

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PAPEL DEL FGF2 EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS  
NEUROEPITELIALES EN ESTADIOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO  
EMBRIONARIO DE RATÓN**

**MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**PRESENTADO POR:**

**JOSÉ FRANCISCO LAMUS MOLINA**

**DIRIGIDO POR:**

**DRA. ESTELA MARÍA CARNICERO GILA**

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y RADIOLOGÍA**

**VALLADOLID, A 02 DE JULIO DE 2012.**

## INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso de los vertebrados se origina a partir de las células neuroepiteliales que constituyen la pared del tubo neural del embrión en desarrollo. Este tubo se origina mediante un proceso denominado neurulación, en el cual, una región del ectodermo de la superficie dorsal del embrión denominada placa neural, se invagina y, progresivamente, fusiona sus bordes y se aísla del resto del ectodermo, formando así una estructura cilíndrica inmersa en el mesénquima embrionario. A continuación, se da inicio a una “fase de expansión y vesiculación cerebral”, en la cual, el tubo neural se expande aceleradamente en su región anterior y se diferencia en cinco vesículas, precursoras del sistema nervioso central completo del adulto: telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo (eje anteroposterior). Finalmente, se desarrolla la histogénesis a lo largo de todo el neuroepitelio.

Durante la fase de expansión y vesiculación cerebral se forma una gran cavidad delimitada por el neuropitelio, y que contiene el fluido cerebroespinal embrionario (E-CSF por sus siglas en inglés), un fluido de composición proteica compleja que resulta indispensable para la regulación de los procesos tempranos de crecimiento, morfogénesis y control del comportamiento de las células neuroepiteliales (Martin et al., 2009; for a review see Gato and Desmond, 2009).

Al finalizar la neurulación, el neuroepitelio pseudoestratificado está conformado en el ratón por aproximadamente 250000 células (for a review see Ford-Perriss, et al., 2001). Éstas son esencialmente células madre pluripotentes que generarán el conjunto de precursores para todo el encéfalo y la médula espinal. Inicialmente se desarrolla una fase de intensa proliferación que busca conformar una gran cantidad de células precursoras. Posteriormente, dará comienzo a una fase de neurogénesis o diferenciación, en la que muchas de las células salen de la región proliferativa, migran y se diferencian a neuronas o células de estirpe glial (for a review see Kessar et al., 2008; Delaunay et al., 2008). Las células de la glía radial actúan a manera de “cuerdas de guía” para la migración de las neuronas desde su lugar de origen hasta sus capas definitivas en el encéfalo.

Las células precursoras que se hallan revistiendo la porción dorsal de las vesículas telencefálicas darán origen a la corteza cerebral, mientras que las células situadas dentro de la región basal constituirán los ganglios basales (Raballo et al., 2000). El número de células progenitoras neuronales, su índice de proliferación y el número de ciclos mitóticos experimentados, determinarán el número de neuronas corticales y el tamaño de la corteza cerebral (Takahashi et al., 1994). Se sabe que en

ratones, los progenitores corticales experimentan neurogénesis desde el estadio embrionario E11,5 (11,5 días p.c.) al estadio E17,5 (17.5 días p.c.) lo que es equivalente a 11 ciclos celulares (Takahashi et al., 1995).

La proliferación debe regularse con el fin de garantizar que el tamaño global del SNC en desarrollo sea el correcto. Además, la decisión de salir del ciclo celular debe coordinarse con la especificación del destino celular para asegurar que la proporción de cada tipo celular (neuronal y glial) sea la adecuada (for a review see Donovan and Dyer, 2005). Diversos factores tróficos y mitogénicos han sido relacionados con los procesos de proliferación y diferenciación durante el desarrollo embrionario del SNC; entre éstos se destacan: factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factor de crecimiento insulínico (IGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), entre otros (for a review see Edlund and Jessell, 1999; Panchision and McKay, 2002; Itoh and Ornitz, 2011).

Es bien conocido que los miembros de la familia de los FGFs desempeñan múltiples y críticas tareas durante la formación del SNC desde el estadio de inducción neural hasta el estadio de diferenciación terminal, promoviendo la supervivencia celular, la proliferación, la migración y la diferenciación (for a review see Ford-Perriss, M. et al., 2001; Hébert, J.M. 2011; Itoh, N., and Ornitz D.M., 2011).

### ***FGFs y su influencia en el desarrollo del SNC***

Los FGFs constituyen una gran familia de factores de crecimiento polipeptídicos que fueron identificados inicialmente como proteínas capaces de promover la proliferación de fibroblastos murinos en cultivo. Actualmente se sabe que desempeñan una gran diversidad de actividades biológicas relacionadas con el desarrollo embrionario, el mantenimiento de la homeostasis, la respuesta al daño, la regulación de la excitabilidad eléctrica de las células y la regulación del metabolismo (for a review see Itoh and Ornitz, 2011).

En mamíferos, la familia FGFs está codificada por 22 genes. En humanos, análisis filogenéticos de sus secuencias identifican 7 subfamilias de FGFs (for a review see Itoh and Ornitz., 2011) y diez de sus miembros son expresados en el sistema nervioso central en desarrollo (for a review see Ford-Perriss, M. et al., 2001). Los FGFs también pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción, como intracrinos (FGF11/12/13/14), endocrinos (FGF15/19/21/23) y paracrinos (el resto) (for a review see Kuro-o, 2008).

Los FGFs ejecutan su actividad biológica actuando sobre una subfamilia de 4 miembros de receptores de superficie celular tipo tirosina quinasa (FGFRs) (Johnson et

al., 1993; Reuss, 2003). Un FGFR está formado por tres dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (I,II,III), un dominio transmembrana y un dominio tirosina quinasa intracelular. Existen varias isoformas debido al *splicing* alternativo del mRNA que se produce para el tercer dominio tipo inmunoglobulina, creando de esta manera receptores con distintas especificidades para FGFs particulares (Johnson and Williams, 1993). Los primeros dos dominios tipo inmunoglobulina están separados por un tramo de aminoácidos ácidos y un dominio de unión a heparina que interacciona con proteoglicanos heparansulfato (HSPGs), que actúan como cofactor y que también pueden ligarse a la familia de FGFs (for a review see Berridge, 2009). Cuando se une el ligando FGF, el receptor se dimeriza, se autofosforila y fosforila uno o más mediadores intracelulares cercanos. La mayoría de los FGFs activan más de un FGFR.

Los FGFs están involucrados en el desarrollo del SNC desde las fases más tempranas de la morfogénesis. Aunque en mamíferos aun no se demuestra plenamente, en vertebrados como el pollo se sabe que los FGFs están relacionados con los eventos de inducción neural (Rodríguez-Gallardo et al., 1997). También se ha demostrado que en etapas posteriores del desarrollo, algunos FGFs participan en el establecimiento del patrón del eje anteroposterior de la placa neural (FGF8), proceso en el que intervienen además otros factores como WNTs, ácido retinoico, BMPs (Bone morphogenetic proteins) y antagonistas de BMP (for a review see Panchision and McKay, 2002; Ille, and Sommer, 2005).

Diversos estudios corroboran la expresión de diferentes FGFs en el esbozo temprano del SNC. Se conoce que el FGF1, FGF2 y FGF15 se expresan de forma más general a lo largo de todo el desarrollo del tubo neural y están presentes tanto en el SNC del adulto como en el embrionario, mientras que FGF8 y FGF17 están característicamente localizados en regiones específicas del cerebro en desarrollo y son expresados en el embrión únicamente en momentos clave (for a review see Ford-Perriss, M. et al., 2001).

Los FGFs se reconocen claramente como promotores de la supervivencia y especificación del destino celular, diferenciación, proliferación, migración e incluso se han relacionado con procesos de guía axonal (for a review see Hébert, J.M. 2011).

Durante el diseño del esbozo (“patterning”) de las vesículas cerebrales, el FGF8 es producido por el organizador ístmico, una estructura que separa el cerebro medio del cerebro posterior y que actúa a manera de centro transmisor de señales moleculares (for a review see Martinez S., 2001). Se han realizado estudios en los que una aplicación ectópica de FGF8 ha ocasionado la formación de dos cerebros medios “en espejo” o la transformación del cerebro anterior en cerebro medio, lo que

demuestra la implicación del FGF8 en la determinación de la identidad del cerebro medio (Crossley et al., 1996; Martínez, S. et al., 1999).

Además del “patterning”, los FGF son indispensables para expandir la reserva de células precursoras neuroepiteliales previo al inicio de la neurogénesis (Vaccarino et al., 1999; Raballo et al., 2000; Paek et al., 2009). En este sentido, diversos estudios llevados a cabo tanto *in vivo* como *in vitro* han mostrado la destacada importancia del FGF2 para inducir la proliferación de progenitores neurales y células madre, así como también para mantener el estado indiferenciado de éstas últimas cuando es necesario (Ray et al., 1994; Temple and Qian, 1995; Raballo et al., 2000; Kang et al., 2009) o incluso, según algunos estudios, para promover supervivencia (Walicke, 1988; Paek et al., 2009).

