

# TESIS DOCTORAL

Influencia del E-CSF en la aportación de  
precursores neurales de la zona  
subependimaria al giro dentado del  
hipocampo en el ratón adulto

Presentada por **Miguel Ángel Madrigal Fernández**

para optar al título de

Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

**Dr. Ángel Gato Casado**

**Dra. M<sup>a</sup> Isabel Alonso Revuelta**

**Dr. Pedro Martín Villamor**







---

**Universidad de Valladolid**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN  
EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**TESIS DOCTORAL:**

**TÍTULO**

---

INFLUENCIA DEL E-CSF EN LA APORTACIÓN DE  
PRECURSORES NEURALES DE LA ZONA  
SUBPENDIMARIA AL GIRO DENTADO DEL  
HIPOCAMPO EN EL RATÓN ADULTO

Presentada por **Miguel Madrigal Fernández**  
para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Ángel Gato Casado

Dra. M<sup>a</sup> Isabel Alonso Revuelta

Dr. Pedro Martín Villamor



## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
CÉLULAS MADRE. EL INICIO DE LA TERAPIA REGENERATIVA .....	1
LA BIOLOGÍA CELULAR COMO ORIGEN DE LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS .....	2
APLICACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN LA REGENERACIÓN DE ALGUNOS TIPOS CELULARES ESPECÍFICOS.....	3
Sangre .....	3
Miocardio.....	4
Sistema nervioso .....	5
DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	6
EL SISTEMA NERVIOSO ADULTO PUEDE GENERAR NUEVAS NEURONAS.....	6
NEUROGÉNESIS: GENERACIÓN DE NUEVAS NEURONAS .....	7
NEUROGÉNESIS EN LA ZONA SUBVENTRICULAR .....	9
NEUROGÉNESIS EN LA ZONA SUBGRANULAR DEL GIRO DENTADO EN HIPOCAMPO ....	10
NICHO NEUROGÉNICO: CONCEPTO CLAVE EN LA NEUROGÉNESIS DEL CEREBRO ADULTO.....	12
EL NICHO DEL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO PRESENTA CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES. ....	14
HIPÓTESIS .....	19
MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
Animales de laboratorio, estabulación, anestesia y apareamiento.....	21
EXTRACCIÓN DE EMBRIONES de ratón .....	22
Obtención de CSF de embriones de ratón .....	23
Obtención del tejido cerebral.....	24
Cultivo in vitro de secciones de cerebro de ratón .....	26
PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO de las secciones de cerebro tras cultivo .....	28
Inmunohistoquímica.....	29
PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTI BRDU Y ANTI SOX-2 .....	30
PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTI BRDU Y ANTI DCX .....	30

PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTI BRDU Y ANTI BIII TUBULINA .....	31
PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTI BRDU Y ANTI CALRETININA .....	31
Análisis de los resultados .....	31
MATERIAL NECESARIO PARA EL CULTIVO IN VITRO DE SECCIONES DE CEREBRO DE RATÓN: .....	33
FIJADOR DE CARNOY .....	34
PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA: MATERIAL NECESARIO .....	34
RESULTADOS .....	37
A. Descripción de las regiones anatómicas objeto del estudio.....	37
B. Estudio del comportamiento de los precursores neurales de la zona ZSE .....	38
C. Detalle de las condiciones experimentales llevadas a cabo .....	39
D. Estudio de la población de precursores neurales indiferenciados y en fase de replicación en el complejo ZSE-BMD-Hilus .....	40
D.1. Comportamiento de los precursores neurales indiferenciados y en estado de replicación.....	40
D.2. Influencia del E-CSF sobre la población de precursores indiferenciados .....	41
E. Estudio de la población de precursores neurales en fase migratoria .....	43
E.1. Valoración de la actividad migratoria de los precursores neurales.....	43
E.2. Comportamiento de los precursores neurales en fase migratoria bajo el efecto de E-CSF .....	44
F. Estudio de la población de precursores neurales diferenciados a neurona joven en el complejo ZSE-BMD-Hilus.....	46
F.1 Comportamiento de los precursores en estado de diferenciación en el complejo neurogénico.....	46
F.2. Influencia del E-CSF en la diferenciación neuronal temprana de los precursores neurales.....	48
G. Estudio de la intensidad de la expresión en el marcaje de $\beta$ III tubulina .....	50
H. Estudio de la población de precursores neurales diferenciados a neurona madura	

H.1. Descripción de la actividad de los precursores neurales que se diferencian a neurona madura .....	52
H.2. Influencia del E-CSF sobre los precursores neurales que se diferencian a neurona madura .....	54
DISCUSIÓN.....	57
Nuestros resultados aportan las siguientes evidencias:.....	57
EXTENSIÓN DEL NICHOS PERIVENTRICULAR DEL HIPOCAMPO: FUNCIONALIDAD DE LAS DISTINTAS ÁREAS. ....	59
NEUROGÉNESIS.....	62
RESPUESTA DEL NICHOS AL CSF EMBRIONARIO .....	64
CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	69



# INTRODUCCIÓN

## CÉLULAS MADRE. EL INICIO DE LA TERAPIA REGENERATIVA

En la actualidad se sabe que muchos tejidos del organismo humano tienen una alta capacidad de regeneración. Este hecho es especialmente llamativo en tejidos epiteliales como la epidermis y las mucosas, o en los tejidos conectivos y en la sangre. El organismo está continuamente regenerándose de una forma eficaz excepto en aquellos órganos formados mayoritariamente por células muy especializadas en donde la regeneración, si ocurre, es muy limitada.

Estos procesos se basan en la existencia de células altamente indiferenciadas que tienen la capacidad de autorreplicarse y de diferenciarse en diversas estirpes celulares. Se trata de las células madre o precursores, caracterizadas por estas dos propiedades fundamentales: autorreplicación y diferenciación.

Cuando existe un daño estructural tisular puede producirse una respuesta de las células madre que, atraídas al foco de la lesión por diversos factores quimiotácticos, se movilizan de sus nichos, proliferan y se diferencian en los tipos celulares necesarios para la reparación (Thurairajah, K. et al., 2017). Así, se ha descrito que células madre tanto de origen mesenquimal, endotelial o hematopoyético, se comportan como células multipotenciales capaces de diferenciarse en varios tipos de tejido como hueso, cartílago, tejido adiposo o tejido muscular (Trounson A and McDonald C 2015).

Las células que proceden del blastocisto embrionario se caracterizan por su destacada pluripotencialidad, esto es, pueden dar lugar a todo tipo de células de nuestro organismo, incluyendo otras células madre o precursores de potencialidad más restringida.

Esta multipotencialidad es característica de las etapas embrionaria y fetal del desarrollo, pero algunos tejidos del organismo adulto poseen ciertos grupos de células madre, conocidas como "células madre adultas o Precursores" que también pueden formar diversas estirpes celulares, generalmente más restringido que las embrionarias. Es el caso de células de origen epidérmico, que pueden dar lugar a miocardiocitos

(Sanganalmath et al 2013). O incluso en el propio tejido nervioso, que podría originar precursores neurales a partir de elementos de la glía (Benraiss et al 2013).

Los estudios acerca de la obtención de este tipo de células o el tipo de estímulos que se requieren para inducir estirpes celulares pluripotenciales, sientan la base del empleo de células madre en terapias regenerativas (Verfaillie et al 2002; Mironov et al 2004).

En este sentido, se han realizado tratamientos regenerativos mediante el empleo de terapia celular en alteraciones de los islotes pancreáticos que ocasionan diabetes tipo 1 (Schulz TC et al 2012); en procesos hepáticos crónicos degenerativos (Uygun BE et al 2010); en trastornos retinianos como la degeneración macular (Stern JH et al 2011) (Buchholz DE et al 2013); o la generación de tejido muscular esquelético a partir de células madre en distrofias musculares (Filareto A et al 2013).

## **LA BIOLOGÍA CELULAR COMO ORIGEN DE LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS**

En las últimas décadas se ha producido un gran avance en los conocimientos sobre biología celular y molecular que han abierto grandes expectativas para la terapia celular regenerativa (Verfaillie et al., 2002; Mironov et al., 2004; Körbling et al., 2003). Además, el interés terapéutico relacionado con el empleo de células madre para la regeneración de tejidos dañados se ha incrementado notablemente ante las evidencias de que, no solo las células madre de origen embrionario sino que también algunas células madre del adulto, pueden implantarse en diversas localizaciones donde, después de acomodarse en un microambiente favorable que se ha denominado "nicho", pueden diferenciarse, proliferar y contribuir a la regeneración del tejido dañado (Mironov et al., 2004). Por tanto, un elemento esencial para el uso de células madre en terapias regenerativas, es proporcionar un entorno adecuado a estas células precursoras para que puedan desarrollarse y potenciar su actividad. El adecuado estímulo de estas células madre pluripotenciales es el elemento clave para activar tanto su replicación, casi de forma indefinida, como la diferenciación en diversos tipos y linajes celulares. (Thomson et al., 1998; Takahashi et al., 2007).

Probablemente, los muchos diseños experimentales en los que se ha intentado implantar células madre en determinadas zonas, con el fin de suplir funciones deterioradas, han

fracasado por la imposibilidad de proporcionar ese ambiente idóneo. En otras ocasiones, explantes celulares que, in vitro dan resultados óptimos, fallan in vivo al no poderse reproducir las condiciones favorables de los cultivos de laboratorio (Simpson D et al., 2007; Li W et al., 2007).

Otro aspecto a tener en cuenta es el origen de las células madre o precursores, ya que ciertos estudios han conseguido inducir células madre a partir de células adultas diferenciadas como son los fibroblastos humanos (Takahashi et al., 2007), demostrando que células somáticas pueden adquirir las características de pluripotencialidad cuando se reprograman, por ejemplo, introduciendo factores de transcripción mediante retrovirus (Yamanaka et al., 2007).

La terapia celular proporciona un medio dinámico al tejido receptor, no solo por la incorporación de células madre sino por la presencia de factores estimuladores producidos o inducidos por ellas, conformando así un nicho tisular apropiado para una regeneración fisiológica del tejido dañado (Gnecchi et al., 2008)

Por otra parte, la implantación de células madre en tejidos humanos, requiere un estricto control sobre su comportamiento a medio-largo plazo para aumentar su perfil de seguridad en cuanto a su potencial efecto tumoral no deseado en relación con una replicación no controlada.

Una mejor comprensión del modo en que otros factores, como la edad, el estadio de la enfermedad y la propia biología del paciente afectan a la regeneración de los tejidos probablemente también será importante para avanzar en este campo (Mao and Mooney 2015).

## **APLICACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN LA REGENERACIÓN DE ALGUNOS TIPOS CELULARES ESPECÍFICOS**

---

### SANGRE

Algunos de los procedimientos terapéuticos más estandarizados relacionados con la regeneración tisular tienen su modelo en los trastornos hematológicos que precisan del aporte de células madre con capacidad regenerativa de replicación y diferenciación de diversas estirpes hematopoyéticas. En el caso de trasplante autólogo se evita la

morbilidad asociada a factores inmunológicos, pero a menudo han de utilizarse trasplantes alogénicos de células madre que siguen implicando una comorbilidad significativa, unida a la dificultad de encontrar los donantes más apropiados.

Un hecho prometedor en la utilización de células madre hematopoyéticas es la reprogramación de células somáticas que, junto con la corrección genética, pueden permitir diferenciarse a progenitores hematológicos y facilitar el autotrasplante, mejorando las tasas de éxito en determinados trastornos genéticos hereditarios, como la inmunodeficiencia combinada y la anemia falciforme (Rideout et al., 2002; Hanna et al., 2007). Por otra parte, aunque las verdaderas células madre hematopoyéticas aún no están disponibles, existen métodos para producir in vitro glóbulos rojos y plaquetas aptos para la transfusión (Rousseau et al., 2014; Mazurier et al., 2011; Nakamura et al., 2014).

---

## MIOCARDIO

La enfermedad cardíaca es la causa más común de muerte en todo el mundo, lo que ha condicionado el uso de terapias celulares y regenerativas en la reparación del músculo cardíaco. Se ha investigado una amplia variedad de tipos celulares como fuente de miocardiocitos, incluyendo mioblastos esqueléticos, células derivadas de médula ósea, células madre cardíacas y células madre mesenquimales. La principal estrategia se ha centrado en el tratamiento de la enfermedad isquémica del corazón mediante la infusión de las células por vía intravascular (intravenosa, intracoronaria o seno coronario retrógrado), por inyección intramiocárdica (inyección transendocárdica, inyección epicárdica), o aportación a través de un parche epicárdico (Sanganalmath et al., 2013).

Como ejemplos de estudios de regeneración cardíaca, basados en el uso de células madre, encontramos la inyección intramiocárdica directa de cardiomiocitos, obtenidos a partir de células pluripotenciales, en primates no humanos postinfartados, que han producido grandes áreas de tejido cardíaco eficaz, aunque no se ha observado una clara mejoría de la función cardíaca (Chong JJH et al., 2014). Por otro lado, la aplicación epicárdica de células endoteliales, obtenidas de células pluripotentes, en corazones postinfartados, ha reducido el tamaño del infarto y mejora de la función ventricular izquierda (Xiong et al., 2013).

Las estrategias que combinan el uso de estas células con parches de bioingeniería o matrices cardíacas descelularizadas también están siendo exploradas, especialmente para su uso en la enfermedad cardíaca congénita (Fox et al., 2014).

En cuanto a la aplicación de la terapia celular en el sistema nervioso está relacionada con los síndromes neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer o la demencia con cuerpos de Lewy, en las que se afectan las células de forma individual o múltiple. Esta heterogeneidad en la afectación celular sugiere que podrían mejorar mediante el uso de terapias basadas en la sustitución de células. La afectación de células de forma individual permite la terapia regenerativa celular de forma específica para esas células concretas, ya sea por trasplante celular o por la activación de células madre neurales de forma endógena (Benraiss et al., 2013). Así, en ciertos trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington, han demostrado su eficacia la sustitución de células de forma específica (Benraiss et al., 2011; Lindvall et al., 2012). Del mismo modo, en algunos trastornos de la memoria, que implican pérdida de neuronas, se ha obtenido cierta respuesta con la aplicación de células pluripotentes (Liu et al., 2013).

Existen estudios en los que se ha realizado trasplante de tejido cerebral fetal, pero con resultados poco gratificantes (Benraiss et al., 2011; Lindvall et al., 2012), aunque existen algunos casos de enfermedad de Parkinson en los que el trasplante de neuronas fetales dopaminérgicas produjo resultados interesantes (Roy et al., 2006; Kriks et al., 2011).

En algunos trastornos epilépticos refractarios al tratamiento, en los cuales existe un déficit cuantitativo y funcional de interneuronas GABAérgicas, se sabe que se pueden beneficiar de un trasplante de interneuronas obtenidas a partir de células pluripotentes derivadas de células madre (Nicholas et al., 2013).

También disponemos de avances en la generación de neuronas motoras espinales a partir de células pluripotentes derivadas de células madre (Li et al., 2005; Karumbayaram et al., 2009), aunque su utilidad clínica está limitada por la falta de regeneración axonal a larga distancia. Otro campo de investigación se centra en el reemplazo de neuronas medulares por astrocitos, que juegan un papel destacado en los defectos metabólicos que influyen en la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica (Lepore et al., 2011).

Las enfermedades deficitarias de mielina que implican pérdida o disfunción de oligodendrocitos mejoran sus expectativas con el empleo de células progenitoras de oligodendrocitos, que generan diversas estirpes gliales como los oligodendrocitos mielinogénicos (Windrem et al., 2008).

## DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso se origina a partir de la placa neural, zona engrosada del ectodermo embrionario, inducida por acción de la notocorda. Progresivamente se produce una elevación y aproximación hacia la línea media de ambos pliegues neurales, que se irán fusionando y cerrando hasta constituir el tubo neural, en un proceso conocido como Neurulación. El cierre de los pliegues neurales progresa en sentido craneal y caudal hasta que quedan conformados los neuroporos anterior o craneal, en torno al día 25 del desarrollo, y posterior o caudal, que lo hace en el día 27.

En la siguiente fase del desarrollo, el tubo neural evoluciona de forma diferente a nivel cefálico, donde se genera el encéfalo y, a nivel caudal, donde formará la médula espinal.

Por otro lado, en el margen lateral de cada pliegue neural se generan las denominadas "células de la cresta neural" que darán lugar al sistema nervioso periférico y autónomo, formando los ganglios raquídeos y de los pares craneales (Gilbert, SF. Formation of the Neural Tube. Developmental Biology 6ª ed. 2001).

Inicialmente, el tubo neural está formado por una pared que consiste en un epitelio columnar pseudoestratificado, denominado Neuroepitelio, en el que mediante de un proceso de crecimiento y morfogénesis combinado se van conformando las tres vesículas encefálicas primarias, prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. A partir de la 5ª semana del desarrollo embrionario, el prosencéfalo se divide en dos vesículas encefálicas secundarias, diencéfalo y telencéfalo, mientras que, el rombencéfalo, originará el mielencéfalo y metencéfalo. Además, durante la 4ª semana de desarrollo, el encéfalo embrionario crece rápidamente, comenzando a formarse los pliegues encefálicos, que darán lugar a las posteriores circunvoluciones cerebrales (Gilbert, SF. Formation of the Neural Tube. Developmental Biology 7ª ed. 2006).

## EL SISTEMA NERVIOSO ADULTO PUEDE GENERAR NUEVAS NEURONAS

Probablemente, el sistema nervioso sea la estructura más compleja y evolucionada del ser vivo, capaz de controlar el resto de sistemas, órganos y el organismo en su conjunto, al tiempo que regula la interacción con el mundo exterior. De ahí que su importancia y

complejidad se va incrementando en la escala filogenética hasta alcanzar su máximo en los mamíferos superiores y, especialmente, en el ser humano.

Hasta la década de los 60 del siglo pasado se pensaba que las neuronas eran células enormemente diferenciadas y especializadas, lo que hacía imposible su regeneración en el cerebro adulto. Fueron Altman y Das, en 1965, quienes primero demostraron la presencia de células capaces de dividirse en el SNC. Más tarde, Kaplan demostró que estas células en división generaban nuevas neuronas (Kaplan and Hinds 1977). Con posterioridad, el desarrollo de la inmunohistoquímica y las técnicas moleculares permitieron aislar y cultivar células de cerebro adulto, capaces de formar neuronas, descubriendo la presencia de células madre neurales (Precursores neurales) en mamíferos adultos (Reynolds and Weiss 1992), y demostrando la capacidad neurogénica en mamíferos superiores y primates (Gould et al., 1997; Gould et al., 1999) y, finalmente, en humanos (Eriksson et al., 1998).

## **NEUROGÉNESIS: GENERACIÓN DE NUEVAS NEURONAS**

El proceso por el cual se forman o generan neuronas se conoce como neurogénesis. Este proceso, hasta hace poco tiempo, se pensaba que únicamente tenía lugar en el período embrionario y fetal, pero en la actualidad sabemos que, en el cerebro de los mamíferos adultos, existen regiones donde persisten células madre con capacidad neurogénica. Concretamente, se ha descrito la existencia de dos zonas neurogénicas, la zona subventricular (ZSV), adyacente al ventrículo lateral del cerebro y la zona subgranular (ZSG) en el giro dentado (GD) del hipocampo.

Las células madre (también conocidas como Precursores neurales) tienen capacidad de autorrenovación, es decir, de generar nuevos precursores indiferenciados, pero también tienen pluripotencialidad, o capacidad de diferenciarse hacia estirpes celulares específicas del sistema nervioso adulto, como son los astrocitos, oligodendrocitos, microglía y por supuesto, neuronas (Gage et al., 2000). Estas nuevas neuronas son capaces de alcanzar un estado de madurez e integrarse funcionalmente en un circuito neuronal preexistente (Zhao et al., 2008). De hecho, se ha descrito la integración de nuevas neuronas en circuitos relacionados con funciones cerebrales superiores como el aprendizaje y la memoria (Lledo et al., 2006; Imayoshi et al., 2008).

La muerte celular programada también juega un papel destacado en la neurogénesis. Durante el desarrollo del sistema nervioso, neuronas inmaduras compiten por la supervivencia con células en estadios similares de diferenciación y maduración. Igualmente, en el cerebro adulto, neuronas jóvenes compiten con células en etapas similares de desarrollo y diferenciación por la supervivencia e integración en circuitos neuronales ya formados. El resultado de dicha competencia es frecuentemente la activación de un proceso de muerte celular programada, que actuaría como una estrategia reguladora. A pesar de la continua actividad proliferativa y neurogénica de los nichos en el cerebro adulto, el número de neuronas maduras que llegan a ser funcionantes es bastante menor que el número de precursores neurales proliferantes y, al mismo tiempo, el número de precursores permanece constante de forma que, el proceso de muerte celular programada colaboraría en este equilibrio, eliminando una fracción sustancial de células en proliferación e inmaduras para mantener un número apropiado de población en regiones neurogénicas (Ryu et al., 2016).

