



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y RADIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL:

**EL FGF2 COMO REGULADOR DE LA ACTIVIDAD
MITOGÉNICA DE PRECURSORES NEURALES EN EL
NICHOS CELULAR DEL CEREBRO EMBRIONARIO DE
RATÓN.**

Presentada por José Francisco Lamus Molina
para optar al grado de doctor por la
Universidad de Valladolid.

Dirigida por:

Prof. Dr. D. Ángel Gato Casado



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la Uva)

D./D^a ÁNGEL GATO CASADO, con D.N.I. nº 9256858-W
Profesor/a del departamento de ANATOMÍA Y
RADIOLOGÍA.....

Centro FACULTAD DE DE
MEDICINA.....

Dirección a efecto de notificaciones en AV. RAMÓN Y CAJAL, 7, FACULTAD DE MEDICINA,
DPTO DE ANATOMÍA Y RADIOLOGÍA.....

.....e-mail
gato@med.uva.es.....

como Director de la Tesis Doctoral titulada EL FGF2 COMO REGULADOR DE LA ACTIVIDAD
MITOGÉNICA DE PRECURSORES NEURALES EN EL NICHOS CELULAR DEL CEREBRO
EMBRIONARIO DE RATÓN.....

presentada por D./D^a JOSÉ FRANCISCO LAMUS
MOLINA.....

alumno/a del programa de DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA.....

autoriza la presentación de la misma, considerando que el trabajo de investigación
presentado por el doctorando reúne los requisitos de originalidad y rigor científico, y que
el doctorando ha mostrado en todo momento, durante el desarrollo de su trabajo de tesis
un desempeño plenamente satisfactorio.

Valladolid, 01 de Julio de 2016



El Director de la Tesis,

Fdo.: Angel Gato Casado.

AGRADECIMIENTOS

A continuación quiero manifestar mis sinceros agradecimientos a aquellas personas que incidieron, de diversas formas, en que finalmente esta tesis doctoral esté llegando a buen término.

Agradezco al director de esta tesis, el Profesor Ángel Gato, por haber confiado desde el principio en mi capacidad para desarrollar este trabajo y haberme abierto las puertas de su grupo de investigación. Su apoyo total y constante mantuvo siempre viable la realización de mi doctorado, a pesar de las diversas dificultades que se presentaron. Su entusiasmo por la ciencia, su consejo y su habitual actitud optimista fueron para mí fuente de motivación en el día a día de mi trabajo de investigación.

A la Profesora María Isabel Alonso por su excelente disposición para atender mis numerosas consultas, siempre con una actitud amable, y porque además, junto con Ángel, me hicieron sentir acogido incluso más allá del ámbito del laboratorio, constituyendo un verdadero apoyo en mi vida diaria.

A los profesores José Antonio Moro y Aníbal de la Mano, pues han participado activamente en mi formación investigadora, me han enseñado lo que es ser un buen profesor y me han hecho sentir como un miembro más del grupo de investigación.

Agradezco de forma especial a la Profesora Estela Carnicero por su excelente tutela durante el desarrollo de mi trabajo de fin de máster, el cual constituyó mi motivación inicial y punto de partida para la realización de la presente tesis doctoral.

A Sagrario Callejo por las numerosas sesiones de asistencia técnica en microscopía confocal, que han resultado fundamentales para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradezco además a Isabel García e Isabel Barrios, por su importante apoyo técnico con el micrómetro y el respaldo logístico en diversos aspectos del trabajo diario, cuando lo he requerido. A Marcos y Feliso les agradezco su actitud siempre dispuesta a colaborar, su buen humor y especialmente lo referente al cuidado de los animales de experimentación.

Agradezco a Raquel Carretero por compartir amablemente su conocimiento conmigo, introduciéndome en las diferentes técnicas de laboratorio y contribuyendo a mi adaptación al laboratorio cuando era apenas un recién llegado. Gracias a Miguel por ser un buen compañero de doctorado, por su buen humor y estar siempre dispuesto a ayudar.

A mi familia por su paciencia y apoyo absolutos, y por creer en la importancia de hacer lo que realmente se quiere en la vida.

A todas las personas que en algún momento durante estos 5 años han hecho más agradable mi estancia en España.

RESUMEN

A lo largo de la vida del individuo, las células precursoras neurales se encuentran alojadas en microentornos especializados conocidos como nichos germinales neurogénicos, que garantizan su mantenimiento y posibilitan la generación de nuevas neuronas, experimentando su momento de máxima actividad neurogénica durante el desarrollo. El fluido cerebroespinal embrionario (eCSF) ha sido identificado como uno de los elementos esenciales del nicho neurogénico del cerebro embrionario, contactando de manera directa con todas las células precursoras neuroepiteliales y demostrando, en virtud de mecanismos físicos y bioquímicos, una participación clave en la regulación de su comportamiento celular básico (supervivencia, replicación, diferenciación). En particular, el conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos regulatorios de la proliferación de las NPCs en los nichos neurogénicos de los mamíferos, resulta indispensable para abordar el diseño de estrategias de neuroregeneración. El FGF2 es una de las moléculas que ha sido directamente relacionada con la expansión de la 'reserva' de NPCs en el cerebro embrionario y adulto, y ha sido identificada como uno de los componentes del eCSF en vertebrados. La presente tesis doctoral pretende estudiar la actividad del FGF2 presente en el eCSF, como regulador de la expansión/proliferación de las células precursoras neurales en el nicho germinal del cerebro embrionario de ratón.

PALABRAS CLAVE

Proliferación.

Células precursoras neurales.

Nicho neurogénico.

Mitógeno.

Fluido cerebroespinal embrionario.

Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ABREVIATURAS	III
INTRODUCCIÓN	1
1. CONCEPTO DE CÉLULA PRECURSORA NEURAL. HETEROGENEIDAD DE PRECURSORES PERTENECIENTES A UNA MISMA ESTIRPE CELULAR.	2
2. NICHOS NEUROGÉNICOS DEL ADULTO.	3
2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL NICHOS GERMINAL DEL CEREBRO ADULTO.	4
2.2 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL NICHOS NEUROGÉNICOS POR SEÑALES EXTRÍNSECAS. COMPLEJIDAD DEL MICROENTORNO.	5
3. CONCEPTO DEL NICHOS NEUROGÉNICOS EMBRIONARIO.....	8
3.1 CARACTERÍSTICAS DEL NICHOS GERMINAL DEL CEREBRO EMBRIONARIO - IMPORTANCIA DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL NICHOS EMBRIONARIO.....	9
4. CONSTITUCIÓN HISTOLÓGICA DEL CEREBRO EMBRIONARIO.	10
5. RESPUESTA DIFERENCIAL DE LAS NPCs EMBRIONARIAS A FACTORES DE CRECIMIENTO MITOGÉNICOS. ..	12
6. REGULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LAS NPCs POR EL ECSF.	13
6.1 PRESIÓN POSITIVA DEL ECSF Y CRECIMIENTO CEREBRAL.	14
6.2 INFLUENCIA DE LAS MOLÉCULAS SEÑAL PRESENTES EN EL ECSF SOBRE LOS PRECURSORES NEUROEPITELIALES.	15
6.2.1 Composición del eCSF.	16
6.2.2 Moléculas biológicamente activas que actúan a través del eCSF.	18
6.3 EL ECSF COMO MATRIZ EXTRACELULAR.....	19
6.4 CONSIDERACIONES ACERCA DEL ORIGEN DEL ECSF.....	20
7. FACTORES DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGFs).....	22
7.1 FGFRs Y SEÑALIZACIÓN POR FGFs.	23
7.1.1 Regulación de la respuesta celular a la activación de FGFR.....	25
7.1.2 Función señalizadora de FGFs y FGFRs en el núcleo.....	25
7.2 FUNCIONES DE LA FAMILIA FGF.	25
7.3 FGFs COMO REGULADORES DEL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	26
7.4 LOS FGFs COMO REGULADORES DEL DESARROLLO DEL NEOCORTEX.	27
7.5 IMPORTANCIA DEL FGF2 PARA EXPANDIR LA RESERVA DE PRECURSORES NEURALES DURANTE LA NEUROGÉNESIS.....	28

7.6 EXPRESIÓN DE FGF2 Y FGFR1 DURANTE EL DESARROLLO DEL CEREBRO.....	29
7.7 DIVERSIDAD FUNCIONAL DE LAS ISOFORMAS DEL FGF2.....	30
7.8 MECANISMO DE SECRECIÓN DEL FGF2.	32
7.9 HEPARÁN SULFATO PROTEOGLICANOS Y SU REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS FGFs.	33
7.10 FGF2 Y REGULACIÓN DE LAS NPCs DEL CEREBRO ADULTO.....	35
7.11 CONSIDERACIONES ACERCA DEL FENOTIPO FGF2 -/-.....	37
8. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS.....	39
8.1 HIPÓTESIS.....	39
8.2 OBJETIVO GENERAL.....	39
8.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.	43
1.1 RATONES FGF2 KNOCKOUT Y WILD-TYPE.	43
1.2 MANTENIMIENTO DE RATONES, CRUCES Y VERIFICACIÓN DE LA GRAVIDEZ.	43
1.3 GENOTIPAJE DE RATONES TRANSGÉNICOS.	44
1.3.1 Aislamiento de DNA a partir de cola de ratón.....	44
1.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	45
1.3.3 Electroforesis de DNA en gel de agarosa.	45
1.4 INYECCIÓN INTRAPERITONEAL DE BROMODEOXIURIDINA.....	46
2. EXTRACCIÓN DE LOS EMBRIONES.	47
3. EXTRACCIÓN DE FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO (ECSEF).	48
4. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LOS EMBRIONES.	49
4.1 PROTOCOLO DE FIJACIÓN, DESHIDRATACIÓN E INCLUSIÓN EN BLOQUES DE PARAFINA.....	49
4.1.1 Fijación de los embriones.	49
4.1.2 Deshidratación de los embriones.	49
4.1.3 Transparentación de los embriones.	49
4.1.4 Impregnación con parafina.	49
4.1.5 Inclusión definitiva de la pieza.	49
4.2 OBTENCIÓN DE SECCIONES HISTOLÓGICAS Y SELECCIÓN DE MUESTRAS.....	50
4.2.1 Elaboración de cortes histológicos.	50
4.2.2 Selección de muestras.	50
5. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y WESTERN-BLOT.	50
5.1 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.....	50
5.2 WESTERN-BLOT.....	51

5.3 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL ECSF + WB.	52
6. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.	52
6.1 PROTOCOLO GENERAL DE DESPARAFINACIÓN Y REHIDRATACIÓN.	53
6.2 DESENMASCARAMIENTO ANTIGÉNICO.	53
6.3 INMUNOHISTOQUÍMICA INDIRECTA (FLUORESCENCIA).	54
6.4 INMUNOHISTOQUÍMICA INDIRECTA (PEROXIDASA/DAB).	55
7. EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE CEREBROS ADULTOS DE RATÓN.	55
8. NIVELES DE ESTUDIO.	56
9. ADQUISICIÓN DE LAS IMÁGENES Y CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS.	58
9.1. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CON BRDU.	58
9.1.1 <i>Estudio de proliferación en embriones FGF2 KO y WT.</i>	58
9.1.2 <i>Estudio de proliferación en explantes de neuroepitelio cultivado in vitro.</i>	59
9.1.3 <i>Estudio de proliferación en la V-SVZ de cerebro adulto FGF2 KO y WT.</i>	59
9.2 ESTUDIOS DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL.	59
10. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEUROEPITELIO DE RATÓN.	59
RESULTADOS	61
1. IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE FGF2 EN EL ECSF.	63
1.1 VALORACIÓN DE LA RELACIÓN DEL FGF2 CON PROTEOGLICANOS SULFATADOS DEL ECSF.	65
2. PATRÓN DE EXPRESIÓN TEMPORO-ESPACIAL DEL FGF2 EN CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN.	67
2.1 PATRONES GENERALES DE EXPRESIÓN DEL FGF2 EN CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN.	67
2.2 PATRÓN TEMPORAL DE EXPRESIÓN DEL FGF2 EN CEREBRO EMBRIONARIO.	71
2.2.1 <i>Expresión de FGF2 en cerebro de ratón E9.5.</i>	71
2.2.2 <i>Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E10.5.</i>	72
2.2.3 <i>Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E11.5.</i>	77
2.2.4 <i>Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E12.5.</i>	78
2.2.5 <i>Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E13.5.</i>	79
2.2.6 <i>Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E14.5.</i>	80
2.2.7 <i>Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E15.5 y E16.5.</i>	82
2.3 CONFIRMACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA AUSENCIA DE FGF2 EN CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN FGF2 KNOCK-OUT.	84
2.4 RESUMEN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL FGF2 POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN.	85
3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL FGFR1 EN EL CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN.	86
4. BLOQUEO IN VITRO DE LA ACTIVIDAD DEL FGF2 DEL ECSF.	88
4.1 ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN EXPLANTES DE NEUROEPITELIO.	88

ÍNDICE DE CONTENIDOS

4.2 ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN EXPLANTES DE NEUROEPITELIO.....	88
5.1 ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN DEL NEUROEPITELIO TELENCEFÁLICO DE RATÓN (E9.5 Y E10.5).....	91
5.2 ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN DEL NEUROEPITELIO MESENCEFÁLICO DE RATÓN (E10.5).....	92
5.3 ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN DEL NEUROEPITELIO ROMBENCEFÁLICO (E9.5 Y E10.5).....	92
6. ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN (WT VS KO).....	98
7. MAYOR INCIDENCIA DE MALFORMACIONES DEL CEREBRO EMBRIONARIO EN RATONES FGF2 KO.	102
8. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN EN V-SVZ DE CEREBRO ADULTO (WT VS KO).....	104
9. EXPRESIÓN DE FGF2 EN V-SVZ DE CEREBRO ADULTO DE RATÓN.	106
DISCUSIÓN.....	107
1. FGF2 COMO COMPONENTE DEL ECSF.	109
2. FGF2 COMO PRODUCTO DE SECRECIÓN APICAL DEL NEUROEPITELIO DE RATÓN.....	111
3. FGF2 COMO REGULADOR DE LA EXPANSIÓN DE LA POBLACIÓN DE PRECURSORES NEURALES.....	114
4. REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN EN EL NICHU NEUROGÉNICO DEL ADULTO POR EL FGF2.	117
CONCLUSIONES	121
REFERENCIAS.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Neurulación primaria	2
Figura 2	Naturaleza glial de las NPCs del desarrollo y del adulto.	3
Figura 3	Nicho neurogénico de la V-SVZ.	5
Figura 4	Nicho neurogénico embrionario.	8
Figura 5	Migración nuclear intercinética.	10
Figura 6	Expansión y regionalización del cerebro embrionario.	11
Figura 7	Histogénesis de la corteza cerebral.	12
Figura 8	Interdependencia entre la cavidad ventricular y la pared neuroepitelial en la regulación de los procesos básicos de crecimiento del esbozo cerebral.	13
Figura 9	Análisis 2-DE de proteínas de eCSF de pollo estadio HH24.	17
Figura 10	Análisis 2-DE para proteínas de eCSF de rata estadio E12.7.	17
Figura 11	Clasificación de la Familia FGF.	23
Figura 12	Arquitectura del receptor tirosina quinasa FGFR.	23
Figura 13	Señalización por FGFs.	24
Figura 14	Isoformas humanas del FGF2.	31
Figura 15	Estructura tridimensional del FGF2.	31
Figura 16	Sistema de secreción no convencional del FGF2.	33
Figura 17	Electroforesis en gel de agarosa (2%) de productos de reacción de PCR.	46
Figura 18	Inyección intraperitoneal de BrdU.	46
Figura 19	Extracción de embriones de ratón.	47
Figura 20	Extracción de eCSF de ratón.	48
Figura 21	Montaje para el desenmascaramiento antigénico mediado por calor.	54
Figura 22	Sección sagital de cerebro embrionario de ratón en estadio E14.5.	56
Figura 23	Niveles de estudio elegidos para los estudios por inmunohistoquímica.	57
Figura 24	Zonas evaluadas para el recuento de núcleos BrdU positivos en los estudios de proliferación de cerebro embrionario.	58
Figura 25	Cultivo organotípico de neuroepitelio mesencefálico de ratón.	60
FIGURA 26	Análisis de western-blot que demuestra la presencia de FGF2 en el eCSF de ratón a los 11,5 d de desarrollo.	64
FIGURA 27	El tratamiento enzimático exhaustivo con heparin y condroitin liasas no modifica el patrón de marcaje del Western-Blot a-FGF2 en el eCSF.	66
FIGURA 28	Diversidad de patrones de expresión para el FGF2 durante el desarrollo embrionario del cerebro de ratón.	69
FIGURA 29	Patrón de expresión de FGF2 en secciones histológicas transversales de cerebro E9.5.	71
FIGURA 30	Patrón de expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E10.5.	73
FIGURA 31	Expresión de FGF2 en cortes histológicos de cerebro embrionario E10.5, realizados a nivel de las vesículas ópticas.	75
FIGURA 32	Marcaje anti-FGF2 en células neuroepiteliales en división celular.	76
FIGURA 33	Expresión de FGF2 en secciones histológicas de cerebro embrionario E11.5.	77
FIGURA 34	Patrón de expresión del FGF2 en secciones histológicas de cerebro embrionario E12.5.	78
FIGURA 35	Expresión de FGF2 en secciones histológicas de cerebro embrionario E13.5.	80
FIGURA 36	Patrón de expresión de FGF2 en secciones histológicas de cerebro embrionario de ratón E14.5.	81

FIGURA 37 Patrón de expresión de FGF2 en cerebro embrionario E15.5 y E16.5.	83
FIGURA 38 Inmunohistoquímica a-FGF2 en secciones histológicas transversales de cerebro embrionario de ratón FGF2 KO en estadio E11.	84
FIGURA 39 Inmunohistoquímica anti-FGFR1 en secciones histológicas transversales de cerebro embrionario de ratón (E9.5 – E10.5).	87
Figura 40 Inmunohistoquímica a-BrdU en explantes de neuroepitelio cultivados durante 24 horas en 3 condiciones diferentes.	89
Figura 41 Estudio de la actividad neurogénica en cultivos organotípicos de neuroepitelio mediante inmunohistoquímica a- β -III-tubulina.	90
Figura 42 Evaluación de la proliferación celular neuroepitelial por inmunohistoquímica a-BrdU en secciones histológicas transversales de telencéfalo embrionario de ratón WT y FGF2 KO en estadio E9.5.	93
Figura 43 Análisis de la proliferación celular neuroepitelial por inmunohistoquímica a-BrdU, en cortes transversales de telencéfalo de embriones de ratón FGF2 KO y WT en estadio E10.5.	94
Figura 44 Comparación de los datos de proliferación celular neuroepitelial obtenidos por inmunohistoquímica anti-BrdU, en cortes de mesencéfalo de embriones de ratón FGF2 KO y WT en estadio E10.5.	95
Figura 45 Estudio de proliferación mediante inmunohistoquímica anti-BrdU en secciones de neuroepitelio rombencefálico de embriones de ratón WT y FGF2 KO en estadio E9.5.	96
Figura 46 Estudio de proliferación mediante inmunomarcaje a-BrdU en la pared neuroepitelial del cerebro embrionario posterior de ratón FGF2 KO y WT en estadio E10.5.	97
Figura 47 Estudio de diferenciación neuronal en secciones transversales de neuroepitelio mesencefálico de embriones FGF2 KO y WT en estadio E10.5.	99
Figura 48 Estudio de diferenciación neuronal por inmunohistoquímica anti-beta-III-tubulina en secciones transversales de cerebro embrionario posterior estadio E10.5.	100
Figura 49 Expresión de beta-III-tubulina en cerebro anterior de embriones FGF2 KO y WT de 10.5 días.	101
Figura 50 Defectos del desarrollo del cerebro embrionario hallados en embriones mutantes para FGF2.	103
FIGURA 51 Análisis de proliferación celular por inmunohistoquímica a-BrdU en secciones transversales de la V-SVZ de los ventrículos laterales.	105
FIGURA 52 Inmunohistoquímica anti-FGF2 de la V-SVZ de los ventrículos laterales, en secciones coronales de cerebro adulto de ratón.	106

ABREVIATURAS

BMPs	Proteínas morfogénicas óseas
BrdU	Bromodeoxiuridina
CSF	Fluido cerebroespinal
DAB	Diaminobencidina
dH ₂ O	Agua destilada
ECM	Matriz extracelular
eCSF	Fluido cerebroespinal embrionario
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
eNPCs	Células precursoras neurales embrionarias
FAKs	Quinasas de adhesión focal
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2
FGFR1	Receptor 1 de factores de crecimiento de fibroblastos
FGFRs	Receptores de factores de crecimiento de fibroblastos
FGFs	Factores de crecimiento de fibroblastos
Fig.	Figura
H&E	Hematoxilina – eosina
hMSCs	Células precursoras mesenquimales humanas
HS	Heparán sulfato
HSPG	Heparán sulfato proteoglicano
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGF-2	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
IGFs	Factores de crecimiento insulínicos
IHQ	Inmunohistoquímica
IPCs	Células progenitoras intermedias
KO	knock-out
LDL	Lipoproteína de baja densidad
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NPCs	Células precursoras neurales
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RBP	Proteína transportadora de retinol
SD	Desviación estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico
SGZ	Zona subgranular
SHH	Sonic hedgehog
SNC	Sistema nervioso central
TBS	Tris-buffered saline
V-SVZ	Zona ventricular – subventricular
WB	Western-blot
Wnt	Wingless
WT	Wild-type

INTRODUCCIÓN

El cerebro, el más complejo y sofisticado órgano de los mamíferos, surge a partir de una población específica y reducida de células neuroepiteliales, cuya transformación durante el desarrollo implica un amplio recorrido que se prolonga hasta la etapa postnatal, para finalmente generar la enorme cantidad de células complejamente estructuradas que constituyen el sistema nervioso central maduro (SNC).

Los cambios morfológicos que dan origen al cerebro embrionario comienzan con la *inducción de la placa neural* en una zona concreta del ectodermo, en la superficie dorsal del embrión, y la consiguiente *neurulación*, un proceso mediante el cual la placa neural se invagina y progresivamente fusiona sus bordes para formar así una estructura cilíndrica denominada tubo neural, inmersa en el mesénquima embrionario (**Fig. 1**).

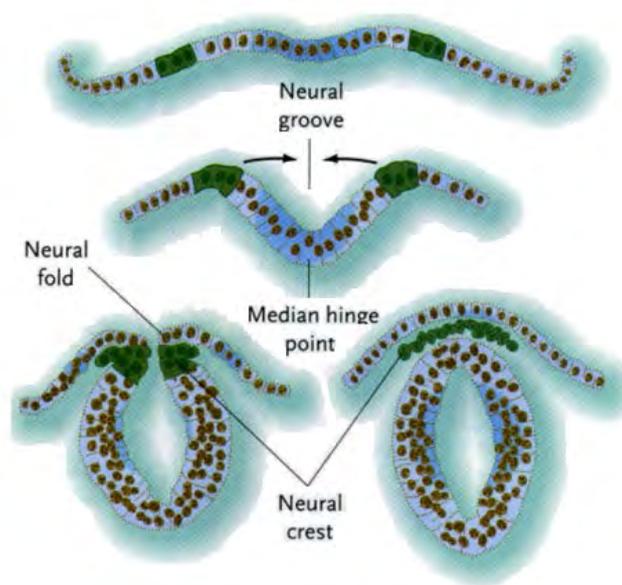


Figura 1 | Neurulación primaria. Se ilustra el plegamiento lateral de la placa neural a lo largo del surco neural en la línea media, y la consiguiente aposición y fusión de los pliegues neurales, originando el tubo neural, separado del tejido ectodérmico suprayacente. Las células de la cresta neural se representan en color verde (Tomada de Carlson, B. (2004). Human Embryology and Developmental Biology, 3rd edition).

Al finalizar la neurulación, el neuroepitelio pseudoestratificado está conformado en el ratón por aproximadamente 250000 células [FordPerriss et al., 2001]. Éstas son esencialmente células madre multipotentes conocidas como Células Precursoras Neurales (NPCs), encargadas de generar el conjunto de precursores para todo el encéfalo y la médula espinal.

1. CONCEPTO DE CÉLULA PRECURSORA NEURAL. HETEROGENEIDAD DE PRECURSORES PERTENECIENTES A UNA MISMA ESTIRPE CELULAR.

El término célula precursora neural es utilizado para referirse a las células progenitoras primarias en diferentes estadios del desarrollo y en el cerebro adulto que inician linajes conducentes a la formación de neuronas o células gliales diferenciadas [Kriegstein and Álvarez-Buylla, 2009]. Este concepto implica la existencia de diversos tipos celulares de progenitores que están linealmente relacionados en el tiempo, es decir, corresponden a una estirpe celular continua que evoluciona a lo largo del desarrollo embrionario, etapa postnatal e incluso en el adulto, en áreas germinales restringidas del cerebro donde las neuronas continúan produciéndose. Muchas de las neuronas y células gliales no son generadas directamente de la división de las NPCs, sino que se originan a partir de precursores con un potencial más restringido que son amplificados transitoriamente y han sido denominadas células progenitoras intermedias (IPCs).

Clásicamente se consideró que las neuronas y las células gliales provenían de diferentes “*pools*” de precursores que se alejaban temprano durante el desarrollo embrionario como dos linajes independientes: neuronal y glial. Actualmente se acepta la naturaleza glial de las células precursoras neurales en el desarrollo y el adulto [Kriegstein and Álvarez-Buylla, 2009].

De esta manera, en las fases iniciales de la neurogénesis en el cerebro de los embriones de mamífero, las células neuroepiteliales se van transformando paulatinamente en “*células de la glía radial*”, que presentan características y marcadores asociados a las células gliales, pero conservan algunas otras características propias de las células neuroepiteliales como la polaridad apico-basal y la migración nuclear intercinética. Estas células pueden autorrenovarse o experimentar división asimétrica, para originar neuronas y glía, directa o indirectamente a través de las células progenitoras intermedias [Kriegstein and Álvarez-Buylla, 2009].

Al final del desarrollo de los mamíferos, persiste en el cerebro una subpoblación de células de la glía radial que continúa actuando como NPCs en el neonato, dando origen a neuronas y oligodendrocitos y estableciendo además, en ciertas zonas restringidas del cerebro postnatal una población de NPCs como una forma especializada de astrocito, que es responsable de establecer y mantener la neurogénesis en regiones concretas del cerebro a lo largo de toda la vida del individuo [Merkle et al., 2004] (Fig. 2).

En roedores ha sido demostrada la existencia de neurogénesis a partir de estas células en al menos dos regiones del cerebro adulto. En la región correspondiente a la pared de los ventrículos laterales, *zona ventricular – subventricular* (V-SVZ), las células astrogliales generan un importante número de neuronas que migran hacia el bulbo

olfatorio siguiendo la llamada *corriente migratoria dorsal*, donde de forma continua reemplazan diversos tipos de interneuronas [Carleton et al., 2003]. Asimismo, en el hipocampo se ha demostrado la producción de nuevas neuronas a partir de los astrocitos radiales presentes en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado, que han sido relacionados con funciones de aprendizaje y memoria [véase revisión de: Drew et al., 2013; Abrous and Wojtowicz, 2015].

Considerando la evolución ontogénica de las NPCs a lo largo de la vida del individuo, el hecho de que exista una relación directa de linaje entre ellas (células neuroepiteliales → glía radial → astrocitos modificados del adulto) y que además conserven y compartan las características fundamentales de autorrenovación y multipotencialidad, permite suponer que estas células podrían responder a mecanismos regulatorios comunes.

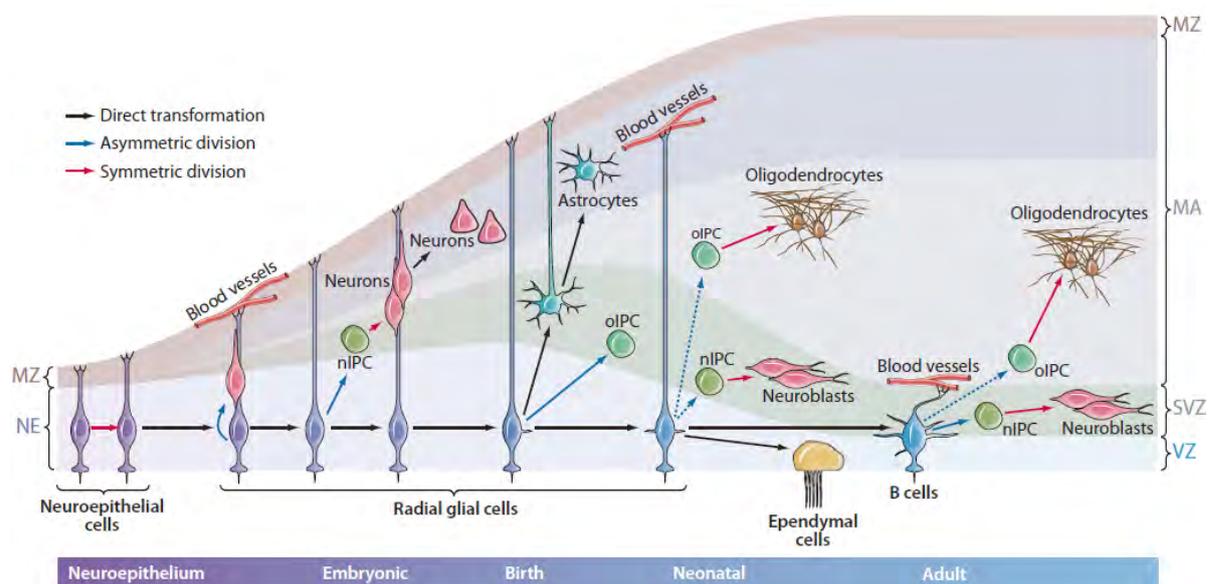


Figura 2 | Naturaleza glial de las NPCs del desarrollo y del adulto. Las células precursoras establecidas en nichos neurogénicos en el periodo postnatal corresponden a la evolución ontogénica de las células de la glía radial (Modificada de Kriegstein and Álvarez-Buylla (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells).

2. NICHOS NEUROGÉNICO DEL ADULTO.

La actividad de las NPCs *in vivo* y la generación de nuevas células a partir de estas, requiere de un entorno celular complejo, con una organización muy bien definida que posibilita el establecimiento de diversos tipos de comunicación intercelular, con el fin de regular de manera precisa diferentes aspectos de su comportamiento. El conocimiento de este microentorno da lugar a la introducción del concepto de '*nicho neurogénico*', que está presente durante toda la vida del individuo, con distinto grado de actividad.

Existen ciertas similitudes en la organización estructural del nicho neurogénico en los diversos momentos de la vida. De hecho, en el nicho adulto se conservan algunas características espaciales y morfológicas importantes distintivas del periodo embrionario. Sin embargo, las NPCs y las neuronas recién generadas en ambos tipos de nicho (embrionario y adulto), están sometidas a un microambiente diferente. La explicación a este hecho radica en la función que desempeña cada nicho. En el caso del embrión, se precisa la generación de la población neuronal del cerebro en un corto periodo de tiempo (86100 millones de neuronas en el cerebro humano, 75 millones de neuronas en el cerebro de ratón), lo que necesariamente implica un intenso grado de actividad por parte de sus NPCs. Por su parte, en el adulto, el nicho neurogénico es el responsable de la sustitución de ciertos tipos de neuronas, es decir, tiene una actividad más limitada, capaz de mantener funciones activas a lo largo de la vida, por lo tanto son nichos localizados, restringidos a zonas concretas del cerebro y suponen un relativo estado de quiescencia para las NPCs [Codega et al., 2014, Lim et al., 2014].

2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL NICHOS GERMINAL DEL CEREBRO ADULTO.

El nicho neurogénico adulto más ampliamente estudiado en mamíferos es la V-SVZ. Las NPCs que alberga corresponden a células con marcadores y características morfológicas astrogiales (*células tipo B*), que tienen la capacidad de permanecer en un estado latente antes de activarse, proliferar y dar origen a las *células tipo C*, activamente proliferativas y que funcionan como expansores de la población de precursores (IPCs) en el cerebro adulto [Ponti et al., 2013]; estas a su vez originan neuroblastos inmaduros (*células tipo A*), las cuales migran al bulbo olfatorio para diferenciarse hacia interneuronas.

La V-SVZ presenta una organización espacial muy característica (Fig. 3). Como se anotó antes, las NPCs del cerebro adulto derivan de las células de la glía radial del cerebro embrionario como consecuencia de su evolución ontogénica. Esto podría explicar por qué las células tipo B conservan una disposición epitelial similar a ellas, manteniendo el contacto con la cavidad ventricular mediante un proceso apical especializado, e igualmente emitiendo un proceso basal que determina un contacto directo con los vasos sanguíneos presentes en la zona subventricular, es decir, las NPCs adultas conservan una polaridad apico-basal [Merkle et al., 2004]. A partir de esta disposición espacial de las células B es posible determinar tres regiones o dominios bien definidos para la V-SVZ [Lim et al., 2014]. El *dominio apical*, inmediatamente adyacente al ventrículo, incluye los procesos apicales de las células B y una capa de células endimarias. El *dominio intermedio* contiene los cuerpos celulares de la mayoría de células B, en contacto directo con agrupaciones de células tipo C en amplificación transitoria y los neuroblastos en migración (células tipo A). Finalmente, la *región basal* incluye los procesos basales de las células B con sus uniones a los vasos sanguíneos. Integrada con el nicho de la V-SVZ en sus tres niveles, existe una variada

red de terminaciones axónicas (serotoninérgicas, dopaminérgicas, colinérgicas) que al parecer de alguna manera aún por dilucidar, ejercen un control regulatorio de la actividad neurogénica del nicho [Lim et al., 2014].

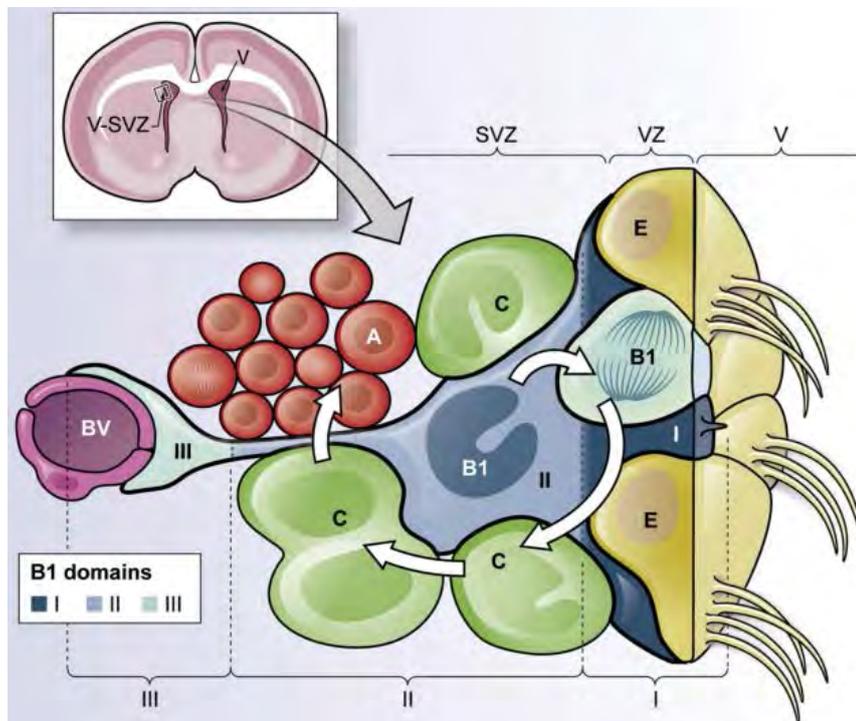


Figura 3 | Nicho neurogénico de la V-SVZ. Los dominios I, II y III de las células B1 corresponden a la región apical, intermedia y basal (Modificada de Fuentealba et al. (2009). *Adult Neural Stem Cells Bridge Their Niche*).

De esta manera, el nicho resulta ser un microentorno heterogéneo y complejo, conformado por diversos tipos celulares incluyendo las NPCs, una alta densidad vascular, terminaciones nerviosas diversas, la matriz extracelular que relaciona los diferentes elementos y una cavidad ventricular.

2.2 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL NICHOS NEUROGÉNICO POR SEÑALES EXTRÍNSECAS. COMPLEJIDAD DEL MICROENTORNO.

Al parecer, la continuidad del fenómeno de neurogénesis a lo largo de la vida del individuo depende no solo de las características intrínsecas propias de la célula B en su condición de NPC (autorrenovación y multipotencialidad), sino también de las señales extrínsecas que difunden en la proximidad de las células precursoras y que resultan instructivas o permisivas para su proliferación y diferenciación neural. La peculiar organización estructural de la V-SVZ del adulto y su diversidad de componentes sugieren múltiples posibles orígenes de los mecanismos de regulación sobre la activación y amplificación de las NPCs y la generación de células diferenciadas. Se ha propuesto incluso, que las diferentes regiones o subdominios del nicho poseen responsabilidades exclusivas en el control de la actividad neurogénica, suministrando a las NPCs señales extrínsecas que podrían ser distintivas de cada región. Una multitud de vías de señalización en el nicho han sido propuestas como parte de estos controles

regulatorios: Wingless (Wnt), Sonic Hedgehog (SHH), Notch, Proteínas Morfogénicas Óseas (BMPs), Factor de Crecimiento de Fibroblastos tipo 2 (FGF2), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), efrinas, entre otros [Zheng et al., 2004; Hor et al., 2010; Khodosevich et al., 2011; Sun et al., 2013; Moore et al., 2014; Joppé et al. 2015; Hirota et al., 2016].

Una de las más importantes fuentes de señales extrínsecas para el control regulatorio de las NPCs de la V-SVZ parece ser el plexo vascular local. Los vasos sanguíneos están en contacto con la matriz extracelular del nicho neurogénico, pero además se asocian de manera directa con las células tipo B mediante uniones basales especializadas [Mirzadeh et al., 2008]. Se ha encontrado que frecuentemente las células en proliferación en este nicho, están asociadas con los vasos sanguíneos o con la matriz alrededor de ellos [Kerever et al., 2007; Jenny et al., 2009], lo cual sugiere que los factores transportados por la vasculatura o incluso provenientes de la célula endotelial misma pueden regular la actividad de los progenitores primarios de la V-SVZ [Shen et al. 2008].

La matriz extracelular (ECM) es un elemento común a los diferentes nichos germinales del organismo, donde regulan diversos aspectos del comportamiento de sus células precursoras [Para una revisión: Gattazzo et al., 2014]. En el cerebro, la V-SVZ expresa varias moléculas de ECM. Específicamente en esta localización han sido descritas estructuras ramificadas de ECM, de geometría fractal y ricas en heparán sulfato proteoglicanos (HSPG) denominadas *fractones*. Estos están en contacto directo con los procesos emitidos por las NPCs y hacen parte además de la lámina basal de la vasculatura del nicho [Kerever et al., 2007]. El HSPG ha demostrado en diferentes tejidos actuar como modulador de la acción de ligandos extracelulares, sobretodo el FGF2, al regular la distribución de estos en el tejido, optimizar el proceso de unión-activación a sus receptores y protegerlos de la degradación enzimática [Forsten-Williams et al., 2008]. De esta manera, se postula que en la V-SVZ los fractones capturan los factores de crecimiento provenientes de diversas fuentes como la vasculatura local o el fluido cerebroespinal del ventrículo lateral que luego regularán diversos aspectos de la actividad del nicho. En este sentido se ha demostrado por ejemplo que el HSPG asociado a los fractones une y activa FGF2, un conocido factor de crecimiento mitótico, mediando de esta manera su efecto activador de la proliferación sobre las NPCs de la V-SVZ [Douet et al. 2013; Kerever et al., 2014].

Las células endimarias, por su parte, están en contacto directo tanto con el fluido cerebroespinal (CSF) del ventrículo como con las células B, sugiriendo que son un elemento importante en la regulación de la V-SVZ. Se ha encontrado que modulan la señalización por BMP, lo que resulta en un control de la neurogénesis del nicho [Lim et al., 2000; Gajera et al., 2010].

En los últimos años se han aportado evidencias de que otro de los mecanismos que controlan la actividad de las NPCs radica en su relación con la cavidad ventricular y su contenido, el *fluido cerebroespinal* (CSF). Tanto el cerebro embrionario como la V-SVZ del cerebro adulto tienen una conexión claramente establecida con el CSF. Ya se han comentado las “propiedades neuroepiteliales” retenidas por las NPCs en el adulto y que hacen posible dicha comunicación. De manera semejante a como ocurre con las células de la glía radial embrionaria, los procesos apicales de las células B envían una prolongación en forma de un único cilio no móvil, que alcanza el ventrículo al atravesar entre múltiples células endoteliales [Mirzadeh et al., 2008]; este actuaría, presumiblemente, como un sensor biológico que interactúa con las moléculas señal presentes en el CSF [Lim et al., 2014].

Actualmente es bien sabido que el CSF del adulto contiene múltiples factores tróficos importantes, incluyendo Wnt, SHH, ácido retinoico, Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 y 2 (IGF-1, IGF-2), BMPs, FGF2, entre otros [Zhou et al., 2006, Sarchielli et al., 2008; Huang et al., 2010, Lehtinen et al., 2011]. Este hecho ha motivado el desarrollo de diversas investigaciones que evalúan la probable influencia del CSF sobre diversos aspectos del comportamiento de los NPCs del cerebro adulto. Se ha observado por ejemplo, que la larga migración que deben efectuar los neuroblastos originados en la V-SVZ se desarrolla siguiendo la dirección del flujo del CSF, lo cual se explicaría por la presencia de un gradiente de concentración de moléculas guía en este fluido [Sawamoto et al., 2006]. Los datos en cuanto a sus efectos sobre la proliferación y diferenciación son variados. Algunos estudios *in vitro* describen al CSF del adulto como un estímulo gliogénico, inhibidor de la proliferación y diferenciación neuronal de las NPCs del adulto [Buddensiek et al., 2010], mientras que otros análisis han encontrado, sobre NPCs fetales, que el CSF promueve la proliferación e inhibe la apoptosis, incrementando además la velocidad de migración y distancia recorrida [Zhu et al., 2015].

Para comprender por qué es posible encontrar variaciones en los efectos biológicos que el CSF ejerce sobre la actividad del nicho de células madre del adulto, es necesario tener en cuenta que el CSF experimenta cambios en su composición y propiedades biológicas a lo largo de la vida o bajo ciertas circunstancias o condiciones patológicas. Esto podría explicar por ejemplo por qué estudios *in vitro* muestran que el CSF de origen embrionario (eCSF) logra activar la neurogénesis de las NPCs de la V-SVZ de ratones adultos, mientras que el CSF adulto control no logra hacerlo [Carnicero et al. 2013]. Así mismo, se ha encontrado que el CSF de pacientes con esclerosis múltiple promueve la diferenciación neuronal de NPCs humanas *in vitro* [Cristofanilli et al., 2013], mientras que el CSF de pacientes con glioblastoma multiforme presenta elevada concentración de IGF-2 y estimula la proliferación de NPCs en cultivos de explantes [Lehtinen et al., 2011].

En resumen, la complejidad estructural y multiplicidad de componentes de la V-SVZ, descritos arriba, permite postular una gran diversidad de probables vías de regulación de su actividad, múltiples mecanismos de interacción entre los diferentes elementos que lo constituyen así como diferentes fuentes y posibles reservorios de señales. La confluencia de combinaciones específicas de estas señales sobre las NPCs es lo que determinaría su estado de quiescencia, activación, supervivencia, proliferación o destino de diferenciación.

3. CONCEPTO DEL NICHU NEUROGÉNICO EMBRIONARIO.

Durante el periodo embrionario, la formación de una neurona a partir de una NPC sigue la misma secuencia de acontecimientos establecida para el nicho neurogénico del adulto. Esta incluye: activación de precursores, activación de la replicación celular (expansión de la población de precursores), diferenciación neuronal/migración, maduración bioquímica y funcional e integración en circuitos. Al igual que en el adulto, el control y coordinación de los tres primeros procesos (activación, proliferación, diferenciación), está condicionado por los estímulos que recibe la célula del microentorno y por lo tanto, hemos optado por hacer uso del término “*nicho neurogénico embrionario*” para referirnos a este. De esta manera, el nicho germinal del cerebro embrionario incluye las señales difusibles circulantes en la proximidad de la célula precursora, cuyo origen pueden ser los *vasos sanguíneos*, *el mesénquima*, *las células neuroepiteliales* y *el fluido cerebroespinal embrionario* (eCSF) (Fig. 4).

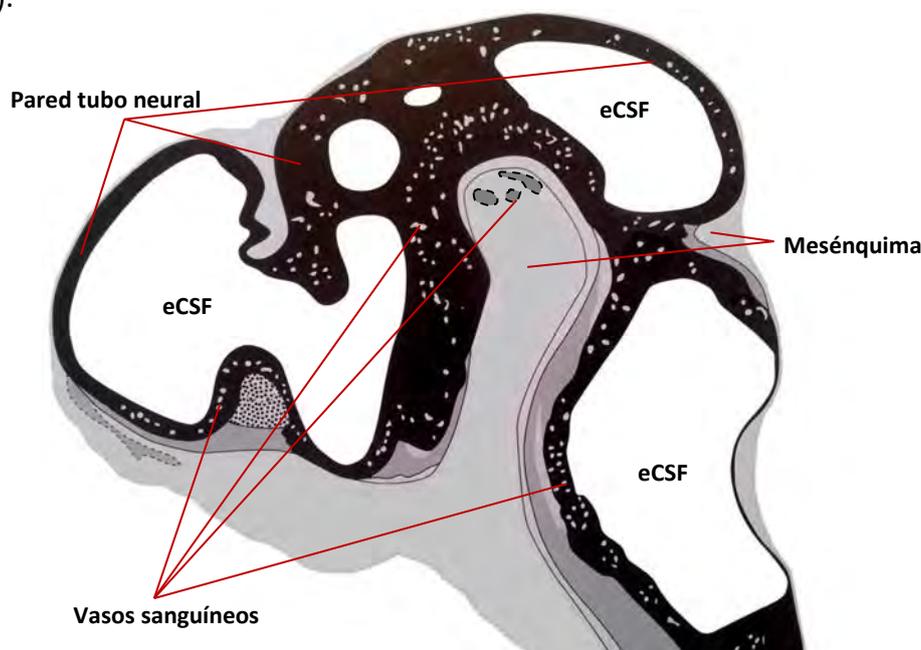


Figura 4 | Nicho neurogénico embrionario. La imagen representa una sección sagital de cerebro embrionario de rata en estadio E14, ilustrando los diferentes elementos del nicho neurogénico durante el desarrollo embrionario (Modificada de Altman and Bayer (1995). Atlas of Prenatal Rat Brain Development).

3.1 CARACTERÍSTICAS DEL NICHOS GERMINAL DEL CEREBRO EMBRIONARIO - IMPORTANCIA DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL NICHOS EMBRIONARIO.

El nicho neurogénico embrionario presenta peculiaridades importantes que lo diferencian del nicho neurogénico adulto. Ya se han abordado, en la sección correspondiente a nicho adulto, algunas de estas características diferenciales. Tal vez la más sobresaliente, además de su alta tasa proliferativa, es que se trata de un nicho generalizado, es decir, abarca todo el esbozo embrionario del SNC, sin embargo, no muestra uniformidad, sino que más bien es dinámico, pues el microentorno que alberga las NPCs se transforma continuamente, exhibiendo distinto grado de actividad de acuerdo a la localización espacial (cerebro anterior, medio o posterior) y temporal (momento del desarrollo). Como ya se describió antes, esto contrasta con la estabilidad del nicho germinal adulto, el relativo estado de quiescencia de sus NPCs y su mayor complejidad desde el punto de vista histológico.

Un nicho germinal con estas características requiere potentes estímulos mitogénicos y neurogénicos que procederán, como se comentó arriba, de los diferentes elementos que lo constituyen. Uno de los procesos claves para generar un evento de “neurogénesis masiva” a partir de una limitada población de precursores es una fase inicial de intensa replicación celular, que busca no solo mantener, sino también expandir la población de precursores indiferenciados que requiere la neurogénesis. En otras palabras, la fase de proliferación de las NPCs permite establecer un número adecuado de células progenitoras de partida, que al salir del ciclo celular y especificarse en diferentes destinos celulares, dará origen a la extensa variedad de tipos celulares neuronales y gliales propia del SNC. Por lo tanto, una correcta fase de proliferación es uno de los factores que permite garantizar que el tamaño global del SNC y el número final de neuronas y células gliales que se origina de cada tipo sea el adecuado. En el telencéfalo por ejemplo, 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; Raballo et al., 2000].

Sin embargo y a pesar de que este fenómeno ha sido abordado en diversas investigaciones, dista mucho de ser conocidos los mecanismos reguladores implicados en el mismo. Diversos factores tróficos y mitogénicos han sido relacionados con los procesos de proliferación de los NPCs durante el desarrollo embrionario del SNC; entre éstos se destacan: factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), familia de la proteína morfogenética ósea (BMPs), factores de crecimiento insulínicos (IGFs), proteínas Wnt, señalización Notch y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Existe evidencia científica diversa que relaciona este conjunto de moléculas con la replicación de las NPCs del nicho neurogénico embrionario a diferentes edades gestacionales [Dickinson et al., 1994; Kelly et al., 2005; Imayoshi et al., 2010; Fernández et al., 2010; Lehtinen et al.,

2011; Naruse et al., 2015]. No obstante, parece comúnmente aceptado que los dos factores directamente implicados en la proliferación de las NPCs embrionarias durante el periodo de máxima expansión de esta población celular son el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) [Martens et al., 2000; Raballo et al., 2000; Kelly et al., 2005; Sanalkumar et al., 2010].

4. CONSTITUCIÓN HISTOLÓGICA DEL CEREBRO EMBRIONARIO.

Al observar la organización histológica básica del cerebro embrionario en una etapa temprana del desarrollo (posterior a la neurulación), podemos afirmar que la pared del tubo neural está constituida en toda su extensión por neuroepitelio pseudoestratificado. Estas células neuroepiteliales corresponden a las primeras NPCs, derivadas directamente del ectodermo y que posteriormente darán origen, como producto de su evolución ontogénica, a las células de la glía radial y demás NPCs, incluyendo las del adulto. Una de las propiedades fundamentales de las células neuroepiteliales, además de su capacidad de autorrenovación y multipotencialidad, es que manifiestan una polaridad apico-basal, es decir, están en contacto tanto con la luz del tubo neural, como con la lámina basal o superficie pial (límite exterior del tubo neural). Los núcleos de estas células modifican su posición dentro del citoplasma, desplazándose por este de acuerdo al estadio del ciclo celular que estén experimentando [Miyata et al., 2015]. Este fenómeno es denominado *migración nuclear intercinética* y es el que otorga al neuroepitelio su carácter pseudoestratificado. Así, la síntesis de DNA (fase S) se produce en los núcleos situados cerca de la membrana limitante externa y cuando estos núcleos se preparan para dividirse, migran dentro del citoplasma hacia la superficie apical del tubo neural, donde experimentan la mitosis (fase M). Los núcleos en fases G1 y G2 están posicionados en la región media, entre las fases S y M.

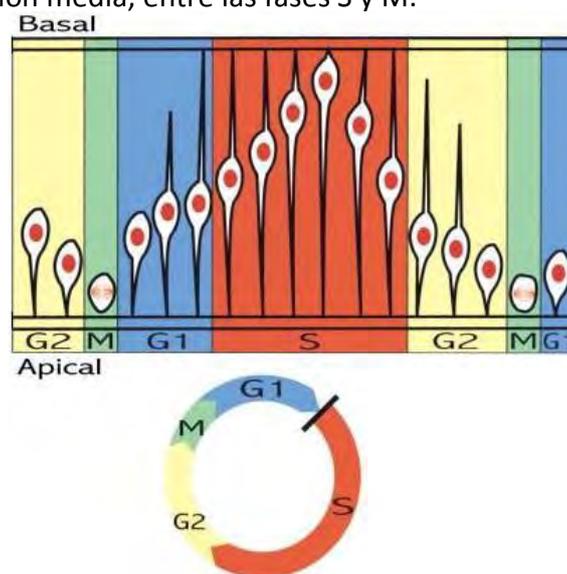


Figura 5 | Migración nuclear intercinética. (Modificada de Burstyn-Cohen and Kalcheim (2002). Association between the Cell Cycle and Neural Crest Delamination through Specific Regulation of G1/S Transition).