Se sabe que en embriones de mamífero, el neuroepitelio es capaz de sintetizar FGF2 (Vaccarino et al., 1999), de tal manera que este actuaría de forma paracrina sobre las células neuroepiteliales. Sin embargo, algunos investigadores postulan además un posible origen extraneural para el FGF2 que actúa sobre el SNC en desarrollo. Los resultados presentados por Martín et al., (2006), muestran por una parte cómo el FGF2 identificado en el E-CSF ejerce un efecto positivo sobre la proliferación celular y la neurogénesis de cultivos neuroepiteliales. Por otra parte, utilizando FGF2 recombinante marcado con FITC, demostraron *in vivo*, en embriones de pollo, cómo este factor logra alcanzar el E-CSF desde el suero embrionario.

El ratón es el modelo de mamífero más ampliamente utilizado para estudiar la función de un gen. La mutagénesis dirigida de genes FGF en ratón ha ayudado a dilucidar muchas de sus funciones en el desarrollo y en el metabolismo. Por ejemplo, utilizando ratones mutantes para el FGF2, se ha llegado a demostrar la importancia de éste durante el desarrollo normal de la corteza cerebral en mamíferos, en aspectos como la regulación del número de neuronas allí localizadas, el volumen, la organización, la diferenciación y la migración (Dono et al 1998; Vaccarino et al. 1999; Raballo et al. 2000). De esta manera se ha encontrado en estos ratones un bajo número de células proliferativas durante los estadios tempranos de la corticogénesis, una baja cinética tanto del incremento del volumen cerebral como del número de células y defectos en la organización de las diferentes capas corticales. Se ha llegado a detectar en ratones homocigotos para el alelo mutado de FGF2 una disminución del número de neuronas corticales de hasta el 50% con respecto al ratón wild-type (Vaccarino et al., 1999).

La mayoría de estudios realizados en ratones acerca de la relación entre FGF2 y la proliferación en el sistema nervioso en desarrollo, han centrado su atención en la zona que dará origen a la corteza cerebral y en estadios posteriores a E10.5,

incluyendo ratones recién nacidos. En ratón, se ha detectado la presencia de FGF2 en las regiones precursoras del cerebro desde el estadio E9.5 (Nurcombe et al., 1993). Resultaría entonces interesante indagar el efecto proliferativo en diferentes zonas del SNC en desarrollo valorando diferentes estadios, incluyendo la fase previa a la neurogénesis.

El objetivo inicial de este trabajo es determinar el efecto de la ausencia del FGF2 sobre la proliferación de las células madre neuroepiteliales durante el desarrollo embrionario en roedores. Para ello, utilizaremos una cepa de ratón knockout (KO) para FGF2 ( $Fgf2^{tm1Doe}/Fgf2^{tm1Doe}$ ; Mice homozygous for the  $Fgf2^{tm1Doe}$  targeted-mutant allele, The Jackson Laboratory).

Se estudiará el comportamiento de las células neuroepiteliales a diferentes niveles: *vesículas telencefálicas, mesencéfalo, cerebro anterior y posterior a nivel de las vesículas ópticas y cerebro posterior a nivel de las vesículas óticas*. Todos los resultados se compararán con los obtenidos en ratones wild-type (WT).

Para el inicio de este estudio utilizaremos ratones KO y WT de estadio E10.5.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

#### *Ratones Knockout FGF-2 y Wild-Type:*

Los ratones FGF-2<sup>-/-</sup> y FGF-2<sup>+/+</sup> tipo salvaje fueron adquiridos al “The Jackson Laboratory” (Bar Harbor, Maine; Stock Number: 003256). El ratón fue generado por medio de una delección dirigida que reemplazó una porción de 0,5 kb del gen FGF-2, incluyendo 121 pb de la región promotora proximal y el exón 1 completo, utilizando un minigen Hprt. El genotipo de cada ratón fue confirmado por PCR de acuerdo al protocolo proporcionado por “The Jackson Laboratory”.

#### *Cruces y verificación de la gravidez:*

Los ratones empleados en los experimentos se ubican en un animalario, expuestos a un ciclo alternante de luz/oscuridad controlado (12 horas luz/12 horas oscuridad) y en unas condiciones favorables de temperatura (20-24 °C) y humedad (45-55%), con el fin de facilitar la estabilidad de los biorritmos de los animales y mejorar los resultados del apareamiento.

Para el ratón, el celo se produce generalmente hacia la medianoche (o de acuerdo al correspondiente período de oscuridad dentro de los ciclos de luz programados en el animalario). Por otra parte, en la orina del macho existen compuestos odoríferos muy fuertes que sirven para marcar el territorio y regular la actividad sexual y social del grupo.

Por lo anterior, cuando se decide realizar los cruces, se deja al macho en su jaula y se rota las hembras: se introducen tres hembras a la jaula del macho al comienzo de la fase de oscuridad y se controla a las hembras bien temprano a la mañana siguiente para verificar la preñez por la aparición del “tapón vaginal”. En los ratones el esperma del macho coagula dentro de la vagina formando un “tapón vaginal” relativamente duro y evidente a simple vista, que persiste unas 6 a 12 horas. Este tapón está formado por una mezcla de secreciones de las glándulas sexuales accesorias del macho y secreciones vaginales.

Las hembras positivas para el hallazgo del tapón, se suponen preñadas y se separan, registrando como hora de inicio del desarrollo embrionario las 0 horas de la noche anterior. El estadio gestacional se expresa en días *post coitum* (p.c.) desde aquel momento.

## Genotipaje

Inicialmente se decidió expandir la colonia de ratones. Se realizó un genotipaje de los ratones obtenidos a partir de cruces (+/-) x (+/-), siguiendo, como se anotó antes, las recomendaciones de "The Jackson Laboratory". El protocolo usado para PCR fue el siguiente:

Primer	5' Label	Sequence 5' --> 3'	3' Label	Primer Type
oIMR0775	-	CAA AGA ACT TAT AGC CCC CC	-	-
oIMR0840	-	CGA GAA GAG CGA CCC ACA C	-	Wild type
oIMR0841	-	CCA GTT CGG GGA CCC TAT T	-	Wild type
oIMR0876	-	TAG CGA TGA TGA ACC AGG	-	Mutant

Reaction Component	Vol. (µl)	Final Concentr.	Step #	Temp °C	Time	Note
ddH2O	3.73	-	1	94	3 min	-
10 X AB PCR BufferII	1.20	1.00 X	2	94	20 sec	-
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.20	2.50 mM	3	64	30 sec	-0.5 C per cycle
2.5 mM dNTP	0.96	0.20 mM	4	72	35 sec	repeat steps 2-4 for 12 cycles
20 uM oIMR0775 (oIMR0840)*	0.60	1.00 uM	5	94	20 sec	-
20 uM oIMR0876 (oIMR0841)*	0.60	1.00 uM	6	58	30 sec	-
5 mM DNA Loading Dye	1.66	0.69 mM	7	72	35 sec	repeat steps 5-7 for 25 cycles
5 U/ul Taq DNA Polymerase	0.05	0.02 U/ul	8	72	2 min	-
DNA	2.00	-	9	10	-	hold

\*De acuerdo a si es la reacción para mutFGF2 o wtFGF2

Luego de la reacción se procedió a una separación en gel de electroforesis con 1.5% agarosa. Se utilizó un lector de geles UVITEC Cambridge.

## INYECCIÓN INTRAPERITONEAL DE BROMODEOXIURIDINA

Tres horas antes de llevar a cabo el procedimiento de obtención de los embriones, las hembras preñadas reciben una inyección intraperitoneal de bromodeoxiuridina (BrdU, Sigma, sln stock 3µg/µL) a una dosis de 10 µg/g de peso. El tiempo de exposición a la BrdU se estimó apoyados en los estudios disponibles (Dono et al., 1998; Raballo et al., 2000) y mediante un sondeo previo en el que, con algunas muestras provenientes de los mismos especímenes usados para este estudio, evaluamos los resultados de la inmunohistoquímica para diferentes tiempos de exposición.

Para la inyección intraperitoneal se utiliza una jeringa con aguja Nº 25. La ratona es sujeta por el dorso evitando cualquier movimiento durante el



procedimiento; su cabeza debe estar ligeramente hacia abajo mientras se presenta la cara ventral hacia el operador. La inyección se aplica en el cuadrante izquierdo bajo, como es observado por el operador (Figura 1). La aguja debe alcanzar una profundidad de aproximadamente medio centímetro y debe insertarse con una inclinación de unos 30° con respecto a la superficie del abdomen.



**Figura 1.** Inyección intraperitoneal.

#### **EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS EMBRIONES DE RATÓN**

##### *Obtención de los embriones:*

Cumplida la edad gestacional de interés, se procede a la extracción los embriones. Inicialmente se anestesia a la hembra preñada mediante inhalación de éter etílico, verificando relajación muscular, inconsciencia y pérdida de mecanismos reflejos.

Se efectúa entonces una laparotomía ventral media (Figuras 2 y 3) con el fin de localizar el útero bicornue. Se comprueba la presencia de embriones al observar el aspecto característico de “collar de cuentas” que adquiere el útero grávido, de tal manera que cada abultamiento corresponde a un embrión. Se separa el útero de la vagina y el peritoneo, y se deposita en una placa de Petri con solución de Ringer (NaCl 120 mM, KCl 5,36 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,63 mM pH 7,3) (Figura 4 y 5). La madre es sacrificada por dislocación cervical.

Cada engrosamiento uterino se individualiza con la ayuda de microtijeras, y entonces por microdissección bajo estereoscopio, a cada engrosamiento uterino se le retira sucesivamente la capa serosa, muscular y finalmente la mucosa. De esta manera queda al descubierto el embrión envuelto en las membranas vitelina y amniótica que son ahora rasgadas cuidadosamente. Por último, se escinde la unión vascular a la placenta (Figuras 6 y 7).