El estudio de la neurogénesis se orienta actualmente hacia el mejor conocimiento de su regulación, es decir, los mecanismos del ciclo celular que desencadenan y controlan la proliferación y la diferenciación, tanto en el cerebro adulto como en la etapa embrionaria (Cheffer et al., 2013).

Respecto al origen de las células madre neurales, se ha demostrado en la zona subventricular y zona subgranular del giro dentado, que una parte de los precursores neuroepiteliales generan una población específica de la glía radial que dará lugar a los precursores neurales en la etapa fetal y posnatal (Álvarez-Buylla et al., 2001; Spassky, et al., 2005). Durante el desarrollo fetal y postnatal, las células de la glía radial generan un tipo particular de astrocitos que persisten en estas localizaciones y son capaces de desarrollar un comportamiento de precursores neuroepiteliales en el cerebro adulto dando lugar a células madre de la zona subventricular, teniendo como base un origen neuroepitelial (Merkle et al., 2006).

Así, Merkle et al., en 2004, propusieron que los astrocitos neurogénicos de las etapas adultas derivan de la glía radial que persiste en la pared de los ventrículos laterales de ratas recién nacidas. Al utilizar marcadores moleculares en estas células se observó que las células de la glía radial del neonato dan origen a neuronas, astrocitos, células endoteliales y oligodendrocitos y, posteriormente, desaparecen a pocos días del nacimiento. Estos autores observaron la presencia de neuroblastos marcados en todas las etapas de la edad adulta, e incluso se encontraron que nuevas neuronas continúan generándose a partir de los precursores derivados de la glía radial. Con este trabajo se

concluyó que la glía radial, derivada de los precursores neuroepiteliales, es la célula precursora de neuronas y células gliales en la etapa neonatal, además de dar lugar a los precursores astrocíticos de la ZSV y zona ZSG, las cuales dan origen a las nuevas neuronas a lo largo de la vida adulta. También se ha establecido que las neuronas corticales proceden de células madre pluripotenciales, generadoras de precursores gliales que darán lugar tanto a neuronas como a componentes de la glía (Malatesta et al., 2000; Hartfuss et al., 2001; Noctor et al., 2001).

Otra cuestión destacada ha sido determinar si las nuevas neuronas originadas en el adulto provienen en última instancia de las células neuroepiteliales presentes durante el desarrollo embrionario. Los tipos celulares que en el sistema nervioso adulto corresponden a las células neuroepiteliales, tales como las células ependimales o las llamadas células de la glía radial, son actualmente considerados como precursores neurales con las mismas características que las células neuroepiteliales embrionarias, de las cuales derivan y conservan la capacidad de responder a las señales inductoras de neurogénesis del embrión (Tamamaki et al., 2001; Álvarez-Buylla et al., 2001; Kintner et al., 2002). En consecuencia, la neurogénesis en el adulto tiene lugar a partir de precursores derivados del neuroepitelio embrionario.

Estos estudios apoyan la idea de que las células madre neurales provienen de un linaje precursor neuroepitelio-glía radial-astrocito (Tramontin et al., 2003).

## **NEUROGÉNESIS EN LA ZONA SUBVENTRICULAR**

En embriones humanos, a partir de la 5ª semana, tiene lugar el desarrollo embriológico del telencéfalo, durante el cual se origina una capa de células germinativas que persiste recubriendo los ventrículos laterales en el cerebro adulto. En la superficie en contacto con los ventrículos laterales y más concretamente en la denominada zona subventricular (ZSV), se localizan precursores neurales capaces de generar nuevas neuronas que migran hacia distintas estructuras del cerebro. Durante el desarrollo posnatal se produce una disminución progresiva de la capacidad de generación de neuronas en esta capa ventricular germinativa y, finalmente, en el cerebro adulto solo se mantiene en determinadas localizaciones denominadas "nichos celulares". La ZSV está implicada en la generación de nuevas neuronas relacionadas con el sistema olfatorio. En esta región, las nuevas neuronas generadas se desplazan a través de la vía

migratoria rostral hacia el bulbo olfatorio, donde se diferencian en dos tipos de interneuronas: las células granulares y las células periglomerulares (Luskin et al., 1993; Lois et al., 1994). En el entorno del nicho celular de la ZSV, encontramos distintos tipos celulares como células ependimales ciliadas, o células tipo E, ubicadas en contacto con la cavidad del ventrículo y que participan en la síntesis y circulación del líquido cefalorraquídeo o Fluido Cerebroespinal (CSF), neuroblastos proliferativos o Precursores tipo B y precursores con alta capacidad proliferativa o células tipo C, (Álvarez-Buylla and García-Verdugo 2002). No existe acuerdo en la clasificación y denominación de estas células, posiblemente la más clara en nuestro criterio es la de Doetsch que distingue diferentes estirpes celulares en la ZSV: células B, astrocitos, precursores neurales con capacidad para generar nuevas neuronas; células C, de amplificación y división; y células A, neuroblastos inmaduros que migran al bulbo olfatorio donde se diferenciarán a interneuronas (Doetsch, et al., 1997).

## **NEUROGÉNESIS EN LA ZONA SUBGRANULAR DEL GIRO DENTADO EN HIPOCAMPO**

El hipocampo es una estructura cerebral que ha sido relacionada con las funciones de memoria a corto plazo y aprendizaje. Podemos diferenciar en el hipocampo una serie de estructuras o elementos anatómicos: cuerno de Amón, subdividido en zona CA1, CA2, CA3 y, el giro dentado (GD), donde se encuentra la zona granular y subgranular (ZSG). En el adulto, a diferencia de lo que ocurre en la ZSV, las nuevas neuronas generadas en el hipocampo se localizan en la ZSG que forma parte del propio Giro Dentado y emigran una corta distancia para diferenciarse en la Zona Granular de esta misma estructura.

Los precursores neurales del hipocampo que se generan en la zona subgranular, dan origen a neuronas que maduran en la capa granular del giro dentado (Eckenhoff et al., 1998) y se ha demostrado que estas nuevas neuronas envían sus axones a la región CA3 del hipocampo.

Diversos estudios han establecido una serie de marcadores moleculares para distinguir los diferentes tipos celulares derivados de los progenitores neurales del hipocampo. Concretamente, se sabe que los precursores neurales presentes en la ZSG son astrocitos modificados, derivados de la glía radial, que son conocidos como células B y,

característicamente, expresan GFAP. Por otro lado, están los precursores intermedios o células D, que son PSA-NCAM positivos y GFAP negativos. Finalmente, están los precursores que han comenzado su diferenciación hacia neuronas granulares, denominados células G, que expresan PSA-NCAM, que progresivamente van presentando características electrofisiológicas de neuronas (Seri, et al., 2001; Seri, et al., 2004)

En definitiva, los precursores neurales de la ZSG del giro dentado adulto son capaces de generar neuronas maduras, polarizadas, con axones y dendritas, y tienen capacidad para establecer sinapsis de modo eficiente, liberando neurotransmisores en respuesta a potenciales de acción (Song et al., 2002).

Para que tenga lugar la neurogénesis, deben confluír de forma secuencial los siguientes procesos: 1.- Replicación celular intensa, que conduce a la expansión de la población de precursores; 2.- Migración celular, con desplazamiento de poblaciones celulares de unas regiones anatómicas a otras; 3.- Diferenciación celular, por la que los precursores neurales se transforman en neuronas y, finalmente, contacto dendrítico y axonal e integración sináptica. Cada una de estas etapas se caracterizan por la existencia de marcadores específicos de las diferentes estirpes celulares (von Bohlen und Halbach 2011). En la etapa de proliferación, en la que los precursores se pueden dividir indefinidamente, conservando su estado de indiferenciación como célula madre, o comenzar la vía de diferenciación a neurona, los precursores neurales se caracterizan por expresar GFAP y Nestina. En la etapa de emigración y comienzo de la diferenciación, se originan neuronas inmaduras con capacidad migratoria que ya no expresan GFAP, pero sí Nestina, al tiempo que comienzan a expresar doblecortina (DCX), además de la molécula de adhesión neural (PSA-NCAM), cesando la expresión de Nestina. Durante el proceso de emigración de los neuroblastos dentro de la capa granular del Giro Dentado, continúan expresando DCX y PSA-NCAM. Posteriormente, en la fase de establecimiento de contacto dendrítico y axonal en conexión con CA3, continúan expresando DCX y PSA-NCAM, pero, además, Calretinina y NeuN como marcador de neurona madura. Finalmente, en la fase de integración sináptica, en las nuevas neuronas maduras cesa la expresión de Calretinina, siguen expresando NeuN y comienza de Calbindina.

Hasta el momento se desconoce si los mecanismos que regulan la neurogénesis, en ambos nichos neurogénicos del cerebro adulto, ZSV y Giro dentado, son los mismos que durante el desarrollo. Se sabe que, en el cerebro adulto, la generación de células madre y la diferenciación de los precursores neurales son procesos regulados por factores

específicos de la zona en la cual residen (Álvarez-Buylla et al., 2004). Como ya hemos comentado, los precursores neurales en cualquier etapa de la vida del individuo tienen un origen común, de forma que las células neuroepiteliales de las etapas embrionarias, persisten durante el periodo fetal y posnatal temprano y, como astrocitos modificados, en el adulto, formando una única estirpe celular. En la actualidad existen estudios que sugieren que el microambiente que regula y mantiene la neurogénesis, es decir el nicho neurogénico, durante el desarrollo embrionario y postnatal se conserva en el cerebro adulto, aunque con características específicas que modifican su grado de actividad. Esto supone la persistencia de un proceso tan relevante como la regeneración neuronal a lo largo de toda la vida del individuo, en base a un mecanismo común. (Álvarez-Buylla et al., 2001; Álvarez-Buylla, García-Verdugo 2002; Spassky et al., 2002; Kempermann et al., 2003; Merkle et al., 2004; Seri et al., 2001; Seri et al., 2004).

## **NICHO NEUROGÉNICO: CONCEPTO CLAVE EN LA NEUROGÉNESIS DEL CEREBRO ADULTO.**

La neurogénesis a partir de Precursores neurales requiere de un entorno o microambiente propicio que facilite los mecanismos que la activan y estimulan su progreso. El nicho neurogénico, en el cerebro de mamíferos adultos, no es generalizado, sino que, hasta el momento, se considera restringido a dos zonas concretas donde se ha podido demostrar la existencia de un proceso de neurogénesis activa: La zona subventricular en el ventrículo lateral y la zona subgranular en el giro dentado del hipocampo.

Como ya hemos comentado, el nicho neurogénico proporciona un entorno de regulación de mecanismos implicados en la neurogénesis, tales como la replicación, migración, diferenciación y maduración neuronal, este entorno, basado en la acumulación de múltiples señales difusibles, es creado por las propias células progenitoras en sus distintas fases de maduración, pero también contribuyen otras células tanto de estirpe neuronal como glial del entorno.

La vascularización cerebral próxima al nicho neurogénico, guarda una estrecha relación con la actividad de los precursores neurales en ambas regiones neurogénicas, zona subventricular (Stubbs et al., 2009) y zona subgranular (Palmer et al., 2000). Estos estudios concluyen que las células del endotelio vascular sirven de soporte y activan la

proliferación de los precursores neurales, formando parte esencial del nicho neurogénico.

El otro elemento que contribuye de forma esencial al microambiente de señales difusibles del nicho neurogénico es el Fluido Cerebroespinal (CSF) contenido en los ventrículos cerebrales. Es de destacar que el nicho neurogénico de la ZSV guarda una relación directa con la superficie endimaria de la cavidad ventricular y el giro dentado del hipocampo, al menos en las etapas embrionaria, fetal y postnatal temprana, también guarda una relación similar con la superficie de la prolongación posterior del ventrículo lateral (ZSVp) o Zona Subependimaria (ZSE). Esta estrecha relación ha sido atribuida a la influencia que, determinados componentes de CSF juegan sobre la funcionalidad de los nichos neurogénicos tanto en etapas del desarrollo, como en el período adulto. En este sentido, se ha demostrado que el CSF proporciona factores tróficos que regulan la proliferación y la diferenciación neuronal en estos nichos (Dziegielewska et al., 2000; Johansson et al., 2010; Falcao et al., 2012; Stolp 2013; Johansson et al., 2013; Zappaterra y Lehtinen 2012), habiéndose demostrado que el bloqueo de su secreción por parte de los plexos coroideos modifica significativamente la funcionalidad del nicho (lehtinen al 2013).

Por lo tanto, se ha sugerido que las alteraciones en la composición del CSF modifican su capacidad de actuar sobre el trofismo de los nichos neurogénicos y afectan de forma destacada a sus funciones que, como ya hemos comentado, están directamente relacionadas con la olfacción y los procesos de aprendizaje y adquisición de memoria a largo plazo (Stolp et al., 2015).

Existen numerosos estudios que demuestran que la adecuada funcionalidad del nicho neurogénico depende de la compleja composición del CSF que, por otro lado, se sabe que existen significativas variaciones ontogénicas, de forma que ni la composición ni sus propiedades son las mismas en el periodo embrionario, fetal o en el adulto. (Álvarez-Buylla and Lim 2004; Kazanis et al., 2008; Johansson et al., 2010). Este hecho se ha puesto en relación con la disminución de la actividad neurogénica que se produce a lo largo de la vida, tanto en circunstancias normales como patológicas (Vukovic et al., 2011)

Son numerosos las moléculas identificadas en el CSF que han sido relacionadas con alguno de los procesos de replicación y diferenciación de los precursores neurales. Destacan entre otros muchos el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), cuya ausencia ha demostrado afectar a la proliferación y diferenciación de los precursores neurales (Yoshimura et al., 2001; Marín et al 2006), propiedad que es compartida con el

IGFI (Lehtinen et al 2011); El ácido retinoico, como un elemento necesario en la regulación de la diferenciación celular y la maduración neural (Chang et al., 2016).

El fluido contenido en las cavidades cerebrales, cuya compleja composición ha sido solo parcialmente estudiada en la actualidad (Parada et al. 2006; Zappaterra et al. 2007) presenta notables diferencias entre la etapa adulta y la embrionaria, siendo en esta, cuando desarrolla al máximo nivel sus propiedades biológicas. En la actualidad sabemos que el CSF embrionario ejerce una influencia clave en el comportamiento de los precursores neuroepiteliales que conforman el cerebro embrionario (Gato y Desmond 2009; Lehtinen y Walsh 2011), promoviendo la supervivencia, la replicación y la neurogénesis a partir de dichos precursores. Además, en el cerebro adulto, el CSF embrionario es capaz de inducir un significativo aumento de la actividad neurogénica (Carnicero et al 2013; Zappaterra y Lehtinen 2012).

La diferencia entre la influencia del CSF sobre los precursores neurales en el desarrollo y la etapa adulta está justificada por la diferente composición del fluido, de forma que los factores que contribuyen a la actividad del nicho de precursores neurales van evolucionando temporalmente hacia una disminución progresiva de la activación de la expansión de la población de precursores indiferenciados y de la neurogénesis (Kazanis et al 2008).

## **EL NICHU DEL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO PRESENTA CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES.**

Una vez que hemos establecido las características generales del nicho neurogénico en el cerebro los mamíferos, debemos considerar que, durante el desarrollo embrionario y la etapa postnatal temprana, el nicho celular del giro dentado del hipocampo tiene un carácter periventricular similar al nicho estándar y será, tras la etapa postnatal temprana, cuando se transforme en un nicho de características aparentemente atípicas por su alejamiento y aparente desconexión del ventrículo lateral. Esta transformación es progresiva y según diversos estudios tiene lugar de forma escalonada en tres etapas (Hatami et al. 2018).

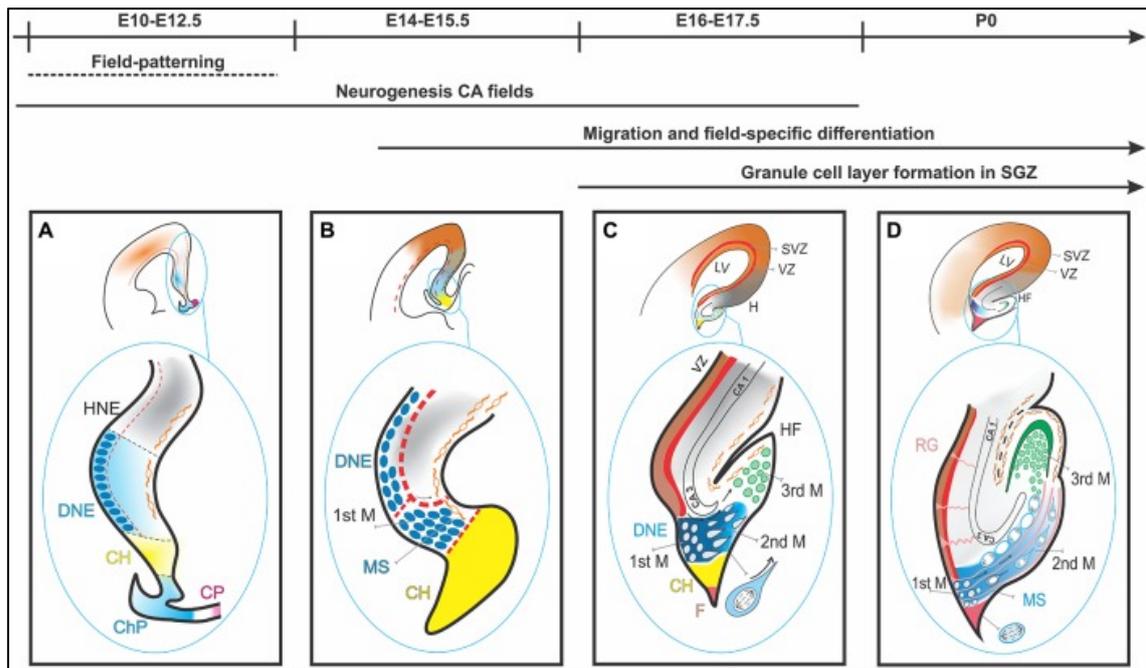


Figura 1: Desarrollo de giro dentario (DG) en el ratón desde el E10 hasta la etapa postnatal. (A) Primera etapa, entre E10-E-12,5 aparece una estructura periventricular con células precursoras proliferativas en el neuroepitelio telencefálico (azul) (matriz proliferativa primaria). (B) Segunda etapa, entre E14-E17,5, las células anteriores emigran hacia el primordio del hipocampo, a través de la banda migratoria dentada (BDM), guiadas por las células de la glía radial (RGCs), formando la matriz proliferativa secundaria. (C) Entre E-16-E17,5 las células de la matriz proliferativa secundaria alcanzan la fisura hipocampal formando la matriz proliferativa terciaria, que origina las células granulares del giro dentado. (D) Tercera etapa, a partir de E17,5 y Periodo postnatal (P0), a partir de la matriz proliferativa terciaria se forma la capa subgranular del giro dentado donde radica el nicho neurogénico hipocampal en el adulto. HNE, Neuroepitelio del Hipocampo; DNE, Neuroepitelio del Giro Dentado; CH Cortical Hem.; ChP, Plexo Coroideo; CP, Placa Coroidea; 1ºM, matriz proliferativa primaria; EM, Flujo Migratorio; CR, Cajal Retzius; 2ºM, matriz proliferativa secundaria; 3ºM, matriz proliferativa terciaria; HF, fisura hipocampal; F, Fimbría (Hatami et al. 2018).

En una primera etapa (Fig.1A), que en embriones de ratón tiene lugar entre los 10 y los 12,5 días desarrollo, se localiza en un área específica del neuroepitelio telencefálico del cerebro embrionario, y que es conocida como "Cortical Hem". Esta región ha sido definida como un centro emisor de señales intercelulares específicas capaces de regular el comportamiento del neuroepitelio cercano, por lo tanto, es considerada como uno de los "centros organizadores el cerebro en desarrollo" (Grove and FuKuchi-Shimogori 2003). Este centro organizador es adyacente a la zona del neuroepitelio

prosencefálico que da lugar hipocampo y juega un papel clave en la organización de su actividad replicativa, neurogénesis y gliogénesis.

Por lo tanto, el primordio del giro dentado del hipocampo consiste en un grupo de células precursoras con carácter proliferativo presentes en el neuroepitelio telencefálico y por tanto en contacto físico y funcional con la cavidad del futuro ventrículo lateral y su contenido, es decir, es considerada una estructura periventricular que ha sido descrita cómo "matriz proliferativa primaria".

En la segunda etapa (Fig. 1B), las células localizadas en esta área de neuroepitelio adquieren una capacidad de emigración que les permite abandonar esta zona y dirigirse al primordio del hipocampo. Este proceso en el ratón tiene lugar entre los 14 y los 17,5 días de desarrollo y genera una determinada ruta de emigración de precursores neurales conocida como "banda migratoria dentada" (BDM), poblada de precursores neurales que en su conjunto se denominan "matriz proliferativa secundaria". Este proceso de migración es guiado por las prolongaciones celulares de la denominada glía radial que, por un lado, están en contacto con la superficie ventricular y por el otro con la superficie pial a nivel de la fisura hipocampal. En el entorno de la fisura hipocampal se diferencian las denominadas células de Cajal-Retzius que a través de una molécula denominada "reelina" juegan un papel clave en la activación y control del proceso de emigración de precursores neurales para formar el giro dentado (Kriegstein and Álvarez-Buylla 2009; Del Río et al. 1997; Hatami et al. 2018).

