de GFP; Vim^{HI}, marcaje intenso de GFP; 4-OHT, tamoxifeno. Barra de calibración en A, B, C, D y E, 2 μ m.

Para confirmar estos datos mediante otro enfoque, utilizamos un ratón transgénico *RaxCreRT*. Rax es un factor de transcripción implicado en la formación de neuronas de los núcleos ARC y VMH durante el desarrollo (Lu et al. 2013). Según Lu *et al.*, su expresión se limita a los dominios I y III del 3V durante el desarrollo, siendo el dominio III la RCV en el adulto (Miranda-Angulo et al. 2014), mientras que el dominio I en el adulto, queda fuera del hipotálamo tuberal, en el límite de entre el tálamo y el hipotálamo. Se hicieron experimentos de “pulso y caza” y se estudió la expresión de GFP mediante el marcaje con partículas de oro en los diferentes tipos de tanicitos a tiempos cortos (3 días) y largos (30 días post-inducción). A tiempo corto, las células que expresaban Rax activamente se localizaban en la RCV, siendo el fenotipo mayoritario el tipo 1 y 5 (Figura 53A y B), muy débil o escaso en las células 3 y 4, y ausente en las células tipo2 (Figura 53C), resultados superponibles a la expresión de vimentina. A tiempos largos, se marcaron los tanicitos tipo 3-4 (Figura 53D), células endimarias ventrales de la franja dorsal (Figura 53E), neuronas yuxtaventriculares (ya presentes a tiempos cortos) pero no se observó marcaje en las células tipo 2, al igual que en los transgénicos *Vim::CreER^{T2}*. En ningún caso se observó nuevo marcaje de neuronas a tiempos largos. Cabe destacar, que se observó una traslación de la marca del citoplasma al núcleo en algunas células.

La interpretación que nos sugieren estos datos es la siguiente, la célula *Vim^{Hl}/Rax^{Hl}* a tiempos cortos es la célula tipo 5. Esta célula, que posee expresión de Rax, es fuente de células endimarias y podría ser de las células de fenotipo intermedio, las tipo 3-4, aunque con los datos que tenemos no es posible descartar que sea la célula tipo 3 la que vaya adquiriendo una mayor expresión de vimentina, y se diferencie a célula tipo 5. La célula tipo 2 no expresa Vimentina ni Rax, ni procede de las células que lo expresan. Este experimento, tal y como lo hemos explicado, implica que la célula vimentina+ sea probablemente una célula precursora gliogénica y endimogénica, pero no neurogénica, aunque posteriormente discutiremos este apartado ampliamente.

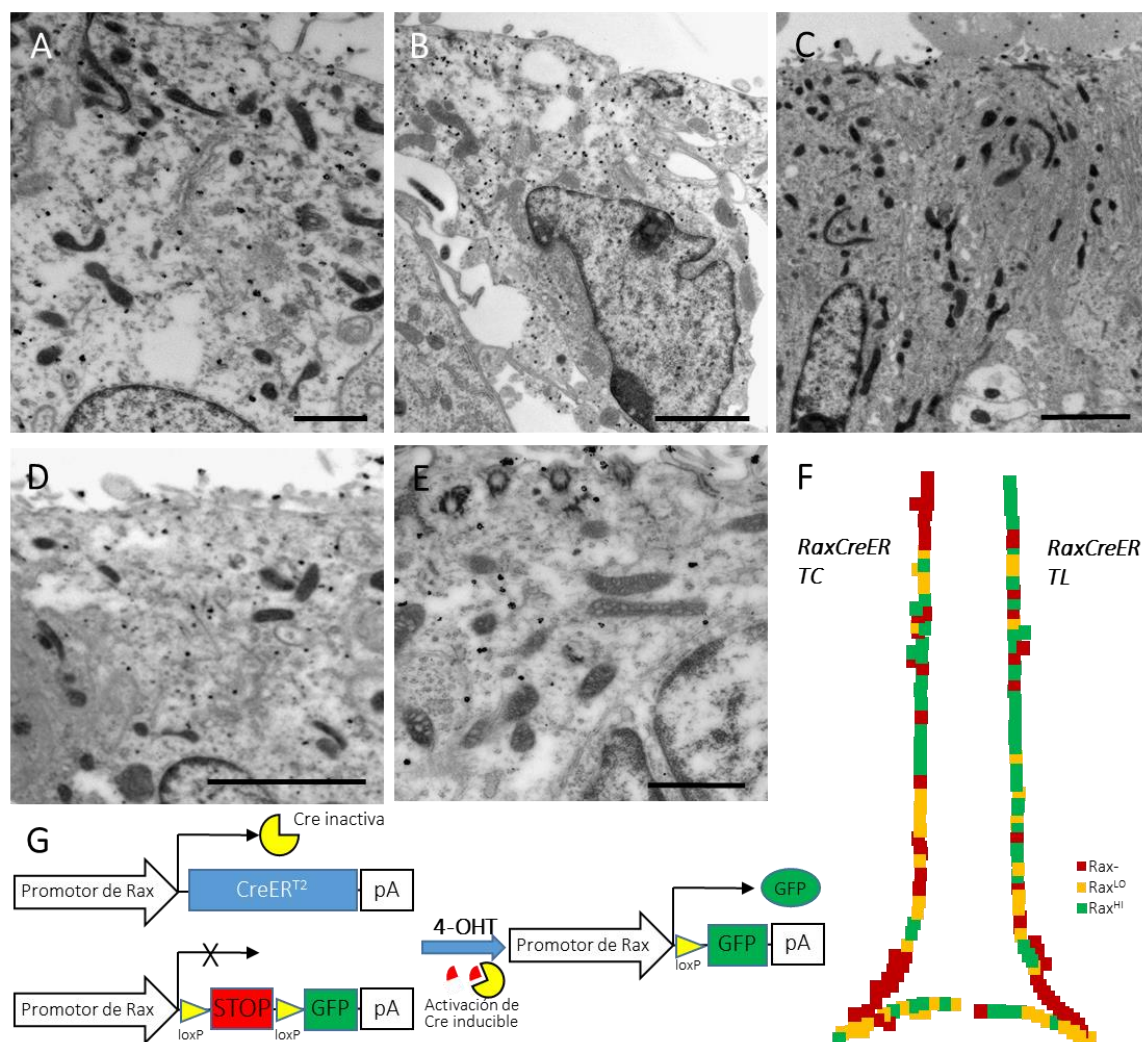


Figura 53. Trazado genético del linaje celular Rax+. A) El tanicito tipo 5 expresa GFP a tiempo corto de inducción ya que expresan la proteína RAX. B) Los tanicitos tipo 1, son junto con los tipo 5, los más intensamente marcados a tiempo corto. C) Por el contrario, los tanicitos tipo 2 no expresaban GFP a tiempo corto, con lo que se deduce que tampoco expresan RAX. D) A tiempo largo tras la inducción, las células ependimarias más próximas a los tipo 5 presentan el marcaje con oro que detecta la GFP. Estas células a tiempo corto eran negativas, por lo que parece que derivan de una célula que fue RAX+. E) A tiempo largo, el marcaje GFP comienza a encontrarse en los tanicitos tipo 3 y 4 con mayor frecuencia. En la imagen se muestra el detalle del citoplasma de un tanicito tipo 3 marcado con partículas de oro. F) Diagrama en el que se muestra la evolución del marcaje de GFP bajo el promotor de RAX, desde el tiempo corto tras la inducción, hasta el tiempo largo. A tiempo corto, como hemos visto, los tanicitos tipo 5 y 1 son los que más GFP expresan. Las multiciliadas y los tipo 2 quedan sin marcaje. Sin embargo, a tiempo largo, mayor número de tanicitos tipo 3 y 4 presentan el marcaje GFP, y algunas multiciliadas cercanas a los tipo 5. G) El ratón *Rax::CreER^{T2}* expresa GFP en las células dónde y cuándo se expresa la proteína RAX en el momento de inducir con tamoxifeno. TC, tiempo corto tras la inducción; TL, tiempo largo tras la inducción, Rax-, ausencia de marcaje GFP; Rax^{LO}, marcaje débil de GFP; Rax^{HI}, marcaje intenso de GFP; 4-OHT, tamoxifeno. Barra de calibración en A y D, 1 μ m; B, C y E, 2 μ m.

4.5 Perfil morfológico de los tanicitos del 3V durante el desarrollo postnatal y envejecimiento

Tras los datos obtenidos previamente, y establecida una hipótesis de linaje celular consideramos de interés el estudio de dos momentos de la vida del ratón, la etapa postnatal temprana, y el envejecimiento, por ser el principio y el fin del proceso que estudiamos en el cerebro adulto.

4.5.1 Desarrollo postnatal

Las células multiciliadas en la RCV continúan generándose a día 4-7 postnatal (P4-P7). Datos obtenidos del mutante *Lhx2*, en los que la ausencia de expresión del gen a partir de P4 inducía un aumento de células multiciliadas en regiones ventrales, sugería que podía estar implicado en el mantenimiento del fenotipo de tanicito frente al de célula ependimaria (Salvatierra et al. 2014). *Lhx2* y *Rax* son genes relacionados, estando *Lhx2* se permite la expresión de *Rax* a partir de P1, y *Rax* se encargaría de mantener a su vez al tanicito como tal mediante inhibición de genes ciliogénicos (*FoxJ1*) o ependimogénicos (*Rarres2*). Por tanto, el periodo postnatal se trata de un periodo dinámico en el que se están constituyendo las poblaciones futuras del 3V adulto.

Al estudiar animales a días P7 y P15 observamos que el 3V de ratón se desarrolla en dirección caudo-rostral, ya que a P7, los niveles más maduros (más parecidos al adulto) eran caudales, no siendo hasta P15 cuando se observaba en regiones rostrales el alcance de la madurez. La madurez implica una mayor diversidad celular, una disminución de células de aspecto indiferenciado y un aumento de células comparables a los tanicitos descritos en adultos. En la RCV y EM de P7 observábamos gradaciones fenotípicas. Las células, dispuestas a modo de epitelio pseudoestratificado, eran extremadamente electrodensas, con pequeñas expansiones citoplasmáticas hacia la luz ventricular, largas cisternas de RER y abundantes polirribosomas libres, lo que nos indicaba una gran actividad de síntesis de proteínas. El núcleo, de borde irregular pero sin invaginaciones, es rico en heterocromatina, sobre todo adherida a la envoltura nuclear (Figura 54A). Presentaban cortas uniones estrechas y uniones adherentes en el extremo más apical del soma quedando el resto libre de uniones (Figura 54B). El proceso basal es rico en microtúbulos y mitocondrias alargadas (Figura 54C) y contacta con los vasos sanguíneos fenestrados del sistema porta. En definitiva, estas células, si pudiéramos equipararlas con el adulto, serían comparables al tanicito tipo 2, aunque con

mayor cantidad de RER. Del mismo modo, las células de las invaginaciones laterales son iguales a las centrales, y presentan un fenotipo oscuro, parecido al descrito como tipo 2^{EM}. Conforme avanzamos dorsalmente, aunque este tipo celular se distribuye ampliamente en el 3V, se puede observar un citoplasma más claro y una cromatina menos condensada (Figura 54D, asterisco negro). Aparecen cuerpos densos en el citoplasma (Figura 54E, puntas de flecha) que se harán muy abundantes en las células ya cercanas a la región multiciliada. Lo más destacable es la aparición de los anillos comunicantes (Figura 54E, asterisco) y su aumento en número y tamaño cuanto más dorsalmente nos encontramos, como ocurre en el adulto con los tunicitos tipo 3, 4 y 5. El RER, en estos tipos sigue siendo abundante (Figura 54E, flechas).

