

Presentado por: Claudia González Cucharero y Ornella Alessandra Mendoza
Carrera de Biomedicina, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid

Autores: Coles JA (1), Stewart-Hutchinson PJ (2), Myburgh E (1 y 3), Brewer JM (1)

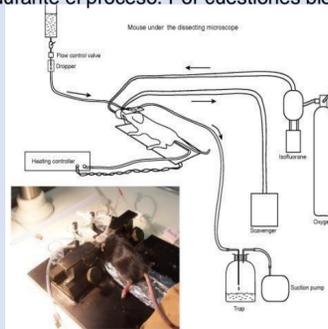
Centros de trabajo: (1) Centre for Immunobiology, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, (2) Department of Pediatrics, Division of Infectious Diseases, Washington University School of Medicine, (3) Centre for Immunology and Infection, Department of Biology, University of York.

OBJETIVOS

Proveer de un protocolo acerca de un método de **microscopía de dos fotones** a través del cráneo cortical de un ratón anestesiado para obtener imágenes en tiempo real a través de las meninges y el cerebro superficial del parénquima. De esta forma se observará el comportamiento que tienen los neutrófilos, linfocitos T, células dendríticas y macrófagos reclutados en las meninges corticales ante las infecciones de meningitis; para ello estudiaremos el efecto de *Plasmodium berghei* y de *Trypanosoma brucei* en **ratones sanos e infectados**.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Sistema para adelgazar el cráneo → placa delgada de acero inoxidable con un orificio
- Sistema para sujetar el cráneo del ratón mediante una "placa del cráneo"
- Bomba de succión con un sistema de calefacción homeostático controlado por una sonda
- Cemento dental, solución salina fisiológica y anestésico volátil (Ketamina)
- Ratón (anestesiado por perfusión)
- Microscopio: Zeiss LSM7 MP → Laser 700 hasta 1050 nm
- Microscopio de excitación de dos fotones.
- El método se basa en la observación mediante el microscopio de dos fotones. (El ratón será anestesiado durante el proceso. Por cuestiones bioéticas el animal será sacrificado con una sobredosis de anestesia al final del experimento.)



La anatomía funcional de las meninges

La duramadre es una membrana delgada que recubre un espacio subaracnoideo espacioso (SAS) en la leptomeninge. Sin embargo, ratones y otros roedores no tienen surcos, y sobre el cerebro dorsal, el SAS es profundo sólo donde penetra la fisura longitudinal medial. En contraste, la duramadre es lo suficientemente gruesa como para acomodar paquetes de colágeno, una rica vasculatura y lagunas extracelulares. Está **ampliamente innervado** y la **actividad en las neuronas del trigémino con terminaciones en la duramadre** se percibe como un dolor de cabeza.

La compartimentación funcional de las meninges aún no está clara. La microscopía electrónica muestra que las células de la **capa externa de la leptomeninge** están **conectadas** por uniones estrechas y se puede suponer que es esta membrana la que **separa** el líquido cefalorraquídeo (LCR) en el SAS del extracelular. La naturaleza de la barrera, así como su ubicación, es de interés, ya que existe evidencia de que la materia particulada y las células T pueden pasar de la leptomeninge a los vasos linfáticos dentro de la duramadre y viceversa. El LCR presente en el SAS puede contener citoquinas pro-inflamatorias secretadas por el plexo coroideo.

Microscopía in vivo de dos fotones, que permite obtener imágenes simultáneas de varios fluoróforos (Fig. 1 A). Pretendemos centrarnos en si una respuesta inmunitaria está en la duramadre o en la leptomeninge.

A las dos semanas de la infección intraperitoneal, **Trypanosoma brucei** se extravasa en espacios cercanos al cráneo. Los **triptanosomas** se pueden ver apretando **entre las fibras de colágeno** y moviéndose cerca de los vasos sanguíneos pequeños, pero por encima de la mayoría de los grandes. Su llegada es precedida por la **invasión de las células T**. Estas características indican que **están en la duramadre**. (Fig. 2 B y C). Al final de la infección, se observan células T ocasionales debajo de la duramadre, a nivel de la piamadre.

Se observa un patrón diferente con la infección por **Plasmodium berghei**. Las células T reclutadas tienden a extenderse a lo largo de los vasos grandes (Fig. 2 E), probablemente en la **leptomeninge**, y su movimiento tiende a ser paralelo al vaso. Esto también se observa después de la oclusión de la arteria cerebral media (Fig. 2 F).

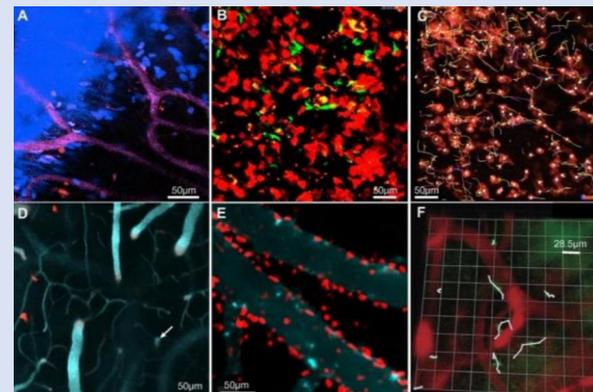


Figura 2

RESULTADOS

Las infecciones virales y microbianas causan meningitis, cuyo síntoma principal es el dolor de cabeza, que implica actividad nerviosa en las meninges y actividad de mastocitos residentes. Son la puerta de entrada a la invasión patógena del parénquima cerebral.

