

## Microbiología Tisular

### El modelo de cultivo cerebral para el estudio de patógenos que afectan al sistema nervioso central

Sara Remuzgo Martínez<sup>1-2</sup>, Elsa Valdizán<sup>3-5</sup>,  
José Manuel Icardo<sup>6</sup> y José Ramos-Vivas<sup>1,2,7\*</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, <sup>2</sup>Instituto IFIMAV, Santander, <sup>3</sup>Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Cantabria, <sup>4</sup>Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (UC-CSIC-SODERCAN), Santander, <sup>5</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, <sup>6</sup>Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria, Santander. <sup>7</sup>Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

En la era de los vuelos *low cost*, publicar o morir, el *net-working*, y también un indeseable ambiente de lucha darwiniana por los recursos, la cooperación entre investigadores de diferentes áreas ha hecho —y hará— emerger nuevas disciplinas científicas. Hace ya casi veinte años, apareció una nueva forma de entender las interacciones entre el hospedador y sus potenciales patógenos. Desde entonces, los investigadores que trabajan en «Microbiología Celular» han identificado y caracterizado numerosas estructuras bacterianas que interactúan directamente con la superficie de las células eucariotas. De manera similar, se han identificado muchos receptores para patógenos, presentes en los diferentes tipos celulares de mamíferos, que desencadenan importantes respuestas para controlar la infección. También se han evidenciado increíbles herramientas que utilizan las bacterias, virus y parásitos para sabotear en su beneficio las maquinarias moleculares y las rutas de señalización de las células eucariotas. Todo esto y mucho más, se ha conseguido gracias al pleno dominio que han adquirido los microbiólogos de las herramientas de cultivo celular y de microscopía avanzada. En este contexto, algunos microbiólogos que estudian las interacciones bacteria-célula y la biología de la infección se han dado cuenta de que hay que dar un paso más, y transitar desde los modelos celulares a los tisulares (15). Por tanto, la colaboración de microbiólogos con investigadores de otros campos como la Inmunología, la Neurobiología, la Farmacología, la Histología, o incluso la Física y la Química, se presume fundamental a la hora de utilizar de forma óptima los modelos bacteria-tejido. Estos modelos, también denominados organotípicos, son muy útiles a la hora de estudiar una infección en su verdadero contexto tisular, a medio camino

entre el modelo celular y el animal. Casi todos conocemos la facilidad de cultivar líneas celulares, y también los grandes problemas que presenta el manejo de animales vivos. Por ello, un nivel intermedio de complejidad puede poseer más ventajas que el modelo celular, y menos inconvenientes que el modelo *in vivo*. Además, en términos de número de animales de experimentación, es muy deseable el establecimiento de modelos que reemplacen, al menos parcialmente, a los estudios *in vivo*. Esta sustitución podría ser muy beneficiosa sobre todo en etapas tempranas de una investigación, como por ejemplo en una fase de cribado inicial de algún microorganismo mutante, o de algún fármaco o compuesto. De hecho, algunos estudios ya han demostrado la eficacia de los modelos tridimensionales de agregados celulares, para el estudio de distintos aspectos de las infecciones con patógenos bacterianos y víricos (1, 8, 13). Aunque estos modelos han resultado muy útiles, al estar formados casi en su totalidad por un solo tipo celular, fallan a la hora de intentar reproducir la heterogeneidad tisular.

### EL MODELO ORGANOTÍPICO DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

Las enfermedades infecciosas que afectan al SNC son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. ¿Quién no ha oído hablar de la meningitis? Otras patologías graves, y de nombres tremendamente extraños (casi todas terminadas en -itis) pueden encontrarse fácilmente en la literatura, y son producidas por bacterias, virus, hongos y parásitos. Aquí los microbiólogos tenemos mucho que decir.

Por SNC nos referiremos principalmente al cerebro, ese órgano inmunológicamente privilegiado y aislado del resto del cuerpo por la barrera hematoencefálica (BH), una riquísima red de capilares que lo protege de toxinas y microorganismos que circulan en la sangre. Pero la evolución ha bendecido a numerosos patógenos —la lista es bastante larga para ocuparnos de ella aquí— con la capacidad para alcanzar esta barrera, e incluso atravesarla para causar daño no solo en las meninges, sino también en el propio tejido cerebral. La Figura 1 representa las rutas principales por las que los patógenos atraviesan la BH.