Posteriormente a la neurulación, el tubo neural inicia una “fase de expansión y vesiculación cerebral”, en la cual se expande aceleradamente en su región anterior y se diferencia en las cinco vesículas precursoras del sistema nervioso central completo del adulto: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo (eje anteroposterior) (Fig. 6). Durante esta fase de expansión y vesiculación destaca una gran cavidad ventricular delimitada por el neuropitelio, y que contiene el fluido cerebroespinal embrionario (eCSF), 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 [Para una revisión: Gato and Desmond, 2009; Gato et al., 2014]. Finalmente, tiene lugar la histogénesis a lo largo de todo el neuropitelio, la cual se prolonga hasta la etapa postnatal temprana.

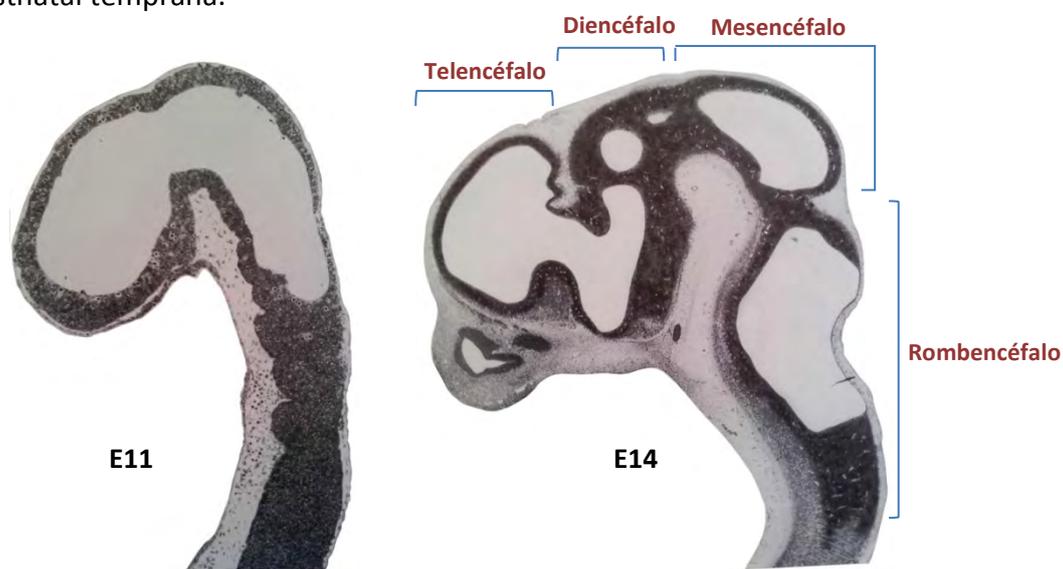


Figura 6 | Expansión y regionalización del cerebro embrionario. Se muestran cortes sagitales de estadios tempranos del desarrollo embrionario de cerebro de rata, donde se observa la transformación de un tubo neural más o menos uniforme (E11 rata) hacia un cerebro embrionario considerablemente expandido y con vesículas primarias y secundarias muy bien delimitadas (E14 rata). (Modificada de Altman and Bayer (1995). Atlas of Prenatal Rat Brain Development).

Como se mencionó antes, desarrollar la histogénesis del SNC requiere inicialmente una fase de proliferación intensa que da lugar a una gran cantidad de NPCs. Para esto, en etapas tempranas las células neuroepiteliales experimentan división simétrica, generando una gran cantidad de células neuroepiteliales (autorrenovación). Posteriormente estas células sufren una transformación morfológica que va acompañada de la expresión de diversos marcadores astrogiales, originando así las células de la glía radial, las cuales pueden experimentar división celular asimétrica con el fin de generar neuronas directamente o a través de IPCs [Para una revisión: Kriegstein and Álvarez-Buylla, 2009]. Da comienzo entonces una fase de diferenciación en la que muchas de las células salen de la región proliferativa, migran y se diferencian a neuronas o células de la estirpe glial. Además de actuar en su

condición de NPCs, las células de la glía radial, por su unión a los extremos apical y basal, 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 (**Fig. 7**).

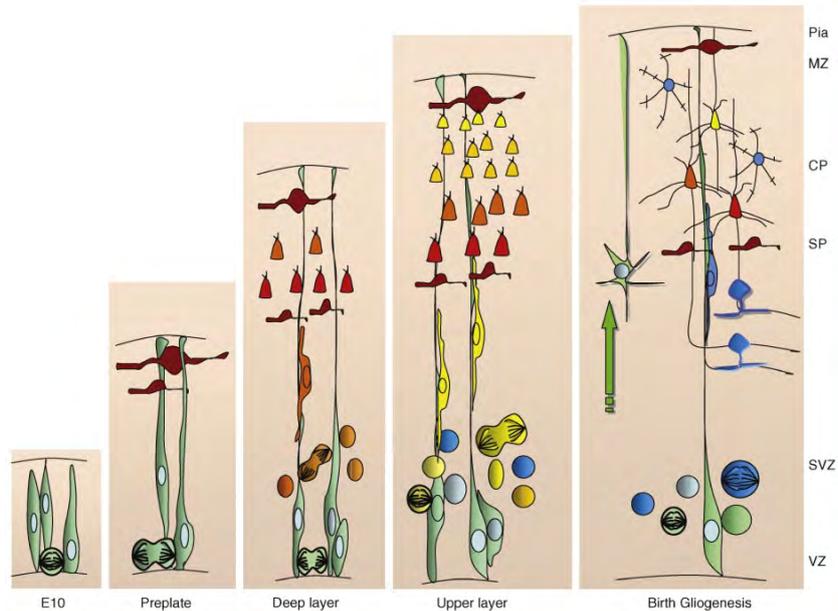


Figura 7 | Histogénesis de la corteza cerebral. (Modificada de Okano and Temple (2009). Cell types to order: temporal specification of CNS stem cells).

Se sabe que inicialmente la diferenciación es en sentido neuronal. Esta neurogénesis inicial tiene lugar desde estadios tempranos del desarrollo embrionario hasta la etapa postnatal temprana; sin embargo, su máxima expresión se da entre los estadios E9.5 – E12.5 en el ratón [Delaunay et al., 2008]. En contraste, la gliogénesis se inicia más tardíamente: E13.5 – periodo postnatal temprano. El intento por dilucidar por qué la generación de neuronas y células gliales durante el desarrollo del SNC ocurre de esta manera ha llevado al establecimiento de dos modelos alternativos, en los que se plantea que los precursores neuroepiteliales son capaces inicialmente de originar neuronas y luego, en estadios posteriores generar células gliales (*switching model*) o que los NPCs embrionarios están intrínsecamente comprometidos para generar uno u otro tipo celular (*segregating model*) [Delaunay et al., 2008].

5. RESPUESTA DIFERENCIAL DE LAS NPCs EMBRIONARIAS A FACTORES DE CRECIMIENTO MITOGÉNICOS.

Diversos estudios en roedores, desarrollados fundamentalmente con neuroesferas, apuntan a que existen dos poblaciones de células precursoras neurales embrionarias (eNPCs) que proliferan diferencialmente en respuesta a los mitógenos FGF2 y EGF, cada una de las cuales contaría con un potencial de diferenciación específico (neuronal o glial). Se ha identificado que las eNPCs de prosencéfalo que responden a FGF2 están presentes desde estadios tan tempranos como E8.5 en el ratón, mientras que las eNPCs que responden a EGF aparecen más tarde en el

desarrollo (E14.5), observándose además que la exposición al FGF2 podría resultar esencial para el desarrollo de una respuesta proliferativa a EGF y que poblaciones separadas de eNPCs con habilidad para proliferar ante FGF2 y EGF coexisten en estadios avanzados del desarrollo prosencefálico [Tropepe et al., 1999; Martens et al., 2000; Kelly et al., 2005]. De igual forma, se ha observado que el potencial de diferenciación neuronal o glial de las eNPCs es determinado por la exposición a FGF2/EGF durante su fase de proliferación y que una posterior exposición a un factor de crecimiento diferente a aquel en el cual las eNPCs fueron expandidas no altera significativamente su destino [Kilpatrick et al., 1995; Kelly et al., 2005; Sanalkumar et al., 2010]. Así, la presencia de FGF2 durante la proliferación de las eNPCs desencadena la expresión de genes que son requeridos para el direccionamiento hacia un destino neuronal y genera en consecuencia predominantemente neuronas, mientras que, en contraparte, las eNPCs expuestas a EGF muestran una pobre expresión de genes proneurales y generan más células de estirpe glial. [Sanalkumar et al., 2010].

6. REGULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LAS NPCs POR EL ECSF.

Al considerar en conjunto la evolución progresiva del esbozo cerebral durante el desarrollo embrionario, se hace evidente que el intenso proceso expansivo que experimenta el tubo neural y la diferenciación histológica son procesos interdependientes y simultáneos, existiendo para su regulación, como desarrollaremos en esta sección, una relación directa entre la cavidad, con sus mecanismos expansivos y de señalización, y los procesos celulares básicos de la pared neuroepitelial (supervivencia, replicación, diferenciación) (Fig. 8).

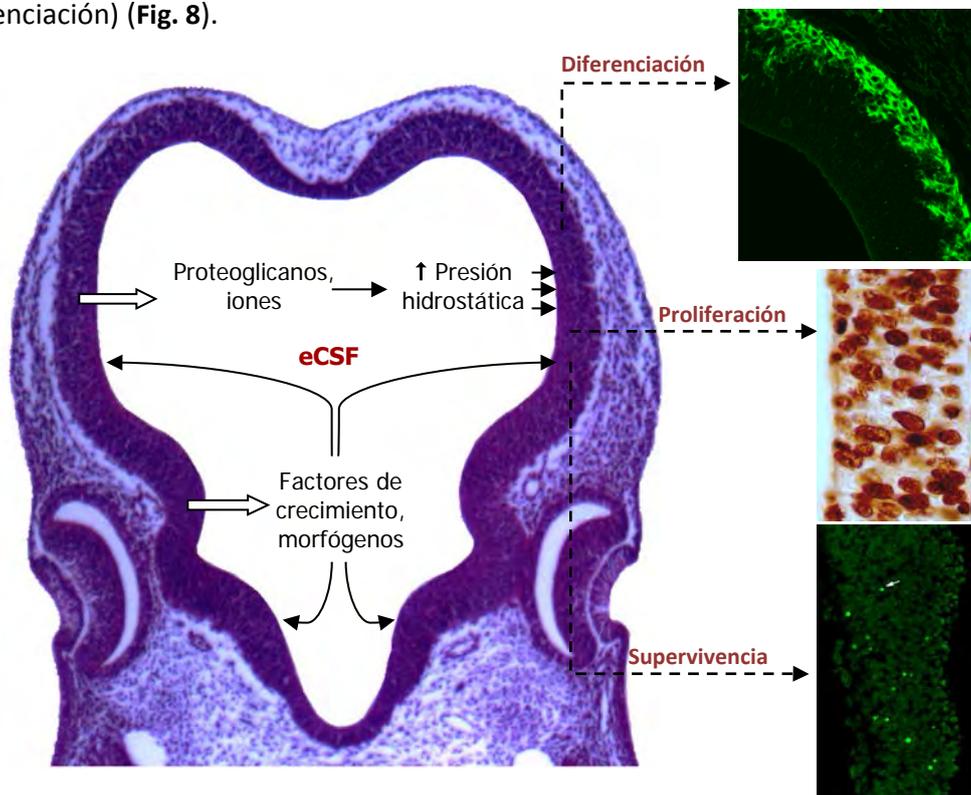


Figura 8 | Interdependencia entre la cavidad ventricular y la pared neuroepitelial en la regulación de los procesos básicos de crecimiento del esbozo cerebral.

La arquitectura tubular que adopta en principio el esbozo cerebral determina la existencia de una cavidad central, la luz del tubo neural. Durante el desarrollo temprano, como consecuencia de la fase de expansión y vesiculación que conduce a la regionalización del cerebro embrionario, esta cavidad se transforma en un sistema de cavidades ventriculares interconectadas, que se torna estanco desde los 9.5 días en el ratón cuando termina de cerrarse el tubo neural. Ya se ha comentado la relación directa y continua de las NPCs con los ventrículos y su contenido, el *fluido cerebroespinal embrionario* (eCSF); esto lo convierte en un sistema ideal de almacenamiento y distribución de señales a través de todo el nicho neurogénico embrionario.

Al parecer, la secreción de eCSF durante estadios tempranos, previo a la aparición de los plexos coroideos, es al menos en parte, responsabilidad de las células que constituyen la pared del esbozo cerebral. En este periodo resulta particularmente interesante estudiar la interrelación eCSF – pared neuroepitelial pues es en este momento cuando el cerebro embrionario comienza a expandirse de manera acelerada y presenta su máxima actividad replicativa y neurogénica. Posteriormente, en un estadio más avanzado del desarrollo, se inicia la actividad de los plexos coroideos y aparecen además otros centros a los que también se les atribuye una participación en la producción del CSF, incluyendo el órgano subcomisural y tal vez otros órganos circumventriculares [Duvernoy and Risold, 2007; Hoyo-Becerra et al., 2010; Bueno et al., 2014].

Actualmente se acepta la importancia capital del eCSF sobre el desarrollo del cerebro y como mecanismo regulatorio de la actividad de las NPCs del nicho neurogénico embrionario [Para una revisión: Zappaterra and Lehtinen, 2012; Gato et al., 2014; Stolp and Molnár, 2015]. De este modo, el eCSF y la pared neuroepitelial son dos componentes del nicho dependientes el uno del otro actuando como una entidad funcional que controla el crecimiento cerebral, su morfogénesis y el comportamiento neuroepitelial [Gato et al., 2014] (Fig. 8). Para llevar a cabo esta cooperación, el eCSF se relaciona con el neuroepitelio mediante la transducción de señales físicas (influencia mecánica) y bioquímicas (influencia por señalización molecular).

6.1 PRESIÓN POSITIVA DEL ECSF Y CRECIMIENTO CEREBRAL.

El cierre completo de la región más anterior del tubo neural transforma la cavidad central en un compartimento cerrado, lleno de fluido, delimitado por una pared neuroepitelial. La presión hidrostática positiva que genera la acumulación de CSF en esta cavidad constituye uno de los mecanismos fundamentales de crecimiento cerebral y morfogénesis en la primera fase del desarrollo cerebral [Gato and Desmond, 2009], resultando particularmente determinante tanto para el incremento del

volumen de la cavidad ventricular como para el aumento concurrente del grosor de la pared neuroepitelial.

Entre los múltiples mecanismos que se han sugerido para la acumulación intracavitaria de fluido, los más plausibles parecen ser los que conducen a la generación de un gradiente osmótico. Diversos estudios apuntan a que este gradiente estaría regulado por las células neuroepiteliales al sintetizar y secretar apicalmente hacia la cavidad ventricular moléculas osmóticamente activas, tales como proteoglicanos, responsables de atrapar agua dentro de la cavidad, lo cual genera un aumento de la presión hidrostática [Gato and Desmond, 2009]. Los proteoglicanos consisten en un núcleo proteico al cual se unen, en sitios específicos, una o más cadenas de glicosaminoglicanos. El Na^+ , un catión con gran capacidad osmótica que atraviesa el neuroepitelio por medio de bombas $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, se asocia a los proteoglicanos como consecuencia de las numerosas cargas negativas de estos y de este modo originan una mayor presión osmótica que aquella que producirían por separado.

Diversos estudios sugieren que la presión intracavitaria es uno de los factores que regulan la proliferación celular durante el desarrollo embrionario temprano [Desmond et al., 2005], probablemente con la mediación de mecanotransductores o quinasas de adhesión focal (FAKs) situadas en la superficie apical del neuroepitelio embrionario, como lo han sugerido trabajos recientes [Desmond et al., 2014].

6.2 INFLUENCIA DE LAS MOLÉCULAS SEÑAL PRESENTES EN EL ECSF SOBRE LOS PRECURSORES NEUROEPITELIALES.

Existe un soporte bibliográfico importante, y que se comentará a continuación, que demuestra que el eCSF resulta esencial para el nicho germinal del cerebro embrionario como elemento modulador de importantes señales biológicas que alcanzan el neuroepitelio y que controlan en su conjunto el comportamiento celular básico de las NPCs.

El modelo *in vitro* de cultivo de explantes de cerebro embrionario desarrollado por nuestro grupo de investigación ha permitido desde hace más de una década, tanto en aves como en roedores, demostrar en estadios tempranos del desarrollo, mediante la exposición y privación del tejido al eCSF, que el neuroepitelio no es autosuficiente y requiere la influencia trófica del eCSF para el mantenimiento de adecuadas tasas de supervivencia, replicación y neurogénesis de los eNPCs [Gato et al., 2005; Martín et al., 2009].

6.2.1 Composición del eCSF.

Conocer la composición del eCSF es fundamental si se quiere comprender cómo ejerce su acción biológica. Se trata de un fluido de naturaleza esencialmente proteica que exhibe un patrón electroforético complejo [Gato et al., 2004; Zappaterra et al., 2007]. Inicialmente, la estrategia que se empleó para hacer un análisis de la composición proteica del eCSF estuvo basada en la separación de proteínas por SDS-PAGE y la posterior asignación de su identidad comparando la masa molecular de las fracciones obtenidas con proteínas conocidas. Así, Gato et al. (2004) identificaron al menos 21 fracciones proteicas diferentes en el eCSF de embriones de pollo, la mayoría de las cuales estaban presentes también en el suero embrionario.

La composición del CSF evoluciona a lo largo de la vida del individuo. Se sabe a partir de estudios efectuados en pollo, que el CSF embrionario (eCSF) contiene una concentración de proteínas mucho más alta que aquella del CSF adulto [Birge et al., 1974; Gato et al., 2004]. Sin embargo, durante el desarrollo el patrón de composición es más o menos estable [Lehtinen et al., 2011], de tal manera que los cambios observados durante este periodo obedecen sobre todo a variaciones cuantitativas en ciertas fracciones proteicas de baja concentración, que no obstante podrían tener un alto significado biológico. Por otra parte, el eCSF comparte muchas similitudes entre especies de vertebrados a pesar de que entre estos, la identidad y concentración de ciertas fracciones proteicas mayores pueda presentar variaciones [Parada et al., 2005; Zappaterra et al., 2007]; esta similitud resulta ventajosa pues facilita el abordaje del estudio del eCSF desde una variedad de modelos experimentales

Posteriormente, el empleo de técnicas proteómicas basadas en electroforesis bidimensional (2D-PAGE) y análisis de secuencia por espectrometría de masas, ha permitido identificar en el eCSF de aves y mamíferos una cantidad considerablemente mayor de proteínas [Parada et al., 2005 y 2006; Zappaterra et al., 2007; Chau et al., 2015]. Con este abordaje experimental se logró reconocer en el eCSF de pollo cerca de 30 proteínas diferentes, incluyendo proteínas de matriz extracelular, proteínas relacionadas con la regulación de la presión osmótica y el transporte de iones, proteínas relacionadas con la quiescencia celular y muerte, algunas apolipoproteínas, proteínas fijadoras de retinol y vitamina D, proteínas antimicrobianas y antioxidantes, entre otras [Parada et al., 2006] (Fig. 9). Usando la misma metodología ha sido también analizado el proteoma del eCSF en mamíferos. Parada et al. (2005) identificaron 31 proteínas en el eCSF de rata (E12.7) cuyo perfil funcional fue muy similar al del pollo; sin embargo, en el eCSF de rata la composición proteica hallada resultó ser más compleja al detectarse enzimas, reguladores de enzimas y una mayor diversidad de apolipoproteínas (Fig. 10).

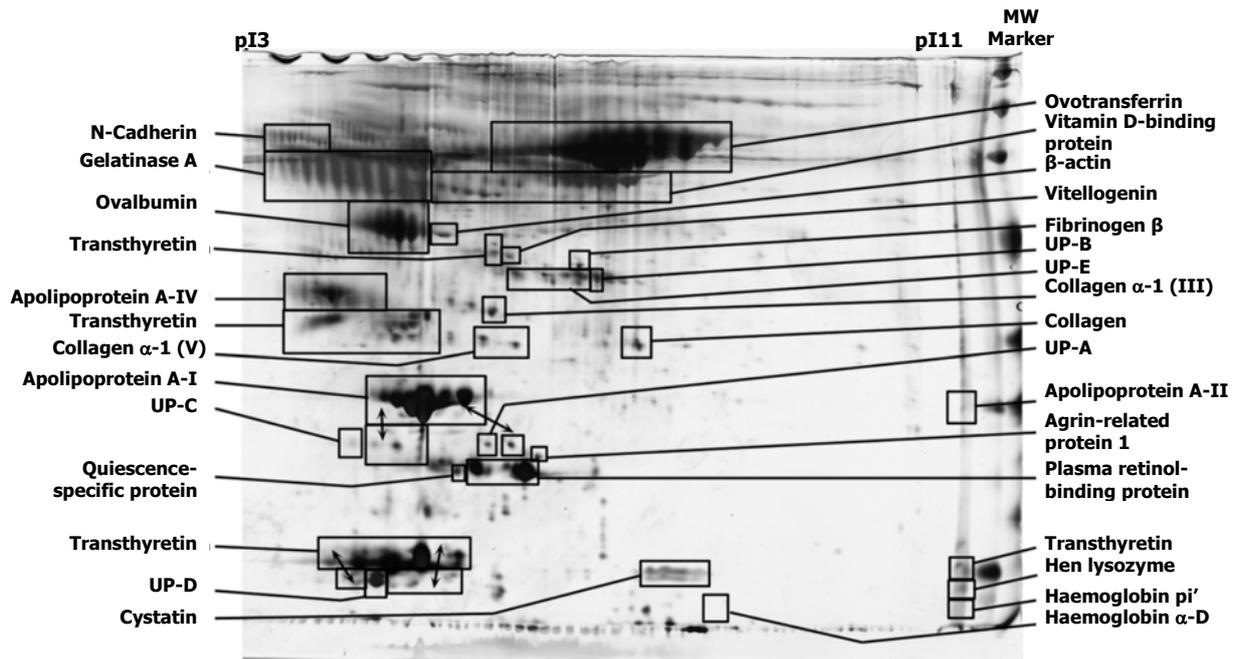


Figura 9 | Análisis 2-DE de proteínas de eCSF de pollo estadio HH24. El estudio de proteómica identificó 26 proteínas con diversas características estructurales y funcionales. (Tomada de Parada et al. (2006). Proteome analysis of chick embryonic cerebrospinal fluid).

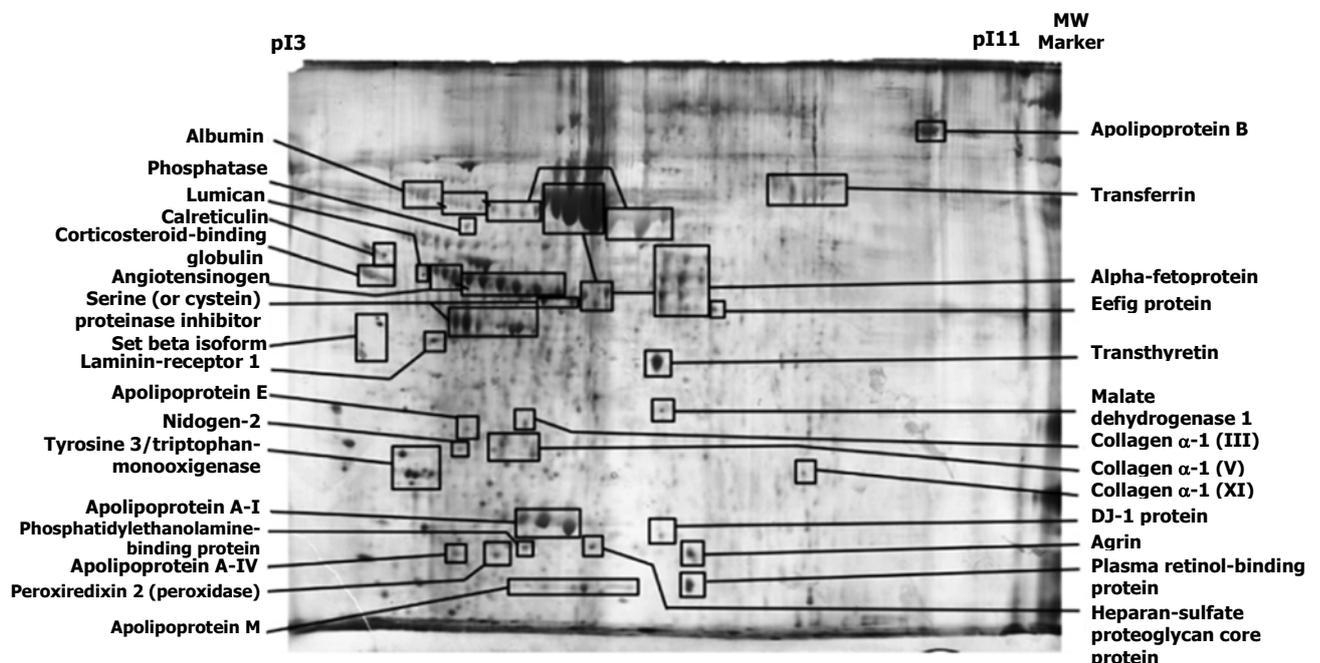


Figura 10 | Análisis 2-DE para proteínas de eCSF de rata estadio E12.7. El patrón electroforético resultó semejante al de su estadio equivalente en eCSF de pollo, aunque en el eCSF de rata se encontró una mayor complejidad de composición, lo cual parece estar relacionado con diferencias filogenéticas. (Tomada de Parada et al. (2005). Mammalian Embryonic Cerebrospinal Fluid Proteome Has Greater Apolipoprotein and Enzyme Pattern Complexity than the Avian Proteome).

Zappaterra et al. (2007) llevaron a cabo un extenso análisis proteómico comparativo del eCSF humano y de rata en diversos estadios del desarrollo, hallando 135 proteínas compartidas entre ambas especies con una gran similitud en las categorías funcionales de las proteínas encontradas.

Llama la atención de los análisis proteómicos convencionales del eCSF realizados hasta el momento, la no detección de factores de crecimiento y citoquinas, que se saben son señales fundamentales para el correcto funcionamiento del nicho germinal del cerebro embrionario. Esto puede obedecer a que resultan enmascarados por las proteínas más abundantes del eCSF y/o que la resolución de las técnicas empleadas no sea la suficiente para alcanzar el bajo umbral de detección de dichos factores [Bueno et al., 2014]. Sin embargo, el western-blot ha permitido a diversos investigadores detectar individualmente la presencia en el eCSF de pollo y roedores, de algunas de estas moléculas, incluyendo FGF2 [Martin et al., 2006], IGF-1 y 2 [Salehi et al., 2009; Lehtinen et al., 2011], factor de crecimiento nervioso (NGF) [Mashayekhi et al., 2009], entre otros.

6.2.2 Moléculas biológicamente activas que actúan a través del eCSF.

Diversos estudios han implicado a moléculas específicas que forman parte del eCSF, incluyendo factores de crecimiento, fracciones lipídicas, morfógenos, entre otros, como elementos que contribuyen en el control de las actividades de proliferación, neurogénesis y supervivencia neuroepitelial. Por ejemplo, por medio de experimentos de inmunobloqueo del FGF2 presente en el eCSF de pollo, Martín et al. (2006) generaron un bloqueo de la actividad replicativa y la neurogénesis de las eNPCs de embriones de pollo del orden de 50% y 25% respectivamente. En cuanto al ácido retinoico, un importante morfógeno durante el desarrollo del SNC, conocido por su potente actividad neurogénica, algunas investigaciones muestran que la proteína transportadora de retinol (RBP) transfiere retinal all-trans desde el plasma embrionario hacia el eCSF, desde donde alcanza el neuroepitelio y es transformado en ácido retinoico por enzimas neuroepiteliales [Parada et al., 2008; Alonso et al., 2011]. Estudios *in vivo* en embriones de pollo reafirman que la neurogénesis es regulada en estadios tempranos de forma indirecta, a través de la regulación de la síntesis de ácido retinoico en el istmo mesencéfalo-rombencefálico [Alonso et al., 2014]. Otros estudios han relacionado la fracción lipídica de la lipoproteína de baja densidad (LDL), la cual es transportada por la apolipoproteína B contenida dentro del CSF, con la proliferación y diferenciación de los eNPCs [Parada et al., 2008]. IGF-1 e IGF 2 por su parte, median principalmente respuestas proliferativas y de supervivencia durante el desarrollo embrionario y también han demostrado actuar a través del eCSF. En este sentido se ha observado que el IGF-2 del CSF durante el desarrollo se une directamente a la membrana apical y el cilio primario de las NPCs corticales, y la expresión del receptor

IGFR1 está situada fundamentalmente en la superficie apical de los progenitores [Lehtinen et al., 2011]. La acción del IGF-2 del CSF sobre las NPCs es muy dependiente del estadio embrionario; es máxima cerca del fin de la neurogénesis, continúa a un bajo nivel postnatalmente y es también modesta en estadios tempranos de la neurogénesis [Lehtinen et al., 2011]. La OSC-espondina, una gran glicoproteína secretada en estadios tempranos por la placa del techo del diencefalo está presente en el eCSF y se le ha identificado como un promotor de la supervivencia y la diferenciación neuronal. Recientes estudios de pérdida y ganancia de función sugieren que la OSC-espondina podría regular el balance entre proliferación y diferenciación de las eNPCs actuando en el eCSF como una gran molécula portadora/secuestradora de factores de crecimiento y morfógenos, regulando así la concentración de estos en el eCSF [Vera et al., 2013, 2015].

6.3 EL eCSF COMO MATRIZ EXTRACELULAR.

Si bien se considera el eCSF como un fluido de composición proteica compleja que incluye una amplia diversidad de proteínas con distintas características estructurales y funcionales, es importante tener presente que los proteoglicanos y los iones son los componentes mayoritarios de este fluido. Este hecho y la demostrada presencia de proteínas fibrosas nos conduce a considerar que el eCSF, más que un fluido puede ser considerado una matriz extracelular. Ya se ha abordado la importancia de las propiedades osmóticas de los proteoglicanos presentes en el eCSF, particularmente del condroitín sulfato proteoglicano, en el mantenimiento de la presión hidrostática dentro de la cavidad ventricular y su consecuente impacto en la expansión del cerebro embrionario. Sin embargo, esta podría no ser la única acción biológica que los proteoglicanos ejercen en el eCSF.

Es bien conocido que en los tejidos biológicos los proteoglicanos pueden encontrarse en la matriz extracelular, o unidos a la membrana celular y que consecuentemente, un gran número de factores de crecimiento pueden unirse a proteoglicanos en estas localizaciones. Esta interacción involucra la unión a las cadenas de heparán sulfato, de manera que los HSPGs de ECM (por ejemplo perlecán, agrina) actúan como importantes moduladores del tráfico molecular intercelular, mientras que los HSPGs de superficie celular (glicanos, sindecanos) modulan la respuesta celular a los factores de crecimiento [Forsten Williams et al., 2008; Nugent et al., 2013]. Más adelante se abordará cómo la habilidad de los FGFs para unirse y activar sus receptores tirosina quinasa es mejorada por el HSPG a través de la formación de complejos de alta afinidad, de tal manera que la señalización de los FGFs es dependiente de HSPGs para una transducción de señal eficiente [Brickman et al., 1995; Shimokawa et al., 2011]. Por otra parte, se sabe que durante el desarrollo, los HSPGs son importantes en la formación de gradientes de morfógenos (Wnt, SHH, FGFs), los cuales desencadenan respuestas celulares específicas en una forma

dependiente de la concentración [Häcker et al., 2005]. La abundante presencia de diversos tipos de proteoglicanos en un medio rico en moléculas de alto valor biológico como es el eCSF, sugiere que probablemente también en este medio los proteoglicanos actúan como mecanismo de control de las redes de factores de crecimiento.

6.4 CONSIDERACIONES ACERCA DEL ORIGEN DEL eCSF.

Como se mencionó antes, la composición del CSF es dinámica en el tiempo. De igual manera, el proceso de síntesis de CSF no es estático pues evoluciona conforme va aumentando la complejidad del cerebro siendo un punto de inflexión el desarrollo de los plexos coroideos y de la barrera sangre-CSF [Bueno et al., 2014]. El desarrollo de los plexos coroideos, un epitelio secretor altamente vascularizado, es considerado un importante punto de referencia pues son los principales responsables de la producción de CSF desde estadios fetales hasta la vida adulta. Sin embargo, del periodo previo a su aparición, que para esta tesis es el que principalmente nos ocupa, la información disponible es muy escasa [Bueno et al. 2014]. Así, teniendo en cuenta que pueden existir variaciones interespecie y que diferentes componentes específicos del eCSF podrían provenir de fuentes concretas, se han propuesto como posibles orígenes para el eCSF [Gato and Desmond, 2009]: el transporte a través del neuroepitelio desde una fuente externa, probablemente el suero, la síntesis y secreción apical generalizada por parte de las células neuroepiteliales, y la síntesis y secreción apical a partir de poblaciones celulares específicas.

Se sabe que las fracciones proteicas más abundantes del eCSF provienen de fuera de las cavidades cefálicas, probablemente al cruzar desde el suero embrionario [Parvas et al., 2008]. Algunos investigadores sostienen que en estadios previos al desarrollo de los plexos coroideos hay un proceso selectivo de tránsito de moléculas proteicas desde el suero embrionario hacia el eCSF que está estrechamente regulado por el neuroepitelio que actúa como una barrera sangre-CSF y por tanto como mecanismo de control de la composición y homeostasis del CSF [Bueno et al., 2014]. A partir de las evidencias obtenidas, estos autores proponen la existencia de mecanismos de transporte transcelular en esta barrera funcional, llevados a cabo en áreas concretas del cerebro embrionario y a través de vasos sanguíneos específicos; esta transferencia es además *específica de molécula*, es decir, algunas proteínas están excluidas del transporte suero-eCSF [Parvas et al., 2008]. Existen algunas evidencias de que algunas moléculas proteicas específicas y de alto valor biológico para el neuroepitelio pueden ser transportadas desde el plasma sanguíneo hacia el eCSF. Por ejemplo, tras su inyección intravascular en embriones de pollo, se logró detectar el paso de FGF2 conjugado con FITC hacia el eCSF, mientras que otras proteínas control

también marcadas con FITC y de peso molecular similar no presentes en este fluido, no lograron alcanzar la cavidad ventricular [Martín et al., 2006].

Si bien todavía no se ha estudiado de manera exhaustiva, actualmente se acepta la existencia de un proceso de secreción apical de moléculas por parte de las NPCs de la pared neuroepitelial hacia el eCSF. Su magnitud, variaciones interespecie, así como las moléculas implicadas son algunos de los aspectos por esclarecer. Igualmente interesante es profundizar en el conocimiento de la implicación de poblaciones celulares específicas en este proceso, como alternativa a un evento de secreción neuroepitelial generalizada. Un buen ejemplo de secreción localizada de sustancias por el neuroectodermo lo constituye la síntesis y secreción apical de OSC-espondina al eCSF, incluso desde una etapa temprana, anterior a la aparición del OSC como tal (tercer día del desarrollo en pollo y su estadio equivalente en el ratón), por parte de una zona muy bien delimitada de la placa del techo del diencefalo [Vera et al., 2013].

En la última década, diversos grupos de investigación han aportado información acerca de la existencia de una intensa actividad endocítica/exocítica que relaciona de forma bidireccional las células neuroepiteliales y el eCSF de la cavidad ventricular. De este modo, Marzesco et al. (2005), por primera vez describen el hallazgo de partículas de membrana extracelulares en el eCSF, probablemente producidas por el propio neuroepitelio. Posteriormente, Bachy et al. (2008), describen partículas tipo exosoma situadas cerca de la superficie apical y que podrían reflejar una importante actividad exocítica de las células y así mismo estar involucradas en la transducción de señales, teniendo en cuenta que sus análisis de imagen evidencian una pronunciada actividad endocítica/exocítica. Feliciano et al. (2014) por su parte encontraron que el CSF contiene 10^{12} nanopartículas/mL (177 nm diámetro), algunas de las cuales fueron identificadas como nanovesículas tipo exosoma. Se encontró que estas nanovesículas, obtenidas a partir de eCSF de embriones de ratón y humanos, encapsulan moléculas proteicas y microRNA relacionados con la vía de señalización del IGF, un importante factor mitogénico del eCSF.

En conclusión, la relación entre neuroepitelio y eCSF es sumamente compleja, interviniendo en ella mecanismos físicos y bioquímicos hasta el momento solo superficialmente comprendidos. Es claro, sin embargo, que el eCSF, en toda su complejidad, resulta un elemento fundamental para la comunicación intercelular en el nicho neurogénico embrionario y para garantizar un adecuado control de las actividades de supervivencia, replicación y diferenciación de las NPCs.

El objetivo fundamental de esta tesis es profundizar en el estudio de aquellos factores presentes en el eCSF, implicados particularmente en la regulación de la actividad mitogénica de las NPCs embrionarias y que controlan por tanto su mantenimiento y expansión. Entre estos, destaca el FGF2, que además ha sido descrito como un componente activo del eCSF en al menos un modelo experimental de vertebrado, el embrión de pollo. Por lo tanto, y dada la importancia, ya discutida en apartados anteriores, de determinar los estímulos mitogénicos de las NPCs embrionarias en mamíferos, la presente tesis doctoral se centra en el estudio del FGF2 como regulador de la actividad mitogénica de las NPCs en el nicho celular del cerebro embrionario del ratón.

7. FACTORES DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGFs).

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 tisular, la regulación de la excitabilidad eléctrica de las células y la regulación del metabolismo [véase revisión de Itoh and Ornitz, 2011].

En mamíferos, la familia de los FGF está codificada por 22 genes distintos, uno por cada miembro. Estos pueden ser clasificados de acuerdo a sus mecanismos de acción como *FGFs intracelulares (intracrinos)*, *FGFs canónicos (paracrinos)* y *FGFs semejantes a hormonas (endocrinos)*. A los dos últimos grupos se les suele denominar en conjunto FGFs secretados y originan respuestas biológicas mediante su unión a receptores de superficie celular tipo tirosina-quinasa (FGFRs), mientras que los FGFs intracrinos funcionan como moléculas intracelulares independientes de FGFRs y actúan fundamentalmente como cofactores de canales de sodio operados por voltaje. Además, tanto los FGFs secretados como los FGFs intracelulares pueden desempeñar funciones directas en el núcleo e interactuar funcionalmente con otras proteínas celulares. El análisis filogenético de sus secuencias identifica 7 subfamilias de FGFs: 5 subfamilias de FGFs paracrinos, una subfamilia de FGFs endocrinos y una subfamilia de FGFs intracelulares (Fig. 11).

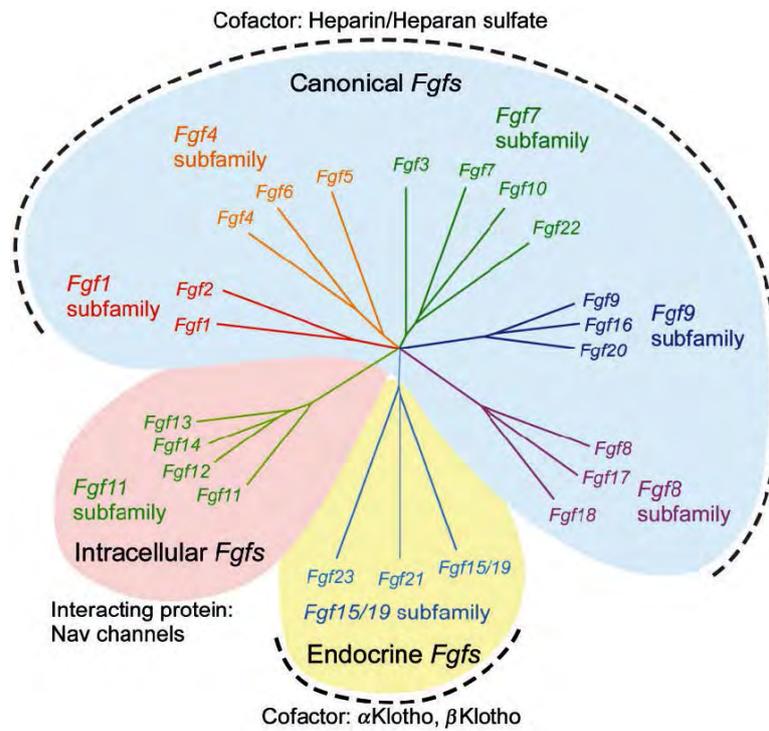
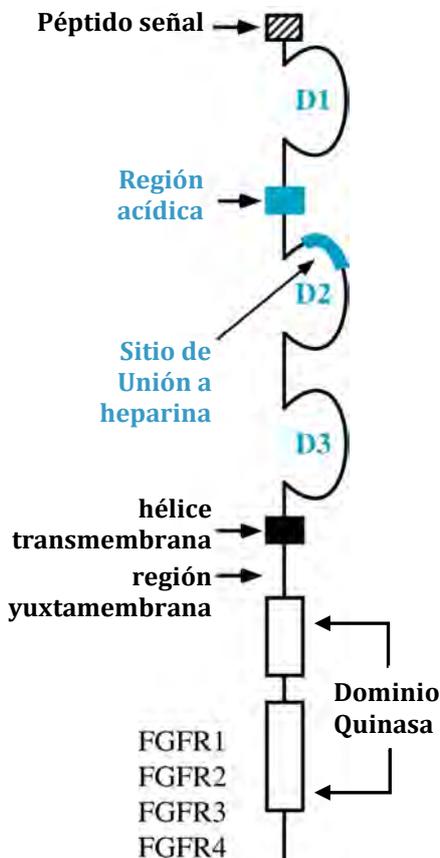


Figura 11 | Clasificación de la Familia FGF. (Tomada de Ornitz and Itoh (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway).

7.1 FGFRs Y SEÑALIZACIÓN POR FGFs.



Los FGFs ejercen su actividad biológica actuando sobre una subfamilia de 4 miembros de receptores de superficie celular tipo tirosina quinasa (FGFRs), codificados por cuatro genes independientes [Johnson et al., 1991; 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 [Werner et al., 1992]. En el lado extracelular, los primeros dos dominios tipo inmunoglobulina están separados por un tramo de aminoácidos ácidos y un dominio de unión a heparina que interacciona con HSPGs, los cuales actúan como cofactor pero también pueden ligarse independientemente a la familia de FGFs [véase revisión de: Nugent et al., 2013].

Figura 12 | Arquitectura del receptor tirosina quinasa FGFR. (Modificada de Moosa Mohammadi Lab. (<http://www.med.nyu.edu/mohammadi/LabPage/fgfr.html>))

La mayoría de los FGFs activan más de un FGFR. Cuando se une el ligando (FGF), se activa el receptor induciendo su dimerización y la fosforilación cruzada entre los dominios quinasa (transautofosforilación). Para el caso del FGFR1, seis residuos de tirosina son secuencialmente fosforilados para activar completamente el dominio quinasa. El evento siguiente es la activación de cuatro vías clave de señalización intracelular: RAS-MAPK, PI3K-AKT, STAT y PLC γ . (Fig. 13). La activación de la proteína RAS por parte del receptor tirosina quinasa activa a su vez la vía del *módulo proteína quinasa activada por mitógeno* (MAP-quinasa) que es una de las vías de señalización mayores que controlan la proliferación celular y la expresión génica a partir de los FGFs. Por su parte, la activación de fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3K) provoca la fosforilación de AKT y promueve la supervivencia y proliferación celular. Además, la señalización por fosfolipasa C γ (PLC γ) es otra de las vías conocidas activadas por FGFs, que están mediadas por señalización por calcio y activación de la proteína quinasa C (PKC). La activación de STAT (proteínas latentes reguladoras de genes) ocasiona su migración al núcleo donde regulan la transcripción génica.

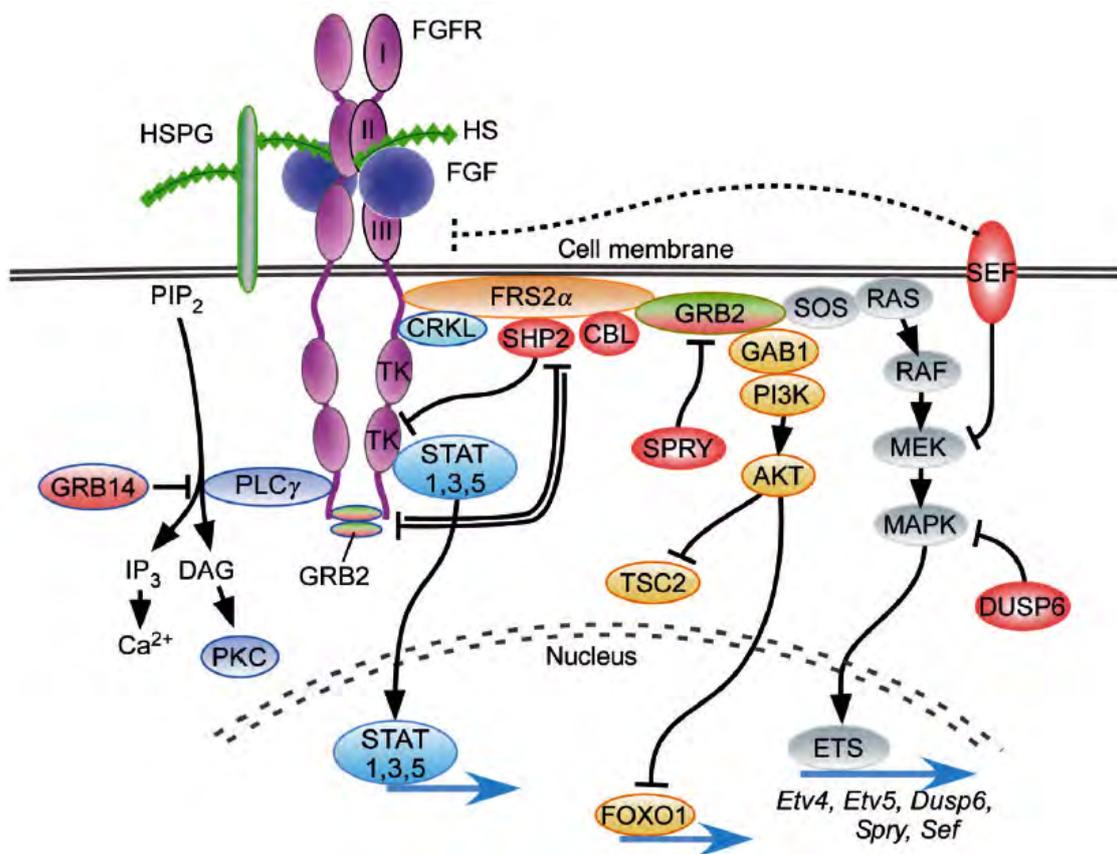


Figura 13 | Señalización por FGFs. (Tomada de Ornitz and Itoh (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway).

7.1.1 Regulación de la respuesta celular a la activación de FGFR.

La respuesta celular a la señalización de los FGFRs es regulada por diferencias en las propiedades intrínsecas de señalización de cada receptor y por la dinámica del tráfico subcelular de FGFR que ocurre en respuesta a la unión del ligando. Las vías de señalización citosólicas pueden ser diferencialmente activadas por FGFRs de superficie celular y FGFRs internalizados. Además, la regulación de la síntesis y degradación de FGFRs puede modular la intensidad de la señal FGFR.

7.1.2 Función señalizadora de FGFs y FGFRs en el núcleo.

Tanto los ligandos FGF como los receptores pueden localizarse en el núcleo celular donde ellos desempeñan funciones de señalización que pueden ser independientes de la actividad del receptor tirosina quinasa. Por ejemplo, se ha encontrado que el FGF1 y FGF2 de localización nuclear estimulan la síntesis de DNA independiente de FGFRs. Actualmente no está claro si los FGFs desempeñan funciones transcripcionales directas o ejercen su actividad en el núcleo a través de interacciones con otras moléculas. En cuanto a las FGFRs, se ha observado por ejemplo que después de su internalización mediada por ligando, el FGFR1 puede ser transportado al núcleo por interacciones con la importina β [Reilly and Maher, 2001]. El FGFR1 nuclear es requerido para diferenciación neuronal y funciones de activación de la transcripción en cooperación con la proteína CREB (cAMP response element-binding).

7.2 FUNCIONES DE LA FAMILIA FGF.

A nivel celular, los FGFs *secretados* regulan procesos celulares fundamentales que incluyen regulación positiva y negativa de la proliferación, supervivencia, migración, diferenciación y control del metabolismo. Numerosos estudios han mostrado además que los FGFs actúan como importantes reguladores de diversos eventos del desarrollo. Por ejemplo, los FGFs controlan el crecimiento y supervivencia de embriones de ratón inmediatamente después de la implantación, regulan la diferenciación de la masa celular interna hacia epiblasto y endodermo primitivo, intervienen en procesos de migración celular durante la gastrulación y establecimiento del eje corporal anteroposterior y más tarde en el desarrollo cumplen funciones claves durante la organogénesis. En el adulto, los FGFs cumplen un papel destacado en la respuesta al daño y reparación tisular. La señalización por FGFs es cardioprotectora en el daño isquémico cardiaco [Liao et al., 2009] y es importante en la reparación epitelial en el pulmón y curación de las heridas [Guzy et al., 2015; Blaber et al., 2015]. Los FGFs endocrinos contribuyen a los mecanismos de mantenimiento de la homeostasis mineral, metabólica, energética y de los ácidos biliares.

Por su parte, los *FGFs intracelulares* son reguladores esenciales de la excitabilidad neuronal y miocárdica [Wildburger et al., 2015]. Sin embargo, actualmente se desconoce si los *FGFs intracelulares* son requeridos durante el desarrollo embrionario normal.

7.3 FGFs COMO REGULADORES DEL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

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; Pera et al., 2014], lográndose experimentalmente por ejemplo, inducir estructuras neurales ectópicas cuando se aplican microesferas impregnadas con *FGF2* y *FGF4* en embriones de pollo en estadios primitivos [Álvarez et al., 1998]. 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 *Wnt*, ácido retinoico, *BMPs* y antagonistas de *BMP* [Glover et al., 2006; Hendrickx et al., 2009; Cho et al., 2013;], cuya interacción/cooperación con los *FGFs* es actualmente poco comprendida.

Diversos estudios confirman la expresión de diferentes *FGFs* en el esbozo temprano del cerebro. 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 cerebro embrionario, mientras que *FGF8* y *FGF17* están localizados característicamente en zonas específicas del esbozo cerebral y son expresados en el embrión únicamente en momentos precisos [Ford-Perriss, M. et al., 2001].

Muy temprano en el desarrollo, la región anterior del tubo neural está subdividido a lo largo de su eje antero-posterior (rostrocaudal), en tres zonas principales: cerebro anterior, cerebro medio y cerebro posterior. Más tarde, con el proceso de regionalización del tubo neural, el cerebro anterior da origen en su extremo más rostral al telencéfalo y el más caudal al diencefalo. El cerebro medio embrionario se desarrolla como una vesícula mesencefálica mientras que el cerebro posterior se divide en rombómeros, de los cuales los dos primeros son conocidos como metencéfalo. Como resultado de esta regionalización, las células neuroepiteliales adquieren una identidad posicional, la cual está controlada en el desarrollo temprano por centros de señalización local. Estos centros de señalización actúan dentro de la pared del esbozo cerebral para inducir y mantener la identidad regional en los segmentos de neuroepitelio adyacentes.

Se han desarrollado trabajos in vivo que demuestran que la señalización por FGF es esencial para la especificación del telencéfalo ventral y la adecuada generación de los tipos celulares ventrales así como en general el desarrollo telencefálico. El *centro de señalización rostral* es el que dirige estos procesos de especificación temprana [Para una revisión: Iwata and Hevner, 2009]. Este centro expresa varios FGFs, incluyendo FGF3, FGF8, FGF15, FGF17 y FGF18. Entre ellos, FGF8, FGF15 y FGF17 han demostrado contribuir en la regulación de la especificación de la corteza frontal [Cholfin and Rubenstein, 2007; Borello et al., 2008].