Cada uno de los embriones es ahora clasificado en su estadio preciso de acuerdo a su grado de desarrollo mediante los parámetros morfológicos descritos por Brown y Fabro (1981).



**Figura 2.** Material de extracción del útero



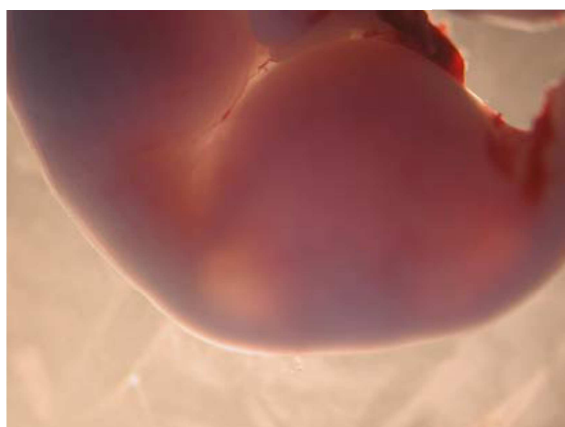
**Figura 3.** Laparotomía ventral media



**Figura 4.** Lupa para microdissección



**Figura 5.** Útero en "collar de cuentas"



**Figura 6.** Engrosamiento del útero



**Figura 7.** Embrión de 11,5 días

#### *Fijación de los embriones:*

Una vez obtenidos todos los embriones, estos son incorporados a una placa de vidrio con fijador Carnoy (70% etanol absoluto, 30% triclorometano estabilizado con etanol, 10% ácido acético glacial). Así se mantienen durante 45 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave.

#### *Deshidratación de embriones:*

Se retira el carnoy de la placa de vidrio y se efectúa una inclusión en etanol al 96% durante 30 minutos, seguida de dos inclusiones en etanol 100%, cada una de 30 minutos de duración.

#### *Transparentación de embriones:*

Se retira el EtOH 100% y se añade xilol dos veces (para este estadio 10 y 5 minutos respectivamente).

#### *Impregnación con parafina :*

Se retira completamente el xilol y se añade parafina líquida. Se almacenan así en estufa a 58 °C durante aproximadamente 2,5 horas.

#### *Inclusión definitiva de la pieza:*

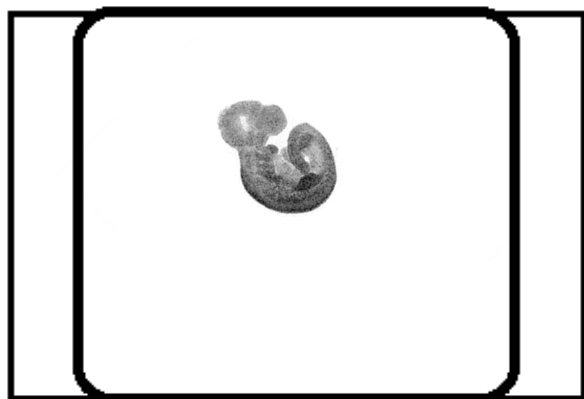
Cada uno de los embriones se incluyó en molde plástico previamente relleno con parafina líquida. Una vez inmerso en este medio, bajo lupa y con la ayuda de un punzón de punta roma se le da la orientación adecuada al embrión para facilitar la posterior ejecución de los cortes con el micrótopo (Figura 8). Se deja solidificar completamente a temperatura ambiente hasta el día siguiente (se desmoldan los bloques y ya se pueden empezar a cortar con el micrótopo [cortes de 8  $\mu\text{m}$  de espesor]).

#### **ELABORACIÓN DE LOS CORTES**

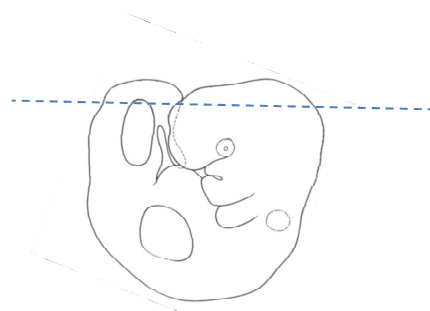
Empleando un micrótopo, de cada embrión se realizaron cortes de 8  $\mu\text{m}$  de espesor, siguiendo el plano ilustrado en la figura 9. Se recogió cada tira de 6 cortes consecutivos sobre porta objetos de vidrio previamente preparados, y se secaron en una estufa a 37 °C durante 24 - 36 horas.

## SELECCIÓN DE PORTAOBJETOS

Bajo microscopio de luz se eligió para cada embrión un portaobjetos de cada una de las regiones o niveles de interés: *mesencéfalo*, *telencéfalo*, *nivel de vesículas ópticas*, *nivel de vesículas óticas*. A esta selección de muestras se le realizó el marcaje anti-BrdU.



**Figura 8.** Orientación dada al embrión en el molde con parafina líquida



**Figura 9.** Plano de realización de los cortes con el micrótopo. (Tomada y modificada de "The atlas of mouse development". Kaufman M.H., 1992).

## INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-BROMODEOXIURIDINA (ANTI-BRDU)

Desparafinación con dos pasos por xilol durante 10 minutos cada uno y dos pasos por etanol 100% durante 7 minutos cada uno.

Se incluyen en agua de grifo durante 15 minutos.

Se desnaturaliza el DNA con HCl 2 M a 37°C durante una hora.

Se neutraliza con ácido bórico 0,1 M a pH 8,5 durante 10 minutos

Se efectúan 3 lavados con buffer TRIS durante 5 minutos cada vez.

Incubación con anticuerpo primario anti-BrdU (IgG Monoclonal Mouse, Dako), dilución 1:100 en buffer TRIS pH 7,3, a 4 °C toda la noche.

Tres lavados con buffer TRIS durante 5 minutos cada vez en agitación suave.

Incubación con anticuerpo secundario anti mouse inmunoglobulina-biotina del kit de extravidina-peroxidasa (Mouse ExtrAvidin® Peroxidase Staining Kit, Sigma), dilución 1:20 en buffer TRIS a temperatura ambiente, en agitación suave durante 30 minutos.

Tres lavados en buffer TRIS durante 5 minutos cada vez.

Se añade la extravidina, dilución 1:20 en buffer TRIS. Se deja durante 10 minutos.

Lavado con buffer TRIS durante 5 minutos.

Se procede al revelado con una solución de diaminobencidina (1 tableta de DAB [SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets] disuelta en 15 mL de buffer TRIS, filtrando posteriormente con filtro de 0,20µM, a la cual se añade 12 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> justo un minuto antes del revelado. El tiempo de exposición a la DAB (< 5 min) dependió de la evolución de la reacción observada bajo lupa.

Se lava con agua destilada durante 5 minutos con el fin de evitar la cristalización de sales.

Se deshidrata durante 5 minutos en cada uno de los alcoholes siguiendo esta secuencia: etanol 80%, 96%, 100% y 100%.

Se pasa dos veces por xilol, 5 minutos cada vez.

Se realiza el montaje con medio eukitt®.

#### **ADQUISICIÓN DE LAS IMÁGENES Y CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS**

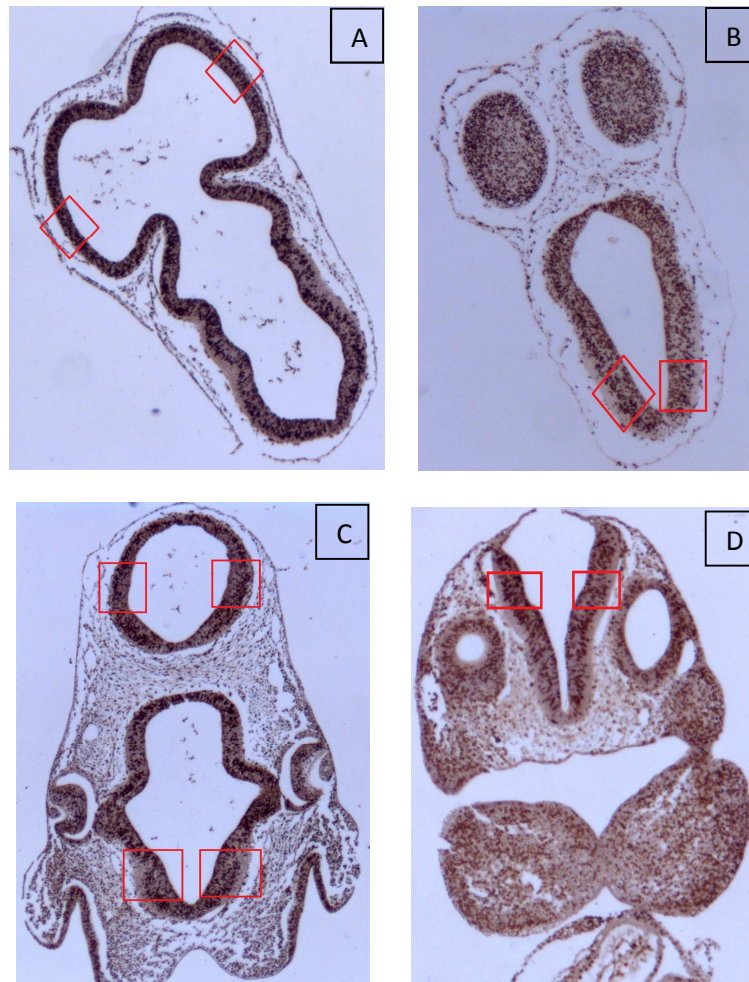
El conteo de las células positivas para incorporación de BrdU se hace a partir de micrografías obtenidas en un microscopio Nikon microphot-FXA, y procesadas con Leica Applications Suite V3.3.0.