En este punto, se han utilizado a menudo los cultivos de células eucariotas de tipo endotelial, para estudiar sus interacciones con los patógenos que causan daños en el SNC (sobre todo bacterias, y más recientemente hongos y parásitos). Todo ello, con vistas a comprender mejor cómo estos patógenos son capaces de atravesar la barrera formada por dichas células, y alcanzar la masa cerebral (10-12, 16, 17). Una vez dentro del cerebro, los patógenos interaccionan con las células autóctonas, principalmente neuronas, astrocitos, y microglía. Microglía es el nombre que reciben las células fagocíticas profesionales del cerebro, y que tienen su analogía en los macrófagos del resto del cuerpo.

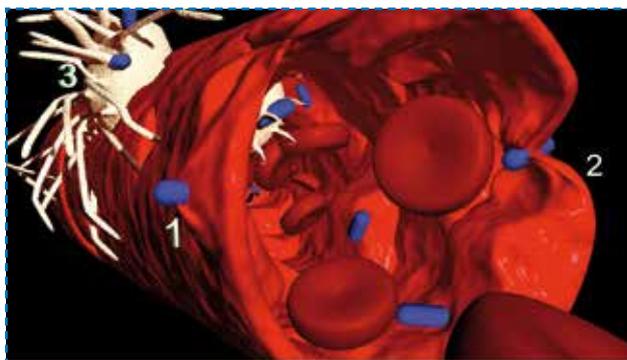
Gracias principalmente a los neurobiólogos y farmacólogos, hace ya bastantes años se establecieron varios modelos tisulares como herramienta para estudios de

electrofisiología, radiología e histología. La extraordinaria peculiaridad de estos modelos es que mantienen viva —incluso durante muchos meses— una porción relativamente extensa de cerebro. Es esta viabilidad tisular la que los hace tremendamente atractivos para estudiar fenómenos fisiológicos, bioquímicos, anatómicos o incluso de desarrollo y regeneración neuronal. Muy pronto, se comprendió que estos «pedazos» de cerebro conservaban prácticamente intacta su estructura original, por lo que eran también buenos candidatos para estudiar infecciones causadas por microorganismos.

Existen varias alternativas para la realización de los cultivos organotípicos, como son el *tubo rotatorio* y el método de *interfase*. Fueron Hogue en 1947 y posteriormente Gähwiler en 1981, los que introdujeron y popularizaron la primera de ellas (5, 7). Años más tarde, investigadores del Departamento de Farmacología del Centro Médico Universitario de Ginebra implementaron un método simple para el cultivo y mantenimiento de tejido cerebral con un espesor considerable, sobre una membrana, en el denominado *método de interfase* (19). Posteriormente, investigadores suizos, de grupos de Microbiología General, Farmacología, y Medicina Tropical, utilizaron este método de cultivo de cerebro para el estudio de infecciones experimentales. Publicaron las primeras infecciones con esta técnica en el *International Journal of Medical Microbiology*, utilizando el parásito protista *Trypanosoma brucei* (18). Desde entonces, numerosos equipos de todo el mundo han utilizado esta técnica de cultivo de tejido cerebral para realizar infecciones con otros patógenos. Por citar algunos: virus: VIH, virus herpes, citomegalovirus; parásitos: *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Neospora*, y bacterias: *Streptococcus pneumoniae* y *Listeria monocytogenes*. Las referencias que citamos a continuación ofrecen una completa información sobre cómo realizar el protocolo más actual de esta técnica de cultivo de cerebro (2, 6).

Las características y ventajas que presenta este modelo son numerosas: puede realizarse en distintas especies de roedores, e incluso en rumiantes, seleccionando la estructura anatómica cerebral más interesante para cada microorganismo. Los tejidos poseen una estructura tridimensional organizada que preserva el microambiente cerebral, donde están presentes todos los tipos celulares representativos del cerebro. El mantenimiento en el laboratorio no supone un gran coste, lo que permite estudiar fenómenos de infección a largo plazo. Requieren escasa manipulación, ya que se nutren como las monocapas de células, con un medio de cultivo fácil de preparar, y cuyo reemplazo se realiza rápidamente sin distorsionar el tejido. Si se pretende por ejemplo, realizar recuentos bacterianos durante las infecciones, se puede lisar el tejido completo para obtener las bacterias intra- y extracelulares. A partir de los lisados (que se realizan de forma sencilla, al tratarse de tejido blando), pueden obtenerse ácidos nucleicos o proteínas —del patógeno o del tejido— para la realización de técnicas moleculares o de proteómica, como la PCR en tiempo real o *Western Blot*.