Por su parte, durante el diseño del esbozo de las vesículas cerebrales, el organizador ístmico, la estructura que separa el cerebro medio del cerebro posterior y que también actúa a manera de centro transmisor de señales moleculares es fundamental para el adecuado desarrollo de los derivados mesencefálicos y metencefálicos. En este centro el FGF8 demuestra una destacada importancia. 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; Martinez, S. et al., 1999]. FGF17 es también expresado por el organizador ístmico después del inicio de la expresión de FGF8 [Liu et al., 2003]. Los estudios de pérdida de función en ratones, han mostrado que estos FGFs cooperan en la regulación de la forma y crecimiento cerebelar manteniendo el ‘pool’ de NPCs en un estado proliferativo indiferenciado [Xu et al., 2000]. Por otra parte, el FGF2 también está presente en el metencéfalo y una sola inyección periférica de FGF2 estimula la producción de células granulares e incrementa el crecimiento cerebelar en ratas recién nacidas, resultados que son apoyados por estudios recientes con neuroesferas [Naruse et al., 2015]. Además del control del desarrollo del cerebelo, los FGFs parecen tener otras funciones durante la especificación regional del cerebro posterior, participando por ejemplo en el establecimiento de la identidad de los rombómeros [Aragón and Pujades, 2009].

7.4 LOS FGFs COMO REGULADORES DEL DESARROLLO DEL NEOCORTEX.

Durante el desarrollo del SNC de los mamíferos, la corteza cerebral se origina a partir del telencéfalo dorsal, mientras que las regiones telencefálicas basales dan origen a núcleos de sustancia gris (ganglios basales). La corteza cerebral experimenta una rápida expansión hacia la mitad de la embriogénesis, transformándose en la estructura más prominente del SNC. Los efectos biológicos de los FGFs en las NPCs neocorticales, así como su implicación en otros aspectos del desarrollo, se estudiaron inicialmente en cultivos celulares. Posteriormente la función de los FGFs y FGFRs durante el desarrollo embrionario y fisiología del adulto han podido ser estudiados

mediante experimentos de pérdida y ganancia de función en diferentes modelos animales, sobretodo anulando la actividad de sus genes por recombinación homóloga en ratones (*ratones knock-out*). Así se ha logrado determinar que los FGFs son moléculas determinantes en la regulación del tamaño telencefálico y de la organización de las capas corticales, pero los mecanismos subyacentes a estas acciones resultan aún muy complejos *in vivo* y solo se conocen superficialmente. Diversos parámetros proliferativos, incluyendo la longitud del ciclo celular, la salida del mismo, y la apoptosis están involucrados en la regulación que ejercen los FGFs en el tamaño telencefálico y desarrollo de la corteza. Cada uno de los parámetros asociados a la proliferación celular es independiente y se ha observado que son diferencialmente regulados por distintos ligandos FGF y FGFRs. Diversos estudios permiten afirmar que el FGF2 resulta ser uno de los más potentes mitógenos para los precursores neurales corticales.

7.5 IMPORTANCIA DEL FGF2 PARA EXPANDIR LA RESERVA DE PRECURSORES NEURALES DURANTE LA NEUROGÉNESIS.

Ya se ha mencionado en secciones anteriores la importancia específica del FGF2 en la proliferación de los NPCs embrionarios y además nos hemos referido específicamente a los estudios *in vitro*, con neuroesferas, sobre la influencia proliferativa de este factor en precursores aislados a partir del nicho telencefálico en distintos momentos del desarrollo así como su impacto final en la neurogénesis [Kilpatrick et al., 1995; Tropepe et al., 1999; Martens et al., 2000; Kelly et al, 2005; Sanalkumar et al., 2010]. Las evidencias a las que se hace alusión conducen claramente a sugerir que el FGF2 podría jugar un papel clave en la expansión de la reserva de células precursoras neuroepiteliales durante la neurogénesis temprana. [Por otra parte](#), los resultados que arrojan diversos estudios *in vivo* y que se comentarán a continuación, resultan consistentes con esta idea.

Vaccarino et al. (1999) han logrado demostrar en roedores, que inducir alteraciones en la cantidad de FGF2 disponible en el nicho neurogénico embrionario genera cambios en el tamaño final de la corteza. Una sola microinyección de FGF2 en la cavidad ventricular de embriones de rata, en etapas tempranas de la neurogénesis - E15.5 (equivalente a E13.5 ratón), ocasionó un incremento considerable del volumen y número total de neuronas de la corteza cerebral adulta (18% y 87% respectivamente), mientras que la microinyección de FGF2 al final de la neurogénesis (E20.5) selectivamente incrementó el número de glía. El estudio de proliferación con BrdU reveló que el FGF2 aumenta la proporción de células en división sin afectar a la longitud del ciclo celular, es decir, incrementa el número de veces que los progenitores corticales se dividen. La ausencia de alteraciones en la tasa de apoptosis de los NPCs indicó que una mejora en la supervivencia no es la responsable del aumento en el

número de NPCs. Otros investigadores han confirmado en embriones de ratón un incremento en el número de células de la corteza cerebral secundario a inyección *in utero* de FGF2 (E14); sin embargo, con las dosis administradas se inducen además alteraciones encefálicas tales como ensanchamiento de los espacios ventriculares, adelgazamiento de la corteza cerebral e incluso diferenciación aberrante de cierto tipo de neuronas [Ohmiya et al., 2001].

Si bien los hallazgos descritos arriba demuestran que el FGF2 es capaz de promover la replicación de células progenitoras corticales *in vivo*, algunos estudios llevados a cabo en ratones *knock-out* para el FGF2 (ratones FGF2 KO) han permitido comprobar si el FGF2 endógeno es necesario para un adecuado crecimiento del neuroepitelio telencefálico durante el desarrollo embrionario. Raballo et al. (2000) han encontrado que en el embrión FGF2 KO, el volumen y el número de células del neuroepitelio telencefálico dorsal (que da origen a la corteza) son sustancialmente menores, hallándose una disminución del 50% de NPCs y una expansión reducida de este pool de células progenitoras al comienzo de la neurogénesis. A pesar de esta reducción, el grado de apoptosis dentro del neuroepitelio no se altera. Así mismo el número de neuronas corticales disminuyó 45% aproximadamente, hacia el final de la neurogénesis. Por su parte, Dono et al. (1998) en sus estudios sobre el ratón FGF2 KO, afirman que el FGF2 no es esencial para la proliferación de los eNPCs ya que el análisis de proliferación con BrdU resultó normal, mientras que sí observaron defectos en la corteza cerebral, como alteraciones en la colonización de ciertas capas corticales (II y III) en áreas motoras y somatosensoriales de la corteza y una disminución en las neuronas parvalbúmina positivas.

7.6 EXPRESIÓN DE FGF2 Y FGFR1 DURANTE EL DESARROLLO DEL CEREBRO.

Algunos estudios sugieren que existen diferencias importantes entre especies en cuanto a la producción de las señales que actúan sobre el neuroepitelio. Martín et al. (2006), como parte de un abordaje experimental para identificar la fuente de procedencia del FGF2 presente en el eCSF de embriones de pollo, desarrollaron un estudio de hibridación *in situ* de mRNA para FGF2 (estadios HH13 al HH27). El resultado arrojó que ninguna de las isoformas conocidas de este gen pudo ser detectada en toda la extensión del neuroepitelio y en todos los estadios analizados. Este y otros resultados asociados les llevó a la conclusión de que el FGF2 presente en el eCSF de embriones de pollo tiene un origen extraneural.

Por otra parte, los patrones presentados hasta el momento en cuanto a expresión de FGF2 y FGFR1 en el cerebro embrionario de roedores han centrado su atención en la región que da origen a la corteza cerebral. Los resultados del marcaje inmunohistoquímico e hibridación *in situ* de RNA, muestran que se trata de una

expresión espacial y temporalmente regulada para ambas proteínas. En particular, las células de la zona ventricular embrionaria expresan niveles considerables de FGFR1 durante el periodo de expansión del “pool” de progenitores corticales y a lo largo de la neurogénesis, con una regulación a la baja en estadios tardíos. En concordancia con la distribución del FGFR1, el FGF2 también se ha encontrado en la zona ventricular del epitelio pseudoestratificado, sobretodo en la región dorsal y en estadios tempranos de la neurogénesis (E14.5 rata, equivalente a E12.5 ratón) pero casi ausente hacia el final de la misma (E17.5 rata) [Dono et al., 1998; Vaccarino et al., 1999; Raballo et al., 2000].

Los datos de expresión de FGF2 disponibles actualmente, aunque aportan un conocimiento general en cuanto a la expresión de esta molécula durante el periodo que se presume de máxima actividad sobre el neuroepitelio, son insuficientes para establecer un patrón de expresión preciso en el esbozo cerebral, temporal y espacialmente.

7.7 DIVERSIDAD FUNCIONAL DE LAS ISOFORMAS DEL FGF2.

Entre todos los FGFs, el FGF2 al igual que el FGF3, tiene la característica de actuar como una molécula extracelular mediante la señalización del receptor canónico tirosina quinasa (función paracrina) y además ejercer directamente funciones intracelulares (función nuclear). Esto es posible debido a que esta proteína es producida como múltiples isoformas por el uso alternativo de sitios de inicio de la traducción a partir de un solo mRNA. La isoforma más pequeña es el FGF2 de 18 KD, conocida como FGF2 de bajo peso molecular que es secretado por las células actuando entonces a través de la activación de receptores FGF de superficie celular, mientras que las variantes de alto peso molecular (22, 22.5, 24 y 34 KD en humanos, 21, 23 y 30 KD en roedores) son importadas al núcleo y ejercen su acción de forma independiente a los FGFRs [Sørensen et al., 2006; Yu et al., 2007].

El FGF2 de 18 KD es traducido desde un codón de inicio convencional AUG (metionina), mientras que las formas de alto peso molecular son sintetizadas comenzando desde codones de iniciación alternativos CUG (leucina) en sentido ascendente. (Fig. 14). Así, todas las isoformas contienen la “secuencia fundamental” de 18 KD y los FGF2 de alto peso molecular son extensiones N-terminales lineales que contienen dicha secuencia. Las diversas isoformas de FGF2 son diferencialmente distribuidas en la célula y su localización subcelular controla su actividad biológica [Sørensen et al., 2006].

La secuencia del FGF2 18 KD consiste de 155 aminoácidos, su estructura tridimensional (Fig. 15) se presenta como una estructura trébol beta que es compartida por todos los miembros de la familia FGF. Este tipo de plegamiento contiene 12 hebras

beta antiparalelas, las cuales forman 6 horquillas de doble hebra. Tres de estas forman una estructura de barril y las otras tres están en un arreglo triangular que tapa el barril [Murzin et al., 1992]. Dos hebras beta (hebras β_{10} y β_{11}) contienen varios residuos de aminoácidos básicos que forman el sitio primario de unión a heparina. Las regiones que se consideran implicadas en la unión al receptor son distintas de las regiones que unen heparina [Ornitz and Itoh, 2001].

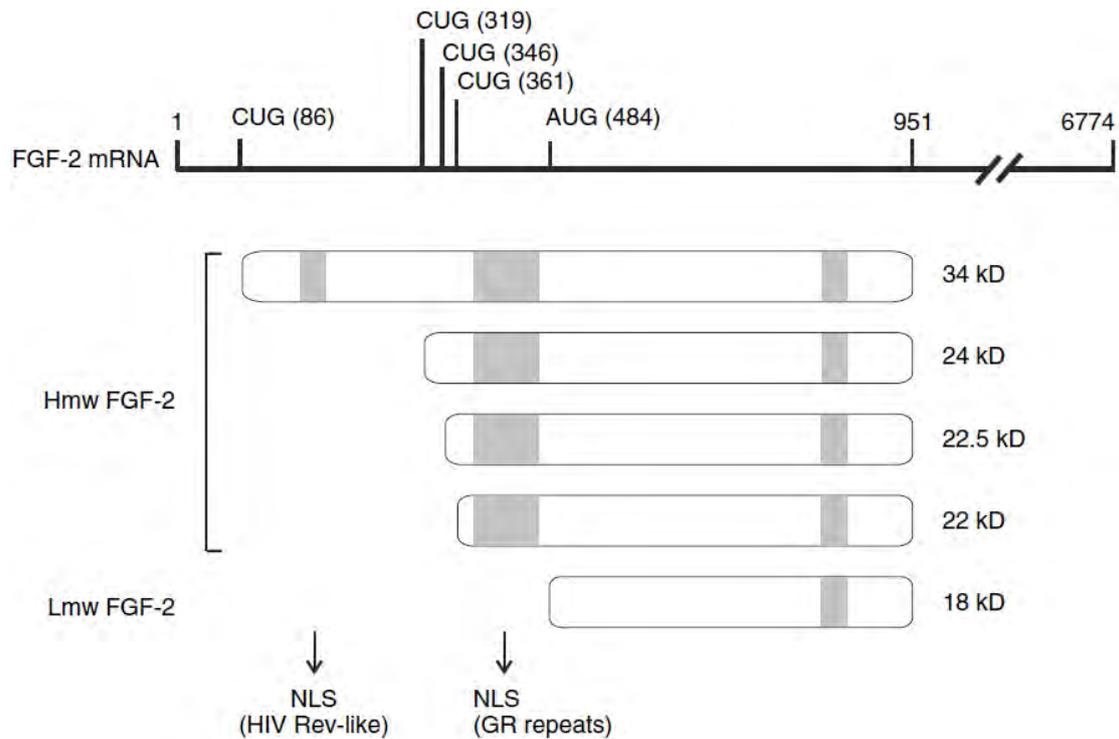


Figura 14 | Isoformas humanas del FGF2. El codón convencional AUG es el sitio de inicio de traducción para el FGF2 de 18 KD. Las 4 isoformas de alto peso molecular son iniciadas en codones CUG. Las isoformas de alto peso contienen en su extensión N-terminal una secuencia de localización nuclear (NLS). La isoforma de 34 KD presenta una secuencia NLS adicional en la región N-terminal. Todas las isoformas presentan una NLS C-terminal (Tomada de Sørensen et al. (2006). Functional diversity of FGF2 isoforms by intracellular sorting).

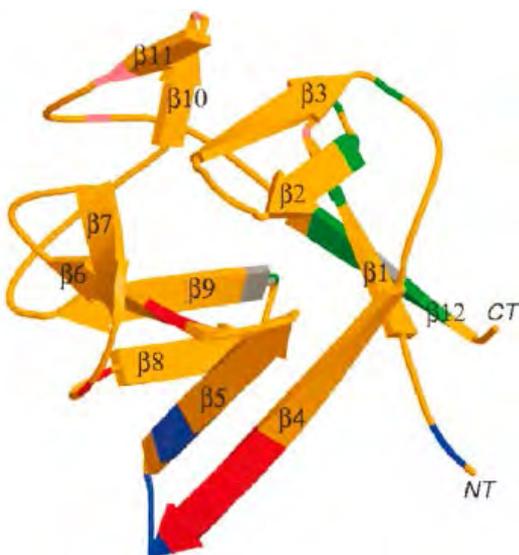


Figura 15 | Estructura tridimensional del FGF2. La región de unión a heparina (color rosa) incluye el 'loop' entre las hojas beta 1 y 2, y zonas de las hojas beta 10 y 11. Los residuos que contactan con FGFR se muestran en verde. (Tomada de Ornitz and Itoh (2001). Fibroblast Growth Factors).

El FGF2 de 18 KD es liberado de las células a través de un mecanismo de secreción de tipo exocitosis, que requiere ATP y es independiente del sistema retículo endoplásmico – Golgi. De esta manera, esta isoforma es predominantemente encontrada en el citosol pero también puede encontrarse asociada con heparán sulfato proteoglicanos en la matriz extracelular. Además, una fracción del FGF2 de bajo peso molecular exógeno y endógeno puede alcanzar el núcleo unido a los FGFR de superficie celular que son internalizados. Por su parte, los FGF2 de alto peso molecular, aunque pueden estar presentes en el citosol y además ser liberados por las células, se localizan predominantemente en el núcleo como consecuencia de la presencia de *secuencias de localización nuclear* en su extensión N-terminal [Yu et al., 2007]. Diversos motivos en la estructura de las diferentes isoformas de FGF2 contribuyen a su localización nuclear. Las formas de alto peso molecular poseen extensiones N-terminal que contienen repeticiones Glu/Arg que actúan como secuencia de localización nuclear para FGF2 y pueden también mediar localización nuclear cuando se fusionan con otras proteínas. Se ha observado que la translocación al núcleo de estas isoformas está acompañada por metilación de algunos residuos de arginina en la región de extensión N-terminal. En cuanto al FGF2 de 18 KD, se ha encontrado que contiene una secuencia de localización nuclear en su extremo C-terminal.

Actualmente se conoce poco acerca de las funciones de los FGF2 de localización nuclear. Lo cierto es que se han identificado funciones celulares diferentes y parcialmente antagónicas reguladas por las isoformas de alto y bajo peso molecular. Las diversas formas de FGF2 son distribuidas diferencialmente en la célula y su localización subcelular resulta ser uno de los determinantes de su actividad biológica [Sørensen et al., 2006]. Además, el FGF2 intracelular específicamente interactúa con diferentes proteínas nucleares posibilitando su potencial participación en múltiples regulaciones nucleares. Dependiendo del respectivo dominio de unión a FGF2 involucrado, las interacciones pueden ser específicas de isoforma o incluir todas ellas. En resumen, la distribución de las isoformas del FGF2 dentro de la célula, la unión a proteínas y la participación en procesos celulares varían en función de la longitud de las extensiones N-terminal [Förthmann et al., 2015].

7.8 MECANISMO DE SECRECIÓN DEL FGF2.

La gran mayoría de las proteínas secretadas por las células eucariotas utilizan la *vía secretoria mediada por el retículo endoplásmico (RE)/Golgi*. Este mecanismo depende de una *secuencia señal* de la proteína, que posibilita su translocación al lumen del RE, seguido por un transporte vesicular a través del complejo de Golgi y de allí a la superficie celular. Sin embargo diversas proteínas carecen de una secuencia

señal y son entonces secretadas por alguna de las diversas vías no convencionales de secreción de proteínas [Nickel W., 2007].

El FGF2 carece de una secuencia señal y por tanto es liberado por un mecanismo exocítico dependiente de energía, sin la participación de intermediarios vesiculares. Este proceso es desencadenado por la unión del FGF2 citoplasmático al fosfatidil-inositol bifosfato de la cara interna de la membrana plasmática, que induce la formación de oligómeros de FGF2 fosforilados y su inserción en la membrana, con la formación transitoria de un poro lipídico y posterior atrapamiento extracelular del FGF2 por parte de heparán sulfato proteoglicano [Rabouille et al. 2012] (Fig. 16).

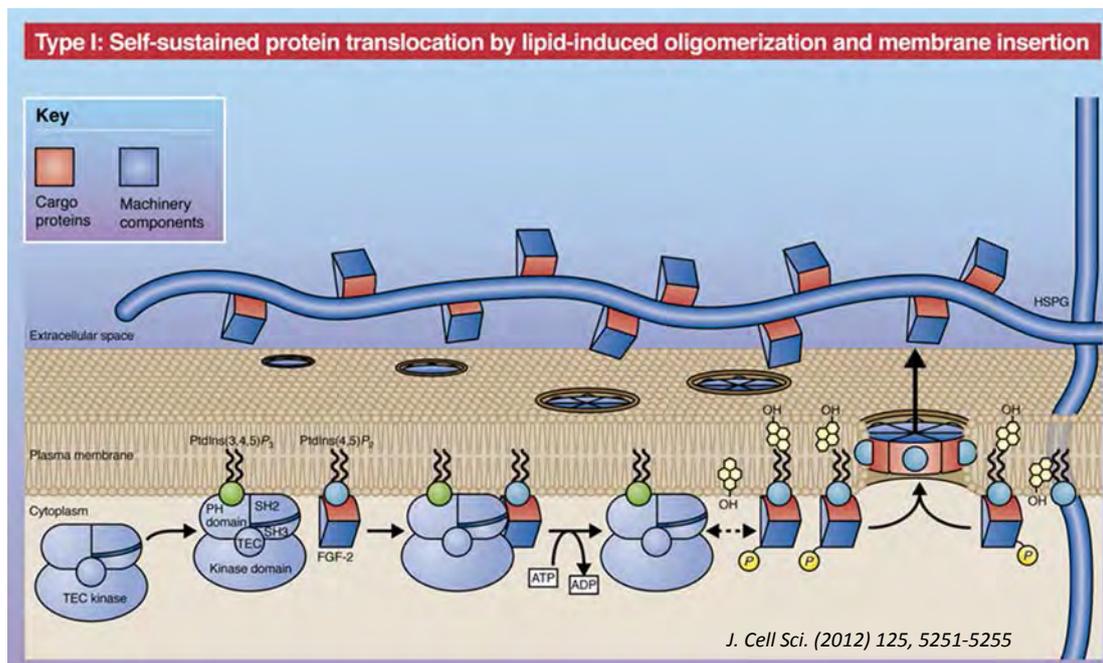


Figura 16 | Sistema de secreción no convencional del FGF2. (Tomada de Rabouille et al. (2012). Diversity in unconventional protein secretion).

7.9 HEPARÁN SULFATO PROTEOGLICANOS Y SU REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS FGFs.

Los FGFs paracrinos, es decir, los secretados al espacio extracelular poseen en su estructura un *sitio de unión a la heparina y moléculas similares a la heparina* que son necesarias para la interacción estable con los FGFRs y una adecuada señalización. Los modelos que se han sugerido para esta interacción han surgido principalmente del estudio de la participación del heparán sulfato (HS) como estabilizador en la activación del FGFR por parte del FGF2.

El HS independientemente puede interactuar tanto con los FGFs como con los FGFRs y se ha propuesto que incrementa cooperativamente la afinidad de un dímero 1:1 FGF-FGFR al unirse a una hendidura formada entre el sitio de unión del HS en el

FGF y la región N-terminal del dominio tipo inmunoglobulina II. Este complejo 1:1:1 FGF-HS-FGFR conduce a cambios conformacionales que estabilizan un dímero simétrico 2:2:2. La dimerización dirige entonces la activación del dominio quinasa y sus respectivas vías de señalización intracelular.

El HS es un tipo de glicosaminoglicano que consiste en una larga cadena lineal de carbohidrato formada por repeticiones de los disacáridos sulfatados ácido glucurónico unido a N-acetilglucosamina. Los HSPGs están compuestos de un núcleo proteico específico al cual se unen covalentemente cadenas de HS. Estos HSPGs, de acuerdo a la estructura de su núcleo proteico pueden estar en la superficie celular en condición de proteínas transmembrana (sindecanos), como proteínas de superficie celular ancladas a glicerofosfatidilinosítidos (glipicanos) o como proteínas secretadas hacia la ECM (perlecán y agrina) [Häcker et al., 2005]. Los HSPGs que se hallan asociados a la membrana pueden ocasionalmente transformarse en difusibles si son liberados por proteasas o heparinasas [Matsuo and Kimura-Yoshida, 2013].

Los HSPGs han sido implicados en tejidos adultos y durante el desarrollo como reguladores de la distribución de ligandos FGFs en la ECM y como reguladores de la activación de la señalización por FGF en la superficie celular. Por ejemplo, mediante el análisis en embriones de roedores con mutaciones que afectan la síntesis de HS (mutación *Ext 1* o *Ext 2*), se ha observado que las cadenas de HS de superficie celular expresadas durante el desarrollo embrionario temprano, formando parte del sindecano-1, son importantes para regular la recepción de la actividad señalizadora del FGF al asegurar una retención local de ligandos FGF y contribuir a la activación del receptor [Shimokawa et al., 2011], demostrando además que la liberación proteolítica de cadenas HS puede propagar la señalización FGF a células adyacentes en una corta distancia. Otro estudio evaluó el efecto proliferativo sobre células precursoras mesenquimales humanas (hMSCs) al utilizar una matriz anclada covalente y no covalentemente a HS como plataforma de liberación de FGF2 solo o en complejo con HS, de tal manera que la liberación del complejo HS/FGF2 ocasionó un efecto proliferativo significativamente mayor sobre las hMSCs en comparación con el FGF2 liberado solo [Calarco et al., 2010]. Se ha propuesto que el HS, como un componente de la ECM, también actúa secuestrando FGFs y modulando su difusión a través del tejido, originando un gradiente. El HSPG secretado a la matriz, perlecán, ha sido identificado en el nicho neurogénico adulto de la V-SVZ formando parte de la membrana basal en las paredes de los vasos sanguíneos y en los fractones [Kerever et al., 2007]. Se ha demostrado que las NPCs expresan perlecán y que este es necesario en este nicho para la activación por parte del FGF2, de algunas vías de señalización relacionadas con la progresión del ciclo celular [Kerever et al., 2014]. Estos investigadores encontraron también que la deficiencia de perlecán (ratones *Hspg-/Tg*) ocasiona una significativa disminución en el número de NPCs quiescentes y

activadas, así como una disminución en el número de nuevas neuronas que se integran en el bulbo olfatorio. También se ha mostrado que la administración de FGF2 en ratones recién nacidos, a través de la cisterna magna, incrementó a las 48 horas la producción de perlecán a nivel cortical y la proliferación de precursores que expresan marcadores neuronales, así como un aumento en el grosor de la corteza cerebral, mientras que la infusión de anticuerpo anti-FGF2 logró el efecto opuesto [Mashayekhi et al., 2011]. Un efecto de sobreexpresión de glipicano-6 en tejido cerebral fue obtenido por otros investigadores en experimentos similares de inyección de FGF2 en la cisterna magna de ratones recién nacidos [Salehi Z., 2009].

7.10 FGF2 Y REGULACIÓN DE LAS NPCs DEL CEREBRO ADULTO.

Al igual que ocurre con las NPCs embrionarias, numerosos estudios *in vitro* han demostrado una intensa capacidad del FGF2 para estimular la proliferación de los NPCs del cerebro adulto [Whittemore et al., 1999; Maric et al., 2007; Galderisi et al., 2013]. Este hecho refleja la implicación que tiene el FGF2 *in vivo* en la actividad del nicho neurogénico del adulto como lo sugieren las observaciones que se han descrito para el ratón adulto deficiente en FGF2 y otras aproximaciones experimentales.

Además de las alteraciones del desarrollo que se habían descrito previamente de la corteza del ratón FGF2^{-/-}, Zheng et al. (2004) encontraron que este knock-out presenta una reducción cercana al 50%, de la proliferación de NPCs en la V-SVZ anterior (sin modificaciones en la longitud del ciclo celular). Según estos investigadores, dichos ratones tienen además bulbos olfatorios más pequeños debido a una disminución en la producción de nuevas neuronas en esta zona. Otros estudios con ratones FGF2 KO que han centrado su atención en el nicho neurogénico del hipocampo sugieren que la deficiencia de FGF2 en el giro dentado adulto no disminuye la proliferación de progenitores pero afecta la diferenciación de nuevas neuronas, efecto que no pudo ser revertido con la administración de FGF2 exógeno [Werner et al., 2011].

Frinchi et al. (2008) examinaron en la V-SVZ de rata mediante hibridación *in situ*, la expresión de mRNA de FGF2 y de sus receptores más importantes, en combinación con estudios de proliferación con BrdU. De esta manera hallaron que tanto el mRNA FGF2 como el mRNA FGFR1 (su principal receptor) son expresados en los NPCs de la V-SVZ; sin embargo, solo se observó marcaje positivo para BrdU acompañando a las células que expresaron mRNA FGFR1, lo cual sugiere que en la V-SVZ las células en proliferación expresan FGFR1, respondiendo al FGF2 liberado por una población específica que no prolifera.

Diversos estudios han mostrado que la lesión del tejido cerebral postnatal estimula la proliferación celular dentro de los nichos neurogénicos y estas nuevas

células pueden diferenciarse a neuronas capaces de integrarse en circuitos neuronales existentes [Sun et al., 2005, 2007]. Sin embargo, la corteza postnatal tiene una habilidad limitada para regenerar tejido neural tras una lesión cerebral. Una de las razones para esta limitada capacidad regenerativa del SNC es la falta de una población local suficiente de NPCs que responda a las señales provenientes del tejido dañado. Por lo tanto se ha intentado proporcionarlas mediante trasplante (Terapias basadas en células progenitoras); sin embargo, la eficiencia de esta estrategia para reemplazo neuronal sigue siendo muy limitada pues después de su implantación, estos precursores pierden su fenotipo indiferenciado y proliferativo, generando células gliales diferenciadas. Por esta razón se ha optado por desarrollar estrategias que mejoren la capacidad de las células precursoras residentes o de las células injertadas en el cerebro postnatal, para generar 'pools' de células multipotenciales, proliferativas y migratorias capaces de participar en la reparación estructural posterior al daño cerebral.

Se ha descrito un fenómeno de reclutamiento de NPCs así como neurogénesis cortical compensatoria después de una degeneración apoptótica inducida [Magavi et al., 2000]. Agasse et al. (2007) demostraron que el tratamiento de explantes de corteza con agentes inductores de la apoptosis incrementa la liberación de FGF2 y que esta molécula, presente en el medio de cultivo condicionado derivado de estos experimentos, es la responsable de mejorar la proliferación en cultivos celulares de SVZ, aunque el estímulo de la diferenciación neuronal que fue observado, pareció depender de la liberación de otros factores por parte de la corteza apoptótica.

Ya se ha demostrado *in vivo* la activación de la proliferación de NPCs de la V-SVZ, mediante la inyección intraventricular de FGF2 en roedores normales [Douet et al., 2013]. Sun et al. (2009) indagaron si la infusión intraventricular de FGF2 tras una lesión traumática del cerebro en roedores, podría estimular los niveles de neurogénesis inducida por daño en la V-SVZ y DG, encontrando que se mejoró significativamente la proliferación celular en ambos nichos una semana después de la lesión traumática y que un gran número de estas células sobrevivieron a las 4 semanas con una diferenciación mayoritaria hacia neuronas; además los animales tratados con FGF2 mostraron una mayor recuperación cognitiva.

Otro estudio investigó el efecto *in vivo* del FGF2 en la proliferación y diferenciación de los NPCs después de isquemia cerebral en ratas neonatales, encontrando que el número de NPCs en proliferación en la V-SVZ de ratas tratadas con FGF2 fue significativamente mayor y además estimuló la diferenciación hacia neuronas, astrocitos y oligodendrocitos [Jin-qiao et al., 2009]. Por su parte, Monfils et al. (2006) administraron FGF2 por vía subcutánea durante una semana a ratas neonatales con lesiones bilaterales de la corteza motora, hallando que en la etapa

adulta, el grupo tratado con FGF2 exhibió un menor deterioro para el desempeño de tareas de habilidad motora y además, en las ratas lesionadas que recibieron FGF2 la lesión cavitaria inicial se rellenó de tejido, mientras que en las ratas control persistió una cavidad prominente. En ratas adultas, la administración intranasal de FGF2 durante 6 días consecutivos después de una isquemia cerebral transitoria por oclusión/reperfusión de la arteria cerebral media se asoció a una mayor proliferación de NPCs en la V-SVZ y zona subgranular del DG ipsilaterales, pudiendo estas nuevas células generar neuronas 28 días después de la isquemia; aunque esta intervención no afecta al tamaño del infarto, estuvo asociada a una mejor recuperación en el comportamiento con respecto a los animales control [Wang et al., 2008].

Dayer et al. (2007), investigaron si la sobreexpresión de FGF2 en NPCs del adulto les otorgaba a estas células mayor capacidad para la reparación en la corteza cerebral de rata, encontrando evidencias de que la sobreexpresión de FGF2 significativamente mejora no solo la actividad proliferativa sino también la capacidad migratoria de las NPCs en estructuras 3D complejas, tales como secciones corticales. Estas propiedades se mantienen cuando estas células son trasplantadas a un nicho neurogénico como la V-SVZ, dando origen a una mayor cantidad de interneuronas en el bulbo olfatorio, sin alterar su potencial de diferenciación. Además, cuando estas NPCs que sobreexpresan FGF2 son trasplantadas a la corteza isquémica neonatal, invaden eficientemente la corteza lesionada y generan un grupo más numeroso de neuronas inmaduras disponibles para reparación cerebral en comparación con NPCs no transfectadas. En un estudio posterior se estudió si la sobreexpresión de FGF2 en NPCs trasplantadas podría mejorar su integración en el tejido huésped, observándose que se promueve la asociación de las NPCs trasplantadas con los vasos sanguíneos, de tal manera que el microambiente perivascular mantiene estas células en un estado indiferenciado y proliferativo en condiciones fisiológicas [Jenny et al., 2009]. Además, se observó que estas agrupaciones neurovasculares de NPCs pueden generar neuronas inmaduras en un medio ambiente isquémico, sugiriendo que podrían asumir la función de un nicho neurovascular ectópico. Otro estudio que incluye un abordaje experimental con manipulación genética de las NPCs demostró que es posible mejorar la supervivencia de NPCs humanas en el cerebro adulto de roedores al co-trasplantarlas con NPCs ayudadoras secretoras de FGF2 bajo el control de doxiciclina [Liang et al., 2013].

7.11 CONSIDERACIONES ACERCA DEL FENOTIPO FGF2 -/-.

Entre las anomalías descritas para los ratones FGF2 KO se incluyen defectos en la citoarquitectura de la corteza cerebral y una disminución en el número de neuronas corticales (ya comentados antes), una prolongación en el tiempo de curación de las heridas en piel y dificultades para la correcta regulación de la presión

arterial [Dono et al., 1998; Ortega et al., 1998]. Sin embargo, los ratones FGF2 KO son viables, sobreviven hasta la adultez y 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, si se tiene en cuenta su amplísima localización y la gran diversidad de actividades que se le ha atribuido. De hecho, el FGF2 se ha detectado en la mayoría de los tejidos embrionarios y adultos de los mamíferos. En el neuroepitelio de ratón, se ha descrito su presencia a partir del estadio E9.5 [Nurcombe et al., 1993]. 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. Miller et al. (2000) indagaron la posible compensación ejercida por el FGF1, mediante la valoración de ratones doble knock-out para FGF1 y FGF2; no obstante, los defectos observados resultaron muy similares a aquellos hallados en el ratón mutante únicamente para FGF2. Esto sugiere que la compensación por FGF1 no explica la limitación de los defectos fenotípicos asociados con la ausencia de FGF2, y que podría suceder que otros FGFs compensen la ausencia de ambos factores en el ratón doble knock-out FGF1-FGF2. De este modo, habría 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 ejercerían solo funciones limitadas durante el desarrollo y los procesos fisiológicos del adulto normal, adquiriendo una mayor importancia en contextos que implican daño o estrés, de manera que estudiando al ratón en el estado patológico apropiado se harían evidentes las diferencias entre el WT y los knock-out [Miller et al., 2000].

8. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS.

Por lo anteriormente expuesto, el FGF2 es el principal candidato para la activación y regulación de la actividad proliferativa de las NPCs embrionarias. Existen además evidencias de que en el nicho neurogénico del adulto, el FGF2 está implicado en el control proliferativo de las NPCs y en la neurogénesis. No obstante, una marcada intensidad de este estímulo mitogénico en el cerebro embrionario y su disminución en el cerebro adulto de los mamíferos, podría explicar en parte, la dificultad de los procesos neurorregenerativos en el adulto y es un obstáculo para el uso de los precursores neurales como terapia neurorregenerativa. Estas consideraciones avalan el interés en estudiar a profundidad la presencia, origen, regulación y actividad del FGF2 en un modelo animal próximo a la especie humana, que nos permita el conocimiento de la regulación y expansión de la población de precursores neurales en el embrión y su posible aplicación en el diseño de estrategias dirigidas al control de la población de precursores neurales en el cerebro de mamíferos adultos. Asimismo, la identificación durante el desarrollo embrionario del patrón de expresión temporo-espacial para el FGF2 y su principal receptor, el FGFR1, resulta indispensable para construir una hipótesis acerca de cómo el FGF2 ejerce *in vivo* su actividad de regulación de las NPCs del nicho embrionario.

8.1 HIPÓTESIS.

El eCSF es un elemento fundamental durante el desarrollo, actuando como portador y distribuidor, a través del nicho neurogénico embrionario, de señales reguladoras de la actividad mitogénica de las NPCs y permitiendo por tanto su mantenimiento y expansión.

8.2 OBJETIVO GENERAL.

Se determinará si el FGF2 es esencial para una correcta expansión de la población de NPCs durante el desarrollo embrionario del cerebro de ratón y si este factor ejerce su acción mitogénica actuando principalmente a través del eCSF.

8.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Se comprobará la presencia de FGF2 en el eCSF de ratón.
2. Se confirmará la presencia de FGF2 en la pared del esbozo cerebral de ratón y se determinará su patrón de expresión espacio-temporal mediante técnicas inmunohistoquímicas.
3. Se evaluará por inmunohistoquímica la expresión de FGFR1 en el cerebro embrionario de ratón y su patrón espacio-temporal.
4. Se evaluará el efecto *in vitro* del bloqueo del FGF2 presente en el eCSF sobre la proliferación y diferenciación neurogénica de NPCs de neuroepitelio de ratón.
5. Se valorará en un modelo de pérdida de función *in vivo*, el efecto de la deficiencia de FGF2 sobre la proliferación de las NPCs del nicho neurogénico embrionario de roedores, en fases tempranas del desarrollo cerebral.
6. Se determinará la posible repercusión *in vivo*, de la deficiencia de FGF2, sobre la neurogénesis en fases tempranas del desarrollo cerebral de roedores.
7. Se determinará si la ausencia de FGF2 en roedores adultos afecta los niveles de proliferación en el nicho neurogénico de la V-SVZ.
8. Se evaluará mediante inmunohistoquímica la expresión de FGF2 en el nicho neurogénico de la V-SVZ del cerebro adulto de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

1.1 RATONES FGF2 KNOCKOUT Y WILD-TYPE.

Los ratones para el alelo mutante FGF2^{tm1Doe} fueron adquiridos en “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 FGF2, incluyendo 121 pb de la región promotora proximal y el exón 1 completo, utilizando un minigen Hprt. Esta estrategia remueve los primeros 59 aminoácidos, los cuales se ha demostrado participan en la actividad mitogénica y en la unión a la heparina y al receptor. El constructo diseñado fue electroporado en líneas celulares embrionarias que fueron luego inyectadas en blastocistos derivados de C57BL/6 [Zhou et al., 1998]. Análisis de northern blot de embriones en estadio E13.5 no lograron detectar secuencias de mRNA que incluyeran los exones 2 y 3 en ratones homocigóticos para la mutación. Análisis de western blot de tejido cerebral de ratones mutantes homocigóticos demostraron que la proteína está ausente [Zhou et al., 1998]. Como animales control fueron usados los ratones con fenotipo salvaje de la colonia (*wild-type*).

1.2 MANTENIMIENTO DE RATONES, CRUCES Y VERIFICACIÓN DE LA GRAVIDEZ.

El manejo, anestesia y sacrificio de los ratones se efectuó respetando la normativa vigente en España, relativa a la protección del bienestar de los animales de experimentación (Ley 32/2007, de 7 de noviembre).

Los ratones empleados en los experimentos se ubicaron 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.

Los ratones son animales de actividad predominantemente nocturna y el celo se produce generalmente hacia la medianoche. En el sistema que se empleó para 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 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 originando un “tapón vaginal”, evidente a simple vista, que persiste unas 8 horas en promedio. Este tapón se forma por una combinación de secreciones de las glándulas sexuales del macho y secreciones vaginales. Las hembras positivas para el hallazgo del tapón se consideraron preñadas y se separaron, registrando como hora de inicio del

desarrollo embrionario las 0 horas de la noche anterior. El estadio gestacional se expresó en días *post coitum* (p.c.) desde aquel momento.

1.3 GENOTIPAJE DE RATONES TRANSGÉNICOS.

Inicialmente se decidió expandir la colonia de ratones mediante cruces sucesivos. Se realizó luego un genotipaje de los ratones obtenidos a partir de cruces (+/-) x (+/-).

1.3.1 Aislamiento de DNA a partir de cola de ratón.

El aislamiento del DNA de los animales de experimentación se llevó a cabo por el método de extracción fenol-cloroformo-isoamil que utiliza el principio de separación de mezclas de moléculas basado en la solubilidad diferencial de moléculas individuales en dos líquidos inmiscibles diferentes y que permite obtener un DNA libre de proteínas.

Brevemente el protocolo consistió en obtener muestras ≤ 0.5 cm de cola del ratón de cada espécimen a genotipar, las cuales se depositaron individualmente en tubos *ependorf* tomando las precauciones necesarias para evitar contaminaciones cruzadas con otras muestras. Se añadió 700 μ l/tubo de la solución *tail buffer* (ver composición en la **tabla 1**) + 1.5 μ l de proteinasa k/tubo (Promega, V302B) y se incubó toda la noche a 55 °C – 800 rpm. Se añadió entonces 700 μ l de la mezcla fenol saturado/cloroformo/alcohol isoamílico (proporción 25:24:1), se mezcló a 600 rpm durante 10 minutos y luego se centrifugó 10 minutos a 13200 rpm. Se extrajo la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo. Se añadió 800 μ l de isopropanol (precipita el DNA) y se mezcló durante 2 minutos (37 °C y 800 rpm). Se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet. Se procedió a lavar con 1 mL de etanol 70% invirtiendo el tubo repetidamente y luego se desechó completamente el sobrenadante, conservando el pellet de DNA. Se permitió la completa evaporación del etanol a temperatura ambiente (normalmente < 1 hora fue suficiente) y luego se resuspendió en 100 μ l de H₂O para PCR (Sigma-Aldrich). Finalmente se incubó durante 15 minutos a 65 °C y a 300 rpm para lograr una adecuada resuspensión del DNA. Después de esto las muestras ya estuvieron preparadas para PCR y fueron almacenadas a -20 °C.

	Concentración final	Para 50 mL
1M Tris pH 8.0	10mM	0.5ml
5M NaCl	100mM	1ml
0.5M EDTA pH 8.0	10mM	1ml
10% SDS	0.5%	2.5ml
dH ₂ O		hasta 50ml

Tabla 1 | Tail Lysis Buffer

1.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El genotipo de cada ratón fue determinado por PCR de acuerdo al protocolo proporcionado por “The Jackson Laboratory”. Para cada tipo de PCR se incluyó un control positivo de DNA de un ratón con genotipo conocido (+/-).

Primer	5' Label	Sequence 5' --> 3'	3' Label	Primer Type
oIMR0775	-	CAA AGA ACT TAT AGC CCC CC	-	Mutant Forward
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 MgCl2	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 se lleva a cabo la reacción para mutFGF2 o wtFGF2

Resultados esperados:

Mutante = ~ 200 pb
 Heterocigoto = ~ 185 pb y ~200 pb
 Silvestre = ~ 185 pb

1.3.3 Electroforesis de DNA en gel de agarosa.

Luego de la reacción se procedió a una separación de los productos por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Agarose D1 low EEO, Pronadisa) en búfer Tris Borato-EDTA (tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM) + 0.01% GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium), este último como marcador fluorescente de ácidos nucleicos. En cada pocillo se cargó siempre 12 µL de muestra de productos de PCR + 3 µL de BlueOrange 6X Loading Dye (Promega). Para determinar la longitud de los fragmentos generados por la reacción de PCR, se cargó en cada electroforesis un estándar 100 bp DNA Ladder (Promega, G2101). Se utilizó un lector de geles UVITEC Cambridge para la obtención de las imágenes y un programa informático (Essential V2 UVITEC) para su procesamiento y análisis (Fig. 17).

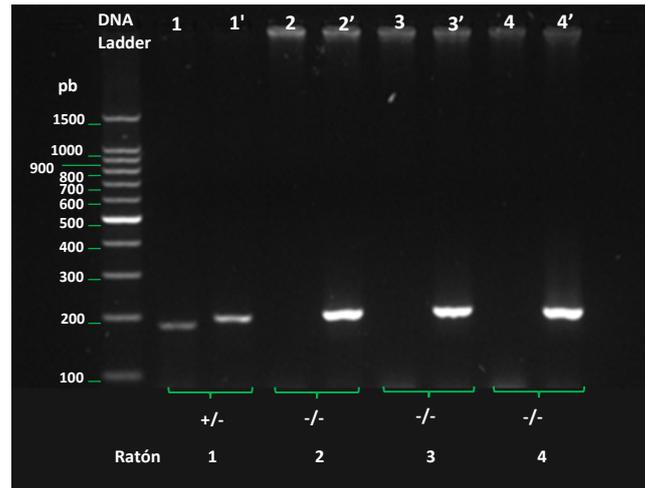


Figura 17 | Electroforesis en gel de agarosa (2%) de productos de reacción de PCR. En la primera columna se cargaron estándares de peso molecular. Las demás columnas corresponden a los productos de reacción de PCR *wt* y *FGF2 mut* de 4 muestras diferentes de DNA de ratón: 1,2,3,4 para PCR *wt*, y 1',2',3',4' para PCR *mut*. De esta manera el ratón 1 resultó ser heterocigoto para la mutación, mientras que los ratones 2, 3 y 4 presentan un genotipo *FGF2 -/-*. Las bandas de 185 pb corresponden a la amplificación del gen *wt*, mientras que el producto de 200 pb es una amplificación del gen mutante.

1.4 INYECCIÓN INTRAPERITONEAL DE BROMODEOXIURIDINA.

Tres horas antes de llevar a cabo el procedimiento de extracción de los embriones, las hembras preñadas recibieron una inyección intraperitoneal de bromodeoxiuridina (BrdU, Sigma) a una dosis de 50 $\mu\text{g/g}$ de peso. La BrdU es un análogo de la timidina que luego de ser administrado a la madre, pasa al embrión y es selectivamente incorporado al DNA celular en la fase S del ciclo, por tanto su inmunodetección hace posible identificar las células en fase de proliferación celular. El tiempo de exposición a la BrdU se estimó apoyados en los estudios disponibles de cerebro en desarrollo [Dono et al., 1998; Raballo et al., 2000] y mediante un rastreo previo en el que evaluamos los resultados de la inmunohistoquímica a-BrdU para diferentes tiempos de exposición. Para la inyección intraperitoneal se utilizó una jeringa con aguja N° 25.



Figura 18 | Inyección intraperitoneal de BrdU. El ratón es inmovilizado durante el procedimiento mediante una sujeción por el dorso; su cabeza debe estar ligeramente hacia abajo mientras se presenta la cara ventral hacia el operador. La inyección se aplica en el cuadrante inferior izquierdo, como es observado por el operador. 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. (Tomada de Procedures With Care Website. Newcastle University. <http://www.procedureswithcare.org.uk/intraperitoneal-injection-in-the-mouse/>).

2. EXTRACCIÓN DE LOS EMBRIONES.

Cumplida la edad gestacional de interés, se procedió a la extracción los embriones. Inicialmente se anestesió a la hembra preñada mediante la administración intraperitoneal de hidrocloreuro de xilacina (Rompun® - Bayer) + clorhidrato de ketamina (Imalgène – Merial), verificando relajación muscular, inconsciencia y pérdida de mecanismos reflejos.

Se efectuó entonces una laparotomía ventral media con el fin de localizar el útero bicorne. Se comprobó 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 separó el útero de la vagina y el peritoneo, y se depositó en una placa de Petri con solución de Ringer (NaCl 120 mM, KCl 5.36 mM, CaCl₂ 1.63 mM pH 7.3) (**Fig. 19**). La madre fue entonces sacrificada por dislocación cervical.

Mediante microdissección bajo estereoscopio, se retiró sucesivamente de cada engrosamiento uterino la capa serosa, muscular y mucosa obteniendo los embriones envueltos en las membranas vitelina y amniótica las cuales fueron entonces rasgadas cuidadosamente. Finalmente para cada embrión se escindió la unión vascular al cono ectoplacentario. 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 \(1981\)](#).

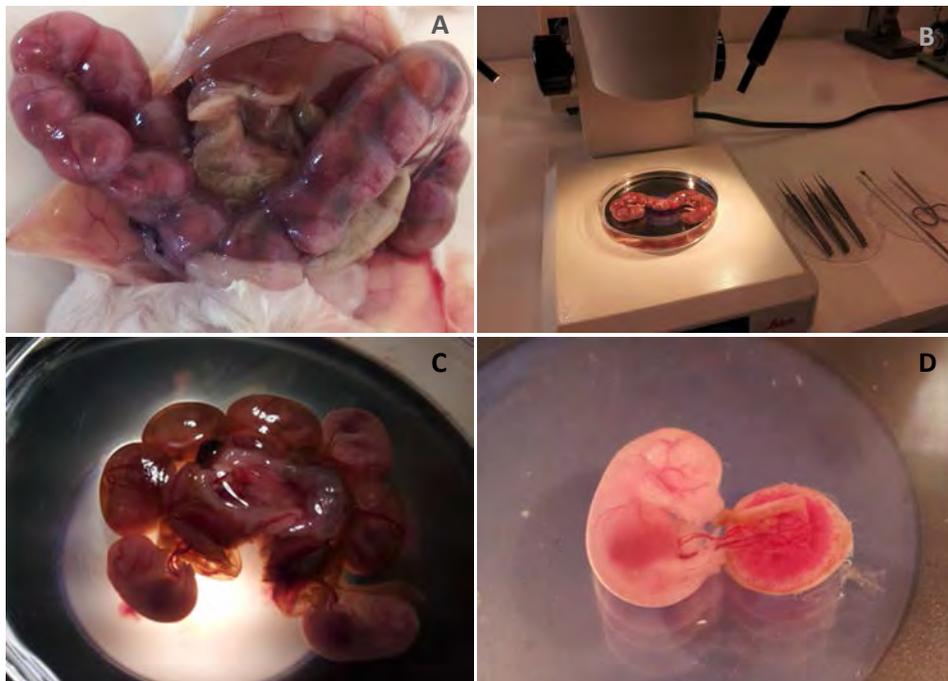


Figura 19 | Extracción de embriones de ratón. En la imagen (A) se aprecia el útero bicorne, grávido; cada engrosamiento corresponde a un embrión. Mediante microdissección (B,C) se individualiza cada embrión. En (D) se observa un embrión de ratón en un estadio aproximado de E13.5, libre de membranas extraembrionarias y con su unión vascular al cono ectoplacentario intacta.

3. EXTRACCIÓN DE FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO (eCSF).

Luego de ser removidos del útero y liberados completamente de sus membranas extraembrionarias, los embriones de ratón fueron lavados suficientemente en solución de Ringer y luego trasladados individualmente a una placa de Petri seca para la extracción del eCSF. Para la obtención de este fluido fueron biselados capilares de borosilicato hasta obtener una punta permeable con un diámetro de 50-60 μm . El procedimiento de extracción de fluido fue llevado a cabo bajo microscopio de disección y guiado por un micromanipulador (Leitz) acoplado a un equipo de microinyección (PLI-100 pico-injector, Harvard Apparatus) (Fig. 20).

Se procedió a la microaspiración directa de la cavidad ventricular accediendo a través de la región dorsal de la vesícula rombencefálica (techo del rombencéfalo \rightarrow cuarto ventrículo), pues se trata de una zona adelgazada, con el menor grosor de tejido de todo el tubo neural, lo que minimiza las posibilidades de contaminación de la muestra con células o restos de tejido. El eCSF fue aspirado cuidadosamente a intervalos cortos de tiempo para evitar el colapso súbito de la cavidad y permitir, entre las pausas, el flujo de eCSF hacia la vesícula rombencefálica proveniente de las demás cavidades que en estadios tempranos están ampliamente interconectadas.

La muestra obtenida se mantuvo a 4 $^{\circ}\text{C}$ mientras duró el procedimiento. Posteriormente fue almacenada a -40 $^{\circ}\text{C}$.