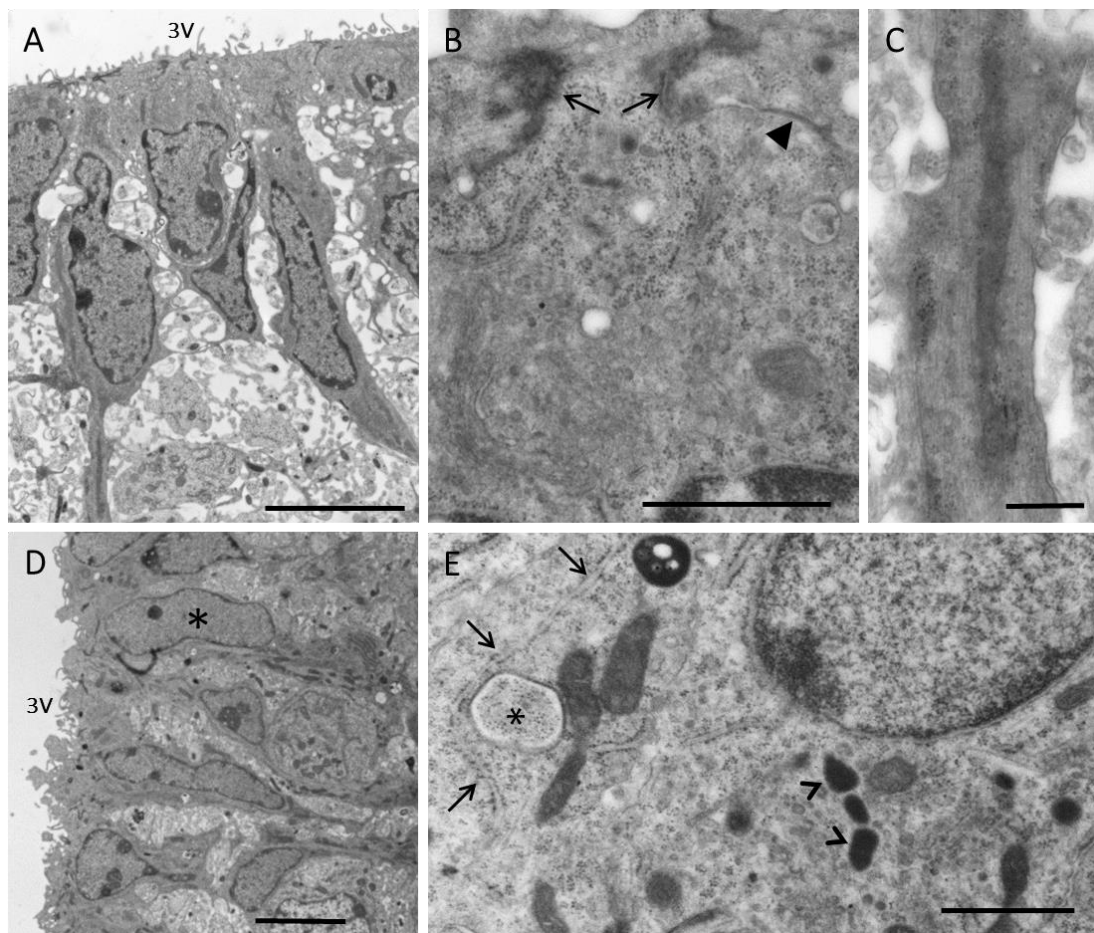


Figura 54. Caracterización ultraestructural de los tunicitos de los tunicitos a los 7 días de desarrollo postnatal (7). A) Los tunicitos localizados ventralmente a P7 destacan por lo altamente electrodensos que son. Son de morfología alargada, al igual que su núcleo. Éste es de cromatina condensada y bordes irregulares pero carentes de invaginaciones. B) Detalle de este tipo celular en el que se aprecian las uniones adherentes (flechas) y estrechas (punta de flecha). Contienen abundantes polirribosomas en su citoplasma. C) Detalle del proceso basal de este tipo celular, no muy grueso como en el adulto, pero ya contiene la maquinaria necesaria para el tráfico vesicular. D) Las paredes laterales de la RCV también se encuentran tapizadas por células muy electrodensas, aunque van apareciendo menos electrodensas conforme ascendemos en el eje dorso ventral. El núcleo de estas células es de cromatina más laxa que el anterior en algunas células (asterisco). E) Conforme ascendemos adquieren nuevas características aparte de la pérdida de oscuridad de sus citoplasmas. Comienzan a aparecer los anillos comunicantes (asterisco) y abundantes cuerpos densos (puntas de flecha). Contienen largas cisternas de RER (flechas). Barra de calibración en A y D 5 μ m, B y E, 1 μ m; C, 500 nm.

En P15, la morfología celular es muy similar a la del adulto, pero se mantienen largas cisternas de RER y abundantes cuerpos densos en algunas células. Las células tipo 1 de la EM ya tienen todas las características propias del adulto y es frecuente que presenten el núcleo profundamente invaginado (Figura 55A). Las células tipo 2 mantienen las características ultraestructurales mostradas a P7, es decir, células muy electrodensas, de núcleo con borde irregular pero escasamente invaginado y cromatina condensada. Además, mantienen el contacto con los capilares fenestrados, es decir, carentes de barrera hematoencefálica, localizados en el núcleo ARC. Estas características se mantienen en el adulto como ya vimos (Figura 55B). Dorsalmente a los tipo 2, encontramos células reconocibles como tanicitos tipo 3, de citoplasma oscuro, pero nunca llegando al nivel de los tipo 2, (Figura 55C, asterisco blanco) y tipo 4, de citoplasma más claro (Figura 55C, asterisco negro). Cercanas a las células multiciliadas, los tanicitos tipo 5 son más abundantes, generándose frecuentemente un engrosamiento del epitelio que desaparece en el adulto (Figura 55D).

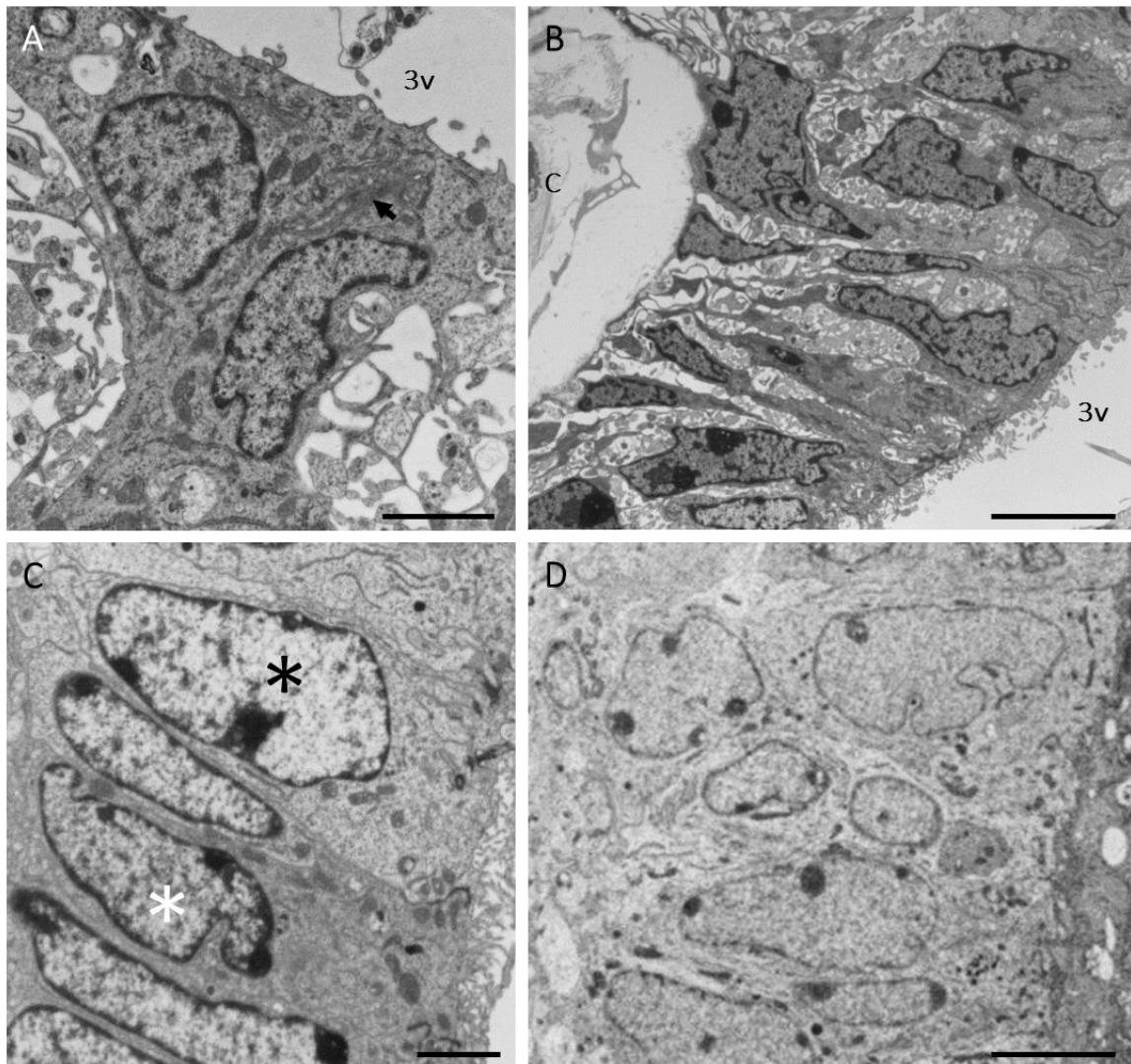


Figura 55. Caracterización ultraestructural de los tanicitos a los 15 días de desarrollo postnatal (P15).

A) La EM ya muestra los tanicitos tipo 1 completamente diferenciados. Presentan las características ultraestructurales del tipo 1 en el adulto, donde destaca su morfología triangular, el grueso proceso basal y su gran aparato de Golgi (flecha). El núcleo presenta ahora bordes redondeados y se encuentra en ocasiones profundamente invaginado, como en la imagen, en la que parece que la célula presente dos núcleos. B) Las células tipo 2, sin embargo, continúan invariables y así seguirán hasta el adulto. Son células alargadas generalmente, de contorno irregular y muy electrodensas. Su núcleo, también de contorno irregular, contiene cromatina altamente condensada. Mantiene el contacto con los capilares fenestrados (V) localizados en el núcleo ARC. C) Dorsalmente a los tipo 2 encontramos los tanicitos tipo 3 y 4, de características ultraestructurales como las encontradas en el adulto. D) Las tipo 5 también están presentes y forman al lado de las células endimarias multiciliadas, un engrosamiento a modo de punto de intenso crecimiento. 3V, tercer ventrículo; C, capilar fenestrado. Barra de calibración en A y C, 2 μm ; B y D, 5 μm .

Por tanto, parece ser que una variante indiferenciada de la célula tipo 2 se encuentra ya presente y de forma mayoritaria tapizando el 3V postnatal temprano, para posteriormente ir apareciendo el resto de tipos celulares.

4.5.2 Envejecimiento

Estudiamos ratones con 22 meses de edad (660 días). En P660 el epitelio del 3V está ocupado por células endimarias dorsales y en la porción ventral, correspondiente a la RCV, por células en su mayoría muy claras. Presentan un citoplasma muy pobre en orgánulos y acumulación de grandes gotas lipídicas, probablemente por efecto de la edad (Figura 56A y B), deduciéndose un envejecimiento de los tanicitos en una forma más fibrosa. Se intercalan muy puntualmente células oscuras que no presentan gotas lipídicas, y sí grandes aparatos de Golgi y abundantes mitocondrias, como en el animal adulto joven, las cuales aparentemente mantendrían su función (Figura 56C). Los tanicitos tipo 2 prácticamente han desaparecido. Podemos resumir que, en general, se produce una fibrosis de la pared ventricular donde los tanicitos parecen volverse estructurales, perdiendo su función normal en el ratón adulto. Por otro lado, los tanicitos tipo 2, de aspecto más indiferenciado, van perdiéndose con la edad.

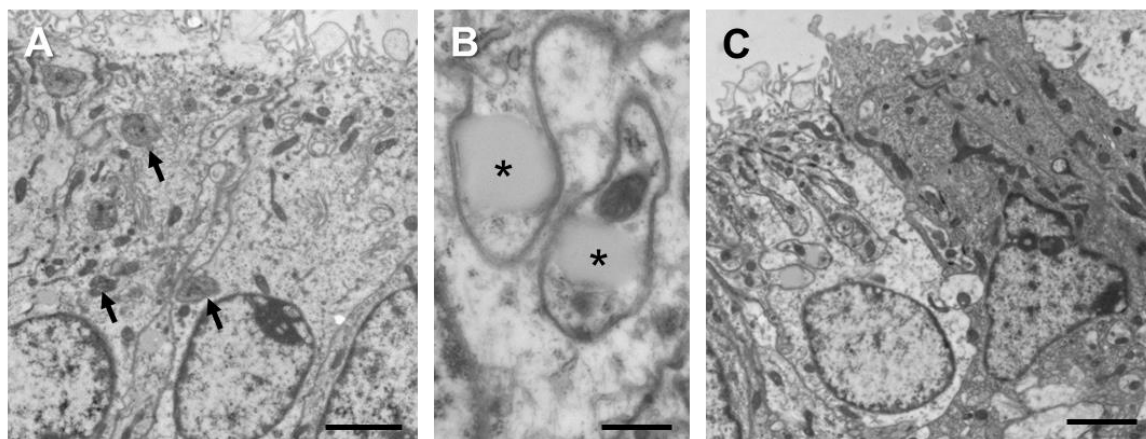


Figura 56. Caracterización ultraestructural de los tanicitos en el envejecimiento. A) La porción más ventral de la RCV apenas presentan tanicitos tipo 2. Abundan los tanicitos tipo 3 y 4. Pero sobretodo, estos últimos aparecen más electrolúcidos que en el adulto, con abundancia en cuerpos densos (flechas) y gotas lipídicas. B) Detalle de las gotas lipídicas encontradas frecuentemente en las células de citoplasma más claro. C) Todavía es posible encontrar células electrodensas en la pared del 3V, pero son muy poco frecuentes. Estas todavía presentan grandes aparatos de Golgi, con lo que al parecer, mantendrían su función de transporte vesicular. Barra de calibración en A y C, 2 μ m; B, 500 nm.

4.6 Simetría

La simetría es una característica de la mayoría de organismos pluricelulares. En reconstrucciones bidimensionales del 3V destacaba la presencia de simetría, que al reproducirse en varios animales, consideramos digna de mención. La simetría regional es un hecho generalizado en el SNC, pero en este caso encontramos simetría a nivel de células individuales. Al igual que los núcleos neuronales se encuentran a ambos lados del 3V, no se espera que sean simétricos célula a célula, ni por supuesto, cada célula de cada hemisferio, como astrocitos, microglía, etc.