Además, el tejido se enraíza y se ancla firmemente en la membrana que lo soporta, a través de proyecciones celulares



**Fig. 1.** Principales mecanismos implicados en el cruce de la BH por patógenos.

**1. Ruta transcelular.** El patógeno cruza la BH atravesando las propias células endoteliales. Un ejemplo de patógeno que utiliza esta ruta es la levadura encapsulada *Cryptococcus neoformans*.

**2. Ruta paracelular.** El patógeno atraviesa la BH utilizando las uniones intercelulares. Un ejemplo de patógeno que utiliza esta ruta es el parásito *Trypanosoma brucei*.

**3. Caballo de Troya.** El patógeno atraviesa la BH utilizando la transmigración de fagocitos previamente infectados. Un ejemplo de patógeno que utiliza esta ruta es la bacteria *Listeria monocytogenes*.

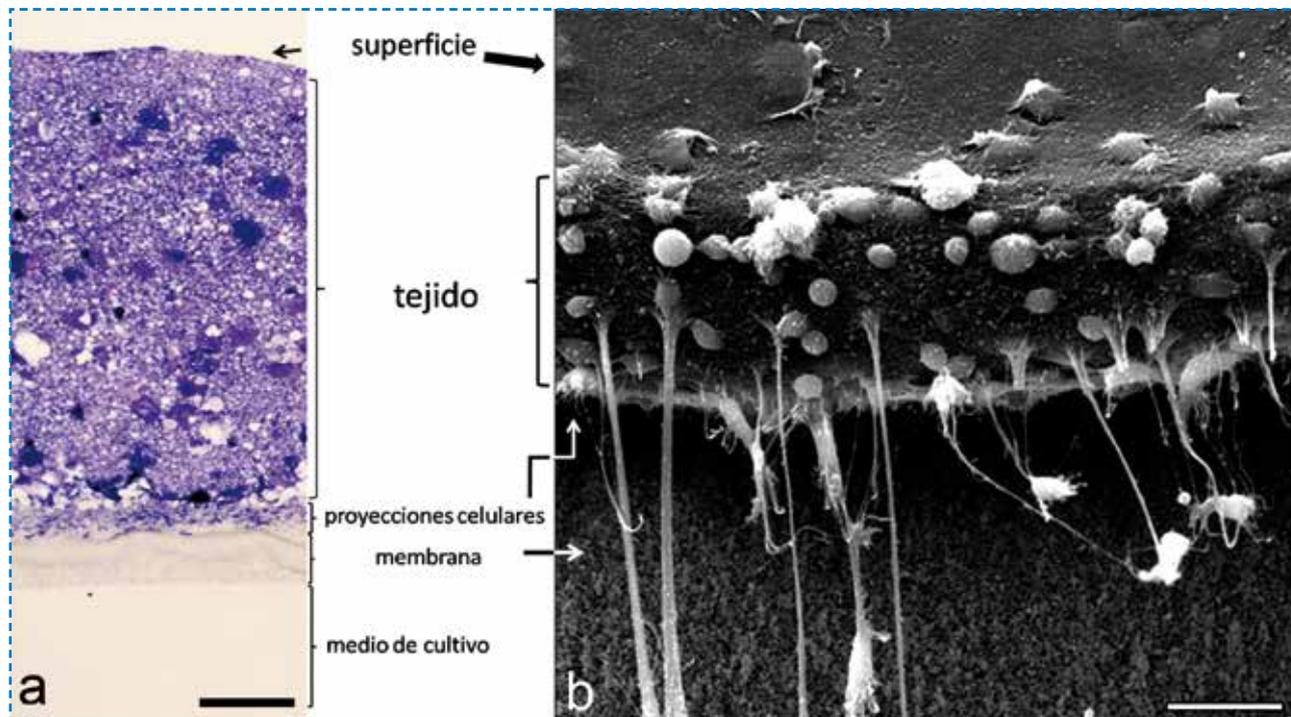
res, hasta alcanzar la proximidad del medio de cultivo en la zona basal (Figura 2), lo que permite que esta sirva como barrera permeable a los nutrientes y a los compuestos que queramos probar, como drogas o inmunosupresores, pero impermeable a bacterias, virus o parásitos (el tamaño de poro de la membrana puede variar).

Al descansar el tejido sobre una membrana transparente, pueden realizarse además, experimentos de transfección y estudios con microscopía de fluorescencia. También, tras una fijación química, pueden estudiarse los fenómenos relevantes mediante microscopía convencional, electrónica de transmisión (TEM), de barrido (SEM) o de dos fotones.