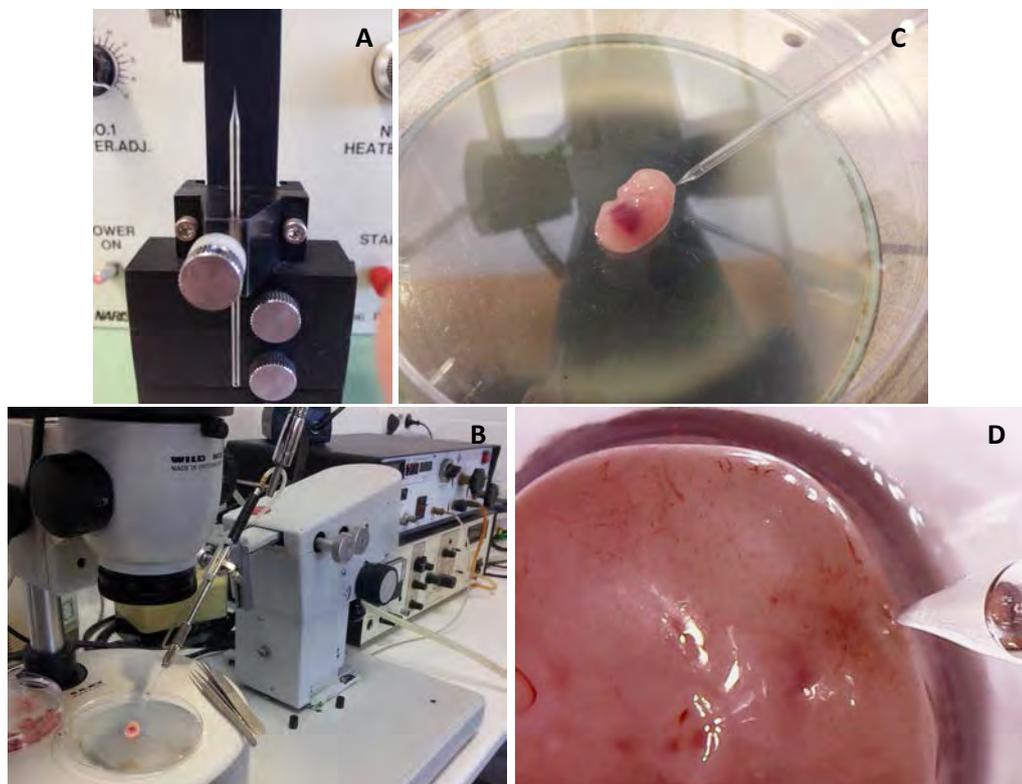


Figura 20 | Extracción de eCSF de ratón. (A) Capilares biselados para microinyección/microaspiración; (B) Equipo de micromanipulación/microinyección; (C,D) Aspiración de eCSF de un embrión de ratón en estadio E13.5.

4. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LOS EMBRIONES.

4.1 PROTOCOLO DE FIJACIÓN, DESHIDRATACIÓN E INCLUSIÓN EN BLOQUES DE PARAFINA.

4.1.1 Fijación de los embriones.

Una vez obtenidos todos los embriones, estos fueron depositados en una placa de vidrio con la solución fijadora Carnoy (70% etanol absoluto, 30% triclorometano estabilizado con etanol, 10% ácido acético glacial) a temperatura ambiente y en agitación suave. El tiempo de fijación utilizado varió entre 30 – 90 minutos, de acuerdo al estadio de los embriones procesados.

4.1.2 Deshidratación de los embriones.

Se retiró el Carnoy de la placa de vidrio y se efectuó una inclusión en etanol al 96% durante 30 – 60 minutos según el estadio, seguida de dos inclusiones en etanol 100%, cada una de 30 – 45 minutos de duración.

4.1.3 Transparentación de los embriones.

Después de la deshidratación, los embriones fueron sumergidos en un agente aclarante (xileno), con un cambio de este y un tiempo de incubación variable de acuerdo al tamaño del embrión (primera inmersión: 10-15 minutos aprox., segunda inmersión: 5-10 minutos aprox.) con el fin de conseguir una adecuada transparentación. Con el xileno se busca además lograr un endurecimiento moderado de la muestra y permitir que posteriormente ocurra una adecuada infiltración del tejido por parte de la parafina, pues esta última no es soluble en alcohol.

4.1.4 Impregnación con parafina.

Se retiró completamente el xileno de la placa de vidrio con los embriones y rápidamente se añadió parafina líquida (Paraplast®, Sigma-Aldrich). Se llevó la placa a una estufa a 56-58 °C y se permitió la infiltración del tejido con parafina durante aproximadamente 2.5 - 4 horas de acuerdo al estadio.

4.1.5 Inclusión definitiva de la pieza.

Cada uno de los embriones se incluyó en un molde plástico previamente rellenado con parafina líquida. Una vez inmerso en este medio, bajo estereoscopio y con la ayuda de un punzón de punta roma se le dio la orientación adecuada al embrión para facilitar luego una correcta ejecución de los cortes con el micrótopo, en el plano deseado. Se permitió la completa solidificación de los bloques a temperatura ambiente antes de empezar a cortar con el micrótopo.

4.2 OBTENCIÓN DE SECCIONES HISTOLÓGICAS Y SELECCIÓN DE MUESTRAS.

4.2.1 *Elaboración de cortes histológicos.*

Empleando un micrótomo (Leitz W 1512), se obtuvieron secciones de 8 μm de espesor cortando en el plano transversal para algunos embriones y en el plano sagital para otros. Se recogieron tiras de cortes seriados sobre porta-objetos de vidrio previamente tratados con una solución de 3-aminopropyl Triethoxy Silane (Sigma-Aldrich) en acetona pura, que posibilita la adherencia de las secciones al cristal. Se permitió el secado de las muestras en una estufa a 37 °C durante al menos 12 horas antes de proceder a utilizarlas.

4.2.2 *Selección de muestras.*

Bajo microscopio de luz se seleccionaron para cada estadio del desarrollo y región de interés, las secciones de tejido con las cuales se desarrolló luego el estudio inmunohistoquímico.

5. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y WESTERN-BLOT.

Teniendo en cuenta que obtuvimos un resultado inmunorreactivo para el FGF2 en una prueba preliminar de dot-blot con una gota de fluido cerebroespinal embrionario, se decidió emplear la técnica de western-blot para demostrar la presencia del FGF2 en este fluido. Se estudió eCSF de ratón de los estadios E10.5, E11.5, E12.5, E13.5, E14.5.

5.1 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.

Para las muestras de e-CSF se desarrolló una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). En concordancia con las masas moleculares esperadas para el FGF2, se decidió utilizar geles con concentraciones de poliacrilamida del 12%; sin embargo, también se hicieron pruebas con un tamaño de poro mayor (7.5%), considerando la posibilidad de la unión del factor a moléculas de considerable tamaño; finalmente se concluyó que 12% es la concentración óptima.

Los geles fueron preparados en el laboratorio. La **tabla 2** resume la preparación del gel concentrador y los geles separadores. Antes de proceder a su polimerización, los geles fueron desgasificados mediante sonicación utilizando un procesador ultrasónico UP100H (Hielscher Ultrasound Technology). Luego de la preparación de la mezcla del gel separador, este se vertió entre los dos cristales de electroforesis para proceder a su polimerización; se añadió entonces en su borde superior un volumen suficiente de agua saturada con isobutanol (isobutanol/dH₂O proporción 10:1) para garantizar una superficie homogénea de inicio de la separación. Luego de la polimerización del gel separador, el isobutanol fue retirado, se añadió el gel concentrador e inmediatamente el peine que da forma a los pocillos. Se esperó al

menos 2 horas antes de iniciar la electroforesis con el fin de favorecer una consistente formación del poro y reproducibilidad de los resultados.

	Gel concentrador	Gel separador	Gel separador
	4%	7.5%	12%
30% acrilamida/bis	1.98 mL	3.75 mL	6 mL
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	3.78 mL	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	3.75 mL	3.75 mL
10% SDS	150 µL	150 µL	150 µL
dH₂O	9 mL	7.28 mL	5.03 mL
TEMED	15 µL	7.5 µL	7.5 µL
10% APS	75 µL	75 µL	75 µL
Volumen total	15 mL	15 mL	15 mL

Tabla 2 | Fórmula para geles de poliacrilamida.

El sistema empleado para la separación fue el de búfer discontinuo empleando un Mini-PROTEAN® Tetra handcast system – Biorad y la fuente de poder PowerPac™ HC. El búfer de electroforesis utilizado fue Tris/Tricina/SDS (Biorad, 161-0744). La electroforesis se desarrolló a 0.25 A (constante), 200 v y 200w.

Para la preparación de las muestras se usó el búfer 2x Laemmli (Biorad) + 5% β-mercaptoetanol como agente reductor. Se mezcló siempre 20 µL de búfer muestra con 20 µL de eCSF y se cargó 30-35 µL/pocillo. Antes de ser cargadas en los pocillos, las muestras se mantuvieron a 95° C durante 5 minutos para completar la desnaturalización de las proteínas. En los pocillos de los extremos del gel, así como en los pocillos que se dejaron libres de muestra, se cargó únicamente búfer de muestra. El estándar de pesos moleculares utilizado fue Precision Plus Protein™ Dual Color Standar.

5.2 WESTERN-BLOT.

Antes de realizar el montaje del casete para la transferencia de proteínas, las membranas de nitrocelulosa (0.45 µm, Biorad), los papeles de filtro (blot paper precut, Biorad), el gel de electroforesis y las esponjas fueron impregnados con búfer de transferencia (Tris/Glycine buffer Biorad) durante 20 minutos en agitación. La transferencia se desarrolló a un voltaje constante de 100 v en un tiempo de 2 horas.

Luego de la transferencia se lavó la membrana de nitrocelulosa 2 x 5 min en dH₂O y se procedió al bloqueo durante 40 minutos en TBS (Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) + 3% de leche desnatada (TBS-MLK) + 0.5% BSA en agitación constante. Luego se incubó la membrana con 1.5 µg/mL de anti-FGF2, clone bFM-2 (Millipore) diluido en TBS-MLK a 4 °C, en agitación, durante toda la noche. Posteriormente a la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó 2 x 5 minutos en dH₂O y una vez durante 5 minutos en TBS 0.05% Tween®-20. Se aplicó entonces el anticuerpo

secundario biotinilado (Goat anti-mouse, B6398 Sigma, dilución 1:2500) diluido en TBS-MLK, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación. Se lavó la membrana 2 x 5 minutos en dH₂O y luego 1 x 5 minutos en TBS 0.05% Tween[®]-20. Finalmente se incubó la membrana en extravidina-peroxidasa (Mouse ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit, Sigma, dilución 1:1000) durante 30 minutos. Se lavó dos veces en dH₂O y una vez en TBS. Como sustrato de la peroxidasa se aplicó una solución de Diaminobencidina (1 pastilla disuelta en 20 mL TBS + 20 µL H₂O₂, Sigma). La inmunoreactividad positiva se evidenció aproximadamente dos minutos después, como bandas marrones visibles a simple vista. Finalmente se lavó la membrana de nitrocelulosa en múltiples cambios de dH₂O y se procedió a la adquisición de las imágenes en un lector UVITEC-Cambridge y al análisis informático.

5.3 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL eCSF + WB.

Con el fin de explorar la posible asociación del FGF2 con los proteoglicanos contenidos en el eCSF, llevamos a cabo un tratamiento enzimático del fluido, previamente a la separación electroforética. El objetivo final fue comparar el patrón de bandas obtenido para el inmunomarcaje específico del FGF2 por inmunoblot, de la muestra de eCSF tratada y la muestra sin tratamiento enzimático, para así valorar si esto ocasiona la “liberación” de FGF2 a partir de bandas de mayor peso molecular.

Tubos eppendorf con 40 µL de muestra de eCSF E11.5 fueron expuestas independiente a 0.2 mUI/µL de heparitinasa II de *Flavobacterium heparinum* (reconstituida en Tris-HCl 30 mM, BSA 0.01%, Sigma, H6512) y 1 mUI/µL de condroitinasa ABC de *Proteus Vulgaris* (reconstituida en Tris-HCl 50 mM, acetato de sodio 60 mM, BSA 0.02%, Sigma, C2905) durante 12 horas, a 37 °C y 250 rpm (Thermo Shaker TS-100, BIOSAN). Posteriormente al tratamiento enzimático, las muestras fueron sometidas al protocolo habitual de electroforesis de proteínas – western-blot.

6. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

Se evaluó mediante inmunohistoquímica (IHQ) el patrón de expresión espacio-temporal del FGF2 y su principal receptor, el FGFR1, en el cerebro embrionario, para diversos estadios (E9.5 – E16.E para FGF2 y E9.5-E11.5 para FGFR1).

Se desarrolló además IHQ con anticuerpo anti-BrdU y anti-beta-III-tubulina para los análisis de proliferación celular y diferenciación neuronal respectivamente, en embriones de estadios E9.5 – E11.5 y explantes de neuroepitelio, así como para el análisis de la V-SVZ de cerebro de ratón adulto.

Cada vez que se desarrolló un procedimiento de IHQ, se incluyeron secciones histológicas de los diversos estadios estudiados y de igual manera, los análisis para muestras wild-type y knock-out se realizaron simultáneamente.

6.1 PROTOCOLO GENERAL DE DESPARAFINACIÓN Y REHIDRATACIÓN.

Antes de proceder con los protocolos de inmunomarcaje y tinción de hematoxilina-eosina, las secciones histológicas fueron desparafinadas en xileno y luego rehidratadas por inmersión en concentraciones decrecientes de etanol hasta agua corriente, de la siguiente manera:

Xileno: 2 x 10 minutos
Etanol 100%: 2 x 7 minutos
Etanol 96%: 5 minutos
Etanol 80%: 5 minutos
Etanol 50%: 5 minutos
Agua corriente: 15 minutos

6.2 DESENMASCARAMIENTO ANTIGÉNICO.

Un importante número de antígenos proteicos de tejidos fijados requieren un paso de desenmascaramiento antigénico previo al marcaje inmunohistoquímico debido a la formación de entrecruzamientos entre proteínas, principalmente por puentes de metileno durante la fijación y por lo tanto enmascaran los epítopes antigénicos impidiendo la unión de los anticuerpos usados para el inmunomarcaje [Shi et al., 2001]. Algunos antígenos requieren un desenmascaramiento mediado por calor mientras que otros requieren métodos enzimáticos.

La inmunohistoquímica anti-beta-III-tubulina no precisó ningún tipo de desenmascaramiento.

Por su parte, el inmunomarcaje anti-BrdU, si bien detecta una molécula de naturaleza no proteica (un análogo de la timidina), requirió un tipo especial de desenmascaramiento con el que se pretende desnaturalizar el DNA de doble cadena para exponer este antígeno. Para esto se procedió a incubar las muestras en una solución HCl 2N a 37°C durante 45 minutos con posterior neutralización en búfer borato (tetraborato de sodio 5 mM, ácido bórico 20 mM, pH 8.5) durante 10 minutos en agitación suave.

Para la inmunohistoquímica anti-FGF2 y anti-FGFR1 se empleó un método de desenmascaramiento antigénico mediado por calor. La eficiencia de este método es dependiente de la temperatura, tiempo, así como del pH y composición química del búfer utilizado, requiriendo cada antígeno condiciones específicas [http://www.nordiqc.org/Techniques/Epitope_retrieval.htm]; por esta razón, desarrollamos pruebas previas con diferentes soluciones y parámetros. El resultado óptimo se consiguió usando búfer Tris/EDTA (10 mM Tris base, 1 mM EDTA, 0.05% Tween® 20, pH 9.0), a 95°C, durante 15 minutos para el desenmascaramiento de FGF2 y 10 minutos para FGFR1. La **figura 21** muestra cómo se dispuso el montaje para llevar a cabo el procedimiento de desenmascaramiento. Una vez terminado este, se introdujo

rápidamente la gradilla con las muestras, en una cubeta con agua corriente, dejando enfriar por 5 minutos antes de proseguir con el protocolo de IHQ.



Figura 21 | Montaje para el desenmascaramiento antigénico mediado por calor. Los portaobjetos con las muestras histológicas se dispusieron en una gradilla que fue introducida en un vaso de precipitado con búfer tris-EDTA pH 9.0, precalentado a 95 °C y situado sobre un agitador magnético con calentador, con el fin de mantener la temperatura constante durante todo el proceso. En el fondo, una placa de Petri de cristal (sin tapa) mantuvo elevada la gradilla y alojó el imán agitador.

6.3 INMUNOHISTOQUÍMICA INDIRECTA (FLUORESCENCIA).

El protocolo general de IHQ fue el mismo para FGF2, FGFR1 y beta-III-tubulina, excepto en lo relativo al desenmascaramiento antigénico ya comentado antes. El inmunomarcaje para cada anticuerpo se efectuó en secciones histológicas independientes.

Luego de la rehidratación de las secciones para el caso de beta-III-tubulina o del desenmascaramiento para FGF2 y FGFR1, se efectuaron 2 lavados de 5 minutos en TBS 0.025% tritón X-100, en agitación suave. Se procedió luego a un paso de bloqueo en 10% suero normal inactivado (Sigma) con 1% BSA en TBS por 2 horas a temperatura ambiente. Se aplicó entonces el anticuerpo primario diluido en TBS con 1% BSA. Los anticuerpos y concentraciones empleadas para cada caso fueron: mouse IgG1k anti-FGF2 clone bFM-2 (10 µg/mL, Millipore), mouse IgM anti-FGFR1 clone VBS1 (10 µg/mL, Millipore) y monoclonal mouse IgG anti-β-III-tubulina. Se incubó con el anticuerpo primario en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente se lavaron las secciones 3 veces durante 5 minutos cada vez, en TBS 0.025% tritón X-100 en agitación. Se aplicó el anticuerpo secundario: Alexa Fluor® 488 rabbit anti-mouse IgG (H+L) dilución 1:1000 para la detección del primario anti-FGF2 y anti-tubulina, Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgM (µ chain) dilución 1:1000 para el caso del a-FGFR1. Se incubó con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente en cámara

húmeda y oscuridad durante 1 hora. En la misma solución que contenía el anticuerpo secundario se aplicó como contratinción nuclear 1 μM TOTO[®]-3 (640/660 nm, Invitrogen). Luego de esta incubación se efectuaron 3 lavados con TBS en agitación suave, se trasladaron los portaobjetos a una cubeta con agua destilada y se procedió al montaje de las muestras con medio acuoso Fluoromount[™] (Sigma). Las muestras fueron estudiadas entonces por Microscopía Láser Confocal.

6.4 INMUNOHISTOQUÍMICA INDIRECTA (PEROXIDASA/DAB).

Como se anotó antes, la proliferación celular se evaluó mediante inmunohistoquímica anti-BrdU.

Luego del protocolo de desenmascaramiento antigénico descrito antes para la BrdU (HCl 2N), se procedió a hacer lavados 3 x 5 minutos en TBS 0.025% Triton X-100 y a la aplicación del anticuerpo primario: Monoclonal mouse anti-BrdU, clone Bu20a (dilución 1:100, DAKO); se incubó toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Se efectuaron entonces 3 lavados de 5 minutos en TBS 0.025% Triton X-100 y se incubó con H₂O₂ 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente, con el fin de suprimir la actividad de la peroxidasa endógena. Después de 3 lavados con TTBS, se aplicó el anticuerpo secundario biotinilado (Goat anti-mouse, B6398 Sigma, dilución 1:20) durante 1 hora, se lavó entonces en TBS (2 x 5 min) y se incubó en extravidina-peroxidasa (Mouse ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit, Sigma, dilución 1:20). El producto de reacción fue detectado como un sustrato marrón empleando una tableta de 10 mg de 3,3-diaminobenzidinetetrahydrochloride (Diaminobencidina - DAB, Sigma) disuelta en 15 mL de TBS + 20 μL de H₂O₂ 30%. La solución de DAB fue previamente filtrada usando un filtro de jeringa de 0.2 μm de poro. El tiempo de exposición a la solución DAB dependió de la evolución de la reacción observada bajo estereoscopio, pero fue siempre < 2 min. Finalmente, las secciones fueron lavadas en agua destilada y deshidratadas por inmersión en concentraciones crecientes de etanol, de manera inversa a lo descrito en la sección 6.1. Los portaobjetos fueron montados usando medio Eukitt[®].

7. EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE CEREBROS ADULTOS DE RATÓN.

Para llevar a cabo el estudio de proliferación celular en la V-SVZ, los ratones adultos FGF2 KO y WT fueron inyectados por vía intraperitoneal con dos dosis de BrdU de 60 $\mu\text{g/g}$ peso corporal, separadas 24 horas. Esquemas de administración de BrdU muy semejantes a este han sido empleadas antes, con éxito, por otros investigadores [Dayer et al., 2007; Werner et al., 2011]. 24 horas después de la última dosis se procedió a la extracción de los cerebros.

Bajo anestesia profunda (Xilacina + Ketamina) se practicó una incisión longitudinal en la piel, desde la región cervical posterior hasta la región más anterior de la cabeza, con el fin de exponer el cráneo. Se efectuó entonces una disección de la musculatura cervical dorsal y luego, usando unas tijeras pequeñas, se procedió a practicar una craneotomía, seccionando a partir del agujero magno y siguiendo la línea media, los huesos occipital, parietal y frontal, sin lesionar el tejido cerebral subyacente. Luego, con una pequeña pinza de disección curva se extirparon sucesivamente fragmentos de hueso y meninges, dejando el cerebro expuesto. Finalmente se seccionó el tallo cerebral y, en la parte más anterior, los nervios olfatorios y ópticos. El cerebro fue trasladado con cuidado mediante una espátula, a una placa de Petri con solución de Ringer, para limpiar rápidamente el exceso de sangre e inmediatamente después depositarlo en la solución fijadora.

Cada cerebro fue fijado por inmersión en 50 mL de Carnoy durante un tiempo total de 20 horas, en agitación, con cambios de la solución fijadora 2 y 14 horas después de iniciado el proceso. Luego se prosiguió con la deshidratación por exposición sucesiva a soluciones de etanol (50 mL) al 80%, 96%, 100%, 100%, durante 90 minutos cada vez. Posteriormente los cerebros fueron depositados en xileno durante 1 hora, con un cambio de solución transcurridos 40 minutos. Finalmente se permitió su infiltración con parafina líquida (56-58 °C) (Paraplast®, Sigma-Aldrich) durante 12 horas.

Los cerebros fueron incluidos en bloques de parafina, a partir de los cuales se obtuvieron posteriormente, para su estudio inmunohistoquímico, secciones coronales de 8 µm de espesor.

8. NIVELES DE ESTUDIO.

Para los análisis inmunohistoquímicos de expresión, proliferación y diferenciación, efectuados para embriones de ratón en estadios E9.5, E10.5 y E11.5, se emplearon secciones histológicas transversales obtenidas a los 3 niveles indicados en la **figura 23A**, lo que permitió, para estos estadios, abarcar en los diferentes análisis, todas las vesículas principales del cerebro embrionario. A partir del estadio E11.5, debido al creciente volumen y complejidad del cerebro embrionario, la valoración se efectuó sobre secciones parasagitales cercanas a la línea media (**Fig. 22**).



Figura 22 | Sección sagital de cerebro embrionario de ratón en estadio E14.5. Para los estadios mayores a E11.5, se emplearon secciones histológicas con esta orientación en el análisis de expresión de FGF2. (Di., diencefalo; Tele., telencefalo; Mes., mesencéfalo; Romb., rombencéfalo.)

La V-SVZ del cerebro de ratón adulto por su parte, fue valorada en cortes coronales efectuados a nivel de la región anterior de los ventrículos laterales (**Fig. 23B**).

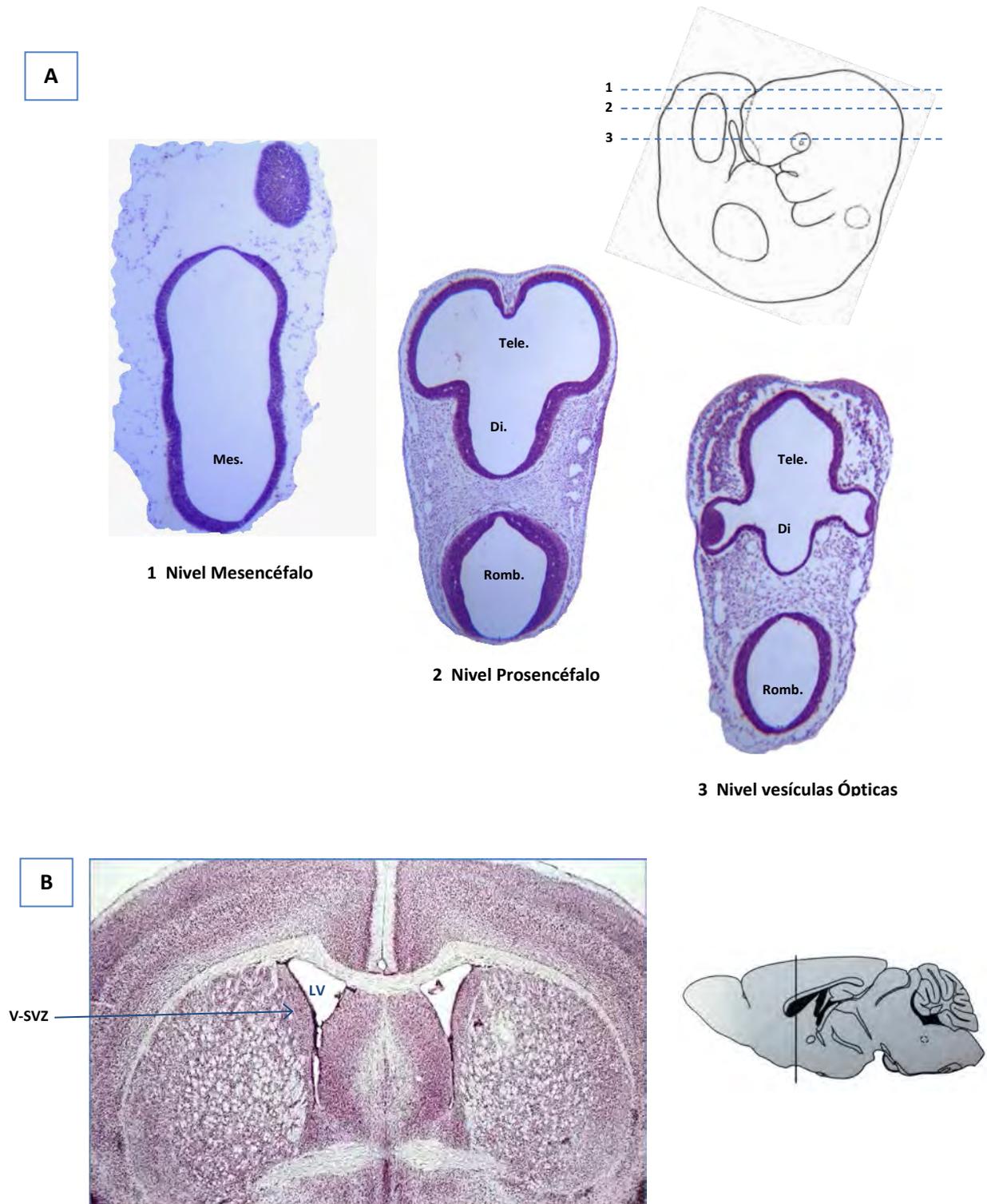


Figura 23 | Niveles de estudio elegidos para los estudios por inmunohistoquímica. (A) Cortes transversales de cerebro embrionario de ratón (E10.25) teñidos con H&E, indicando los niveles de estudio abordados en la presente tesis para embriones E9.5 – E11.5. **(B)** Corte coronal de cerebro adulto de ratón, teñido con H&E, ilustrando el nivel empleado para el estudio de la V-SVZ. (Di., diencefalo; Mes., mesencéfalo; Tele., telencefalo; Romb., rombencéfalo; LV, ventrículo lateral; V-SVZ, zona ventricular – subventricular). (Imagen **(B)** modificada de Franklin and Paxinos, 2008. The mouse brain in stereotaxic coordinates, 3rd edition).

9. ADQUISICIÓN DE LAS IMÁGENES Y CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS.

9.1. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CON BRDU.

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

9.1.1 Estudio de proliferación en embriones *FGF2 KO* y *WT*.

Para el análisis comparativo de la proliferación en embriones *FGF2 KO* y *WT*, se adquirieron para ambas condiciones imágenes de las tres vesículas cerebrales principales: telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Para cada una de las vesículas se tomaron siempre imágenes simétricas del neuroepitelio en las zonas que se indican en la **figura 24**. Además, de cada portaobjetos seleccionado se analizaron tres secciones histológicas diferentes, buscando de esta manera hacer siempre un contaje por triplicado.

Las fotos fueron tomadas con objetivo de 40X y una magnificación de 1.5X. Para asegurarnos de que las imágenes fueran comparables, se procuró adquirir siempre exactamente la misma longitud de neuroepitelio. Se incluyeron como células positivas para BrdU en el conteo, aquellas que mostraron una coloración marrón en su núcleo, determinada de forma visual a partir de un umbral definido previamente. Solo se tuvieron en cuenta las células cuyo núcleo apareció mayoritariamente en el campo.

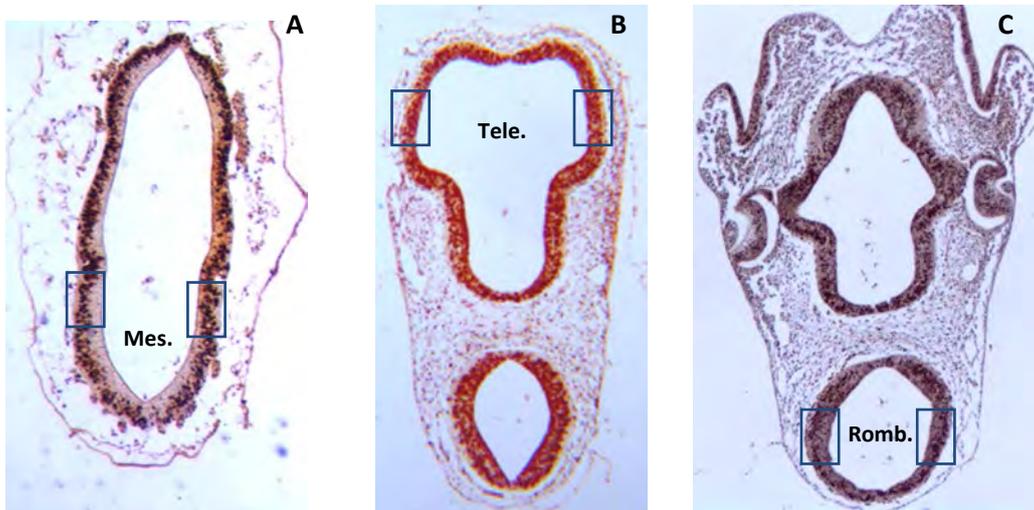


Figura 24 | Zonas evaluadas para el recuento de núcleos BrdU positivos en los estudios de proliferación de cerebro embrionario. Las imágenes que se muestran fueron tomadas con un objetivo 4X. Para cada uno de los niveles de estudio el recuento de núcleos marcados se hizo a 40X en las zonas indicadas por los recuadros. **(A)** Mesencéfalo; **(B)** Vesículas telencefálicas; **(C)** Rombencéfalo en secciones a nivel de las vesículas ópticas.

9.1.2 Estudio de proliferación en explantes de neuroepitelio cultivado *in vitro*.

En este caso se realizó el conteo de núcleos BrdU positivos, con un objetivo 20X y una magnificación 1.5X, en imágenes de cortes transversales de los explantes de neuroepitelio cultivados. Se procuró siempre hacer las fotos de la región más central del explante.

9.1.3 Estudio de proliferación en la V-SVZ de cerebro adulto FGF2 KO y WT.

Los contajes de los núcleos positivos para el marcaje anti-BrdU por inmunofluorescencia se hizo en imágenes obtenidas por microscopía láser confocal (Leica TCS SPE) a 40X, zoom 1.0. El contaje se llevó a cabo en toda la extensión de la V-SVZ que permitiera el campo, siempre en cortes al mismo nivel (región anterior de los ventrículos laterales).

9.2 ESTUDIOS DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL.

La adquisición de las imágenes para los estudios de diferenciación neuronal se hizo por microscopía láser confocal, con un objetivo de 40X y zoom 1.0. Para los contajes, se consideraron células positivas para beta-III-tubulina aquellas cuyo núcleo estuviera rodeado de señal positiva en al menos un 50%.

10. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEUROEPITELIO DE RATÓN.

Con el fin de investigar la influencia biológica que ejerce el FGF2 presente en el eCSF sobre el neuroepitelio, utilizamos la técnica de cultivo *in vitro* de explantes de neuroepitelio mesencefálico. Esta técnica ha sido previamente empleada con éxito en nuestro laboratorio para valorar la dependencia de las NPCs al eCSF durante el desarrollo, pues permite un control de la exposición o privación neuroepitelial al eCSF durante la duración del cultivo [Gato et al., 2005; Martín et al., 2009] y ha demostrado además su utilidad como modelo en experimentos de pérdida y ganancia de función para moléculas específicas pues permite desarrollar estrategias de inmunobloqueo [Vera et al., 2013, 2015].

Luego del aislamiento de los embriones (E10.5), se transfirieron estos a una placa con solución de Ringer estéril. En cámara de flujo laminar se procedió a obtener de cada embrión, con la ayuda de microtijeras el fragmento de neuroepitelio deseado (porción dorsal de la vesícula mesencefálica), previa disección del ectodermo de superficie y mesénquima suprayacentes. Estos fragmentos fueron trasladados a una placa de Petri con DMEM-F12 a 37°C, donde se realizó el montaje de cada pieza de neuroepitelio sobre un pequeño fragmento de membrana de nitrocelulosa (0.8 µm, Millipore) (Fig. 25A-F). La superficie apical del neuroepitelio quedó en contacto con la membrana y completamente adosada a ella. Se efectuaron en la parte periférica del explante de neuroepitelio, pequeños toques con un filamento de tungsteno, de modo que la

muestra quedó fija en su posición. De este modo se permitió una adecuada nutrición del tejido a partir del medio de cultivo subyacente al papel de filtro.

Cada uno de los explantes de neuroepitelio dispuestos sobre el papel Millipore fueron situados individualmente en pocillos de placas de cultivo, sobre pequeñas mallas metálicas apoyadas en anillos de teflón. De este modo, el tejido no estuvo inmerso en el medio de cultivo pero sí en permanente contacto con él, y se favoreció la nutrición del explante, desde abajo, por capilaridad y así como un adecuado intercambio gaseoso (**Fig. 25G**).

El medio de cultivo empleado fue DMEM/F12 (1:1), 300 μ L/pocillo, suplementado con ácido ascórbico (50 μ g/mL, \pm 280 μ M). Este medio de cultivo fue acondicionado para las muestras experimentales, añadiendo eCSF o anticuerpos, de acuerdo al diseño establecido previamente. El cultivo se mantuvo durante 24 horas, 37 °C, atmósfera húmeda con 5 % CO₂. Para todas las muestras, exactamente una hora antes de la terminación del cultivo se añadió BrdU al medio (concentración final 5 μ M), con el fin de testar luego su incorporación en estudios de proliferación celular.

Las condiciones finales de medio de cultivo fueron las siguientes:

Medio de cultivo

Medio de cultivo + 15% eCSF E11.5

Medio de cultivo + 15% eCSF + 5 μ g/mL anticuerpo anti-FGF2 (anti-FGF2 neutralizing monoclonal antibody, Clone b-FM1, Millipore).

Al finalizar el cultivo las muestras fueron fijadas en Carnoy, procesadas e incluidas en parafina para su posterior estudio inmunohistoquímico (anti-BrdU, anti- β III-tubulina).

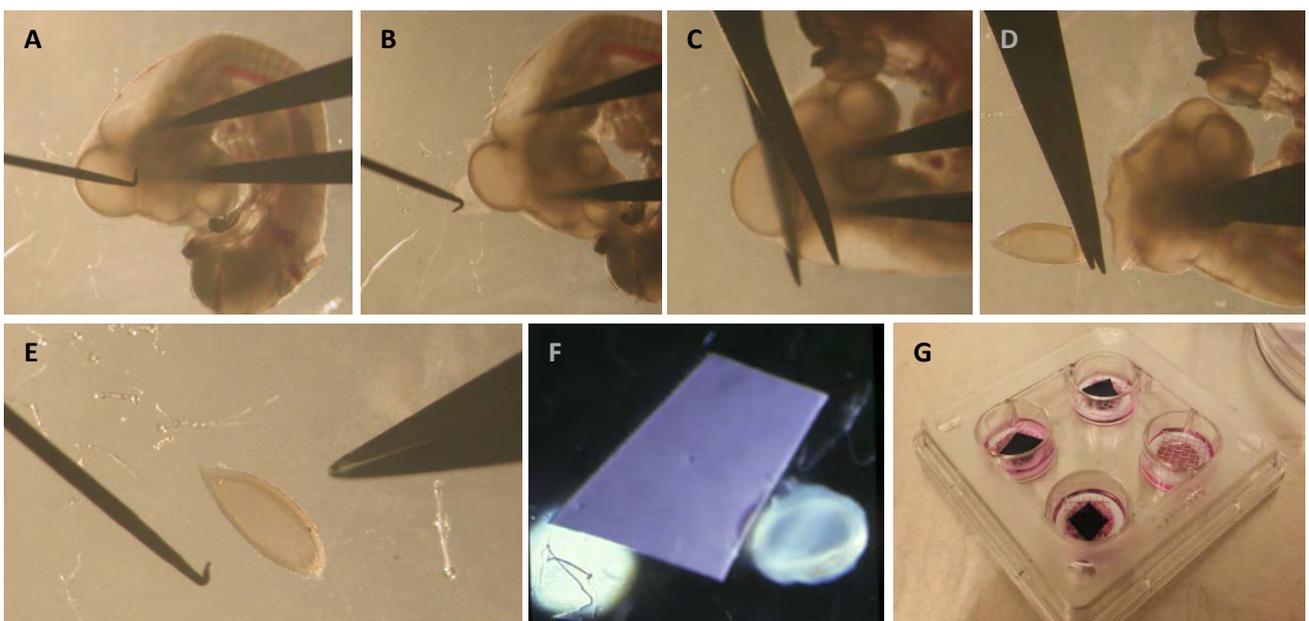


Figura 25 | Cultivo organotípico de neuroepitelio mesencefálico de ratón. (A,B) Disección del ectodermo de superficie. (C,D,E) obtención del fragmento de neuroepitelio. (F,G) El explante se posiciona sobre el papel de filtro y se traslada a la placa para el montaje definitivo del sistema de cultivo.

RESULTADOS

1. IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE FGF2 EN EL eCSF.

El eCSF de ratón fue sometido a SDS-PAGE y posterior análisis por western-blot con el fin de valorar la presencia de FGF2 en este fluido. Se utilizó un anticuerpo monoclonal, obteniéndose un inmunomarcaje específico para FGF2 y no apreciándose reactividad cruzada con FGF1 y FGF8b recombinantes usados como controles (**Fig. 26A**).

El western-blot reveló 4 bandas de diferente volumen e intensidad, que tomadas en conjunto revelan una presencia importante de FGF2 en el eCSF. La banda más intensamente marcada corresponde a la de mayor peso molecular (aproximadamente 50 KD). Las tres bandas restantes se encuentran agrupadas, con pesos moleculares de 28, 24.5 y 22.5 KD (**Fig. 26B**).

La inmunodetección de bandas de diverso peso molecular, así como la ausencia de marcaje en el nivel correspondiente a los 18 KD, cuya presencia cabría esperar para la isoforma secretada de FGF2, podrían ser explicados por una parte por la presencia de las tres *isoformas de FGF2 de alto peso molecular*, bien documentadas en roedores (ver *sección 7.7*), con pesos moleculares muy semejantes a las tres bandas inferiores halladas en nuestro estudio. Por otro lado, como se abordó en la introducción, se trata de un fluido con una composición compleja que presenta atributos propios de una matriz extracelular, lo cual hace posible pensar en una asociación del FGF2 de bajo peso molecular con otras moléculas presentes en el eCSF, tales como los proteoglicanos y que presumiblemente actúan como secuestradores de factores de crecimiento, explicando así la banda inmunorreactiva de 50 KD detectada en este fluido.

Finalmente, al confrontar el resultado obtenido por análisis de western-blot de eCSF a los 11.5 días con un patrón electroforético general del mismo estadio revelado con tinción de plata, es posible determinar comparativamente, de acuerdo a los pesos moleculares, a qué fracción proteica de este patrón corresponden las bandas inmunorreactivas para FGF2. Este resultado contribuye a caracterizar mejor la identidad de dichas fracciones y es presentado en la **Fig. 26C**.

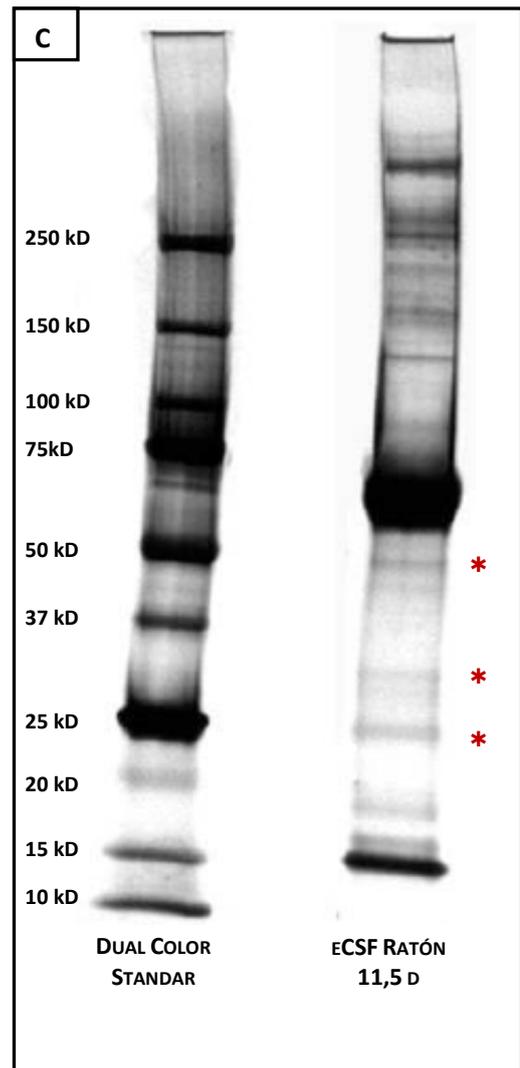
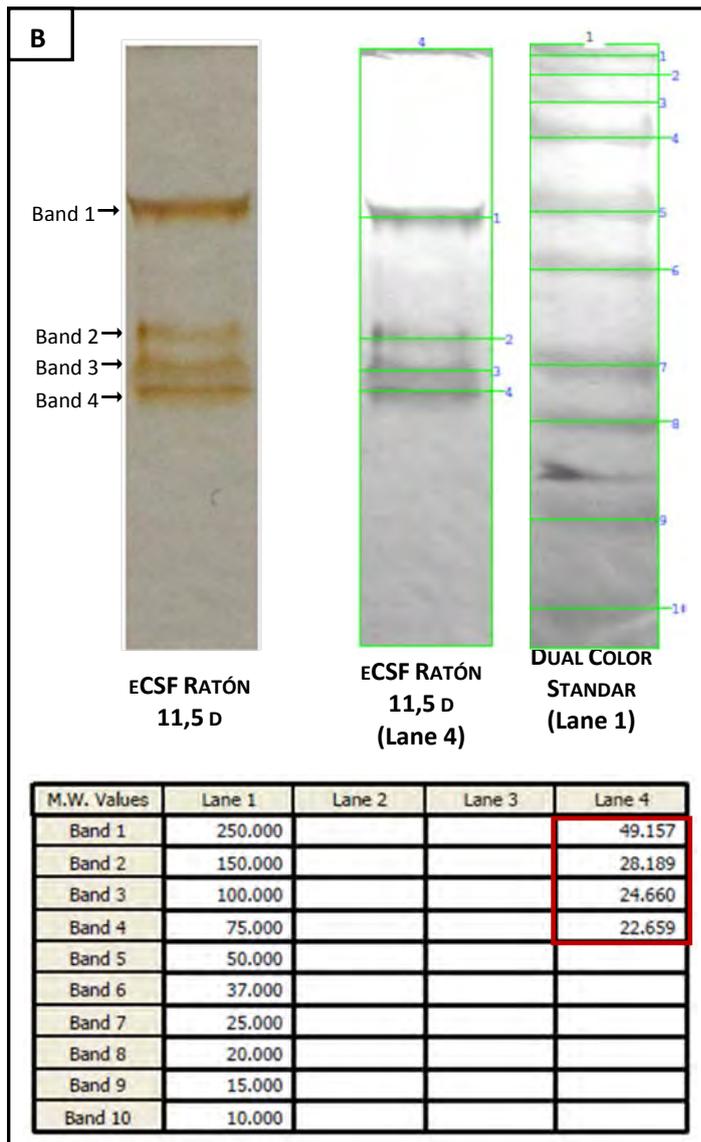
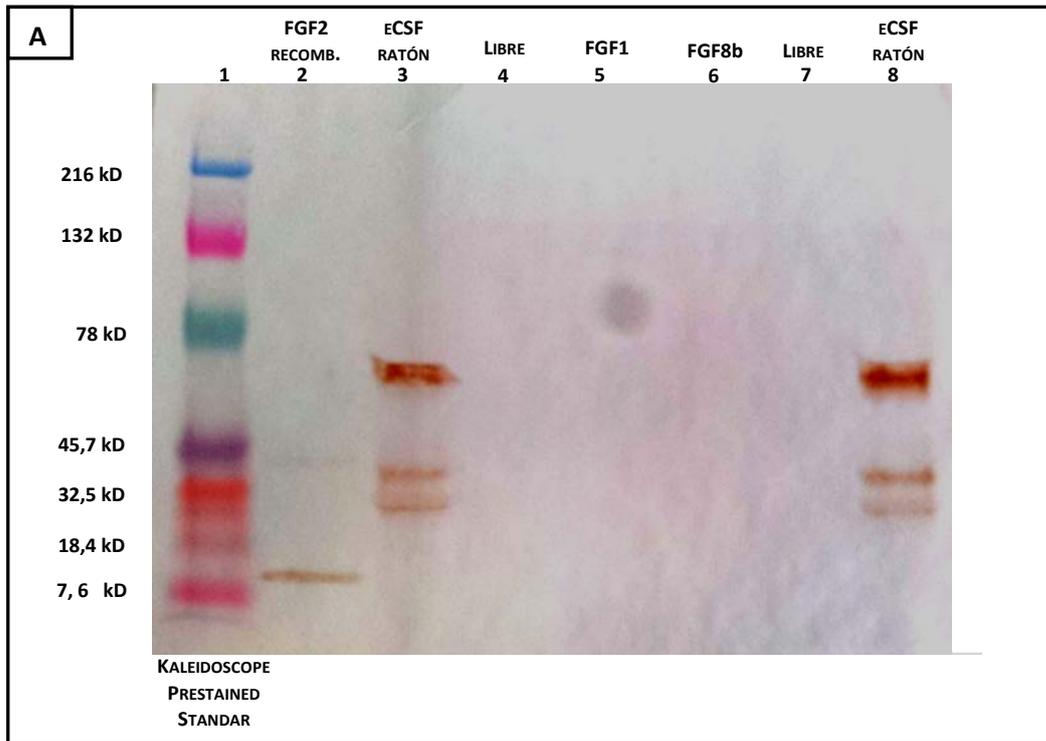


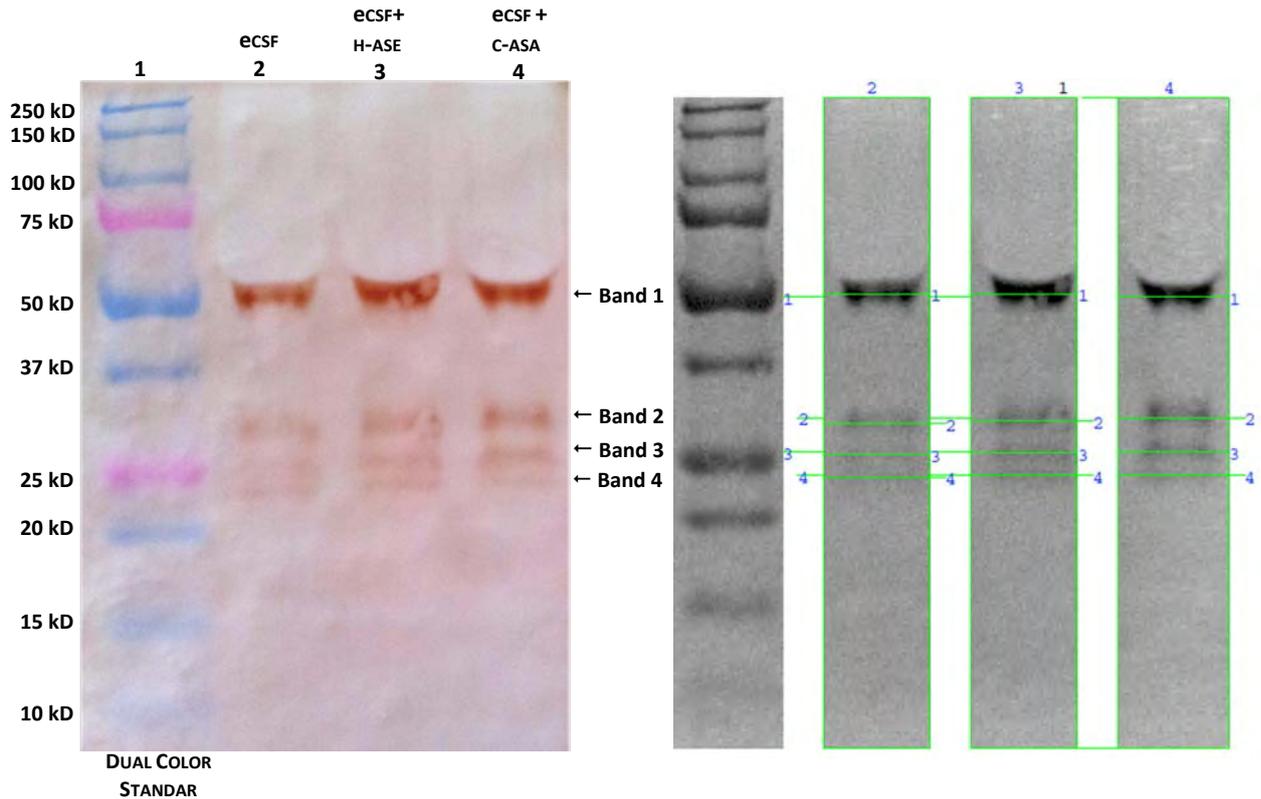
FIGURA 26 | Análisis de western-blot que demuestra la presencia de FGF2 en el eCSF de ratón a los 11,5 d de desarrollo. **A.** La columna 1 fue cargada con el estándar de peso molecular; en la columna 2 FGF2 recombinante de ratón como control positivo, mostrando una adecuada inmunorreactividad. Las columnas 5 y 6 demuestran una ausencia total de señal para FGF1 y FGF8b, avalando la especificidad del inmunomarcaje. Las columnas 3 y 8, eCSF de 11.5 días, mostrando 4 bandas inmunorreactivas para a-FGF2 (indicadas con flechas). **B.** Análisis del peso molecular de las bandas con inmunomarcaje positivo para FGF2 en eCSF. A la izquierda se observa la membrana de nitrocelulosa con las 4 bandas antes descritas, claramente identificables. Las dos imágenes de la derecha y la tabla presentan el análisis de peso molecular, con el resultado para las cuatro bandas indicado en el recuadro rojo. **C.** Imagen de SDS-PAGE 12% + tinción de plata donde se presenta el patrón electroforético general para el eCSF de 11,5d. Los asteriscos indican las fracciones proteicas del eCSF que se corresponden con los pesos moleculares hallados en el análisis de western-blot aFGF2.

1.1 VALORACIÓN DE LA RELACIÓN DEL FGF2 CON PROTEOGLICANOS SULFATADOS DEL eCSF.

Se pretendió valorar si el FGF2 presente en el eCSF se encuentra unido total o parcialmente a heparán sulfato proteoglicanos. Para esto se llevó a cabo una digestión enzimática con heparinasa y condroitinasa, del eCSF de E11.5, y posteriormente se evaluó si este tratamiento tuvo algún efecto en la movilidad electroforética del FGF2.

Las liasas actúan rompiendo mediante un *mecanismo de eliminación* las cadenas de polisacáridos sulfatados (GAGs) que contienen uniones 1-4 entre hexosaminas y residuos de ácido urónico [Ernst S. et al., 1995], ocasionando de esta manera la despolimerización de los glicosaminoglicanos y por tanto la liberación del FGF2 potencialmente unido a ellos, modificando su peso molecular en el inmunoblot.

Con una concentración de heparitinasa II de 1mUI/mL eCSF y condroitinasa ABC de 0.5 mUI/mL eCSF y 12 horas de tratamiento no se hizo evidente ninguna modificación del peso molecular de las bandas inmunorreactivas para FGF2 en el western-blot, persistiendo una banda de 50 KD intensamente marcada y otras tres bandas de menor intensidad y con pesos moleculares en el intervalo entre 24-30 KD (Fig. 27). Los resultados para las condiciones de digestión evaluadas indican que no existe una interacción directa entre FGF2 y heparán sulfato, y sería necesario valorar la posible unión del FGF2 a otro tipo de moléculas, tales como la OSC-espondina (macromolécula de carácter glicoproteico presente en el eCSF).



