

2017-2018



# PAPEL DE LOS MITÓGENOS DEL FLUIDO CEREBRO-ESPINAL EMBRIONARIO EN LA MORFOGÉNESIS CEREBRAL DE RATA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

VERÓNICA CRESPO LÓPEZ

Dirigido por:  
Profª Dra. Mª ISABEL ALONSO REVUELTA

Página 1 | 26

<b>PAPEL DE LOS MITÓGENOS DEL FLUIDO CEREBRO-ESPINAL EMBRIONARIO EN LA MORFOGÉNESIS CEREBRAL DE RATA</b> .....	1
Abreviaturas.....	3
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
Hipótesis y objetivos .....	8
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	8
2.1. OBTENCIÓN de medio de cultivo de embriones de rata .....	8
2.2. OBTENCIÓN de embriones de rata.....	9
2.3. TÉCNICA de microinyección y microaspiración.....	10
Preparación de los capilares de microinyección .....	10
Técnica de microinyección y microaspiración .....	11
Extracción de fluido cerebroespinal embrionario (eCSF).....	12
Ensayo de reactividad de anticuerpos anti FGF2y EGFcon DotBlot .....	12
Microinyección de anticuerpos .....	13
2.4. TÉCNICA de cultivo de embriones de rata .....	14
2.5. Fotografiado y valoración morfológica .....	14
2.6. <i>Fijación y procesamiento en bloques de parafina</i> .....	15
2.7. Elaboración de cortes histológicos .....	15
2.8. Inmunomarcaje de FGF2 y EGF.....	16
2.9. MICROSCOPIA láser confocal .....	17
<b>3. RESULTADOS</b> .....	18
3.1. DotBlot .....	18
3.2. RESULTADOS inmunomarcaje FGF2 en neuroepitelio .....	18
3.3. Observación morfológica de embriones.....	19
Inmunobloqueo de FGF2 en eCSF.....	19
Inmunobloqueo de EGF en el eCSF .....	20
Inmunobloqueo de FGF2 y EGF en el eCSF .....	20
Valoración morfológica de los embriones .....	21
<b>4. interpretación de los resultados</b> .....	22
6. conclusiones.....	23
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	24

## ABREVIATURAS

<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>BrdU</b>	Bromodeoxiuridina
<b>CPNs</b>	Células precursoras neurales
<b>eCSF</b>	Fluido cerebroespinal embrionario
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>FGF2</b>	Factor crecimiento fibroblastos tipo 2
<b>FGFs</b>	Factores de crecimiento de fibroblastos
<b>FGFRs</b>	Receptores de factores de crecimiento de fibroblastos
<b>SDS-page</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico.
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TTBS</b>	Tris búfer salino Twin
<b>Wnt</b>	Wingless
<b>RT</b>	Condiciones temperatura ambiente y presión de 1 atmósfera

# PAPEL DE LOS MITÓGENOS DEL FLUIDO CEREBRO-ESPINAL EMBRIONARIO EN LA MORFOGÉNESIS CEREBRAL DE RATA

## 1. INTRODUCCIÓN

El cerebro de los mamíferos ha permitido que las tareas de relacionar y coordinar las funciones vitales y la interacción con el medio ambiente, nos diferencien de otros organismos, siendo el órgano más complejo del organismo y parte fundamental del sistema nervioso central.

El sistema nervioso central se desarrolla durante el desarrollo embrionario temprano, donde tras el proceso de gastrulación se genera un embrión con tres capas germinales: Ectodermo, que forma la cubierta dorsal del embrión y queda en contacto con la cavidad amniótica; Mesodermo, que da lugar a la capa intermedia o mesénquima; y Endodermo, que da origen a la cubierta ventral y queda en contacto con el saco vitelino.

Seguidamente tienen lugar una serie de acontecimientos, conocidos en conjunto como Neurulación, que darán origen al cerebro embrionario, comenzando con una inducción por la notocorda, de la placa neural en una zona concreta del ectodermo, seguida de un proceso de invaginación y progresiva fusión de los bordes de la placa, formando una estructura cilíndrica denominada tubo neural, inmersa en el mesénquima embrionario, terminando el cierre del tubo neural en el estadio 10 días en ratas (Bruce M. Carlson, 2014). Durante el desarrollo del tubo neural se diferencian progresivamente las vesículas que darán lugar a las distintas partes del cerebro adulto como se muestran en la figura 1:

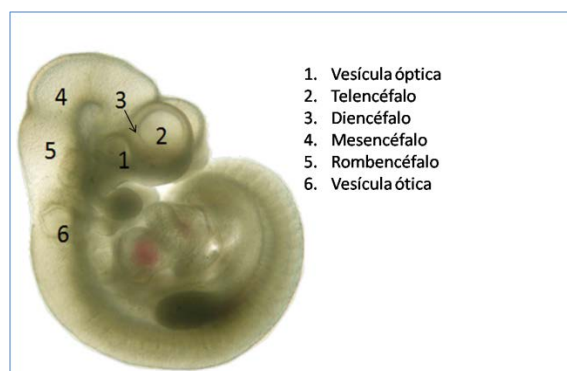


Figura 1. Embrión de rata de 11.5 días. Se muestran las vesículas cerebrales primarias (mesencéfalo y rombencéfalo), y secundarias (telencéfalo y diencéfalo) junto con la vesícula óptica y ótica.

Las células precursoras neurales (CPNs), término que se asimila a las células neuroepiteliales embrionarias durante el desarrollo embrionario del cerebro, siguen una secuencia de comportamiento similar a la que tiene lugar en el nicho neurogénico adulto. El orden de estos procesos comienza con la activación de los precursores, y su replicación (aumento de la población de precursores), seguido de la diferenciación neural, al principio del desarrollo solo se generan neuronas luego también glía y su posterior migración, que finalmente concluye con una maduración bioquímica/funcional e integración en los circuitos neurales. Estos eventos necesitan un entorno de estímulos y señales apropiadas para su correcto desarrollo, lo cual tiene lugar en el denominado “nicho neurogénico”.

En el caso del nicho neurogénico embrionario estas señales provienen en parte del contenido de las cavidades delimitadas por las propias células neuroepiteliales, el Fluido Cerebroespinal Embrionario (eCSF). La diferencia más importante con el nicho neurogénico adulto es la elevada tasa neurogénica y proliferativa de las CPNs, necesaria para asegurar la continuidad de la población de precursores, que pueda generar un número adecuado de neuronas y células gliales para el correcto funcionamiento del SNC. En relación con el nicho neurogénico embrionario, se ha demostrado que la presión positiva ejercida por el eCSF sobre las paredes del tubo neural regulan su expansión y, por tanto, el volumen del extremo cefálico o esbozo cerebral, por lo cual también influye en el desarrollo morfológico adecuado del embrión (Gato et al., 2009) ver figura 2.