Para estudios de interacciones con patógenos, este sistema permite la realización de tres tipos de infecciones diferentes. La primera, para patógenos que atraviesan fácilmente la BH, la infección se realiza de forma sencilla y directa en la parte superior del tejido. Por otro lado, para patógenos que no atraviesan la BH, pero cuyos productos extracelulares inducen daño cerebral por estimulación de mediadores proinflamatorios, la infección se realiza inculcando el propio medio de cultivo del tejido, en la parte basal de la membrana sobre la que descansa este. Con lo

cual, el patógeno no entra en contacto directo con el tejido —ya que el filtro actúa haciendo las veces de BH— pero sus productos extracelulares sí. Estos productos extracelulares como el LPS o toxinas, son los causantes *in vivo* de inflamación en la BH o en las meninges. Para incrementar la complejidad, pueden introducirse en el sistema células endoteliales que se anclan perfectamente a la membrana sobre la que descansa el tejido cerebral, emulando su sistema fisiológico de microdiálisis (3). Además, se pueden utilizar animales transgénicos para obtener los cultivos, realizar estudios de co-infección con cepas bacterianas salvajes y mutantes, o realizar estudios de farmacocinética con antibióticos, drogas u otros compuestos, con vistas a determinar su rol durante las infecciones. Estos compuestos se añaden de manera fácil y directa al medio de cultivo tisular, haciendo muy versátil a este modelo.

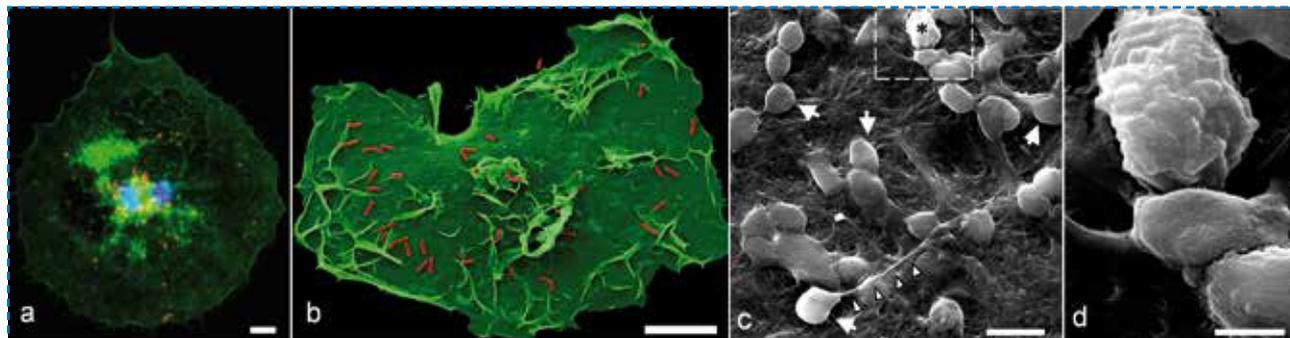
Un tercer tipo de infección que se puede realizar en estos cultivos, es la denominada caballo de Troya, en la cual, fagocitos infectados en otras zonas del cuerpo, son transportados por el torrente sanguíneo hasta la BH, que cruzan fácilmente para realizar sus funciones, pero también liberando a los patógenos que transpor-



**Fig. 2.** Estructura del tejido organotípico de cerebro. Microfotografías de un corte semifino (izquierda) y de SEM (derecha) de un cultivo organotípico de cerebro de rata, utilizado para realizar infecciones experimentales con *L. monocytogenes*. En el corte semifino (teñido con azul de toluidina) podemos apreciar las diferentes partes del cultivo. En la microfotografía de SEM, podemos observar un borde del tejido, que se ha despegado parcialmente de la membrana que lo sustenta. La superficie del tejido está formada por células planas, que dan un aspecto liso a su parte superior, en donde se realizan las infecciones. Podemos también apreciar como algunas células intentan alcanzar el sustrato para adquirir nutrientes. Magnificación original: a  $\times 400$ ; b  $\times 900$ . Barras de escala, a, 50  $\mu\text{m}$ , b, 15  $\mu\text{m}$ .

tan, directamente en el tejido cerebral. Para imitarlo, se puede disgregar previamente el tejido cerebral de un cultivo no infectado, y obtener células aisladas de microglía (fagocitos). Estas células son infectadas *in vitro* (Figura 3a-b), y pueden ser puestas en contacto otra vez con la superficie de un nuevo cultivo organotípico.