Cuando las células migratorias de la matriz secundaria alcanzan fisura hipocampal se acumulan en esta región formando lo que se conoce como "matriz proliferativa terciaria" que inicialmente da lugar a la capa de células granulares del giro dentado que se transformaran en neuronas antes y durante el periodo postnatal temprano (1C).

En la tercera etapa (Fig.1 D) las matrices primaria y secundaria van desapareciendo progresivamente y a partir del periodo postnatal temprano, las células de la matriz terciaria se reducen en número y forman la capa subgranular del giro dentado donde radica el nicho neurogénico hipocampal en el adulto. Finalmente, las neuronas generadas en este nicho sufren un proceso de maduración estableciendo conexiones con CA3 (Sugiyama et al 2014).

Sin embargo, existe un número significativo de investigaciones en la última década que ponen en cuestión este modelo diferencial de nicho Subgranular "no periventricular" en el hipocampo de mamíferos adultos.

En primer lugar, destaca el hecho de que el nicho no periventricular de la ZSG del giro dentado en adultos parece ser una característica específica de los mamíferos a diferencia de aves y reptiles donde si conserva su carácter periventricular, sugiriendo que este concepto de relación con el ventrículo podría ser la norma general y el giro dentado de los mamíferos adultos, la excepción (Hevner 2016).

En segundo lugar y de particular interés son los estudios de Seaberg and Van Der Kooy (2002) y de Clarke and Van Der Kooy (2011). Estos autores mediante técnicas de aislamiento y cultivo de células de la ZSVp (que corresponde a la parte posterior del ventrículo lateral) y de la ZSG, demuestran que, por un lado, en la ZSG de mamíferos adultos existe una población de precursores con determinación neuronal o glial, pero con una capacidad de autorrenovación muy limitada, esta población justifica la neurogénesis en el giro dentado, pero que no explica la autorrenovación y permanencia de los precursores neurales en el nicho. Por otra parte, y a pesar de los estudios comentados en capítulos previos, en la ZSVp en el adulto persiste una población de precursores neurales indiferenciados que mantienen intacta su capacidad de autorrenovación y pluripotencialidad, sugiriendo que en el adulto persiste activo el nicho que dio lugar al giro dentado durante el desarrollo. Sin embargo, estos autores afirman que en el adulto no existe el proceso de emigración que establece una conexión entre las poblaciones de precursores comentadas y por tanto los precursores de la ZSVp no contribuirían a la neurogénesis hipocampal en esta etapa. Estos estudios demuestran la persistencia del nicho celular Subventricular posterior en las proximidades del hipocampo del cerebro de roedor adulto, aunque no aclaran el destino y función de dichos precursores.

Estos datos se ven reforzados por los de Chechneva et al. 2005; Sachewsky et al. 2014 y Berg et al. 2018 que proponen la existencia de dos poblaciones diferenciadas de precursores neurales en el giro dentado del hipocampo de roedores adultos con localizaciones diferenciadas (ZSVp y ZSG) que tendrían capacidad de diferenciación y respuesta a estímulos específicas.

Por otra parte, la persistencia de unas características de receptividad del nicho de la ZSG del hipocampo de rata adulta a precursores neurales de la ZSVp, ha sido demostrada por Shetty and Hattiangady (2016). Estos autores realizaron implantes de precursores neurales de la ZSVp en el giro dentado del hipocampo de ratas adultas comprobando que muchas de ellas sobreviven, se replican y se diferencian en neuronas al tiempo que mantienen una población indiferenciada con características de precursores neurales integrada en el giro dentado. Estos datos sugieren que el giro

dentado del hipocampo es un nicho que no se ha independizado completamente del sistema de nicho periventricular permaneciendo receptivo a los precursores que provienen de la ZSVp y posiblemente también a los factores reguladores intraventriculares presentes en el CSF. En este mismo sentido, los estudios de Encinas et al 2013 y Perez-Alcazar et al en 2016 sugieren que algunas de las poblaciones de precursores neurales del hipocampo podrían conservar su dependencia de los factores neurogénicos presentes en CSF.

Tomando en conjunto estos datos podríamos concluir que el nicho de precursores neurales del hipocampo en los mamíferos adultos podría estar escindido en dos poblaciones, una de ellas localizada en la ZSG y la otra en la ZSVp y que la diferencia entre el desarrollo y etapa postnatal temprana y el adulto radica en la desaparición de la capacidad migratoria que comunica el nicho periventricular con el giro dentado de forma que, en el adulto, este nicho no contribuiría a la neurogénesis del giro dentado. Sin embargo, el trabajo de Cuccioli et al. (2015) demuestra que en mamíferos adultos existe una ruta migratoria de precursores neurales distinta a la de la ZSV que conduce a los precursores en dirección al bulbo olfatorio. Esta ruta migratoria alternativa tendría un carácter tangencial, partiendo de la ZSVp y dirigiéndose, al menos en parte, hacia la región CA3 del hipocampo y también hacia el giro dentado a través de la denominada *Banda Migratoria Dentada* que hemos descrito previamente. Este proceso de emigración de precursores neurales se acompaña de una diferenciación neuronal de los precursores y parece ser dependiente de un factor de crecimiento (FGF8) que está presente en el CSF. Esta ruta migratoria caudal apoya la existencia de una contribución postnatal de precursores neurales del nicho de la ZSVp a la neurogénesis del giro dentado del adulto.

Finalmente, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio (datos no publicados, Fraile Eugenia, Trabajo Fin de Máster) con un sistema de trazabilidad celular y usando la incorporación nuclear de BrdU como marcador de linaje celular en precursores, aportan evidencias de que el proceso de emigración de precursores desde la ZSVp hacia el giro dentado, está conservado en los ratones adultos.

Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido demostrar que los precursores neurales de la ZSVp del adulto contribuyan de forma efectiva a la neurogénesis hipocampal.

## HIPÓTESIS

Dada la evidencia de que en la ZSVp o ZSE persiste un nicho celular activo en contacto directo con el CSF y que existen indicios racionales de que este nicho aporta precursores neurales con carácter migratorio hacia el giro dentado del hipocampo, en la presente tesis doctoral pretendemos, en primer lugar, comprobar la existencia del nicho de la ZSVp o ZSE y su proceso de emigración, en nuestro modelo de cultivo organotípico de secciones del cerebro de ratón adulto, tipificando el estado de diferenciación de los precursores neurales y sus derivados, al tiempo que pretendemos demostrar que los precursores de este nicho mantienen intacta su capacidad de responder a estímulos derivados de CSF embrionario, especialmente en lo referente a su capacidad replicativa y neurogénica.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### ANIMALES DE LABORATORIO, ESTABILIZACIÓN, ANESTESIA Y APAREAMIENTO

En nuestro estudio hemos empleado ratones adultos de la raza Swiss-Webster, seleccionados indistintamente de su sexo y de 8-10 semanas de edad (figura 2). Los ratones destinados a los experimentos se ubicaron en un animalario, con una dieta estándar, expuestos a un ciclo alternante de luz/oscuridad controlado (12 horas luz/12 horas oscuridad), en condiciones óptimas de temperatura (20-24 °C) y humedad (45-55%), y en ausencia de estímulos estresantes, con el fin de facilitar la estabilidad de los biorritmos de los animales y mejorar los resultados del apareamiento.

El manejo, anestesia y sacrificio de los ratones se efectuaron respetando la normativa vigente en España, relativa a la protección del bienestar de los animales de experimentación (RD 53/2013, de 1 de febrero), bajo la supervisión de personal veterinario de la Universidad de Valladolid.



Figura 2. Ratón adulto Swiss-Webster

La anestesia de los ratones se realizó por inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina (Imalgene®1000) a dosis de 150 mgr/Kg de peso y, Xylacina (Rompun®) empleando una dosis de 10 mgr/Kgr de peso, que proporciona una anestesia profunda y duradera, comprobada por ausencia de reflejo corneal. Inmediatamente antes de la extracción del cerebro o -en su caso- de los embriones, los animales anestesiados fueron sacrificados por dislocación cervical.

Para la obtención de embriones se emplearon ratonas jóvenes en edad fértil, aproximadamente, 8-10 semanas de edad, que fueron introducidas a las 20 h. en una jaula con dos machos jóvenes, permaneciendo toda la noche para conseguir el apareamiento dado que los ratones son animales de actividad fundamentalmente nocturna.

En los ratones el espermatozoides del macho coagula dentro de la vagina originando un "tapón vaginal", visible a simple vista, que persiste unas 8 horas de promedio.

A las 8 h. de la mañana siguiente, se procedió a la detección del tapón mucoso vaginal como signo de preñez, separando a las hembras en las que se evidenció su presencia y 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. Las hembras preñadas se mantienen en jaulas separadas hasta el momento conveniente del desarrollo embrionario, en nuestro caso 11,5 días.

## EXTRACCIÓN DE EMBRIONES DE RATÓN

Cumplida la edad gestacional de interés, 11,5 días, se procedió a la extracción de los embriones. Inicialmente se anestesió a la hembra preñada mediante la administración intraperitoneal de la mezcla anteriormente especificada, 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 (figura 3A). 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, CaCl<sub>2</sub> 1.63 mM pH 7.3) La madre fue entonces sacrificada por dislocación cervical.

Mediante microdissección bajo estereoscopio, se retiraron sucesivamente de cada engrosamiento uterino las capas serosa, muscular y mucosa, obteniendo 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 fue clasificado en su estadio preciso de desarrollo mediante los parámetros morfológicos descritos por Brown y Fabro (1981) (figura 3).

Todos los procedimientos susceptibles de contaminación bacteriana: obtención de embriones, extracción de CSF, obtención de tejido cerebral y cultivos in vitro se realizaron en condiciones de asepsia adecuadas, empleando siempre material estéril y manipulación bajo campana de flujo laminar (modelo ESCO® Isocide™ ULPA filter per IEST-RP-CC001.3) con un flujo de aire vertical de 0.4 m/seg.

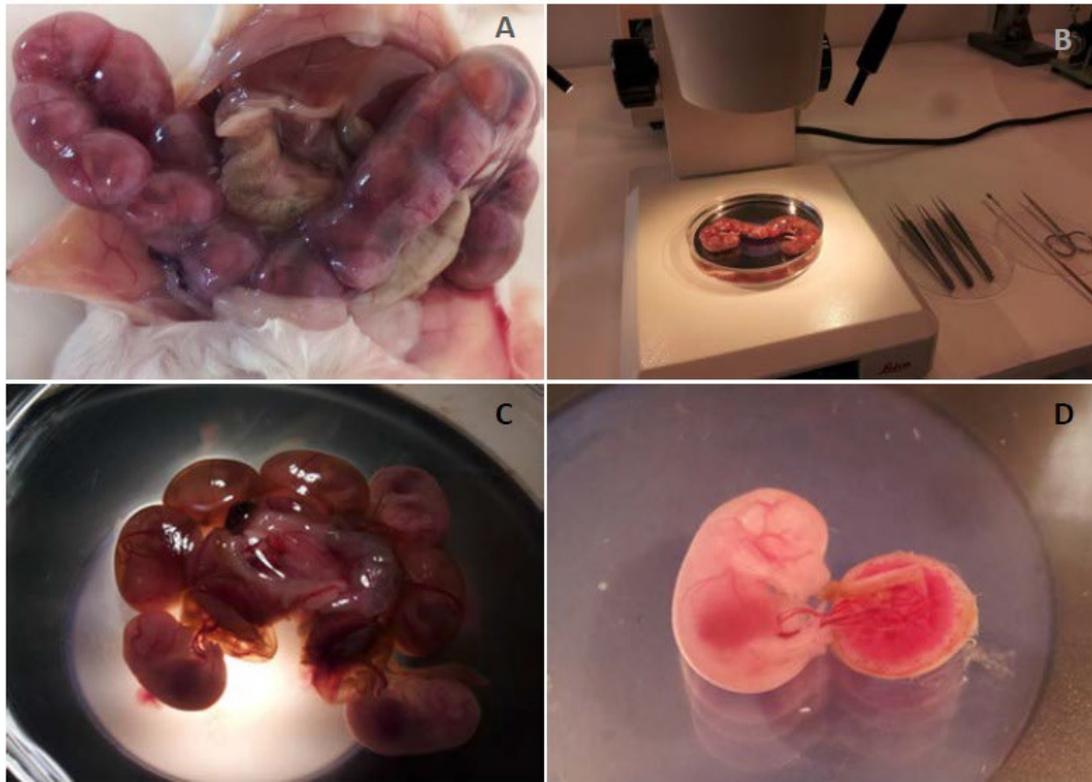


Figura 3. Extracción embriones de ratón. Útero bicorne, cada engrosamiento supone un embrión (A). Se procede a separar cada embrión con ayuda de una lupa y material de disección (B). Cada embrión es separado del resto, desprendiéndolos de sus membranas (C). Obtención de embrión de ratón sin sus membranas, dispuesto para obtener E-CSF(D).

## OBTENCIÓN DE CSF DE EMBRIONES DE RATÓN

Una vez extraídos los embriones, éstos son lavados adecuadamente con solución de Ringer, son situados sobre una placa de Petri estéril y con ayuda de un microinyector (PLI-100 pico-injector; Harward Apparatos) y micromanipulador (Leitz), se inserta una micropipeta de vidrio (50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno) en la cavidad rombencefálica, región con menor grosor parietal de todo el tubo neural, y se procede a la aspiración cuidadosa de CSF con intervalos cortos de tiempo para así evitar el colapso súbito de esta cavidad y permitir el paso de contenido de otras cavidades adyacentes, evitando en todo momento la contaminación del mismo por células de la pared neuroepitelial (figura 4). Para evitar la posible degradación proteica, el CSF obtenido de distintos

embriones se deposita en un Eppendorf a 4°C y rápidamente se almacena a -40 °C hasta su uso.

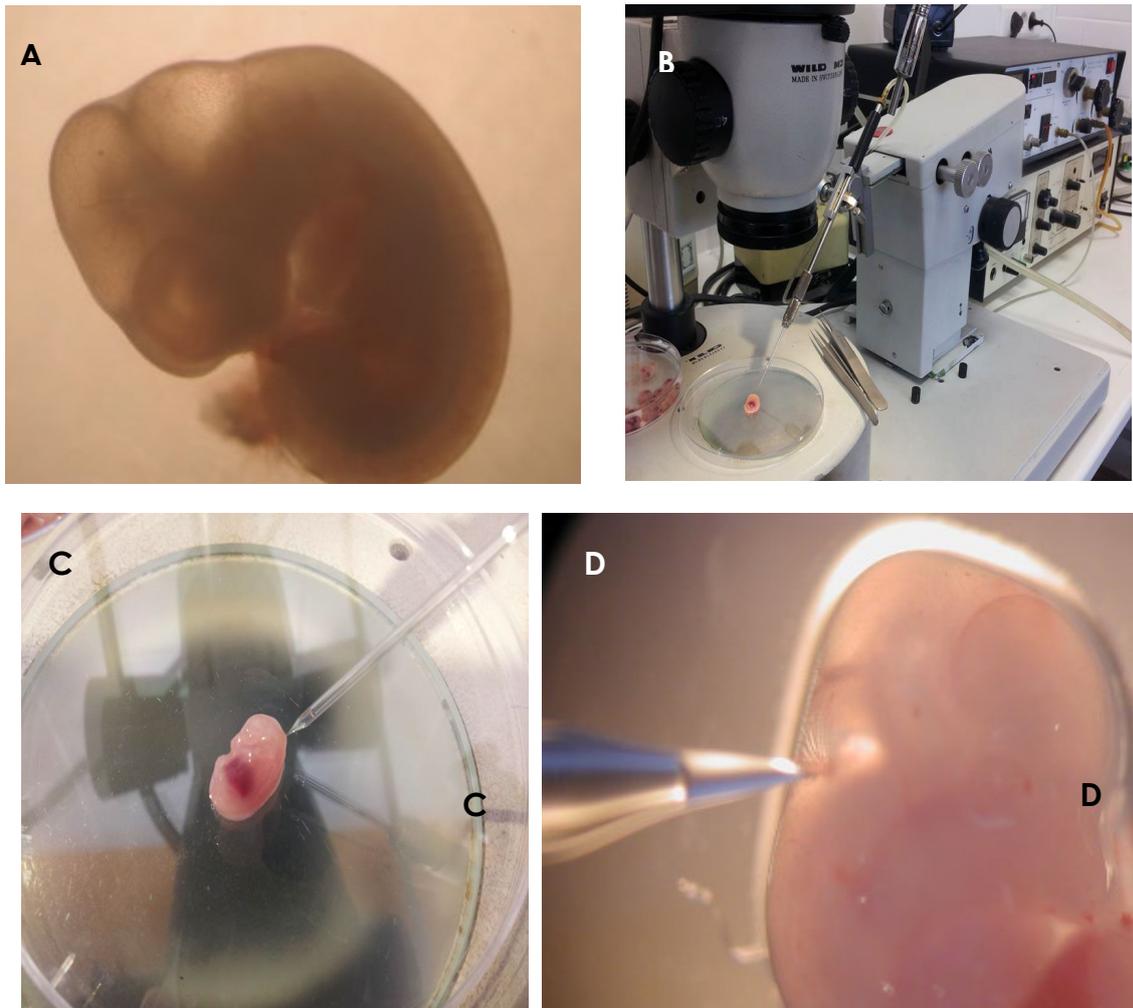


Figura 4. Obtención de CSF-E. Inicialmente se retiran las diferentes membranas del embrión (A). Empleamos un micromanipulador al que acoplamos un microinyector con una micropipeta (B). Se dispone el embrión en una placa de Petri para la extracción del CSF-E (C). Procedemos a puncionar el rombencéfalo para extraer el CSF (D)

## OBTENCIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL

Para la extracción de los cerebros adultos, previa anestesia y sacrificio del animal como se ha detallado anteriormente, se sigue el procedimiento descrito por Guo et al., 2012.

Se sitúa el ratón en decúbito prono e inicialmente, con unas tijeras se realiza una incisión longitudinal en la línea media de la cabeza del animal, rechazando lateralmente la piel para dejar al descubierto la bóveda craneal. Utilizando unas pequeñas tijeras estériles, se recorta con mucho cuidado la bóveda craneal, abriéndole en la línea media, desde el agujero occipital hasta la región nasal del animal. Las dos mitades de la bóveda craneal son levantadas y escindidas con cuidado con ayuda de pinzas, exponiéndose el encéfalo. A continuación, se secciona el bulbo olfatorio y el tronco del encéfalo, lo cual permite, con ayuda de una espátula/cuchara estéril, levantar el cerebro desde la base del cráneo y trasladarlo para su lavado a solución de Ringer estéril a 4 °C (Figura 5).

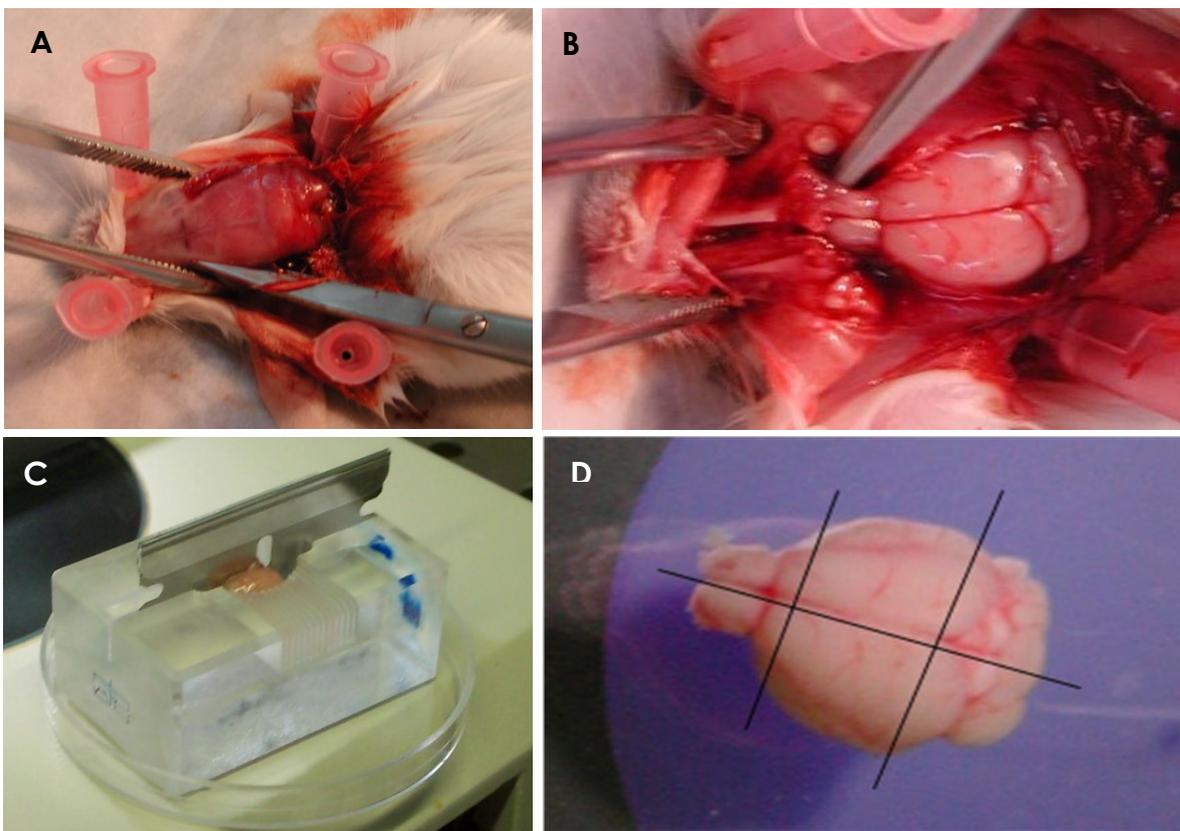


Figura 5. Obtención cerebro de ratón adulto. Procedemos a separar el cerebro del resto de estructuras y del cráneo (A). Seccionamos el cerebro del tronco del encéfalo con ayuda de unas pinzas (B). Procedemos a colocar el cerebro en un molde de metacrilato, para separarle en sus

Posteriormente, se eliminan con una cuchilla el polo anterior y posterior del cerebro y se separan ambos hemisferios cerebrales de acuerdo con los planos indicados en la figura 5D.