Se adquieren imágenes de 5 embriones diferentes tanto para el grupo control como para el grupo KO FGF2.

Las zonas del neuroepitelio seleccionadas en cada una de las dos condiciones experimentales para el análisis de proliferación son: telencéfalo, mesencéfalo, neuroepitelio de cerebro anterior y posterior en las secciones histológicas correspondientes al nivel de las vesículas ópticas, y cerebro posterior a nivel de las vesículas óticas. Para cada zona se toma una imagen del neuroepitelio a cada lado, es decir dos imágenes simétricas (Figura 10). Además, de cada portaobjetos se analizan dos cortes buscando de esta manera lograr siempre un contaje por duplicado.

Las imágenes fueron tomadas con objetivo de 40X y una magnificación de 1.5X. Con el fin de hacer confrontables las imágenes, se buscó adquirir siempre exactamente

la misma longitud de neuroepitelio. Las células incluidas en el conteo son aquellas que exhiben una coloración marrón en su núcleo, precisada de forma visual a partir de un umbral definido previamente. Solo se tienen en cuenta las células que aparecen completamente en el campo.



**Figura 10.** Microfotografías a 4X de las regiones del SNC en desarrollo evaluadas para marcaje anti-BrdU. **(A)** Nivel mesencefálico; **(B)** Vesículas telencefálicas; **(C)** Neuroepitelio (cerebro anterior [abajo] y posterior [arriba]) a nivel de las vesículas ópticas; **(D)** Nivel de vesículas ópticas.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se comparó el número total de células neuroepiteliales marcadas para BrdU en cada una de las zonas estudiadas, para la condición KO frente a la condición control (WT), utilizando una prueba t de dos colas para valorar la significancia de las diferencias encontradas. Además, se calculó y graficó, para cada una de las regiones, el promedio de células positivas para el marcaje, presentes en cada condición, con su respectiva desviación estándar.

## **RESULTADOS**

Con el fin de establecer si la deficiencia de FGF2 durante el desarrollo embrionario ocasiona una disminución en el grado de replicación de las células madre neuroepiteliales, se obtuvieron 5 embriones de ratón KO FGF2 E10.5d (grupo experimental) y 5 embriones de ratón “wild-type” E10.5d (grupo control). Cada grupo se obtuvo a partir de una sola ratona preñada tratada previamente con bromodeoxiuridina (ver materiales y métodos).

Se procedió al procesamiento de estos embriones, a su inclusión en parafina, a la realización de secciones histológicas y a la selección de las regiones de interés a partir de estas últimas. A continuación se llevó a cabo el estudio de proliferación celular mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo anti-BrdU. La obtención de resultados se realizó mediante conteo de células BrdU positivas en un total de 200 imágenes del neuroepitelio, obtenidas en las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos. Finalmente se procedió a realizar un análisis estadístico de los resultados.

La inmunohistoquímica fue exitosa en demostrar la incorporación de la BrdU en todos los casos.

### ***1. Estudios de proliferación***

#### ***1.1 Estudio de la proliferación del neuroepitelio de telencéfalo:***

De cada uno de los 5 embriones WT y KO se seleccionó un portaobjetos con los cortes de neuroepitelio de la región telencefálica. Se procuró seleccionar aquellos cortes en los que se observaba las cavidades telencefálicas de mayor tamaño con el fin de estar situados cada vez, aproximadamente en el mismo nivel.

Se procedió a realizar la inmunohistoquímica antibromodeoxiuridina y al posterior análisis proliferativo. Para ello se tomaron fotos de 2 cortes de la región en estudio por cada portaobjetos, teniendo en cuenta que por cada corte debía adquirirse una imagen del neuroepitelio de la pared lateral correspondiente a cada una de las dos vesículas telencefálicas. De este modo, se hizo, para esta zona, el contaje de núcleos positivos para BrdU en 20 imágenes diferentes por cada uno de los embriones. La zona precisa de estudio se ilustra en la figura 10-A (materiales y métodos).

En la figura 11 (C- D) se muestran los resultados de los análisis estadísticos para estos datos. Se detectó una disminución de cerca del 40% en el número de núcleos

marcados positivamente en el embrión de ratón mutante con respecto al WT ( $p < 0.001$ ).

Al analizar las imágenes detectamos, a su vez, que las paredes del neuroepitelio telencefálico del KO presentaban, de una manera recurrente, un menor grosor que las paredes de los embriones WT (Fig 11 A-B).

### ***1.2 Estudio de la proliferación del neuroepitelio de mesencéfalo:***

De manera similar a como se hizo en el caso anterior, se seleccionaron 5 portaobjetos de mesencéfalo por cada condición (experimental y control), de manera que cada portaobjetos seleccionado se corresponde con un embrión.

Se realizó la inmunohistoquímica, y a continuación se adquirió en cada corte, una foto de cada una de las 2 paredes laterales del mesencéfalo, incluyendo 2 cortes por cada portaobjetos seleccionado, para un total de 20 imágenes por cada grupo de estudio. La zona precisa de estudio se ilustra en la figura 10-B (materiales y métodos)

Se observa una diferencia altamente significativa desde el punto de vista estadístico, entre la condición experimental y el control. Al realizar los contajes obtuvimos un descenso del 37% en el número de núcleos marcados para embriones deficientes en FGF2 comparado con el WT. (Figura 2 C-D).

Nuevamente se observa en la mayoría de las imágenes un grosor menor del neuroepitelio de los embriones mutantes en relación al visualizado en los embriones WT (Fig 12 A-B).

### ***1.3 Estudio de la proliferación del neuroepitelio del cerebro embrionario anterior, a nivel de las vesículas ópticas:***

En un corte de tipo frontal, como el que realizamos en este estudio (Figura 9, materiales y métodos), se hace evidente cuando se llega al nivel de los esbozos ópticos, la aparición de una vesícula correspondiente al cerebro embrionario anterior, y otra perteneciente al posterior (Figura 10-C, materiales y métodos).

Para la región anterior, nuevamente se seleccionó un portaobjetos correspondiente al nivel de interés por cada uno de los 5 embriones de ambos grupos. Se realizó la inmunohistoquímica y de nuevo se tomaron imágenes del neuroepitelio de manera simétrica, es decir a ambos lados en cada uno de los cortes, aprovechando 2 cortes por portaobjetos, para un total de 20 fotos. En esta región, se optó por elegir siempre, para tomar las fotos, el neuroepitelio en su porción más anterior (Figura 10-C, materiales y métodos).



En esta zona también se halló una diferencia altamente significativa entre los dos grupos. Esta vez obtuvimos un conteo total de células en proliferación 38% menor en los embriones KO para FGF2 frente al hallado en el neuroepitelio de los WT (Figura 13 C-D).

De manera generalizada en las diferentes imágenes, vuelve a ser notoria una disminución del volumen de la pared neuroepitelial en los embriones KO con respecto a los del grupo control (Figura 13 A-B).

#### ***1.4 Estudio de la proliferación del neuroepitelio del cerebro embrionario posterior, a nivel de las vesículas ópticas:***

A partir de las imágenes obtenidas para desarrollar el estudio de proliferación del apartado 2.3, situamos la atención en la zona posterior de cada corte (Figura 10-C, materiales y métodos), obteniendo imágenes de forma simétrica, del neuroepitelio de la región central de las paredes laterales.

Uno de los portaobjetos correspondientes al WT, por algún problema técnico durante el procesamiento de la muestra, presentó una avulsión del neuroepitelio del lado derecho, lo que significó dos imágenes menos para el análisis de proliferación del WT en esta región (n=18, en lugar del n=20 esperado).

La figura 14 (C-D) presenta un resumen del análisis estadístico efectuado a los resultados del conteo de núcleos positivos para BrdU. En esta región, se evidencia mediante esta técnica un 36% de disminución en la proliferación de las células neuroepiteliales en los embriones con deficiencia de FGF2, con respecto al valor encontrado para los embriones WT ( $p < 0.001$ ).

Se hizo manifiesto un menor volumen neuroepitelial en los embriones mutantes con relación al control (Figura 14 A-B).