A partir de ahí, los patógenos que utilizan este método de infección escapan de las células infectadas para colonizar el tejido cerebral (Figura 3c-d). Utilizando cultivos organotípicos de cerebro de rata, nuestro grupo ha realizado «quizás» la primera foto *in situ* de la fagocitosis por células de microglía de un patógeno neurotrópico,



**Fig. 3.** Mecanismo del caballo de Troya utilizado por *L. monocytogenes* en el tejido cerebral. Microfotografías: a) Célula de microglía cerebral aislada de tejido *ex vivo*, que ha sido cultivada *in vitro* durante varios días, e infectada experimentalmente con el patógeno. En la imagen, tomada con un microscopio de epifluorescencia, podemos observar las bacterias en rojo, el núcleo celular en azul, y el citoesqueleto celular en verde; b) Se muestra la misma escena que en a), pero la microfotografía está tomada con un microscopio de barrido, y en ella se pueden observar solo las bacterias adheridas a la superficie del fagocito cerebral. En c) observamos un fagocito (\*) que ha capturado bacterias, se está desplazando sobre el cultivo organotípico, y se dispone a penetrar en el interior del tejido. En la imagen se muestran numerosos cuerpos neuronales (flechas) y un axón de gran tamaño (cabezas de flecha), sobre un entramado de extensas conexiones nerviosas. En d), se muestra una magnificación del recuadro señalado en c). Magnificación original: a,  $\times 200$ ; b,  $\times 5000$ ; c,  $\times 4000$ ; d,  $\times 19.627$ . Barras de escala, a, b,  $10\ \mu\text{m}$ , c,  $10\ \mu\text{m}$ , d,  $2.5\ \mu\text{m}$ .

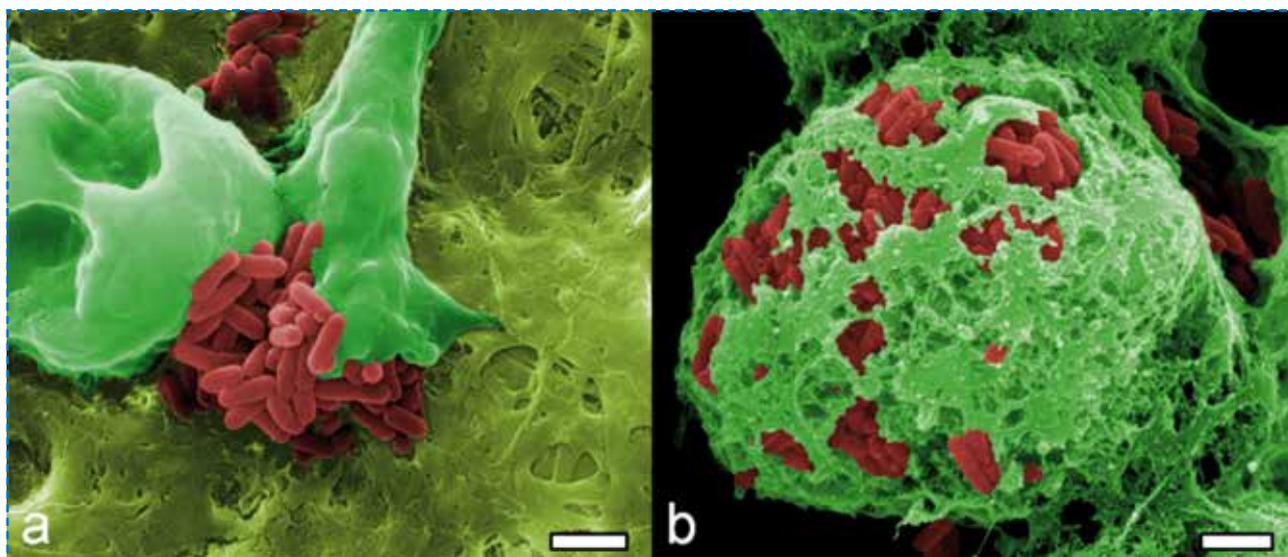
mediante SEM (Figura 4a) (14). Posteriormente, se produce un crecimiento intracelular de la bacteria, que en algunos casos produce una destrucción total de la célula infectada (Figura 4b). Este modelo, puede ser por tanto, utilizado para estudiar fenómenos aislados de interacciones bacteria-célula dentro de un contexto tisular, lo que permite conocer con más detalle cómo es la biología de la infección en el cerebro.