Cada hemisferio es entonces introducido verticalmente en un molde que contiene una solución de agarosa al 3%, mantenida en estado líquido a 56°C, el cual es inmediatamente transferido a una cámara fría a 4°C, donde se mantiene durante una hora (figura 6A).

Finalmente, este molde de agarosa es tallado con cuchilla, para obtener una forma de pirámide cuadrangular y se sitúa entonces en un microtomo-vibratomo (Leika VT 1200), procediendo a obtener secciones coronales de cerebro de 300 µm de espesor (figuras 6B y 6C).

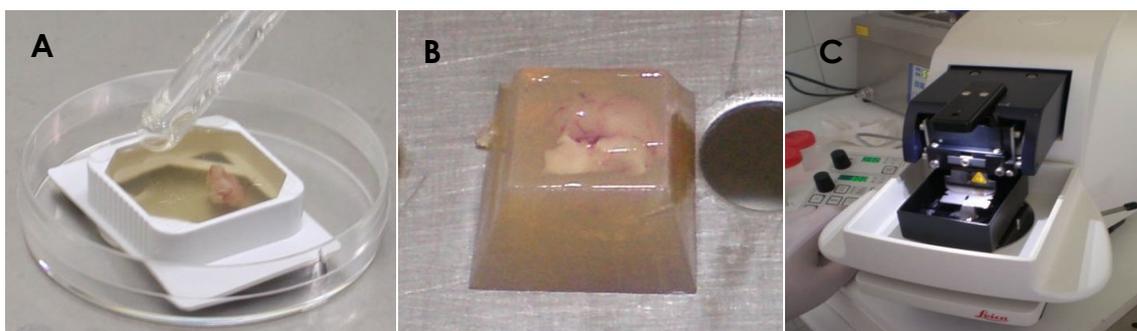


Figura 6. Figura 5. Procesamiento tejido cerebral. Inclusión de los hemisferios cerebrales en agar 3% y posterior enfriamiento (A) (B). Bloque solidificado de agar para su posterior corte (C). Obtención secciones histológicas mediante vibrátomo (C)

## CULTIVO IN VITRO DE SECCIONES DE CEREBRO DE RATÓN

En nuestro caso, procedimos a cultivar secciones cerebrales coronales, que incluían tanto el hipocampo, como la región adyacente al ventrículo lateral, conocida como zona subependimaria. La duración del cultivo fue de 7 días.

Cada sección de cerebro, de 300 µm de grosor, fue recogida con un cubre estéril humedecido con solución Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) y depositada en una placa de Petri con Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) + 6.5 mg/ml de glucosa (figura 7A y 7B). Posteriormente, cada sección cerebral fue situada sobre la superficie de un papel de filtro estéril de 0,8 µm (Millipore®, AABP04700), previamente hervido durante media hora y tratado con una gota de colágeno tipo I de cola rata (5 µl), el cual se permitió solidificar durante 30 minutos a 37°C. Cada uno de los fragmentos del papel de filtro que sostienen las secciones cerebrales fue colocado en los pocillos de

una placa de cultivo (Nunc®) en los que se habían emplazado una arandela de teflón con una rejilla metálica encima (figura 7C). De esta forma, la sección cerebral, junto con el papel de soporte, quedan flotando sobre el medio de cultivo, sin hundirse, permitiendo tanto la nutrición del tejido desde abajo, por capilaridad, como un adecuado intercambio gaseoso. Inmediatamente después, cada muestra de tejido fue recubierta con colágeno tipo I de rata para garantizar un adecuado adosamiento del tejido al papel de filtro.

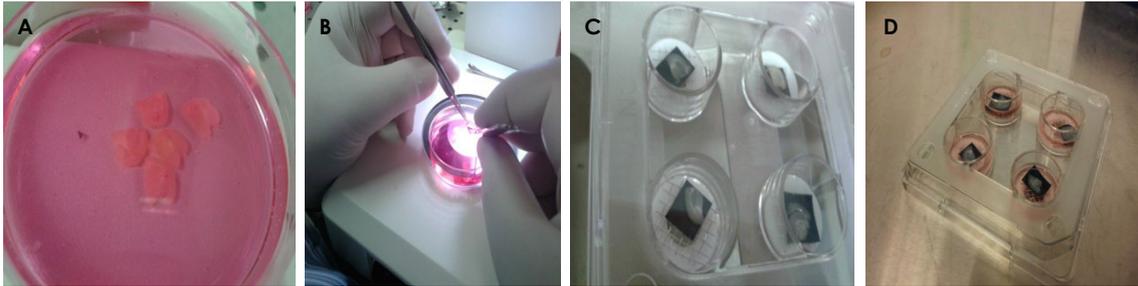


Figura 7. Preparación tejido cerebral para cultivo. Secciones cerebrales inmersas en medio de cultivo durante su procesamiento (A). Colocación del tejido cerebral en placas de cultivo bajo lupa (B). Disposición secciones cerebrales sobre papel de filtro, rejilla y arandela (C).

A continuación, se añadió a cada pocillo 350  $\mu$ l de medio de cultivo (DMEM-F12 suplementado con ácido ascórbico 50  $\mu$ g/mL) y, una vez colocadas las muestras de secciones cerebrales en los pocillos, se procedió a implantar microesferas de látex (Sigma SD-91) en el tejido próximo a la zona subependimaria del ventrículo lateral.

La implantación de microesferas permite establecer dos condiciones necesarias: microesferas impregnadas con CSF-E (condición experimental) y microesferas con PBS (como control). Es importante preparar las microesferas con 24 horas de antelación para que se impregnen adecuadamente del fluido y actúen como un administrador lento del mismo. En la parte final de este apartado se relacionan y detallan los materiales empleados en el cultivo.

Las placas ya preparadas fueron introducidas en una estufa de cultivo (Figura 8) con CO<sub>2</sub> al 5%, a 37°C. El cultivo de las secciones cerebrales se mantuvo durante 7 días, cambiando el medio de cultivo a las 24, 72 y 120 horas desde el inicio del mismo (figuras 8A y 8B). En cada cambio del medio de cultivo, se añadieron 10 µl de una solución stock de BrdU con el fin de alcanzar una concentración de 5µM en el medio.



Figura 8. Estufa para cultivos de secciones cerebrales.

## PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LAS SECCIONES DE CEREBRO TRAS CULTIVO

Una vez finalizado el cultivo, cada muestra situada sobre el papel de filtro fue depositada en una solución con medio de cultivo, despegando cuidadosamente la sección cerebral del papel. Posteriormente, las muestras fueron fijadas en solución de Carnoy durante 60 minutos y después deshidratadas con alcoholes de graduación creciente (96%, 100%, 100%), manteniéndolas 30 minutos para cada pase para, finalmente, sumergirlas en xilol durante dos minutos, tiempo suficiente para la transparentación de los cortes. Posteriormente, se mantuvieron en parafina líquida a 56-58°C (*Paraplast® Sigma-Aldrich*), durante 3 horas. Tras este tiempo todas las muestras de tejido cerebral se incluyeron en moldes de parafina fundida, orientándoles de forma específica antes de su solidificación, para posibilitar la obtención de secciones histológicas que incluyan las zonas de interés: ventrículo lateral, zona subependimaria e hipocampo.

## INMUNOHISTOQUÍMICA

De las muestras de tejido cerebral, convenientemente marcadas para identificar los grupos control y experimental, se obtuvieron secciones histológicas seriadas de 8  $\mu\text{m}$  de grosor mediante microtomía. Sobre estas secciones se realizaron los protocolos de inmunohistoquímica por inmunofluorescencia indirecta, que serán descritos más adelante, para su posterior examen y obtención de las imágenes con microscopio confocal.

Cada una de las muestras, fue desparafinada e hidratada con pases sucesivos por xilol y alcoholes de concentración decreciente: dos pases por solución de xilol, dos pases con solución de etanol 100°, dos pases por etanol 96° y dos pases por etanol 70°, cada uno de ellos de 8 minutos de duración y, finalmente, agua corriente durante 15 minutos.

Dado que durante la fase de cultivo in vitro se añadió BrdU (10  $\mu\text{l}$ ) al medio de cultivo, para que fuera incorporado al DNA de las células en fase de replicación, que en el cerebro adulto coinciden mayoritariamente con los progenitores neurales en fase de replicación, hemos empleado la detección de BrdU como un trazador de los precursores neurales con replicación activa y un segundo marcaje simultáneo, para la valoración individual de aspectos específicos de determinación y maduración neuronal que se describen a continuación:

- La inmunohistoquímica con antibromodeoxiuridina (antiBrdU) y anti sox-2, permite identificar precursores neurales en fase de replicación, pero sin diferenciación celular.
- La inmunohistoquímica con antibromodeoxiuridina (antiBrdU) y anti doblecortina (antiDCX), que nos permite identificar precursores con actividad mitótica que se han diferenciado a neuroblastos, precursores en fase de determinación neuronal, y que presentan capacidad migratoria.
- La inmunohistoquímica con antibromodeoxiuridina (antiBrdU) y anti  $\beta$ III tubulina (anti tuji1), identifica precursores neurales con diferenciación neural temprana.
- La inmunohistoquímica con antibromodeoxiuridina (antiBrdU) y anti calretinina, permite identificar precursores neurales que han alcanzado el estado de neuronas maduras.

---

## PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTI BRDU Y ANTI SOX-2

- 2 pases con xilol de 8 minutos cada uno, para la desparafinación.
- 2 pases con etanol 100% de 8 minutos cada uno para la rehidratación del tejido.
- 2 pases con etanol 96% de 8 minutos de duración en cada pase
- 2 pases de etanol 70%, también de 8 minutos de duración
- Agua corriente durante 15 minutos.
- CIH 1M a 37°C 1 hora para desnaturalizar el DNA.
- Ácido bórico 0.1M pH=8.6 durante 10 minutos para estabilizar el pH básico.
- Reposo hasta llegar a temperatura ambiente.
- Tres lavados con TRIS durante 5 minutos cada uno.  
150 µl solución anticuerpo primario, toda la noche a 4°C, en cámara húmeda.  
Los anticuerpos primarios empleados son:
  - Anti BrdU: Hecho en ratón (Dako® Ref.: M7240), dilución 1/100.
  - Anti sox-2: Hecho en conejo (Sta. Cruz® Ref.: SC17319), Dilución 1/100.
- 3 lavados de 5 minutos cada uno en TRIS pH=7.3 para equilibrar el pH celular.
- 150 µl solución anticuerpo secundario, durante 1 hora, en cámara húmeda y oscuridad. Los anticuerpos secundarios empleados son:
  - Antimouse Ig G-Alexa Fluor® 594 (Invitrogen. Ref.: A11008) (color rojo), Dilución 1/1000
  - Antirabbit Ig G-Alexa Fluor® 488 (Invitrogen. Ref.: 10680) (color verde), Dilución 1/1000.
- 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- Lavado con agua destilada.
- Montaje con medio acuoso. Secado. Observación en el microscopio laser confocal.

---

## PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTI BRDU Y ANTI DCX

El protocolo llevado a cabo es semejante al anterior y el anticuerpo anti BrdU es el mismo.

Para el segundo marcaje, hemos empleado Anti DCX (Doblecortina), hecho en conejo (Abcam® Ref.: ab18723), dilución 1/1000.

El anticuerpo Secundario utilizado fue: Antirabbit Ig G-Alexa Fluor® 488 (Invitrogen. Ref.: 10680) (color verde), dilución 1/1000.

---

## PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTI BRDU Y ANTI $\beta$ III TUBULINA

El protocolo llevado a cabo es semejante al primero y utilizamos el mismo tipo de anticuerpo anti BrdU.

El anticuerpo usado para detectar  $\beta$ III tubulina fue: Anti  $\beta$ III-tubulin hecho en conejo (Sigma® Ref.: T2200), dilución 1/100.

El Anticuerpo Secundario empleado fue: Antirabbit Ig G-Alexa Fluor® 488 (Invitrogen. Ref.: 10680) (color verde), dilución 1/1000.

---

## PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTI BRDU Y ANTI CALRETININA

El protocolo llevado a cabo es semejante al primero y utilizamos el mismo tipo de anticuerpo anti BrdU.

El segundo marcaje fue: Anticuerpo Anti Calretinina: hecho en conejo (Milipore® AB5054), dilución 1/200.

El Anticuerpo Secundario fue: Antirabbit Ig G-Alexa Fluor® 488 (Invitrogen. Ref.: 10680) (color verde), dilución 1/1000

---

## ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

La valoración de los resultados de inmunohistoquímica se realizó, inicialmente, mediante la observación y obtención de imágenes con microscopía confocal (*Nikon Microphot-FXA Leica TCS SPE procesadas con el software Leica Applications Suite V3.0*), a un aumento de 40x.

Se tomaron imágenes de distintos campos de cada una de las muestras histológicas, tanto de las procedentes de condiciones experimentales, con CSF-E en el cultivo, como de los controles, sin CSF-E. Este proceso lo realizamos para los cuatro dobles marcajes efectuados, BrdU con Sox2, BrdU con Doblecortina, BrdU con  $\beta$ III Tubulina y BrdU con Calretinina.

Para el conteo de precursores y/o células que presentan doble marcaje, se evaluaron áreas equiparables de las preparaciones "experimental" y "control" contando áreas de superficie análoga (0,075 mm<sup>2</sup> aproximadamente). Fueron seleccionadas 10 u 11 imágenes de cada condición, sin E-CSF y con E-CSF.

Con los datos obtenidos del conteo se calcularon promedio y desviación estándar mediante hoja de cálculo de Excel®. Los datos se expresan en el apartado de "resultados" en las correspondientes tablas.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba *t* de Student de doble cola, comparando dos grupos diferentes, cultivo in vitro de secciones cerebrales con presencia de CSF-E y sin él. Los datos obtenidos también se reflejan en el apartado de resultados.

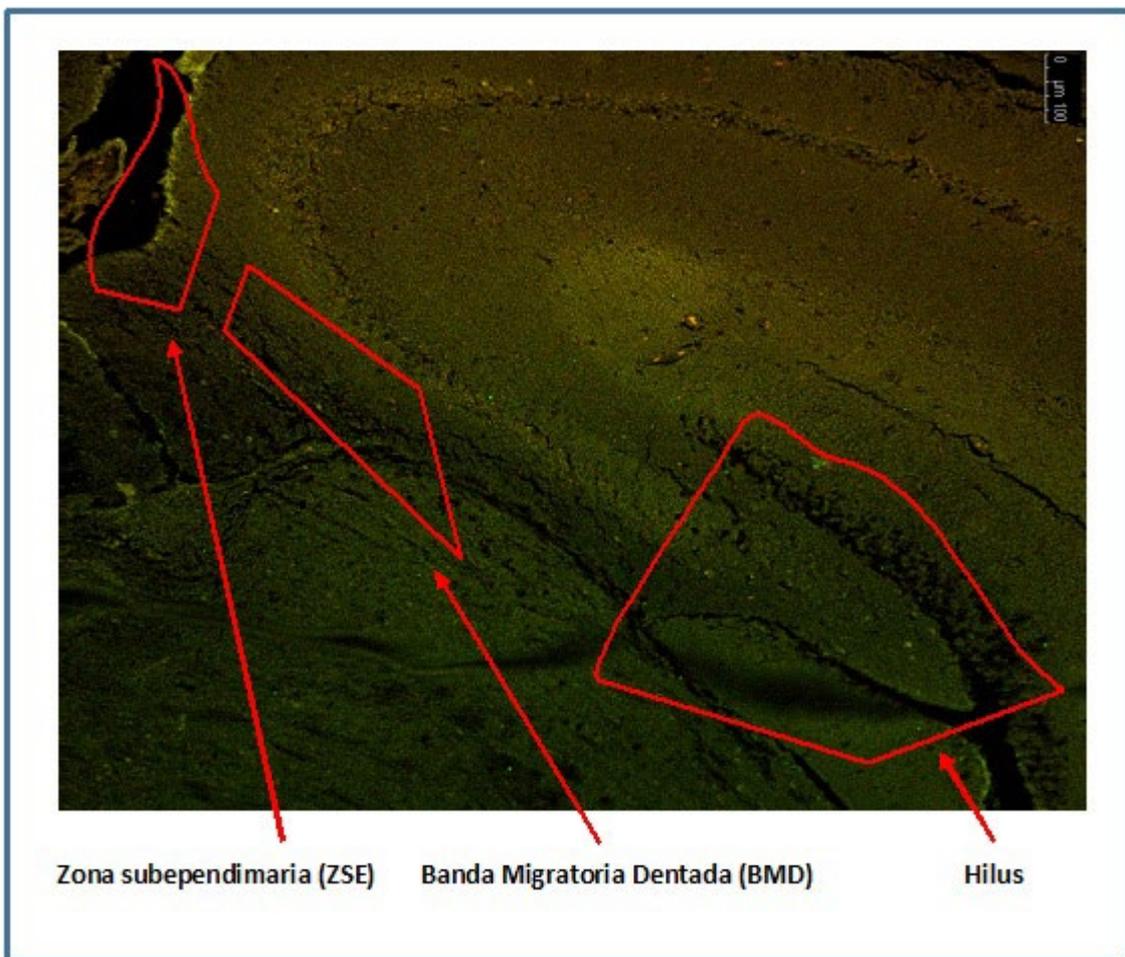


Figura 9. Imagen obtenida con microscopía confocal tras procedimiento de inmunohistoquímica donde se aprecia la región anatómica global objeto del estudio que incluye algunas de las zonas de interés (ventrículo lateral con zona subependimaria (ZSE o ZSVp), banda migratoria dorsal o dentada (BMD) e hilus del hipocampo).

---

## MATERIAL NECESARIO PARA EL CULTIVO IN VITRO DE SECCIONES DE CEREBRO DE RATÓN:

1. Agar: Preparar bacto-agar en PBS (pH 7.3-7.4) 100 ml al 3%. Esterilizar con autoclave (hemos empleado un dispositivo modelo Autotester® M.437-G), a 120°C y 1 kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 20 minutos. Introducir después las botellas de agar en un baño a 55° si se van a utilizar en el día; en caso contrario dejar a temperatura ambiente. Licuar en microondas a baja potencia el día que se vayan a utilizar y dejarlas en un baño a 55°C.
2. Glucosa: Preparar glucosa al 25% en agua destilada. Filtrar en campana y guardar a 4°C.
3. Esterilización con calor húmedo: Esterilizar en autoclave (Autotester® M.437-G) las pipetas Pasteur de vidrio, Ringer, agua destilada, agar, puntas pipetas, a 120°C de T°, 1 kg/cm<sup>2</sup> de presión, durante 20 minutos.
4. Esterilización con calor seco: La malla metálica, previamente recortada, cuchillas, bisturís, cubreobjetos y papel de aluminio, se esterilizan con calor seco a 136°C, 2 bares de presión, durante 20 minutos. Hemos empleado un dispositivo modelo Autotester dry® M.4001728.
5. Arandelas de teflón: Se lavan bien con agua y jabón, y se aclaran con agua destilada. Posteriormente se incluyen en lejía al 25%. Se aclaran con agua destilada estéril y se pasan a un recipiente con etanol 100% durante 24 horas. Por último, se ponen a secar dentro de la campana de flujo laminar. Se guardan en un recipiente estéril.
6. Moldes de inclusión en agar: Se lavan bien, se aclaran con agua destilada y se pasan a un recipiente con etanol 100%. Finalmente se ponen a secar dentro de la campana de flujo laminar y se guardan en un recipiente estéril.
7. Filtro estéril de nitrocelulosa de 0,8 µm de grosor Millipore®, lote R8AN41420: Recortar los filtros en pequeños rectángulos. Poner a hervir en agua destilada durante 2 minutos en un vaso de precipitado. Cambiar el agua y dejar hervir durante 20 minutos más. Pasar a una placa con PBS estéril.
8. Microesferas de látex: 5 µl de una solución con microesferas de látex de 90.7 µm de diámetro, Sigma SD-91, lote 113H0487, que se incluyen en PBS o CSF-E, a 4°C, durante 24 horas.
9. Medios o soluciones empleadas para el cultivo:
  - Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) + 6,5 mg/ml de glucosa (4°C).
  - La glucosa se prepara previamente en solución stock (20 ml de agua destilada + 5 g de glucosa). Se filtra en campana y se guarda en frigorífico a 4 °C. De esta

solución stock se deben añadir 26 µl por cada ml de HBSS: Se pueden preparar 100 ml de HBSS y añadir 2,6 ml de la solución stock de glucosa al 25%.