M.W. Values	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4
Band 1	250.000	51.833	51.833	51.089
Band 2	150.000	29.633	29.976	30.322
Band 3	100.000	26.049	26.203	26.358
Band 4	75.000	23.800	23.933	23.933
Band 5	50.000			
Band 6	37.000			
Band 7	25.000			
Band 8	20.000			
Band 9	15.000			
Band 10	10.000			

FIGURA 27 | El tratamiento enzimático exhaustivo con heparin y condroitin liasas no modifica el patrón de marcaje del Western-Blot a-FGF2 en el eCSF. A la izquierda se muestra la membrana de nitrocelulosa; A la derecha y en la tabla inferior se presenta análisis de peso molecular. Muestra control sin tratamiento enzimático (*columna 2*), muestra tratada con heparitinasas II (*columna 3*) [0.2 mUI/20µL CSF, 37°C, 6 h] y muestra tratada con condroitinasas ABC (*columna 4*) [0.2 mUI/20µL, 37°C, 12 h]. El inmunomarcaje obtenido para las muestras sometidas a digestión enzimática no difiere del detectado en el control.

2. PATRÓN DE EXPRESIÓN TEMPORO-ESPACIAL DEL FGF2 EN CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN.

Después de poner a punto la técnica inmunohistoquímica y probar con diferentes anticuerpos anti-FGF2, vamos a presentar los resultados del protocolo con el cual hemos obtenido un inmunomarcaje óptimo y reproducible. En estas condiciones, en términos generales podemos afirmar que en secciones histológicas incluidas en parafina, por inmunofluorescencia indirecta existe un marcaje específico, citoplasmático, en determinadas células del neuroepitelio cerebral embrionario de ratón.

El estudio por inmunohistoquímica de un periodo amplio (E9.5 – E16.5) y en cortes histológicos a varios niveles (que abarcan cerebro anterior, medio y posterior), nos ha permitido concluir que este marcaje es temporal y espacialmente variable, de acuerdo al estadio embrionario y zona de la pared del tubo nervioso estudiados, y sugiriendo que esto podría estar relacionado con su funcionalidad biológica. Las imágenes sagitales han facilitado la valoración de los estadios más avanzados, los cuales presentan una mayor complejidad estructural y han permitido además identificar marcajes específicos en zonas como la placa del suelo o la placa del techo que tienen características diferenciales y que en los cortes transversales se identifican peor.

2.1 PATRONES GENERALES DE EXPRESIÓN DEL FGF2 EN CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN.

Antes de entrar en detalle con estadios y regiones específicas, es posible establecer una serie de tipologías estándar de marcaje o patrones de expresión que van apareciendo en el nicho embrionario a lo largo del desarrollo (**Fig. 28**).

El patrón más llamativo desde el punto de vista morfológico, permite la identificación de células individuales en el neuroepitelio, con citoplasmas positivos para FGF2, tratándose de células en posición apical claramente diferenciadas del resto, que pueden aparecer agrupadas o aisladas (**Fig. 28A**) y que pueden llegar a formar una monocapa celular discontinua (**Fig. 28B**) o continua (**Fig. 28C**). Las imágenes sugieren que las células de alguna forma están en relación con procesos cavitarios, pudiendo indicar una posible secreción hacia la cavidad, una posible incorporación desde la cavidad o bien que mantienen relación con algún fenómeno que ocurre siempre en la superficie apical de la pared neuroepitelial como ocurre con la replicación celular.

En otras ocasiones es posible encontrar un marcaje más complejo, que puede incluir por ejemplo la superficie basal, donde pueden marcarse algunas células agrupadas en esta zona del neuroepitelio, como se observa en las **Fig. 28B, E, F, J**. Sin embargo, este marcaje basal no presenta la regularidad y consistencia observadas en la porción apical de la pared neuroepitelial y generalmente no permite fácilmente distinguir una localización citoplasmática del mismo, lo que quizás sugiere que puede

ser la mayoría de las veces, un marcaje de la membrana basal, la cual puede aparecer como una capa de espesor variable (**Fig. 28E, F**). En este caso, es frecuentemente encontrar asociado un marcaje intenso en el mesénquima subyacente, sea con vasos o no.

Otro patrón de marcaje, que puede coexistir con el basal o no, es un marcaje apical, pero mucho más abigarrado, más intenso, que llega a formar capas continuas, en ocasiones alcanzando varios estratos de núcleos adyacentes a la superficie apical del neuroepitelio, como se aprecia en la **Fig. 28C**. En algunas zonas este marcaje puede incluso abarcar hasta casi la mitad del grosor del neuroepitelio (**Fig. 28D**), lo que podría indicar un reclutamiento de células secretoras (positivas para FGF2) en ciertas regiones, en relación con la activación de algún proceso.

En algunos casos está presente un patrón de marcaje de zonas intermedias de la pared neuroepitelial, sin guardar relación con la cavidad ventricular y al que hemos denominado marcaje difuso transparietal (**Fig. 28G**).

Es destacable también el marcaje en la cavidad del cerebro embrionario. En algunas ocasiones se observa que el material precipitado en el interior de la cavidad presenta un intenso inmunomarcaje, con aspecto fibroso, como si constituyera un depósito de FGF2 en una matriz intercelular (**Fig. 28H**).

Para los estadios más avanzados, al valorar la expresión de FGF2 a nivel de los plexos coroideos, podemos decir que hemos detectado marcaje en estos, pero parece que solamente está en relación con los vasos sanguíneos y no se aprecia que en la superficie de las vellosidades de los plexos coroideos haya células intensamente positivas.

Finalmente, dentro de esta descripción general de patrones, cabe destacar que los vasos sanguíneos y el mesénquima presentan en ocasiones un marcaje de intensidad variable (**Fig. 28 B, F, J**).

En resumen, existe un marcaje específico del neuroepitelio para FGF2; este es fundamentalmente citoplasmático, en células que se marcan intensamente y se distinguen completamente del resto. Su patrón de distribución no es homogéneo, existiendo zonas donde en cierto momento hay una mayor concentración y pudiéndose establecer una serie de patrones generales de marcaje, que varían desde la presencia de grupos aislados de células hasta marcajes más difusos, y que predominan de acuerdo al momento del desarrollo y localización. Como hallazgo más sobresaliente puede mencionarse la marcada interacción de estas células con la superficie apical del neuroepitelio, hecho que sumado a la presencia de FGF2 en el fluido contenido dentro de la cavidad, sugiere la existencia de una forma de acúmulo y secreción de este factor hacia el interior de la misma por parte de las células neuroepiteliales.

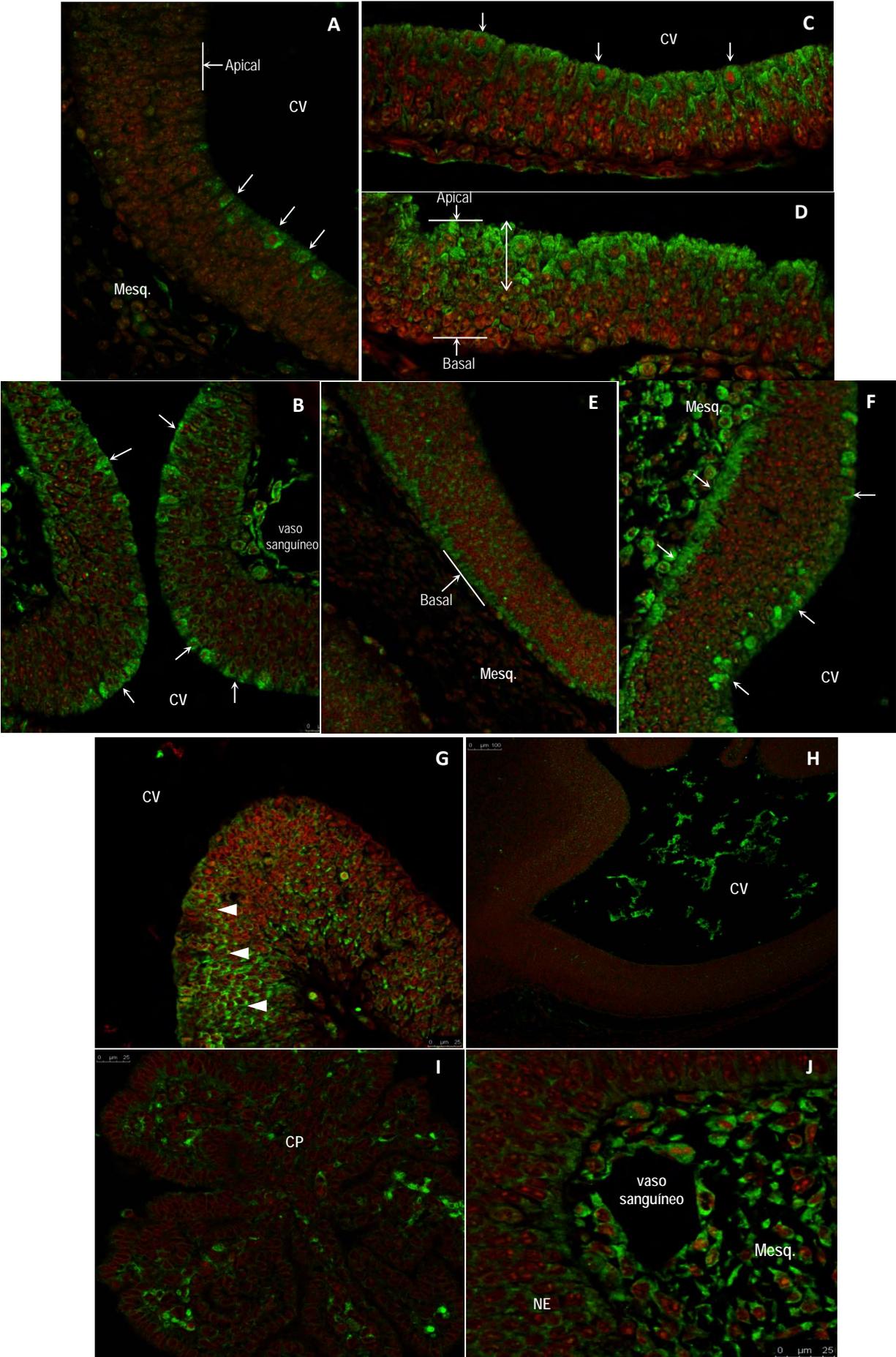


FIGURA 28| Diversidad de patrones de expresión para el FGF2 durante el desarrollo embrionario del cerebro de ratón. Inmunohistoquímica anti-FGF2 en secciones histológicas de cerebro embrionario de ratón donde se presentan los patrones de expresión predominantes para esta proteína a lo largo del desarrollo. La señal en verde corresponde al marcaje con anti-FGF2, mientras que en rojo se muestran los núcleos teñidos con TOTO[®]-3. **A.** Marcaje apical de células aisladas. **B.** Marcaje apical en capa discontinua. **C.** Marcaje apical en capa continua. **D.** Doble o triple capa de células. **E.** Marcaje basal. **F.** Marcaje mixto apical + basal. **G.** Marcaje difuso transparietal. **H.** Marcaje intracavitario. **I.** Marcaje de plexos coroideos. **J.** Marcaje del mesénquima. Se indica con flechas la localización preferencial de las células marcadas para cada uno de los patrones de expresión; Igualmente con barras se señalan las superficies apical y basal de la pared neuroepitelial. (CV, cavidad ventricular; Mesq., mesénquima; NE, neuroepitelio).

2.2 PATRÓN TEMPORAL DE EXPRESIÓN DEL FGF2 EN CEREBRO EMBRIONARIO.

2.2.1 Expresión de FGF2 en cerebro de ratón E9.5.

En cuanto al patrón de marcaje específico de 9.5 días, hay que decir en primer lugar que el cerebro del ratón en este estadio es muy simple, estando prácticamente diferenciadas las tres vesículas primarias, pero diferenciándose poco las vesículas secundarias. El neuroepitelio exhibe además una uniformidad bastante evidente en cuanto a su grosor y apariencia histológica.

En el neuroepitelio de ratón se ha descrito la presencia de FGF2 desde el estadio E9.5 [Nurcombe et al., 1993]; esta fue una de las principales consideraciones que tuvimos en cuenta para tomar este estadio como punto de partida para nuestro estudio. Aunque en futuros análisis podríamos explorar estadios previos para confirmar la ausencia de expresión, llama mucho la atención en nuestra exploración, un inicio brusco y profuso del marcaje para esta edad gestacional (Fig. 29). Además, da la sensación de que este es poco diferenciado, es decir, es un marcaje “en bloque”, que afecta a todas las vesículas, con muchas células positivas y con tendencia a ocupar varias capas.

En resumen, parece un marcaje no diferenciado por vesículas, en el que prácticamente todas las células que tienen contacto con la superficie apical tienen un citoplasma intensamente marcado.

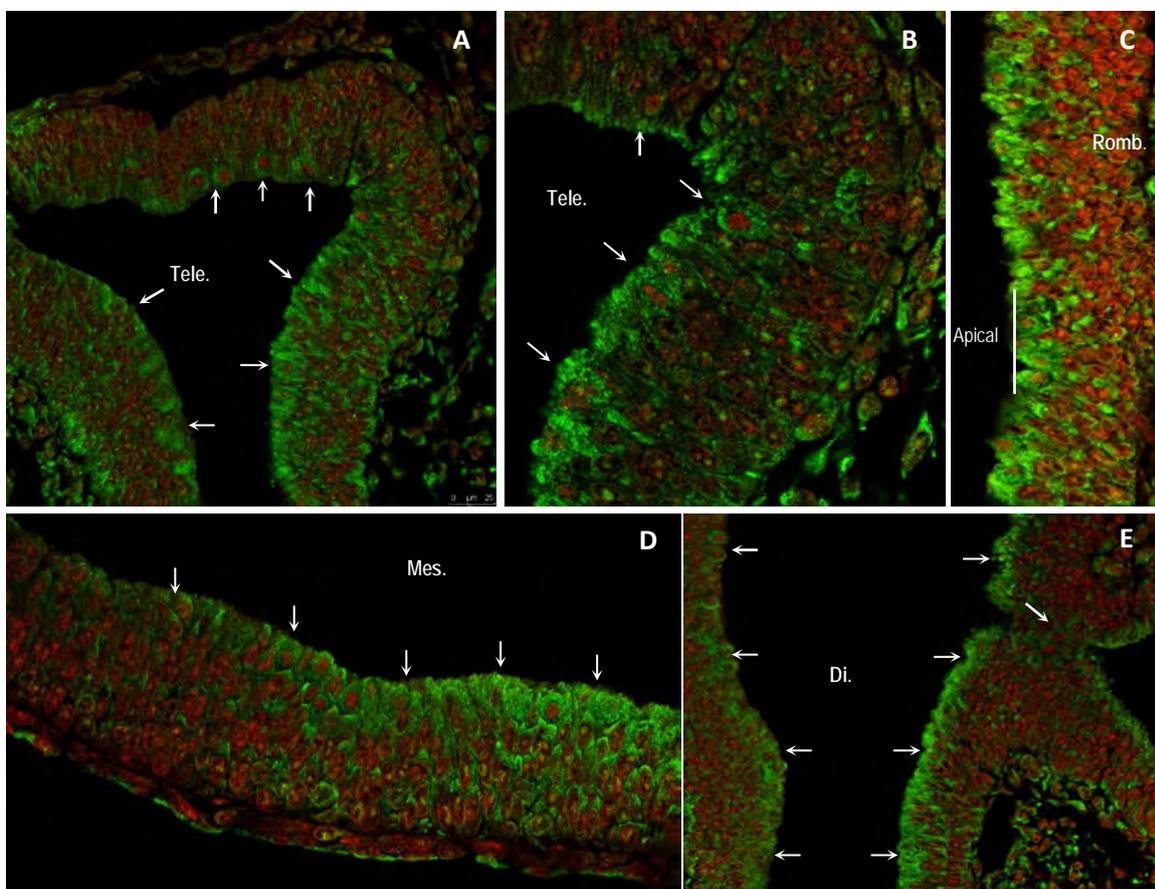


FIGURA 29| Patrón de expresión de FGF2 en secciones histológicas transversales de cerebro E9.5. La señal a-FGF2 corresponde al verde y en rojo se marcan los núcleos con TOTO[®]-3. Las flechas indican la localización del marcaje; es evidente que este se sitúa preferencialmente y de forma generalizada en torno a la cavidad ventricular. Se muestra telencéfalo (**A**) y a mayor aumento en (**B**), pared del rombencéfalo (**C**), mesencéfalo (**D**), diencéfalo en un corte a nivel de las vesículas ópticas (**E**). (Tele., telencéfalo; Di., diencéfalo; Mes., mesencéfalo; Romb., rombencéfalo).

2.2.2 Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E10.5.

En este estadio el cerebro ha evolucionado notablemente, empiezan a diferenciarse ya las vesículas secundarias, y se observa una especialización en el patrón de expresión por regiones.

En el prosencéfalo disminuye notablemente la tendencia al marcaje difuso en el neuroepitelio, descrito en el estadio previo, y la señal positiva para FGF2 se restringe a una serie de células apicales muy bien definidas (indicadas con flechas en la **Fig. 30**). De esta manera, a nivel de las vesículas telencefálicas es posible encontrar marcaje de células aisladas (**30A**), de grupos celulares que en ciertos segmentos pueden formar capas continuas (**Fig. 30B**) o más comúnmente discontinuas (**Fig. 30C**), en todos los casos directamente relacionadas con la superficie apical y, solo ocasionalmente se aprecia un marcaje difuso transparietal (**Fig. 30C**). El diencéfalo presenta un marcaje de similares características (**30E-F**)

El mesencéfalo muestra un patrón diferente (**Fig. 30G**). Es evidente la presencia de una capa casi continua de células apicales y además, en determinadas zonas se puede apreciar un marcaje transneuroepitelial, incluso asociado con marcaje a nivel basal. Este patrón se reproduce de forma estable en el mesencéfalo en este estadio, sugiriendo que se conserva un grado menor de diferenciación, mientras que en el cerebro anterior (telencéfalo y diencéfalo), parece que la capacidad de síntesis o de acumulación de FGF2 en general queda restringido a ciertas células en la superficie apical.

En el rombencéfalo (**30H**) se observan células FGF2 positivas dispuestas de manera regular pero discontinua en la superficie apical, asociadas en algunas zonas a un patrón difuso transparietal.

Las secciones sagitales confirman que en el prosencéfalo el marcaje es predominantemente apical (**Fig. 30I**) como habíamos descrito para los cortes transversales. Por otra parte, en el suelo del rombencéfalo, se observa de manera recurrente una banda central dentro del neuroepitelio, que coincide morfológicamente con los rombómeros, como se aprecia por las crestas que delimitan los mismos, sugiriendo un marcaje prácticamente transneuroepitelial (**Fig. 30J**). Por último, una imagen muy llamativa es la del suelo del diencéfalo-mesencéfalo en la que se aprecia un marcaje muy abundante (transneuroepitelial), asociado a un cúmulo de células intensamente marcadas en el mesénquima adyacente a la zona basal (**Fig. 30K**).

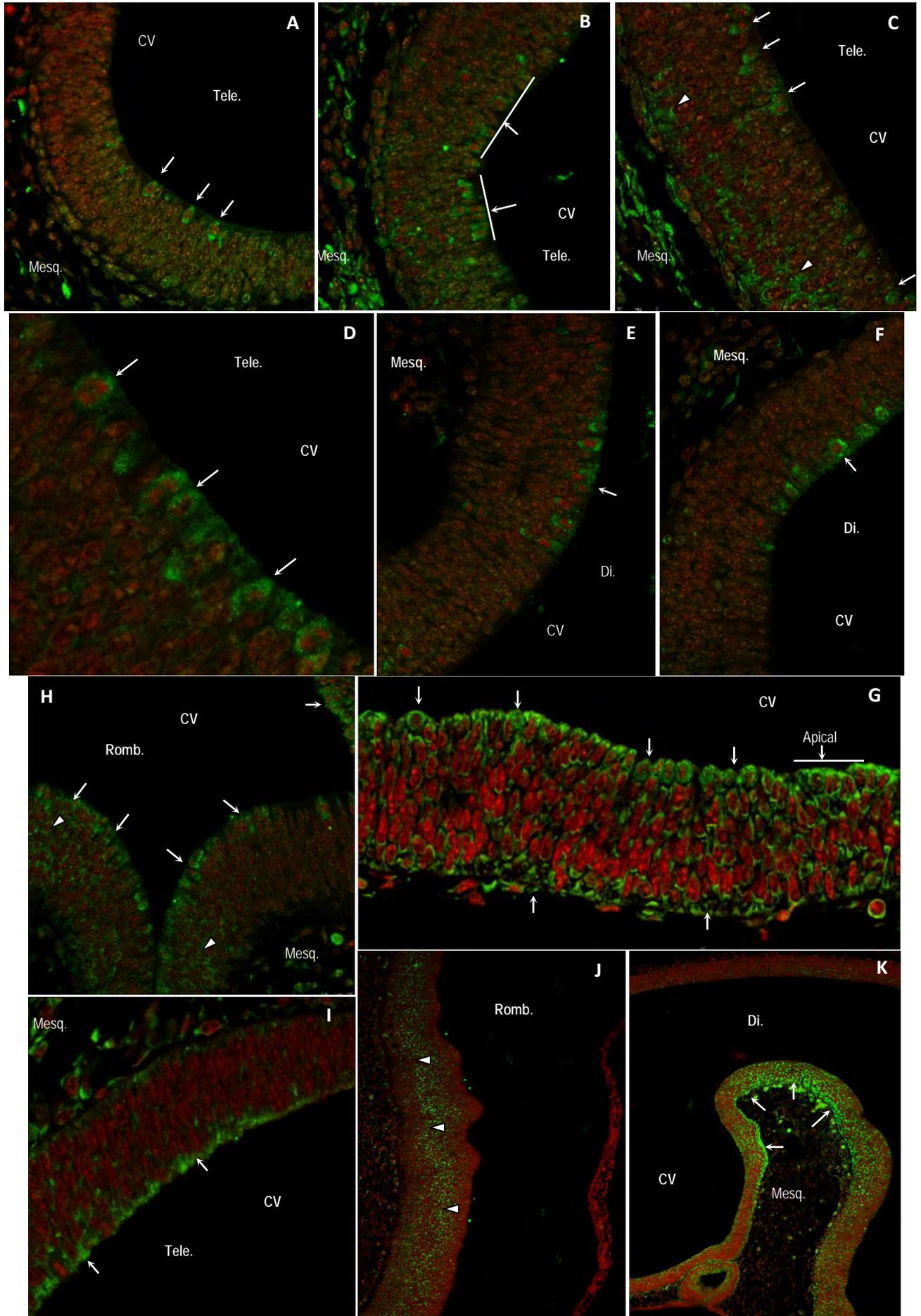


FIGURA 30| Patrón de expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E10.5. Las imágenes **A-G** muestran secciones histológicas transversales, mientras que en **I-K** se presentan cortes parasagitales. El inmunomarcaje a-FGF2 corresponde a la señal en verde; en rojo se marcaron los núcleos con TOTO[®]-3. Las flechas indican células o grupos de células marcados en posición apical, excepto en (**K**), donde se señala la región basal; las puntas de flecha señalan células marcadas intraparietales. En las vesículas telencefálicas (**A-D**) y diencefalo (**E-F**): se observa que mayoritariamente la señal positiva para FGF2 se localiza en la superficie apical del neuroepitelio. Una imagen a mayor aumento (**D**) permite identificar la localización fundamentalmente citoplasmática del FGF2. Mesencéfalo (**G**). Rombencéfalo (**H**). Las tres imágenes inferiores, corresponden a cortes parasagitales: Prosencéfalo (**I**), cuarto ventrículo (**J**), techo y suelo del diencefalo (**K**). (CV, cavidad ventricular; Mesq, mesénquima; Tele., telencefalo; Di., diencefalo; Mes., mesencéfalo; Romb., rombencéfalo).

Otra disposición particular de la expresión del FGF2 dentro del estadio E10.5 se da en el diencefalo justo cuando emite lateralmente las vesículas ópticas. A este nivel, aun conservando el patrón que hemos descrito, parece que se acumula una mayor cantidad de células en la superficie apical, llegando casi a formar una capa continua (**Fig. 31A,B,C**) y también se observan en ocasiones células con marcaje positivo en el mesénquima subyacente al neuroepitelio (frecuentemente asociado a un vaso o como parte de la pared de un vaso) (**Fig. 31A,C**). En **Fig. 31C** igualmente se observa este patrón en la pared del tallo óptico que es una continuidad de la pared del cerebro anterior. En las vesículas ópticas, se aprecia un patrón estándar en desarrollo temprano del esbozo ocular como el que se ve en la **Fig. 31D**. En esta estructura aparece un marcaje intensamente apical en las dos superficies que corresponden a la región apical del neuroepitelio que origina las futuras retina pigmentaria y retina neural.

La observación a mayor aumento permite apreciar un hecho muy significativo y es que estas células FGF2 positivas parecen coincidir con núcleos (marcados en rojo por TOTO-3) que presentan una intensa condensación de la cromatina, es decir que están experimentando un proceso de división (**Fig. 32**). Este hecho podría indicar que de alguna forma la secreción o acumulación de FGF2 dentro del citoplasma de la célula neuroepitelial está en relación directa con el proceso de replicación celular.

Así mismo, como una observación complementaria, se aprecia una tendencia al acúmulo de las células positivas para FGF2, en relación con la aparición de cambios de dirección en el neuroepitelio, de manera que en las zonas donde hay un plegamiento, bien sea en sentido apical o en sentido basal, parecen acumularse, o aparece una mayor concentración de este tipo de células (**30B,E,H**). Esto podría tener su explicación en el hecho de que en las zonas de plegamiento sería necesario un mayor índice de replicación celular para acomodarse al nuevo estado morfológico, es decir, habría una relación entre la replicación de las células neuroepiteliales y la morfogénesis (aparición de los límites entre vesículas cerebrales - compartimentalización del cerebro embrionario), aunque esto requeriría un análisis más sistemático.

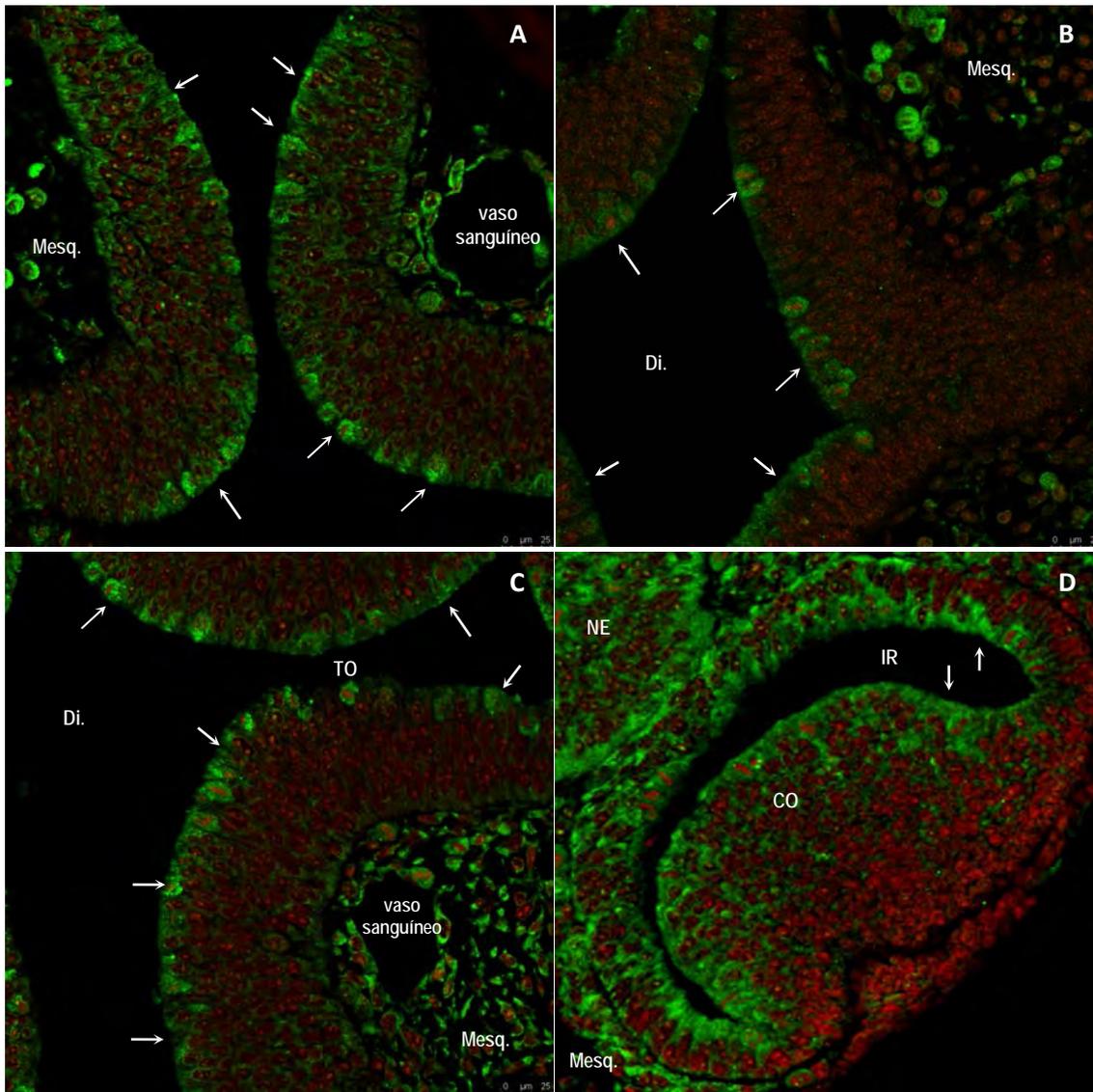


FIGURA 31| Expresión de FGF2 en cortes histológicos de cerebro embrionario E10.5, realizados a nivel de las vesículas ópticas. La señal para α -FGF2 corresponde al verde; los núcleos fueron teñidos con TOTO[®]-3. A este nivel, el neuroepitelio diencefálico (**A,B,C**) presenta abundante marcaje, esencialmente apical, que aparece en células aisladas como una capa discontinua de células apicales marcadas (flechas en **A,B**) que en algunos segmentos se transforma en una capa continua (flechas en **C**). En (**C**) se observa este patrón en la pared del tallo óptico (TO). Se observa además, en diversas zonas, un intenso marcaje del mesénquima embrionario y de las células endoteliales de la pared de los vasos sanguíneos (**A-C**). En (**D**) se presenta el esbozo embrionario del ojo, donde se observa una fuerte señal para FGF2 en la pared que circunda el espacio intrarretiniano, en toda su extensión. (CV, cavidad ventricular; Mesq, mesénquima; TO, tallo óptico; CO, copa óptica; IR, espacio intrarretiniano; NE, pared neuroepitelial).

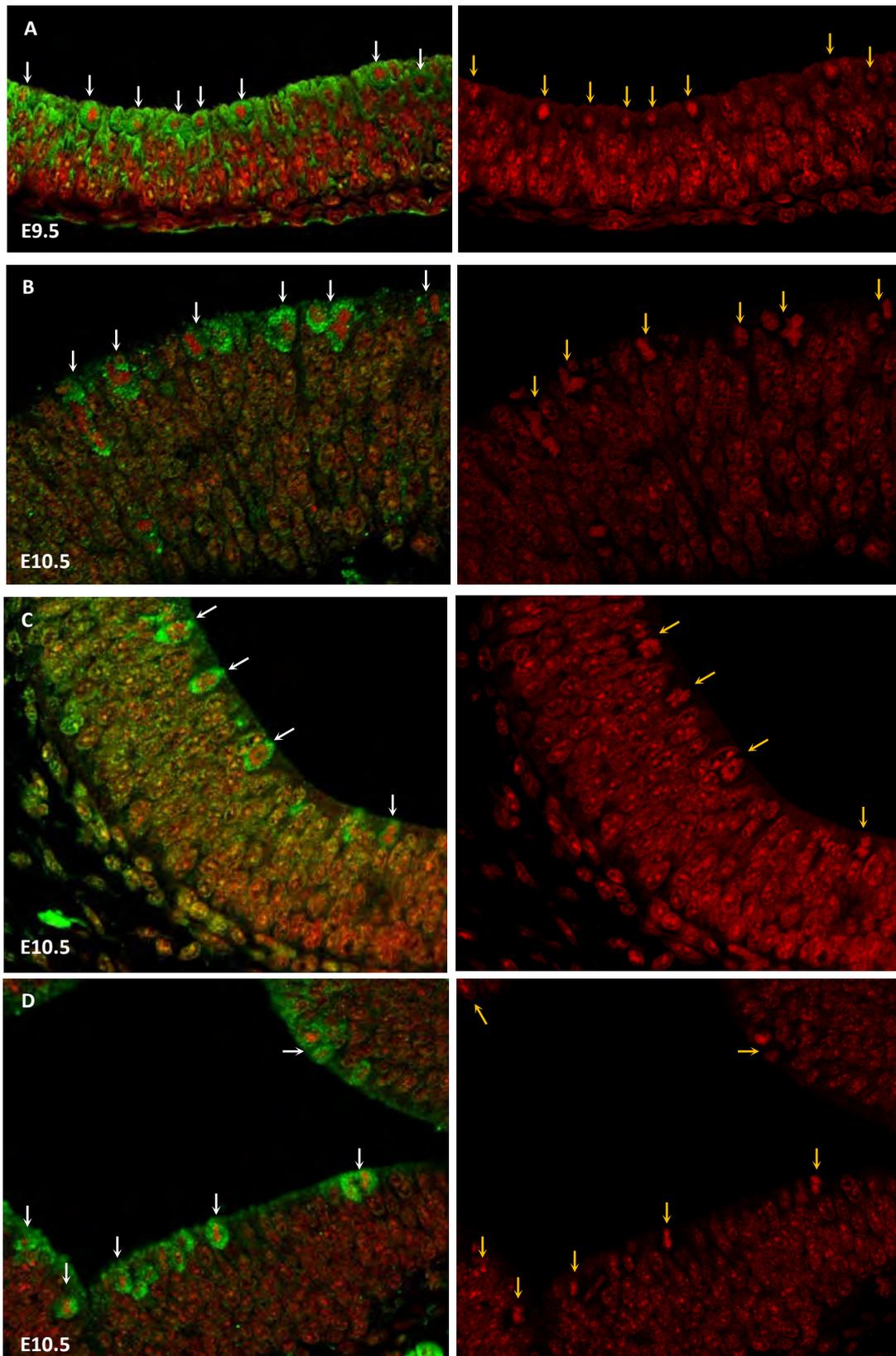


FIGURA 32| Marcaje anti-FGF2 en células neuroepiteliales en división celular. En las fotos de la derecha, el marcaje de los núcleos con TOTO[®]-3 (señal en rojo) permite identificar células con núcleos en fases mitóticas en la superficie apical neuroepitelial (indicados por flechas amarillas). Se observa que estas células siempre coinciden con células FGF2 positivas (señaladas con flechas blancas en las imágenes de la izquierda).

2.2.3 Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E11.5.

Este estadio se comporta como una etapa de transición en la cual el patrón descrito para E10.5, que podría ser definido como estadio estándar, se va “desdibujando” hacia un tipo de marcaje más disperso. Fundamentalmente se observa una sustancial disminución en la intensidad del marcaje y que está mucho menos relacionado con la superficie apical. Las células positivas para FGF2 se encuentran en el espesor del neuroepitelio de las tres vesículas cerebrales, constituyendo grupos celulares (patrón transneuroepitelial) que muestran un marcaje citoplasmático, apareciendo solo ocasionalmente células con un marcaje apical (**Fig. 33B-F**). La explicación a este cambio de patrón podría radicar en que la pared del cerebro embrionario ya se está volviendo demasiado gruesa como para poder ser gobernada únicamente por señales apicales. Esta ya deja de ser un epitelio pseudoestratificado y ya muchas células no están en contacto con el ventrículo. Es así como el propio neuroepitelio conservaría en estratos intermedios una secreción autocrina/paracrina ya no mediada por el eCSF intracavitario; sin embargo, se detecta una señal FGF2 positiva importante en el material precipitado en el interior de la cavidad ventricular (**Fig. 33A**), lo cual indicaría que continúa viable un mecanismo de señalización celular por FGF2 sobre el neuroepitelio, mediado por el eCSF.

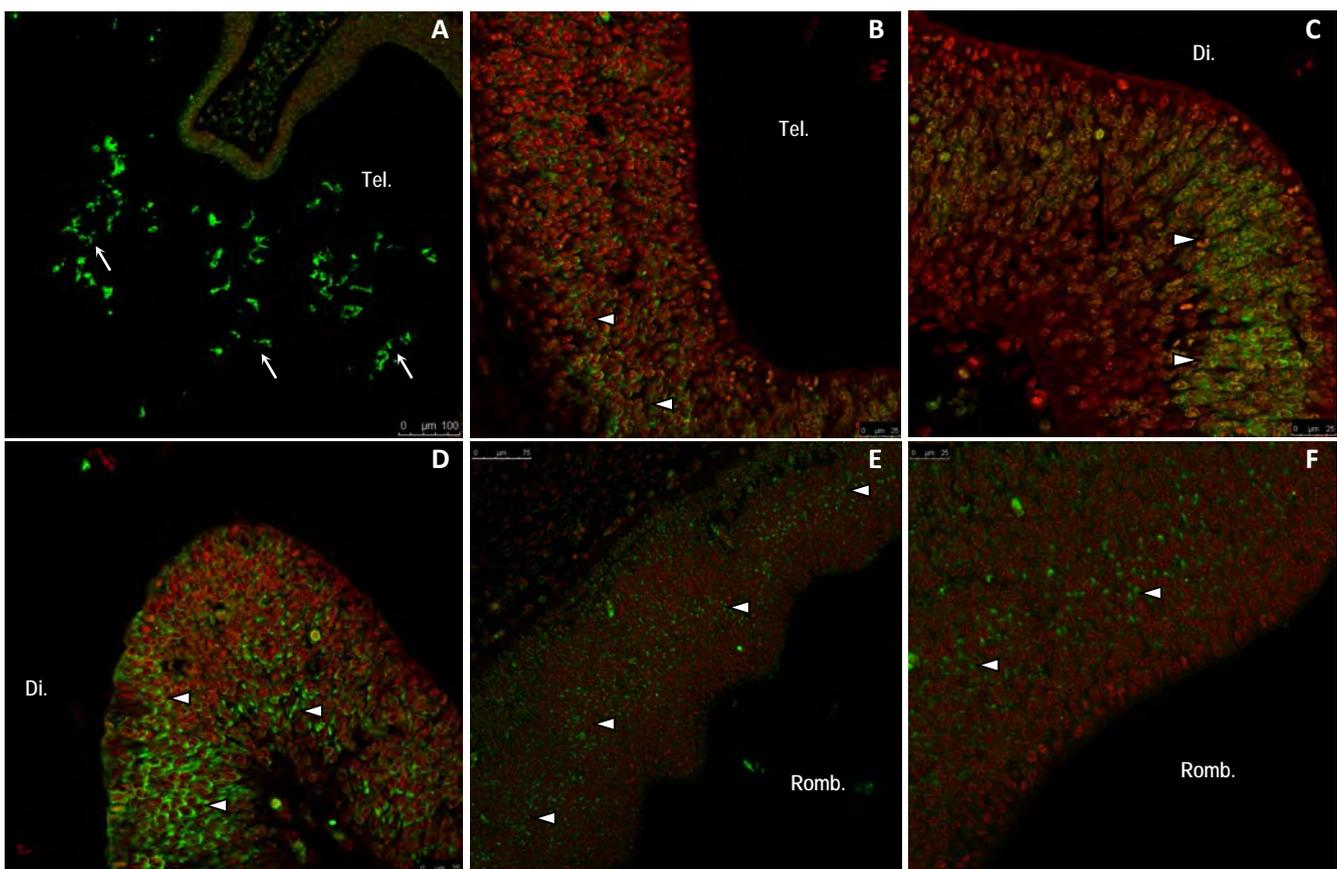


FIGURA 33| Expresión de FGF2 en secciones histológicas de cerebro embrionario E11.5. Se señala con puntas de flecha el marcaje positivo para FGF2 (verde), que muestra una distribución difusa transparietal para todas las vesículas. Obsérvese el marcaje intracavitario (flechas en **A**). **A-D** cortes transversales, **E-F** cortes parasagitales. (Tele., telencéfalo; Di., diencefalo; Romb., rombencéfalo).

2.2.4 Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E12.5.

El patrón de expresión para este estadio constituye la consolidación de las modificaciones que hemos descrito en E11.5. Se aprecia que el cerebro embrionario histológicamente presenta ahora una mayor complejidad. El neuroepitelio presenta un mayor grosor y una organización celular muy diversa. La señal para FGF2 es en general menos intensa (**Fig. 34A,C**), pero al observar a mayor aumento se hace evidente un marcaje citoplasmático, formando una especie de capa en la zona media del neuroepitelio, poco intensa y discontinua (**Fig. 34B,D**). Hay una mayor o menor intensidad de marcaje según las zonas. Esto se mantiene en las 3 vesículas cerebrales. Persiste la presencia de material FGF2 positivo intraventricular. En ocasiones se aprecia un marcaje apical intenso en áreas concretas del cerebro embrionario que coinciden con el suelo del rombencéfalo como se muestra en la **Fig. 34F**.

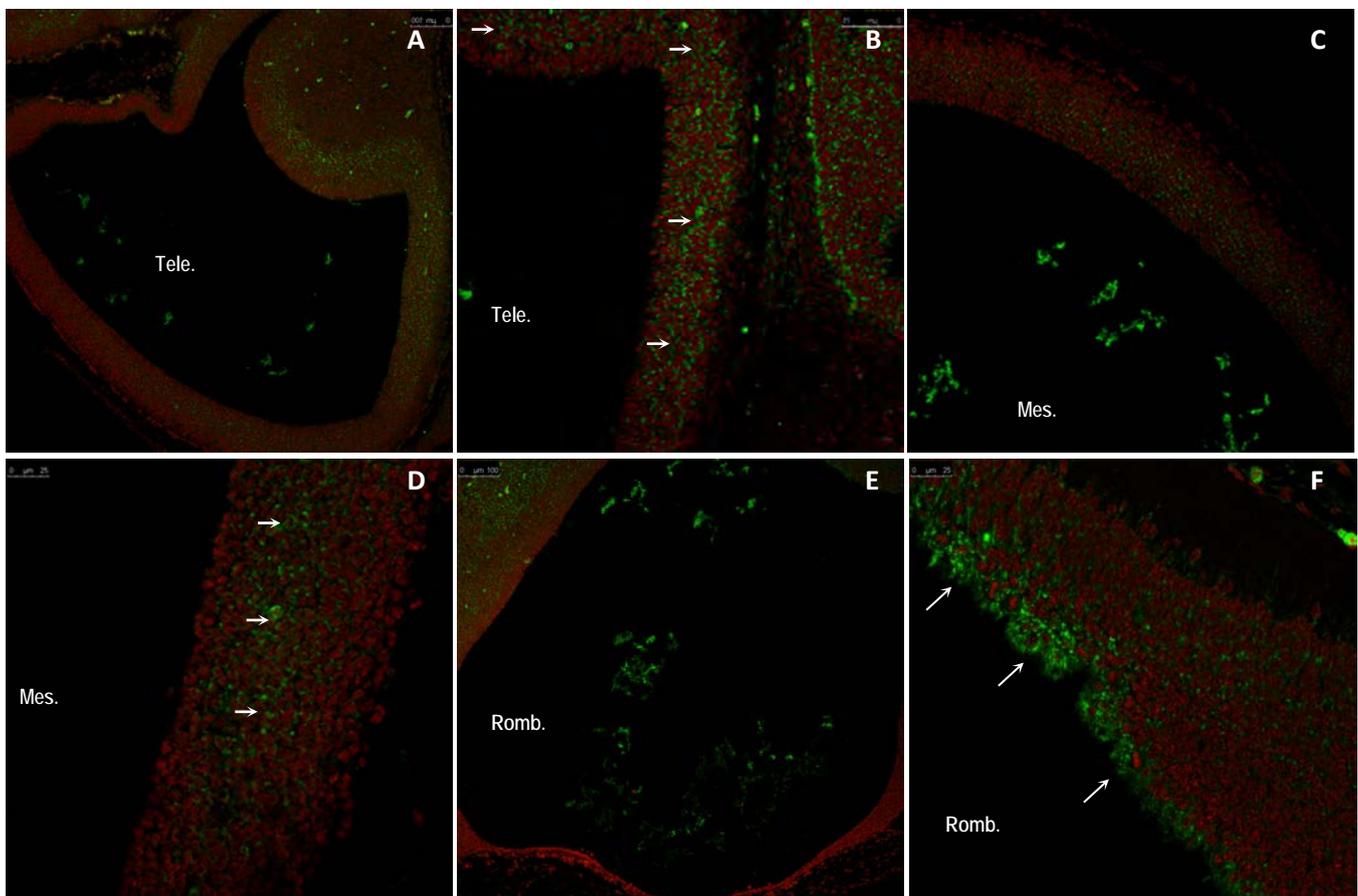


FIGURA 34 | Patrón de expresión del FGF2 en secciones histológicas de cerebro embrionario E12.5. . El inmunomarcaje a-FGF2 aparece en verde; en rojo se marcaron los núcleos con TOTO[®]-3. Las flechas indican la localización del marcaje en las diferentes vesículas, a bajo aumento (**A,C,E**) y a mayor magnificación (**B,D,F**). Su distribución es principalmente transneuroepitelial (**A-D**), excepto en localizaciones específicas que muestran señal intensa a nivel apical (**F**). Las secciones presentadas son parasagitales. (Tele., telencéfalo; Mes., mesencéfalo; Romb., rombencéfalo).

2.2.5 Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E13.5.

Continúa el patrón descrito para el estadio anterior. El marcaje de las células se va haciendo menos intenso. Aparecen muy pocas en la superficie apical y basal y la señal se restringe a una banda media en el neuroepitelio. Las células presentan ahora un marcaje muy discreto como se puede apreciar en la **Fig. 35**. Por otra parte, persiste el marcaje intracavitario muy intenso (**Fig. 35A**).

Se produce alguna excepción en regiones concretas como la zona presuntiva del órgano subcomisural, en la que aparecen estructuras reticulares marcadas con anticuerpo anti-FGF2 y que se depositan en la superficie apical (**Fig. 35B**) coincidiendo posiblemente con la secreción que hace este órgano, la fibra de Reissner o alguno de sus componentes como la OSC-espondina. Otra zona de marcaje diferencial son los plexos coroideos donde se mantiene un patrón en el que progresivamente va apareciendo más marcaje a nivel vascular (en la zona interna); ocasionalmente parece que se precipita algo de material, adosado a la superficie epitelial, pero extracelular; sin embargo, el neuroepitelio adyacente sí parece mostrar cierto marcaje celular apical (**Fig. 35C**). No aparecen células llamativamente marcadas con anti-FGF2 en su citoplasma.

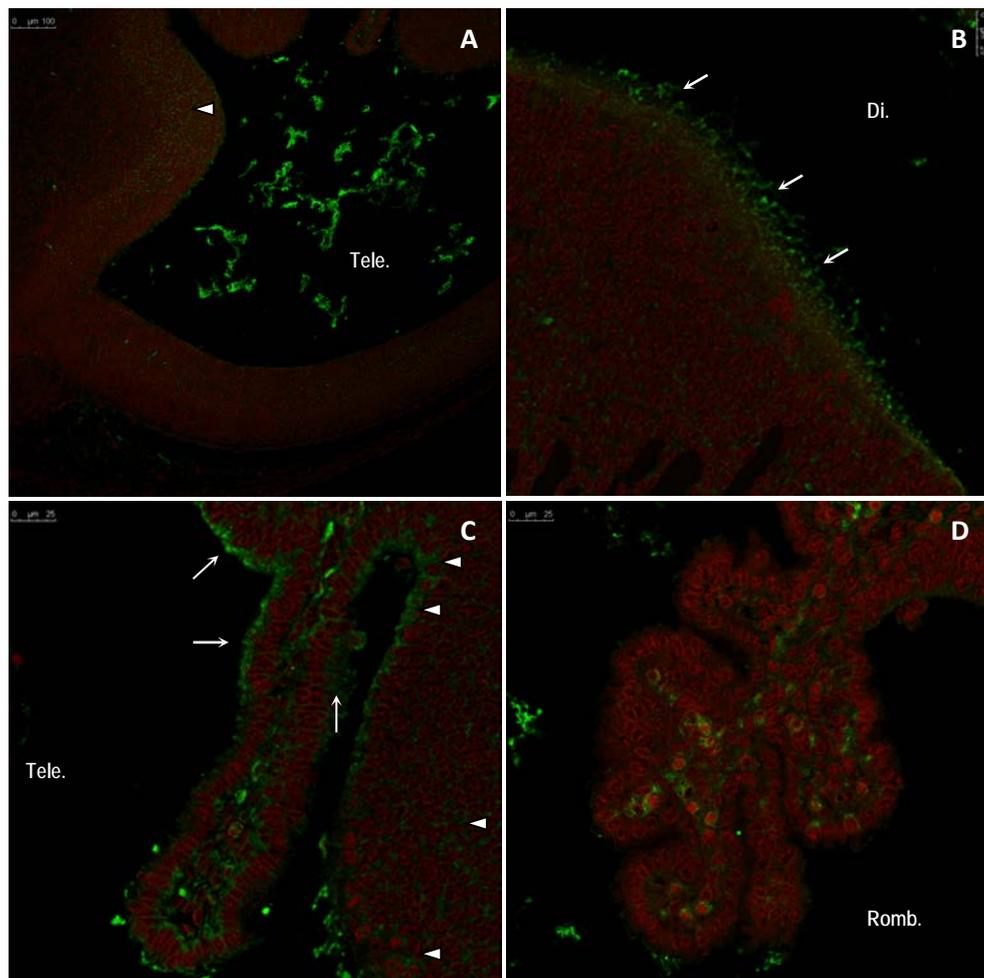


FIGURA 35 | Expresión de FGF2 en secciones histológicas de cerebro embrionario E13.5. El marcaje para FGF2 aparece con una distribución difusa intraparietal (puntas de flecha, señal en verde) que en este estadio aparece bastante disminuida. Se observa abundante material intracavitario positivo (A). El material precipitado en la cavidad se sitúa en algunas zonas de la superficie apical (flechas en B,C). La imagen (B) corresponde al techo del diencéfalo, donde se desarrolla la comisura posterior y órgano subcomisural. Se muestran igualmente los plexos coroideos de los ventrículos laterales (C) y cuarto ventrículo (D). (Tele., telencéfalo; Di., diencéfalo; Romb., rombencéfalo).

2.2.6 Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E14.5.

Continuando con el estudio temporal del patrón de expresión, observamos que en E14.5, cuando ya la complejidad de las estructuras encefálicas está aumentando ostensiblemente, se mantiene el patrón de expresión ya descrito para estadios previos. Fundamentalmente se trata de una expresión intraneuroepitelial, que aparece en células dispersas en la zona media (Fig. 36A). Persiste además el intenso marcaje dentro de la cavidad y con frecuencia tiende a asociarse con la superficie apical (Fig. 36B, C). Sin embargo, en este estadio pueden aparecer marcajes específicos en determinadas localizaciones: En la región posterior del mesencéfalo aparece un marcaje transneuroepitelial bastante pronunciado, junto con un marcaje apical intenso que, aunque en algunas zonas parece tratarse de una precipitación del material en la superficie apical (Fig. 36B, C), en este caso aparece rodeando los núcleos en una monocapa que no llega a ser completa, es decir, solo marca la mitad apical de las células que están en contacto con el eCSF (Fig. 36D, E). Esto último podría indicar una secreción muy localizada o bien una captación del FGF2 presente en el eCSF. Igualmente, en el techo y el suelo del diencéfalo en el cerebro anterior, aparecen algún marcaje apical intracelular, siempre en zonas convexas (Fig. 36F, G). Finalmente, en cuanto a los plexos coroideos, seguimos sin observar un patrón claro que indique que el citoplasma de sus células epiteliales acumula FGF2, pero al igual que en el suelo y techo del diencéfalo, aparece un marcaje intracitoplasmático apical en el neuroepitelio adyacente al plexo coroideo (Fig. 36H, I).