Creemos que, mientras nuevos modelos de infección *in vitro* hacen su aparición [como los complejos sistemas de pocillos insertables que cada vez incorporan más tipos celulares distintos, o los prometedores esferoides libres de andamiajes sintéticos e hidrogeles (4, 9)] y se implementa la versatilidad y la resolución de la microscopía intravital, los modelos organotípicos posibilitan una tremenda fuente de información para los microbiólogos, sobre infecciones víricas, fúngicas, parasitarias y bacterianas, complementando perfectamente, y sustituyendo en algunos casos, a los estudios *in vivo*.

**Agradecimientos.** Nuestro trabajo no sería tan efectivo sin la colaboración del Dr. Fidel Madrazo (Servicio de Microscopía Avanzada, IFIMAV, Santander).

## REFERENCIAS

1. Barrila J, Radtke AL, Crabbe A, Sarker SF, Herbst-Kralovetz MM, Ott CM, Nickerson CA. 2010. Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* 8:791-801.
2. De Simoni A, Yu LM. 2006. Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: interface method. *Nat Protoc* 1:1439-45.
3. Dupont S, Robert F, Muller D, Grau G, Parisi L, Stoppini L. 1998. An *in vitro* blood-brain barrier model: cocultures between endothelial cells and organotypic brain slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1840-5.
4. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. 2013. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol* 31:108-15.
5. Gahwiler BH. 1981. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 4:329-42.
6. Gogolla N, Galimberti I, DePaola V, Caroni P. 2006. Preparation of organotypic hippocampal slice cultures for long-term live imaging. *Nat Protoc* 1:1165-71.
7. Hogue MJ. 1947. Human fetal brain cells in tissue cultures; their identification and motility. *J Exp Zool* 106:85-107.
8. Honer zu Bentrup K, Ramamurthy R, Ott CM, Emami K, Nelman-Gonzalez M, Wilson JW, Richter EG, Goodwin TJ, Alexander JS,



**Fig. 4.** Interacción de *L. monocytogenes* con células de microglía. En a), se muestra la primera fotografía de SEM de una célula de microglía capturando bacterias en un contexto tisular. En b), la imagen muestra como la bacteria ha proliferado enormemente en el interior de un fagocito, hasta el punto de que se ha fracturado completamente la membrana celular, con lo que se pueden observar las bacterias en su interior. a) Imagen pseudocoloreada, reproducida con el permiso de John Wiley and Sons Publishers: *GLIA*, 2013; Vol 61:611-22. Magnificación original: a,b,  $\times 20.000$ . Barras de escala, a,  $2 \mu\text{m}$ , b,  $2.5 \mu\text{m}$ .

- Pierson DL, Pellis N, Buchanan KL, Nickerson CA. 2006. Three-dimensional organotypic models of human colonic epithelium to study the early stages of enteric salmonellosis. *Microbes Infect* 8:1813-25.
9. Keller PJ, Pampaloni F, Stelzer EH. 2006. Life sciences require the third dimension. *Curr Opin Cell Biol* 18:117-24.
10. Kim K. 2008. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol* 6:625-34.
11. Kim KS. 2002. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. *J Infect Dis* 186 Suppl 2:S220-4.
12. Kristensson K, Masocha W, Bentivoglio M. 2013. Mechanisms of CNS invasion and damage by parasites. *Handb Clin Neurol* 114: 11-22.
13. Nickerson CA, Goodwin TJ, Terlonge J, Ott CM, Buchanan KL, Uicker WC, Emami K, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Clarke MS, Vanderburg CR, Hammond T, Pierson DL. 2001. Three-dimensional tissue assemblies: novel models for the study of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* pathogenesis. *Infect Immun* 69:7106-20.
14. Remuzgo-Martinez S, Pilares-Ortega L, Icardo JM, Valdizan EM, Vargas VI, Pazos A, Ramos-Vivas J. 2013. Microglial activation and expression of immune-related genes in a rat ex vivo nervous system model after infection with *Listeria monocytogenes*. *Glia* 61:611-22.
15. Richter-Dahlfors A, Dumenil G. 2012. Tissue microbiology emerging. *Curr Opin Microbiol* 15:1-2.
16. Sabiiti W, May RC. 2012. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol* 7:1297-313.
17. Spindler KR, Hsu TH. 2012. Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends Microbiol* 20:282-90.
18. Stoppini L, Buchs PA, Brun R, Muller D, Duport S, Parisi L, Seebek T. 2000. Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Trypanosoma brucei brucei*. *Int J Med Microbiol* 290:105-13.
19. Stoppini L, Buchs PA, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37: 173-82.