- Medio de cultivo: 50 ml
  - Advanced Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM): 25 ml
  - HBSS: 12,5 ml
  - Horse serum : 12,5 ml
  - Penicilina(P) + Estreptomicina(S): 0,5 ml
  - 1 ml de solución stock de glucosa. Se debe de oscurecer el tubo con papel de aluminio para evitar la luz
- Colágeno tipo I de cola rata, elaborado por Millipore®, lote 2008664: Se resuspende 1 mg/ml en 0.1N de ácido acético y se guarda a 4°C. Posteriormente se prepara: colágeno/DMEM/FBS (suero bovino fetal) en proporción 8:1:1 y se mantiene a temperatura ambiente durante el experimento en un Eppendorf de 1 ml:
  - 800 µl de colágeno
  - 100 µl de suero bovino fetal (FBS)
  - 100 µl de DMEN (no tocar bordes botella)

---

## FIJADOR DE CARNOY

Debe ser preparado inmediatamente antes de su uso:

- 60 ml de etanol al 100%, elaborado por Merck EMD Millipore® corporation
- 30 ml de cloroformo, elaborado por Panreac®, lote 00000553243
- 10 ml de ácido acético glacial, elaborado por Merck EMD Millipore® Corporation, lote 607-002-00-6

---

## PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA: MATERIAL NECESARIO

### 1. Solución PBS:

- Sodio Dihidrógeno fosfato ( $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ): 2,964 g
- DiSodio Hidrógeno Fosfato anhidro ( $\text{Na}_2 \text{H PO}_4$ ): 11,461 g
- Agua destilada ( $\text{H}_2\text{O}$ ). 1 l (pH 7.3)

### 2. Solución Buffer Tris:

- Tris: 0,605 g
- Cloruro sódico: 8 g

- Ácido Clorhídrico 1N (empleado hasta ajustar pH 7.3)
- Enrasar (completar) con agua destilada hasta 1 l (pH 7.3)

3. Solución Ácido Clorhídrico 2M

- Ácido clorhídrico fumante: 14,568 ml
- Agua destilada hasta completar: 200 ml

4. Solución Ácido Bórico 0.1M

- Ácido bórico: 1,2368 g
- Na OH (empleado hasta ajustar pH 8.5)
- Enrasar (completar) con agua destilada hasta 200 ml



## RESULTADOS

### A. DESCRIPCIÓN DE LAS REGIONES ANATÓMICAS OBJETO DEL ESTUDIO

Tras el conteo de las células positivas en las distintas inmunotinciones y en las distintas condiciones experimentales especificadas en el Material y Métodos, los datos obtenidos se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar y se representan en diagramas de barras.

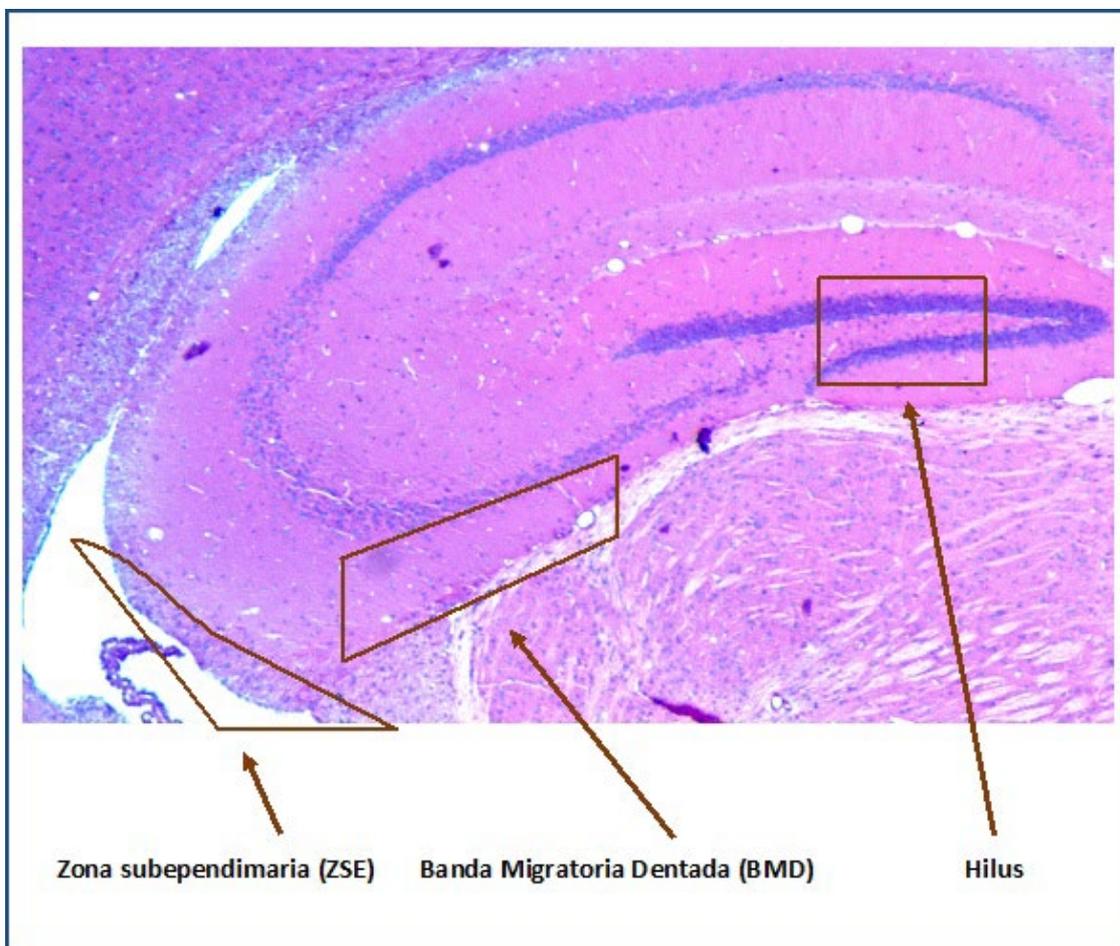


Figura 10. Descripción anatómica de las tres regiones ZSE o ZSVp, BMD e Hilus, en las que se valora la actividad de los precursores neurales y se realiza el estudio

Para una mejor interpretación de los resultados, procedemos a valorar de forma independiente, los precursores neurales en las tres zonas estudiadas: la primera en la pared de la prolongación posterior del ventrículo lateral conocida como Zona Subventricular posterior (ZSVp) o Zona Subependimaria (ZSE), la segunda correspondiente a la vía de migración o Banda Migratoria Dentada (BMD) y la última correspondiente a la región del Hilus del giro dentado (véase figura 10).

## **B. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS PRECURSORES NEURALES DE LA ZONA ZSE**

En cada condición experimental hemos realizado cuatro tipos de marcaje celular: en primer lugar, la replicación celular se ha valorado por la incorporación de BrdU al núcleo, que es específica de células en fase de síntesis de DNA. Este marcaje permanece durante varios días en el núcleo y lo empleamos como marcador de precursores neurales indiferenciados en fase proliferativa y como trazador para las células que derivan de dichos precursores. Para valorar el grado de migración y diferenciación celular utilizaremos un marcaje combinado con BrdU y otros marcadores como son Sox2, para precursores indiferenciados, doblecortina (DCX), para precursores en fase migratoria;  $\beta$ III tubulina, para la identificación de precursores diferenciados de neurona joven y calretinina, para precursores diferenciados en fase de neurona madura (figura 11).

Las células detectadas que sólo expresan BrdU pueden ser consideradas como precursores que se han replicado durante el periodo experimental, pero que han perdido el estado de indiferenciación, diferenciándose en neuronas no identificables por los anticuerpos empleados o alternativamente en glía. Finalmente, los precursores que expresan Sox2, pero no están marcados con BrdU, suponemos que son precursores que no están en fase de replicación activa.

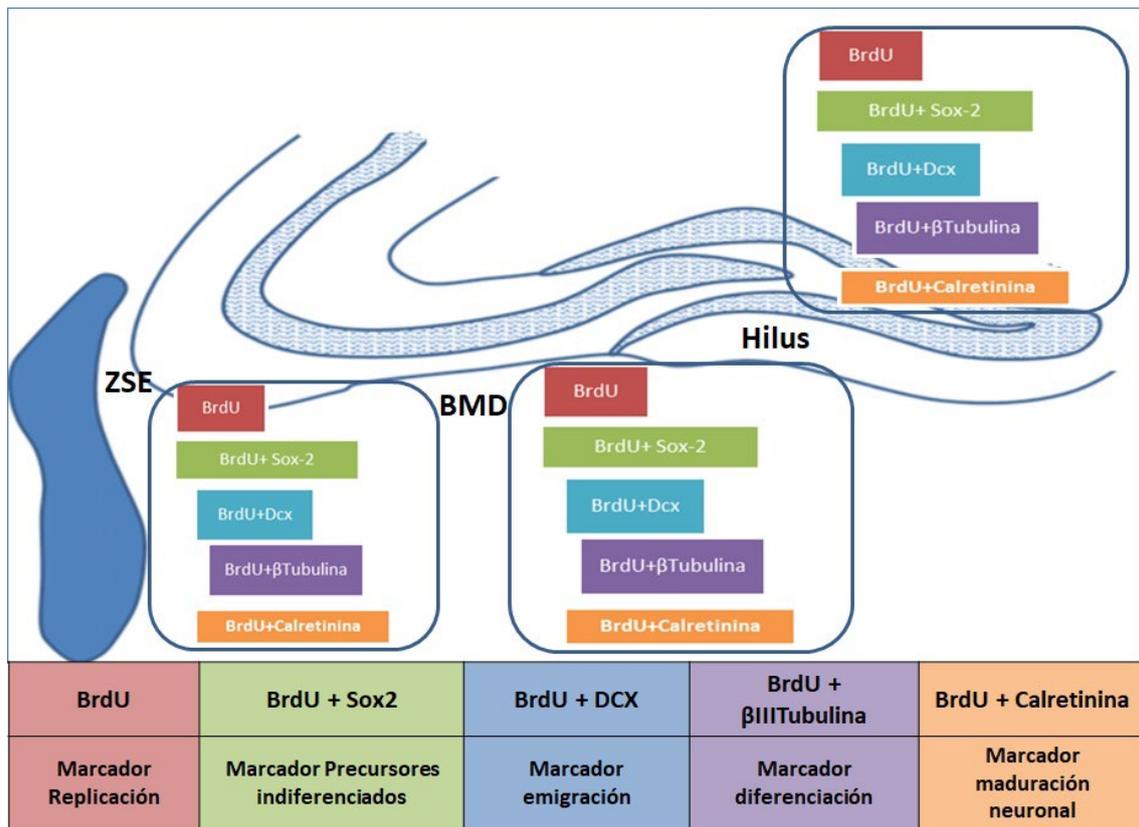


Figura 11. Ilustración de las tres regiones objeto de estudio ZSE, BMD e Hilus, en las que mostramos los tipos de marcadores empleados para el estudio inmunohistoquímico de la actividad de los precursores neurales. Fuente: Esquema de elaboración propia.

### C. DETALLE DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES LLEVADAS A CABO

Podemos dividir las diferentes condiciones experimentales desarrolladas en nuestro estudio en dos grupos, uno control, basado en cultivos de secciones cerebrales coronales a nivel del giro dentado del hipocampo de ratón adulto, en las que se implantaron microesferas impregnadas en Búfer Fosfato Salino (PBS) en el ventrículo lateral de la zona subependimaria (ZSE); el otro grupo experimental, basado en cultivos de secciones cerebrales coronales a nivel del giro dentado del hipocampo de ratón adulto en los que se implantaron, en la misma localización, microesferas impregnadas en Fluido Cerebroespinal embrionario (E-CSF) de ratón de 11,5 días de desarrollo.

## **D. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE PRECURSORES NEURALES INDIFERENCIADOS Y EN FASE DE REPLICACIÓN EN EL COMPLEJO ZSE-BMD-HILUS**

### **D.1. COMPORTAMIENTO DE LOS PRECURSORES NEURALES INDIFERENCIADOS Y EN ESTADO DE REPLICACIÓN**

En las secciones control, tratadas con PBS, hemos estudiado el comportamiento de los precursores neurales en condiciones basales (en ausencia de E-CSF), valorando si su actividad y localización, justifican la existencia de un nicho de precursores neurales localizado junto a la prolongación posterior del ventrículo lateral (ZSE). Posteriormente, pretendemos valorar si existe un proceso de migración y diferenciación de estos precursores desde la ZSE hacia el giro dentado del hipocampo a través de la BMD. Finalmente, valoraremos la influencia del E-CSF en esos procesos.

Nuestros resultados revelan que en las secciones control, existe un elevado número de células con núcleo con BrdU positivo y por tanto con capacidad replicativa en la superficie medial del extremo posterior del ventrículo lateral y tejido circundante (ZSE). El número de células con núcleo BrdU positivo disminuye en dirección a la Banda Migratoria Dentada (BMD) y aún más al llegar al Hilus. Sólo un reducido número de estas células, calculado en porcentaje, expresan únicamente marcaje para BrdU sin expresar simultáneamente Sox2, lo que sugiere que la mayor parte de las células con capacidad replicativa detectadas en esta zona son precursores neurales indiferenciados. La presencia de numerosas células que coexpresan BrdU y Sox2 en la ZSE apoya la existencia de un nicho de precursores neurales indiferenciados próximo al ventrículo lateral en la ZSE. El número de células que coexpresan ambos marcadores no presenta variaciones significativas en las tres zonas estudiadas (figura 12), sugiriendo que podría existir un proceso de migración de estos precursores desde la zona subependimaria hacia el hilus y que el grado de replicación de los precursores en la ZSE es suficiente para que se mantenga estable la cantidad de precursores indiferenciados a lo largo de todo este trayecto. Estos datos también sugieren que el proceso de migración es continuo y que los precursores neurales permanecen en estado indiferenciado durante el mismo, de forma que la expansión de la población de precursores neurales tendría lugar, no sólo en la ZSE, sino que también tiene lugar a lo largo de la ruta migratoria (BMD) e incluso en el Hilus (figura 12). No obstante, no podemos descartar la existencia local, en cada

una de las zonas estudiadas, de poblaciones de precursores indiferenciados en fase proliferativa.

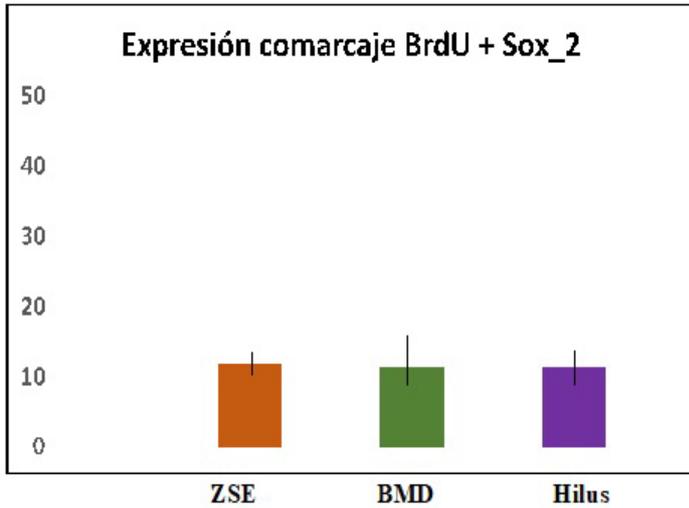


Figura 12. Representación gráfica de los resultados del estudio de coexpresión Sox2 con BrdU en las secciones control (Media ± Desviación estándar).

Expresión comarcaje BrdU + Sox2 en secciones control			
comarcaje / zona	ZSE	BMD	Hilus
<b>BrdU + Sox2</b>	<b>11,8 ± 3,326</b>	<b>11,4 ± 5,777</b>	<b>11,4 ± 4,344</b>
<b>Valor Prueba F</b>	<b>p &gt;0,05</b>		

## D.2. INFLUENCIA DEL E-CSF SOBRE LA POBLACIÓN DE PRECURSORES INDIFERENCIADOS

El tratamiento con E-CSF en la zona ventricular de las secciones de hipocampo de ratón induce cambios significativos en el comportamiento de los precursores neurales de la ZSE (figura 13). En esta zona se observa que los precursores en estado proliferativo e indiferenciado (BrdU y Sox2 positivo) se incrementan en un 105% en las secciones tratadas con E-CSF, con respecto a las secciones control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (véase figura 14). Respecto a la BMD encontramos un incremento del 148% en el número de células con doble marcaje (BrdU y Sox2) en las secciones tratadas con E-CSF respecto a las secciones control, apreciando diferencias con significación estadística. Finalmente, en el Hilus se aprecia un incremento del 104% en el número de células BrdU y Sox2 positivas, en las secciones tratadas con E-CSF respecto a las secciones control, siendo estadísticamente significativo (figura 14).

Estos resultados demuestran que el número de progenitores neurales en estado de replicación e indiferenciación en la zona estudiada es modificable por la presencia del E-CSF y que éste, en las tres zonas estudiadas por nosotros, activa la replicación de precursores por encima del 100%, no obstante, este incremento inducido por E-CSF en la población de precursores indiferenciados es significativamente mayor en la BMD.

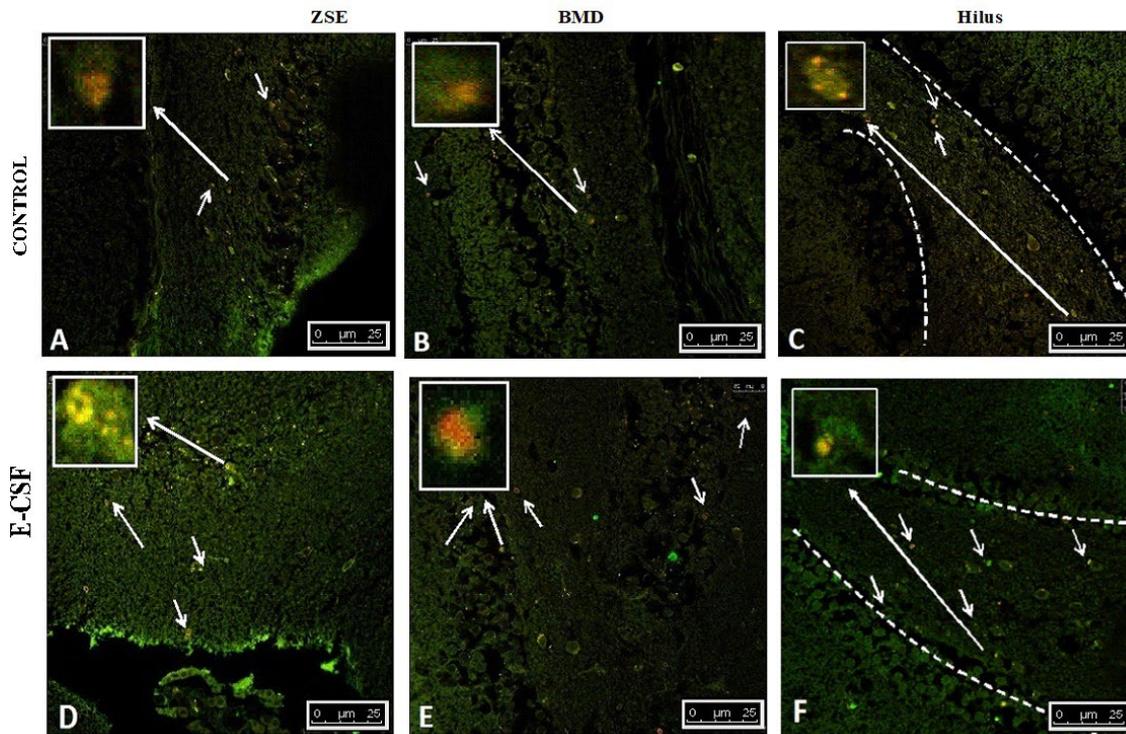
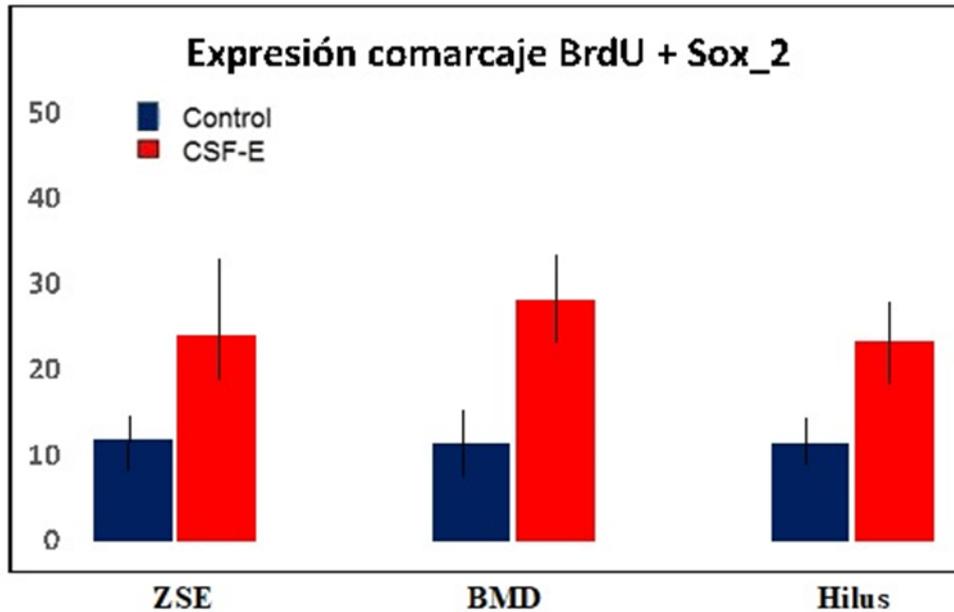


Figura 13. Imágenes de microscopía láser confocal de inmunomarcaje con Anticuerpo Anti-BrdU (rojo) más Anticuerpo Anti-Sox2 (verde).