Al estudiar cortes coronales del 3V siempre nos encontramos con una luz ventricular con dos paredes epiteliales enfrentadas que tienen su base en la EM. Ambas paredes, en regiones dorsales (frangas intermedia y dorsal) establecen contacto directo quedando la luz del ventrículo convertida en una cavidad virtual donde se entremezclan cilios y microvellosidades de lados opuestos. Al estudiar cortes ultrafinos reconstruidos, observamos una correspondencia célula-célula entre todos los tipos de tanicitos estudiados en la pared lateral del 3V, de modo que a una célula tipo 5 en un lado, le correspondía, una célula tipo 5 en el lado opuesto (Figura 57). La mayor simetría celular se encontraba en las zonas de fusión entre paredes opuestas. Los tanicitos tipo 2 o 3 ventrales (muy oscuras) en ocasiones aparecían asociados en parejas sin correspondencia con el lado opuesto (Figura 57).

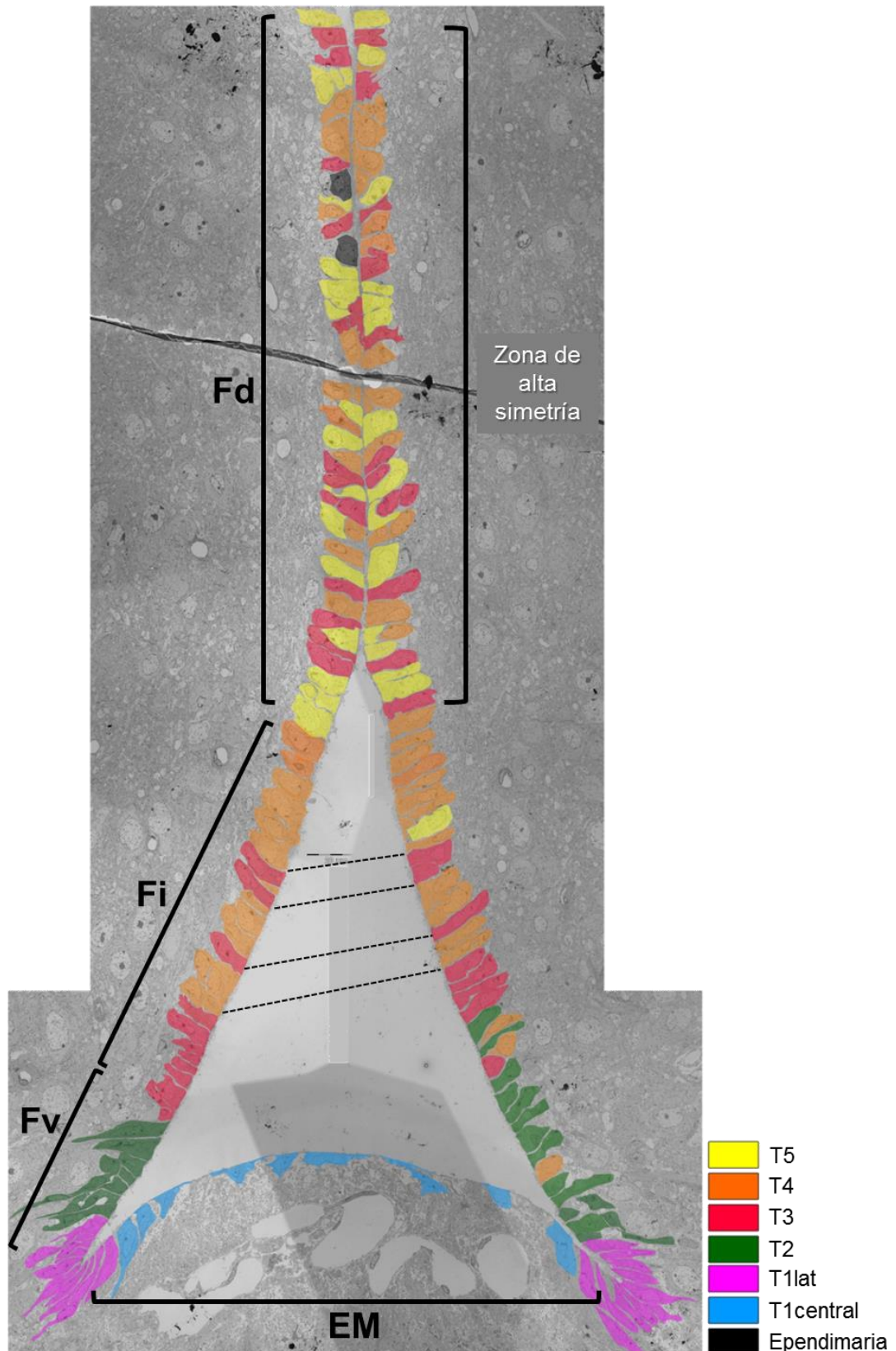


Figura 57. Simetría. Ultrafino de la RCV donde se han coloreado las células en función del tipo para facilitar la visualización de la simetría. Las zonas donde se fusionan las paredes siempre muestran una simetría mayor. Conforme descendemos, esta simetría se mantiene en cierto grado, pero desplazada como muestran las líneas discontinuas. Fd, franja dorsal; Fi, franja intermedia; Fv, franja ventral; EM eminencia media; T1central, tancito tipo 1 central; T1lat, tancito tipo 1 lateral; T2, tancito tipo 2; T3, tancito tipo 3; T4, tancito tipo 4; T5, tancito tipo 5; RCV, región caudoventral no multiciliada.

Discusión

5 Discusión

En este trabajo hemos descrito de forma exhaustiva las poblaciones celulares que constituyen el 3V. Proponemos una nueva clasificación de los tanicitos basada en una caracterización ultraestructural y molecular, que las diferencia, morfológicamente y pudiera ser que incluso, funcionalmente. Destacamos la descripción de un tipo de tanicito, el tipo 2 en la clasificación propuesta en este trabajo, por presentar unas características morfológicas y moleculares que no se corresponden a ninguno de los cuatro tipos descritos hasta el momento. Por último, y mediante el estudio de la proliferación y el uso de animales transgénicos, hemos intentado dilucidar el controvertido rol neurogénico y gliogénico del 3V. A continuación pasamos a discutir los distintos hallazgos.

5.1 Los tanicitos no son A + B. Una nueva clasificación

El epéndimo del 3V de ratón adulto está formado por células ependimarias multiciliadas y por los tanicitos. Los tipos de tanicitos establecidos clásicamente se describieron como $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, según el lugar que ocupaban en la pared ventricular y hacia dónde proyectaban sus procesos basales (Akmayev & Popov 1977; Rodríguez et al. 1979). Ultraestructuralmente, los tanicitos $\beta 1$ y $\beta 2$ eran distinguidas por otros autores debido a su ubicación diferencial en la región central de la EM o en las invaginaciones laterales del receso infundibular respectivamente. Sin embargo, los tanicitos $\alpha 1$ y $\alpha 2$, los describían como morfológicamente similares, y la distinta nomenclatura se basaba en que los tanicitos $\alpha 1$ expandían su proceso basal hacia el núcleo arcuato (ARC), mientras que los $\alpha 2$ lo enviaban hacia el núcleo hipotalámico ventromedial hipotalámico (VMH) (Millhouse 1971). Esta clasificación ha sido la utilizada por la comunidad científica, a pesar de que ha habido otras caracterizaciones algo más confusas (Mathew 2008) que no han sido adoptadas en estudios posteriores. Es común que en distintos trabajos, localicen a los tanicitos en regiones diferentes. Se habla incluso en estudios recientes de subtipos de tanicitos $\alpha 2$, dorsales y ventrales (S C Robins et al. 2013).

Una parte de este trabajo la hemos dedicado a establecer una nueva clasificación de los tipos de tanicitos que hay en el 3V. En nuestro análisis hemos

encontrado en la región caudoventral (RCV) hasta cinco tipos de tanicitos con características propias, y células con fenotipos intermedios, independientemente de hacia dónde enviaran estas células el proceso basal, rompiendo pues una de las premisas de las clasificaciones anteriores. La correspondencia por localización sería: célula tipo 1 central ($\beta 2$), célula tipo 1 lateral ($\beta 1$), célula tipo 2 ($\beta 1$ y $\alpha 2$ ventral), células tipo 3, 4 y 5 ($\alpha 2$ dorsal y $\alpha 1$). Pasamos a explicar el porqué de esta nueva clasificación.

Basándonos en nuestro análisis, los tanicitos $\beta 1$ y $\beta 2$ clásicos, no presentaban, suficientes diferencias ultraestructurales y moleculares como para distinguirlos en dos tipos celulares, por lo que decidimos fusionarlos en un mismo tipo 1. Sin embargo, para facilitar la descripción, los hemos clasificado en central y lateral en función de su posición con respecto a la EM. Clásicamente, los tanicitos $\beta 1$, se definían como células que emitían expansiones citoplasmáticas hacia la luz ventricular (Akmayev 1969), a diferencia de las células $\beta 2$, que no las presentaban. Sin embargo, nosotros no hemos observado esas expansiones en estas células, sólo pequeños pliegues de la membrana apical debidos a la compresión por las células adyacentes, ya que disponen de menor espacio en la zona más angulada de la invaginación. Otra característica distintiva era la presencia en los tanicitos $\beta 2$ de dictiosomas del aparato de Golgi únicamente en el proceso basal, mientras que los tanicitos $\beta 1$, también los mostraban en el soma (Rodríguez et al. 2005). Nosotros hemos observado dictiosomas en soma y proceso basal con igual frecuencia en ambos tipos celulares. La ausencia de gotas lipídicas en los tanicitos $\beta 2$, presentes en células $\beta 1$ tampoco hemos podido confirmarla, ya que nosotros sí hemos observado gotas lipídicas en los tanicitos $\beta 2$. Quizá, estas diferencias que nosotros no observamos se deban a características propias de las especies estudiadas, dado que los estudios previos se realizaron en rata y nosotros hemos estudiado el ratón. La única diferencia que encontramos estaba en relación con los contactos con vasos sanguíneos que, en el tanicito $\beta 1$ eran capilares con BHE, mientras que en los $\beta 2$ se trataba de capilares fenestrados (Rodríguez et al. 2010). A las similitudes que hemos encontrado, se añadió la expresión por ambas poblaciones celulares de marcadores específicos como zo-1 (*zonula occludens*), α -catenina (Rodríguez et al. 2010), y el FGF-10 (Haan et al. 2013). Todos estos datos apoyaban la similitud entre esos dos tipos clásicamente separados.

Al contrario, los autores clásicos no encontraban diferencias ultraestructurales entre los tanicitos α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) como ya introdujimos, salvo por sus proyecciones, donde los tanicitos $\alpha 1$ expandían su proceso basal hacia el núcleo arcuato (ARC), mientras que los $\alpha 2$ lo enviaban hacia el núcleo ventromedial hipotalámico (VMH) (Millhouse 1971). Nosotros, sí que hemos encontrado fenotipos muy distintos, y entre ellos, células con

características intermedias. Por un lado, células claras muy electrolúcidas (tipo 5) más dorsales, con escasos orgánulos, pero abundantes filamentos intermedios. Y por otro, las tipo 3, localizadas ventralmente, más electrodensas, con microtúbulos, dictiosomas del aparato de Golgi y mitocondrias en su proceso basal, que ya comienzan a mostrar uniones GAP y anillos comunicantes, aunque son escasos. Pero la mayoría de las células, entre ellas presentan características intermedias (tipo 4), mostrando cada vez más uniones GAP y menos microtúbulos, dictiosomas y mitocondrias. Desconocemos si pertenecen a estados fisiológicos diferentes, o si se trata de una transformación progresiva de una a otra. Por último, existen células en regiones ventrales, localizadas entre las tipo 1 y 3, muy electrodensas (tipo 2), con microtúbulos, grandes aparatos de Golgi y abundantes mitocondrias, que no presentan uniones GAP, pero sí estrechas y contactan con vasos fenestrados.

Los estudios clásicos tampoco hacían descripciones precisas acerca de la estructura ciliar, ni siquiera si los tanicitos eran uni- o biciliados o si carecían de cilio. El cilio tiene actualmente mucha importancia por su relación como antena receptora de señales extracelulares. En nuestro trabajo, en todas los tanicitos que hemos reconstruido, hemos podido detectar al menos un cilio y en ocasiones dos cilios. Por primera vez en el 3V, hemos determinado que existen cuatro tipos de aparatos ciliares que subclasifican a las células que integran la pared del 3V en: E1 o multiciliadas, que no corresponden a ningún tipo de tanicito sino a la célula endimaria. E2-1, uniciliadas, y E2-2, biciliadas, los tanicitos tipo 1, tipo 3, tipo 4 y tipo 5. Por el contrario, el aparato ciliar de la célula tipo E3, con un único cilio con centriolo perpendicular y próximo al corpúsculo basal del mismo, se encuentra exclusivamente en el tanicito tipo 2. A este respecto, es de destacar la implicación que podría tener el cilio en la función que cada tipo de tanicito realiza, ya que, por definición, la estructura ciliar tipo E3, de cilio 9+0, es la que caracteriza a las células madre y glía radial. Por otro lado, las células biciliadas, de cilios 9+2, pueden tener a su vez un papel en el movimiento del LCR (como las multiciliadas) y poseer características de “antena”, típica del cilio de las células madre clásicas. A estas células biciliadas, en la SVZ, no se les ha dado un significado. Sin embargo, en el canal de la médula, donde se ha descrito este tipo celular, se les atribuye un papel proliferativo para aumentar la pared del canal, es decir, para formar células endimarias durante el crecimiento en longitud en la etapa postnatal (Alfaro-Cervello et al. 2012). Curiosamente, en nuestros estudios de desarrollo, observamos un engrosamiento de la pared ventricular donde se acumulaban células similares al tipo 5, formando un epitelio pseudoestratificado. En estudios anteriores estos engrosamientos también fueron observados y atribuidos a una proliferación que generaba el crecimiento

de la cavidad ventricular (Walsh et al. 1978). Por tanto, podemos sugerir que los tanicitos tipo 5 biciliados, podrían estar implicados en la generación de nuevas células ependimarias en el desarrollo postnatal temprano del 3V, relacionado con el crecimiento del lumen ventricular, y mantener esta capacidad en el adulto. Esto estaría apoyado, como veremos más adelante, por los experimentos de linaje celular, que sugieren que los tanicitos tipo 5 podrían estar incrementando la población de células multiciliadas.