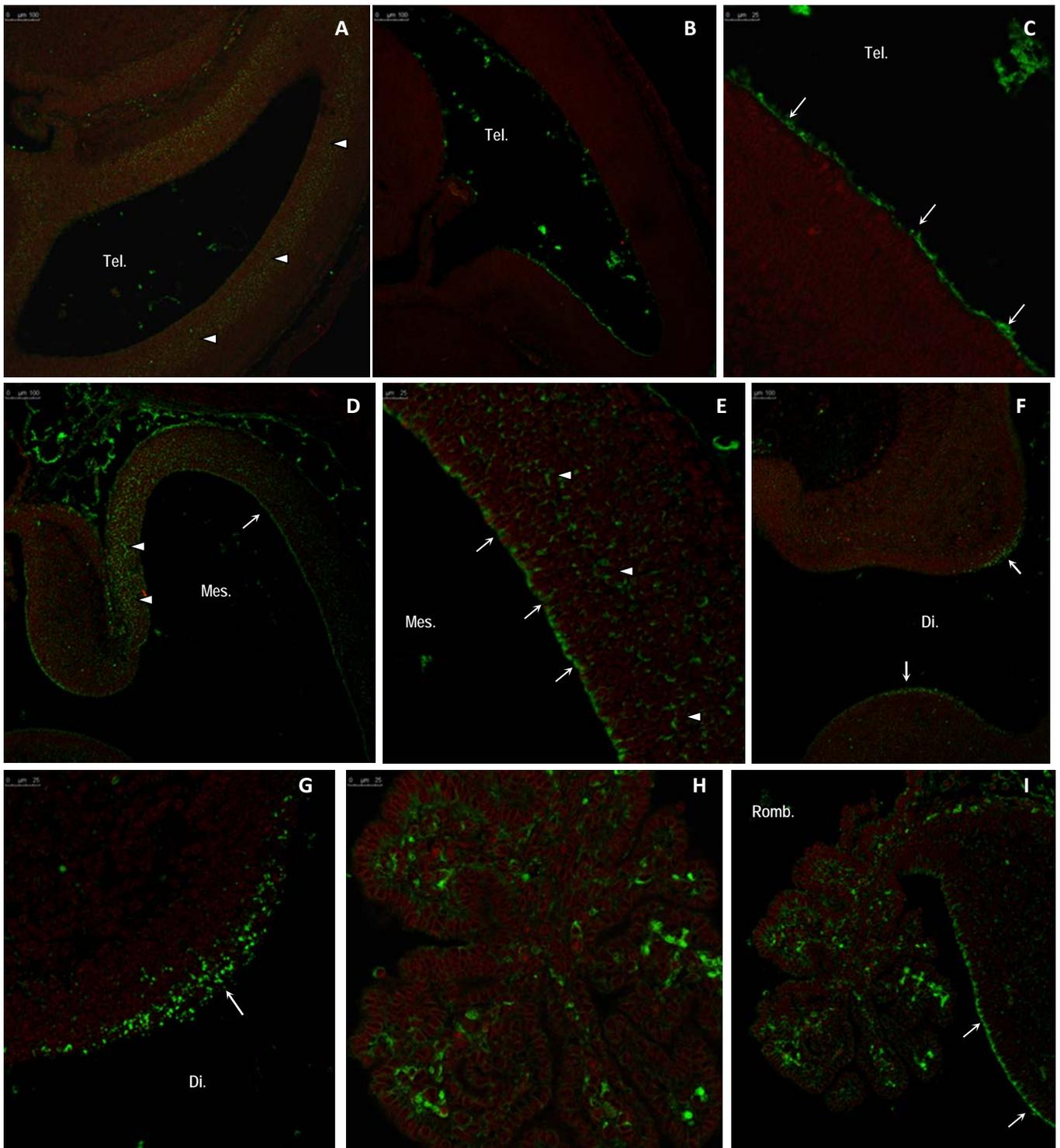


FIGURA 36 | Patrón de expresión de FGF2 en secciones histológicas de cerebro embrionario de ratón E14.5. La señal positiva para FGF2 aparece en verde, mientras que en rojo se muestran los núcleos marcados con TOTO[®]-3. Las puntas de flecha indican hallazgos intraparietales y las flechas, el marcaje asociado con la superficie apical. Las imágenes (B,D,F) se presentan a mayor aumento en (C,E,G). (Tele., telencéfalo; Di., diencefalo; Mes., mesencefalo; Romb., rombencefalo).

2.2.7 Expresión de FGF2 en cerebro embrionario de ratón E15.5 y E16.5.

Con respecto a los estadios más avanzados que hemos estudiado (E15.5 y E16.5), no observamos cambios significativos con respecto a lo hallado a los 14.5 d. Persiste un patrón más bien discreto, fundamentalmente localizado en la zona media del tejido cerebral, posiblemente en relación con la organización de las capas y núcleos que se desarrollan en él (**Fig. 37**). Tampoco apreciamos que haya modificaciones en cuanto al marcaje intracavitario, que persiste, siendo bastante intenso (**Fig. 37A, B, D**). Los plexos coroideos siguen con el mismo patrón que hemos descrito previamente, es decir, no hay marcaje de sus células epiteliales y sí en la base de los mismos (**Fig. 37F**). Ocasionalmente, en el neuroepitelio aparece algún marcaje apical que usualmente es fruto de la condensación de material intracavitario (**Fig. 37B, E**), pero en algunas ocasiones parece que sí es un marcaje específico intracelular que curiosamente solo afecta las porciones laterales y apicales de las células (**Fig. 37C, D**). Como se mencionó en estadios anteriores, igualmente podría sugerir un proceso de captación e internalización de FGF2 porque está en relación con la aparición de puntos marcados entre las células adyacentes a la cavidad ventricular.

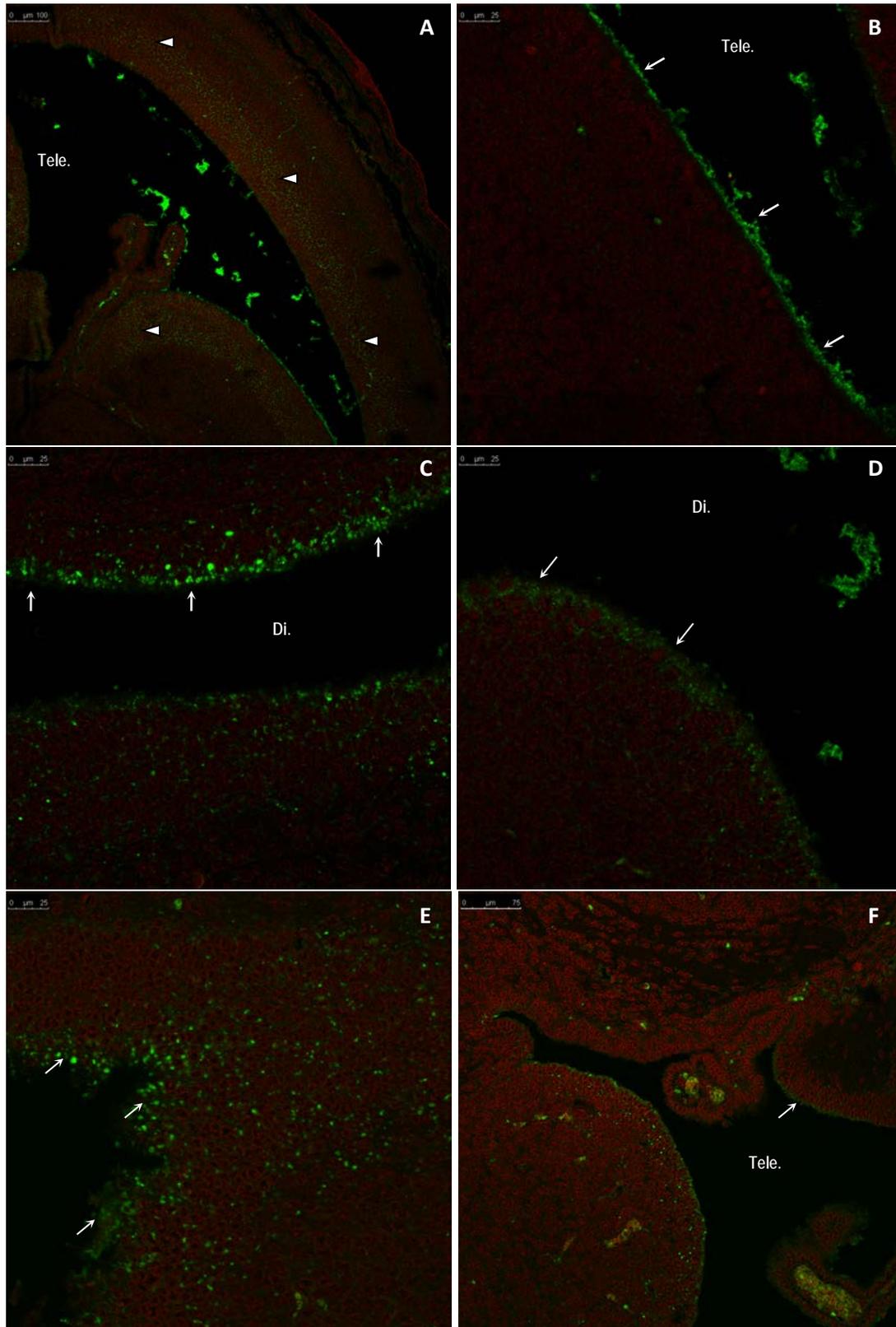


FIGURA 37 | Patrón de expresión de FGF2 en cerebro embrionario E15.5 y E16.5. Las puntas de flecha señalan el patrón general difuso transneuroepitelial (señal en verde) que predomina en estos estadios. La señal en rojo corresponde al marcaje nuclear con TOTO®-3. Las flechas indican los hallazgos apicales que aparecen en regiones específicas. En (B,E), el precipitado intracavitario marcado está ligado a la superficie apical, mientras que (C,D,F) muestra un patrón apical citoplasmático. (Tele., telencéfalo; Di., diencefalo).

2.3 CONFIRMACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA AUSENCIA DE FGF2 EN CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN FGF2 KNOCK-OUT.

Nuestro protocolo de inmunohistoquímica anti-FGF2 fue desarrollado simultáneamente y bajo las mismas condiciones en secciones histológicas de cerebro embrionario de ratón FGF2 knock-out (FGF2 KO) y Wild-type (WT) en diversos estadios del desarrollo, confirmándose mediante esta técnica la ausencia total de expresión de la proteína en los embriones homocigotos para la mutación (FGF2 $-/-$) (**Fig. 38**), y contribuyendo así mismo, al constituir un verdadero control negativo, a validar la especificidad del inmunomarcaje obtenido en la elaboración de nuestro análisis del patrón de expresión de FGF2 en cerebro de embriones WT.

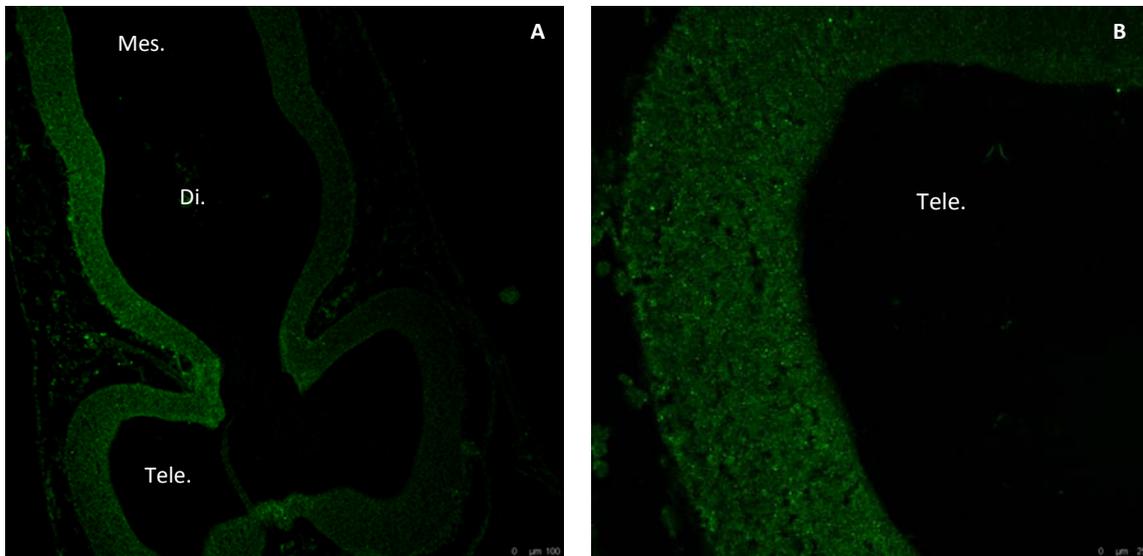


FIGURA 38 | Inmunohistoquímica anti-FGF2 en secciones histológicas transversales de cerebro embrionario de ratón FGF2 KO en estadio E11. En el corte transversal (A) es posible visualizar la pared neuroepitelial correspondiente a 3 vesículas cerebrales diferentes. La señal observada en verde (anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488) es homogénea en toda la extensión de la pared y claramente inespecífica. La imagen a mayor magnificación presentada en (B), correspondiente a una de las vesículas telencefálicas, confirma la ausencia de inmunomarcaje específico. (Tele., telencefalo; Di., diencefalo; Mes., mesencefalo).

2.4 RESUMEN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL FGF2 POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN.

En resumen, el patrón de marcaje que hemos descrito mediante inmunohistoquímica para el FGF2 en cerebro embrionario inicia en el estadio E9.5, y se intensifica de una forma más notable en el estadio E10.5 que es donde pudiera producirse la secreción más intensa y posiblemente el vertido más intenso hacia la cavidad. Destaca además una relación espacial directa de las células FGF2 positivas con núcleos con cromatina condensada, en fase mitótica. Posteriormente este patrón se desdibuja y empieza a desaparecer progresivamente el marcaje apical, quedando este restringido a zonas específicas. El marcaje intracavitario por su parte se mantiene en todos los estadios, pudiendo actuar como almacén de FGF2. El patrón de marcaje neuroepitelial parece que permanece entonces, en gran parte, limitado a las capas medias donde se están desarrollando capas neuronales. El patrón parece que se estabiliza a partir de E12.5 y se mantiene como un patrón radicalmente distinto a los estadios más tempranos que sugerían un proceso de secreción intensa hacia la cavidad. A partir de este punto parece que se trata de un fenómeno de señalización por FGF2 sobre la superficie apical o de internalización de la proteína. La expresión de FGF2 por parte del cerebro embrionario del ratón sería entonces un proceso regulado temporalmente, que comenzaría prácticamente con el cierre del tubo nervioso y cuya desaparición paulatina está probablemente relacionada con un cambio en la complejidad y grado de desarrollo de este órgano. Desde el punto de vista espacial, el marcaje está presente en las tres zonas estudiadas del esbozo cerebral, es decir, no se excluye ninguna vesícula, pero podemos decir que el patrón de distribución no es homogéneo, existiendo una distribución regional relacionada con el estadio.

3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL FGFR1 EN EL CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN.

Como hemos comentado en la introducción, el FGF2 ejerce su acción actuando principalmente a través del receptor tipo tirosina quinasa FGFR1. Por lo tanto, decidimos valorar la expresión de este receptor en el cerebro embrionario en diferentes momentos del desarrollo. Para esto hemos usado un anticuerpo monoclonal que reconoce principalmente FGFR1 y en menor medida FGFR2 (que también tiene cierta afinidad por el FGF2) [Venkateswaran et al., 1992]. Hemos centrado nuestro análisis de expresión de FGFR1 en los estadios que en nuestro estudio previo corresponden al momento de máxima producción o presencia de FGF2 en el cerebro embrionario.

El marcaje puede ser descrito como un patrón punteado grueso que ‘salpica’ el neuroepitelio de manera difusa (**Fig. 39C, E**) aunque frecuentemente se concentra de forma visible, a lo largo de la superficie apical neuroepitelial (**Fig. 39A, B**).

Por otra parte, no parece existir un patrón regional diferencial por vesículas, presentándose un marcaje de iguales características que se dispersa a lo largo de toda la pared neuroepitelial. Sin embargo, se hace evidente una mayor densidad de marcaje en torno a la cavidad ventricular, ocupando la mayoría de las veces hasta la mitad del espesor del neuroepitelio, como se puede apreciar en la **Fig. 39**.

Este patrón de expresión claramente difiere del descrito para el FGF2 en la sección anterior, lo que induce a pensar que la población de células diana para FGF2 (células FGFR1 positivas) podría ser diferente de aquella que expresa este factor.

En cuanto a la evolución temporal, en primer lugar, detectamos la presencia de un marcaje específico para FGFR1 en neuroepitelio desde el estadio inicial de nuestro estudio, es decir E9.5, alcanzando en E10.5 su máxima expresión, momento en el cual, se estabiliza, no presentando entonces llamativas variaciones temporales en estadios posteriores.

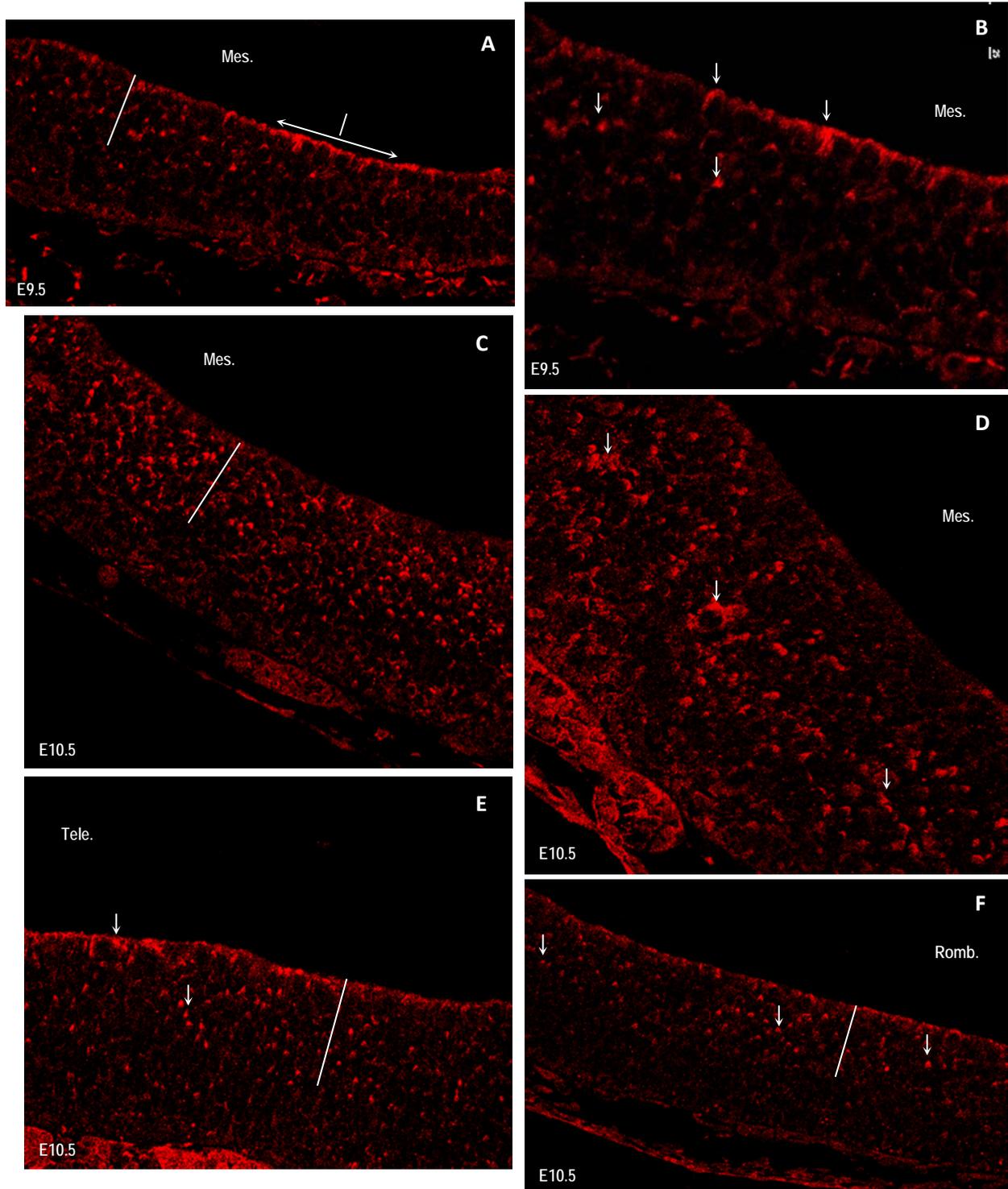


FIGURA 39| Inmunohistoquímica anti-FGFR1 en secciones histológicas transversales de cerebro embrionario de ratón (E9.5 – E10.5). Las flechas señalan algunos puntos del neuroepitelio donde se localiza señal positiva para FGFR1 (fluorescencia en rojo), en diferentes vesículas cerebrales. Las líneas blancas indican la región de la pared neuroepitelial donde se distribuye predominantemente el marcaje. En (B,D) se presentan imágenes a mayor aumento (63X). (Tele., telencéfalo; Mes., mesencéfalo; Romb., rombencéfalo).

4. BLOQUEO IN VITRO DE LA ACTIVIDAD DEL FGF2 DEL eCSF.

Con el fin de valorar *in vitro* la actividad biológica que ejerce el FGF2 presente en el eCSF sobre el comportamiento de las células neuroepiteliales, se llevaron a cabo experimentos de inmunobloqueo del FGF2 en cultivos organotípicos de mesencéfalo de ratón E10.5 suplementados con eCSF. Decidimos centrar nuestro estudio en el análisis de la replicación celular y diferenciación neuronal de los precursores neuroepiteliales.

4.1 ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN EXPLANTES DE NEUROEPITELIO.

Para evaluar el nivel de proliferación, la BrdU fue añadida al medio 1 hora antes de la finalización del cultivo. Los resultados presentados corresponden al conteo de núcleos positivos para el inmunomarcaje anti-BrdU (núcleos en color marrón) en imágenes adquiridas a 20X y 1.5X de magnificación en cortes transversales de explantes mesencefálicos (n=18 para cada una de las tres condiciones de cultivo) (**Fig. 40A**). La inmunohistoquímica demostró una correcta incorporación de la BrdU en todos los casos.

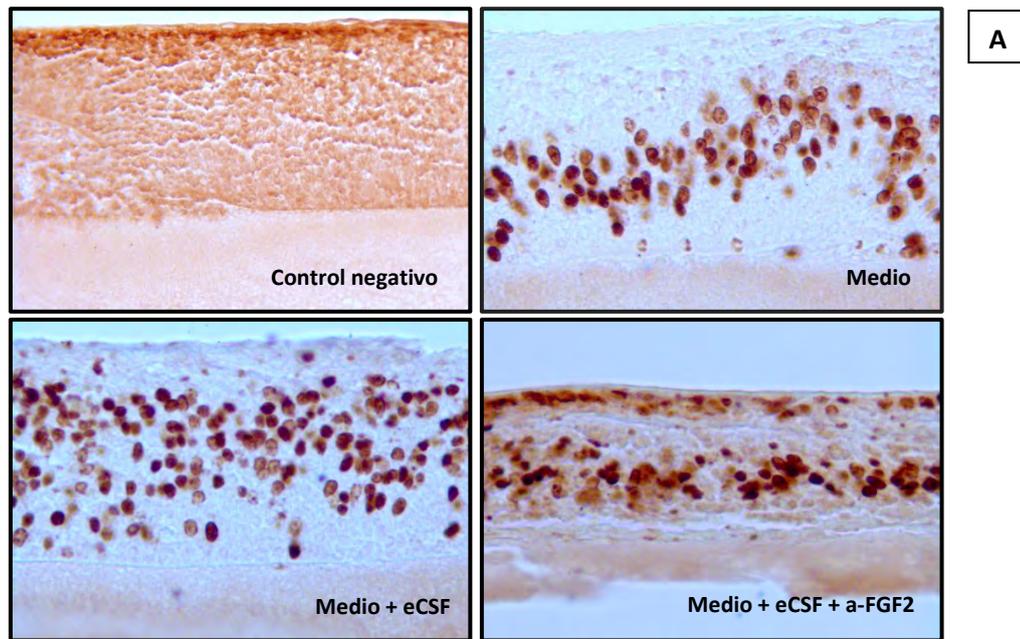
El estudio de proliferación (**Fig. 40B**) demuestra en primer lugar un incremento del 43% en el número de núcleos BrdU positivos en el grupo de explantes cultivados en presencia de eCSF, con respecto al grupo control. Igualmente se observa que la presencia de anticuerpo neutralizante de FGF2 en los cultivos de neuroepitelio tratados con medio + eCSF no solo evita dicho aumento de la proliferación celular sino que además ocasiona una disminución del 20% del número de núcleos BrdU positivos en comparación con el control. El análisis de la varianza (ANOVA) y posterior prueba de Tukey permitió establecer que existe una diferencia estadísticamente significativa (95% de confiabilidad) en el número de núcleos BrdU positivos entre los tres grupos de estudio (**Fig. 40C**).

Estos resultados confirman el papel del FGF2 del eCSF de ratón como mitógeno sobre precursores neuroepiteliales.

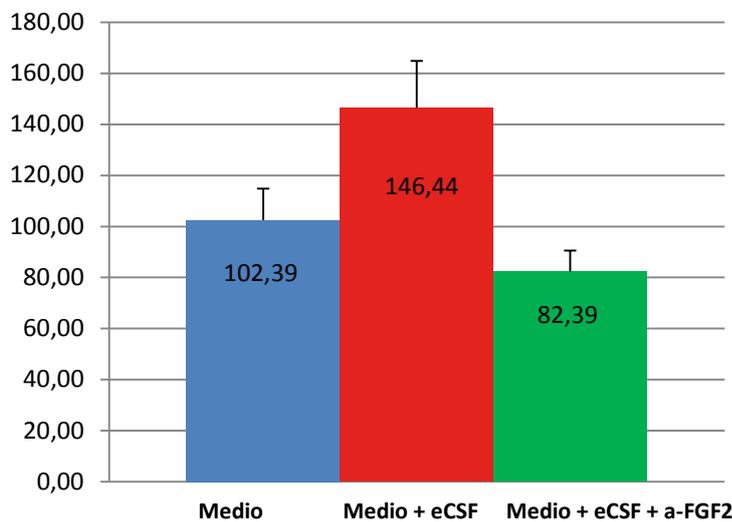
4.2 ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN EXPLANTES DE NEUROEPITELIO.

El estudio de diferenciación neuronal en los explantes cultivados se llevó a cabo mediante la valoración por inmunofluorescencia indirecta de la expresión de beta-III-tubulina (TUJ1), un marcador citoplasmático de neuronas inmaduras. En el recuento de las células positivas para este marcador se incluyeron únicamente las células marcadas presentes en la región adyacente a la superficie basal del neuroepitelio, excluyendo así cualquier marcaje apical que normalmente no se presenta en condiciones fisiológicas. Además se contabilizaron solo las células cuyo núcleo estuviera rodeado en al menos un 50% por la señal fluorescente (**Fig. 41A**).

En nuestro análisis se encontró que los dos grupos cultivados en presencia de eCSF presentaron un incremento estadísticamente significativo (cerca al 40%) en el número de células positivas para beta-III-tubulina en comparación a los explantes control mantenidos únicamente en medio de cultivo. Por otra parte, el tratamiento con un anticuerpo neutralizante del FGF2 no modificó de forma significativa el aumento en la actividad neurogénica asociado a la presencia de eCSF (**Fig. 41B,C**).



A

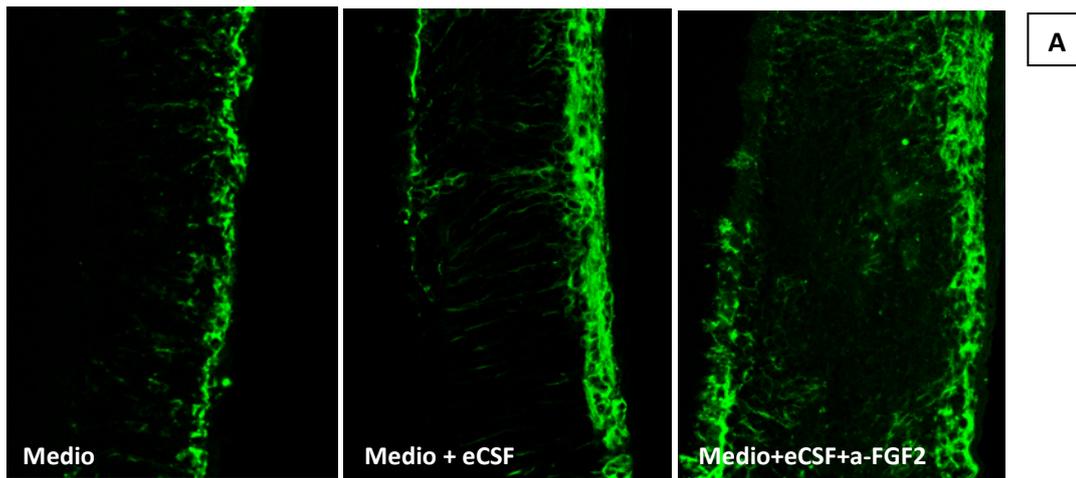


B

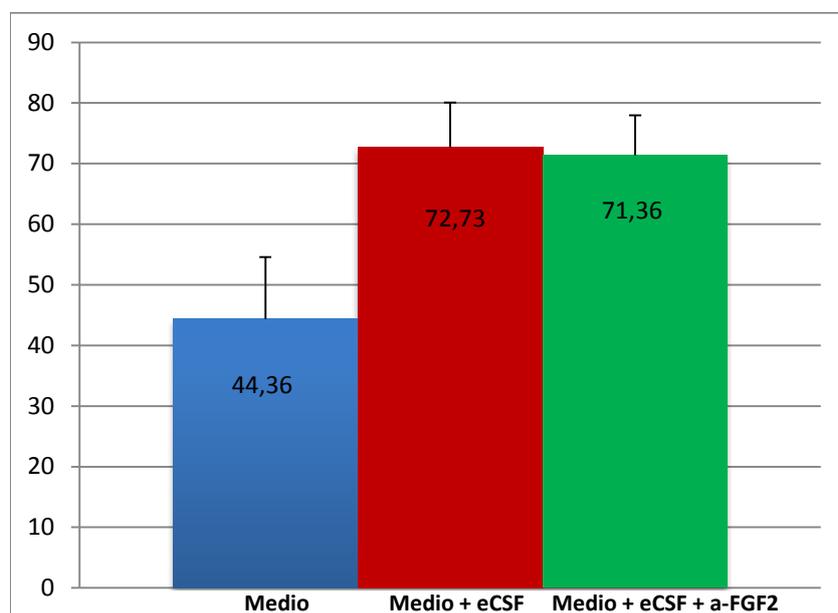
Grupos	N	Promedio	SD	Varianza
Medio	18	102.39	12.39	153.66
Medio + eCSF	18	146.44	18.35	336.73
Medio + eCSF + a-FGF2	18	82.39	8.2	67.31
Valor Prueba F	Valor P		HSD	
104.0	1.01 x 10 ⁻¹⁸		10.93	
Diferencia entre grupos				
	Medio + eCSF		Medio + eCSF + a-FGF2	
Medio	-44.05 (<i>significativa</i>)		20 (<i>significativa</i>)	
Medio + eCSF	-		64.05 (<i>significativa</i>)	

C

Figura 40| A. Inmunohistoquímica anti-BrdU en explantes de neuroepitelio cultivados durante 24 horas en 3 condiciones diferentes. La incubación en ausencia de anticuerpo primario demuestra ausencia de marcaje inespecífico. B. El promedio del recuento de núcleos BrdU positivos para cada una de las 3 condiciones de cultivo muestra la presencia de diferencias en la actividad proliferativa. C. El análisis de varianza confirma que existe una diferencia estadísticamente significativa en el número de núcleos BrdU positivos entre los tres grupos de estudio.



A



B

Grupos	N	Promedio	SD	Varianza
Medio	11	44.36	10.21	104.25
Medio + eCSF	11	72.73	7.33	53.82
Medio + eCSF + a-FGF2	11	71.36	6.62	43.85
Valor Prueba F	Valor P		HSD	
41.8	2.11 x 10 ⁻⁹		8.63	
Diferencia entre grupos				
	Medio + eCSF		Medio + eCSF + a-FGF2	
Medio	-28.36 (<i>significativa</i>)		-27.00 (<i>significativa</i>)	
Medio + eCSF	-		1.36 (<i>No significativa</i>)	

C

Figura 41 | Estudio de la actividad neurogénica en cultivos organotípicos de neuroepitelio mediante inmunohistoquímica anti-beta-III-tubulina. El análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey demuestran diferencias estadísticamente significativas en el promedio de células marcadas para los dos grupos muestras expuestas a eCSF, con respecto al grupo control; sin embargo, no existe diferencia significativa entre el grupo tratado solo con *medio + eCSF* y aquel expuesto a *medio + eCSF + a-FGF2*.

Con la finalidad de determinar si la deficiencia de FGF2 tiene un impacto negativo sobre la replicación/expansión de las NPCs del nicho embrionario durante las fases más tempranas del desarrollo cerebral, que coinciden con el pico de máxima expresión del FGF2 en el cerebro embrionario de ratón, se llevó a cabo un estudio de proliferación mediante marcaje con BrdU en embriones FGF2 knock-out (homocigotos para la mutación) y wild-type, de los estadios E9.5 y E10.5.

Se obtuvieron para cada estadio, 5 embriones de ratón FGF2 KO (grupo experimental) y 5 embriones de ratón WT (grupo control) a partir de ratonas previamente tratadas con bromodeoxiuridina, como se describe en la sección 1.4 de materiales y métodos. Luego se procedió al procesamiento histológico y se desarrolló inmunohistoquímica anti-BrdU en secciones histológicas transversales de las regiones de interés (paredes laterales de telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo) obteniéndose un recuento de núcleos marcados en las imágenes tomadas del neuroepitelio. La inmunohistoquímica demostró la correcta incorporación de BrdU en todos los casos.

5.1 ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN DEL NEUROEPITELIO TELENCEFÁLICO DE RATÓN (E9.5 Y E10.5).

Se seleccionaron aquellos cortes en los que se observaba las cavidades telencefálicas de mayor tamaño con el fin de que en todos los embriones se realizara la valoración aproximadamente en el mismo nivel. Para el recuento de los núcleos marcados se tomaron fotos (40X) de dos cortes de la región estudiada por cada portaobjetos seleccionado, adquiriendo por cada corte una imagen del neuroepitelio de cada una de las paredes laterales del telencéfalo. De esta manera, para esta zona se llevó a cabo el contaje de núcleos BrdU positivos en 4 imágenes diferentes por cada uno de los embriones, completándose un total de 20 imágenes por cada condición (experimental y control).

El resultado del análisis de proliferación en los estadios E9.5 y E10.5 está representado en las **figuras 42 y 43** respectivamente. En ambos estadios se detectó una disminución en el número de núcleos positivos en los embriones de ratón mutante con respecto a los embriones wild-type. La magnitud de esta disminución fue del 21.7% para E9.5 y de cerca del 36.5% para E10.5, siendo en ambos casos estadísticamente significativa ($P < 0.001$).

Al analizar las imágenes detectamos además, que en el caso de los embriones de E10.5, las paredes del neuroepitelio de las vesículas telencefálicas del FGF2 KO presentaban, de una manera recurrente, un menor grosor que las paredes de los embriones WT (**Fig. 43A,B**).

5.2 ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN DEL NEUROEPITELIO MESENCEFÁLICO DE RATÓN (E10.5).

De forma similar a como se procedió con el prosencéfalo, se adquirieron para cada grupo de estudio 20 imágenes de las paredes laterales del mesencéfalo, a partir de 5 embriones diferentes.

Al realizar el recuento se observó una diferencia significativa entre la condición experimental y el grupo control, obteniéndose un descenso del 40% en el número de núcleos marcados para embriones deficientes en FGF2 en comparación con el WT. (**Fig. 44 C,D**).

Nuevamente se aprecia en la mayoría de las imágenes un grosor menor del neuroepitelio de los embriones mutantes en relación a los embriones WT (**Fig. 44A, B**); el número total de células parece sensiblemente inferior y no se observan núcleos picnóticos que sugieran muerte celular.

5.3 ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN DEL NEUROEPITELIO ROMBENCEFÁLICO (E9.5 Y E10.5).

Siguiendo el esquema empleado para el estudio del cerebro anterior y medio, se procedió al análisis de proliferación en el cerebro embrionario posterior, a partir de 20 imágenes obtenidas de las paredes laterales del rombencéfalo (cuarto ventrículo) de 5 embriones distintos para cada condición, realizadas en secciones histológicas transversales que pasan a nivel de las vesículas ópticas (**Fig. 23A, materiales y métodos**).

En las **figuras 45 y 46** son presentados los resultados del conteo de núcleos positivos para BrdU en cada condición y para cada estadio. En esta vesícula cerebral se observa que en los embriones con deficiencia de FGF2 hay una disminución en la proliferación celular neuroepitelial con respecto a los controles de una magnitud del 31.7% para embriones E9.5 y del 36% en los de E10.5 ($P < 0.001$).

Al igual que en las otras regiones estudiadas, la disminución en el número de células en fase proliferativa para el estadio E10.5 se asocia una reducción del volumen de la pared neuroepitelial (**Fig. 46A,B**).

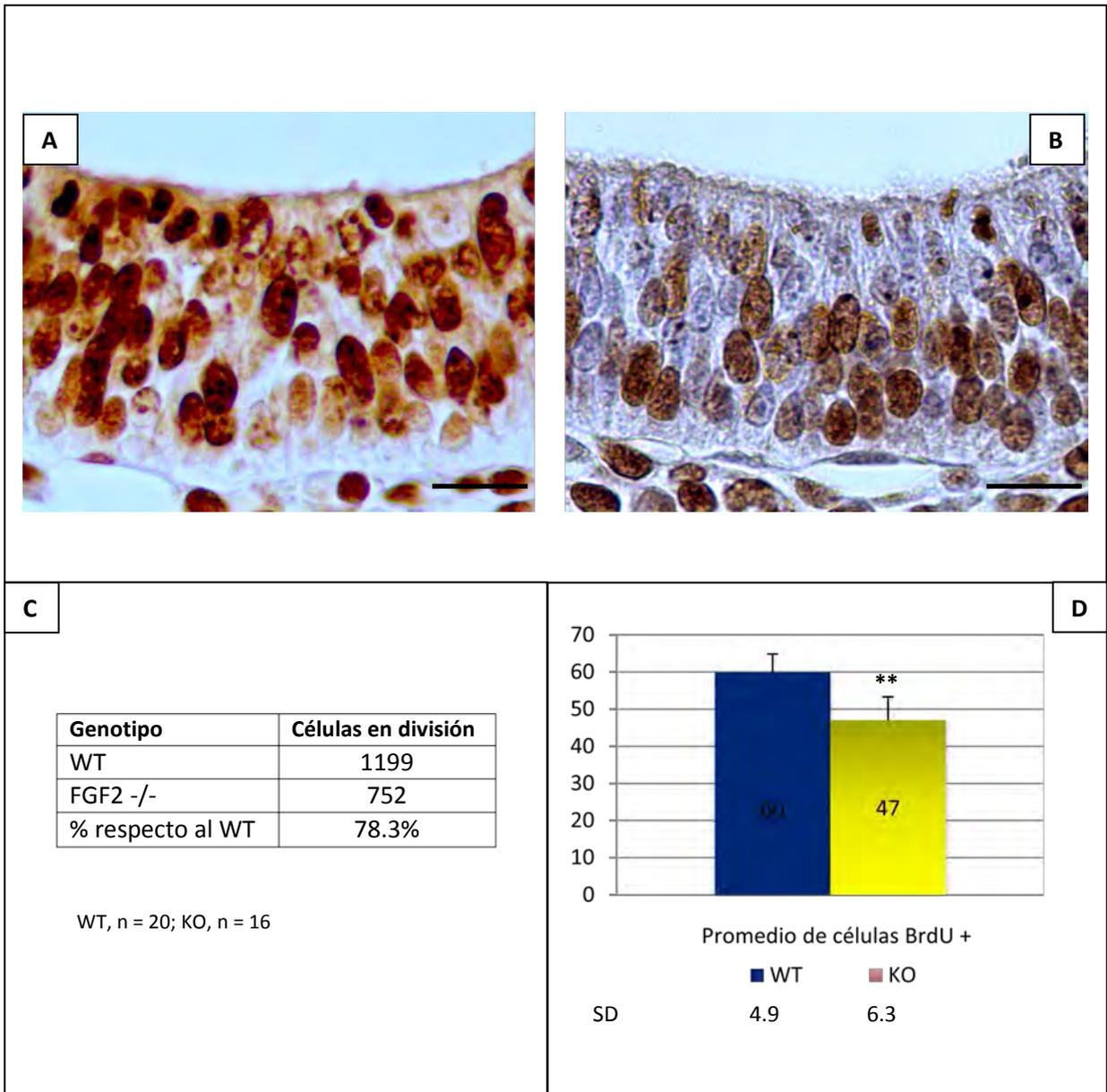


Figura 42 | Evaluación de la proliferación celular neuroepitelial por inmunohistoquímica a-BrdU en secciones histológicas transversales de telencéfalo embrionario de ratón WT y FGF2 KO en estadio E9.5. En las imágenes analizadas se observó una menor cantidad de células en proliferación (núcleos teñidos de marrón) para el grupo mutante (B), en comparación con los embriones WT (A). La tabla (C) registra el recuento total de núcleos positivos para BrdU en cada condición, mientras que en (D) se compara gráficamente el promedio de células BrdU+ halladas en cada imagen de neuroepitelio, para cada grupo ($p < 0.001$). Barra de escala: 20 μm . (SD, desviación estándar).

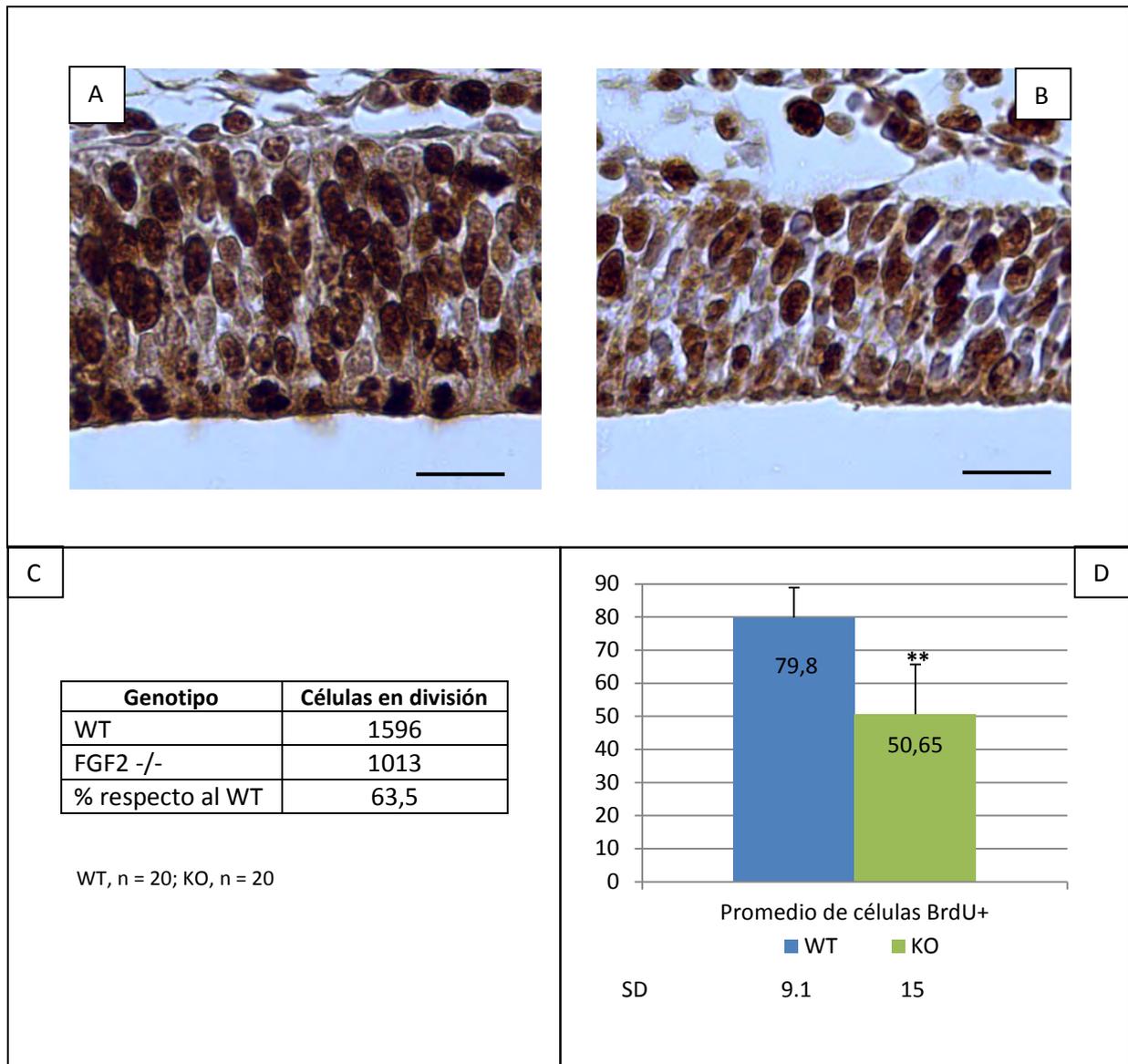


Figura 43 | Análisis de la proliferación celular neuroepitelial por inmunohistoquímica a-BrdU, en cortes transversales de telencéfalo de embriones de ratón FGF2 KO y WT en estadio E10.5. La imagen (B) corresponde al neuroepitelio de la pared lateral del telencéfalo de un embrión FGF2 KO; se aprecia una menor cantidad de núcleos positivos en comparación con la pared de la vesícula telencefálica del ratón WT (A), así como un adelgazamiento del neuroepitelio en comparación con el grosor del WT. El histograma (D) presenta el promedio de células BrdU positivas. La tabla (C) muestra el número total de células contadas para cada condición así como el porcentaje con respecto al control WT, encontrándose una disminución del 36.5% en el FGF2 KO en relación al WT ($p < 0.001$). Barra de escala: 20 μ m. (SD, desviación estándar).

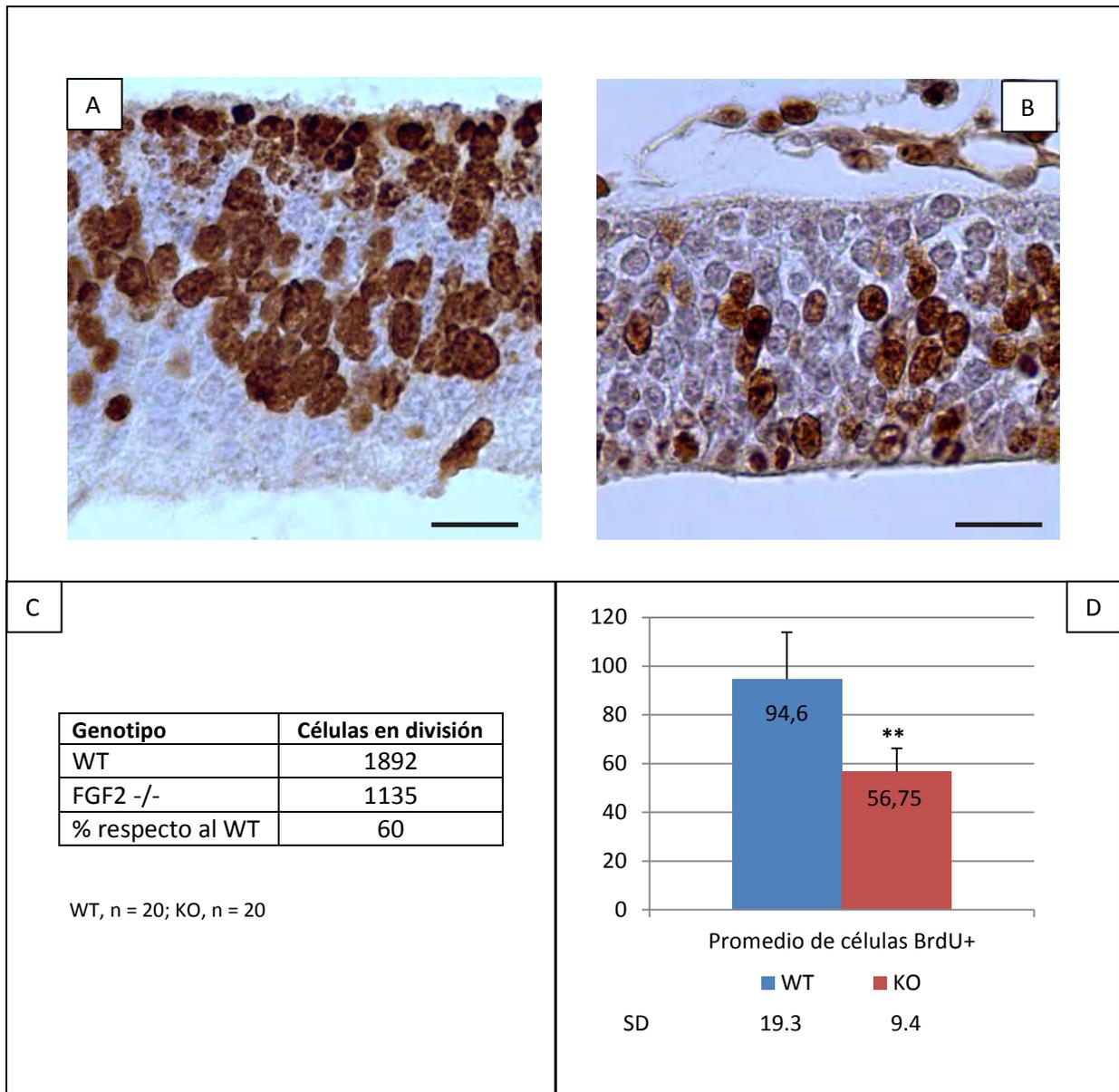


Figura 44 | Comparación de los datos de proliferación celular neuroepitelial obtenidos por inmunohistoquímica anti-BrdU, en cortes de mesencéfalo de embriones de ratón FGF2 KO y WT en estadio E10.5. Se observa una mayor proliferación de las células neuroepiteliales de los embriones WT **(A)** con respecto a los embriones deficientes en FGF2 **(B)**. Nuevamente se hace evidente un menor grosor de la pared neuroepitelial en el embrión de ratón mutante. En la tabla **(C)** se indica el número total de células BrdU 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 ($p < 0.001$). Barra de escala: 20 μm . (SD, desviación estándar).