Las imágenes **A, B y C** corresponden a secciones coronales de cerebro de ratón adulto a nivel del hipocampo **control**, donde se aprecian los precursores que presentan doble marcaje (flechas) y el recuadro muestra una imagen ampliada de los precursores marcados. La imagen **A** muestra la ZSE. La imagen **B** muestra la BMD. La imagen **C** muestra el Hilus. Los trazos blancos discontinuos delimitan la región del giro dentado en el Hilus.

Las imágenes **D, E y F** corresponden a secciones coronales tratadas con **E-CSF**, de cerebro de ratón adulto a nivel del hipocampo donde se aprecian los precursores que presentan doble marcaje (flechas) y el recuadro muestra una imagen ampliada de los precursores marcados. La imagen **D** muestra la ZSE. La imagen **E** muestra la BMD. La imagen **F** muestra el Hilus. Los trazos blancos discontinuos delimitan la región del giro dentado en el Hilus.



Expresión comarcaje BrdU + Sox2			
cultivo / zona	ZSE	BMD	Hilus
Control	11,8 ± 3,326	11,4 ± 5,777	11,4 ± 4,344
E-CSF	24,2 ± 11,67	28,32 ± 7,165	23,3 ± 7,762
Valor p	p <0,05	p <0,05	p <0,05

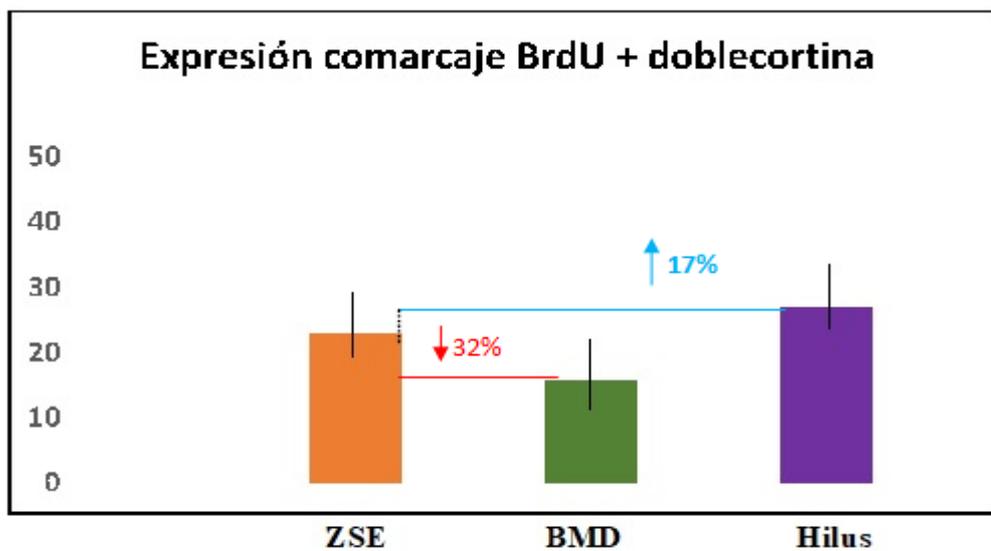
Figura 14. Representación gráfica de los resultados de la coexpresión Sox2 con BrdU bajo la influencia de E-CSF (Media ± Desviación estándar.)

## E. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE PRECURSORES NEURALES EN FASE MIGRATORIA

### E.1. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD MIGRATORIA DE LOS PRECURSORES NEURALES

Seguidamente procedimos a valorar los resultados de la expresión de doblecortina (DCX), marcador de precursores neurales migratorios. En las tres zonas estudiadas, hemos detectado la presencia de células que coexpresan BrdU y DCX. Como ya hemos comentado, el marcaje con BrdU, que permanece largo tiempo en el núcleo, es

considerado un trazador de las células precursoras neurales que están o han estado en fase de replicación activa. La detección de células con doble marcaje en las tres zonas estudiadas sugiere la existencia de un proceso de migración continuo de precursores neurales entre la zona subependimaria y el Hilus a través de la BMD. Sin embargo, el número de células que expresan BrdU y DCX disminuye un 32% en la BMD con respecto a la ZSE, para incrementarse un 17% en la zona del Hilus, respecto a la ZSE (figura 15). Estos datos parecen indicar que el proceso de migración podría no ser homogéneo y estar enlentecido, paradójicamente, en la BMD.



Expresión comarcaje BrdU + doblecortina			
comarcaje / zona	ZSE	BMD	Hilus
BrdU + doblecortina	23 ± 6,928	15,7 ± 6,528	27 ± 6,744
Valor Prueba F	p <0,05		

Figura 15. Representación gráfica de los resultados de la coexpresión doblecortina (DCX) con BrdU (Media ± Desviación estándar.)

## E.2. COMPORTAMIENTO DE LOS PRECURSORES NEURALES EN FASE MIGRATORIA BAJO EL EFECTO DE E-CSF

Por otra parte, el estudio de las células que coexpresan BrdU y DCX, en las secciones tratadas con E-CSF (figura 16 y 17), revela que el E-CSF induce un incremento de células

BrdU-DCX positivas en todas las zonas estudiadas respecto a las secciones control, siendo este incremento estadísticamente significativo. Este incremento en la ZSE se cuantifica en torno al 60%, mientras que en la BMD es de un 50% y en la zona del hilus unos valores en torno al 50%. Estos datos sugieren que el E-CSF es capaz de activar de forma homogénea el proceso migratorio de los precursores neurales desde la zona ZSE hacia el giro dentado.

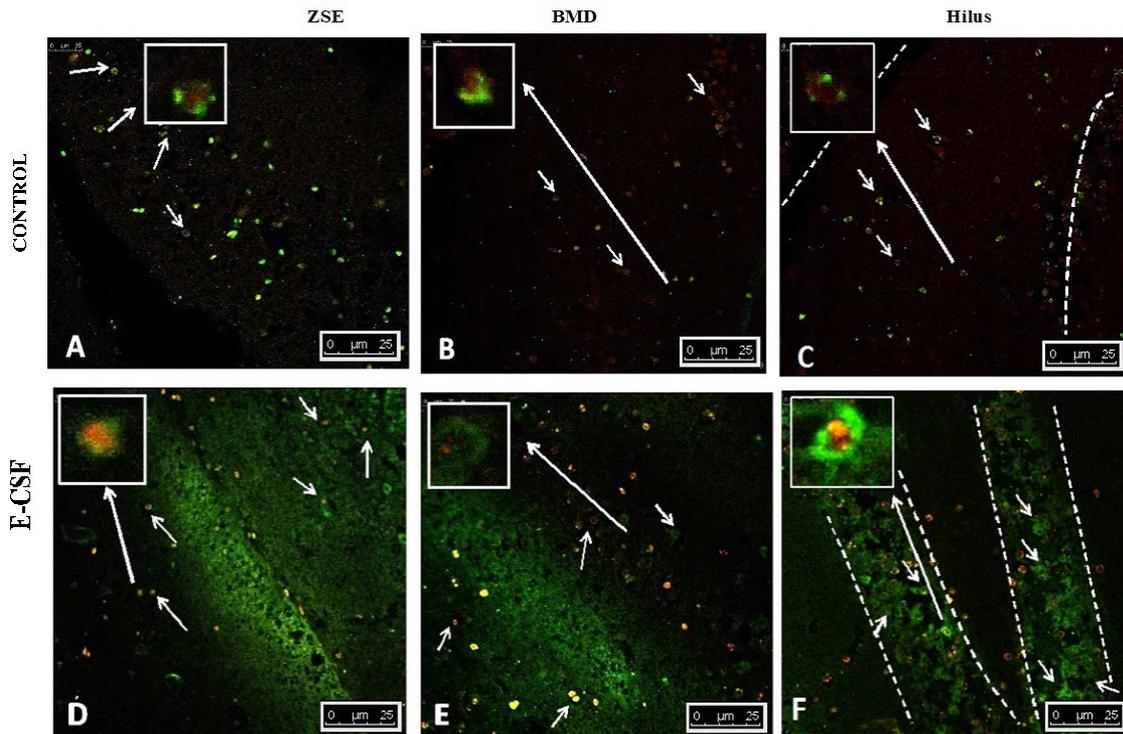
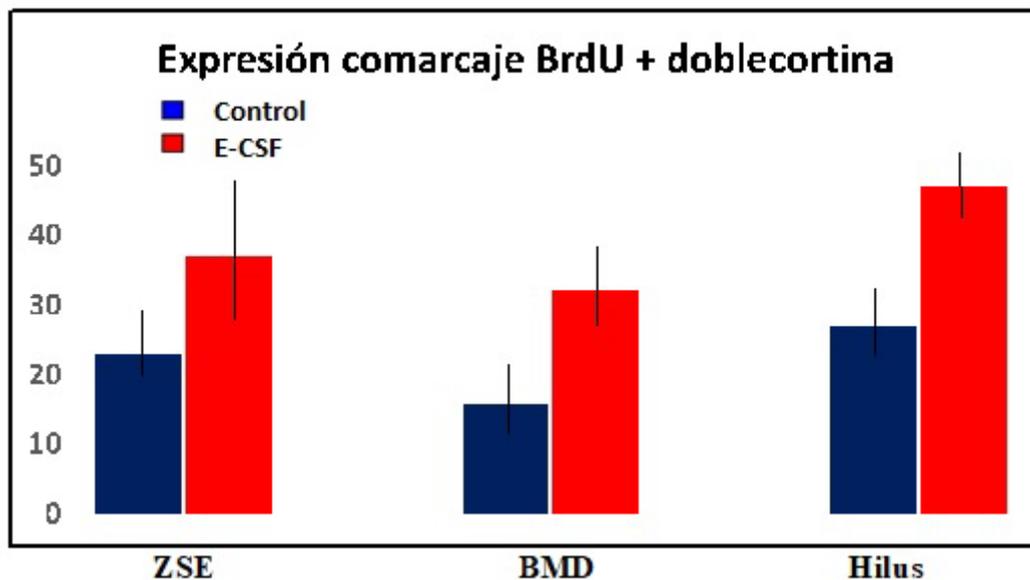


Figura 16. Imágenes de microscopía láser confocal de inmunomarcaje Anticuerpo Anti-BrdU (rojo) más Anticuerpo Anti-doble cortina (DCX) (verde).

Las imágenes A, B y C corresponden a secciones coronales de cerebro de ratón adulto a nivel del hipocampo control donde se aprecian los precursores que presentan doble marcaje (flechas) y el recuadro muestra una imagen ampliada de los precursores marcados. La imagen A muestra la ZSE. La imagen B muestra la BMD. La imagen C muestra el Hilus.

Las imágenes D, E y F corresponden a secciones coronales tratadas con E-CSF, de cerebro de ratón adulto a nivel del hipocampo donde se aprecian los precursores que presentan doble marcaje (flechas) y el recuadro muestra una imagen ampliada de los precursores marcados. La imagen D muestra la ZSE. La imagen E muestra la BMD. La imagen F muestra el Hilus. Los trazos blancos discontinuos delimitan la región del giro dentado en el Hilus.



Expresión comarcaje BrdU + doblecortina			
cultivo / zona	ZSE	BMD	Hilus
Control	23 ± 6,928	15,7 ± 6,528	27 ± 6,744
CSF	37 ± 12,364	32,3 ± 7,645	47 ± 5,440
Valor p	p <0,05	p <0,05	p <0,05

Figura 17. Representación gráfica de los resultados de la coexpresión de doblecortina (DCX) con BrdU bajo la influencia de E-CSF (Media ± Desviación estándar.)

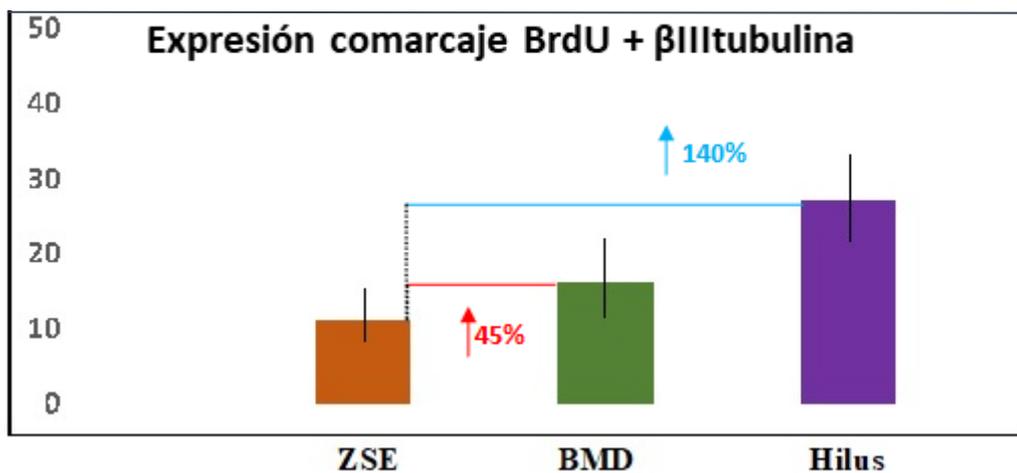
## F. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE PRECURSORES NEURALES DIFERENCIADOS A NEURONA JOVEN EN EL COMPLEJO ZSE-BMD-HILUS

### F.1 COMPORTAMIENTO DE LOS PRECURSORES EN ESTADO DE DIFERENCIACIÓN EN EL COMPLEJO NEUROGÉNICO

Hemos empleado la expresión de  $\beta$ III tubulina, como un marcador celular de neuronas jóvenes. El comarcaje de BrdU, trazador celular, con  $\beta$ III tubulina, nos permite identificar precursores neurales que acaban de diferenciarse a neuronas. Por otra parte, las células

$\beta$ III tubulina sin expresión de BrdU son interpretadas como células que no provienen de precursores neurales que han estado recientemente en fase proliferativa.

Los resultados de nuestro estudio revelan la existencia de un número significativo de precursores recién diferenciados a neurona joven en la ZSE, que se incrementa progresivamente a lo largo de las otras áreas estudiadas, de forma que en la BMD se localiza un incremento de 45% en el número de células BrdU- $\beta$ III tubulina positivas con respecto a ZSE y, en el Hilus, el incremento es de 140% más que en ZSE (figura 18). Esto implica que, en las zonas estudiadas, existe un proceso de neurogénesis, a partir de precursores neurales, que se inicia en las proximidades del ventrículo, coexistiendo con el proceso de replicación y migración de los precursores neurales. Este proceso de diferenciación neurogénica parece acentuarse durante la migración en la BMD y es particularmente activo al llegar al Hilus. Dado que en la capa subgranular del giro dentado se ha descrito la presencia de células BrdU- $\beta$ III tubulina positivas, no tenemos evidencia de que estos precursores que proceden de la zona subependimaria y, que se han transformado en neuronas jóvenes, se integren en la población de precursores neurales del giro dentado.



Expresión comarcaje BrdU + $\beta$ III tubulina			
comarcaje / zona	ZSE	BMD	Hilus
BrdU + $\beta$ III tubulina	11,2 $\pm$ 5,055	16,3 $\pm$ 8,014	27 $\pm$ 9,345
Valor Prueba F	p < 0,05		

Figura 18. Representación gráfica de los resultados de la coexpresión  $\beta$ III tubulina con BrdU (Media  $\pm$  Desviación estándar.)

## F.2. INFLUENCIA DEL E-CSF EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL TEMPRANA DE LOS PRECURSORES NEURALES

Para valorar la influencia del E-CSF en el proceso de diferenciación neuronal, comparamos el número de células BrdU positivas- $\beta$ III-tubulina positivas en las secciones tratadas con E-CSF con las de los controles (figura 19). Nuestros resultados demuestran que en la ZSE hay un incremento del 140% de células con comarcaje positivo respecto a las secciones control, en la zona BMD hay un incremento del 104% respecto a las secciones control y, en la zona del Hilus, el incremento es del 14% respecto a las secciones control, siendo estas diferencias de incremento estadísticamente significativas (figura 20).

Estos datos indican, en primer lugar, que también el proceso de diferenciación neuronal es sensible a la acción del E-CSF y, en segundo lugar, que la activación inducida por el E-CSF es mucho mayor en la ZSE y BMD que en el Hilus. Este dato se puede interpretar como que, tanto en la ZSE como en BMD, existe una reserva de precursores neurales no diferenciados en fase de expansión o migración que tiene una capacidad neurogénica no desarrollada en condiciones fisiológicas, mientras que en el Hilus el potencial neurogénico está desarrollado casi en su totalidad, puesto que la mayor parte de los precursores llega a él en estado de diferenciación neuronal temprana.

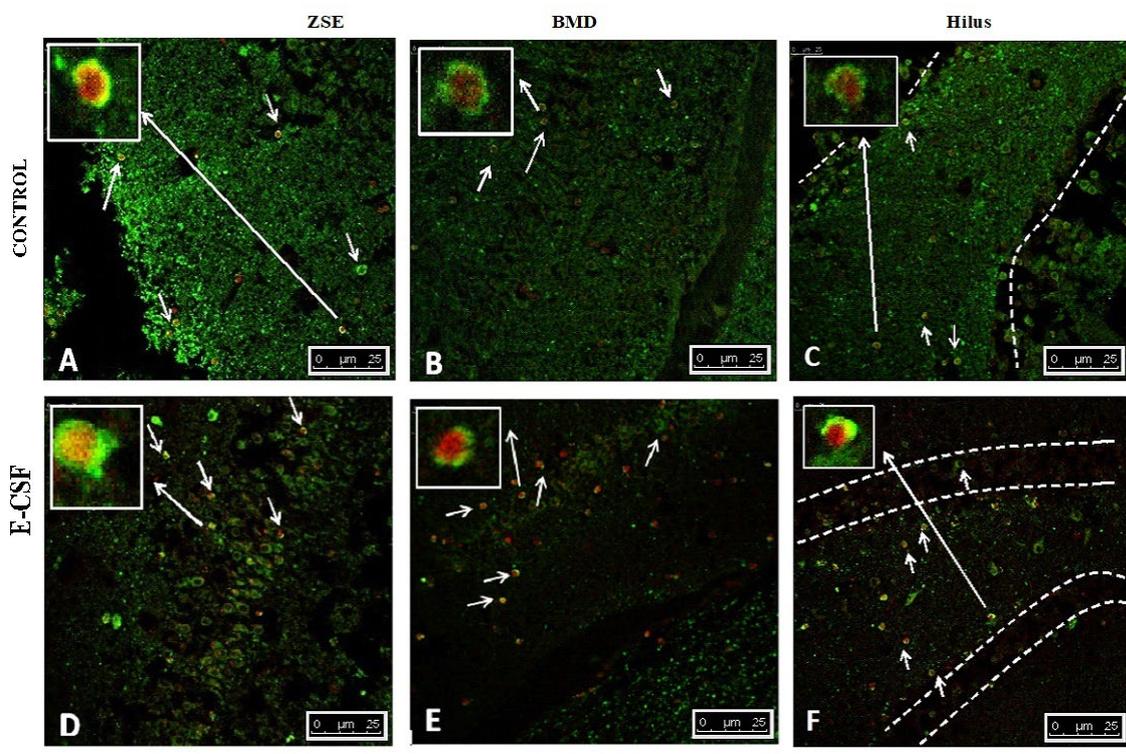
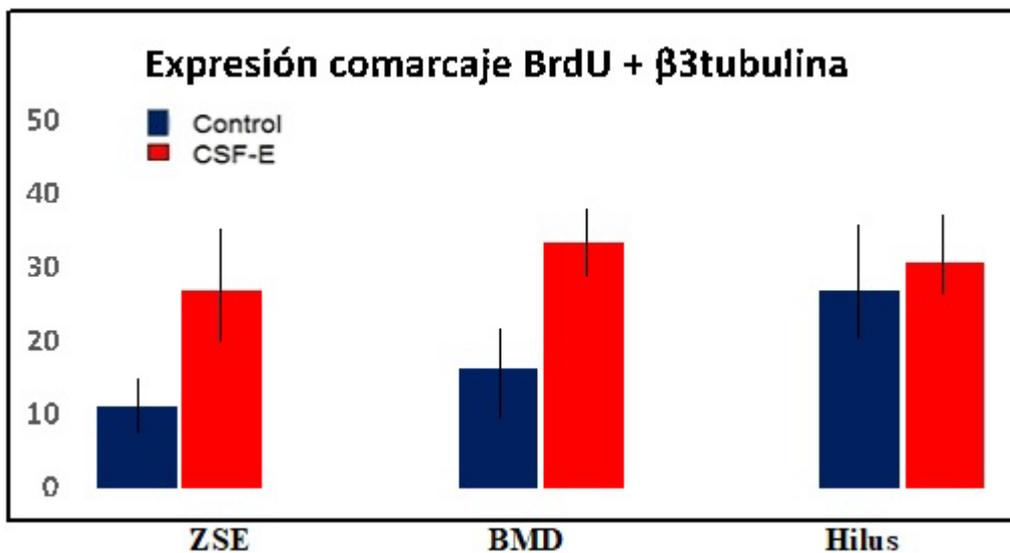


Figura 19. Imágenes de microscopía láser confocal de inmunomarcaje Anticuerpo Anti-BrdU (rojo) más Anticuerpo Anti- $\beta$ III tubulina (verde).