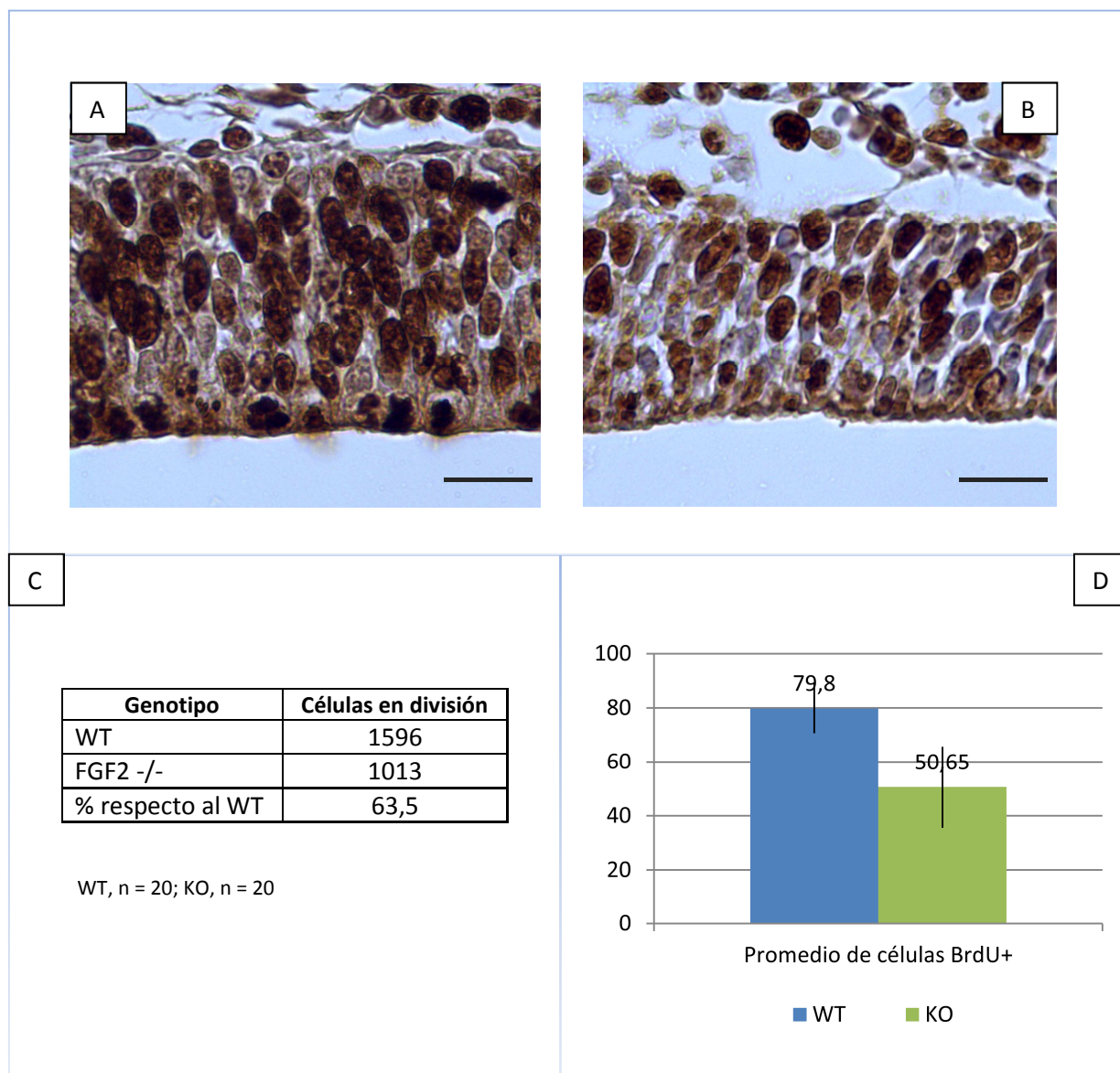
#### ***1.5 Estudio de la proliferación del neuroepitelio del cerebro embrionario posterior, a nivel de las vesículas ópticas:***

Se escogió para cada uno de los embriones KO y WT, un portaobjetos con secciones histológicas que incluyeran el neuroepitelio del cerebro embrionario posterior, a nivel de las vesículas ópticas. A continuación, se efectuó mediante inmunohistoquímica anti-BrdU, un marcaje de las células en estado proliferativo. Luego, se adquirieron imágenes del neuroepitelio de la región de interés (Figura 10-D, materiales y métodos), en dos cortes por cada portaobjetos, para realizar de este

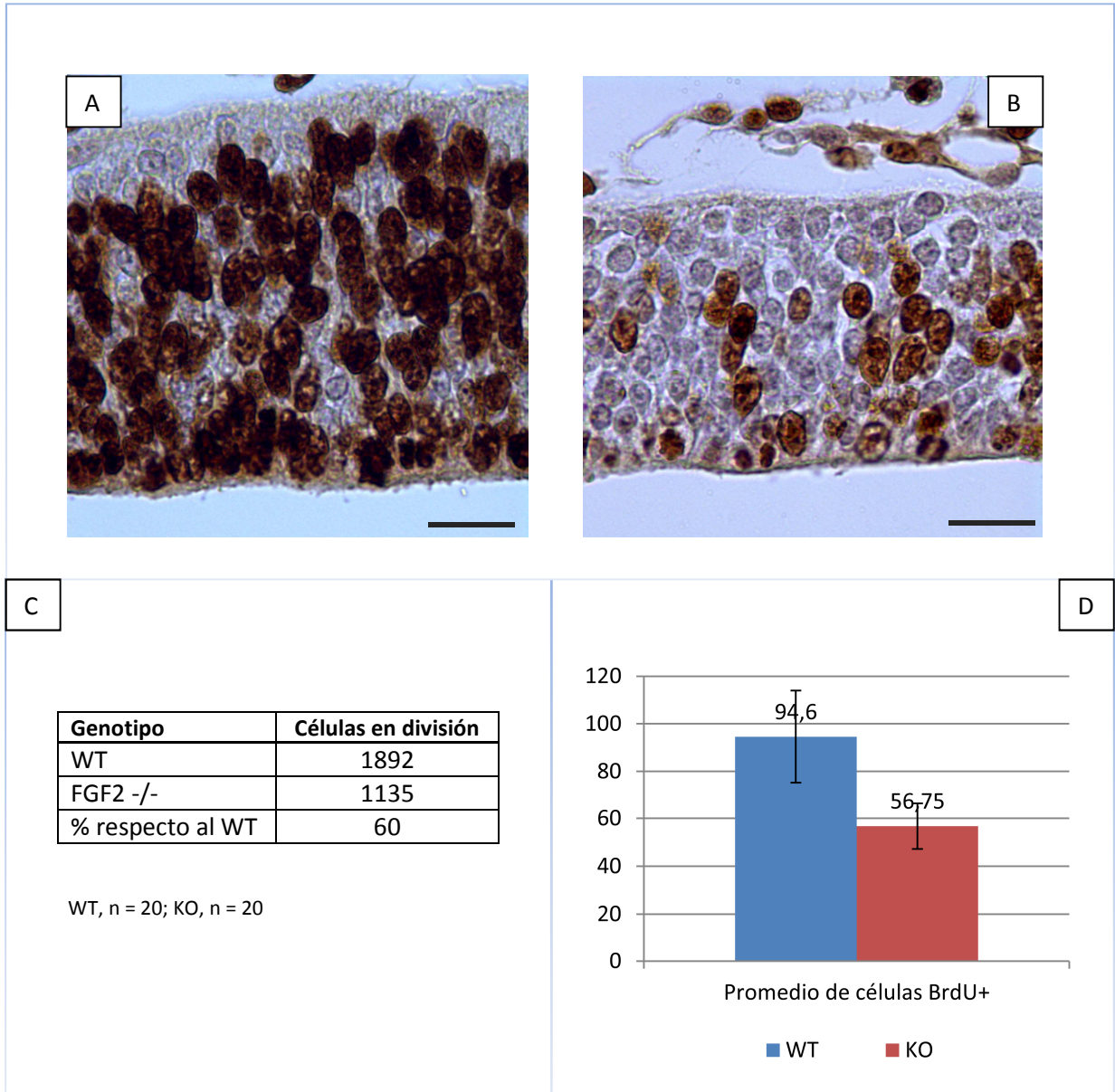
modo el recuento de células marcadas para BrdU en un total de 20 imágenes, 10 por cada condición (experimental y control).

La figura 15 (C-D) presenta los resultados obtenidos en este análisis de proliferación. Se detectó un 40% menos de células que han entrado en fase S, en las muestras obtenidas de embriones de ratón KO para FGF2 en comparación con aquellas de los embriones WT.