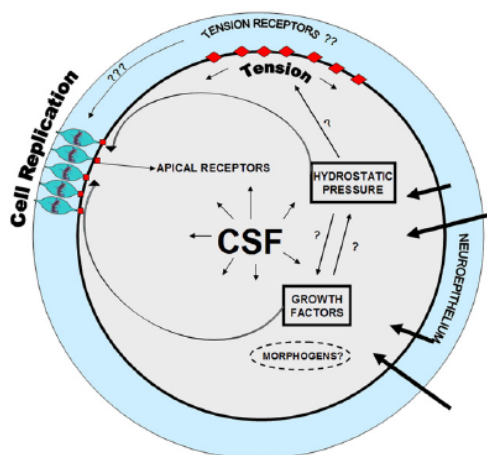


Figura 2. Diagrama esquemático de una sección transversal del tubo neural embrionario. Muestra la interdependencia de las interacciones de la presión hidrostática creada por el eCSF y la acción de factores de crecimiento sobre el comportamiento del neuroepitelio (Gato et al., 2009)

Los mecanismos que regulan la proliferación de las CPNs en el desarrollo embrionario son parcialmente desconocidos, sin embargo se conoce la acción de factores tróficos y mitogénicos en relación con el aumento del número de precursores y la neurogénesis. Entre ellos destacan el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), así como, factores de transcripción como Wnt, entre otros. (Dickinson et al., 1994, Kelly et al., 2005., Imayoshi et al., 2010., Fernandez et al., 2010., Lehtinen et al., 2011., Naruse et al 2015)

Los FGF en mamíferos constituyen una familia de al menos 21 miembros diferentes, cada uno de los cuales actúa sobre receptores de superficie celular tipo tirosina quinasa (FGFRs). La estructura del FGFR activado contiene desde el N hasta el C terminal, tres dominios extracelulares (D1-D3) de tipo inmunoglobulina, una hélice transmembrana individual y un dominio citoplasmático con actividad tirosina kinasa (Donald V. et al., 2006) Ver figura 3.

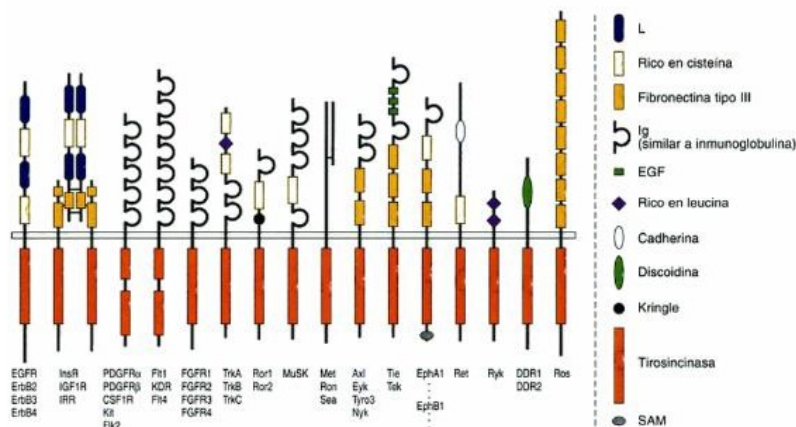


Figura 3. Familia de receptores para FGF. Libro Bioquímica 3ª edición, Donald Voet Judith G. Voet

Cuando los FGFs actúan sobre un FGFR se produce la dimerización del receptor y posterior fosforilación cruzada entre los dominios kinasa (transautofosforilación). Estos receptores regulan gran variedad de procesos biológicos, concretamente en la etapa de desarrollo embrionario, el FGF2 actuando sobre FGFR1 y FGFR3 promueve la división celular simétrica de precursores neurales mientras que la activación del receptor FGFR2 induce un estado multipotencial (Maric et al. 2007). Además, se ha observado que el potencial de diferenciación neuronal o glial de las poblaciones de CPNs es dependiente de la relación de concentración FGF2/EGF en la fase de proliferación. (Kilpatrick et al 1995; Sanalkumar et al 2010).

Los estudios basados en la expresión de FGF2 sugieren que existen diferencias entre especies, teniendo en cuenta la producción de señales que actúan en neuroepitelio. Estudios de hibridación in situ de mRNA para FGF2 realizados por Martin et al. 2006 en embriones de pollo, concluyen que ninguna isoforma del gen se expresa en el tejido neuroepitelial en los estadios embrionarios analizados. Este resultado y otros resultados asociados arrojaron la conclusión que el FGF2 presente en eCSF de embriones de pollo tiene un origen extraneural. Por otro lado, la expresión de FGF2 en el cerebro embrionario de roedores, detectada a través de hibridación in situ de mRNA o marcaje inmunohistoquímico, muestra que existe expresión de FGF2 en la zona ventricular del epitelio pseudoestratificado en estadios tempranos de la neurogénesis (E 14.5 rata, equivalente a E 13.5 ratón) y está ausente al final de la misma (E 17.5 rata). [Dono et al., 1998, Vaccarino et al., 1999; Raballo et al., 2000].

Otro factor implicado en el desarrollo del cerebro embrionario, es el EGF, presente en fluidos corporales entre ellos el CSF. El EGF estimula la proliferación de CPNs, su receptor EGFR se expresa en varias regiones del SNC en desarrollo. Los estudios realizados en modelos de ratón indican que una deficiencia en la expresión de EGFR desencadena una serie de defectos menores epiteliales y enfermedades degenerativas que provocan la muerte del embrión en el primer mes de vida. Por otro lado, el efecto neurotóxico y mitogénico del EGF se ha comprobado en cultivos de neuronas corticales cerebrales de rata (Yamada et al., 1997, Wing et al., 2004).

Actualmente se acepta la importancia del eCSF en el desarrollo del cerebro embrionario. La composición de este fluido es esencialmente proteica, con un patrón de bandas electroforético complejo, como se observa en la figura 4. La composición de este fluido evoluciona a lo largo de la vida del individuo y estudios realizados en pollo demuestran que el eCSF embrionario contiene una concentración de proteínas más elevada, y una composición más compleja que el CSF adulto. (Birge et al 1974, Gato et al 2004).

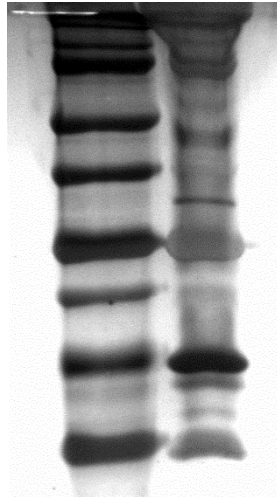


Figura 4. SDS page eCSF de pollo E 25 Hamburger & Hamilton, carril izquierdo: estándares proteicos (precision plus Bio Rad), carril derecho: eCSF de embrión de pollo (E25), imagen obtenida con lector de geles (Uvitec Cambridge)

La relación entre las CPNs y el eCSF se evidenció por varios grupos de investigación que aportaron información sobre la intensa interacción bidireccional entre la pared ventricular y el eCSF (Gato, Desmond 2006). Por primera vez, en los estudios de Marzesco et al 2005, se describen partículas de membrana extracelulares en el eCSF, que son probablemente producidas por el neuroepitelio. Más recientemente, Feliciano et al 2014, encontraron en embriones de ratón y humanos que el eCSF contiene  $10^{12}$  nanopartículas/ml, algunas de ellas identificadas como nanovesículas, denominadas *exosomas*, que son capaces de encapsular moléculas proteicas y mRNA relacionadas con la señalización del IGF, siendo un importante factor mitogénico del eCSF.

Estudios in vitro realizados en embriones de pollo, demuestran la importancia del FGF2 del eCSF como factor trófico durante el desarrollo embrionario, promoviendo la activación de la replicación y neurogénesis de las CPNs.

Estudios recientes (Lamus F. Tesis Doctoral 2016) han demostrado la evidencia del FGF2 en el eCSF de ratón, como producto de secreción exocrina de las CPNs, actuando sobre las mismas como un potente activador mitogénico.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En conclusión, sabemos que en modelos de embriones de pollo y ratón el FGF2 y EGF son factores mitogénicos involucrados en la replicación de las células de la pared neural, pero es desconocida su influencia en la morfogénesis y crecimiento global del esbozo del cerebro embrionario.

Por lo anteriormente citado, en este trabajo pretendemos demostrar la presencia del FGF2 y EGF en el eCSF y bloquear con anticuerpos la acción biológica de este FGF2 y EGF, para comprobar su influencia en la morfogénesis del cerebro embrionario y el desarrollo de las vesículas primarias y secundarias. El objetivo del trabajo es determinar si existe relación entre la acción mitogénica del FGF2 y EGF y la morfogénesis cerebral.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño experimental expuesto a continuación trata de demostrar la hipótesis principal.