Las imágenes A, B y C corresponden a secciones coronales de cerebro de ratón adulto a nivel del hipocampo control, donde se aprecian los precursores que presentan doble marcaje (flechas) y el recuadro muestra una imagen ampliada de los precursores marcados. La imagen A muestra la ZSE. La imagen B muestra la BMD. La imagen C muestra el Hilus. Los trazos blancos discontinuos delimitan la región del giro dentado en el Hilus.

Las imágenes D, E y F corresponden a secciones coronales tratadas con E-CSF, de cerebro de ratón adulto a nivel del hipocampo donde se aprecian los precursores que presentan doble marcaje (flechas) y el recuadro muestra una imagen ampliada de los precursores marcados. La imagen D muestra la ZSE. La imagen E muestra la BMD. La imagen F muestra el Hilus. Los trazos blancos discontinuos delimitan la región del giro dentado en el Hilus.



Expresión comarcaje BrdU + $\beta$ III tubulina			
cultivo / zona	ZSE	BMD	Hilus
Control	11,2 ± 5,055	16,3 ± 8,014	27 ± 9,345
CSF	26,9 ± 10,15	33,3 ± 5,677	30,8 ± 6,477
Valor p	p <0,05	p <0,05	p >0,05

Figura 20. Representación gráfica de los resultados de la coexpresión  $\beta$ III tubulina con BrdU bajo la influencia de E-CSF (Media  $\pm$  Desviación estándar.)

## G. ESTUDIO DE LA INTENSIDAD DE LA EXPRESIÓN EN EL MARCAJE DE $\beta$ III TUBULINA

Nuestros resultados revelan notables diferencias en la intensidad de marcaje para  $\beta$ III tubulina en el citoplasma de las células con núcleo BrdU positivo, lo que sugiere que existen diversos grados de maduración dentro del estadio de neurona joven. En consecuencia, hemos valorado dos tipos de células; unas, con marcaje  $\beta$ III tubulina discreto (tub +) a los que se les supone una diferenciación reciente y, otras, con un marcaje  $\beta$ III tubulina intenso (tub +++) que sugiere un proceso neurogénico de más larga duración (figura 21).

En la figura 22 se aprecian diferencias en las secciones tratadas con E-CSF frente a las secciones control. En la ZSE, el número de células que presenta un intenso marcaje (+++) está en torno al 40% del total de neuronas jóvenes, mientras que en las secciones tratadas con E-CSF, estas células representan el 78%, es decir, se incrementa en un 38% respecto a las secciones control. En la BMD, el número de células con marcaje intenso para  $\beta$ III tubulina es del 24% del total, mientras que en las secciones tratadas con E-CSF es del 60%, con lo que se incrementa un 36% respecto a los controles. Finalmente, en el Hilus de las secciones control el 34% presenta un marcaje intenso y en las tratadas con E-CSF es del 63% por lo que se incrementa un 29% frente a las secciones control (figura 22).

En primer lugar, la comparación del marcaje más o menos intenso con  $\beta$ III tubulina en las secciones control indica que este proceso de maduración neuronal inicial de neuronas jóvenes comienza en la ZSE, pero se activa rápidamente en BMD y es particularmente evidente en el Hilus. Por otro lado, se aprecia un aumento de células  $\beta$ III tubulina +++ en la ZSE con una posterior disminución en BMD e Hilus. Esto sugiere la no aceleración de la maduración neuronal temprana en la ZSE y no aceleración del paso de neurona joven a neurona madura en BMD e Hilus.

Por otro lado, en las secciones control hay un predominio de marcaje menos intenso (+), especialmente en ZSE, luego tiene lugar una neurogénesis poco evolucionada. Mientras que en secciones bajo la acción de E-CSF se invierte esta situación y predominan precursores con marcaje más intenso (+++), siendo este cambio muy evidente en la ZSE que pasa de un porcentaje, en cuanto a la intensidad de marcaje (+++/+), de 40%/60% a casi 80%/20%, por lo que el E-CSF activa el proceso de neurogénesis y además acelera este proceso en las neuronas recién nacidas.

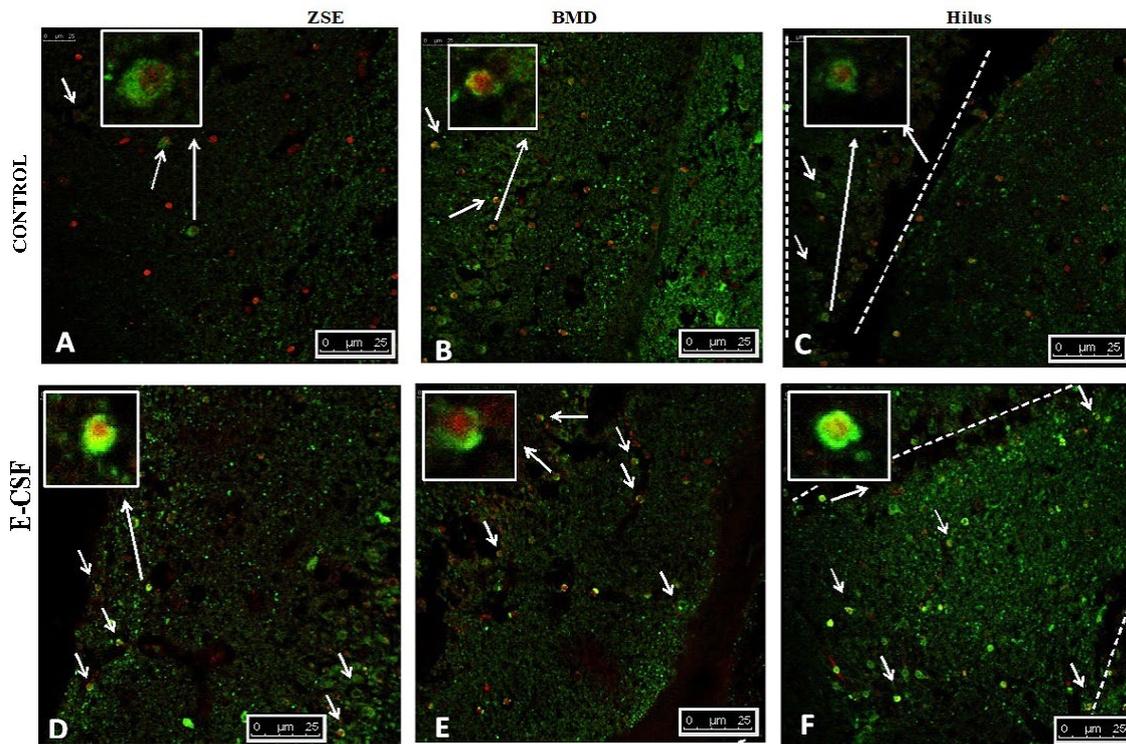
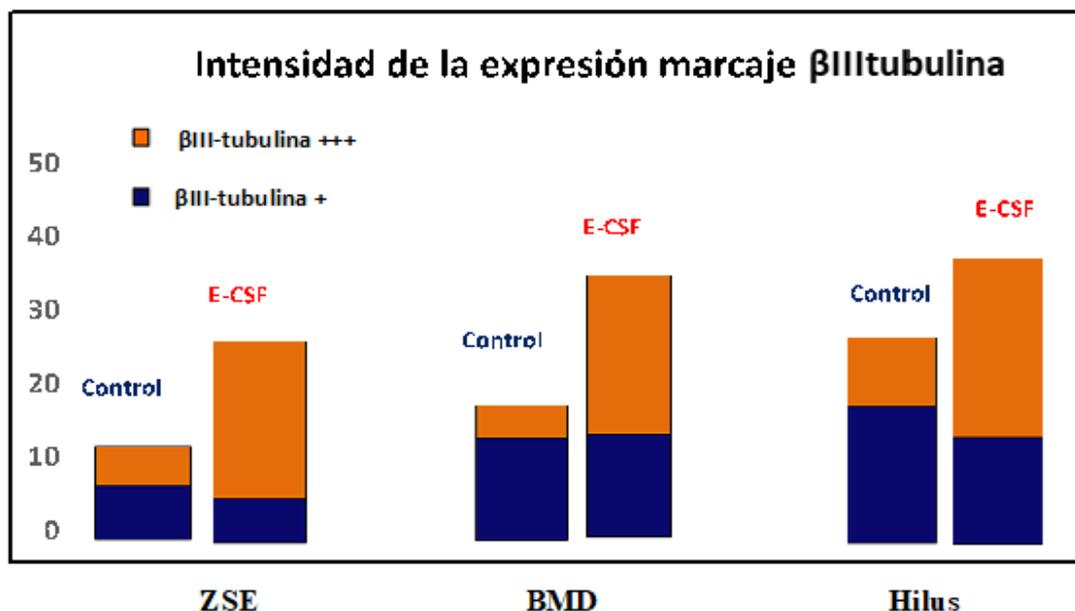


Figura 21. Imágenes de microscopía láser confocal de inmunomarcaje Anticuerpo Anti-BrdU (rojo) más Anticuerpo Anti- $\beta$ III-tubulina (verde) con diferencias en la intensidad de marcaje para  $\beta$ III-tubulina.

Las imágenes A, B y C corresponden a secciones coronales de cerebro de ratón adulto a nivel del hipocampo control donde se aprecian los precursores que presentan doble marcaje y con una intensidad en el marcaje habitual (flechas) y el recuadro muestra una imagen ampliada de los precursores marcados. La imagen A muestra la ZSE. La imagen B muestra la BMD. La imagen C muestra el Hilus. Los trazos blancos discontinuos delimitan la región del giro dentado en el Hilus.

Las imágenes D, E y F corresponden a secciones coronales tratadas con E-CSF, de cerebro de ratón adulto a nivel del hipocampo donde se aprecian los precursores que presentan doble marcaje, pero con una intensidad en el marcaje mayor (flechas) y el recuadro muestra una imagen ampliada de los precursores marcados. La imagen D muestra la ZSE. La imagen E muestra la BMD. La imagen F muestra el Hilus. Los trazos blancos discontinuos delimitan la región del giro dentado en el Hilus.



% Intensidad expresión marcaje βIII-tubulina +++/+						
	ZSE		BMD		Hilus	
Intensidad	Control	E-CSF	Control	E-CSF	Control	E-CSF
βIII-tubulina +++	40%	78%	24%	60%	34%	63%
βIII-tubulina +	60%	12%	76%	40%	66%	37%
Valor p	p <0,05		p <0,05		p >0,05	

Figura 22. Representación gráfica de los resultados de la mayor o menor intensidad en la expresión del marcaje de βIII-tubulina (Media ± Desviación estándar.)

## H. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE PRECURSORES NEURALES DIFERENCIADOS A NEURONA MADURA

### H.1. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS PRECURSORES NEURALES QUE SE DIFERENCIAN A NEURONA MADURA

Para valorar la progresión y maduración neuronal del proceso neurogénico descrito en los precursores neurales de las zonas estudiadas, hemos empleado la coexpresión inmunohistoquímica de calretinina, marcador de maduración neuronal, y BrdU, empleado como trazador del linaje celular de precursores neurales. En las secciones control, se aprecia la presencia de células que coexpresan BrdU y calretinina a lo largo del territorio estudiado, incluyendo ZSE, BMD e Hilus, sin diferencias significativas entre ellas (véase figura 23), lo que indica que el inicio de la neurogénesis detectado con  $\beta$ III tubulina termina en muchos casos con una maduración neuronal en el lugar de origen (ZSE, BMD e Hilus), sugiriendo que las neuronas derivadas de los precursores neurales puede madurar localmente o bien madurar en sitios distintos en el hipocampo, por lo que podría ser un proceso de neurogénesis más amplio que no afecta sólo al hipocampo. Igualmente, hemos comprobado que el número de células BrdU-calretinina positivas en las tres regiones estudiadas no varía significativamente.

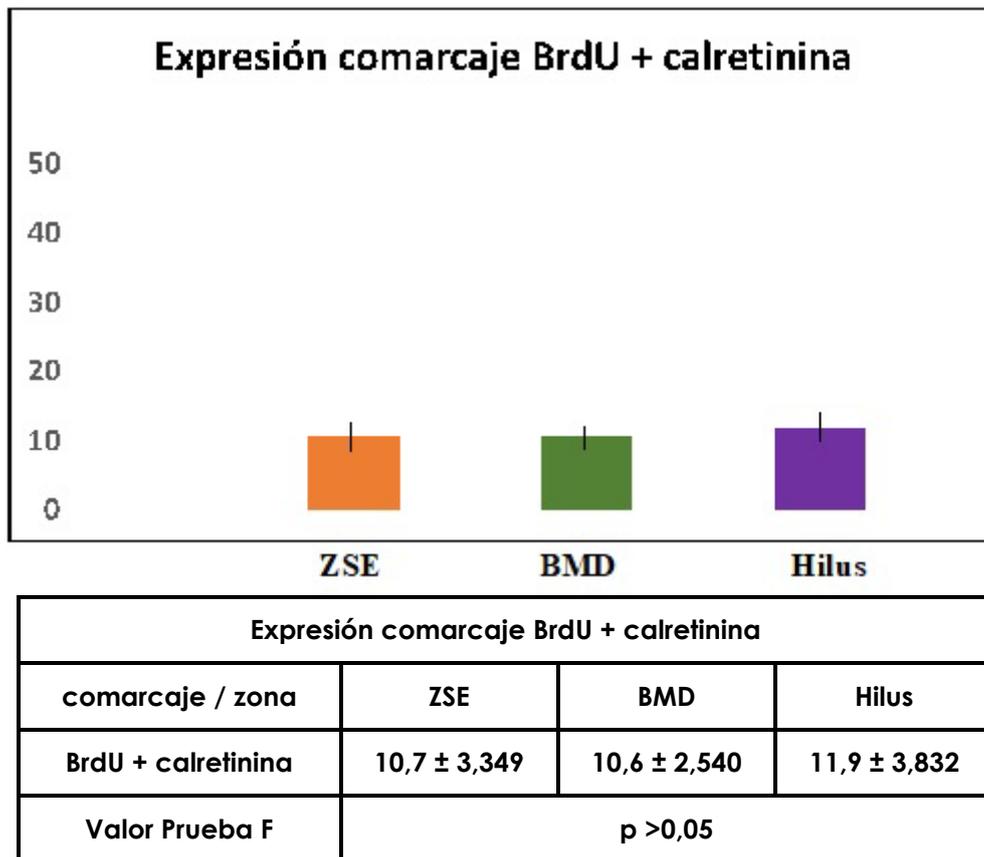


Figura 23. Representación gráfica de los resultados de la coexpresión calretinina con BrdU (Media  $\pm$  Desviación estándar.)

## H.2. INFLUENCIA DEL E-CSF SOBRE LOS PRECURSORES NEURALES QUE SE DIFERENCIAN A NEURONA MADURA

Para valorar el efecto del E-CSF en la maduración neuronal a partir de precursores neurales, se procedió a la inmunodetección de BrdU y calretinina en las secciones de hipocampo tratadas con E-CSF (figura 24). En ellas, se observó en la un incremento del 48% de neuronas maduras con respecto a los controles. Este incremento aumenta al 98% en la BMD con respecto a los controles y se eleva hasta el 183% en el número de neuronas maduras en el Hilus de las secciones tratadas con E-CSF con respecto a los controles (figura 25). Estos datos demuestran la influencia del E-CSF sobre el proceso de neurogénesis con maduración neuronal a partir de los precursores neurales y, al mismo tiempo, revela que es un proceso activo en todas las zonas estudiadas y regulado, con una alta capacidad de reserva que no se desarrolla en condiciones fisiológicas y que aumentaría con la proximidad al Hilus.

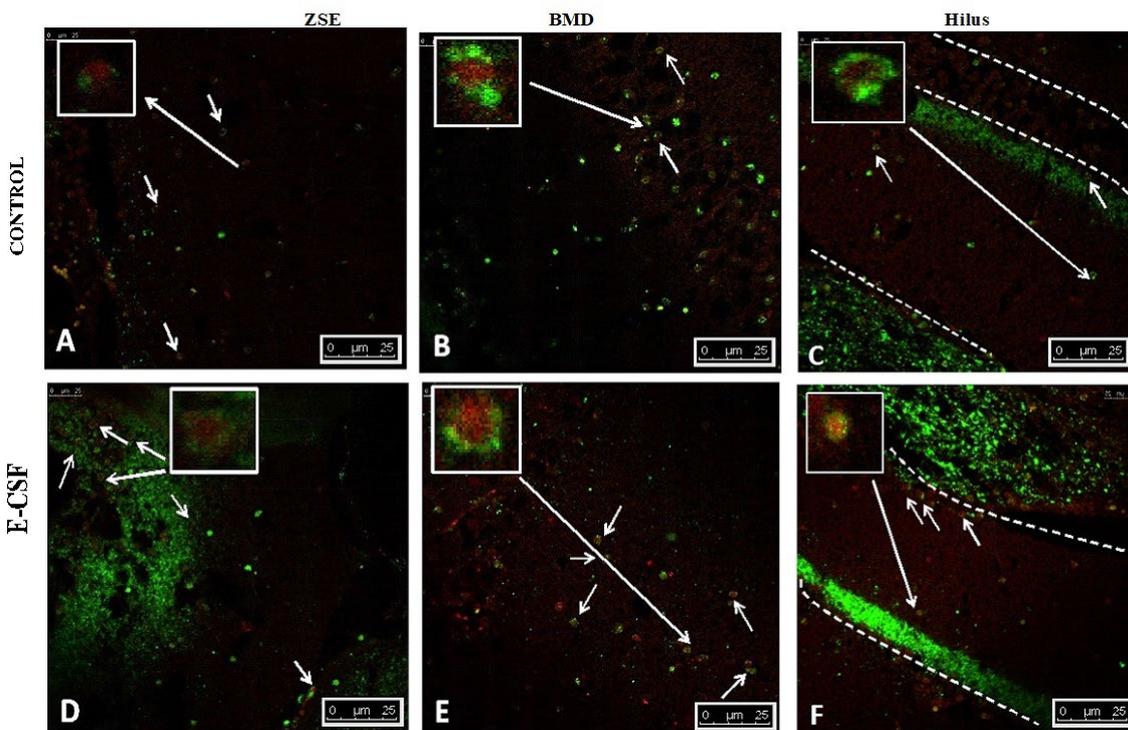


Figura 24. Imágenes de microscopía láser confocal de inmunomarcaje Anticuerpo Anti-BrdU (rojo) más Anticuerpo Anti-calretinina (verde).

Las imágenes A, B y C corresponden a secciones coronales de cerebro de ratón adulto a nivel del hipocampo control donde se aprecian los precursores que presentan doble marcaje (flechas) y el recuadro muestra una imagen ampliada de los precursores marcados. La imagen A muestra la ZSE. La imagen B muestra la BMD. La imagen C muestra el Hilus. Los trazos blancos

díscontinuos delimitan la región del giro dentado en el Hilus.