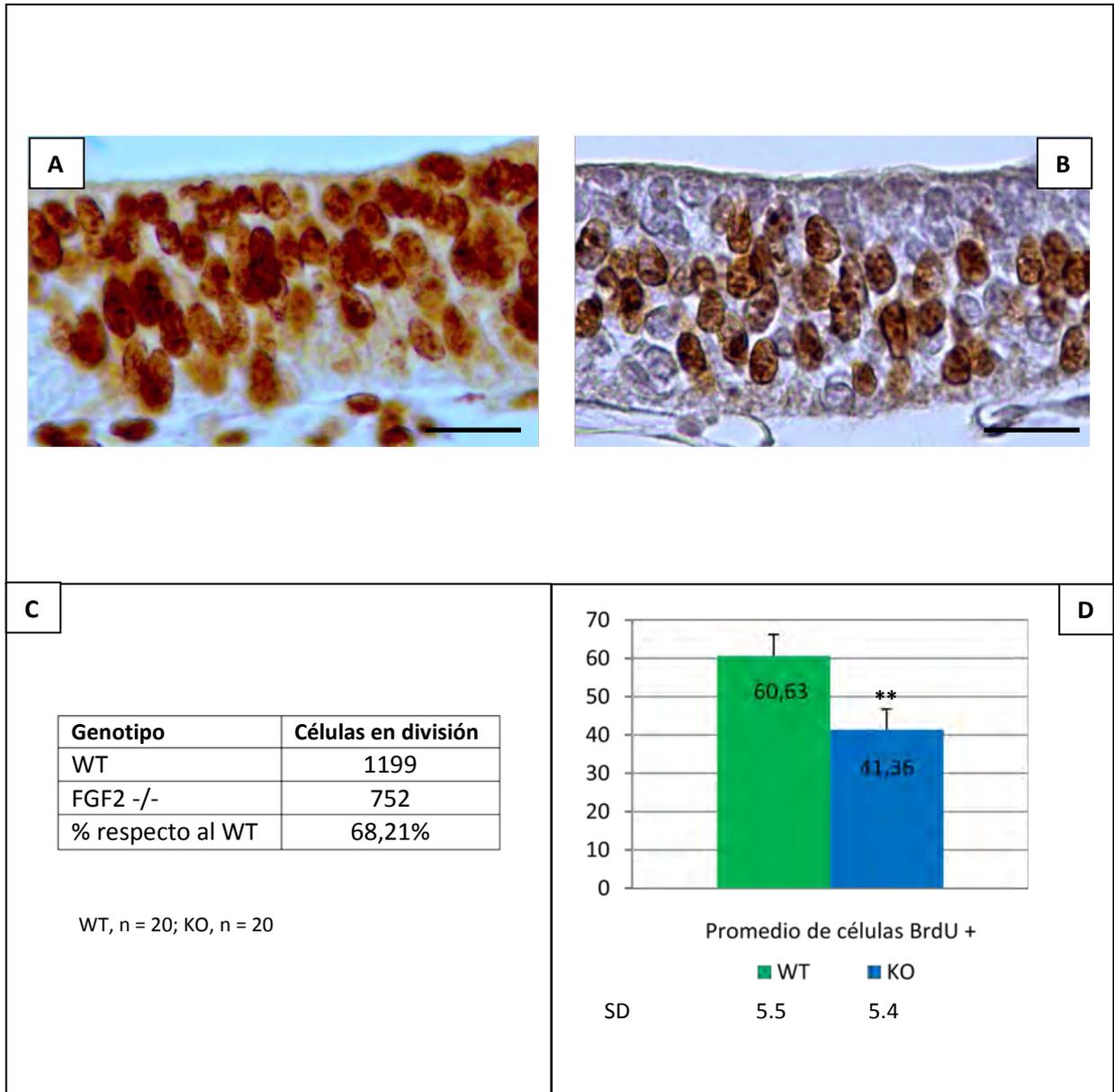


Figura 45 | Estudio de proliferación mediante inmunohistoquímica anti-BrdU en secciones de neuroepitelio rombencefálico de embriones de ratón WT (A) y FGF2 KO (B) en estadio E9.5. El recuento de la cantidad de núcleos marcados indica una menor actividad proliferativa en la condición mutante. Los datos se muestran registrados en la tabla (C), donde se indica la cantidad total de células BrdU positivas halladas en las secciones histológicas analizadas para cada condición, así como el porcentaje del mutante con respecto al WT. La gráfica (D) compara el promedio de células proliferativas hallado por muestra para cada grupo de estudio (control y experimental) ($p < 0.001$). Barra de escala: 20 μm . (SD, desviación estándar).

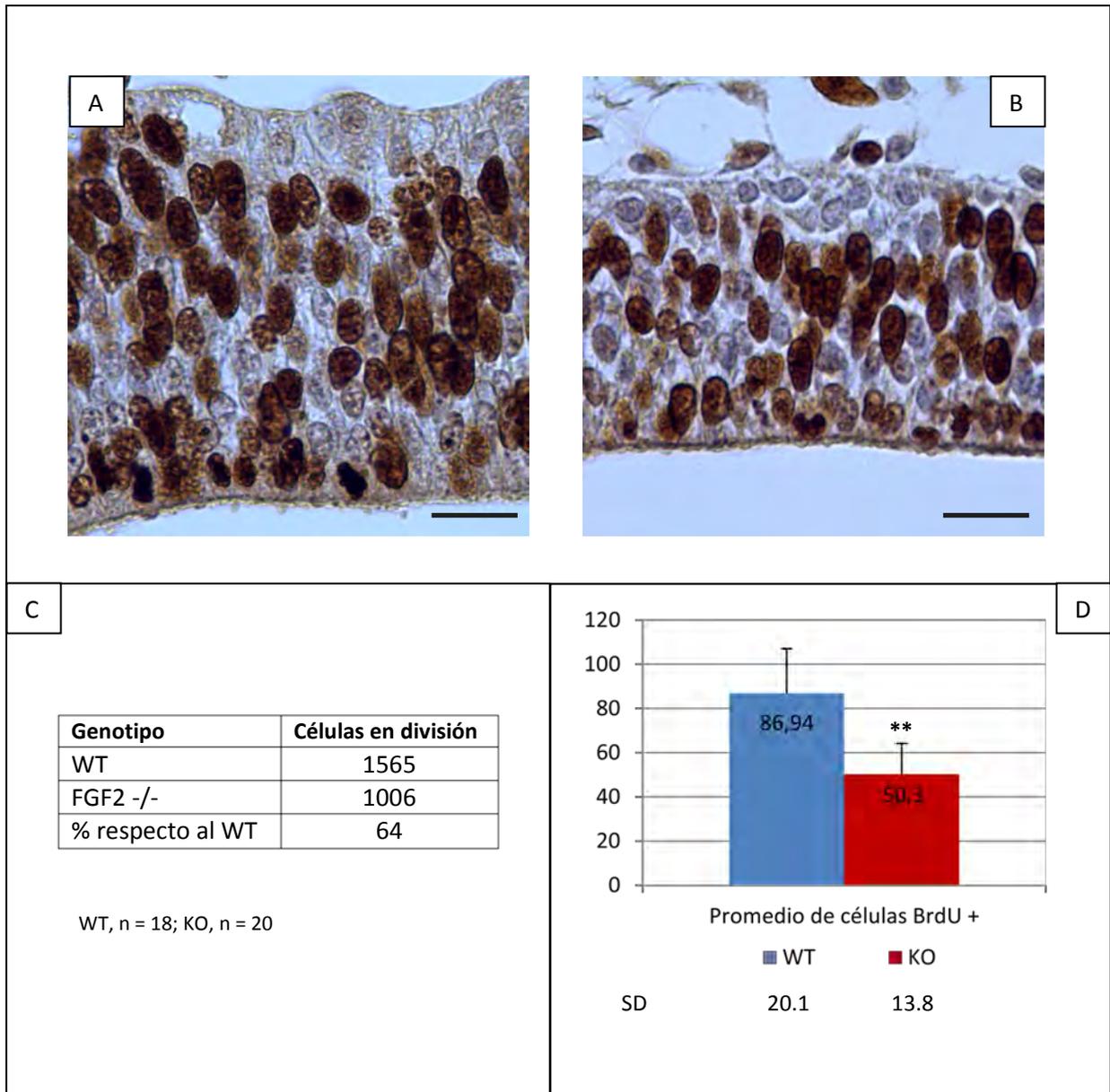


Figura 46| Estudio de proliferación mediante inmunomarcaje a-BrdU en la pared neuroepitelial del cerebro embrionario posterior de ratón FGF2 KO y WT en estadio E10.5. Las imágenes **(A)** y **(B)** corresponden a secciones transversales de neuroepitelio rombencefálico. La tabla **(C)** registra el número 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 ($p < 0.001$). Barra de escala: 20 μm . (SD, desviación estándar).

6. ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN (WT vs KO).

Se valoró si la deficiencia de FGF2 que se traduce en una disminución de la replicación de las NPCs del adulto, se asocia a cambios en el patrón de diferenciación neuronal para embriones de 10.5 días, con respecto al control WT. Para esto, se valoraron mediante inmunohistoquímica con anticuerpo anti-beta-III-Tubulina las tres vesículas cerebrales principales en cortes transversales de al menos tres embriones diferentes en los dos grupos de estudio. Se contabilizaron solo las células cuyo núcleo estuviera rodeado de marcaje positivo en al menos un 50%.

Hemos encontrado una disminución de un 37% en el número de células beta-III-tubulina positivas a nivel del neuroepitelio mesencefálico en los embriones con deficiencia de FGF2 en comparación con embriones WT (**Fig. 47**), mientras que el análisis de las paredes laterales de la vesícula rombencefálica de los embriones mutantes mostró una disminución de aproximadamente el 50% en relación a los embriones control (**Fig. 48**).

En nuestras valoraciones el patrón de diferenciación neuronal en neuroepitelio embrionario evaluado mediante inmunohistoquímica anti-beta-III-tubulina muestra en los embriones normales (WT) una expresión más temprana de este marcador para cerebro posterior y medio con respecto al cerebro anterior, de tal manera que en E10.5 el prosencéfalo revela un inmunomarcaje menos abundante en las paredes laterales del telencéfalo y sobre todo a nivel del diencefalo, en comparación con el observado para mesencéfalo y rombencéfalo del mismo estadio. En los embriones KO para FGF2 se observa que el marcaje en el prosencéfalo a los 10.5 días es aún más débil, detectándose apenas un discreto marcaje a nivel del diencefalo más posterior, con ausencia total en las regiones más anteriores, incluyendo el telencéfalo. Por esta razón, no fue pertinente un análisis cuantitativo con recuento de células positivas para beta-III-Tubulina en esta región (**Fig. 49**).

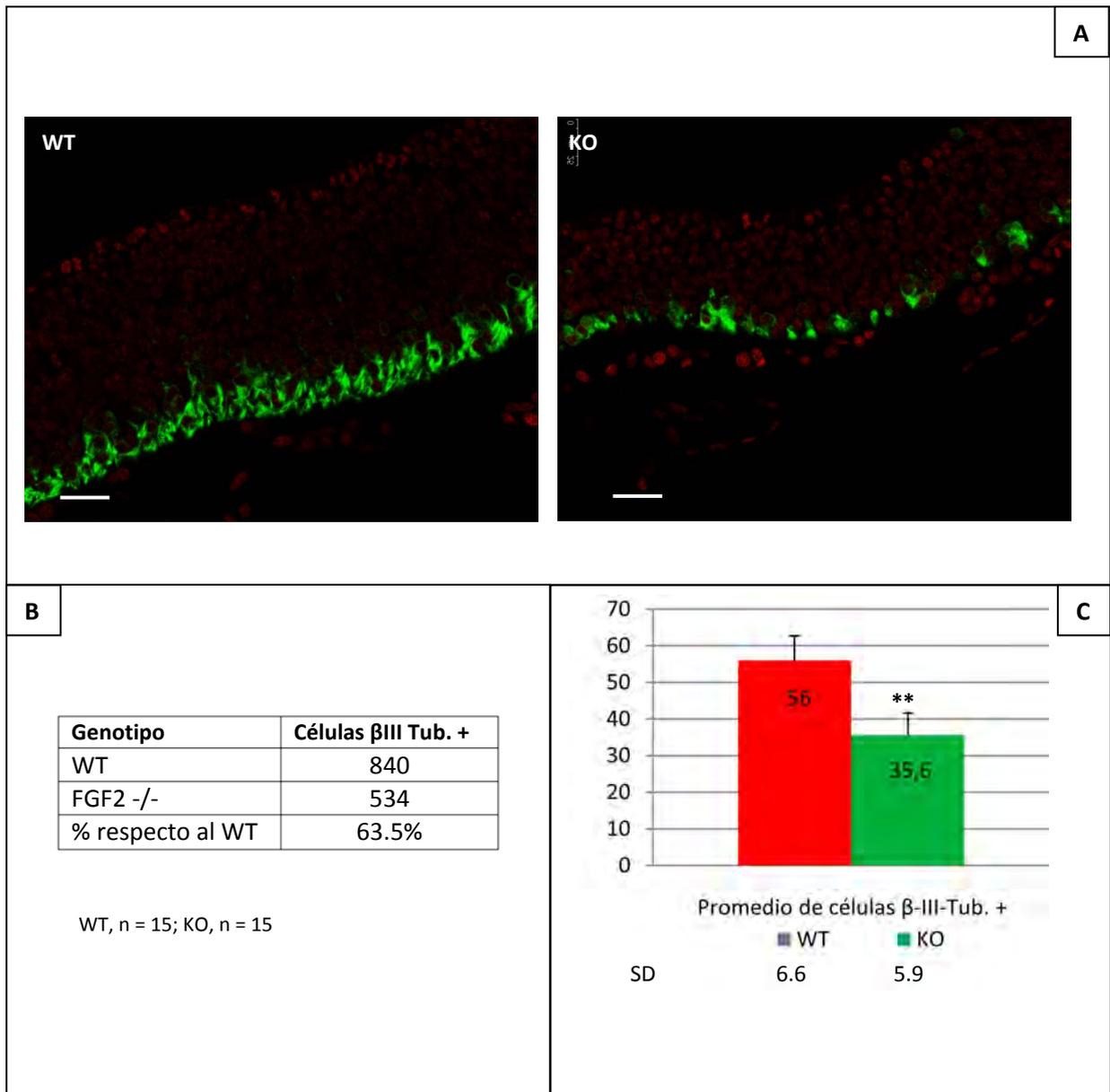


Figura 47 | Estudio de diferenciación neuronal en secciones transversales de neuroepitelio mesencefálico de embriones FGF2 KO y WT en estadio E10.5. (A) La inmunohistoquímica anti-beta-III-tubulina (señal en verde) que muestra un marcaje localizado en la zona basal del neuroepitelio mesencefálico (40X) para ambos grupos estudiados. La tabla (B) muestra el número total de células positivas identificadas para cada condición, así como el porcentaje del recuento obtenido en los embriones KO con respecto al grupo WT. La gráfica (C) presenta el promedio de células beta-III-tubulina positivas identificadas en las secciones histológicas estudiadas para cada condición. ($P < 0.001$). La señal en rojo corresponde a tinción nuclear con TOTO[®]-3. Barra de escala 25 μ m. (SD, desviación estándar).

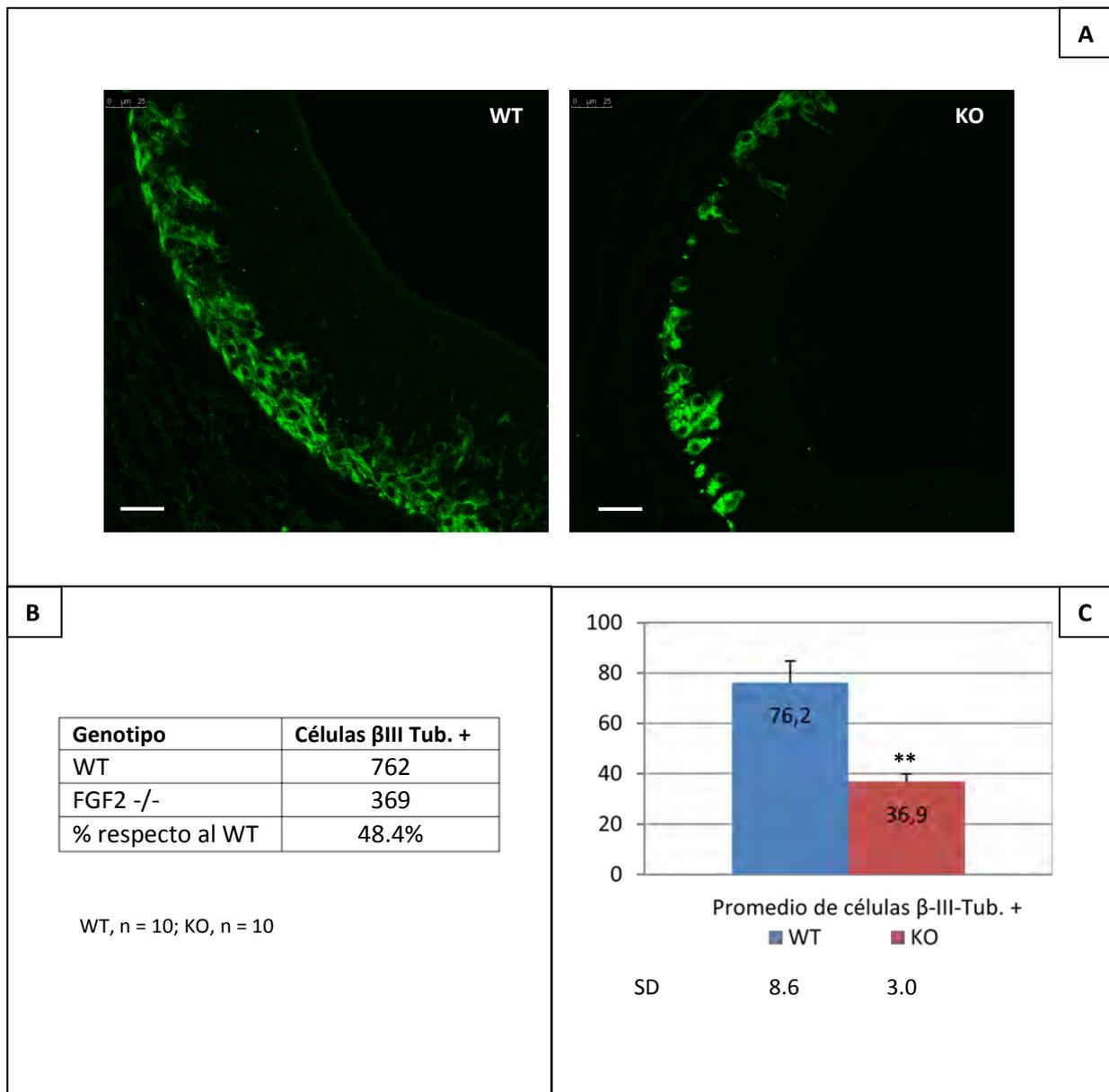


Figura 48 | Estudio de diferenciación neuronal por inmunohistoquímica anti-beta-III-tubulina en secciones transversales de cerebro embrionario posterior en estadio E10.5. (A) Imágenes de neuroepitelio rombencefálico (40X) en las que es evidente una mayor abundancia de inmunomarcaje en el embrión WT en comparación al embrión con deficiencia de FGF2. **(B)** Los datos del recuento total de células positivas para cada grupo de estudio confirman una disminución de la cantidad de células beta-III-tubulina positivas en el ratón KO. La gráfica **(C)** muestra el promedio de número de células marcadas identificadas en las muestras analizadas. ($P < 0.001$). Barra de escala 25 μ m. (SD, desviación estándar).

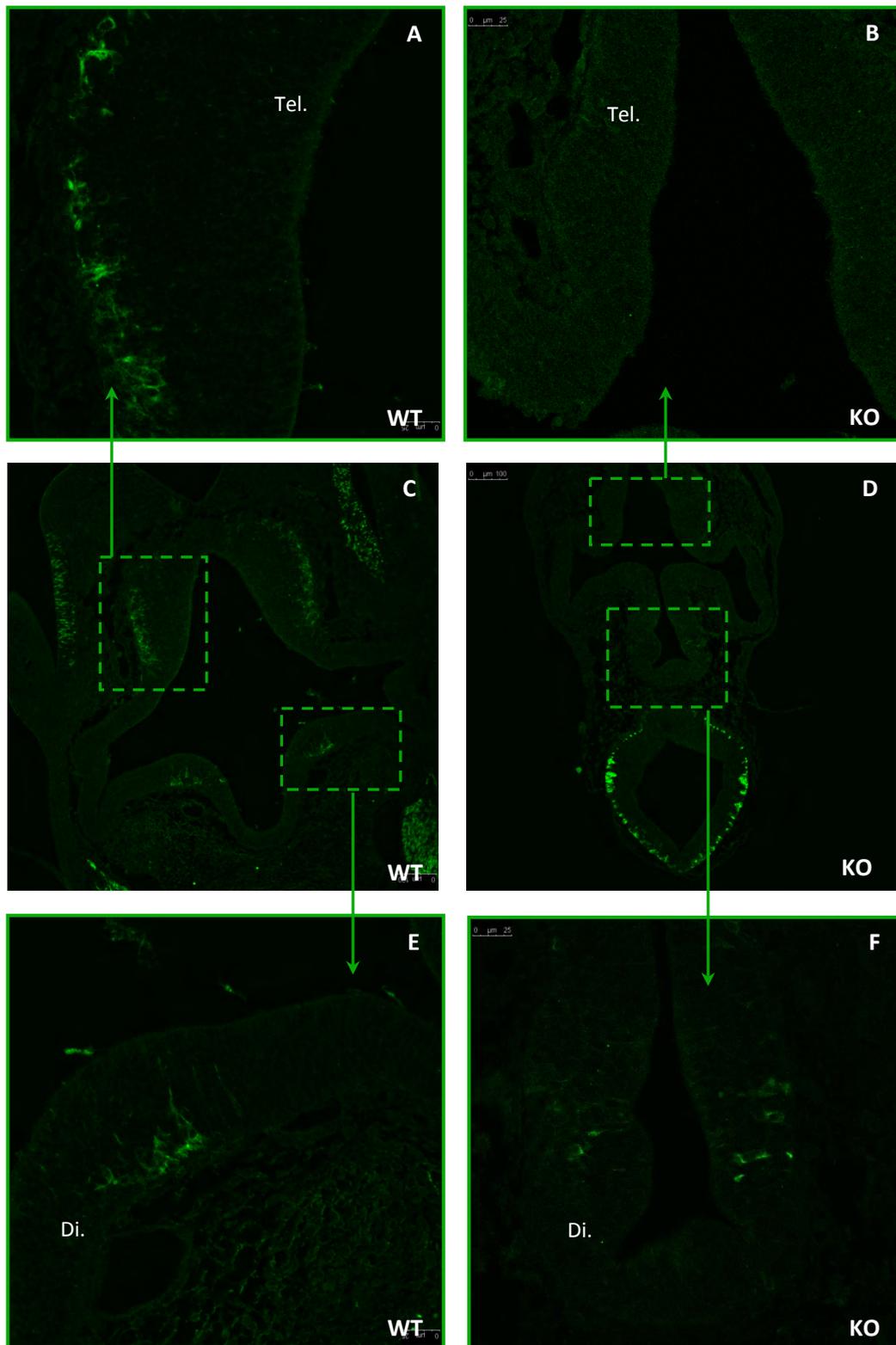


Figura 49| Expresión de beta-III-tubulina en cerebro anterior de embriones FGF2 KO y WT de 10.5 días. Las fotos del centro (C,D) corresponden a secciones sagitales a un nivel aproximado a las vesículas ópticas de embriones de ratón normal y mutante respectivamente (aumento 10X). En las fotos superiores e inferiores se muestran imágenes a mayor aumento (40X) de zonas específicas del neuroepitelio prosencefálico señaladas con recuadros para ambas condiciones, a nivel de telencéfalo (A,B) y diencefalo (E,F). (Tel., telencéfalo; Di., diencefalo).

7. MAYOR INCIDENCIA DE MALFORMACIONES DEL CEREBRO EMBRIONARIO EN RATONES FGF2 KO.

Tras el nacimiento, el ratón FGF2 $-/-$ ha sido descrito con un fenotipo aparentemente normal, aunque con importantes defectos en la organización y número de neuronas de la corteza cerebral [Vaccarino et al., 2000; Ortega et al., 1998; Dono et al., 1998]. Sin embargo, en el transcurso de nuestro trabajo con embriones homocigotos para la mutación del gen FGF2, hemos identificado de manera recurrente diversas anomalías morfológicas durante el desarrollo temprano de estos embriones, específicamente del SNC.

En nuestras observaciones identificamos que estas malformaciones se presentan como un espectro de gravedad que varía desde leves a severas e incompatibles con la progresión del desarrollo, y podrían explicar las capas menos numerosas, características de los ratones *knock-out* para FGF2 en comparación con los ratones *wild-type*.

Los defectos más frecuentes son aquellos relacionados con el volumen del esbozo cerebral. Se trata de embriones en los cuales se observa que las cavidades cerebrales no se expanden suficientemente, pudiendo llegar incluso a manifestarse como un colapso severo de estas (hipoplasia neuroepitelial), o en otras ocasiones haciendo difícil o menos evidente la identificación de la regionalización cerebral propia de la etapa de expansión y vesiculación del tubo neural durante el desarrollo temprano del cerebro.

También fueron identificados con cierta frecuencia defectos del cierre del tubo neural, de amplitud y localización variable, generalmente y como es lógico acompañados de una pobre expansión del volumen cerebral.

Finalmente, es común hallar en los embriones FGF2 KO la presencia de hemorragias, solas o en combinación con los defectos descritos antes.

En la **figura 50** se presentan imágenes de embriones FGF2 KO y que ilustran las anomalías que hemos descrito.

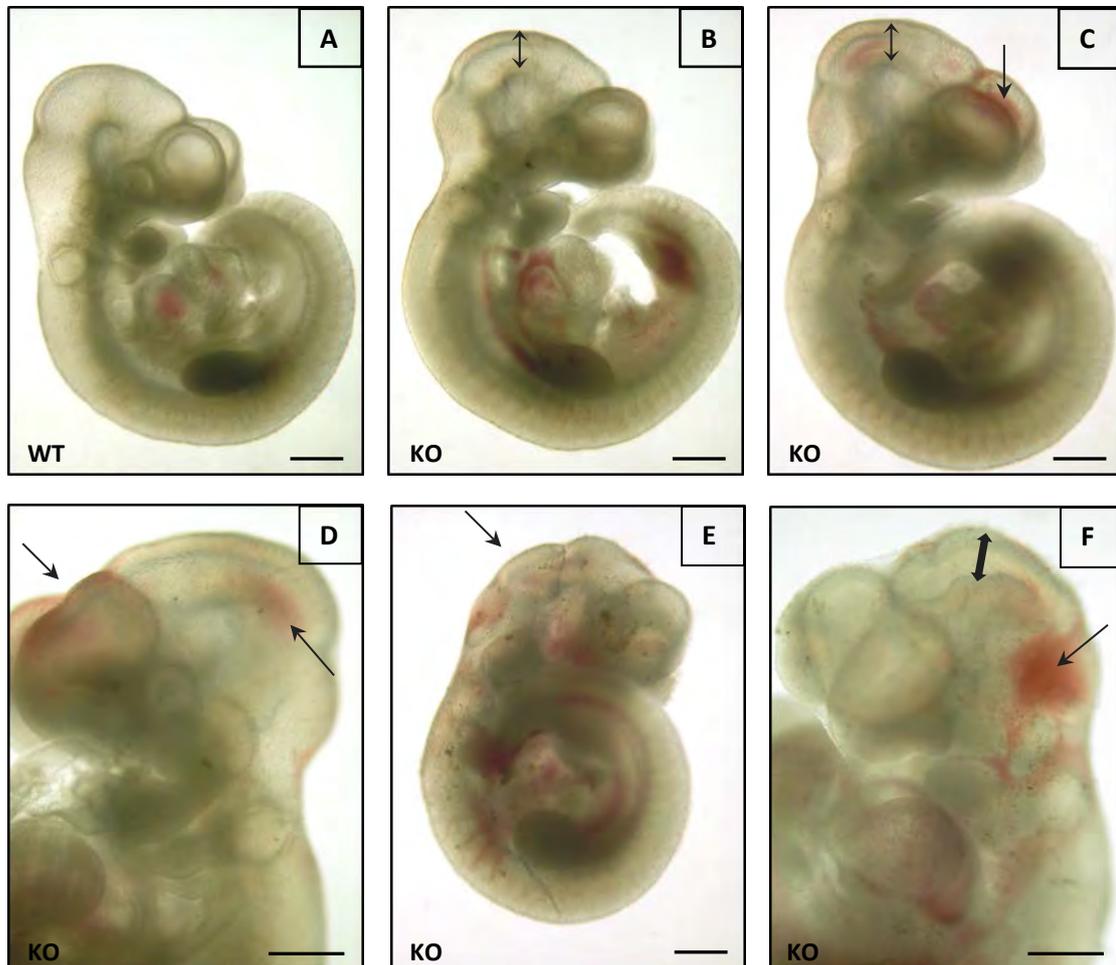


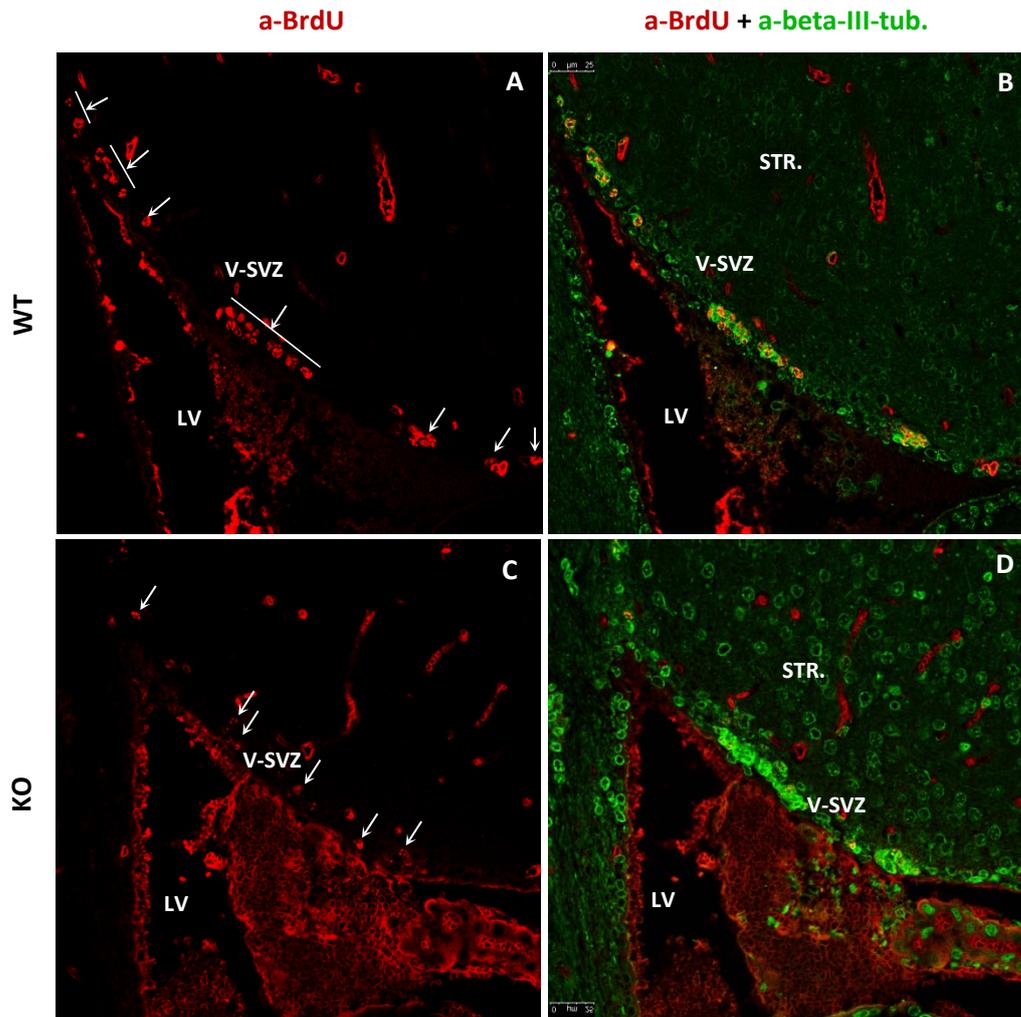
Figura 50 | Defectos del desarrollo del cerebro embrionario hallados en embriones mutantes para FGF2. Las fotos corresponden a embriones de 10.5 días, inmediatamente después de su extracción. Las flechas señalan los defectos a los que se hace alusión en el texto. En (A) se muestra un embrión WT con una morfología normal. En el resto de imágenes se presentan embriones FGF2 KO. **B.** Embrión con una disminución generalizada del volumen de sus cavidades cerebrales. **C.** Se observa un déficit de volumen en las vesículas cerebrales acompañado de hemorragias a nivel del cerebro anterior y medio. **D.** El embrión anterior fotografiado a mayor magnificación muestra con mayor claridad una insuficiencia en la expansión del tubo neural, más evidente en las vesículas telencefálicas. **E.** Colapso severo de las cavidades cerebrales y hemorragias múltiples concomitantes. **F.** Defecto amplio del cierre del tubo neural a nivel cefálico, acompañado de hemorragias en la región caudal. Barra de escala: 500 μ m. D, F fueron adquiridas a mayor magnificación.

8. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN EN V-SVZ DE CEREBRO ADULTO (WT VS KO).

El marcaje con BrdU ha sido empleado con éxito para valorar la proliferación de las NPCs de los nichos neurogénicos adultos en un amplio rango de tiempo que puede extenderse incluso varias semanas [Hayes and Nowakowski, 2002; Kee et al., 2002; Frinchi et al., 2010; Werner et al., 2011].

Para establecer si la ausencia del gen para FGF2 se asocia a una disminución en el número de NPCs en proliferación, en el principal nicho neurogénico adulto, llevamos a cabo un análisis de proliferación celular en la V-SVZ de cerebro de ratón adulto *knock-out* para FGF2 y se comparó con los resultados obtenidos en el ratón *wild-type*. Para esto, a los dos grupos de ratones se les administró, por vía intraperitoneal, 2 dosis de 60 µg/g peso de BrdU, separadas 24 horas, siendo sacrificados 24 horas después de la última dosis. Los cerebros fueron entonces extraídos y procesados para histología tal como se describe en materiales y métodos y se desarrolló una doble inmunohistoquímica anti-BrdU y anti-beta-III-tubulina en la V-SVZ de la región anterior de los ventrículos laterales (Fig. 51A-D).

El número de células BrdU positivas en la V-SVZ fue 32% menor en el grupo FGF2 KO en comparación con el WT ($P < 0.001$) (Fig. 51E), lo cual sugiere que el FGF2 en roedores adultos participa en la regulación de la proliferación de las NPCs de este nicho germinal. Se observó además, en ambos grupos, una localización mayoritaria del inmunomarcaje a-BrdU en aquellas células de la V-SVZ positivas para beta-III-tubulina y una distribución de estas células en grupos o racimos. Esto indica que la mayor parte de estas probablemente corresponden a células precursoras en diferenciación (células de tipo A), las cuales se sabe provienen de NPCs en fase de rápida replicación (Células tipo C).



Proliferación celular en la V-SVZ

E

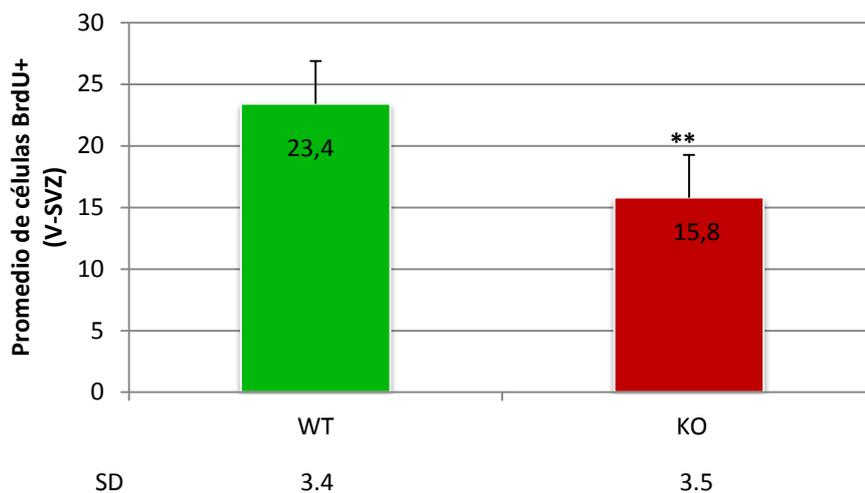


FIGURA 51| Análisis de proliferación celular por inmunohistoquímica a-BrdU en secciones transversales de la V-SVZ de los ventrículos laterales. **A,B:** cerebro wild-type; **C,D:** cerebro knock-out. En las fotos de la izquierda se indica por medio de flechas los núcleos BrdU positivos. En las fotos de la derecha se presenta superpuesta la señal a-beta-III-Tubulina. El histograma (E) muestra el número promedio de núcleos BrdU positivos para cada grupo. ($P < 0.001$, Prueba T de dos colas). WT, $n = 10$; KO, $n = 10$. (LV, ventrículo lateral; V-SVZ, zona ventricular-subventricular; STR., Striatum; SD, desviación estándar).

9. EXPRESIÓN DE FGF2 EN V-SVZ DE CEREBRO ADULTO DE RATÓN.

Mediante inmunohistoquímica logramos identificar que el FGF2 es expresado en la V-SVZ de los ventrículos laterales del cerebro adulto de ratón. Nuestro estudio muestra que el FGF2 se distribuye 'delineando' toda la extensión de la pared lateral del ventrículo, de forma difusa, apreciándose un patrón de marcaje intracelular y otro asociado a la pared de los vasos sanguíneos (Fig. 52A,C). La presencia de este factor de crecimiento en la V-SVZ sugiere su participación en los procesos básicos que regulan el comportamiento de las NPCs en este nicho germinal. Por su parte, la V-SVZ del cerebro adulto FGF2 KO manifiesta una completa ausencia de señal positiva para el inmunomarcaje anti-FGF2 (Fig. 52B).

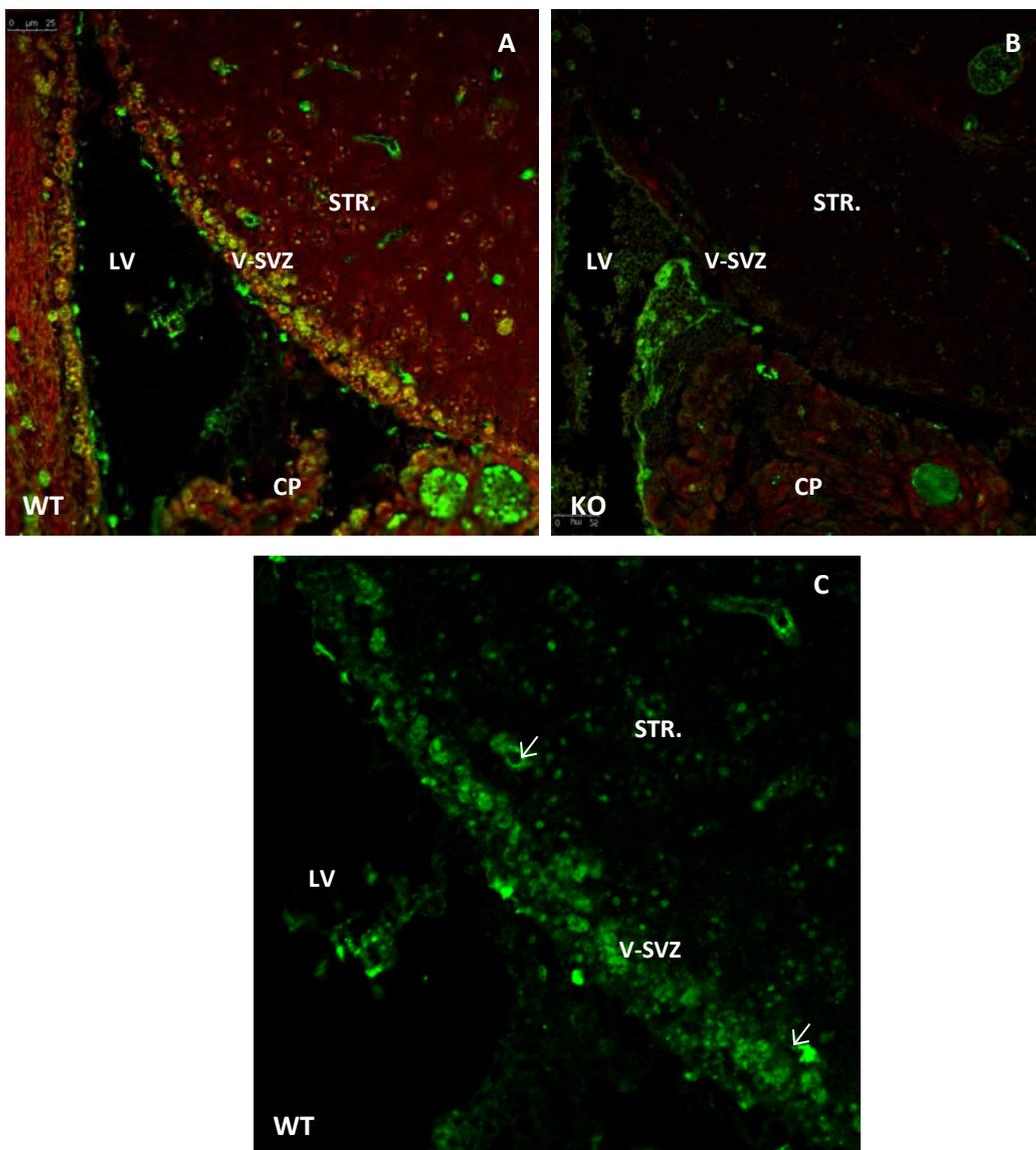


FIGURA 52 | Inmunohistoquímica anti-FGF2 de la V-SVZ de los ventrículos laterales, en secciones coronales de cerebro adulto de ratón. La señal anti-FGF2 corresponde al verde. Su distribución en la V-SVZ es difusa como se aprecia en (A) y en el acercamiento mostrado en (C), donde además se señalan con flechas algunos vasos sanguíneos con un marcaje intenso asociado a su pared. En la imagen (B), correspondiente a ratón FGF2 KO, se observa ausencia de marcaje específico. (LV, ventrículo lateral; V-SVZ, zona ventricular-subventricular; STR., Striatum; CP, plexos coroideos).

DISCUSIÓN

La presente tesis contribuye a un mejor entendimiento de los mecanismos de regulación del comportamiento de las células precursoras neurales en el contexto de *nicho neurogénico*, en el cual la señalización por medio de factores de crecimiento resulta esencial para la ejecución del control sobre las actividades básicas de replicación, diferenciación y supervivencia celular.

En nuestro estudio se demuestra en primer lugar que el cerebro embrionario de mamíferos, en concreto de ratón, contiene FGF2 en su cavidad, como componente del eCSF. El estudio inmunohistoquímico detallado sugiere que este factor, a diferencia de lo que ocurre en especies inferiores como el pollo, es fruto de la secreción apical de las propias células neuroepiteliales. Por su parte, los análisis de pérdida de función *in vitro* e *in vivo* demuestran que el FGF2 juega un papel clave en la replicación de las células neuroepiteliales del nicho embrionario. Finalmente aportamos evidencias que sugieren que la capacidad del FGF2 para expandir la población de células precursoras neurales se prolonga hasta la etapa adulta en zonas neurogénicas específicas.

1. FGF2 COMO COMPONENTE DEL ECSF.

Las evidencias aportadas por diversos trabajos desarrollados en los últimos años han conducido a que el eCSF sea considerado actualmente un elemento esencial del cerebro embrionario en virtud de su composición y propiedades complejas, así como por su contacto directo con todas las células neuroepiteliales [Zappaterra and Lehtinen, 2012; Gato et al., 2014].

Sus componentes mayoritarios le otorgan al eCSF características propias de una matriz extracelular laxa. Como ya se abordó en la introducción, esta matriz en parte está orientada a regular un fenómeno osmótico de atrapamiento de agua y generar un mecanismo expansivo del cerebro embrionario que depende fundamentalmente de la cavidad, como demostraron Desmond et al. (1977, 1984, 2002). Los trabajos desarrollados por nuestro grupo y otros [Li and Desmond, 1991; Gato et al., 1993, Alonso et al., 1998, 1999] han aportado la idea de que, posiblemente, la regulación en la síntesis y secreción apical de proteoglicanos junto con el transporte de iones, generan dicho ambiente osmótico positivo que termina estableciendo, por atrapamiento de agua, una presión positiva dentro de una cavidad cerrada. Por otra parte, diversos estudios proteómicos, en parte iniciados por nuestro grupo hace años y otros más recientes [Gato et al., 2004; Parada et al., 2005 y 2006; Zappaterra et al., 2007], revelan que existen otros muchos tipos de moléculas biológicamente activas y de carácter proteico, dentro de la cavidad, cuyo papel en su conjunto es aún

desconocido, a pesar de que poco a poco se va esclareciendo el papel que juegan algunas de ellas [Martín et al., 2006; Lehtinen et al., 2011; Vera et al., 2013].

Todo esto en conjunto sugiere que estamos ante un fluido muy complejo que posiblemente interviene en muchas funciones y que actúa como parte integrante del cerebro embrionario, de una forma coordinada e interdependiente con el tejido cerebral que se está desarrollando. Esta interdependencia implicaría a diversos factores y de hecho una de las hipótesis planteadas por nuestro grupo ha sido que el CSF es una vía de comunicación entre las células precursoras neurales embrionarias, de forma análoga a un mecanismo hormonal: las señales que parten de ciertas células se transportan, modifican, almacenan o destruyen en el medio de transporte que sería el CSF ejercen su acción en las células diana a distancia.

En esta amplia diversidad de componentes del eCSF, un grupo de moléculas que ha llamado la atención y que por su escasa concentración no suele ser detectado en los estudios proteómicos pero sí mediante inmunomarcaje específico, es el de los factores de crecimiento. Se ha descrito la presencia de varios de ellos dentro del eCSF (EGF, FGF2, IGF1, IGF2, NGF,) [Cieslak et al., 1986; Martín et al., 2006; Salehi et al., 2009; Mashayekhi et al., 2009; Lehtinen et al., 2011]. Al parecer todos ellos en su conjunto, actuando sobre distintas células diana y en diferentes momentos, son determinantes en el complejo proceso de desarrollo del cerebro. Uno de los aspectos hacia donde se ha enfocado la atención en el estudio de la influencia de los factores de crecimiento sobre el desarrollo del sistema nervioso central es la influencia que ejercen estos en la regulación del comportamiento celular básico de los precursores neuroepiteliales (Supervivencia, replicación, diferenciación).

El FGF2 hasta el momento solo había sido identificado en el eCSF de embriones de pollo [Martín et al., 2006]. Si bien su expresión estaba documentada en el neuroepitelio de roedores [Dono et al., 1998; Vaccarino et al., 1999; Raballo et al., 2000], su actuación sobre este ha sido descrita como de tipo endocrino/paracrino. En esta tesis aportamos evidencia de la presencia de FGF2 en el eCSF de ratón, especie por otra parte más próxima al humano por ser mamífero y más versátil desde el punto de vista de la embriología experimental por la posibilidad de generar modelos knock-out, evidenciándose en primer lugar que se trata de un componente filogenéticamente conservado del eCSF. Además, el FGF2 podría ser considerado al menos en parte, como un producto de secreción exocrina, que al ser un componente del eCSF, contacta directamente con todos los precursores neuroepiteliales, lo que sugiere, junto con la presencia difusa de receptores, que el eCSF actúa como una vía de transmisión/propagación de la señal FGF2 intracerebral.

De acuerdo con nuestros datos, el FGF2 presente en el eCSF no aparece como una forma única de FGF2 de bajo peso molecular como cabría esperar del FGF2 secretado por la célula y que actúa sobre receptores de superficie celular. Nuestro

análisis mediante western-blot demuestra que existen distintas fracciones proteicas positivas para el inmunomarcaje anti-FGF2. Por una parte, se obtuvieron 3 bandas con pesos moleculares bastante aproximados a las 3 isoformas bien conocidas de FGF2 de alto peso molecular [Yu et al., 2007]. Si bien en general es aceptado, como ya se comentó en la introducción, que el FGF2 secretado corresponde a la isoforma de bajo peso molecular, existen evidencias aportadas por algunos autores que demuestran la secreción de isoformas de FGF2 de alto peso molecular hacia el medio extracelular, por parte de ciertos tipos celulares como los miofibroblastos cardiacos normales [Santiago et al., 2011]. Por otra parte, nuestro estudio también detectó una banda de aproximadamente 50 KD y de mayor volumen e intensidad que las demás, que en principio descartamos que se trate de formas diméricas del FGF2 de bajo peso molecular si se tiene en cuenta que la electroforesis fue desarrollada en condiciones desnaturalizantes. Los trabajos que describen la presencia de heparán-sulfato proteoglicano dentro de la cavidad, como componente del eCSF [Parada et al., 2005, 2006], sugieren que este podría actuar como un sistema de almacenamiento y control de la actividad biológica del FGF2 al ser este proteoglicano uno de los mejor caracterizados '*heparin-binding growth factor*', hipótesis que se ve fortalecida por el hecho de que existe una expresión de receptores FGFR1 en torno a la cavidad y se ha descrito que el heparán-sulfato actúa como cofactor para la señalización del FGF2 sobre su receptor específico. Sin embargo, el estudio realizado en esta tesis doctoral mediante la digestión enzimática específica de proteoglicanos, no ha revelado cambios en el peso molecular de las bandas inmunorreactivas para el FGF2 al western-blot como cabría esperar, sugiriendo que de existir una relación de este tipo, podría implicar la unión a otro tipo de moléculas glucídicas no pertenecientes a la familia de los proteoglicanos, como podría ser por ejemplo la OSC-espondina, una molécula glicoproteica cuya presencia en el eCSF ha sido documentada desde estadios tempranos [Vera et al., 2013] y que por su potencial capacidad para el secuestro de otras moléculas, pudiera estar ligada al FGF2 Y además ser responsable de una acción regulatoria sobre su actividad [Vera et al., 2013].

La probable existencia de un sistema de almacenamiento/liberación del FGF2 a partir del eCSF refuerza la idea de que el proceso de síntesis, secreción, almacenamiento y actuación de esta molécula sobre las células diana es un proceso finamente regulado por el propio cerebro embrionario.

2. FGF2 COMO PRODUCTO DE SECRECIÓN APICAL DEL NEUROEPITELIO DE RATÓN.

La cavidad del tubo neural da origen a los ventrículos cerebrales y es una cavidad estanca que está totalmente rodeada por células neuroepiteliales. En un estudio publicado recientemente, Chau et al. (2015) plantean que inicialmente, el eCSF se origina a partir del líquido amniótico atrapado después del cierre del tubo nervioso pero la evolución del proteoma de este fluido diverge rápidamente durante el

desarrollo embrionario. Existen diversas teorías y discrepancias en la bibliografía en cuanto a cómo a partir de este momento son incorporados los componentes proteicos al eCSF de la cavidad, incluyendo los factores de crecimiento detectados. Entre las posibilidades se incluye transporte desde una fuente externa a través del neuroepitelio, síntesis y secreción apical generalizada por parte del neuroepitelio o síntesis y secreción apical a partir de poblaciones celulares neuroepiteliales específicas [Parvas et al., 2008; Gato and Desmond, 2009; Bueno et al., 2014]]. En particular, nuestro grupo llegó a demostrar en embriones de pollo, que existe un mecanismo de transporte transneuroepitelial, específico para FGF2, de manera que el factor, posiblemente producido en la notocorda, alcanzaría por vía sanguínea el neuroepitelio siendo entonces transportado selectivamente al interior de la cavidad donde se almacena y se regula su acción biológica [Martín et al., 2006]. En este punto encontramos una diferencia filogenética sustancial, pues según el patrón de expresión que hemos hallado en nuestro análisis, el FGF2 del cerebro embrionario de ratón parece ser el resultado de un proceso de síntesis y secreción por parte de las propias células neuroepiteliales que posiblemente se encargan de secretarlo hacia la luz del tubo neural.

Existen datos aportados por diversos estudios mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* de mRNA desarrollados en embriones de roedores que demuestran la síntesis de FGF2 por parte del tercio apical de la pared neuroepitelial [Raballo et al., 2000; Vaccarino et al., 1999; Dono et al., 1998]; sin embargo, aunque estos indican que se trata de una expresión espacial y temporalmente regulada, no se trata de estudios sistemáticos donde se pueda apreciar cuánto factor hay, cómo está regionalmente distribuido y cómo evoluciona desde estadios tempranos.

Las imágenes presentadas en nuestros resultados en conjunto sugieren la existencia de una población celular específica en el neuroepitelio de embriones de ratón, que expresa una importante cantidad de FGF2 en su citoplasma y que por su posición en contacto directo con la superficie apical, sumado a la presencia de FGF2 en el eCSF contenido dentro de la cavidad, posiblemente sea la responsable de la secreción de este factor hacia el interior de esta.