Es posible que estas diferencias de clasificación, en algunos casos, sean debidas a que los tipos de tanicitos establecidos se estudiaron inicialmente en cerebro de rata y se describieron como ya hemos indicado en $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ (Akmayev & Popov 1977; Rodríguez et al. 1979; Rodríguez et al. 2010; Rodríguez et al. 2005). Es importante destacar que existen sustanciales diferencias entre el 3V de ratas y ratones, no sólo en cuanto a la morfología, sino también en la distribución de elementos funcionales (Nehmé et al. 2012).

5.2 La naturaleza glial de los tanicitos y ruptura del dogma de la vimentina

Además de definir las nuevas poblaciones por su ultraestructura y el número y tipo de cilios, hemos podido definir su naturaleza mediante marcadores moleculares. Aunque en principio todas las células que tapizan el 3V procederían de un ancestro de glía radial común, durante el desarrollo postnatal los progenitores van diferenciándose y madurando, generándose células multiciliadas, células de aspecto glial y células con características específicas, las dos primeras expresando vimentina. Los tanicitos por definición han sido considerados células que expresan vimentina debido a su origen en la glía radial (Fanny. Langlet et al. 2013; Sarah C. Robins et al. 2013; Niwa et al. 2015). La expresión diferencial de vimentina que nuestro trabajo demuestra en los tanicitos ha supuesto un desafío de este dogma. Comprobando este hallazgo por múltiples enfoques y técnicas experimentales, podemos asegurar que el tanicito tipo 2 no expresa vimentina.

La explicación del por qué hemos sido capaces de mostrar este fenómeno, se encuentra en la complejidad estructural de los tanicitos. La ultraestructura del 3V nos ha mostrado, que los tanicitos son células muy interdigitadas, hasta el extremo de que cortes transversales muestran células difíciles de delimitar individualmente. Los estudios de expresión de vimentina se han realizado con inmunofluorescencia y, a los aumentos obtenidos, con la resolución que la fluorescencia otorga (sin posibilidad de visualizar las membranas celulares), el aspecto del 3V es el de una expresión universal, cuando

realmente se trataba de capas superpuestas de células distintas. La detección de vimentina con anticuerpos conjugados con oro coloidal mostró células no marcadas, y posteriormente, el uso del animal *Vim::CreR^{T2}* confirmó los resultados obtenidos con anticuerpos anti-vimentina. En este caso, detectamos la expresión de vimentina de forma indirecta, donde la fluorescencia GFP traducía la expresión del gen de vimentina. En este ratón, tras la inducción con 4-OHT, las células que expresaban vimentina, expresaban también GFP. Sin embargo, continuábamos teniendo el problema de la baja resolución al óptico, la cual no nos permitía ver las interdigitaciones de células positivas entre las negativas, dando un falso positivo. El empleo de la técnica de inmuno-oro resolvió este problema, ya que pudimos delimitar las células contiguas a pesar de sus interdigitaciones. La detección de GFP mediante en la inmuno-oro confirmó que no era un problema de reconocimiento del anticuerpo anti-vimentina a la proteína, apoyando nuestros resultados. No tenemos una explicación clara para la funcionalidad de esta población celular, ya que el resto de marcadores utilizados no mostraron marcaje. Sin embargo, las características ultraestructurales sí permitían observar características específicas, como el contacto con los vasos fenestrados formando una barrera hematoencefálica (BHE).

En el otro extremo, existían poblaciones celulares con una fuerte expresión para vimentina, como son el tipo 1 en la EM y el tipo 5 en franja dorsal. Los tipos 3 y 4, también expresan vimentina, aunque más débilmente. Gracias a esta característica, pudimos determinar que estos tipos de tanicitos, clásicamente conocidos como α -tanicitos, contactaban con neuronas de los núcleos hipotalámicos adyacentes, algo que no se ha confirmado hasta el momento con datos morfológicos, aunque sí se suponía mediante estudios funcionales (Rodríguez et al. 2005; Frayling et al. 2011). La célula tipo 5 era una célula mayoritariamente biciliada, aunque en alguna ocasión fueran también tetraciliadas, tenía la matriz citoplasmática muy clara y su ultraestructura se aproximaba más a los astrocitos. Trabajos recientes se refieren a estas células GFAP+/GLAST+ como tanicitos α 2 dorsales (S C Robins et al. 2013). Los tanicitos tipo 3 y 4, débilmente positivas para vimentina, también expresaban débilmente GLAST, pero que no expresaban GFAP. Es interesante resaltar que las células multiciliadas expresaban vimentina y, las multiciliadas cercanas a la franja dorsal, además GFAP, a diferencia de las células ependimarias de la SVZ (Mirzadeh et al. 2008). En base a estos datos, una hipótesis a comprobar sería el posible origen de las células ependimarias a partir del tanicito tipo 5.

El hallazgo de estos tipos de tanicitos tan distintos nos lleva a la siguiente pregunta: ¿pertenecen las células tipo 2 y tipo 5 a linajes distintos? ¿Proceden de un

ancestro celular común (glía radial)? ¿Son células capaces de transformarse de una en otra? Los estudios de desarrollo del 3V, en efecto, apuntan a un ancestro común, con posterior compartimentalización en tres dominios determinados por la expresión de Rax (Lu et al. 2013), siendo el dominio I, origen de las células endimarias multiciliadas, el II el de la transición de multiciliadas y tanicitos y, finalmente, el dominio III, el más ventral, la futura RCV.

5.3 ¿Existe proliferación en el 3V? ¿Qué tanicito prolifera?

Numerosos trabajos consideran al 3V como una zona proliferativa con poca actividad basal, que experimenta un aumento de la proliferación en respuesta a estímulos como factores de crecimiento, el fotoperíodo o la dieta (Huang et al. 1998; Lee et al. 2014; Lee et al. 2012; Pérez-Martín et al. 2010).

Se han obtenido neuroesferas a partir de disecciones del 3V (S C Robins et al. 2013; Xu et al. 2005; Hourai & Miyata 2013), cultivadas en medios con factores de crecimiento. Nosotros obtuvimos neuroesferas cuando cultivamos la RCV, encontrando una alta proliferación, al menos en respuesta a factores de crecimiento. Nuestros cultivos de 3V posterior (3Vp), que contenía la RCV, crecieron a una tasa similar a la de la SVZ y sus neuroesferas fueron idénticas. Sin embargo, en base a estos experimentos no podíamos afirmar que las neuroesferas derivasen de tanicitos, ya que encontrábamos con frecuencia células marcadas en las proximidades del epéndimo tras inyecciones de BrdU o ³H-timidina. Otros estudios si lo han demostrado anteriormente, cultivando de forma separada los tanicitos del parénquima, éstos fueron capaces de generar neuroesferas en cultivo (Xu et al. 2005; S C Robins et al. 2013).

En nuestro estudio, hemos detectado proliferación en contacto con el 3V pero, a tasas muy bajas sin estimulación, por lo que hemos podido estudiar pocas células ultraestructuralmente. Los tanicitos proliferativos encontrados se ubicaban en la EM y la pared más ventral del 3V, coincidiendo con las regiones donde encontrábamos tanicitos tipo 1 y tipo 2 (2^{EM} y 2). Los tanicitos tipo 2 presentan un cilio corto asociado a un centriolo ortogonal en su base (E3) de estructura microtubular 9+0, considerado el cilio presente en células madre. Al contrario de los que piensan que la neurogénesis debe atribuirse a un tipo de tanicito o a otro, nosotros pensamos que varios tipos tienen la capacidad, pero pueden responder a factores distintos. En el único caso en el que estimulamos la proliferación con factores de crecimiento en los cultivos organotípicos, la expresión de Ki67 fue generalizada a las 24h, en ambas regiones, sugiriendo una

capacidad proliferativa quiescente de estas células, a la espera de una activación ¿por requerimiento de una pronta respuesta hipotalámica ante cambios en el metabolismo energético? (Lee et al. 2012; Huang et al. 1998), ¿daño neuronal tras lesión, como ocurría con el glutamato monosódico? (Rodríguez et al. 2005). La célula Ki67+ analizada al TEM en la franja ventral era ultraestructuralmente un tanicito tipo 2. El estudio del desarrollo postnatal, que muestra una mayoría de tanicitos tipo 2-like en etapas tempranas y una disminución progresiva y ventralización indicaría que podrían estar por delante en el linaje del 3V. Por el contrario, nosotros hemos visto, que el tipo 2 es una población minoritaria en el ratón viejo, coincidiendo con el envejecimiento celular, donde abundan tanicitos ricos en filamentos intermedios, dando la sensación de células fibrosas, así como gotas lipídicas.

Algunos autores, no sin cierta controversia, hablan del tanicito en el adulto como célula progenitora con capacidad para dar neuronas y glía. Sin embargo, no llegan a un consenso en la localización o el tipo de tanicito. Unos consideran que las proliferantes se encuentran tapizando la eminencia media (EM) y otros en la pared lateral del 3V. Robins y colaboradores consideran a la célula GLAST+ como la célula madre, a la que ubican en la franja dorsal y denominan tanicito $\alpha 2$ dorsal, localizado en la pared lateral frente al núcleo ARC, que se corresponde espacial y molecularmente con nuestro tanicito tipo 5. En este trabajo, utilizaron el ratón transgénico *GLAST::CreER^{T2}*, en el que tras la inducción con tamoxifeno, las células que expresaban GLAST en el momento del pulso, expresarían GFP quedando la marca de forma permanente (S C Robins et al. 2013). Tras 9 meses de supervivencia encontraron la marca de GFP en tanicitos ventrales a los $\alpha 2$ dorsal, asumiendo una generación y migración ventricular de nuevos tanicitos (S C Robins et al. 2013). Para conocer qué tanicito ejercía de célula madre, realizaron ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vivo*, administraron FGF-2 intraventricularmente junto con BrdU, durante 7 días consecutivos y sacrificio al día siguiente, encontrando marcaje en el tanicito $\alpha 2$ dorsal aunque otros tanicitos también se activaban. Este protocolo conllevaba una activación de la proliferación mediante el factor de crecimiento, no siendo extrapolable a las condiciones basales. Además, la administración prolongada de BrdU (7 días) no aseguraba estar marcando la célula progenitora exclusivamente, porque también se marcaría la progenie temprana. Concluían que el tanicito $\alpha 2$ dorsal era el generador de tanicitos, porque era el “más activado”, lo que en definitiva implica que no eran datos irrefutables. *In vitro*, cultivaban de forma separada los tanicitos $\alpha 2$ dorsales (GLAST+), de los β y células parenquimáticas, no obteniendo neuroesferas de estos últimos. Nosotros, como comentábamos, no hemos visto, en condiciones basales *in vivo*, tanicitos tipo 5, ni cualquier otro tipo de tanicito en esta localización (tipo 3 o 4), marcados con ³H-timidina

o BrdU a tiempos cortos de supervivencia, ni con Ki67, ni en mitosis. Sin embargo, por los inconvenientes de la detección de proliferación en el 3V que explicaremos más adelante, es posible que no la hayamos detectado.

Por el contrario Haan et al. ubicaban a las células madre en la franja ventral (que ellos identifican como tanicito $\beta 1$, pero en base a nuestra nueva clasificación, seguramente se trate de tanicitos tipo 2) y en la región de la eminencia media (tipo 1), como células FGF-10+/GLAST-. Las células FGF10+ se localizan en la porción ventral, donde nosotros encontramos los tanicitos tipo 1 y tipo 2, aunque en algunos animales que estudiamos, los tipo 1 eran sustituidos por tanicitos tipo 2^{EM}. Dado que no realizan inmuno-oro, no podemos determinar a qué caso se corresponde o si es a ambos. En cualquier caso, nunca se trata de los tipos 3, 4 o 5, ni las células endimarias. Demuestran con trazado genético en animales *FGF10:CreER^{T2}* mediante estudios de pulso y caza a tiempo largo (inducción de expresión de GFP bajo el promotor de FGF-10 mediante la administración de 4-OHT, y sacrificio a tiempo largo de supervivencia desde la administración), la formación de neuronas del núcleo ARC, aunque lo realizan en ratón joven (P28), donde existe mayor tasa proliferativa que en P60 (Haan et al. 2013) a partir de los tanicitos ventrales. el grupo de Seth Blackshaw ha demostrado proliferación mediante la administración de BrdU en los tanicitos de la EM, coincidiendo con la localización del trabajo de Haan y colaboradores, en animales adultos, aunque a tasa muy lenta (Lee et al. 2012).