*En este proyecto, una vez detectada la presencia de factores mitogénicos (FGF2 y el EGF) presentes en el eCSF de rata, se realiza un inmunobloqueo de su actividad biológica in vivo y, posteriormente, se valora la morfogénesis y crecimiento en volumen del esbozo cerebral.*

---

### TÉCNICAS UTILIZADAS

En nuestro estudio hemos utilizado embriones de rata de la raza Wistar. Los animales utilizados en los experimentos fueron tratados de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación, docencia y otros fines científicos.

#### 2.1. OBTENCIÓN DE MEDIO DE CULTIVO DE EMBRIONES DE RATA

Como medio de cultivo se empleó suero homólogo de rata. Los animales, previamente anestesiados por inhalación con éter etílico, fueron sometidos a una amplia laparotomía exponiendo el peritoneo parietal posterior y rechazando hacia un lado el paquete intestinal, para lograr localizar en el retroperitoneo la arteria aorta abdominal. Una vez localizada la aorta, se puncionó ésta con una aguja conectada a una palometa de venoclisis, con el fin de extraer de cada animal aproximadamente 10 ml de sangre arterial (ver figura 5). Esta sangre se centrifugó varias veces para eliminar los elementos formes del suero, el cual fue entonces calentado a 56°C en un baño termostático, con el fin de eliminar las fracciones termolábiles del complemento. Finalmente, se conservó en cámara frigorífica a -40° hasta su uso.





Figura 5. En la imagen de cirugía de rata se observa la zona de punción de la arteria aorta, a su lado la vena cava en color rosado y arriba las asas intestinales previa inserción de la palometa para extraer la sangre arterial.

## 2.2. OBTENCIÓN DE EMBRIONES DE RATA

Las ratas utilizadas en el experimento se mantuvieron en un animalario con condiciones controladas de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad, además de una temperatura de 20-24 °C y humedad relativa del 55%, con el fin de facilitar los biorritmos de los animales y el apareamiento de los mismos.

El sistema empleado para realizar los cruces consiste en dejar al macho en su jaula y se introducen tres hembras por macho en cada jaula, realizando este proceso en fase de oscuridad ya que estos animales son de actividad nocturna y su celo se produce generalmente hacia la medianoche. Al día siguiente temprano, se examinan las hembras identificando como cruce positivo aquellas en las que aparezca un tapón vaginal a simple vista, que persiste 8 horas aproximadamente debido a que el esperma del macho coagula dentro la vagina de la hembra formando ese tapón. Las hembras que dieron positivo a esta exploración se separaron del resto, considerando hora de inicio de desarrollo embrionario las 0 horas de la noche anterior, a partir de entonces el estadio gestacional se expresó en días *post coitum*.

Una vez se alcanza la edad gestacional de 10.5 días se procedió a la extracción de los embriones. En primer lugar la madre fue anestesiada por inhalación con éter etílico y antes de seguir se comprobó la profundidad de la anestesia observando la falta de reflejos, inconsciencia y relajación muscular.

Para el proceso de disección se posicionó la rata boca arriba sobre una plancha de corcho, separando las cuatro patas con gomas dejando libre la parte ventral del animal. Se efectuó entonces una laparotomía ventral media, localizando el útero bicorne y comprobando visualmente el emplazamiento de los embriones por la característica imagen en collar de cuentas, cada abultamiento corresponde a un embrión. Se separó el útero de la vagina y el peritoneo, depositándolo en una placa Petri con solución Ringer (figura 6A). La madre se sacrificó por dislocación cervical.

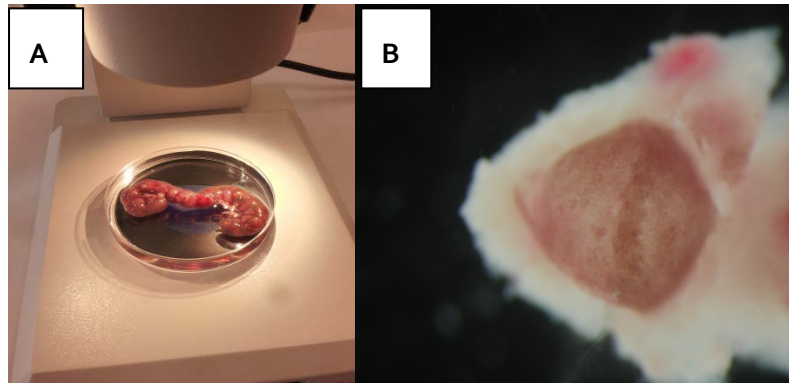


Figura 6.Extracción de embriones de rata: En la imagen (6A) observamos bajo lupa el útero bicorne extraído por disección. En la imagen (6B) vemos una ampliación del embrión de 10,5 días separado de la mucosa exponiendo el cono ectoplacentario en color rojizo.

Una vez hemos extraído el útero bicorne, en campana de flujo laminar y con material estérilautoclavado se procedió a cortar cada engrosamiento uterino, rasgando con ayuda de pinzas las capas serosa y muscular del útero mediante disección roma seccionando longitudinalmente la mucosa a lo largo de la porción ancha de la misma se observa el embrión adherido a una de esas mitades, con pinzas de relojero se procedió a separar el embrión de la mucosa en la etapa más delicada del proceso ya que se debe dejar el cono ectoplacentario y sus envolturas intactas (saco vitelino, saco amniótico) ya que son vitales para la nutrición y viabilidad del embrión. Únicamente es necesario rasgar la membrana de Reigther para el correcto desarrollo del embrión (ver figura 6B).

### 2.3. TÉCNICA DE MICROINYECCIÓN Y MICROASPIRACIÓN

#### PREPARACIÓN DE LOS CAPILARES DE MICROINYECCIÓN

Para las técnicas de microaspiración y microinyección se emplean unos capilares comerciales de vidrio de borosilicato, que deben sometidos a un microestirado y biselado, hasta obtener un diámetro entre 50-60 $\mu$ m para microinyectar. Para ello, los capilares se introducen en un aparato que tiene una resistencia eléctrica capaz de calentar el vidrio y unas pesas que traccionan del mismo y los estiran. Se realiza primero un preestirado y luego estirado definitivo (Figura 7A).