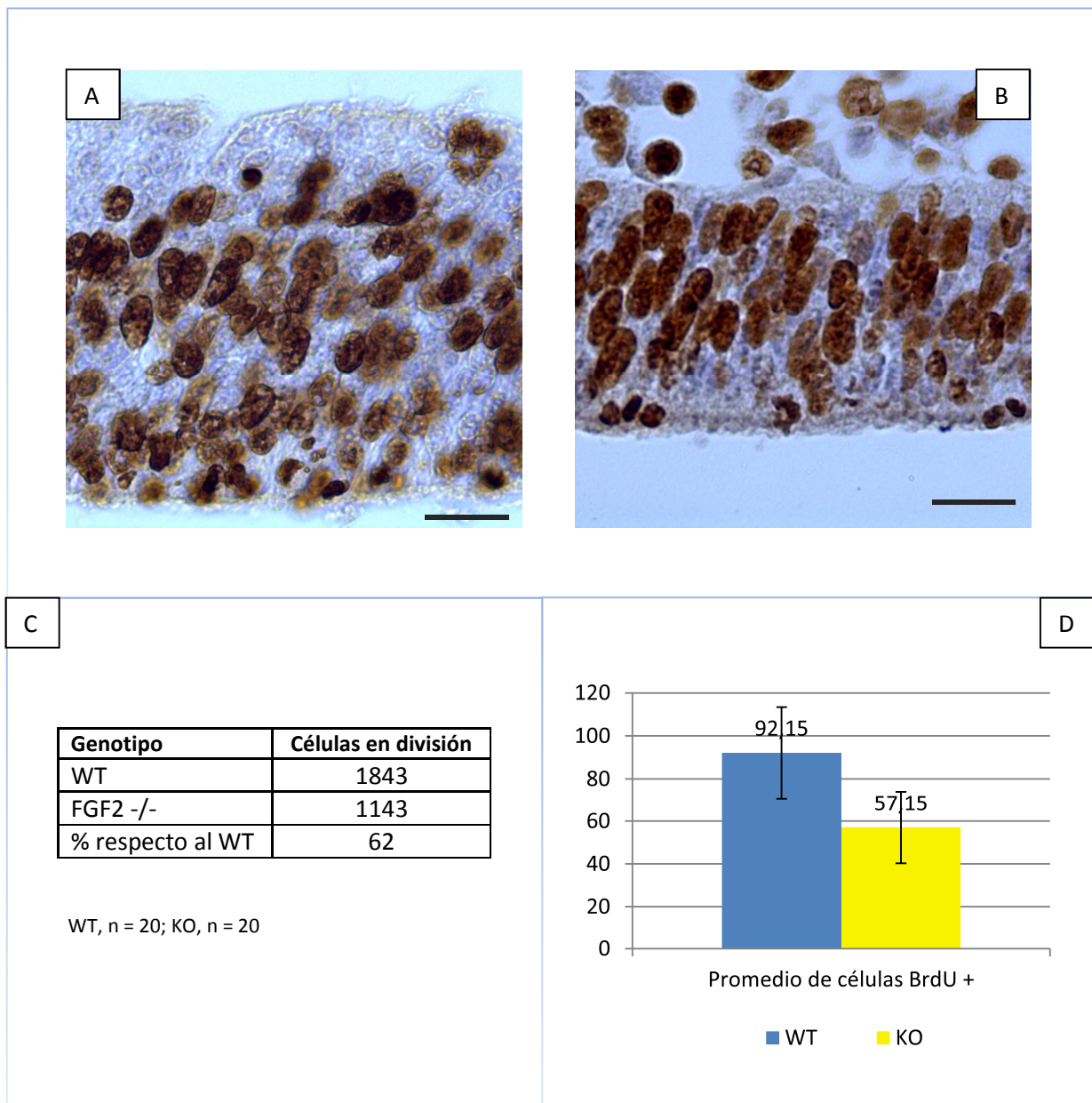
Al igual que en el resto de las regiones estudiadas, se evidencia una reducción del grosor de la pared neuroepitelial.



**Figura 11.** Análisis de proliferación celular neuroepitelial por inmunohistoquímica, en cortes realizados a nivel de telencéfalo de embriones de ratón KO FGF2 y WT (E10,5), tratados con BrdU *in vivo*. Los núcleos marcados aparecen teñidos de marrón y representan a las células en procesos de división celular. Barra de escala: 20  $\mu$ m. En la imagen **(B)** correspondiente al neuroepitelio de la pared lateral del telencéfalo de un embrión KO, se aprecia una menor cantidad de núcleos positivos en comparación con una porción de neuroepitelio de igual longitud perteneciente al telencéfalo del ratón WT **(A)**. Es notable además el adelgazamiento del neuroepitelio en la imagen del KO. La tabla **(C)** muestra el número total de células contadas para cada condición así como el porcentaje con respecto al control WT. El gráfico de barras **(D)** presenta el promedio de células positivas para BrdU ( $p < 0.001$ ).

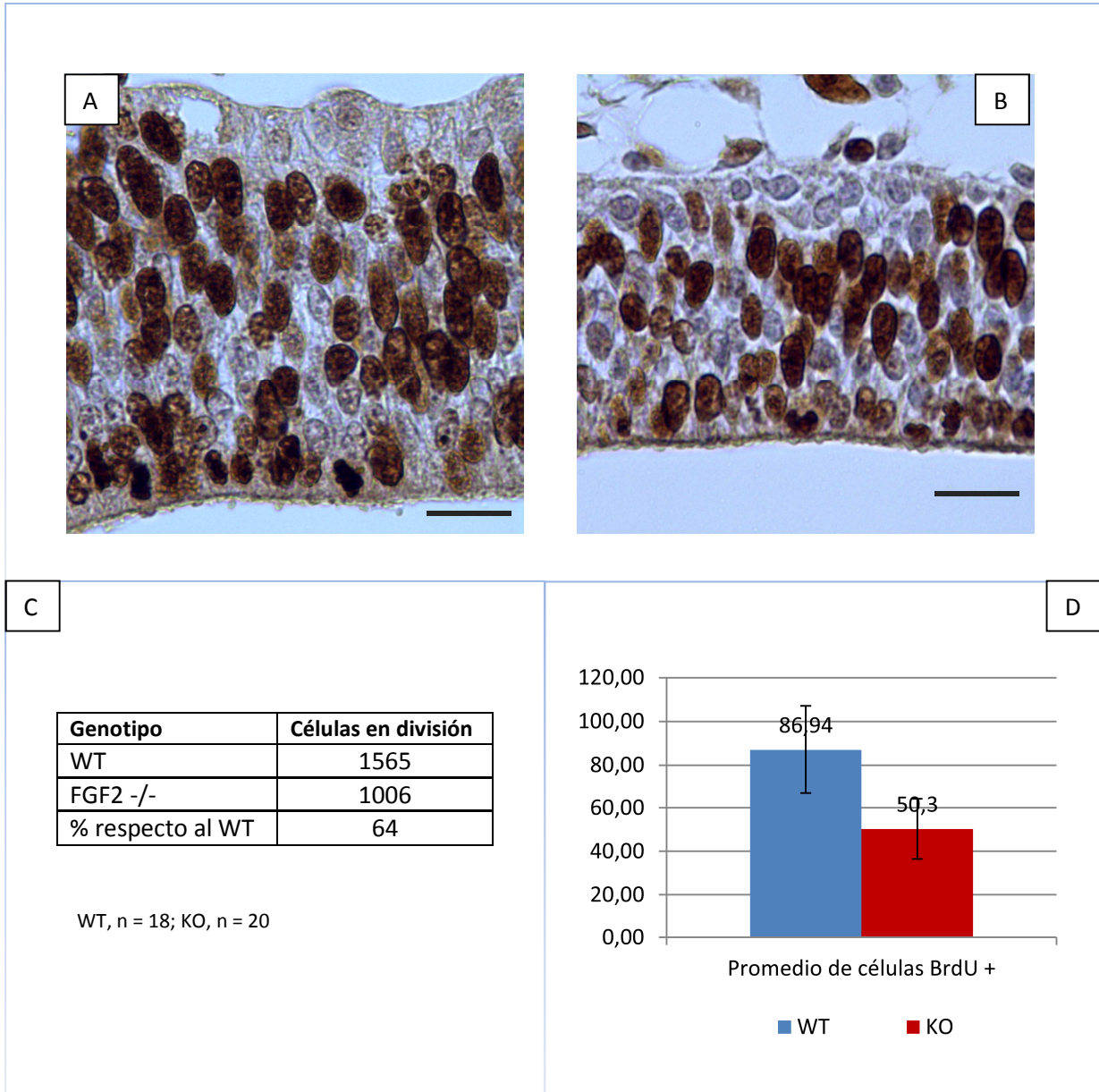


**Figura 12.** Comparación de los resultados de proliferación celular neuroepitelial obtenidos por inmunohistoquímica anti-BrdU, en cortes de mesencéfalo de embriones de ratón KO FGF2 y WT en estadio E10,5. Es evidente una mayor proliferación de las células neuroepiteliales de los embriones WT **(A)** con respecto a los embriones deficientes en FGF2 **(B)**. Nuevamente se hace evidente un menor grosor de la pared neuroepitelial en el embrión de ratón mutante. Barra de escala: 20  $\mu$ m. En la tabla **(C)** se indica el número total de células positivas contadas para cada condición y el porcentaje con respecto al WT. En el gráfico de barras **(D)** se representa el promedio de células marcadas para BrdU en cada condición ( $p < 0.001$ ).