El problema principal para estudiar la capacidad proliferativa del 3V de ratones adultos en condiciones basales, es que es extremadamente baja. Los diferentes autores se han visto obligados a seguir dos estrategias. En primer lugar, administrar mayor cantidad de marcador exógeno de la proliferación y durante periodos más largos. Por lo tanto, para la detección de proliferación por autorradiografía, administramos, durante 10 días, ³H-timidina vía i.p y obtuvimos sólo una célula en contacto con el ventrículo marcada, correspondiente a un tanicito tipo 1. El mayor inconveniente de este protocolo, es que no podemos asegurar que no se trate de una célula hija, sin embargo, este protocolo o similares, son los utilizados por los diferentes autores que estudian proliferación en el 3V (Haan et al. 2013; Lee et al. 2012; Pérez-Martín et al. 2010; Kokoeva et al. 2007).

Además, estos protocolos tienen otros inconvenientes derivados de la gran dosis acumulada que soportan los animales. Si la sustancia está muy accesible, la célula la capta, a pesar de no entrar en fase S, dando falsos positivos. Por este motivo se recomienda no realizar administraciones de dosis muy altas, evitando por ejemplo la administración por el agua de bebida (Rakic 2002). Otro inconveniente de utilizar altas

concentraciones de BrdU o ^3H -timidina, es que pueden ser tóxicas y dañar las células (por ejemplo, la ^3H -timidina es un producto radiactivo), y frente a ese “daño” activan su proliferación (Rakic 2002). En el trabajo de Haan y colaboradores tienen en cuenta este fenómeno y comparan el marcaje de BrdU y de EDU, otro marcador exógeno de la proliferación, que resulta menos tóxico para las células, y corroboran que el marcaje es mucho menor en los animales a los que se les ha administrado EDU (Haan et al. 2013). Por otro lado, existe un problema en el uso de marcadores exógenos de proliferación que sólo afecta a los órganos circunventriculares, y por tanto, al 3V dado que contiene a la EM, considerado órgano circunventricular. Siguiendo una revisión de Cifuentes, debemos tener en cuenta la diferente localización del marcaje encontrado por los diferentes autores, según la vía de administración (Cifuentes et al. 2011). Cuando la vía de administración del análogo de timidina empleado era sistémica, incluida i.p, se encuentra el marcaje restringido a los tanicitos de la EM, los cuales contactan con vasos fenestrados, es decir, los tipo 1 y 2. Por el contrario, cuando la administración es vía i.c.v, el marcaje abarca todo el epéndimo de la cavidad, además de cursar con un aumento enorme del número de células marcadas, tanto en la pared del 3V como parenquimáticas. Como se vio en la introducción, la EM forma una estructura estanca debido a las uniones estrechas entre los tanicitos que la tapizan y por otro lado entran sustancias a ella con mayor facilidad pues contiene vasos fenestrados (Brightman & Reese 1969; Peruzzo et al. 2000). Dado que los tanicitos externos a la EM no están accesibles al marcador si la administración ha sido sistémica, no se marcarían a pesar de proliferar. Por otro lado, cuando la administración es sistémica (como cuando administramos vía i.p), la sustancia se acumula en la EM pudiendo ser captada de manera inespecífica por cualquier tanicito y ser tóxica, activando la proliferación o incorporándose al ADN en el proceso de su reparación.

Para complementar el estudio y salvar estas dificultades, decidimos utilizar el marcador endógeno Ki67. Además la única mitosis encontrada en todo el estudio se localizó en la EM. Al igual que con el uso de marcadores exógenos, las células marcadas eran las ventrales, confirmando nuestros resultados. El estudio de este marcaje al TEM reveló que se trataba de tanicito tipo 2, células E3, como ya hemos indicado, de estructura microtubular 9+0, considerado el cilio presente en células madre (Alvarez-Buylla et al. 1998; Doetsch et al. 2002). Es curioso resaltar que, utilizando el marcaje con Ki67 para la detección de proliferación, no encontrásemos mucho mayor marcaje como ocurre en la SVZ.

Utilizar factores de crecimiento u otros factores externos como la dieta hipercalórica, es la segunda estrategia utilizada para facilitar el estudio del 3V como nicho proliferativo, ya que sus células responden intensamente a estos factores,

incrementando la proliferación. Sin embargo, estas estrategias tienen inconvenientes. En el caso del uso de factores de activación de la proliferación en el 3V, estaríamos acelerando artificialmente el proceso, que en otros casos sería muy lento. Por otro lado, con el uso de cada tipo de factor, podemos estar seleccionando diferentes poblaciones de tanicitos a proliferar, dando resultados sesgados. En estudios recientes en la SVZ, se ha demostrado que administrando VEGF se dividen células endimarias (CD133+/GFAP-) que en condiciones normales no se dividen, y en cambio el factor FGF, activaría a las células subependimarias (CD133+/GFAP+) (Luo et al. 2015).

Por último, cuando hablábamos de simetría, bastante conservada en regiones dorsales, aparecían células tipo 3 o incluso tipo 2-like, intercaladas o en parejas sin correspondencia en la pared opuesta. La simetría en el resto de tipos celulares podría implicar que el 3V no es un sistema azaroso, que se encuentra ordenado, y que el dinamismo de los tipos que conservan la simetría, si existe, debe ser muy lento. En esta misma línea, en los animales analizados existía una variabilidad significativa en cuanto al número y distribución de las células tipo 2, encontrando animales con células tipo 2 que abarcaban las franjas ventral e intermedia sin encontrar prácticamente fenotipos intermedios. Incluso, hemos analizado ratones cuya EM estaba únicamente tapizada por células tipo 2. En ratones tratados con glutamato monosódico (tóxico para el núcleo ARC) es espectacular la transformación del 3V hacia el fenotipo tipo 2 (comunicación personal del Prof. Blackshaw). Esta plasticidad que atribuimos a las células tipo 2 podría tener que ver con esa quiescencia y quizá una posición más indiferenciada en el linaje, y con el contacto permanente e invariable con los vasos fenestrados del sistema porta.

5.4 El linaje celular en el 3V ¿Gliogénesis, neurogénesis o ambos?

Según nuestros datos, existe una célula esencialmente gliogénica, el tanicito tipo 5, que gracias al trazado genético de la proteína Rax, nos ha permitido observar que son capaces de generar células endimarias. Además, encontramos células endimarias multiciliadas, cercanas a los tanicitos tipo 5, que expresan intensamente GFAP, marcador no expresado (o débilmente) por las células endimarias multiciliadas más dorsales en el 3V. Esto podría sugerir que la célula multiciliada GFAP+ se tratase de un fenotipo intermedio entre el tipo 5 y la célula multiciliada madura. Estas nuevas células se deben de generar muy lentamente, pues con nuestros protocolos, no observamos proliferación del tipo 5. Lo que no pudimos determinar con los animales transgénicos es si las células tipo 5, a su vez procedían de otras células (las tipo 2, el fenotipo

intermedio 3 y 4), ya que a tiempos cortos ya partíamos de un marcaje intenso de vimentina y Rax en la célula tipo 5. Además el tiempo largo utilizado, de 30 días, nos permite apreciar un descenso del marcaje hacia ventral, pero debe ser un proceso tan lento que no podemos descartar que se trate de un efecto aleatorio. Apoyando la teoría gliogénica, Robins et al., estudian el linaje de células GLAST+ y a los 9 meses detectan células marcadas en el epéndimo (dorsalmente) y en la región intermedia (ventralmente).

Tanto en el caso de este estudio como en otros estudios que se han basado en animales CreER^{T2}, hay que tener en cuenta las limitaciones de esta tecnología como la ausencia de promotores o potenciadores (*enhancers*) que recapitulen el perfil de expresión de vimentina o Rax, o que la inserción del transgén ocurra en una zona del genoma donde la expresión de Cre siga un patrón en mosaico. Ante estas limitaciones estamos prevenidos a la hora de extraer conclusiones. Por otro lado, las células mantienen relaciones intercelulares intensas, en las que se intercambian moléculas. En el caso de los tanicitos tipo 3, 4 y 5, existen estructuras que hemos denominado como “bocados” de clatrina o, de mayor tamaño, los “anillos comunicantes”, en los que es visible el traspaso de citoplasma de unas células a otras. De este modo, la proteína GFP puede estar siendo traspasada de unos tanicitos a otros, y no estar generándose nuevos tanicitos. Estas estructuras, justamente se encuentran en los tanicitos implicados recientemente en la generación nuevos tanicitos.

Respecto a la neurogénesis, aunque hemos observado un cierto grado de proliferación, en ningún momento hemos observado neuronas marcadas a tiempos largos de supervivencia/caza con los métodos utilizados. De hecho, Robins y colaboradores, que estudiaban el linaje derivado de los tanicitos GLAST+, se detectó un porcentaje muy pequeño de células con marcadores neuronales maduros. En contrapunto a estos trabajos, Haan y colaboradores, sí han demostrado la existencia de neurogénesis (Haan et al. 2013). Utilizando el ratón *FGF-10::Cre^{T2}*, combinado con marcadores específicos de neuronas del 3V, tras 6 meses desde la inducción con 4-OHT, encuentran neuronas marcadas, demostrando que los tanicitos FGF-10, que localizaban en la porción ventral, son neurogénicos. Nosotros, hemos detectado proliferación en esta localización, como vimos en el punto anterior, pero en ningún caso neurogénesis. Una de las causas puede ser que nosotros realizamos una pauta de inyección de marcadores exógenos de la proliferación, donde sólo el marcador está presente durante un tiempo limitado, a unas dos horas post-inyección de cada vez que inyectamos es decir, estaría presente durante dos horas cada 24 horas, durante 10 días, mientras que el trabajo de Haan y colaboradores, utiliza 4-OHT, por lo que tiene

marcadas una mayor franja de células, aunque no hace referencia al número de neuronas que obtiene, presumiblemente porque sea bajo. No pudimos identificar un marcador específico de las células tipo 2, aunque podrían expresar, basándonos en su expresión ventral, *shh*, *BLBP* o *fgf10* (marcaje con oro coloidal en proceso en el momento de la redacción de estas líneas) (Haan et al. 2013). Estos genes se relacionan con la formación de nuevas neuronas del ARC a partir de los tanicitos, y por tanto, si pudieran detectarse en las células tipo 2 podríamos establecer un rol potencial de estas células en la neurogénesis.

Es curioso el hecho de haber encontrado células de aspecto similar al tanicito tipo 1 en el parénquima de la EM, “células indeterminadas”, que presentaban marcaje con ^3H -timidina a tiempos cortos y largos de supervivencia. Esta célula podría tratarse de una célula hija del tanicito tipo 1 o 2, o, no podemos descartarlo, un tanicito tipo 1 desplazado. Estas células aparecen en algunos casos como “desprendidas”, yuxtapuestas a los tanicitos de la EM aunque sin tocar la luz del 3V. ¿Podrían ser células generadas a partir de la pared de la EM? En estudios de tiempo corto (de expresión) del animal *FGF-10:CreR^{T2}*, aunque los autores no hacen mención, se observa una gran cantidad de células marcadas en el parénquima de la EM, indicando que estas células expresan FGF-10+, de igual manera que la expresan los tanicitos ventrales. Sería interesante poder explicar el por qué estas células incorporan ^3H -timidina con más frecuencia que los tanicitos tocando ventrículo, pero nuestros datos no nos lo han permitido. Estas células parenquimáticas similares a tanicitos presentan un cilio orientado siempre en dirección ventral y pocos contactos con células vecinas. Se podría pensar que son células en estado de migración, similar a las células tipo A de la SVZ de los ventrículos laterales, que son los neuroblastos que migran a los bulbos olfatorios (Lois et al. 1996). Estas células en la SVZ, se caracterizan por presentar contactos focales entre ellas, y poseer un cilio cuya orientación indica su dirección de migración. En el 3V, las “células indeterminadas” podrían estar migrando en dirección ventral hacia los capilares porta, según estas características.

5.5 El cilio en constante remodelación

Actualmente numerosos estudios asocian el cilio a la correcta funcionalidad del hipotálamo (Davis et al. 2007; Oh et al. 2015; Seo et al. 2009), incluida la expresión de receptores para moléculas relacionadas con el control de la función hipotalámica, como, por ejemplo, la leptina (Oh et al. 2015). El estudio tridimensional de los cilios nos ha permitido afinar en la clasificación de los tanicitos, y confirmar las diferencias entre

tanicitos que observábamos a nivel citosólico y nuclear. El hecho de que estemos hablando de células que puedan ser progenitoras de otras, como comentábamos para las células tipo 5, implicaría una remodelación de los cilios. En el caso de la célula tipo 5 que diera lugar a células endimarias, la célula tendría que sintetizar nuevos cilios. De hecho, existían células tipo 5 uniciliadas junto a células tipo 5 biciliadas y de forma ocasional, células tetraciliadas con intenso marcaje GFAP, lo que podría indicar una transformación de la célula GFAP+, aumentando el número de cilios o disminuyéndolo si la dirección fuera en sentido contrario. A este respecto, hemos encontrado estructuras que bien podrían relacionarse con este fenómeno de remodelación. Hemos encontrado cilios cortos internalizados en el citoplasma apuntando en dirección al núcleo, o atravesando el citoplasma de la membrana lateral y proyectándose hacia el espacio intercelular. Podríamos pensar que se trata de cilios en involución, aunque, pese haberse descrito este hallazgo en la literatura (Rodríguez et al. 2005), nunca se ha explicado su funcionalidad. También hemos encontrado corpúsculos basales con una vesícula asociada a uno de los extremos, igual a las descritas como “vesículas ciliares” implicadas en la ciliogénesis (Figura 58) (Sorokin 1962; Lu et al. 2015). En el caso de la transformación a tipo 3 y 4, si nuestra hipótesis fuera cierta, deberían perderse cilios. Toda esta diversidad encontrada podría deberse a una intensa remodelación entre los distintos aparatos ciliares.