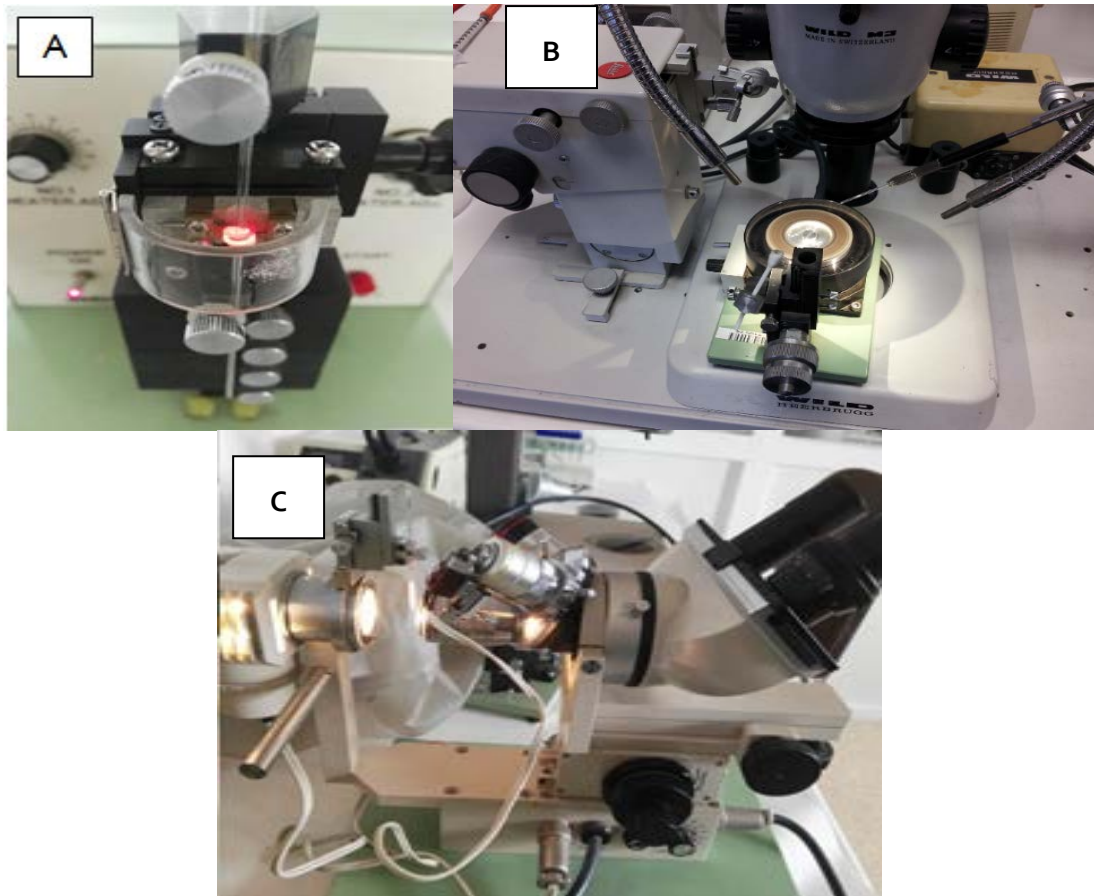


Figura 7. Imagen (7A) resistencia eléctrica del equipo para el preestirado del capilar. Imagen (7B) biselado del capilar. Imagen (7C) estereomicroscopio para medición del grosor del capilar.

Para obtener el diámetro adecuado se bisela la punta de la micropipeta en un esmeril giratorio, con ayuda de agua destilada para evitar la fricción directa y el paso de cristales dentro de las micropipetas; para guiar esta operación se realizó bajo estereomicroscopio, con un ángulo de 45° aproximadamente (Figura 7B).

Posteriormente debemos comprobar el diámetro exacto que hemos obtenido, mediante un microscopio cuyo objetivo en horizontal tiene una rejilla calibrada que nos permite medir el diámetro interno de la punta. (Figura 7C).

---

#### TÉCNICA DE MICROINYECCIÓN Y MICROASPIRACIÓN

La técnica de microinyección permite inyectar diferentes sustancias en áreas muy específicas del embrión, tanto en embriones de pollo in ovo, como in vitro en embriones de rata.

La microaspiración, una técnica que permite obtener fluidos de áreas muy específicas del embrión, se realizó con el fin de obtener eCSF tal y como se describe a continuación.

---

## EXTRACCIÓN DE FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO (eCSF)

Para la extracción de eCSF se usaron un total de 6 embriones de rata en estadio 13.5 días a los cuales fue necesario, mediante microdissección, liberar completamente de sus envolturas para evitar la contaminación de la muestra u obstrucción del capilar de extracción. Para esto, se colocaron en una placa de petri con solución de Ringer en disposición de agujas de reloj, ver figura 8.

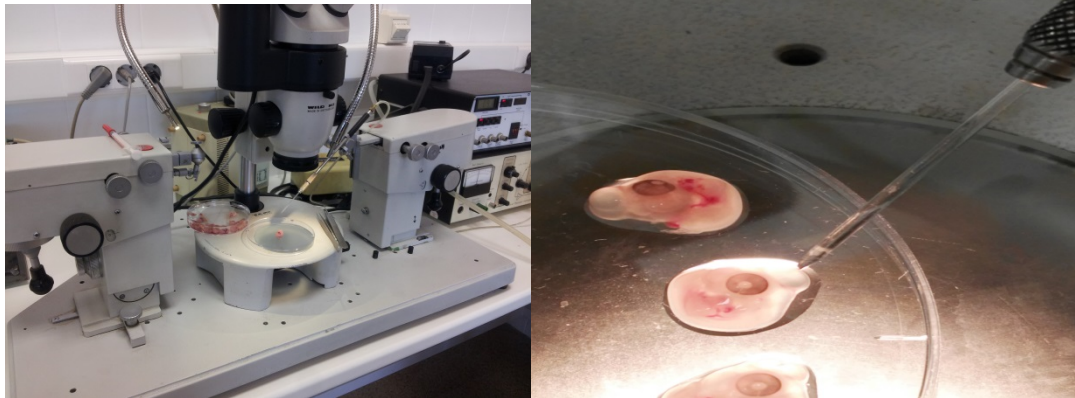


Figura 8. Técnica de microinyección y microaspiración de embriones de pollo E 13.5. Imagen Izquierda equipo micromanipulador. Imagen derecha microaspiración de eCSF del mesencéfalo de embrión.

Con ayuda del equipo de microaspiración se extrajo el eCSF del mesencéfalo depositándolo en tubos eppendorf. El eCSF es alicuotado, liofilizado y congelado a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

---

## ENSAYO DE REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS ANTI FGF2 Y EGF CON DOTBLOT

Para examinar en el modelo de eCSF de embrión de rata la reactividad del anticuerpo anti-FGF2 y anti-EGF se procedió de la siguiente manera:

- ❖ Ac. 1°antiFGF2 : Anti Fibroblast growth factor-basic (Sigma F 3393) dilución 1:2500 en TTBS  
Ac.secundario: Alexa Fluor ® 488 rabbit anti-mouse IgG (H+L) dilución 1:2500 en TTBS
- ❖ Ac 1°antiEGF : Anti Epidermal Growth Factor from murine submaxillary gland (Sigma E 4127) dilución 1:2500 en TTBS\*  
Ac.secundario: Alexa Fluor ® 488 rabbit anti-rat IgG (H+L) dilución 1:2500 en TTBS

DotBlot, es una técnica rápida y simple que permite determinar si los anticuerpos problema son reactivos para nuestra muestra a analizar.

El procedimiento a seguir es el siguiente: se recorta una tira de membrana de nitrocelulosa, con ayuda de una micropipeta se deja caer 1 gota de  $10\mu\text{l}$  de muestra, en nuestro caso eCSF de rata, y otra gota de  $10\mu\text{l}$  de eCSF, que se incubará solo con el anticuerpo secundario, como control negativo, como se indica en el esquema:

\*Nota: TTBS (50mM Tris, 0.5 NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4)



La membrana se incuba durante 1 hora a RT, es importante que esté totalmente seca antes de continuar, se sigue con un bloqueo de sitios inespecíficos con 5% leche en polvo en TTBS durante 1 hora a RT. Pasado este tiempo se procede a incubar con la dilución 1:2500 de Ac primario en TTBS 1 hora a RT. Trascurrido este tiempo procedemos a lavar la membrana 2 x 5' agua destilada 1 x 5' TTBS. Una vez hecho esto incubaremos con el Ac secundario dilución 1:2500 en TTBS 1 hora a RT. Seguidamente una etapa de lavado adicional y revelado de la membrana con diaminobenzidina (1 pastilla disuelta en 20 ml TBS + 20µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma).

Protocolo extraído de: (<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/dot-blot-protocol>)

---

## MICROINYECCIÓN DE ANTICUERPOS

La técnica de microinyección como hemos visto nos permite introducir fluidos en cavidades específicas del embrión. Una vez comprobada la reactividad de los anticuerpos frente a FGF2 y EGF, se eligieron 4 embriones de rata de 10.5 días, por condición experimental. La micropipeta debe atravesar las envolturas llegando a la cavidad del mesencéfalo y salir una vez realizada la microinyección sin afectar al embrión, ya que necesitamos que conserven su integridad en el cultivo posterior. La microinyección de los anticuerpos provoca un inmunobloqueo de la actividad biológica de los mismos.