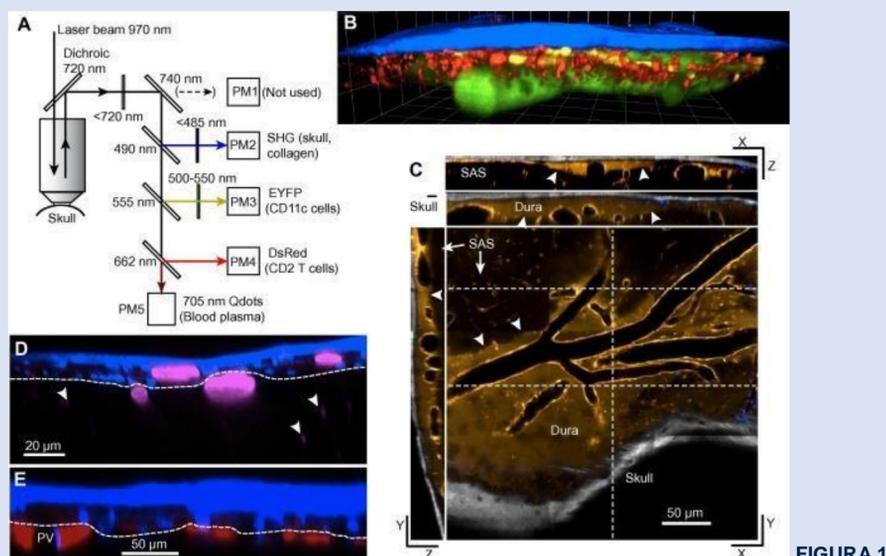
Usamos estas enfermedades para que nos aporten información sobre la **relación huésped-patógeno**; relación que se ve afectada por modificaciones como el entorno. Podemos alterar el tejido al llevar a cabo una disección, para lo que usaremos el método intravital, evitando falsos resultados.

La **técnica** más eficaz es la **microscopía de dos fotones** a través del adelgazamiento del cráneo cortical de un ratón anestesiado. Ésta nos permitirá obtener **imágenes en tiempo real** a través de las meninges y hacia el parénquima. Hay ratones informadores mediante los que determinamos qué tipos de células expresan proteínas fluorescentes y conseguir imágenes posteriores a la infección. Una **desventaja** es que los cambios patológicos del transcriptoma pueden no ser iguales en ratones y humanos.

Las enfermedades estudiadas son:

• **Plasmodium berghei**: reclutamiento de células T (naranja) en espacios subaracnoideos en la leptomeninge (conjunto de piamadre y aracnoides).

• **Trypanosoma brucei**: reclutamiento de células T a la duramadre donde pueden moverse entre fibras de colágeno (líneas verdes).



En Fig. B vemos vasos sanguíneos marcados mediante inyección iv de dextrano usando fluorescencia.

Localización de células y estructuras en las meninges del ratón

En la Fig. 1 B se muestran en verde los **vasos sanguíneos**. El **hueso** y el **colágeno** se pueden visualizar fácilmente con un microscopio de dos fotones (Fig. 1 C). Se emite una longitud de onda de 900 nm y se produce una emisión a 450 nm, que se puede usar para construir una imagen como si fuera un fluoróforo convencional (azul en la Figura 1).

Los vasos sanguíneos en la duramadre son relativamente permeables, y los tintes nucleares fluorescentes inyectados marcan los núcleos en la duramadre, así como los núcleos de las células endoteliales vasculares de color azul (Fig. 1 D, E y Fig. 2 A).

En la Fig. 1 D sugerimos dónde podría ubicarse la **membrana aracnoidea**, debajo de los núcleos marcados y por encima de los **vasos leptomenígeos**.

Como se muestra en la Fig. 1 C, en estos ratones, no solo se etiquetan las paredes de los vasos, sino que el tejido de la **duramadre** es débilmente fluorescente, a diferencia del **leptomeninge** que no se identifica. → Esto puede resultar una herramienta útil para distinguir los dos compartimentos, pero un ratón informador en el que la membrana aracnoidea sea fluorescente, sería más convincente.

En la duramadre se observa la presencia de colágeno y de los núcleos marcados con un colorante IV en el parénquima (Fig. 2 A) y emergen las **venas** (Fig. 2 D). Los **capilares** no están presentes en la leptomeninge, mientras que los pequeños vasos en la duramadre tienen un patrón de ramificación característico (color morado, Fig. 2 D).

El **parénquima** cerebral se identifica fácilmente por la ausencia de grandes vasos horizontales. Los vasos leptomenígeos son grandes y horizontales y con frecuencia se encuentran en depresiones en la superficie parenquimatosa. Las **arterias** se hunden bruscamente.

CONCLUSIONES

Tras los resultados obtenidos a partir del estudio de *Plasmodium berghei* y de *Trypanosoma brucei* y su efecto en ratones sanos e infectados, hemos observado que:

- Las meninges corticales llevan a cabo un fuerte reclutamiento de las células inmunitarias: neutrófilos, linfocitos T, macrófagos células dendríticas.
- Dependiendo del tipo de virus afecta a la parte de la duramadre (como es el caso de *Trypanosoma brucei*) o de la leptomeninge (*Plasmodium berghei*).