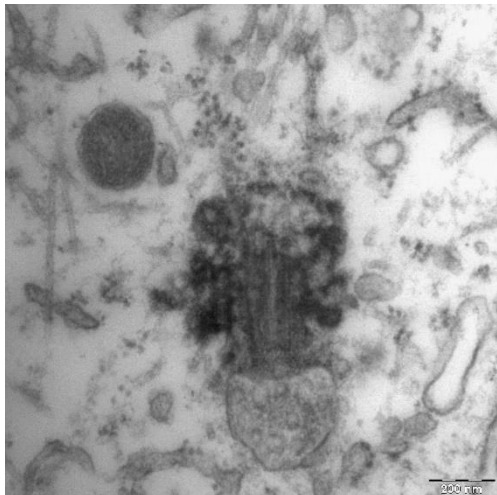


Figura 58. Cilio en formación. Corpúsculo basal de cilio asociado a una vesícula ciliar. Estas se han relacionado con la formación del cilio.

Las células E1, E2-1, E2-2 presentan estructuras ciliares morfológicamente similares entre ellas (Mirzadeh et al. 2008), con corpúsculos basales idénticos, muy desarrollados y con raicillas ciliares partiendo de uno de los extremos de cada uno, lo que podría indicar que puedan transformarse unas células en otras remodelando su

sistema ciliar. Durante la endimogénesis es habitual encontrar en el citoplasma de la célula endimaria en formación unas estructuras llamadas deuterosomas (Spassky et al. 2005), sin embargo, no apreciamos su existencia en los tanicitos del 3V del ratón adulto. Las células E3, en cambio, a pesar de ser uniciliadas, presentan un corpúsculo basal no muy desarrollado del que parte un cilio, y un centriolo sin estructura proteica en corona asociada ni raicillas, colocado en la base del corpúsculo basal y perpendicular a este. Tenemos dudas de que esta estructura ciliar sea intercambiable con la del resto de células E1 o E2. Por último, algunos autores han observado tanicitos carentes de cilios con SEM, pero nosotros en nuestro estudio no hemos encontrado ninguna célula carente de cilio.

5.6 El papel del tanicito ventral en la función hipotalámica en relación con el fotoperiodo

El hecho de encontrar una importante variabilidad interindividual en la proporción y distribución de tanicitos tipo 2, nos hizo plantearnos si esta plasticidad atendía a una causa funcional. En la literatura se ha descrito que diferentes factores metabólicos y/u hormonales como el ciclo reproductivo, el sexo, el fotoperiodo, la alimentación o los ciclos circanales (Bruni et al. 1977; Migaud et al. 2014; Prevot et al. 1999; Huang et al. 1998; Hazlerigg & Lincoln 2011) alteran la proliferación del 3V. Un ejemplo, es el caso de la hormona tiroidea que, a través de su interacción con el hipotálamo medio basal, juega un papel crítico en la respuesta de las gónadas al fotoperiodo. Esta interacción está mediada por las enzimas DIO2 y DIO3, de acciones opuestas, que se ha visto se expresan en los tanicitos ventrales. DIO2 transforma la hormona tiroidea T4 (prohormona) en T3 (triyodotironina) implicada en la secreción de GnRH, y por tanto en el control de la reproducción, aunque también en el balance energético, mientras que DIO3 transforma T3 en T4 (forma inactiva). Estudios de genómica funcional han demostrado que la luz del día, a través de la melatonina, que actúa sobre receptores de la EM, induce la producción de hormona estimulante de la tiroides (TSH), que actúa sobre los tanicitos aumentando la expresión de DIO2. De esta forma, cuanto más largos son los días (14h luz/10h oscuridad), mayor es la cantidad de DIO2 y por tanto mayor cantidad de T3 (Hanon et al. 2008; Nakane & Yoshimura 2014). Durante los fotoperiodos cortos (10h luz/14h oscuridad), por tanto, se estimula en menor medida la producción de TSH y por lo tanto de DIO2, coincidiendo con un aumento en la proliferación del 3V (Hazlerigg & Lincoln 2011). Un aumento en la proliferación se ha

correlacionado con un aumento en el peso corporal, explicado como un mecanismo de adquisición de reservas como preparación al invierno (Huang et al. 1998).

Hemos analizado el 3V de algunos animales cuya EM y franja ventral están compuestos mayoritariamente por células tipo 2 y 2^{EM}. Además, este hecho confiere a la pared ventricular una apariencia característica, ya que estas células poseen grandes espacios intercelulares y, como comentábamos previamente, dan una imagen de “desprendimiento” hacia el parénquima (Figura 25). Desafortunadamente, aunque sería muy interesante para relacionar al tanicito tipo 2 con una función hipotalámica, no podemos saber qué factores pudieron influir en esos cambios pues los animales se estabulaban en las mismas condiciones durante todo el año con fotoperiodos constantes e intermedios (12h día/12h noche). Sería muy interesante comprobar en el futuro, basándonos en nuestra hipótesis, si el aumento de tanicitos tipo 2, y supuestamente, de la proliferación en el 3V, estuviera relacionada con fotoperiodos cortos. Otros factores como el acceso a la alimentación, la estabulación junto a hembras, o factores que desconocemos, podrían influir en esta variabilidad y se requieren nuevos ensayos para darle solidez a esta idea.

5.7 ¿Cómo se comunican los distintos tipos de tanicitos? ¿Cómo ejercen su función? Una visión desde la ultraestructura

La morfología peculiar de los distintos tipos de tanicitos, podría estar relacionada con cómo se comunican con el parénquima subyacente y la circulación sistémica para ejercer su función como receptores y/o liberadores de señales neuroquímicas y neuroendocrinas. Gracias al proceso basal radial, los tanicitos pueden contactar con los vasos sanguíneos y relacionarse con las neuronas de los núcleos en vecindad. La formación de la BHE va a ser fundamental en este proceso, ya que supone un aislamiento de ciertas estructuras. En este contexto, en el 3V, la BHE se dispone englobando a la EM (Akmayev 1969), formando un microambiente diferente al resto del hipotálamo mediobasal (Guerra et al. 2010). Paradójicamente, la EM está sembrada de vasos fenestrados que permiten la comunicación entre los tanicitos que tapizan el 3V a ese nivel y el torrente sanguíneo. Esto hace de la EM una región privilegiada, capaz de regular la función hipotalámica controlando dicha comunicación. Relacionando lo dicho con nuestro trabajo, los tanicitos recién descritos encargados de constituir la BHE, y por tanto, “reguladores directos” son el tipo 1, central y lateral, y los tipo 2. Ultraestructuralmente, estos tanicitos presentan un potente proceso basal que contacta

con los vasos fenestrados, repleto de toda la maquinaria celular necesaria para el transporte vesicular, refiriéndonos al alto contenido en microtúbulos, mitocondrias, dictiosomas del aparato de Golgi y vesículas. Hay estudios que demuestran ambos sentidos del transporte, tanto de los vasos sanguíneos hacia el LCR como al revés, pero en ambos casos el transporte requiere de receptores específicos (Balland et al. 2014). También llevan a cabo transporte desde el LCR hacia las neuronas mediante contactos sinaptoides (Feng et al. 2011).

Por otro lado, los tanicitos tipo 3, tipo 4 y tipo 5, hemos observado en este estudio que poseen estructuras que facilitan la captación de señales del LCR como microvellosidades abundantes, expansiones celulares o *blebs*, y cilios. Estudios demuestran que estas estructuras pueden aumentar en número o disminuir, en respuesta a diversos fenómenos, como por ejemplo, el ciclo estral. Tras la administración de estrógenos aumentaba la cantidad de microvellosidades y de *blebs*, de los tanicitos aumentando la superficie expuesta (Kobayashi et al. 1970; Bruni et al. 1977; Mestres 1981). Por el contrario, el transporte vesicular en estas células debe ser escaso, ya que carecen de un proceso basal desarrollado, y el que presentan posee menor cantidad de microtúbulos, mitocondrias y carece de grandes cisternas de Golgi, a diferencia de los tanicitos tipo 1 y 2. Algunos autores describen a los tanicitos de las franjas intermedia y dorsal, los tipo 3, 4 y 5, como células capaces de iniciar y transmitir un impulso nervioso al entrar en contacto con sustancias activadoras del LCR (Vígh et al. 2004; Andrew 1988). En esta línea, se ha demostrado que los tanicitos utilizan la vía de señalización de Ca^{2+}/ATP , igual que los astrocitos (Frayling et al. 2011) para generar impulsos tras despolarizar su membrana, y que utilizan uniones GAP para amplificar la señal (Andrew 1988). Relacionándolo con la morfología, nosotros encontramos que los tanicitos tipo 3, 4 y 5 cumplen todos los requisitos para ejercer esta función, ya que contienen abundantes uniones GAP y las estructuras especializadas de uniones GAP, que hemos denominado anillos comunicantes, a las cuales se le atribuye la función de transmisión del impulso nervioso (Piehl et al. 2007). Estas estructuras habían sido descritas por Walsh en 1978 como anillos de uniones comunicantes completamente independientes de la membrana plasmática, “flotando” en el citoplasma (Walsh et al. 1978). Sin embargo, mediante tridimensionalización, hemos observado diferentes estadios que van desde un simple abombamiento de la membrana hasta una esfera de unos 500 nm unida por un pequeño apéndice a la membrana citoplasmática. Al no encontrar nunca una esfera completamente aislada en el citoplasma, pensamos que debía tratarse de interdigitaciones rodeadas de uniones GAP, cortadas transversalmente. Sin embargo, un trabajo basado en la formación de estos anillos, los cuales denominan como *annular GAP junctions*, han demostrado que su formación está

mediada por moléculas de clatrina que estiran de la porción de membrana con la unión GAP, hasta que forman una gran vesícula que finalmente se desprende de la membrana. Lo novedoso de este estudio para nosotros, es que la función que atribuyen a estos anillos, es la degradación de las conexinas que forman las uniones GAP, es decir, realmente es un mecanismo para deshacer una unión GAP (Piehl et al. 2007). Estas grandes vesículas, *annular GAP junctions*, una vez aisladas en el citoplasma, se degradan muy rápidamente, por lo que la probabilidad de encontrar un anillo comunicante en este estadio es muy baja, lo que explicaría que no lo hayamos detectado en nuestros estudios de tridimensionalización. La función principal de los anillos, sería regular la remodelación de las uniones GAP de membrana, pues son las encargadas de su degradación.

Para esta transmisión eléctrica que comentábamos, es necesario el contacto directo con las neuronas hipotalámicas, algo que hasta la fecha no había sido posible visualizar. Tan sólo existía un único estudio morfológico, mediante la técnica de Golgi Cox donde veían la íntima relación entre las neuronas y, los entonces, tanicitos α , sin llegar a demostrar su contacto (Bleier 1971) y algunas aproximaciones funcionales que postulaban la necesidad de estos contactos, descritos como sinaptoides, puesto que mediante ATP transmitían la señal eléctrica a las neuronas (Frayling et al. 2011). Nosotros, aprovechando la característica de que los tanicitos tipo 3, 4 y 5, candidatos a ser transmisores eléctricos, expresan vimentina, demostramos en inmuno-oro, el contacto directo entre los procesos basales de dichos tanicitos, vimentina+, con neuronas de los núcleos hipotalámicos adyacentes.

5.8 La pared del 3V se distribuye en franjas y no en “pinwheels”

Los tanicitos no se distribuyen formando “pinwheels” como en la SVZ (Mirzadeh et al. 2008). Como hemos visto, los diferentes tipos de tanicitos se distribuyen formando franjas horizontales que se manifiestan tanto al SEM cuando observamos la superficie ventricular, como al TEM con la manifiesta distribución en el eje vertical de las franjas descritas. Además, a pesar de encontrar células uni-, bi- y multiciliadas dentro de una única franja, la dorsal, éstas no parecían mostrar ninguna distribución organizada.

En la región caudoventral encontramos varios tipos celulares según la superficie mostrada a la cavidad. Células de superficie lisa y uniciliadas, uniciliadas de penachos repletos de pequeñas protrusiones o *blebs*, células de abundantes microvellosidades uniciliadas, otras biciliadas, y células que presentan un único *bleb* grande y esférico que también pueden ser uniciliadas o biciliadas; al contrario de trabajos previos que

aseguran que la mayoría de los tanicitos localizados en la RCV, los clásicos α , carecen de cilios. No encontramos una distribución en “pinwheel” como el descrito en la SVZ (Mirzadeh et al. 2008), por el contrario, se distribuyen en tres franjas, aproximadamente paralelas, donde, en cada una predomina un tipo celular de superficie determinada.

La franja ventral está formada principalmente por células que muestran un penacho central de pequeñas y abundantes protrusiones citoplasmáticas o *blebs*, en la base del cual surge un cilio largo.

La franja intermedia, compuesta principalmente de células uniciliadas repletas de microvellosidades en su superficie. Aquí es más frecuente que en la franja anterior encontrar células biciliadas, y además son distintas a las anteriores ya que están repletas de microvellosidades. Parecen los mismos tipos celulares que pueden presentar uno o dos cilios en función del requerimiento funcional.