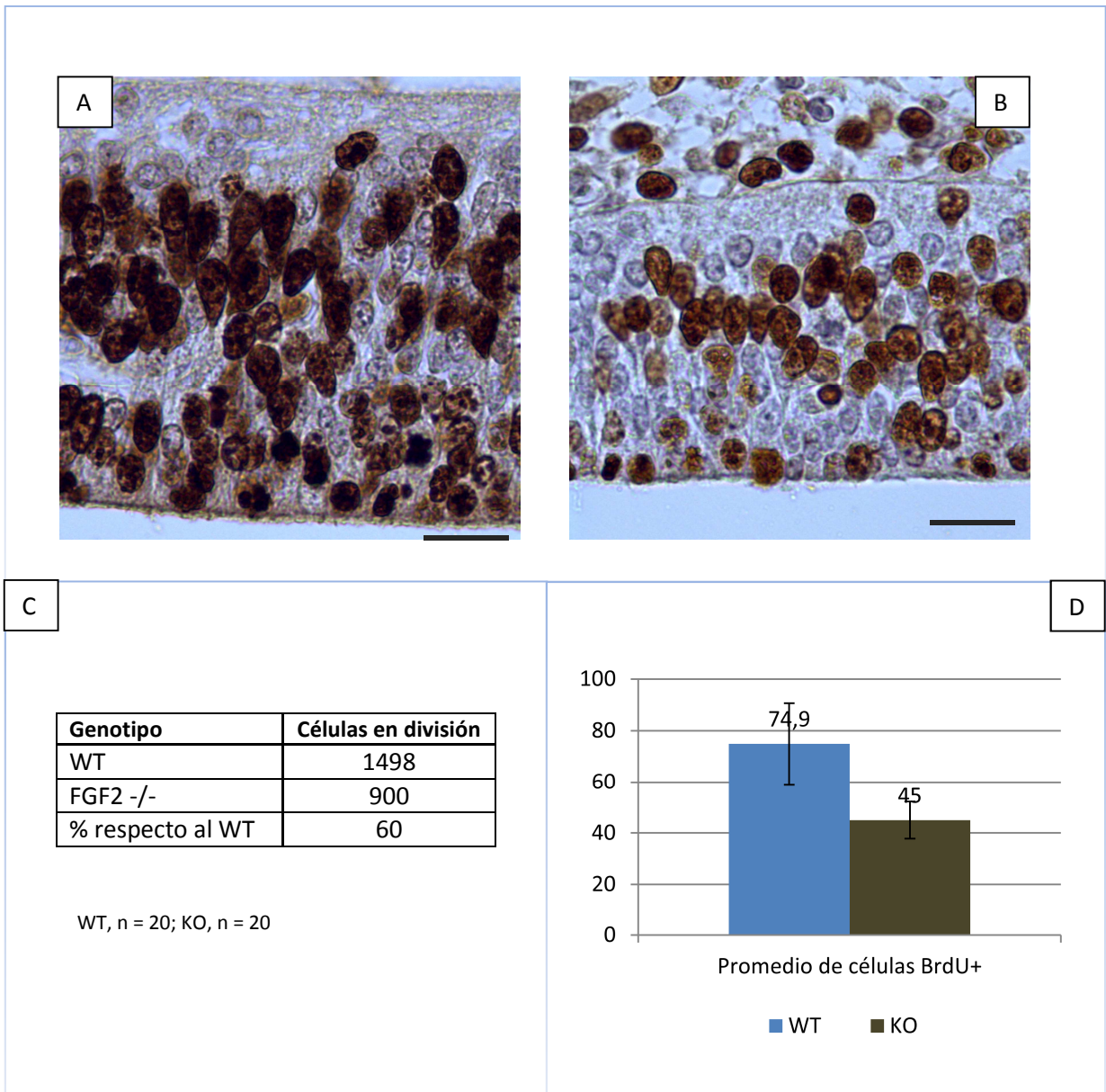


**Figura 13.** Evaluación de la proliferación celular del neuroepitelio del cerebro embrionario anterior, mediante técnicas inmunohistoquímicas anti-BrdU, en secciones histológicas frontales a nivel de las vesículas ópticas de embriones de ratón KO FGF2 y WT. Una menor cantidad de núcleos proliferativos (teñidos de marrón) es observada en el embrión mutante **(B)**, en relación con la cantidad de núcleos positivos observada en embriones WT **(A)**. También se observa un menor grosor del neuroepitelio en el grupo de estudio. Barra de escala: 20  $\mu$ m. La tabla **(C)** registra el número total de núcleos positivos contados en cada condición, mientras que en **(D)** se compara el promedio de células BrdU+ halladas en cada imagen, para cada grupo ( $p < 0.001$ ).





**Figura 14.** Inmunomarcaje de células neuroepiteliales en estado proliferativo en embriones de ratón (estadio E10,5) homocigotos para una mutación dirigida al gen FGF2 (**B**), frente a embriones WT de igual estadio (**A**). Las imágenes estudiadas corresponden a secciones frontales de neuroepitelio de cerebro embrionario posterior, a nivel de las vesículas ópticas. Barra de escala: 20  $\mu$ m. La tabla (**C**) registra el número total de células positivas para BrdU en cada grupo (KO y WT). En (**D**) presentamos una comparación del promedio de células BrdU positivas en cada una de las muestras para cada grupo (  $p < 0.001$ ).



**Figura 15.** Estudio de la proliferación neuroepitelial en embriones de ratón WT **(A)** y mutantes para FGF2 **(B)** en estado E10,5 utilizando inmunohistoquímica anti-BrdU. Se observa una menor cantidad de núcleos marcados (marrón) en los embriones KO, lo que indica una menor actividad proliferativa en esta condición. Barra de escala: 20  $\mu$ m. La tabla **(C)** indica la cantidad encontrada de células positivas en el total de cortes seleccionados para cada condición, así como el porcentaje con respecto al WT. La gráfica **(D)** representa una comparación del promedio de células proliferativas hallado en cada una de las muestras de cada grupo (control y experimental) ( $p < 0.001$ ).

Desde el principio de este trabajo, se pretendió extender los estudios de proliferación para incluir además a embriones de ratón en estadios E10 y E11.5. De esta manera, se logró terminar completamente con los experimentos para ratones KO FGF2 E10 y para embriones WT E11.5. Sin embargo, por dificultades técnicas, no se consiguió terminar a tiempo la evaluación de estos dos estadios pues están pendientes los experimentos del grupo control de KO FGF2 E10 y el grupo experimental WT E11,5.



## DISCUSIÓN

La proliferación celular es una fase crítica del desarrollo embrionario del sistema nervioso, pues permite establecer el número adecuado de células progenitoras de partida, que al salir del ciclo celular y comprometerse a diferentes destinos celulares, darán origen a la amplia variedad de tipos celulares gliales y neuronales propia del sistema nervioso central (for a review see Donovan and Dyer, 2005). De esta manera, una correcta proliferación es uno de los factores que permite asegurar que el número final de neuronas y células gliales que se origina de cada tipo, sea el adecuado.

Para el caso de la formación de la corteza cerebral, diversos estudios en roedores muestran cómo la amplificación de las células progenitoras localizadas dentro del epitelio ventricular pseudoestratificado (porción dorsal de las vesículas telencefálicas), es necesaria para alcanzar un adecuado número de neuronas corticales al nacimiento, así como un adecuado volumen cortical (Takahashi et al., 1994; Raballo et al., 2000). Una combinación de señales extrínsecas e intrínsecas regula la proliferación de las células precursoras neurales (for a review see Donovan and Dyer, 2005).

En efecto, el FGF2 es una señal extrínseca que promueve la proliferación de células progenitoras neurales, tanto *in vitro* (Murphy et al., 1990; for a review see Ford-Perriss, et al., 2001), como *in vivo* (Vacarino et al., 1999; Raballo et al., 2000).

Los estudios que examinan la relación entre FGF2 y proliferación durante el desarrollo del SNC de mamíferos, se han enfocado fundamentalmente en el desarrollo de la corteza cerebral (Takahashi et al., 1995; Dono et al., 1998; Raballo et al., 2000), con numerosos e interesantes hallazgos. Sin embargo, el FGF2 está presente a lo largo de todo el tubo neural en desarrollo y se ha detectado desde estadios anteriores al inicio de la corticogénesis.

Los resultados del presente trabajo muestran una disminución de la actividad proliferativa neuroepitelial de embriones de ratón KO FGF2, en las cinco zonas analizadas del SNC en desarrollo: telencéfalo, mesencéfalo, cerebro anterior y posterior (a nivel de las vesículas ópticas), y en el cerebro posterior (a nivel de vesículas ópticas). La comparación se efectuó con ratones WT del mismo estadio (E10.5), y la diferencia resultó ser altamente significativa en todos los casos.

La disminución observada en la proliferación neuroepitelial del cerebro embrionario en el grupo deficiente en FGF2 con respecto al control, fue muy similar en las diferentes zonas estudiadas. De esta manera, para todas las zonas estudiadas, la proliferación en los mutantes siempre fue de aproximadamente el 62% de la alcanzada

por el WT. Esto significa que se cuenta con un 38% menos de precursores en un momento crucial, pues es la fase del desarrollo preliminar al inicio de la neurogénesis.

Para el estadio E10.5 en ratones, Raballo et al. (2000) muestran en sus resultados una disminución en la proliferación de aproximadamente el 50% en la región dorsal del neuroepitelio telencefálico de embriones KO FGF2 en comparación con embriones WT. Además, encontraron que no sólo éste número inicial de células es más pequeño, sino que también la amplificación del número de células neuroepiteliales durante la primera fase de la neurogénesis es más reducida en comparación con el WT. Otro hecho analizado por estos autores fue que el número de neuronas corticales cuantificadas al nacimiento en ratones mutantes de FGF2 es un 46% menor con respecto a la camada control. Otros investigadores también han observado una reducción de neuronas corticales en ratones KO FGF2 (Ortega et al. 1998).

Asímismo, Raballo et al. (2000) detectaron una disminución importante en el volumen de la región dorsal del neuroepitelio, en secciones parasagitales de embriones de ratón KO FGF2 en estadios E10.5, E11.5 y E12.5, al compararlos con embriones WT. Igualmente, se ha visto asociado a este genotipo una disminución en el grosor de la corteza cerebral de más del 10%, en ratones recién nacidos, comparado con los WT (Dono et al. 1998; Ortega et al., 1998).

Aunque evaluar la variación del volumen del neuroepitelio en embriones deficientes en FGF2 no fue planteado como uno de los objetivos de este trabajo, se pudo observar en las diferentes regiones estudiadas, un repetido “adelgazamiento” de la pared neuroepitelial, con relación al volumen de la misma mostrado por los embriones WT (ver resultados, Figuras 11 – 15 (A-B)). Este hallazgo, es compatible con los resultados presentados previamente, y contribuye a confirmar que el FGF2 es necesario para una adecuada morfogénesis del cerebro embrionario.