Los experimentos de microinyección de anticuerpos con el equipo (Medical System PLI 100) en mesencéfalo se realizaron con las siguientes condiciones experimentales:

- **Embriones Control (C):** microinyección 5 µl de solución salina
- **Embriones con Ac. anti FGF2 (F):** microinyección 5 µl de anticuerpo anti Fibroblast growth factor-basic (Sigma F3393), diluido 1/100, para evaluar el efecto de bloqueo de la actividad biológica de FGF2.
- **Embriones con Ac. anti EGF (E):** microinyección 5 µl de anticuerpo anti Epidermal Growth Factor from murine submaxillary gland (Sigma E4127), diluido 1/100, para evaluar el efecto de bloqueo de la actividad biológica de EGF.
- **Embriones con Ac. anti EGF + anti FGF2 (EF):** microinyección anticuerpos 2,5 µl anti EGF (Sigma E4127) + 2,5 µl anti FGF2 (Sigma F3393), diluido cada uno 1/100, para evaluar el efecto de bloqueo de la actividad biológica de ambos anticuerpos.



## 2.4. TÉCNICA DE CULTIVO DE EMBRIONES DE RATA

Para mantener un cultivo de embriones de rata durante 24 horas se hizo uso de la técnica de New (1950), basada en un cultivo in vitro de embriones de rata en frasco de vidrio con fase gaseosa, que permite un crecimiento adecuado del embrión durante un periodo de 24-48 horas.

La técnica de cultivo de embriones de rata in vitro permite cultivar embriones de mamíferos in vitro durante periodos limitados de tiempo en etapas tempranas de gestación, en el caso, de ratas entre E 8.5 días – E 14.5 días. (Takahashi M., Osumi N. 2010).

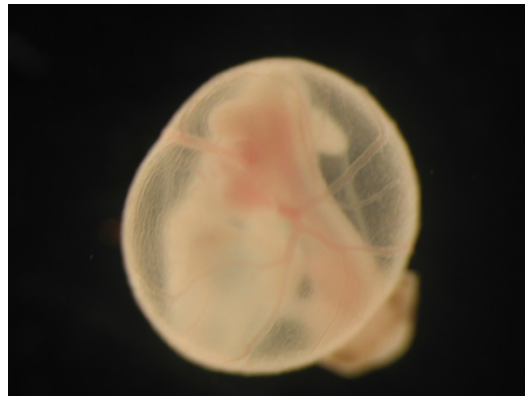


Figura 9. Cultivo de embrión en botella, se muestra al embrión con sus envolturas intactas al término del cultivo.

El proceso de cultivo comienza introduciendo los embriones previamente microinyectados (ver apartado anterior) en el frasco de cultivo, con 4 ml de suero homólogo y 50µl de Streptomina para evitar el crecimiento bacteriano, la fase gaseosa necesaria se mantuvo haciendo circular a través de un tubo acoplado a una palometa concentraciones de O<sub>2</sub> dependientes del grado de desarrollo del embrión ver tabla 1. Los frascos de cultivo sellados se depositaron en una incubadora a 37°C con movimiento rotario constante 20 rpm/min favoreciendo la difusión de gases y nutrientes y evitando la adhesión de los embriones a las paredes del frasco (ver figura 9).

Embrión días rata	10.5	0 h	12h	24 h	48 h
		95% 50 cc	95% 75 cc	95% 100 cc	96% 125 cc

Tabla 1. Concentraciones de O<sub>2</sub> óptimas para el desarrollo del embrión en la técnica WEC

Se realizó un cultivo de 24 horas hasta alcanzar los 11.5 días de desarrollo.

## 2.5. FOTOGRAFIADO Y VALORACIÓN MORFOLÓGICA

Trascurrido el tiempo de incubación deseado procedimos a liberar los embriones de sus membranas extraembrionarias y saco amniótico bajo lupa con ayuda de pinzas de relojero, continuando con el fotografiado de los mismos (figura 10) y posterior valoración morfológica clasificándolos según su desarrollo mediante una serie de parámetros morfológicos descritos por Brown y Fabro 1985.



Figura 10. Fotografía bajo lupa de embrión de rata 11.5 días, 24 horas después del inicio del cultivo.

Las valoraciones morfométricas se llevaron a cabo sobre imágenes fotografiadas bajo lupa, haciendo uso de una escala milimetrada de 1 mm, con el software Leica Applications Suite V3.3.0. Se identificaron las áreas de las vesículas embrionarias correspondientes al prosencéfalo, mesencéfalo y telencéfalo y se procedió a medir el área de cada una de ellas.

## 2.6. FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO EN BLOQUES DE PARAFINA.

Los embriones una vez fotografiados fueron fijados para evitar su degradación, por inmersión en solución Carnoy (70% etanol absoluto, 30% cloroformo, 10% ácido acético glacial) a temperatura ambiente y agitación suave en un balancín, durante 30 minutos.

Una vez fijados se retiró el Carnoy procediendo a deshidratarlos con concentraciones crecientes de etanol (96% durante 30 minutos + 2 x 30 minutos 100%) de nuevo en una placa de vidrio con agitación suave. Seguido de dos inmersiones en xileno de 10 minutos cada una.

Posteriormente, se realizó la impregnación con parafina líquida (Paraplast®, Sigma Aldrich) en estufa a una temperatura comprendida entre 56-58°C, permitiendo la infiltración en el tejido durante 3 horas.

Cada embrión se incluyó en un molde de parafina, la orientación adecuada de la muestra se realizó bajo estereoscopio. Este proceso facilita la obtención posterior de cortes con micrótopo en el plano deseado. Finalmente, se deja solidificar el bloque con parafina a temperatura ambiente.

## 2.7. ELABORACIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS

Utilizando un micrótopo (Leitz W 1512) obtuvimos secciones de 8µm de espesor cortando en el plano transversal (ver figura 11). Los cortes seriados fueron recogidos sobre portaobjetos de vidrio pretratados con una solución de 3-aminopropylTriethoxySilane (Sigma Aldrich) en acetona pura, mejorando la adherencia de los cortes en los portaobjetos.

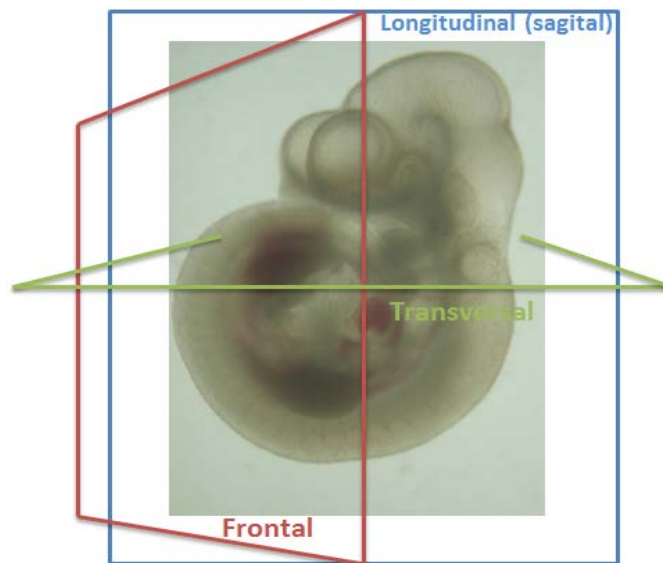


Figura 11. Secciones del embrión para cortes histológicos.

Las secciones de tejido una vez elegidas y rotuladas en los portaobjetos fueron seleccionadas para la realización del estudio inmunohistoquímico.