La franja dorsal por último, presenta los tipos celulares encontrados en la F2, pero aparece un nuevo tipo caracterizado por presentar un único gran *bleb* esférico en superficie. Éstas pueden ser también uniciliadas o biciliadas. Aparecen más o menos agrupadas pero sin seguir ningún patrón aparente. Estas células con protrusiones han sido descritas previamente pero fueron identificadas como neuronas en contacto con la luz ventricular (Vigh & Vigh-Teichmann 1998). Sin embargo, en nuestro estudio ultraestructural mediante tridimensionalización, ninguna célula en contacto con el LCR presentó características morfológicas neuronales. Dada la cantidad de células que muestran este tipo de *blebs* bajo el MEB, deberían haberse podido observar numerosas neuronas en contacto con la cavidad ventricular.

Dentro de cada franja no hemos reconocido estructuras en “pinwheel”. Por la constitución de las franjas, en las que las células E3 se encuentran en una franja concreta, no existiría la posibilidad de la formación de “pinwheels” entre células E3 y otros tipos, como las E2-1 o E2-2. No hemos visto si en las franjas intermedia y dorsal, donde existe mayor variedad celular existe alguna organización. En la zona de “overlap”, entre la franja dorsal y la región dorsal multiciliada, aparecen células E1, pero no E3, así que de haber alguna estructura en “pinwheel”, nunca implicaría una célula E3 (comparable a la B1).

Conclusiones

6. Conclusiones

1. El tercer ventrículo está formado por tres regiones, las regiones rostroventral y caudoventral, formadas por tanicitos, y la región dorsal, formada por células multiciliadas.
2. La región caudoventral es capaz de producir neuroesferas a una tasa de amplificación y tamaño similar a la SVZ, mientras que la región rostroventral tiene una menor capacidad para producir neuroesferas en cultivo.
3. La región caudoventral está formada por una pared lateral dividida en tres franjas: la franja ventral, intermedia y dorsal; y un suelo, constituido por la pared que tapiza la eminencia media.
4. Los tanicitos de la región caudoventral se dividen en 5 tipos que hemos nombrado como tipo 1, 2, 3, 4 y 5, en base a su ultraestructura, y caracterizados por su patrón distintivo de expresión de marcadores moleculares.
5. El tipo 1 se localiza en la eminencia media, el tipo 2 en la franja ventral, los tipos 3 y 4 en las franjas intermedia y dorsal. En esta última, además, comparten espacio con el tipo 5. En determinados individuos, el tipo 2 ha sido localizado tapizando la eminencia media.
6. Hemos caracterizado cuatro estructuras ciliares distintas en las células del tercer ventrículo: la estructura E1, que contiene múltiples cilios de estructura 9+2, presente en las células ependimarias; la estructura E2-1, formada por un cilio 9+2 de grueso corpúsculo basal y un corpúsculo basal sin cilio; la estructura E2-2, de iguales características al anterior, pero que presenta dos cilios. Las estructuras E2-1 y E2-2 están presentes en los tanicitos tipo 1, 3, 4 y 5. Por último, la estructura E3, con cilio 9+0, con corpúsculo basal pequeño y centriolo perpendicular al mismo, característico de los tanicitos tipo 2.
7. Los tanicitos tipo 1 y 2 contactan con capilares fenestrados. Presentan un grueso proceso basal especializado en el transporte de vesículas y uniones estrechas, lo

que favorece la formación de una barrera hematoencefálica que aísla la eminencia media.

8. Los tanicitos tipo 3, 4 y 5 presentan un proceso basal poco desarrollado, que contacta con neuronas de los núcleos hipotalámicos adyacentes. Muestran en su membrana apical estructuras de amplificación de la superficie, como son microvellosidades y grandes *blebs*. Carecen de microtúbulos o son muy escasos. Entre estos tipos de tanicito se da una gradación fenotípica (de tipo 3 a tipo 5), donde van adquiriendo cada vez más anillos comunicantes, “bocados” de clatrina y filamentos intermedios. Además, los tipos 3 y 4 suelen presentar un cilio mientras que el tipo 5, dos.
9. Los tanicitos tipo 2 no expresan vimentina, al contrario que el resto de tipos. Sin embargo, los tanicitos tipo 5 expresan fuertemente vimentina, además de Rax y GFAP. El linaje con Rax mostró que existe regeneración dorsalmente en dirección tanicito tipo 5 a multiciliada.
10. La proliferación constitutiva del tercer ventrículo *in vivo* es ínfima. Las células detectadas con marcadores de proliferación corresponden al tipo 2 y al tipo 1. No se ha podido confirmar la existencia de neurogénesis en esta región.
11. La adición de FGF en secciones de tercer ventrículo, activa la proliferación de los tanicitos localizados en la franja ventral y eminencia media.
12. Basándonos en los resultados ultraestructurales, moleculares y el trazado del linaje vimentina y Rax, hemos establecido dos poblaciones bien diferenciadas de tanicitos, la formada por los tipos 1 y 2, y la formada por los tipos 3, 4 y 5.

Bibliografía

7. Bibliografía

- Aaku-Saraste, E. et al., 1997. Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. *Mechanisms of development*, 69(1-2), pp.71–81.
- Akmayev, I.G., 1969. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 96(4), pp.609–624.
- Akmayev, I.G. et al., 1973. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. IV. Medial basal hypothalamus. An experimental morphological study. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)*, 137(4), pp.493–512.
- Akmayev, I.G. & Popov, A.P., 1977. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VII. The tanycytes: Their relation to the hypophyseal adrenocorticotrophic function. An ultrastructural study. *Cell and tissue research*, 180(2), pp.263–82.
- Alfaro-Cervello, C. et al., 2012. Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. *The Journal of comparative neurology*, 520(15), pp.3528–52.
- Alfaro-Cervello, C. et al., 2014. The adult macaque spinal cord central canal zone contains proliferative cells and closely resembles the human. *Journal of Comparative Neurology*, 522(8), pp.1800–1817.
- Altman, J. & Bayer, S.A., 1978a. Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*, 182(5), pp.945–971.
- Altman, J. & Bayer, S.A., 1978b. Development of the diencephalon in the rat. III. Ontogeny of the specialized ventricular linings of the hypothalamic third ventricle. *The Journal of Comparative Neurology*, 182(5), pp.995–1015.
- Altman, J. & Bayer, S.A., 1986. The development of the rat hypothalamus. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 100, pp.1–178.
- Alvarez-Buylla, a et al., 1998. Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(3), pp.1020–1037.
- Amat, P. et al., 1999. Lateral evaginations from the third ventricle into the rat mediobasal hypothalamus: An amplification of the ventricular route. *Neuroscience*, 88(3), pp.673–677.
- Andrew, F.D., 1988. Correlated Electrophysiology Rat Hypothalamus. *Scanning Electron Microscopy*, 8(October).
- Anthony, T.E. et al., 2004. Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of the Central Nervous System. *Neuron*, 41(6), pp.881–890.

- Balland, E. et al., 2014. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell metabolism*, 19(2), pp.293–301.
- Bennett, L. et al., 2009. Circumventricular organs: a novel site of neural stem cells in the adult brain. *Molecular and cellular neurosciences*, 41(3), pp.337–47.
- Berger, U. V. & Hediger, M. a., 2001. Differential distribution of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in tanycytes of the third ventricle. *Journal of Comparative Neurology*, 433(1), pp.101–114.
- Bernal, J., 2007. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3(3), pp.249–259.
- Bignami, A. & Dahl, D., 1974. Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat. *Nature*, 252(5478), pp.55–6.
- Bleier, R., 1971. The relations of ependyma to neurons and capillaries in the hypothalamus: a Golgi-Cox study. *The Journal of comparative neurology*, 142(4), pp.439–463.
- Blouet, C. & Schwartz, G.J., 2010. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behavioural brain research*, 209(1), pp.1–12.
- Bolborea, M. & Dale, N., 2013. Hypothalamic tanycytes: Potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends in Neurosciences*, 36(2), pp.91–100.
- Brawer, J.R. & Walsh, R.J., 1982. Response of tanycytes to aging in the median eminence of the rat. *The American journal of anatomy*, 163(3), pp.247–256.
- Brightman, M.W. & Reese, T.S., 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *Journal of Cell Biology*, 40(3), pp.648–677.
- Bruni, J.E., Clattenburg, R.E. & Millar, E., 1983. Tanycyte ependymal cells in the third ventricle of young and adult rats: a Golgi study. *Anatomischer Anzeiger*, 153(1), pp.53–68.
- Bruni, J.E., Montemurro, D.G. & Clattenburg, R.E., 1977. Morphology of the ependymal lining of the rabbit third ventricle following intraventricular administration of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH): a scanning electron microscopic investigation. *The American journal of anatomy*, 150(3), pp.411–425.
- Cardona-Gómez, G.P., DonCarlos, L. & Garcia-Segura, L.M., 2000. Insulin-like growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain. *Neuroscience*, 99(4), pp.751–760.
- Chenn, A. et al., 1998. Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. *Molecular and cellular neurosciences*, 11(4), pp.183–93.
- Cifuentes, M. et al., 2011. A comparative analysis of intraperitoneal versus intracerebroventricular administration of bromodeoxyuridine for the study of cell proliferation in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 201(2), pp.307–314.
- Collins, P., 1989. The sulcus medianus organ in the fourth cerebral ventricle of the

- rabbit: a previously undescribed circumventricular organ. *Journal of anatomy*, 162, pp.185–193.
- Corbeil, D. et al., 2001. Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(2), pp.82–91.
- Dahiya, S., Lee, D.Y. & Gutmann, D.H., 2011. Comparative characterization of the human and mouse third ventricle germinal zones. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 70(7), pp.622–633.
- Dahlstrand, J., Lardelli, M. & Lendahl, U., 1995. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Developmental Brain Research*, 84(1), pp.109–129.
- Das, G.D., 1979. Gliogenesis and ependymogenesis during embryonic development of the rat. An autoradiographic study. *Journal of the neurological sciences*, 43(2), pp.193–204.
- Davis, R.E. et al., 2007. A knockin mouse model of the Bardet-Biedl syndrome 1 M390R mutation has cilia defects, ventriculomegaly, retinopathy, and obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), pp.19422–19427.
- Desmond, M.E. & Jacobson, A.G., 1977. Embryonic brain enlargement requires cerebrospinal fluid pressure. *Developmental biology*, 57(1), pp.188–98.
- Dimou, L. & Götz, M., 2014. Glial Cells as Progenitors and Stem Cells: New Roles in the Healthy and Diseased Brain. *Physiological reviews*, 94(3), pp.709–737.
- Doetsch, F. et al., 2002. EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adult Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron*, 36(6), pp.1021–1034.
- Doetsch, F. et al., 1999. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell*, 97(6), pp.703–716.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, a, 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(13), pp.5046–5061.
- Ellis, P. et al., 2004. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Developmental neuroscience*, 26(2-4), pp.148–65.
- Felten, D.L., Cummings, J.P. & Burnett, B.T., 1981. Ontogeny of caudal fourth ventricular tanycytes in the rabbit brain: a Golgi study. *The Anatomical record*, 200(3), pp.321–330.
- Feng, C.-Y., Wiggins, L.M. & von Bartheld, C.S., 2011. The locus ceruleus responds to signaling molecules obtained from the CSF by transfer through tanycytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(25), pp.9147–9158.

- Feng, L. & Heintz, N., 1995. Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development (Cambridge, England)*, 121(6), pp.1719–30.
- Frayling, C., Britton, R. & Dale, N., 2011. ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *The Journal of physiology*, 589(Pt 9), pp.2275–86.
- Gadisseux, J.F. & Evrard, P., 1985. Glial-neuronal relationship in the developing central nervous system. A histochemical-electron microscope study of radial glial cell particulate glycogen in normal and reeler mice and the human fetus. *Developmental neuroscience*, 7(1), pp.12–32.
- Garcia-Ovejero, D. et al., 2015. The ependymal region of the adult human spinal cord differs from other species and shows ependymoma-like features. *Brain : a journal of neurology*, 138(Pt 6), pp.1583–97.
- Garcia-Segura, L.M. et al., 1994. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia*, 10(1), pp.59–69.
- Götz, M. & Huttner, W.B., 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(10), pp.777–788.
- Guerra, M. et al., 2010. Cell organization of the rat pars tuberalis. Evidence for open communication between pars tuberalis cells, cerebrospinal fluid and tanycytes. *Cell and Tissue Research*, 339(2), pp.359–381.
- Haan, N. et al., 2013. Fgf10-Expressing Tanycytes Add New Neurons to the Appetite/Energy-Balance Regulating Centers of the Postnatal and Adult Hypothalamus. *Journal of Neuroscience*, 33(14), pp.6170–6180.
- Hanon, E. a. et al., 2008. Ancestral TSH Mechanism Signals Summer in a Photoperiodic Mammal. *Current Biology*, 18(15), pp.1147–1152.
- Hartfuss, E. et al., 2001. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Developmental biology*, 229(1), pp.15–30.
- Hazlerigg, D.G. & Lincoln, G. a., 2011. Hypothesis: Cyclical Histogenesis Is the Basis of Circannual Timing. *Journal of Biological Rhythms*, 26(6), pp.471–485.
- Horstmann, E., 1954. [The fiber glia of selacean brain]. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)*, 39(6), pp.588–617.
- Hourai, A. & Miyata, S., 2013. Neurogenesis in the circumventricular organs of adult mouse brains. *Journal of Neuroscience Research*, 91(6), pp.757–770.
- Huang, L., DeVries, G.J. & Bittman, E.L., 1998. Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *Journal of Neurobiology*, 36(3), pp.410–420.
- Huttner, W.B. & Brand, M., 1997. Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Current opinion in neurobiology*, 7(1), pp.29–39.
- Ibañez-Tallon, I., Heintz, N. & Omran, H., 2003. To beat or not to beat: roles of cilia in