Nuestro patrón de expresión plantea la cuestión de que no todas las células a lo largo de la pared neuroepitelial demuestran el marcaje, es decir, no todo el neuroepitelio está implicado en la síntesis de FGF2, sino que se trata de una población determinada que se distribuye en muchos casos de forma dispersa, en toda la extensión de la pared del tubo neural a nivel cerebral. Por otra parte, un hecho fundamental que resulta bastante evidente es que no coincide la población celular que produce el factor y la que responde a él, siendo esta última mucho más extensa, como lo demuestra el patrón de expresión difuso de FGFR1 hallado en la mitad apical del neuroepitelio. Esto nos conduce a proponer la hipótesis de la existencia de grupos

de células que se sitúan en proximidad a la superficie apical neuroepitelial, con capacidad de producir y secretar FGF2 hacia la cavidad ventricular donde probablemente la actividad de esta proteína es regulada por moléculas secuestradoras, posiblemente en presencia además de otros componentes del eCSF de carácter enzimático que a su vez modifican a las moléculas inmovilizadoras de FGF2 (ej. metaloproteasas), regulando así la biodisponibilidad del factor y el acceso a la señalización sobre sus receptores en las células diana que tendrían una distribución difusa.

Por su parte, el análisis de la distribución regional de la expresión del FGF2 por vesículas no parece arrojar diferencias significativas en el cerebro embrionario de ratón, a pesar de que las vesículas crecen diferencialmente. Este hecho resulta compatible con nuestra idea de que la actuación del FGF2 en el nicho neurogénico embrionario no es un fenómeno de síntesis/secreción/señalización locales. En lugar de eso, la secreción neuroepitelial hacia la cavidad buscaría alcanzar una concentración global de FGF2 en eCSF suficiente para llevar a cabo una activación global, la cual proponemos que regionalmente podría ser regulada por las concentraciones diferenciales intracavitarias de FGF2 biodisponible en las diferentes vesículas como consecuencia de diferencias locales en la dinámica del eCSF como matriz extracelular. Además, no se puede descartar que también intervenga en la regulación de la activación de la replicación por el FGF2 intracavitario mecanismos relacionados con las células diana, como la regulación de la cantidad o densidad de receptores, que nuestro estudio no permite cuantificar.

Finalmente, el patrón de expresión temporal del FGF2 no es estable, como se pone en evidencia en los resultados. En primera instancia, el marcaje intensamente apical de las fases tempranas del desarrollo coincide con el periodo de máxima expansión del cerebro embrionario, momento en el cual el cerebro experimenta un rápido incremento de volumen a expensas de un aumento concomitante de la cavidad ventricular y del grosor de la pared neuroepitelial. Esto sugiere una relación directa del proceso de secreción intensa de FGF2 con el proceso de expansión del tubo neural. Posteriormente, ocurre una transición a partir de la cual el cerebro pasa de un crecimiento expansivo a experimentar un largo periodo de crecimiento tisular en el cual el evento predominante es un aumento en la complejidad del tejido. Durante este periodo la expresión de FGF2 en el cerebro embrionario se torna más restringida a determinadas localizaciones. Al parecer, en el momento en que la histología pasa de ser algo tan simple como un epitelio pseudoestratificado a una estructura progresivamente más compleja, el esquema de coordinación de los mecanismos expansivos a través del eCSF de la cavidad con la pared del tubo nervioso disminuye su eficiencia. De esta manera, aunque este modelo conserve cierto nivel de funcionamiento necesario para mantener una población de NPCs, probablemente

toman el control intratisularmente otras localizaciones y otras células, generando una actividad mitogénica local.

3. FGF2 COMO REGULADOR DE LA EXPANSIÓN DE LA POBLACIÓN DE PRECURSORES NEURALES.

Como acabamos de discutir, el FGF2 es un componente filogenéticamente conservado del eCSF y por tanto resulta relevante plantear la cuestión acerca de cuál es la función que desempeña esta proteína a través de este fluido desde etapas tempranas del desarrollo.

Existen diversos antecedentes, ya comentados en la introducción, que le atribuyen al eCSF una capacidad de influencia sobre las NPCs durante el desarrollo, controlando su comportamiento básico. Las actividades primordiales de las NPCs del nicho embrionario son dos; la primera y más importante es expandir su población. A partir de un *pool* de precursores expandido ocurre la segunda actividad que es la diferenciación. Es imprescindible para conocer la dinámica de estos precursores, identificar qué moléculas están implicadas en la proliferación y cuáles en el control de la diferenciación.

La actividad del FGF2 como mitógeno es bien conocida y está documentada en diferentes contextos biológicos. En particular, diversos estudio *in vitro* e *in vivo*, incluyendo nuestros resultados, avalan esta molécula como un potente inductor de la replicación de las NPCs embrionarias y de hecho la relacionan como un factor clave en determinados momentos del desarrollo para el mantenimiento y expansión de este tipo de población celular [Vaccarino et al., 1999, Raballo et al., 2000, Martens et al., 2000; Kelly et al., 2005].

Sin embargo, no podemos descartar la acción mitogénica sobre los precursores del nicho embrionario, de otros factores tales como SHH, IGF-1, IGF-2, EGF, los cuales también han sido detectados en el eCSF [Lehtinen et al., 2011; Salehi et al., 2009; Martín et al., 2006; Huang et al., 2010], pero que de acuerdo con los estudios, su acción podría ser indirecta y/o complementaria. En este sentido se ha identificado por ejemplo a la proteína SHH en el eCSF de embriones de ratón como una señal proliferativa importante para el desarrollo cerebelar [Huang et al., 2010]. Por su parte, se ha encontrado que el efecto proliferativo del IGF2 durante el desarrollo es limitado en estadios tempranos, mientras que su actividad máxima ocurre ya cerca del fin de la neurogénesis, decayendo nuevamente en el periodo posnatal [Lehtinen et al., 2011]. En cuanto al EGF, se ha sugerido que aunque pueden coexistir, en el neuroepitelio de mamíferos, poblaciones de eNPCs que responden a FGF2 y EGF, aquellos precursores que responden a EGF aparecen más tarde en el desarrollo [Tropepe et al., 1999].

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones y nuestros resultados, principalmente aquellos derivados del ratón FGF2 KO, proponemos que en el neuroepitelio ocurre una activación mitogénica basal, mediada por FGF2, responsable

del crecimiento basal durante la etapa de máxima expansión y concomitantemente, una actividad mitogénica puntual que podría estar mediada por factores o mecanismos 'coadyuvantes de la expansión' responsables de crecimientos específicos en zonas del cerebro embrionario que requieren de un crecimiento singular, ya sea en el tiempo o en el espacio. De este modo, cuando el 'sistema' se basa en una capa de células neuroepiteliales en contacto directo con el eCSF y en un modelo de crecimiento expansivo no homogéneo (istmos y vesículas), existiría un mecanismo base de activación de la expansión de la población de NPCs, basado en la presencia de FGF2 en el eCSF que, como abordamos en el epígrafe anterior, controlaría la biodisponibilidad del factor activo, accesible a todas las células en contacto con la cavidad a través de su superficie apical. Sin embargo, las necesidades puntuales de incremento de la población de células precursoras en determinadas localizaciones o momentos del desarrollo requerirían la acción conjunta del estímulo mitogénico basal (FGF2) y los estímulos accesorios de replicación, entre los que se encuentran los anteriormente mencionados (IGF, SHH, EGF). En este mismo sentido, [Desmond et al. \(2014\)](#) demostraron la existencia de un mecanismo mitogénico accesorio en las paredes de las vesículas cerebrales durante el periodo de máxima expansión del esbozo cerebral. Dicho mecanismo estaría basado en la expresión apical de mecanorreceptores del tipo de las FAKS (*Focal adhesion Kinases*) que median una correlación directa entre presión intracavitaria y proliferación celular neuroepitelial, lo que contribuiría en estas fases tempranas del desarrollo cerebral, a la adecuación del crecimiento de la pared del esbozo cerebral, a la expansión que experimentan las vesículas cerebrales, en función del incremento de la presión hidrostática intracavitaria.

Nuestros resultados de bloqueo *in vitro* de la actividad biológica del FGF2 en cultivos de neuroepitelio nos lleva a demostrar que el FGF2 presente del eCSF está directamente implicado en la replicación de las células neuroepiteliales. El hecho de que en los controles se mantenga una cierta actividad mitogénica es justificado por la propia 'inercia' del cultivo, que estuvo expuesto a estímulos mitogénicos *in vivo* previamente a la extracción de los embriones y que han perdurado, o bien y lo más probable es que existen otros factores que sostienen la actividad proliferativa hasta cierto nivel, distintos al FGF2, lo cual estaría en concordancia con lo que acabamos de comentar en los párrafos anteriores.

Otro hecho que demuestran nuestros cultivos con inmunobloqueo de FGF2 de forma bastante clara es que en las NPCs no existe una relación directa y unívoca entre replicación y neurogénesis y que el FGF2 es un estímulo mitogénico que no afecta en gran medida al proceso de diferenciación *in vitro*. Sin embargo, la pronunciada diferencia en el nivel de neurogénesis *in vivo* a favor de los embriones WT con respecto al KO, evaluado mediante la expresión de Beta-III-Tubulina, podría obedecer a que a diferencia de lo que ocurre en el caso de los cultivos organotípicos, en el embrión homocigoto para la mutación del gen FGF2 no se trata de una pérdida de

función puntual de FGF2 por inmunobloqueo, sino de un déficit de largo recorrido en el que la carencia en la replicación finalmente impacta negativamente la cantidad de células que ingresan a fase de diferenciación.

Estas observaciones acerca de la complejidad del comportamiento tanto en expansión como en diferenciación de los NPCs conducen a suponer que la proliferación y neurogénesis son eventos secuenciales que precisan de la presencia tanto de factores mitogénicos como neurogénicos. En este sentido, la hipótesis que planteamos incluye al FGF2 como estímulo mitogénico fundamental, mientras que el estímulo neurogénico dependería de otro tipo de moléculas, de modo que la actividad de estos dos estímulos tendría que estar de alguna forma coordinada. La molécula que proponemos, el ácido retinoico y su mecanismo de regulación, han sido explorados previamente por nuestro grupo en un modelo de embriones de pollo [Parada et al., 2008; Alonso et al., 2011, 2014]. El estudio de la dinámica de los componentes de este mecanismo sugiere que el ácido retinoico requiere de la presencia y el concurso del eCSF, que aporta el componente precursor (retinol) y el transportador/internalizador (Retinol-Binding Protein - RBP) y se requeriría además la participación de un grupo celular con la capacidad de transformar mediante la retinaldehído deshidrogenasa (RALDH) al retinol incorporado a partir del eCSF, en ácido retinoico, que por su carácter liposoluble, difunde para ejercer su actividad neurogénica. De esta manera, el FGF2 es parte fundamental de un mecanismo global mitogénico/neurogénico en el nicho embrionario.

Nuestra consideración del FGF2 como el principal mitógeno implicado en la replicación/expansión de la población de precursores neuroepiteliales en mamíferos es apoyada por los estudios *in vivo*, incluyendo el nuestro, desarrollados en roedores.

Vaccarino et al. (1999) por ejemplo, demostraron que una insuficiente expansión del *pool* de progenitores en el neuroepitelio telencefálico dorsal fue la base de un impacto final importante a nivel global, sobre la corteza cerebral posnatal en cuanto a volumen y número de neuronas, como consecuencia de una alteración exógena de la concentración de FGF2 inducida durante el desarrollo embrionario de ratas, en fases tempranas de la neurogénesis. Por otra parte, los estudios en el modelo de ratón FGF2 KO han logrado determinar en este periodo una disminución de hasta un 50% en el número de NPCs embrionarias y una menor expansión de esta población en los estudios de proliferación, lo que condujo a una disminución en una proporción similar en el número de neuronas corticales al final de la neurogénesis [Vaccarino et al., 1999; Raballo et al., 2000].

Nuestro estudio de los embriones de ratón FGF2 KO se centró en un periodo aún más temprano del desarrollo, a partir de los 9.5 días, cuando la neurogénesis en ciertas zonas (cerebro anterior) aún está prácticamente ausente o en una fase muy inicial. Además no nos enfocamos únicamente en la región del neuroepitelio que da

origen a la corteza, sino que extendimos el análisis a las tres vesículas cerebrales principales. De esta manera, nuestro estudio de proliferación identificó que el déficit en la expansión, secundario a la ausencia del estímulo FGF2, se gesta desde etapas muy tempranas, lo que resulta compatible con aquellos trabajos que sitúan la influencia proliferativa del FGF2 sobre los precursores neuroepiteliales desde aproximadamente los 9 días del desarrollo [Tropepe et al., 1999].

La reducción en la tasa de proliferación detectada por nuestro estudio para los embriones FGF2 KO resultó similar a aquella encontrada en una fase menos inicial de la neurogénesis por los autores arriba mencionados y afectó de forma global a todo el nicho neurogénico embrionario. Esto último resulta coherente con nuestra hipótesis descrita de actuación/activación global de la proliferación dependiente de FGF2 durante las fases tempranas.

Adicionalmente al déficit proliferativo y como hallazgo complementario, hemos descrito una frecuente asociación de la condición KO con todo un espectro de malformaciones del desarrollo del SNC que van desde la disminución del volumen de las vesículas cerebrales (que incluyen una disminución del grosor de la pared neuroepitelial en estadios tempranos), hasta defectos de cierre de la porción más anterior del tubo neural, hemorragias y colapso de cavidades, lo que sugiere la posible implicación del FGF2 en otros mecanismos morfogenéticos o aspectos del desarrollo cerebral que podrían ser explorados en el futuro.

4. REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN EN EL NICHOS NEUROGÉNICO DEL ADULTO POR EL FGF2.

Las NPCs de los nichos neurogénicos adultos son establecidas posnatalmente a partir de una población de progenitores embrionarios que persisten en zonas específicas del cerebro y que es mantenida indiferenciada y con sus capacidades de autorrenovación y multipotencialidad intactas [Lim and Álvarez-Buylla, 2014]. Aunque estas células en el adulto presentan un grado de actividad mucho menor y un estado de relativa quiescencia, constituyen el resultado de la evolución ontogénica de las NPCs embrionarias y por tanto posiblemente podrían responder a factores y mecanismos regulatorios comunes.

Por su parte, el CSF también experimenta una evolución ontogénica, con un periodo especialmente activo durante la etapa embrionaria como ya se ha discutido ampliamente, para luego decaer en el adulto según lo sugieren algunos trabajos [Buddensiek et al, 2009, 2010; Carnicero et al., 2013]. Sin embargo, conserva algunos atributos interesantes que incluyen su capacidad de influir en ciertos comportamientos celulares [Sawamoto et al., 2006; Farivar et al., 2015] y alterar su composición bajo ciertas circunstancias, lo cual incide en sus propiedades [Cristofallini et al., 2013; Tietje et al., 2014; Sarchielli et al., 2008].

Si bien la actividad neurogénica en el cerebro adulto está disminuida y localizada, se ha demostrado que las NPCs del adulto mantienen una capacidad neurogénica y de respuesta a estímulos a lo largo de la vida []. Además, el hecho de que por su parte, el CSF adulto demuestre claramente una disminución de su actividad estimuladora sobre las NPCs permite plantear la cuestión acerca de la posible utilización del CSF embrionario, biológicamente muy activo, sobre los NPCs del nicho adulto y su potencial eficacia en la generación de poblaciones neuronales como una futura estrategia de terapia neuroregenerativa. En este sentido ya se han comenzado a obtener algunos datos positivos que relacionan el eCSF como un inductor de la neurogénesis en NPCs del adulto [Carnicero et al., 2013]. Resulta pertinente además valorar la presencia y actividad de los factores individuales para los cuales se ha ido identificando una participación en la activación de este nicho, pues regular el comportamiento del nicho adulto con factores solubles podría ser planteado como perspectiva.

En este sentido, la expresión de FGF2 y su receptor más importante, el FGFR1, ha sido demostrada en los dos principales nichos neurogénicos de roedores adultos: la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) [Zheng et al., 2004; Mudò et al., 2007; Belluardo et al., 2008; Frinchi et al., 2008, 2010] y el giro dentado del hipocampo [Ohkubo et al., 2004; Salik et al., 2005; Shetty et al., 2005; Bland et al. 2007]. En nuestros resultados identificamos claramente, por inmunohistoquímica la presencia de una importante cantidad de FGF2 en la V-SVZ de los ventrículos laterales de ratón wild-type e igualmente se confirmó su ausencia en el ratón FGF2 (-/-).

Los estudios de expresión desarrollados por Frinchi et al. (2008) mediante hibridación in situ para mRNA de FGF2 y FGFR1 en la V-SVZ combinados con inmunohistoquímica anti-BrdU indican que la expresión de estas dos proteínas ocurre diferencialmente en poblaciones específicas de NPCs, de manera que solo se observa marcaje positivo para BrdU acompañando a las células que expresan mRNA FGFR1, lo cual permite sugerir que estos precursores en proliferación responden al FGF2 liberado por otra población específica de precursores que no prolifera, de manera similar a lo que hemos propuesto para el periodo embrionario.

Los resultados que presentamos en esta tesis demuestran cómo la anulación del gen FGF2 provoca una caída bastante significativa en la actividad mitogénica de las células precursoras neurales en el nicho adulto. De esta manera, se evidencia que el déficit de actividad proliferativa descrito para el nicho embrionario del ratón FGF2 KO perdura en el tiempo, manteniéndose también en el nicho neurogénico del adulto. Acorde con nuestros resultados, Zheng et al. (2004) encontraron que el ratón knock-out para FGF2 presenta una reducción cercana al 50% de la proliferación de NPCs en la V-SVZ anterior además de bulbos olfatorios más pequeños como consecuencia de una disminución en la producción de nuevas neuronas en esta zona.

Dado que un paso fundamental para poder plantear estrategias de neuroregeneración es lograr expandir la población de NPCs, conocer el elemento responsable del control de esta expansión en etapas embrionarias, momento en el cual ocurre un crecimiento muy intenso, puede ser la clave para lograr una 'reactivación' del nicho en el adulto y conseguir que tenga una población de precursores notablemente incrementada, mediante la aplicación de factores embrionarios específicos.

CONCLUSIONES

1. El FGF2 está presente en la cavidad ventricular del cerebro embrionario, como un componente del eCSF.
2. El eCSF actúa en el nicho neurogénico embrionario como un reservorio de FGF2. Proponemos que probablemente este fluido constituye además, una vía de propagación y actuación de la señal FGF2.
3. Las evidencias aportadas por nuestro estudio sugieren que el FGF2 presente en el eCSF, es un producto de secreción de las NPCs de la pared del tubo neural.
4. Hemos identificado la existencia de una población celular específica, próxima a la cavidad ventricular que parece ser la responsable de la secreción de FGF2 en el cerebro embrionario.
5. La población de células FGF2 positivas parece no presentar una distribución regional diferencial significativa por vesículas cerebrales, tratándose más bien de un mecanismo de secreción global y disperso en el nicho neurogénico embrionario, en etapas tempranas.
6. La secreción de FGF2 en el nicho neurogénico embrionario es un proceso regulado temporalmente y coincide con el periodo de máxima expansión del esbozo cerebral.
7. Las células diana para FGF2 (FGFR1 positivas) presentan una distribución difusa en el nicho, en torno a la cavidad ventricular, y representan una población numéricamente mucho mayor que aquella positiva para la expresión de FGF2.
8. El inmunobloqueo y pérdida de función del FGF2 conlleva una caída drástica de la actividad replicativa celular, y en consecuencia, una disminución en la población de precursores neurales.
9. Nuestro estudio, en conjunto, sugiere que el FGF2 es la principal molécula responsable de la expansión de la población de NPCs en etapas tempranas del desarrollo del cerebro.
10. Nuestros resultados sugieren que el mecanismo de regulación de la expansión de la población de NPCs por parte del FGF2 en el embrión, también tiene lugar en el adulto en el nicho neurogénico de la V-SVZ.

REFERENCIAS

1. Abrous DN, Wojtowicz JM. Interaction between Neurogenesis and Hippocampal Memory System: New Vistas. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015 Jun 1;7(6):10.1101/cshperspect.a018952.
2. Agasse F, Nicoleau C, Petit J, Jaber M, Roger M, Benzakour O, et al. Evidence for a major role of endogenous fibroblast growth factor-2 in apoptotic cortex-induced subventricular zone cell proliferation. Eur J Neurosci. 2007 Dec;26(11):3036-42.
3. Alonso M, Carnicero E, Carretero R, De la Mano A, Moro J, Lamus F, et al. Retinoic Acid, under Cerebrospinal Fluid Control, Induces Neurogenesis during Early Brain Development. J Dev Biol. 2014;2(2):72-83.
4. Alonso MI, Gato A, Moro JA, Barbosa E. Disruption of proteoglycans in neural tube fluid by beta-D-xyloside alters brain enlargement in chick embryos. Anat Rec. 1998 Dec;252(4):499-508.
5. Alonso MI, Gato A, Moro JA, Martin P, Barbosa E. Involvement of sulfated proteoglycans in embryonic brain expansion at earliest stages of development in rat embryos. Cells Tissues Organs. 1999;165(1):1-9.
6. Alonso MI, Martin C, Carnicero E, Bueno D, Gato A. Cerebrospinal fluid control of neurogenesis induced by retinoic acid during early brain development. Dev Dyn. 2011 Jul;240(7):1650-9.
7. Alvarez IS, Araujo M, Nieto MA. Neural induction in whole chick embryo cultures by FGF. Dev Biol. 1998 Jul 1;199(1):42-54.
8. Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2008;73:357-65.
9. Aragon F, Pujades C. FGF signaling controls caudal hindbrain specification through Ras-ERK1/2 pathway. BMC Dev Biol. 2009 Dec 3;9:61,213X-9-61.
10. Bachy I, Kozyraki R, Wassef M. The particles of the embryonic cerebrospinal fluid: how could they influence brain development? Brain Res Bull. 2008 Mar 18;75(2-4):289-94.
11. Belluardo N, Mudo' G, Bonomo A, Di Liberto V, Frinchi M, Fuxe K. Nicotine-induced fibroblast growth factor-2 restores the age-related decline of precursor cell proliferation in the subventricular zone of rat brain. Brain Res. 2008 Feb 8;1193:12-24.
12. Birge WJ, Rose AD, Haywood JR, Doolin PF. Development of the blood-cerebrospinal fluid barrier to proteins and differentiation of cerebrospinal fluid in the chick embryo. Dev Biol. 1974 Dec;41(2):245-54.
13. Blaber SI, Diaz J, Blaber M. Accelerated healing in NONcNZO10/LtJ type 2 diabetic mice by FGF-1. Wound Repair Regen. 2015 Jul-Aug;23(4):538-49.
14. Bland ST, Tamlyn JP, Barrientos RM, Greenwood BN, Watkins LR, Campeau S, et al. Expression of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor mRNA in the medial prefrontal cortex and hippocampus after uncontrollable or controllable stress. Neuroscience. 2007 Feb 23;144(4):1219-28.
15. Borello U, Cobos I, Long JE, McWhirter JR, Murre C, Rubenstein JL. FGF15 promotes neurogenesis and opposes FGF8 function during neocortical development. Neural Dev. 2008 Jul 14;3:17,8104-3-17.

16. Brickman YG, Ford MD, Small DH, Bartlett PF, Nurcombe V. Heparan sulfates mediate the binding of basic fibroblast growth factor to a specific receptor on neural precursor cells. *J Biol Chem.* 1995 Oct 20;270(42):24941-8.
17. Buddensiek J, Dressel A, Kowalski M, Runge U, Schroeder H, Hermann A, et al. Cerebrospinal fluid promotes survival and astroglial differentiation of adult human neural progenitor cells but inhibits proliferation and neuronal differentiation. *BMC Neurosci.* 2010 Apr 8;11:48,2202-11-48.
18. Buddensiek J, Dressel A, Kowalski M, Storch A, Sabolek M. Adult cerebrospinal fluid inhibits neurogenesis but facilitates gliogenesis from fetal rat neural stem cells. *J Neurosci Res.* 2009 Nov 1;87(14):3054-66.
19. Bueno D, Parvas M, Garcia-Fernandez J. The embryonic blood-cerebrospinal fluid barrier function before the formation of the fetal choroid plexus: role in cerebrospinal fluid formation and homeostasis. *Croat Med J.* 2014 Aug 28;55(4):306-16.
20. Bueno D, Parvas M, Hermelo I, Garcia-Fernandez J. Embryonic blood-cerebrospinal fluid barrier formation and function. *Front Neurosci.* 2014 Oct 28;8:343.
21. Calarco A, Petillo O, Bosetti M, Torpedine A, Cannas M, Perrone L, et al. Controlled delivery of the heparan sulfate/FGF-2 complex by a polyelectrolyte scaffold promotes maximal hMSC proliferation and differentiation. *J Cell Biochem.* 2010 Jul 1;110(4):903-9.
22. Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci.* 2003 May;6(5):507-18.
23. Carnicero E, Alonso MI, Carretero R, Lamus F, Moro JA, de la Mano A, et al. Embryonic cerebrospinal fluid activates neurogenesis of neural precursors within the subventricular zone of the adult mouse brain. *Cells Tissues Organs.* 2013;198(5):398-404.
24. Chau KF, Springel MW, Broadbelt KG, Park HY, Topal S, Lun MP, et al. Progressive Differentiation and Instructive Capacities of Amniotic Fluid and Cerebrospinal Fluid Proteomes following Neural Tube Closure. *Dev Cell.* 2015 Dec 21;35(6):789-802.
25. Cho GS, Choi SC, Han JK. BMP signal attenuates FGF pathway in anteroposterior neural patterning. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 May 10;434(3):509-15.
26. Cholfin JA, Rubenstein JL. Frontal cortex subdivision patterning is coordinately regulated by Fgf8, Fgf17, and Emx2. *J Comp Neurol.* 2008 Jul 10;509(2):144-55.
27. Cieslak D, Szulc-Kuberska J, Stepień H, Klimek A. Epidermal growth factor in human cerebrospinal fluid: reduced levels in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 1986 Nov;233(6):376-7.
28. Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, Deleo AM, Pastrana E, et al. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron.* 2014 May 7;82(3):545-59.
29. Cristofanilli M, Cymring B, Lu A, Rosenthal H, Sadiq SA. Cerebrospinal fluid derived from progressive multiple sclerosis patients promotes neuronal and oligodendroglial differentiation of human neural precursor cells in vitro. *Neuroscience.* 2013 Oct 10;250:614-21.
30. Cristofanilli M, Cymring B, Lu A, Rosenthal H, Sadiq SA. Cerebrospinal fluid derived from progressive multiple sclerosis patients promotes neuronal and oligodendroglial differentiation of human neural precursor cells in vitro. *Neuroscience.* 2013 Oct 10;250:614-21.
31. Crossley PH, Martinez S, Martin GR. Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature.* 1996 Mar 7;380(6569):66-8.

32. Dayer AG, Jenny B, Sauvain MO, Potter G, Salmon P, Zraggen E, et al. Expression of FGF-2 in neural progenitor cells enhances their potential for cellular brain repair in the rodent cortex. *Brain*. 2007 Nov;130(Pt 11):2962-76.
33. Delaunay D, Heydon K, Cumano A, Schwab MH, Thomas JL, Suter U, et al. Early neuronal and glial fate restriction of embryonic neural stem cells. *J Neurosci*. 2008 Mar 5;28(10):2551-62.
34. Desmond ME, Jacobson AG. Embryonic brain enlargement requires cerebrospinal fluid pressure. *Dev Biol*. 1977 May;57(1):188-98.
35. Desmond ME, Knepper JE, DiBenedetto AJ, Malaugh E, Callejo S, Carretero R, et al. Focal adhesion kinase as a mechanotransducer during rapid brain growth of the chick embryo. *Int J Dev Biol*. 2014;58(1):35-43.
36. Desmond ME, Levitan ML. Brain expansion in the chick embryo initiated by experimentally produced occlusion of the spinal neurocoel. *Anat Rec*. 2002 Oct 1;268(2):147-59.
37. Desmond ME, Levitan ML, Haas AR. Internal luminal pressure during early chick embryonic brain growth: descriptive and empirical observations. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2005 Aug;285(2):737-47.
38. Dickinson ME, Krumlauf R, McMahon AP. Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development*. 1994 Jun;120(6):1453-71.
39. Dono R. Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Apr;284(4):R867-81.
40. Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J*. 1998 Aug 3;17(15):4213-25.
41. Douet V, Kerever A, Arikawa-Hirasawa E, Mercier F. Fractone-heparan sulphates mediate FGF-2 stimulation of cell proliferation in the adult subventricular zone. *Cell Prolif*. 2013 Apr;46(2):137-45.
42. Drew LJ, Fusi S, Hen R. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus? *Learn Mem*. 2013 Nov 19;20(12):710-29.
43. Duvernoy HM, Risold PY. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev*. 2007 Nov;56(1):119-47.
44. Ernst S, Langer R, Cooney CL, Sasisekharan R. Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995;30(5):387-444.
45. Farivar S, Mohamadzade Z, Shiari R, Fahimzad A. Neural differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells by cerebrospinal fluid. *Iran J Child Neurol*. 2015 Winter;9(1):87-93.
46. Feliciano DM, Zhang S, Nasrallah CM, Lisgo SN, Bordey A. Embryonic cerebrospinal fluid nanovesicles carry evolutionarily conserved molecules and promote neural stem cell amplification. *PLoS One*. 2014 Feb 12;9(2):e88810.
47. Fernandez C, Tatard VM, Bertrand N, Dahmane N. Differential modulation of Sonic-hedgehog-induced cerebellar granule cell precursor proliferation by the IGF signaling network. *Dev Neurosci*. 2010 Mar;32(1):59-70.
48. Ford-Perriss M, Abud H, Murphy M. Fibroblast growth factors in the developing central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001 Jul;28(7):493-503.

49. Forsten-Williams K, Chu CL, Fannon M, Buczek-Thomas JA, Nugent MA. Control of growth factor networks by heparan sulfate proteoglycans. *Ann Biomed Eng.* 2008 Dec;36(12):2134-48.
50. Forthmann B, Grothe C, Claus P. A nuclear odyssey: fibroblast growth factor-2 (FGF-2) as a regulator of nuclear homeostasis in the nervous system. *Cell Mol Life Sci.* 2015 May;72(9):1651-62.
51. Frinchi M, Bonomo A, Trovato-Salinaro A, Condorelli DF, Fuxe K, Spampinato MG, et al. Fibroblast growth factor-2 and its receptor expression in proliferating precursor cells of the subventricular zone in the adult rat brain. *Neurosci Lett.* 2008 Dec 5;447(1):20-5.
52. Frinchi M, Di Liberto V, Olivieri M, Fuxe K, Belluardo N, Mudo G. FGF-2/FGFR1 neurotrophic system expression level and its basal activation do not account for the age-dependent decline of precursor cell proliferation in the subventricular zone of rat brain. *Brain Res.* 2010 Oct 28;1358:39-45.
53. Gajera CR, Emich H, Liubinski O, Christ A, Beckervordersandforth-Bonk R, Yoshikawa K, et al. LRP2 in ependymal cells regulates BMP signaling in the adult neurogenic niche. *J Cell Sci.* 2010 Jun 1;123(Pt 11):1922-30.
54. Galderisi U, Peluso G, Di Bernardo G, Calarco A, D'Apolito M, Petillo O, et al. Efficient cultivation of neural stem cells with controlled delivery of FGF-2. *Stem Cell Res.* 2013 Jan;10(1):85-94.
55. Galderisi U, Peluso G, Di Bernardo G, Calarco A, D'Apolito M, Petillo O, et al. Efficient cultivation of neural stem cells with controlled delivery of FGF-2. *Stem Cell Res.* 2013 Jan;10(1):85-94.
56. Gato A, Alonso MI, Martin C, Carnicero E, Moro JA, De la Mano A, et al. Embryonic cerebrospinal fluid in brain development: neural progenitor control. *Croat Med J.* 2014 Aug 28;55(4):299-305.
57. Gato A, Desmond ME. Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histiogenesis. *Dev Biol.* 2009 Mar 15;327(2):263-72.
58. Gato A, Martin P, Alonso MI, Martin C, Pulgar MA, Moro JA. Analysis of cerebro-spinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2004 Apr 1;301(4):280-9.
59. Gato A, Moro JA, Alonso MI, Bueno D, De La Mano A, Martin C. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005 May;284(1):475-84.
60. Gato A, Moro JA, Alonso MI, Pastor JF, Represa JJ, Barbosa E. Chondroitin sulphate proteoglycan and embryonic brain enlargement in the chick. *Anat Embryol (Berl).* 1993 Jul;188(1):101-6.
61. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug;1840(8):2506-19.
62. Glover JC, Renaud JS, Rijli FM. Retinoic acid and hindbrain patterning. *J Neurobiol.* 2006 Jun;66(7):705-25.
63. Guzy RD, Stoilov I, Elton TJ, Mecham RP, Ornitz DM. Fibroblast growth factor 2 is required for epithelial recovery, but not for pulmonary fibrosis, in response to bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015 Jan;52(1):116-28.

64. Hacker U, Nybakken K, Perrimon N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Jul;6(7):530-41.
65. Hayes NL, Nowakowski RS. Dynamics of cell proliferation in the adult dentate gyrus of two inbred strains of mice. *Brain Res Dev Brain Res.* 2002 Mar 31;134(1-2):77-85.
66. Hendrickx M, Van XH, Leyns L. Anterior-posterior patterning of neural differentiated embryonic stem cells by canonical Wnts, Fgfs, Bmp4 and their respective antagonists. *Dev Growth Differ.* 2009 Oct;51(8):687-98.
67. Hirota Y, Sawada M, Huang SH, Ogino T, Ohata S, Kubo A, et al. Roles of Wnt Signaling in the Neurogenic Niche of the Adult Mouse Ventricular-Subventricular Zone. *Neurochem Res.* 2016 Feb;41(1-2):222-30.
68. Hor CH, Tang BL. Sonic hedgehog as a chemoattractant for adult NPCs. *Cell Adh Migr.* 2010 Jan-Mar;4(1):1-3.
69. Hoyo-Becerra C, Lopez-Avalos MD, Cifuentes M, Visser R, Fernandez-Llebrez P, Grondona JM. The subcommissural organ and the development of the posterior commissure in chick embryos. *Cell Tissue Res.* 2010 Feb;339(2):383-95.
70. Huang X, Liu J, Ketova T, Fleming JT, Grover VK, Cooper MK, et al. Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 4;107(18):8422-7.
71. Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci.* 2010 Mar 3;30(9):3489-98.
72. Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem.* 2011 Feb;149(2):121-30.
73. Iwata T, Hevner RF. Fibroblast growth factor signaling in development of the cerebral cortex. *Dev Growth Differ.* 2009 Apr;51(3):299-323.
74. Jacobs S, Lie DC, DeCicco KL, Shi Y, DeLuca LM, Gage FH, et al. Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 7;103(10):3902-7.
75. Jenny B, Kanemitsu M, Tsupikov O, Potter G, Salmon P, Zraggen E, et al. Fibroblast growth factor-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential. *Stem Cells.* 2009 Jun;27(6):1309-17.
76. Jin-qiao S, Bin S, Wen-hao Z, Yi Y. Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in neonatal rats after ischemic brain injury. *Brain Dev.* 2009 May;31(5):331-40.
77. Johnson DE, Lu J, Chen H, Werner S, Williams LT. The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol Cell Biol.* 1991 Sep;11(9):4627-34.
78. Joppe SE, Hamilton LK, Cochard LM, Levros LC, Aumont A, Barnabe-Heider F, et al. Bone morphogenetic protein dominantly suppresses epidermal growth factor-induced proliferative expansion of adult forebrain neural precursors. *Front Neurosci.* 2015 Oct 29;9:407.
79. Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods.* 2002 Mar 30;115(1):97-105.

80. Kelly CM, Tyers P, Borg MT, Svendsen CN, Dunnett SB, Rosser AE. EGF and FGF-2 responsiveness of rat and mouse neural precursors derived from the embryonic CNS. *Brain Res Bull.* 2005 Dec 15;68(1-2):83-94.
81. Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 2004 Apr;14(2):186-91.
82. Kerever A, Mercier F, Nonaka R, de Vega S, Oda Y, Zalc B, et al. Perlecan is required for FGF-2 signaling in the neural stem cell niche. *Stem Cell Res.* 2014 Mar;12(2):492-505.
83. Kerever A, Schnack J, Vellinga D, Ichikawa N, Moon C, Arikawa-Hirasawa E, et al. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells.* 2007 Sep;25(9):2146-57.
84. Khodosevich K, Watanabe Y, Monyer H. EphA4 preserves postnatal and adult neural stem cells in an undifferentiated state in vivo. *J Cell Sci.* 2011 Apr 15;124(Pt 8):1268-79.
85. Kilpatrick TJ, Bartlett PF. Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF. *J Neurosci.* 1995 May;15(5 Pt 1):3653-61.
86. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:149-84.
87. Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, et al. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron.* 2011 Mar 10;69(5):893-905.
88. Li X, Desmond M. Modulation of Na⁺/K⁺-ATPase pumps in the heart of the chick embryo influences brain expansion. *Soc Neurosci Abstr.* 1991;17:16-21.
89. Liang Y, Agren L, Lyczek A, Walczak P, Bulte JW. Neural progenitor cell survival in mouse brain can be improved by co-transplantation of helper cells expressing bFGF under doxycycline control. *Exp Neurol.* 2013 Sep;247:73-9.
90. Liang Y, Agren L, Lyczek A, Walczak P, Bulte JW. Neural progenitor cell survival in mouse brain can be improved by co-transplantation of helper cells expressing bFGF under doxycycline control. *Exp Neurol.* 2013 Sep;247:73-9.
91. Liao S, Bodmer J, Pietras D, Azhar M, Doetschman T, Schultz Jel J. Biological functions of the low and high molecular weight protein isoforms of fibroblast growth factor-2 in cardiovascular development and disease. *Dev Dyn.* 2009 Feb;238(2):249-64.
92. Lim DA, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells stake their ground. *Trends Neurosci.* 2014 Oct;37(10):563-71.
93. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron.* 2000 Dec;28(3):713-26.
94. Liu A, Li JY, Bromleigh C, Lao Z, Niswander LA, Joyner AL. FGF17b and FGF18 have different midbrain regulatory properties from FGF8b or activated FGF receptors. *Development.* 2003 Dec;130(25):6175-85.
95. Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature.* 2000 Jun 22;405(6789):951-5.

96. Maric D, Fiorio Pla A, Chang YH, Barker JL. Self-renewing and differentiating properties of cortical neural stem cells are selectively regulated by basic fibroblast growth factor (FGF) signaling via specific FGF receptors. *J Neurosci*. 2007 Feb 21;27(8):1836-52.
97. Martens DJ, Tropepe V, van Der Kooy D. Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone. *J Neurosci*. 2000 Feb 1;20(3):1085-95.
98. Martin C, Alonso MI, Santiago C, Moro JA, De la Mano A, Carretero R, et al. Early embryonic brain development in rats requires the trophic influence of cerebrospinal fluid. *Int J Dev Neurosci*. 2009 Nov;27(7):733-40.
99. Martin C, Bueno D, Alonso MI, Moro JA, Callejo S, Parada C, et al. FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells. *Dev Biol*. 2006 Sep 15;297(2):402-16.
100. Martinez S, Crossley PH, Cobos I, Rubenstein JL, Martin GR. FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmo-cerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression. *Development*. 1999 Mar;126(6):1189-200.
101. Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Brauninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, et al. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci*. 2005 Jul 1;118(Pt 13):2849-58.
102. Mashayekhi F, Azari M, Moghadam LM, Yazdankhah M, Naji M, Salehi Z. Changes in cerebrospinal fluid nerve growth factor levels during chick embryonic development. *J Clin Neurosci*. 2009 Oct;16(10):1334-7.
103. Mashayekhi F, Sadeghi M, Rajaei F. Induction of perlecan expression and neural cell proliferation by FGF-2 in the developing cerebral cortex: an in vivo study. *J Mol Neurosci*. 2011 Oct;45(2):87-93.
104. Matsuo I, Kimura-Yoshida C. Extracellular modulation of Fibroblast Growth Factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev*. 2013 Aug;23(4):399-407.
105. Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 14;101(50):17528-32.
106. Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 14;101(50):17528-32.
107. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol*. 2000 Mar;20(6):2260-8.
108. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):265-78.
109. Miyata T, Okamoto M, Shinoda T, Kawaguchi A. Interkinetic nuclear migration generates and opposes ventricular-zone crowding: insight into tissue mechanics. *Front Cell Neurosci*. 2015 Jan 28;8:473.
110. Monfils MH, Driscoll I, Kamitakahara H, Wilson B, Flynn C, Teskey GC, et al. FGF-2-induced cell proliferation stimulates anatomical, neurophysiological and functional recovery from neonatal motor cortex injury. *Eur J Neurosci*. 2006 Aug;24(3):739-49.

111. Moore L, Bain JM, Loh JM, Levison SW. PDGF-responsive progenitors persist in the subventricular zone across the lifespan. *ASN Neuro*. 2014 Feb 7;6(2):10.1042/AN20120041.
112. Mudo G, Belluardo N, Mauro A, Fuxe K. Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation. *Neuroscience*. 2007 Mar 16;145(2):470-83.
113. Murzin AG, Lesk AM, Chothia C. beta-Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. *J Mol Biol*. 1992 Jan 20;223(2):531-43.
114. Naruse M, Shibasaki K, Ishizaki Y. FGF-2 signal promotes proliferation of cerebellar progenitor cells and their oligodendrocytic differentiation at early postnatal stage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 7;463(4):1091-6.
115. Nickel W. Unconventional secretion: an extracellular trap for export of fibroblast growth factor 2. *J Cell Sci*. 2007 Jul 15;120(Pt 14):2295-9.
116. Nugent MA, Zaia J, Spencer JL. Heparan sulfate-protein binding specificity. *Biochemistry (Mosc)*. 2013 Jul;78(7):726-35.
117. Nurcombe V, Ford MD, Wildschut JA, Bartlett PF. Developmental regulation of neural response to FGF-1 and FGF-2 by heparan sulfate proteoglycan. *Science*. 1993 Apr 2;260(5104):103-6.
118. Ohkubo Y, Uchida AO, Shin D, Partanen J, Vaccarino FM. Fibroblast growth factor receptor 1 is required for the proliferation of hippocampal progenitor cells and for hippocampal growth in mouse. *J Neurosci*. 2004 Jul 7;24(27):6057-69.
119. Ohkubo Y, Uchida AO, Shin D, Partanen J, Vaccarino FM. Fibroblast growth factor receptor 1 is required for the proliferation of hippocampal progenitor cells and for hippocampal growth in mouse. *J Neurosci*. 2004 Jul 7;24(27):6057-69.
120. Ohmiya M, Fukumitsu H, Nitta A, Nomoto H, Furukawa Y, Furukawa S. Administration of FGF-2 to embryonic mouse brain induces hydrocephalic brain morphology and aberrant differentiation of neurons in the postnatal cerebral cortex. *J Neurosci Res*. 2001 Aug 1;65(3):228-35.
121. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2001;2(3):REVIEWS3005.
122. Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 12;95(10):5672-7.
123. Parada C, Gato A, Aparicio M, Bueno D. Proteome analysis of chick embryonic cerebrospinal fluid. *Proteomics*. 2006 Jan;6(1):312-20.
124. Parada C, Gato A, Bueno D. All-trans retinol and retinol-binding protein from embryonic cerebrospinal fluid exhibit dynamic behaviour during early central nervous system development. *Neuroreport*. 2008 Jun 11;19(9):945-50.
125. Parada C, Gato A, Bueno D. Mammalian embryonic cerebrospinal fluid proteome has greater apolipoprotein and enzyme pattern complexity than the avian proteome. *J Proteome Res*. 2005 Nov-Dec;4(6):2420-8.
126. Parvas M, Rius M, Bueno D. Most of the abundant protein fractions of embryonic cerebrospinal fluid are produced out of the brain anlagen. *The Open Proteomics Journal*. 2008;1:1-4.

127. Parvas M, Parada C, Bueno D. A blood-CSF barrier function controls embryonic CSF protein composition and homeostasis during early CNS development. *Dev Biol.* 2008 Sep 1;321(1):51-63.
128. Pera EM, Acosta H, Gouignard N, Climent M, Arregi I. Active signals, gradient formation and regional specificity in neural induction. *Exp Cell Res.* 2014 Feb 1;321(1):25-31.
129. Ponti G, Obernier K, Guinto C, Jose L, Bonfanti L, Alvarez-Buylla A. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 12;110(11):E1045-54.
130. Raballo R, Rhee J, Lyn-Cook R, Leckman JF, Schwartz ML, Vaccarino FM. Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 2000 Jul 1;20(13):5012-23.
131. Rabouille C, Malhotra V, Nickel W. Diversity in unconventional protein secretion. *J Cell Sci.* 2012 Nov 15;125(Pt 22):5251-5.
132. Rawson NE, LaMantia AS. A speculative essay on retinoic acid regulation of neural stem cells in the developing and aging olfactory system. *Exp Gerontol.* 2007 Jan-Feb;42(1-2):46-53.
133. Reilly JF, Maher PA. Importin beta-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation. *J Cell Biol.* 2001 Mar 19;152(6):1307-12.
134. Rodriguez-Gallardo L, Climent V, Garcia-Martinez V, Schoenwolf GC, Alvarez IS. Targeted over-expression of FGF in chick embryos induces formation of ectopic neural cells. *Int J Dev Biol.* 1997 Oct;41(5):715-23.
135. Salehi Z. In vivo injection of fibroblast growth factor-2 into the cisterna magna induces glypican-6 expression in mouse brain tissue. *J Clin Neurosci.* 2009 May;16(5):689-92.
136. Salehi Z, Mashayekhi F, Naji M, Pandamooz S. Insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid during the development of mouse embryos. *J Clin Neurosci.* 2009 Jul;16(7):950-3.
137. Salik E, Ercan F, Sirvanci S, Cetinel S, Onat F, San T. Effect of aging on the distribution of basic fibroblast growth factor immunoreactive cells in the rat hippocampus. *Brain Res Bull.* 2005 Jan 15;64(5):409-15.
138. Sanalkumar R, Vidyanand S, Lalitha Indulekha C, James J. Neuronal vs. glial fate of embryonic stem cell-derived neural progenitors (ES-NPs) is determined by FGF2/EGF during proliferation. *J Mol Neurosci.* 2010 Sep;42(1):17-27.
139. Santiago JJ, Ma X, McNaughton LJ, Nickel BE, Bestvater BP, Yu L, et al. Preferential accumulation and export of high molecular weight FGF-2 by rat cardiac non-myocytes. *Cardiovasc Res.* 2011 Jan 1;89(1):139-47.
140. Sarchielli P, Di Filippo M, Ercolani MV, Chiasserini D, Mattioni A, Bonucci M, et al. Fibroblast growth factor-2 levels are elevated in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett.* 2008 Apr 25;435(3):223-8.
141. Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science.* 2006 Feb 3;311(5761):629-32.
142. Schoenwolf GC, Desmond ME. Neural tube occlusion precedes rapid brain enlargement. *J Exp Zool.* 1984 Jun;230(3):405-7.

143. Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, et al. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):289-300.
144. Shetty AK, Hattiangady B, Shetty GA. Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia*. 2005 Aug 15;51(3):173-86.
145. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem*. 2001 Aug;49(8):931-7.
146. Shimokawa K, Kimura-Yoshida C, Nagai N, Mukai K, Matsubara K, Watanabe H, et al. Cell surface heparan sulfate chains regulate local reception of FGF signaling in the mouse embryo. *Dev Cell*. 2011 Aug 16;21(2):257-72.
147. Sorensen V, Nilsen T, Wiedlocha A. Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *Bioessays*. 2006 May;28(5):504-14.
148. Sorensen V, Nilsen T, Wiedlocha A. Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *Bioessays*. 2006 May;28(5):504-14.
149. Stolp HB, Molnar Z. Neurogenic niches in the brain: help and hindrance of the barrier systems. *Front Neurosci*. 2015 Feb 3;9:20.
150. Sun D, Bullock MR, McGinn MJ, Zhou Z, Altememi N, Hagood S, et al. Basic fibroblast growth factor-enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2009 Mar;216(1):56-65.
151. Sun D, Colello RJ, Daugherty WP, Kwon TH, McGinn MJ, Harvey HB, et al. Cell proliferation and neuronal differentiation in the dentate gyrus in juvenile and adult rats following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2005 Jan;22(1):95-105.
152. Sun D, McGinn MJ, Zhou Z, Harvey HB, Bullock MR, Colello RJ. Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery. *Exp Neurol*. 2007 Mar;204(1):264-72.
153. Sun F, Mao X, Xie L, Ding M, Shao B, Jin K. Notch1 signaling modulates neuronal progenitor activity in the subventricular zone in response to aging and focal ischemia. *Aging Cell*. 2013 Dec;12(6):978-87.
154. Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. Mode of cell proliferation in the developing mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jan 4;91(1):375-9.
155. Tietje A, Maron KN, Wei Y, Feliciano DM. Cerebrospinal fluid extracellular vesicles undergo age dependent declines and contain known and novel non-coding RNAs. *PLoS One*. 2014 Nov 24;9(11):e113116.
156. Tropepe V, Sibilia M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol*. 1999 Apr 1;208(1):166-88.
157. Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, Nilsen J, Rhee J, Zhou M, et al. Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci*. 1999 Sep;2(9):848.
158. Venkateswaran S, Blanckaert V, Schelling M. Production of anti-fibroblast growth factor receptor monoclonal antibodies by in vitro immunization. *Hybridoma*. 1992 Dec;11(6):729-39.

159. Vera A, Recabal A, Saldivia N, Stanic K, Torrejon M, Montecinos H, et al. Interaction between SCO-spondin and low density lipoproteins from embryonic cerebrospinal fluid modulates their roles in early neurogenesis. *Front Neuroanat*. 2015 May 28;9:72.
160. Vera A, Stanic K, Montecinos H, Torrejon M, Marcellini S, Caprile T. SCO-spondin from embryonic cerebrospinal fluid is required for neurogenesis during early brain development. *Front Cell Neurosci*. 2013 Jun 3;7:80.
161. Wang ZL, Cheng SM, Ma MM, Ma YP, Yang JP, Xu GL, et al. Intranasally delivered bFGF enhances neurogenesis in adult rats following cerebral ischemia. *Neurosci Lett*. 2008 Nov 28;446(1):30-5.
162. Werner S, Duan DS, de Vries C, Peters KG, Johnson DE, Williams LT. Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol Cell Biol*. 1992 Jan;12(1):82-8.
163. Werner S, Unsicker K, von Bohlen und Halbach O. Fibroblast growth factor-2 deficiency causes defects in adult hippocampal neurogenesis, which are not rescued by exogenous fibroblast growth factor-2. *J Neurosci Res*. 2011 Oct;89(10):1605-17.
164. Whittemore SR, Morassutti DJ, Walters WM, Liu RH, Magnuson DS. Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations. *Exp Cell Res*. 1999 Oct 10;252(1):75-95.
165. Wildburger NC, Ali SR, Hsu WC, Shavkunov AS, Nenov MN, Lichti CF, et al. Quantitative proteomics reveals protein-protein interactions with fibroblast growth factor 12 as a component of the voltage-gated sodium channel 1.2 (nav1.2) macromolecular complex in Mammalian brain. *Mol Cell Proteomics*. 2015 May;14(5):1288-300.
166. Yu PJ, Ferrari G, Galloway AC, Mignatti P, Pintucci G. Basic fibroblast growth factor (FGF-2): the high molecular weight forms come of age. *J Cell Biochem*. 2007 Apr 1;100(5):1100-8.
167. Zappaterra MD, Lisgo SN, Lindsay S, Gygi SP, Walsh CA, Ballif BA. A comparative proteomic analysis of human and rat embryonic cerebrospinal fluid. *J Proteome Res*. 2007 Sep;6(9):3537-48.
168. Zappaterra MW, Lehtinen MK. The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Sep;69(17):2863-78.
169. Zheng W, Nowakowski RS, Vaccarino FM. Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev Neurosci*. 2004 Mar-Aug;26(2-4):181-96.
170. Zhou CJ, Borello U, Rubenstein JL, Pleasure SJ. Neuronal production and precursor proliferation defects in the neocortex of mice with loss of function in the canonical Wnt signaling pathway. *Neuroscience*. 2006 Nov 3;142(4):1119-31.
171. Zhou M, Sutliff RL, Paul RJ, Lorenz JN, Hoying JB, Haudenschild CC, et al. Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat Med*. 1998 Feb;4(2):201-7.
172. Zhu M, Feng Y, Dangelmajer S, Guerrero-Cazares H, Chaichana KL, Smith CL, et al. Human cerebrospinal fluid regulates proliferation and migration of stem cells through insulin-like growth factor-1. *Stem Cells Dev*. 2015 Jan 15;24(2):160-71.