## 2.8. INMUNOMARCAJE DE FGF2 Y EGF

Las secciones histológicas requieren ser desparafinadas y rehidratadas antes de proceder con los protocolos de inmunomarcaje para lo cual se sumergieron en xileno y una batería de soluciones de etanol de concentraciones decrecientes y finalmente en agua corriente como se detalla a continuación:

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

El inmunomarcaje anti-FGF2 y anti EGF requiere de un previo desenmascaramiento antigénico mediado por calor.

Se siguió el protocolo de desenmascaramiento por calor con búfer Tris/EDTA a pH 9 (ver protocolo en [http://www.nordiqc/techniques/Epitope\\_retrieval.htm](http://www.nordiqc/techniques/Epitope_retrieval.htm)) realizando previamente una serie de pruebas con diferentes parámetros de tiempo y temperatura, teniendo en cuenta que la eficiencia del protocolo es dependiente de estos factores y otros, como pH y composición



química del búfer.

Una vez realizado este proceso, seguimos con el protocolo de inmunohistoquímica.

Las muestras a temperatura ambiente fueron sometidas a dos lavados de 5 minutos en TBS 0,025% tritón y posterior bloqueo en 10% suero normal inactivado (Sigma) con 1% BSA en TBS, durante una hora.

Se aplicó entonces el anticuerpo primario mouse anti-Fibroblast growth factor-basic (Sigma) diluido en TBS (1:100) para FGF2 y Anti Epidermal Growth Factor from murine submaxillary gland (Sigma E 4127) diluido en TBS (1:100) para EGF, con 1% BSA, incubándolos en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron tres veces los portas durante 5 minutos con TBS 0.025% tritón X-100 con agitación suave. Se procedió a incubar el anticuerpo secundario Alexa Fluor®488 rabbit anti-mouse IgG (H+L) diluido en TBS (1:1000) para FGF2 y Alexa Fluor® 488 rabbit anti-rat IgG (H+L) diluido en TTBS(1:1000) para EGF, a temperatura ambiente, cámara húmeda y oscuridad durante 1 hora. Finalmente, se hizo el montaje de las muestras con medio acuoso Fluoromount™ (Sigma).

## 2.9. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL.

Las imágenes de expresión inmunohistoquímica de FGF2 y EGF en el neuroepitelio fueron obtenidas mediante microscopía confocal.

El equipo Leica TCS SPE consta de un microscopio y un software informático para almacenamiento y procesamiento de imágenes, ver figura 12



Figura 12. Equipo microscopía confocal Facultad de Medicina Universidad de Valladolid.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. DOTBLOT

La inmunodetección de EGF y FGF2 en el eCSF se realizó con la técnica de Dot-blot. Como se ve en la figura 13, el marcaje resultó positivo para ambos factores, siendo más intenso para EGF que para FGF2. Los controles negativos se realizaron en ambos casos con el correspondiente Ac.Secundario, siendo ambos negativos.

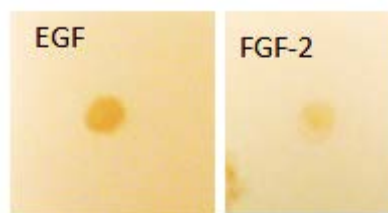


Figura 13. Ensayos DotBlot Ac para EGF y FGF2.

#### 3.2. RESULTADOS INMUNOMARCAJE FGF<sub>2</sub> EN NEUROEPITELIO

Con objeto de comprobar el origen del FGF<sub>2</sub>, que en embriones de pollo es extraneural (Martin et al 2006), hemos realizado un inmunomarcaje en cortes histológicos de embriones de rata de 11,5 días de desarrollo. Como puede verse en la figura 14, existe un intenso marcaje en el polo apical de las células neuroepiteliales, especialmente evidente en las vesículas telencefálicas, lo cual sugiere que en los embriones de rata es el propio neuroepitelio el encargado de sintetizar y segregar este factor.

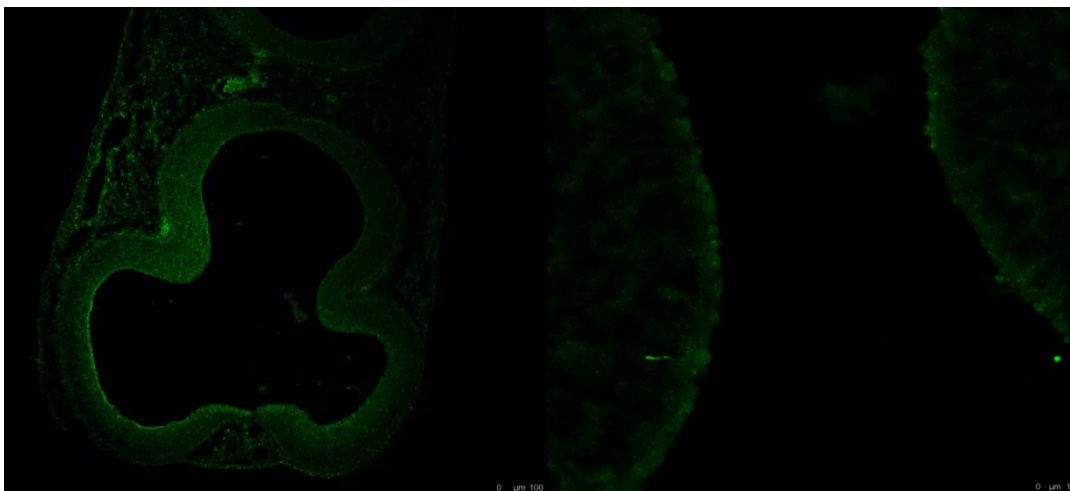


Figura 14. Imágenes obtenidas con microscopia confocal. Izquierda: Muestra la zona prosencefálica del embrión de rata de 11.5 días. Derecha: Ampliación de la zona media del prosencefalo mostrando el marcaje apical.

### 3.3. OBSERVACIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES

Una vez realizada la extracción de los embriones, la microinyección de anticuerpos en la cavidad del cerebro embrionario y el cultivo in vitro posterior, hasta alcanzar los 11.5 días de desarrollo, se procede a la valoración morfológica de desarrollo embrionario.

En primer lugar, procedimos a determinar el grado de desarrollo de los embriones control mediante los parámetros establecidos por Brown y Fabro (1985). Comprobamos que los embriones control alcanzaron un grado de desarrollo coincidente con los 11.5 días con un desarrollo morfológico normal (Figura 15C) incluyendo el desarrollo de los somites (s), del asa cardíaca (AC), arcos branquiales (Ab), vesícula ótica (Vo), vesícula óptica (Vot) y de las tres vesículas primarias del cerebro embrionario: Rombencéfalo (R), Mesencéfalo (M) y Prosencéfalo, con el diencéfalo (D) y las vesículas telencefálicas (VT).