- development and disease. *Human molecular genetics*, 12 Spec No(1), pp.R27–R35.
- Jiménez, A.J. et al., 2014. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue barriers*, 2, p.e28426.
- Johnson, a K. & Gross, P.M., 1993. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(8), pp.678–686.
- Kálmán, M. & Ajtai, B.M., 2001. A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia in the developing rat neocortex: Immunostaining against nestin reveals more detail, than GFAP or vimentin. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19(1), pp.101–108.
- Kobayashi, H., Matsui, T. & Ishii, S., 1970. *International Review of Cytology Volume 29*, Elsevier.
- Kokoeva, M. V, Yin, H. & Flier, J.S., 2005. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5748), pp.679–683.
- Kokoeva, M. V., Yin, H. & S., F.J., 2007. Evidence for Constitutive Neural Cell Proliferation in the Adult Murine Hypothalamus. *The Journal of comparative neurology*, 504(3), pp.287–297.
- Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla, A., 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*, 32, pp.149–84.
- Kriegstein, A.R. & Götz, M., 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia*, 43(1), pp.37–43.
- Krisch, B. & Leonhardt, H., 1978. The functional and structural border of the neurohemal region of the median eminence. *Cell and tissue research*, 192(2), pp.327–39.
- Kútna, V. et al., 2014. Enigmatic cerebrospinal fluid-contacting neurons arise even after the termination of neurogenesis in the rat spinal cord during embryonic development and retain their immature-like characteristics until adulthood. *Acta histochemica*, 116(1), pp.278–85.
- Langlet, F. et al., 2013. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *The Journal of comparative neurology*, 521(15), pp.3389–405.
- Langlet, F. et al., 2013. Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell metabolism*, 17(4), pp.607–17.
- Lechan, R.M. & Fekete, C., 2007. Infundibular tanycytes as modulators of neuroendocrine function: Hypothetical role in the regulation of the thyroid and gonadal axis. *Acta Biomedica*, 78(SUPPL. 1), pp.84–98.

- Lee, D. a et al., 2012. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nature Neuroscience*, 15(5), pp.700–702.
- Lee, D. a. et al., 2014. Dietary and sex-specific factors regulate hypothalamic neurogenesis in young adult mice. *Frontiers in Neuroscience*, 8(8 JUN), pp.1–11.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B. & McKay, R.D., 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60(4), pp.585–95.
- Levitt, P. & Rakic, P., 1980. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *The Journal of comparative neurology*, 193(3), pp.815–40.
- Li, J., Tang, Y. & Cai, D., 2012. IKK β /NF- κ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nature cell biology*, 14(10), pp.999–1012.
- Lois, C., García-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, a, 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5251), pp.978–981.
- Lowery, L.A. & Sive, H., 2009. Totally tubular: the mystery behind function and origin of the brain ventricular system. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 31(4), pp.446–58.
- Lu, F. et al., 2013. Rax is a selector gene for mediobasal hypothalamic cell types. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(1), pp.259–72.
- Lu, Q. et al., 2015. Early steps in primary cilium assembly require EHD1/EHD3-dependent ciliary vesicle formation. *Nature Cell Biology*, (February 2014).
- Luo, Y. et al., 2015. Single-Cell Transcriptome Analyses Reveal Signals to Activate Dormant Neural Stem Cells. *Cell*, 161(5), pp.1175–1186.
- Mailleux, A.A. et al., 2005. Fgf10 expression identifies parabronchial smooth muscle cell progenitors and is required for their entry into the smooth muscle cell lineage. *Development (Cambridge, England)*, 132(9), pp.2157–66.
- Malatesta, P. et al., 2003. Neuronal or Glial ProgenyRegional Differences in Radial Glia Fate. *Neuron*, 37(5), pp.751–764.
- Markakis, E. a et al., 2004. Novel neuronal phenotypes from neural progenitor cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(12), pp.2886–2897.
- Marshall, W.F. & Kintner, C., 2008. Cilia orientation and the fluid mechanics of development. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(1), pp.48–52.
- Martens, D.J., Seaberg, R.M. & Van der Kooy, D., 2002. In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 16(6), pp.1045–1057.
- Mashayekhi, F. et al., 2002. Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas

- (H-Tx) rat: a role for CSF. *Brain : a journal of neurology*, 125(Pt 8), pp.1859–1874.
- Mathew, T.C., 2008. Regional analysis of the ependyma of the third ventricle of rat by light and electron microscopy. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 37(1), pp.9–18.
- Mathew, T.C., 2007. Scanning electron microscopic observations on the third ventricular floor of the rat following cervical sympathectomy. *Folia Morphol (Warsz)*, 66(2), pp.94–99.
- Merkle, F.T. et al., 2004. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(50), pp.17528–32.
- Merkle, F.T., Mirzadeh, Z. & Alvarez-Buylla, A., 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5836), pp.381–4.
- Mestres, P., 1981. The ventricular surface of the monkey mediobasal hypothalamus. *Anatomy and Embryology*, 161(4), pp.391–404.
- Migaud, M., Butrille, L. & Batailler, M., 2014. Seasonal regulation of structural plasticity and neurogenesis in the adult mammalian brain: Focus on the sheep hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 37, pp.146–157.
- Millhouse, O.E., 1971. A Golgi study of third ventricle tanycytes in the adult rodent brain. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 121(1), pp.1–13.
- Miranda-Angulo, A.L. et al., 2014. Rax regulates hypothalamic tanycyte differentiation and barrier function in mice. *Journal of Comparative Neurology*, 522(4), pp.876–899.
- Mirzadeh, Z. et al., 2010. Cilia organize ependymal planar polarity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(7), pp.2600–10.
- Mirzadeh, Z. et al., 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell stem cell*, 3(3), pp.265–78.
- Miyan, J. a, Nabiyouni, M. & Zendah, M., 2003. Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 81(4), pp.317–328.
- Morshead, C.M. et al., 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: A relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*, 13(5), pp.1071–1082.
- Mullier, A. et al., 2010. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 518(7), pp.943–962.
- Nakane, Y. & Yoshimura, T., 2014. Universality and diversity in the signal transduction

- pathway that regulates seasonal reproduction in vertebrates. *Frontiers in Neuroscience*, 8(8 MAY), pp.1–7.
- Nehmé, B. et al., 2012. The Expression Pattern of the Na(+) Sensor, Na(X) in the Hydromineral Homeostatic Network: A Comparative Study between the Rat and Mouse. *Frontiers in neuroanatomy*, 6, p.26.
- Niwa, A. et al., 2015. Voluntary exercise induces neurogenesis in the hypothalamus and ependymal lining of the third ventricle. *Brain Structure and Function*.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V. & Kriegstein, A.R., 2008. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *The Journal of comparative neurology*, 508(1), pp.28–44.
- Nyeng, P. et al., 2007. FGF10 signaling controls stomach morphogenesis. *Developmental biology*, 303(1), pp.295–310.
- O’Rahilly, R. & Müller, F., 1994. Neurulation in the normal human embryo. *Ciba Foundation symposium*, 181, pp.70–82; discussion 82–9.
- Oh, E.C., Vasanth, S. & Katsanis, N., 2015. Metabolic Regulation and Energy Homeostasis through the Primary Cilium. *Cell Metabolism*, 21(1), pp.21–31.
- Ohata, S. et al., 2014. Loss of Dishevelleds disrupts planar polarity in ependymal motile cilia and results in hydrocephalus. *Neuron*, 83(3), pp.558–71.
- Ohata, S. et al., 2015. Mechanosensory Genes Pkd1 and Pkd2 Contribute to the Planar Polarization of Brain Ventricular Epithelium. *Journal of Neuroscience*, 35(31), pp.11153–11168.
- Pérez-Martín, M. et al., 2010. IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. *European Journal of Neuroscience*, 31(9), pp.1533–1548.
- Peruzzo, B. et al., 2000. A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Experimental brain research*, 132(1), pp.10–26.
- Peruzzo, B. et al., 2004. Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat. *Cell and tissue research*, 317(2), pp.147–164.
- Piehl, M. et al., 2007. Internalization of large double-membrane intercellular vesicles by a clathrin-dependent endocytic process. *Molecular biology of the cell*, 18(2), pp.337–47.
- Pierce, A. a & Xu, A.W., 2010. De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. , 30(2), pp.723–730.
- Pixley, S.K. & de Vellis, J., 1984. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain research*, 317(2), pp.201–9.
- Prevot, V. et al., 1999. Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: Implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience*, 94(3), pp.809–819.

- Rakic, P., 2003. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cerebral Cortex*, 13(6), pp.541–549.
- Rakic, P., 2002. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(1), pp.65–71.
- Robins, S.C. et al., 2013. Extensive regenerative plasticity among adult NG2-glia populations is exclusively based on self-renewal. *Glia*, 61(10), pp.1735–1747.
- Robins, S.C. et al., 2013. α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nature communications*, 4(May), p.2049.
- Rodríguez, E.M. et al., 2005. Hypothalamic tanycytes: A key component of brain-endocrine interaction. *International Review of Cytology*, 247(05), pp.89–164.
- Rodríguez, E.M., Blázquez, J.L. & Guerra, M., 2010. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*, 31(4), pp.757–776.
- Rodríguez, E.M., González, C.B. & Delannoy, L., 1979. Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell and tissue research*, 201(3), pp.377–408.
- Sahara, S. & O'Leary, D.D.M., 2009. Fgf10 Regulates Transition Period of Cortical Stem Cell Differentiation to Radial Glia Controlling Generation of Neurons and Basal Progenitors. *Neuron*, 63(1), pp.48–62.
- Salvatierra, J. et al., 2014. The LIM Homeodomain Factor Lhx2 Is Required for Hypothalamic Tanycyte Specification and Differentiation. *Journal of Neuroscience*, 34(50), pp.16809–16820.
- Schachenmayr, W., 1967. Über die Entwicklung von Ependym und Plexus choroideus der Ratte. *Z. Zellforsch*, 77, pp.25–68.
- Schwartz, M.W. et al., 2000. Control of food intake. *Nature*, 404Schwa, pp.661–671.
- Segal, M.B., 1993. Extracellular and cerebrospinal fluids. *Journal of inherited metabolic disease*, 16(4), pp.617–38.
- Seo, S. et al., 2009. Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Human molecular genetics*, 18(7), pp.1323–31.
- Shearer, K.D. et al., 2012. Photoperiodic expression of two RALDH enzymes and the regulation of cell proliferation by retinoic acid in the rat hypothalamus. *Journal of neurochemistry*, 122(4), pp.789–99.
- Shibata, T. et al., 1997. Glutamate Transporter GLAST Is Expressed in the Radial Glia-Astrocyte Lineage of Developing Mouse Spinal Cord. *J. Neurosci.*, 17(23), pp.9212–9219.
- Sorokin, S., 1962. Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *The Journal of cell biology*, 15(10), pp.363–377.

- Sousa-Ferreira, L. et al., 2011. Proliferative hypothalamic neurospheres express NPY, AGRP, POMC, CART and orexin-a and differentiate to functional neurons. *PLoS ONE*, 6(5).
- Sousa-Ferreira, L., de Almeida, L.P. & Cavadas, C., 2014. Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 25(2), pp.80–8.
- Spassky, N. et al., 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(1), pp.10–8.
- Sternson, S.M., 2013. Hypothalamic survival circuits: blueprints for purposive behaviors. *Neuron*, 77(5), pp.810–24.
- Tong, C.K. et al., 2014. Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell stem cell*, 14(4), pp.500–11.
- Tramontin, A.D. et al., 2003. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): A continuum of the neural stem cell compartment. *Cerebral Cortex*, 13(6), pp.580–587.
- Valassi, E., Scacchi, M. & Cavagnini, F., 2008. Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, 18(2), pp.158–68.
- Vígh, B. et al., 2004. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histology and Histopathology*, 19(2), pp.607–628.
- Vígh, B. & Vígh-Teichmann, I., 1998. Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Microscopy Research and Technique*, 41(1), pp.57–83.
- Walsh, R.J., Brawer, J.R. & Lin, P.L., 1978. Early postnatal development of ependyma in the third ventricle of male and female rats. *The American journal of anatomy*, 151(3), pp.377–407.
- Weigmann, A. et al., 1997. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), pp.12425–30.
- Weiss, S. et al., 1996. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(23), pp.7599–7609.
- Whish, S. et al., 2015. The inner CSF-brain barrier: developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions. *Frontiers in neuroscience*, 9, p.16.
- Wittkowski, W., 1998. Tanycytes and pituicytes: Morphological and functional aspects of neuroglial interaction. *Microscopy Research and Technique*, 41(1), pp.29–42.
- Xu, Y. et al., 2005. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Experimental Neurology*, 192(2), pp.251–264.

- Yokohama-Tamaki, T. et al., 2006. Cessation of Fgf10 signaling, resulting in a defective dental epithelial stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development (Cambridge, England)*, 133(7), pp.1359–66.
- Zoli, M. et al., 1995. Age-related alterations in tanycytes of the mediobasal hypothalamus of the male rat. *Neurobiology of Aging*, 16(1), pp.77–83.