En el desarrollo embrionario del SNC, el FGF2 ha sido implicado no solo en proliferación, sino que también se ha relacionado con actividades de diferenciación y supervivencia celular (Walicke, 1988; For a review see Murphy et al., 1990; Hébert et al., 2009).

Este trabajo en realidad podría ser visto como una parte preliminar de un estudio más amplio y que incluya además estadios anteriores y posteriores al analizado aquí. Sería interesante dilucidar el papel del FGF2 en el comportamiento de las células neuroepiteliales de las distintas regiones del cerebro embrionario. En conjunto, los procesos que sería necesario tener en cuenta para incluir en esta valoración son: proliferación, muerte celular, migración, neurogénesis (diferenciación neuronal) y gliogénesis (diferenciación glial).

### *Consideraciones finales acerca del fenotipo FGF2 (-/-)*

El FGF2 está presente en la mayoría de los tejidos embrionarios y adultos de los mamíferos. En el neuroepitelio de ratón, por ejemplo, se detecta desde el estadio E9.5, antes que cualquier otro FGF (Nurcombe et al., 1993). Entre las anomalías descritas asociadas a los ratones KO para FGF2 se incluyen defectos en la citoarquitectura de la corteza cerebral y reducción en el número de neuronas corticales (ya comentados atrás), una prolongación en el tiempo de curación de las heridas en piel, y una dificultad en la regulación de la presión arterial (Ortega et al., 1998; Dono et al., 1998). Sin embargo, los ratones KO FGF2 son viables, sobreviven hasta la adultez, son fértiles e indistinguibles del WT a la inspección macroscópica (Ortega et al., 1998).

La ausencia de un fenotipo muy adverso asociado a la deficiencia de FGF2 resulta sorprendente, teniendo en cuenta su extensa localización y la gran cantidad de actividades que se les ha atribuido.

Se ha propuesto que la razón para que el FGF2 no resulte esencial para el desarrollo embrionario y su ausencia ocasione únicamente efectos relativamente modestos en la fisiología del ratón en condiciones normales, es que su función puede ser compensada por otros miembros de la familia FGF o por otro tipo de moléculas (Ortega et al., 1998).

El FGF1 es el único FGF que se une con una alta afinidad a todas las isoformas conocidas del FGFR; además es el FGF que presenta una mayor semejanza con el FGF2 en cuanto a estructura, patrón de expresión y localización celular y subcelular. Es por esto que Miller et al. (2000) indagaron la posible compensación por parte del FGF1, mediante la evaluación de ratones doble KO FGF1 – FGF2, pero los defectos observados fueron muy similares a aquellos encontrados en el ratón KO FGF2. Esto sugiere que la compensación por FGF1 no explica la limitación de los defectos fenotípicos asociados con la delección de FGF2, y que podría ser que otros FGFs estén compensando la ausencia de ambos factores en el ratón doble KO FGF1-FGF2. De este modo, ocurriría un alto grado de redundancia entre varios miembros de la familia FGF o entre diversas vías de señalización de factores de crecimiento (Miller et al., 2000).

Como explicación alternativa se plantea que tanto FGF1 como FGF2, a pesar de su extensa localización ejercen funciones limitadas durante el desarrollo y los procesos fisiológicos del adulto normal, de tal manera que estudiando al ratón en el estado patológico apropiado se harían evidentes las diferencias entre el WT y el doble KO. (Miller et al., 2000).

## CONCLUSIONES

- Los ratones KO para el FGF2 experimentan durante el estadio estudiado (E10.5), una significativa disminución del número de células proliferativas neuroepiteliales en las principales vesículas del cerebro embrionario, en comparación con embriones WT.
- La magnitud de la disminución de la actividad proliferativa neuroepitelial fue muy similar en las cinco zonas estudiadas.
- Este trabajo contribuye a soportar la idea de que el FGF2 es necesario en los mamíferos, como mitógeno, durante la fase proliferativa previa al inicio de la neurogénesis.
- La deficiencia de FGF2 durante el desarrollo embrionario del ratón, en el estadio estudiado, podría estar asociada con la disminución del volumen del epitelio ventricular pseudoestratificado.

## REFERENCIAS

Benavides, F.J., Guénet, J.L., 2003. Manual de genética de roedores de laboratorio - Principios básicos y aplicaciones. Universidad de Alcalá – SECAL.

Berridge, M. J., 2009. Cell Signalling Biology. Portland Press Limited, Module 1.

Crossley, P. H., Martinez, S., and Martin, G. R., 1996. Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380, 66–68.

Delaunay D., Nave, K.A., Heydon, K., Zalc, B., Cumano, A., Spassky, N., Schwab, M.H., Thomas, J.L., Suter, U., 2008. Early Neuronal and Glial Fate Restriction of Embryonic Neural Stem Cells. *The Journal of Neuroscience* 28, 2551–2562

Dono, R., Texido, G., Dussel, R., Ehmke, H., and Zeller, R., 1998. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J.* 17, 4213–4225.

Donovan, S. L., and Dyer M. A., 2005. Regulation of proliferation during central nervous system development. *Sem. in Cell & Dev. Biol.* 16, 407–421.

Edlund, T., and Jessell T., 1999. Progression from Extrinsic to Intrinsic Signaling in Cell Fate Specification: A View from the Nervous System. *Cell* 96, 211–224.

Ford-Perriss, M., Abud H. and Murphy, M., 2001. Fibroblast growth factors in the developing central nervous system. *Clin. and Exper. Pharmacol. and Physiol.* 28, 493–503.

Gato A., Desmond M., 2009. Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histiogenesis. *Dev. Biol.* 327, 263–272.

Hébert, J.M. 2011. FGFs: neurodevelopment's Jack-of-all-trades – how do they do it?. *Frontiers in Neuroscience* 5, 133.

Ille, F., and Sommer, L., 2005. Wnt signaling: multiple functions in neural development. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1100–1108.

Itoh, N., and Ornitz D.M., 2011. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J. Biochem.* 149, 121–130.

Johnson, D. E., and Williams, L. T., 1993. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* 60, 1–41.

Kessarlis, N., Pringle, N., and Richardson, W.D., 2008. Specification of CNS glia from neural stem cells in the embryonic neuroepithelium. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 71–85.

Kilpatrick, T.J., Richards, L.J., Bartlett, P.F., 1995. The regulation of neural precursor cells within the mammalian brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 6, 2–15.

Kuro-o, M., 2008. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends in Endocr. and Metabol.* 19, 245-239.

Martín, C., Alonso, M.I., Santiago, C., Moro, J.A., De la Mano, A., Carretero, R., Gato, A., 2009. Early embryonic brain development in rats requires the trophic influence of cerebrospinal fluid. *Int. J. Devl Neuroscience* 27, 733–740

Martinez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubenstein, J.L., Martin, G.R., 1999. FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development* 126, 1189-1200

Martinez, S., 2001. The isthmic organizer and brain regionalization. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 367-371

Murphy, M., Drago, J., Bartlett, P.F., 1990. Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. *J. Neurosci. Res.* 25, 463-75.

Nurcombe, V., Ford, M.D., Wildschut, J.A., Bartlett, P.F., 1993. Developmental regulation of neural response to FGF-1 and FGF-2 by heparan sulfate proteoglycan. *Science* 260, 103-106.

Ortega, S., Ittmann, M., Tsang, S.H., Ehrlich, M., and Basilico, C., 1998. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5672–5677.

Paek, H., Gutin, G., and Hébert, J.M., 2009. FGF signaling is strictly required to maintain early telencephalic precursor cell survival. *Development* 136, 2457-2465

Panchision, D. M. and McKay, R. DG., 2002. The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr. Opinion in Gen. and Devl* 12, 478–487.

Raballo, R., Rhee, J., Lyn-Cook, R., Leckman J.F., Schwartz M.L., and Vaccarino F.M., 2000. Basic Fibroblast Growth Factor (Fgf2) Is Necessary for Cell Proliferation and Neurogenesis in the Developing Cerebral Cortex. *J Neurosci.* 20, 5012–5023

Rodriguez-Gallardo, L., Climent, V., Garcia-Martinez, V., Schoenwolf, G.C., and Alvarez, I. S., 1997. Targeted over-expression of FGF in chick embryos induces formation of ectopic neural cells. *Int. J. Dev. Biol.* 41, 715–723.

Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness Jr, V.S., 1994. Mode of cell proliferation in the developing mouse neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 375-379.

Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness Jr, V.S., 1995. The Cell Cycle of the Pseudostratified Ventricular Epithelium of the Embryonic Murine Cerebral Wall. *J Neurosci.* 15, 6046-6057.

Temple, S. and Qian, X. bFGF, Neurotrophins, and the Control of Cortical Neurogenesis, 1995. *Neuron* 15, 249-252.

The Jackson Laboratory. 2012 The Jackson Laboratory Website. JAX Mice Database. <<http://jaxmice.jax.org/strain/003256.html>> [consulta: Junio 2012]

Vaccarino, F.M., Schwartz, M.L., Raballo, R., Nilsen, J., Rhee, J., Zhou, M., Doetschman, T., Coffin, J.D., Wyland, J.J., Hung, E., 1999. Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nature* 2, 246-253.

Walicke P.A., 1988. Basic and Acidic Fibroblast Growth Factors Have Trophic Effects on Neurons from Multiple CNS Regions. *J. Neurosci.*, 8, 2618-2627.