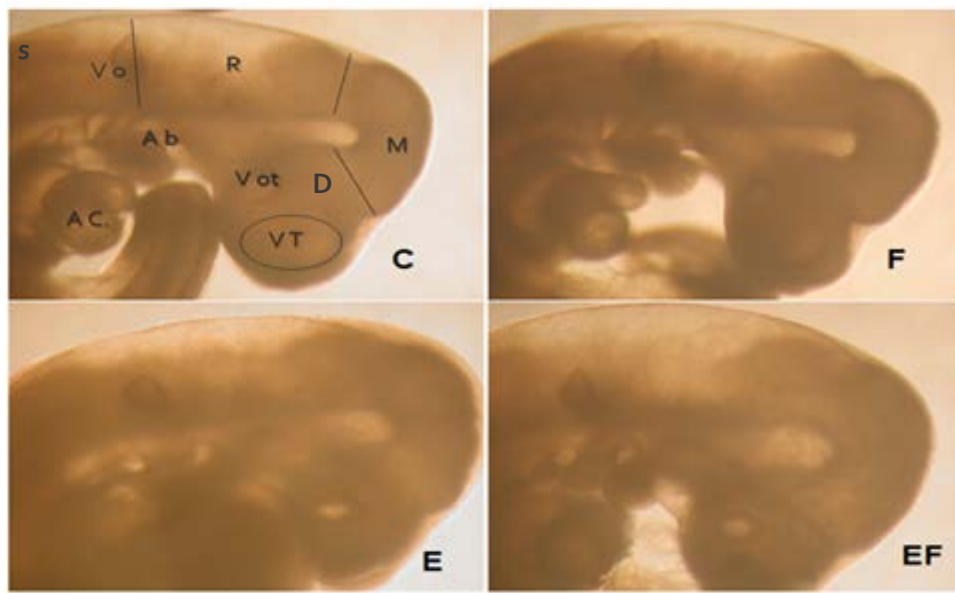


Figura 15. Imágenes bajo lupa de los embriones: Control (C), y tratados con Ac antiFGF2 (F), Ac antiEGF (E), Ac antiEGF + Ac antiFGF2 (EF)

En la figura 15C se aprecia también las distintas proporciones volumétricas de las vesículas cerebrales, así como el grado de plegamiento ventral a nivel mesencefálico. La imagen de la figura 15C nos sirve para la comparación con las otras condiciones experimentales, teniendo en cuenta que todas las imágenes se realizaron con la misma magnificación.

---

#### INMUNOBLOQUEO DE FGF<sub>2</sub> EN ECSF

Una vez realizado el inmunobloqueo de la actividad biológica del FGF<sub>2</sub> en el fluido cerebro espinal contenido en la cavidad cerebral embrionario (Figura 15F) y dejando evolucionar el desarrollo embrionario hasta los 11.5 días se pueden observar diversas alteraciones del desarrollo. En primer lugar, el desarrollo global del embrión es aparentemente normal, ya que una vez evaluados los

parámetros de Brown y Fabro (1985), el grado de desarrollo corresponde a los 11.5 días de los embriones in útero ver figura 15.

Tanto la apariencia de los embriones, como su la valoración mediante morfometría, demuestran que el inmunobloqueo de la actividad del FGF2 en el eCSF (Fig. 15F) induce un incremento en el volumen del cerebro posterior (Rombencéfalo) del 17%, en cambio, el cerebro medio (Mesencéfalo) presenta una disminución de volumen del 20%, al igual que en las vesículas telencefálicas cuya disminución es del 20% siendo estas últimas vesículas las que paradójicamente presentan mayor crecimiento en embriones de rata durante esta fase del desarrollo. Finalmente, se aprecia una disminución del tamaño de la vesícula óptica que en estos estadios es una evaginación lateral del diencéfalo.

En resumen, el bloqueo de la acción biológica del FGF2 del eCSF provoca alteraciones evidentes en el desarrollo del esbozo cerebral, con dilatación y aparente adelgazamiento del cerebro posterior y cerebro medio, además, una evidente disminución de volumen en las vesículas telencefálicas. La morfología general y los límites entre las vesículas cerebrales no se ven considerablemente alterados.

---

#### INMUNOBLOQUEO DE EGF EN EL ECSF

El inmunobloqueo in vivo de EGF en el eCSF (Figura 15E) provocó alteraciones aparentemente más severas en el desarrollo del esbozo cerebral, en comparación con el bloqueo de FGF2 (Figura 15F) y los controles (Figura 15C).

En primer lugar, el grado de desarrollo general del embrión es algo menor que en los controles y en los tratados con anticuerpo antiFGF2, los arcos branquiales y el esbozo cardiaco aparecen más pequeños y menos definidos, sin embargo, el volumen global del embrión se mantiene en valores normales. En lo referente al desarrollo del esbozo cerebral del mesencéfalo, está reducido con respecto a los controles (se reduce un 10%), de forma similar a lo descrito en los embriones tratados con anticuerpo antiFGF2. Además, el rombencéfalo presenta un mayor volumen en comparación con los controles (aumenta en un 21,7% semejante valor que en los tratados con anticuerpo antiFGF2; sin embargo la disminución de tamaño en las vesículas telencefálicas (disminuye en un 25%) es evidente en las propias vesículas, afectando también al diencéfalo, cabe destacar también la disminución del tamaño de la vesícula óptica, cuya comunicación con el diencéfalo se observa notablemente dilatada.

---

#### INMUNOBLOQUEO DE FGF<sub>2</sub> Y EGF EN EL ECSF

El bloqueo combinado de la acción biológica del FGF2 y del EGF también afecta al grado de desarrollo del cerebro embrionario, como se muestra en la figura 15 EF. En este caso, el desarrollo es similar al de los embriones tratados con anticuerpo EGF; los arcos branquiales y el asa cardiaca aparecen menos desarrollados. En estos embriones, tanto el cerebro posterior está notablemente más dilatados (como se aprecia por la transparencia del tejido al ser tras iluminado) que en todas las otras condiciones experimentales anteriores (aumento de volumen de 30,5%), respectivamente). Sin embargo, el desarrollo del cerebro medio presenta una disminución del 15%, el mayor cambio está en el cerebro anterior (tanto del diencéfalo como de las vesículas telencefálicas) así como el de la vesícula óptica presenta un grado de disminución de crecimiento notable (un 33%), similar al descrito con anticuerpo antiFGF2.

## VALORACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EMBRIONES

Haciendo uso del software Leica Application Suite (LAS) ® trazamos y cuantificamos las áreas del mesencéfalo, rombencéfalo y vesículas telencefálicas de cada imagen obtenida con anterioridad bajo lupa, para su calibrado hemos utilizado como escala un portaobjetos milimetrado de 1mm. Ver figura 16.

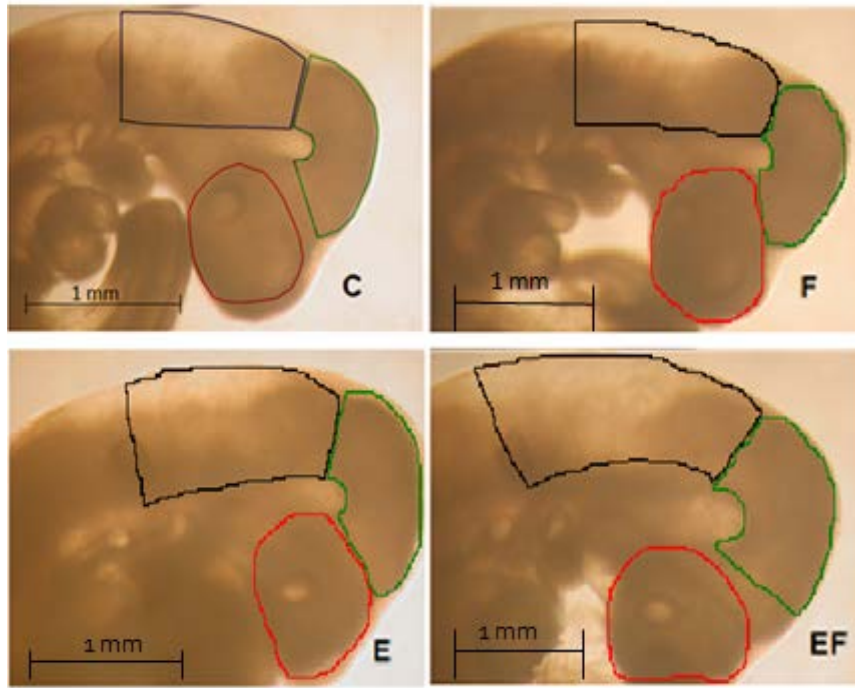


Figura 16. Embrión Control (C), Ac FGF2 (F), Ac EGF (E), Ac FGF2 + Ac EGF (EF) se muestran marcadas las áreas de vesícula telencefálica en color rojo, mesencéfalo color verde y rombencéfalo color azul, utilizando escala de 1mm para todos los casos.

El programa nos calcula las áreas obtenidas de cada zona de interés, así podemos comprobar las variaciones en proporción respecto al control:

	<b>Control (C) área mm<sup>2</sup></b>	<b>Ac FGF2(F) % área</b>	<b>Ac EGF (E)% área</b>	<b>Ac EGF + Ac FGF2 (EF) % área</b>
<b>Mesencéfalo</b>	0,48	-20,00%	-10,00%	-15,00%
<b>Rombencéfalo</b>	0,37	+17,00%	+21,70%	+30,50%
<b>Telencéfalo</b>	0,50	-20,00%	-25,00%	-33,00%

Tabla 2. Áreas y Porcentajes de áreas de tratamiento con Ac referenciado al control (C), obtenidas del programa Leica Applications Suite V3.3.0.

#### 4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El estudio realizado para este Trabajo Fin de Máster se enmarca dentro de una línea de investigación que trata de dilucidar el papel de los factores mitogénicos del eCSF en el desarrollo cerebral.

En este estudio se han puesto a punto una serie de técnicas de microinyección, como de cultivo embrionario, que nos permiten abordar el estudio del papel de los factores mitogénicos del eCSF en la morfogénesis y crecimiento temprano del cerebro en embriones de rata. Los resultados son provisionales y se basan en una muestra de cuatro embriones por condición experimental por lo que se hace necesario ampliar dicha muestra en un futuro.

En un trabajo previo, se demostró que el Ac anti FGF2 inyectado en la cavidad del tubo neural no atraviesa el neuroepitelio, permaneciendo confinado en la cavidad, esto nos permite afirmar que los efectos obtenidos son atribuibles al inmunobloqueo de los factores de crecimiento presentes en el eCSF.

El inmunobloqueo de la actividad biológica de ambos factores mitogénicos del eCSF, el FGF2 y el EGF, afecta notablemente al grado de crecimiento de las vesículas cerebrales y en especial al crecimiento de las vesículas telencefálicas que son las que mayor grado de desarrollo volumétrico alcanzan los mamíferos, lo cual sugiere que la acción de estos factores mitogénicos es especialmente intensa en el cerebro anterior. El bloqueo individual de ambos factores, afecta al crecimiento de las vesículas telencefálicas, sin embargo esta afectación es mayor en el caso del Ac antiEGF lo que sugiere que este factor podría ser más activo a este nivel. Paradójicamente, el rombencéfalo aparentemente incrementa su tamaño con el bloqueo con Ac antiFGF2 y Ac antiEGF con respecto a los controles. Sin embargo, la mayor transparencia de la pared del tubo neural sugiere un proceso de estiramiento de la pared neuroepitelial por la presión intracavitaria. El crecimiento de la vesículas cerebrales en estos estadios del desarrollo depende de un modelo que implica el grosor de la pared neuroepitelial y la presión positiva ejercida por el eCSF, cuando dicha pared pierde grosor cambia la presión dentro de la vesícula produciéndose un hinchamiento de la misma.

Sin embargo, en el caso del cerebro anterior y mesencéfalo, cuyas paredes son más anchas resistiendo la presión que pueda variar dentro, el resultado del bloqueo es un menor crecimiento de la cavidad telencefálica y así mismo de la vesícula óptica, ya que depende de ésta para su desarrollo.

No obstante, es necesario confirmar la disminución de la replicación en las células neuroepiteliales inducida por el inmunobloqueo por lo que en un futuro próximo se repetiría el experimento, pero incorporando BrdU al medio de cultivo, con objeto de estudiar la replicación celular en cortes histológicos. Por otra parte, la valoración del tamaño de las vesículas cerebrales se ha realizado mediante morfometría sobre imágenes fotográficas, lo que permite valorar el área de la vesícula cerebral, en un futuro próximo se realizaría morfometría sobre cortes histológicos seriados para obtener datos de volumen de las vesículas cerebrales.

## 6. CONCLUSIONES

- 1) El diseño experimental planteado es válido para demostrar la hipótesis principal.
- 2) El e-CSF de rata tiene entre sus componentes FGF2 y EGF que es aparentemente segregado por las propias células neuroepiteliales.
- 3) El inmunobloqueo de los factores mitogénicos del e-CSF afecta al crecimiento de las vesículas cerebrales provocando una hiperexpansión en rombencéfalo y un déficit de crecimiento en mesencéfalo y vesículas telencefálicas.
- 4) El efecto de bloqueo del EGF provoca una deficiencia resistente en el crecimiento de las vesículas cerebrales.
- 5) El inmunobloqueo de los factores mitogénicos del eCSF no afecta a la morfología ni al patrón de vesiculación del cerebro embrionario sugiriendo que se debe a mecanismos diferentes de replicación celular.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

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;41(2):245-54.

Brown N.A., Fabros. Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. *Teratology.* 1981. 24(1):65-78

Dickinson ME, Krumlauf R, McMahon AP. Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development.* 1994;120(6):1453-71.

Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF2 deficient mice. *Embo J.* 1998;17(15):4213-25.

Feliciano DM, Zhang S, Nashrallah 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.

Fernandez C, Tatard VM, Bertrand N, Dahmane N. Differential modulation of Sonic-hedgehog-induced cerebellar granule cell precursor proliferation by the IGF signalling network. *Dev Neurosci.* 2010;32(1):59-70.

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;301(4):280-9.

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.

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; 30(9):3489-98.



Kelly CM, Tyers P, Borg MT, Svendsen CN, Dunnet SB, Rosser AE. EGF and FGF2 responsiveness of rat and mouse neural precursors derived from the embryonic CNS. *Brain Res Bull.* 2005;68(1-2):83-94.

Kilpatrick TJ, Bartlett PF. Cloned multipotential precursor from the mouse cerebrum require FGF2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF2 or EGF. *J Neurosci.* 1995;15(5 Pt 1):3653-61.

Lamus J.F., El FGF2 como regulador de la actividad mitogénica de precursores neurales en el nicho celular del cerebro embrionario de ratón. Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid, 2016.

Lethinen 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;69(5):893-905.

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; 118 (Pt 13):2849-58.

Maric D, FiorioPla 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;27(8):1836-52.

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;297(2):402-16.

Naruse M, Shibasaki K, Ishizaki Y. FGF2 signal promotes proliferation of cerebellar progenitors cells and their oligodendrocytic differentiation at early postnatal stage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;463(4):1091-6.

New, D.A. & Cockroft, D.L. A rotating bottle culture method with continuous replacement of the gas phase. 1979; *Experientia* 35, 138-140

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;20(13):5012-23.

Sanalkumar R, Vidyanand S, LaithaIndulekha C, James J. Neuronal vs glial fate of embryonic stem cell-derived neural progenitors (Es-NPs) is determined by FGF2/EGF during proliferation. *J molNeurosci.* 2010;42(1):17-27

Takahashi M., Osumi N. The Method of Rodent Whole Embryo Culture using the Rotator-type Bottle Culture System. 2010. *JoVE.* 42.

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;2(9):848.

Wing RW, Guillaud L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2004;15(2-3):147-156.

Yamada M., Ikeuchi T., Hatanaka H. The neurotropic action and signaling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol.* 1997;51:19-37.

Libros relacionados:

Donald Voet ,Judith G. Voet, *Bioquímica* 3ª edición, 2006, Buenos Aires: Médica Panamericana.

Bruce M. Carsol, *Human embryology and developmental biology* 5ª edición, 2014, University of Michigan ELSEVIER SAUNDERS.