Las imágenes D, E y F corresponden a secciones coronales tratadas con E-CSF, de cerebro de ratón adulto a nivel del hipocampo donde se aprecian los precursores que presentan doble marcaje (flechas) y el recuadro muestra una imagen ampliada de los precursores marcados. La imagen D muestra la ZSE. La imagen E muestra la BMD. La imagen F muestra el Hilus. Los trazos

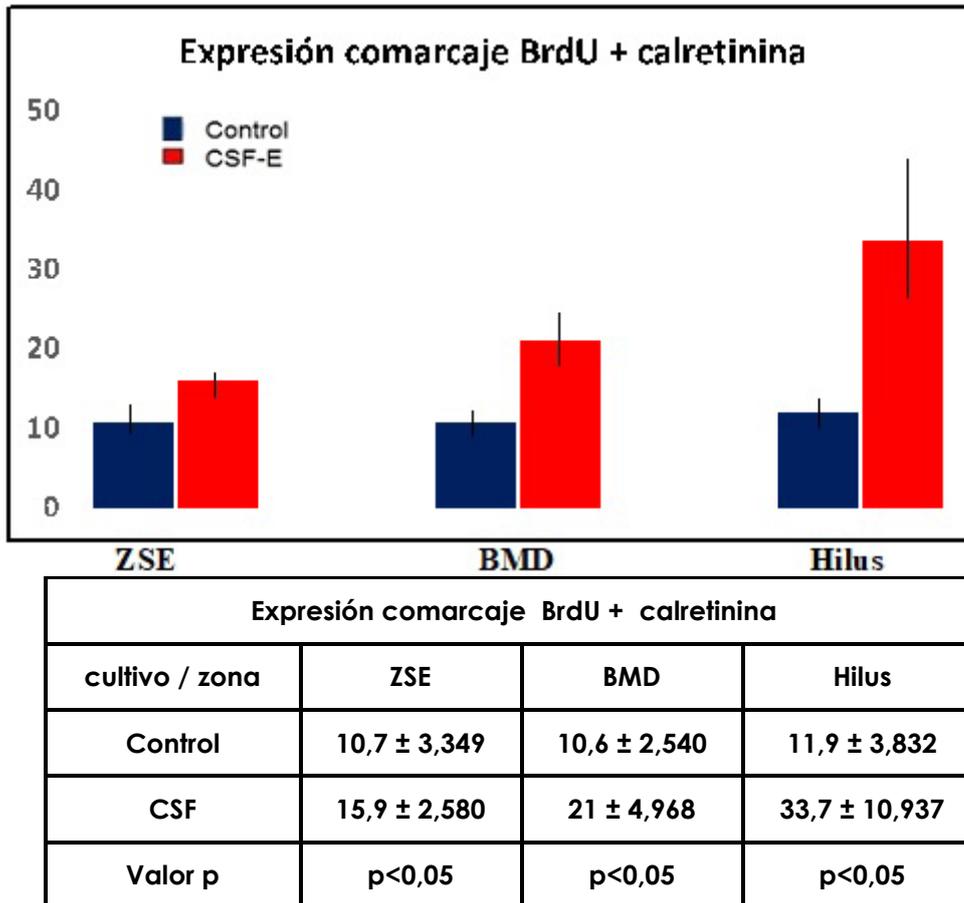


Figura 25. Gráfica y tabla de datos sobre los resultados de la coexpresión calretinina con BrdU bajo la influencia de E-CSF (Media ± Desviación estándar.)



## DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios sobre neurogénesis hipocampal, enfocan su interés en la ZSG del Giro Dentado, describiendo su localización en el adulto, como un proceso restringido a esta formación neuronal a pesar de que, según la opinión de muchos investigadores, la baja actividad mitótica de la ZSG en el cerebro de roedor adulto no es compatible con la presencia de un nicho celular en sentido estricto, ya que no explicaría el necesario proceso de autorrenovación de la población de precursores. En este sentido, existe un número significativo de evidencias científicas que apoyan la contribución de la ZSVp (localizada en la superficie medial de la parte posterior del ventrículo lateral o ZSE) como componente del nicho hipocampal del cerebro adulto, al igual que ocurre durante el desarrollo y etapa postnatal tardía. Sin embargo, la contribución de la ZSVp a la neurogénesis hipocampal en el adulto requiere de estudios que aporten evidencia científica a esta hipótesis, siendo este el principal objetivo de la presente tesis doctoral.

### **NUESTROS RESULTADOS APORTAN LAS SIGUIENTES EVIDENCIAS:**

**En el hipocampo del cerebro de ratones adultos hay una población de células con características de “precursores neurales” aparentemente ajena a la de la ZSG. Dicha población o poblaciones presentan una localización múltiple en la ZSVp (ZSE), en la BDM y en el Hilus desarrollando, en las tres zonas descritas, su potencial tanto de autorrenovación como neurogénico con una dependencia directa del CSF embrionario. Estos datos sugieren que esta población de precursores neurales periventriculares podría formar parte del nicho neurogénico del hipocampo.**

La generación de nuevas neuronas en el hipocampo de roedores adultos procede de un nicho neurogénico que debe proveer a las células de las señales adecuadas para que éstas sean autorrenovables, evitando así el agotamiento del nicho, al tiempo que activar el desarrollo de su potencial neurogénico. No obstante, hasta la fecha el conocimiento del nicho hipocampal no es completo presentando importantes incógnitas. Aunque es ampliamente aceptado que, en el cerebro de mamíferos adultos, este nicho se encuentra en la ZSG del giro dentado, existen múltiples estudios que destacan la ausencia de células con capacidad de autorrenovación en los precursores de la ZSG (Kriesgtein and Alvarez-Buylla, 2009; Urban and Guillemot, 2014).

En relación con este hecho, y aunque determinados autores sugieren que no es necesaria la autorrenovación para la limitada neurogénesis hipocampal, la teoría más comúnmente aceptada es que la autorrenovación es una condición indispensable para el mantenimiento del nicho celular. En consecuencia, este hecho sugiere la posible existencia de componentes adicionales del nicho del Giro Dentado en los cuales las células precursoras se dividan activamente manteniendo y expandiendo la población (Seaberg and Van der Kooy 2002). Además de la ausencia de un área de autorregeneración, hay otra característica diferencial en el nicho de la ZSG con respecto al otro nicho cerebral reconocido y que ha sido ampliamente estudiado como es la ZSV, que consiste en la ausencia de contacto directo de los precursores neurales con el LCR del ventrículo lateral, contacto que ha demostrado ejercer una gran influencia en su comportamiento tanto en embriones como en adultos (Carnicero et al. 2013). Ambas afirmaciones, apoyan la idea de que la ZSG del giro dentado podría ser sólo una parte del nicho neurogénico y que probablemente existan otras zonas de replicación intensa próximas al ventrículo lateral adyacente al hipocampo, como ocurre en la ZSV y en el mismo hipocampo durante el desarrollo y etapa postnatal temprana. La demostración de esta hipótesis permitiría establecer un modelo único de nicho celular en el cerebro de los mamíferos (Gato et al. 2020).

Nuestros resultados demuestran que existe una población de precursores neurales asociada a la pared medial y posterior del ventrículo lateral, esta población presenta un elevado índice de replicación celular y es compatible con la existencia de un proceso de autorrenovación de la población de precursores. Estudios previos han demostrado que la autorrenovación de los precursores de la ZSV depende, en gran medida, de factores tróficos como el FGF2 y el IGF, presentes en el CSF, especialmente durante el desarrollo (Lehtinen et al. 2011; Miyan et al. 2020; Gato et al. 2020) Por similitud con el modelo general de nicho, es lógico pensar que la actividad regenerativa del nicho del hipocampo radique en células precursoras próximas al fluido intraventricular.

La existencia de una población de precursores neurales en la zona subependimaria del ventrículo lateral posterior, posiblemente relacionada con la neurogénesis hipocampal, ha sido previamente sugerida (Kriegstein Alvarez-Buylla, 2009; Clarke and Van Der Kooy, 2011). Esta población de precursores, derivada del proceso de formación del hipocampo durante el desarrollo cuando el giro dentado presuntivo es colonizado por diversas oleadas de precursores generados en la eminencia gangliónica lateral (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Urban and Guillemot, 2014; Parisot et al., 2017). Hasta la fecha este comportamiento ha sido relacionado con el desarrollo y etapa postnatal

tardía, siendo reemplazado en el adulto por la ZSG (Brunner et al., 2010; Nicola et al., 2015). Sin embargo, existen estudios que demuestran la presencia de precursores neuronales en el Hilus de ratones adultos, fuera de la ZSG (Clarke and Van Der Kooy, 2011; Parisot et al., 2017) apoyando la teoría de la existencia de un nicho hipocampal más amplio.

Por otro lado, la presencia de otra población de precursores neurales distinta a la comúnmente aceptada de la ZSV, en la pared lateral de la porción posterior del ventrículo lateral, apoya la idea de que toda la pared lateral de los ventrículos laterales del cerebro de mamíferos adultos, podría ser un nicho común que genera neurogénesis con diferentes destinos (Lehtinen and Walsh, 2011).

## **EXTENSIÓN DEL NICHOS PERIVENTRICULAR DEL HIPOCAMPO: FUNCIONALIDAD DE LAS DISTINTAS ÁREAS.**

Como ya hemos comentado, la coexpresión de BrdU y Sox2 identifica precursores neuronales indiferenciados, la coexpresión de BrdU y DCX identifica precursores neuronales con capacidad migratoria, la coexpresión de BrdU y  $\beta$ III Tubulina identifica precursores neuronales diferenciados a neuronas jóvenes y la coexpresión de BrdU y Calretinina identifica neuronas maduras.

La valoración global de nuestros resultados permite apreciar la existencia de una notable población de Precursores Neuronales y sus células derivadas tanto en la ZSVp (ZSE) como en la BDM como en el Hilus, confirmando los resultados previos (Sachewsky et al. 2014; Cuccioli et al 2014) que demuestran que en la región hipocampal existen poblaciones de precursores neuronales activos, distintos de los de la ZSG, implicados en un proceso de neurogénesis que podría estar en relación con la regeneración neuronal hipocampal, no obstante esta última suposición requiere de demostración experimental en ulteriores estudios.

El análisis de los distintos grados de evolución de los precursores neuronales en las distintas regiones estudiadas revela los siguientes datos: nuestros resultados demuestran que existe una población de precursores neuronales indiferenciados homogéneamente distribuida en las tres zonas estudiadas. A pesar de que inicialmente esperábamos encontrar una población de precursores indiferenciados preferentemente o casi exclusivamente localizada en las proximidades de la parte posterior del ventrículo

lateral, es decir en la ZSVp/ZSE, que iría migrando y diferenciándose en dirección al hilus, los resultados de nuestro estudio demuestran la existencia de precursores neurales indiferenciados distribuidos por las tres zonas estudiadas, en cantidades similares.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los demás marcadores de movilidad y diferenciación celular, estos datos sugieren que en la región hipocampal del ratón adulto, existen distintas poblaciones de precursores neurales indiferenciadas y activas a lo largo de todo el trayecto entre el ventrículo lateral y el giro dentado del hipocampo, lo cual habla en favor de la idea de que existe un nicho neurogénico amplio, no restringido a la ZSE, que abarca las mismas localizaciones que se han demostrado durante el desarrollo embrionario y etapa postnatal tardía. Como ya hemos comentado, el giro dentado del hipocampo se desarrolla como una estructura de carácter periventricular y es al comienzo de la etapa adulta cuando el nicho celular adquiere unas características aparentemente atípicas por su alejamiento y aparente desconexión del ventrículo lateral. Esta transformación es progresiva y según diversos estudios tiene lugar de forma escalonada en tres etapas (Hatami et al. 2018), comenzando como una estructura periventricular que ha sido descrita como "matriz proliferativa primaria" que es considerada como un "centro organizador del cerebro en desarrollo" neuroepitelio telencefálico del cerebro embrionario (Grove and Fukuchi-Shimogori 2003). Una segunda etapa, en la que estas células adquieren una capacidad de emigración que les permite dirigirse al primordio del hipocampo para formar el Giro Dentado, generando una ruta de emigración de precursores neurales conocida como "banda migratoria dentada" (BDM), que forma la "matriz proliferativa secundaria". En la tercera etapa, cuando las células de la matriz secundaria alcanzan la fisura hipocampal se acumulan en esta región formando la "matriz proliferativa terciaria" al tiempo que las matrices primaria y secundaria van desapareciendo progresivamente (Del Rio et al. 1997; Kriegstein and Álvarez-Buylla 2009; Sugiyama et al 2014; Hatami et al. 2018). Nuestros resultados sugieren que este proceso de regresión de las matrices celulares primaria y secundaria, que implica el aislamiento del nicho celular del entrono periventricular, no tiene lugar o no es completo de forma que la emigración que origina la matriz celular secundaria dejaría un número suficiente de precursores neurales indiferenciados desde la ZSVp hasta el hilus del hipocampo que podrían jugar el papel reservorio del nicho hipocampal con capacidad de autorregeneración. Esto sugiere que, durante el desarrollo del hipocampo, las migraciones de distintas oleadas de precursores desde las proximidades del ventrículo lateral hacia el giro dentado podrían dejar establecidas distintas poblaciones celulares que en el adulto tendrían una funcionalidad diferenciada (Cuccioli et al. 2014). Estos datos rebaten la teoría de nicho

hipocampal único radicado en la ZSG y apoyan la existencia de un nicho mucho más amplio que se extiende desde la ZSVp o ZSE hasta el Giro dentado. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que, dentro de este concepto de nicho neurogénico ampliado, el proceso de replicación y autorregeneración de los precursores neurales, podría radicar mayoritariamente en su porción periventricular.

Como ya hemos comentado, la adquisición de capacidad migratoria por los precursores neurales fue valorada por la expresión de doblecortina (DCX). Hemos comprobado la presencia de un número significativo de células que coexpresan BrdU y DCX tanto en la ZSE como en la BDM y el Hilus, lo que sugiere que los precursores neurales en estas regiones sufren un proceso de migración continuo que permitiría la incorporación de precursores desde la ZSVp hacia el giro dentado. Esta migración parece tener lugar a través de una banda de tejido específico conocida como Banda migratoria Dentada (BDM) descrita por Parisot et al., 2017 de forma similar a la migración que ocurre en la banda migratoria rostral en la región subventricular del bulbo olfatorio o dentro de giro dentado entre la ZSG y la ZG (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Nicola et al., 2015).

Sin embargo, la valoración local de las células que coexpresan BrdU y DCX demuestra que la distribución regional no es homogénea, de forma que tomando como referencia la ZSVp (ZSE), se aprecia una disminución significativa en la DSM para sufrir luego un gran incremento en la zona del hilus. Estos datos indican que el proceso de migración podría no ser homogéneo presentando, paradójicamente, menos intensidad en la BMD.

En principio si los precursores neurales detectados en las distintas zonas fueran parte del mismo grupo celular, con una dinámica de diferenciación progresiva en dirección al hilus, deberíamos observar un incremento progresivo de células con capacidad migratoria. Estos datos podrían revelar la existencia de una migración parcial de los precursores DCX positivos desde la ZSVp hacia otros destinos diferentes del Hilus como se sugiere en trabajos previos (Cuccioli et al. 2015). O bien podrían ser reflejo de la existencia de nichos regionales independientes con diferente grado de actividad incluida la migratoria.

Los mecanismos implicados en los procesos de emigración de los precursores neurales cerebrales para alcanzar su destino final permanecen sin aclarar en la actualidad, no obstante, cabe destacar el trabajo de Sawamoto et al., 2006 quienes describieron en la ZSV el papel quimiotáctico de determinadas moléculas solubles del Fluido Cerebroespinal que mediante mecanismos de gradiente, juegan un papel clave en la

activación y guía de los precursores neurales hacia el bulbo olfatorio a través de la banda migratoria dorsal. Por otro lado, durante el desarrollo del hipocampo, se ha demostrado el papel que juegan las células de la guía radial con sus prolongaciones ápico-basales en la guía de los precursores neurales en sus distintas oleadas hacia el primordio del giro dentado ((Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Xu et al. 2015; Hatami et al. 2018) de forma similar a como ocurre en la formación de la corteza cerebral (Kaneko et al. 2010). Un estudio detallado de la presencia y disposición de la glía radial en estas regiones podría contribuir de forma fundamental en la aclaración de este mecanismo.

## NEUROGÉNESIS

La coexpresión de BrdU y  $\beta$ III tubulina en las zonas estudiadas, nos permite evaluar el comienzo del proceso de neurogénesis a partir de precursores neurales. Nuestros resultados muestran varios datos interesantes. En primer lugar, que existe neurogénesis temprana en las tres zonas estudiadas ZSE, BMD e Hilus y no solo en el Hilus como cabría esperar por ser la zona más cercana al giro dentado. Este hecho habla en favor de la existencia de poblaciones locales de precursores neurales con comportamiento independiente. En segundo lugar, hemos podido demostrar un incremento progresivo en el número de nuevas neuronas en dirección ventrículo- giro dentado sugiriendo que a pesar de que las tres regiones tienen capacidad neurogénica, podría existir un incremento de los estímulos que activan la neurogénesis según aumenta la proximidad al giro dentado. En relación con este dato, Una de las principales moléculas relacionadas con el proceso de activación de la neurogénesis en precursores neuronales en cerebro tanto embrionario como adulto es el Ácido Retinoico, que ha demostrado actuar por gradiente de concentración (Gato et al., 2005; Martin et al., 2009; Maia et al., 2011; Alonso et al., 2014; Stoney et al., 2016). En este sentido ha sido descrita la expresión del enzima retinaldehído deshidrogenasa tipo 2 (RALD2), necesario para la síntesis de Ácido Retinoico a partir de su precursor el Retinol, en las meninges situadas inmediatamente por debajo de la BMD (Fragoso et al., 2012), lo cual podría contribuir a la creación de un gradiente creciente de Ácido Retinoico en dirección al giro dentado. Finalmente, hemos cuantificado la cantidad de  $\beta$ III tubulina que expresan las neuronas jóvenes en su citoplasma, comprobando que existen diferencias notables en función de la zona estudiada y a pesar de que en las tres zonas es mayoritaria la

presencia de precursores con baja expresión de Tubulina, el número de precursores con alto nivel de expresión de tubulina se va incrementando porcentualmente al aproximarnos al Hilus. Este dato puede interpretarse como la existencia de una aceleración en el proceso de maduración neuronal concomitante con la emigración desde la ZSVp (ZSE) hacia el hilus que podría estar relacionado con el mecanismo anteriormente expuesto.

El hecho de que exista neurogénesis a partir de precursores neurales en la ZSVp o en la BMD, indica que al menos una parte de los precursores han comenzado el proceso de diferenciación neuronal, in situ, sugiriendo que en la proximidad del ventrículo existen estímulos neurogénicos probablemente derivados del CSF o de las meninges adyacentes a la BMD (McCaffery et al. 2006; Alonso et al. 2014). Estos datos dejan abierta la posibilidad de que se trate de un nicho polivalente, cuya capacidad neurogénica no está solamente relacionada con el giro dentado del hipocampo, pudiendo generar nuevas neuronas con otros destinos no conocidos al igual que ocurre en la zona subventricular donde las neuronas generadas, no sólo emigran por la banda migratoria rostral hacia el bulbo olfatorio, sino que también lo hacen a través del estriatum hacia áreas corticales como es el caso de las lesiones por isquemia (Liang et al 2019).

La coexpresión de BrdU y Calretinina indica la transformación de los precursores neurales en neuronas maduras, demuestra la capacidad del nicho para generar un proceso neurogénico completo capaz de concluir en una neuroregeneración. Nuestros resultados demuestran que este proceso de maduración neuronal tiene lugar de forma difusa y homogénea en todas las zonas estudiadas, sugiriendo que todas ellas forman parte de un nicho neurogénico único y amplio que permanece activo en el cerebro de roedores adultos perpetuando las capacidades desarrolladas durante la etapa embrionaria, fetal y postnatal temprana. No obstante, no podemos establecer cuál es el destino y significado funcional de estas nuevas neuronas, que pueden estar en consonancia con los trabajos de Clarke and Van Der Kooy, 2011; Sachewsky et al., 2014 y Yamada et al., 2015 y dejan abierto este campo a futuras investigaciones.

## RESPUESTA DEL NICHOS AL CSF EMBRIONARIO

El dato más destacable de nuestros resultados es la demostración de que el CSF embrionario es capaz de modificar el patrón de comportamiento del nicho asociado al giro dentado del hipocampo incluyendo la ZSVp (ZSE), la BMD y el Hilus. En todos los casos, el CSF embrionario ha demostrado ejercer un significativo incremento en la actividad del nicho que se traduce finalmente en un incremento de la neurogénesis. No obstante hemos detectado variaciones regionales significativas en las distintas etapas de activación de los precursores neurales de forma que la actividad de replicación de los precursores se incrementa de forma casi homogénea en las tres regiones estudiadas, el potencial migratorio se incrementa en mayor medida en la BMD y en el hilus, la neurogénesis temprana está significativamente elevada en la ZSVp (ZSE) y en la BMD (presentando además una mayor concentración de  $\beta$ III tubulina intracitoplásmica), finalmente, por el contrario, la maduración neuronal medida por la expresión de Calretinina, está significativamente más incrementada en el Hilus.

Un factor clave para demostrar la existencia de un modelo único de nicho celular, es demostrar su dependencia de los factores tróficos presentes en el CSF, como reflejo de su relación con el ventrículo lateral (revisión nuestra de 2020). Estudios previos han demostrado la influencia del CSF sobre el nicho de la ZSV (Zappaterra and Lehtinen 2012) y nuestro grupo ha demostrado recientemente la intensa respuesta neurogénica de este nicho frente al CSF de etapas embrionarias tempranas (Carnicero et al. 2013; Alonso et al. 2017). En consecuencia, una parte de nuestro estudio se ha orientado a comprobar si la supuesta extensión periventricular del nicho hipocámpal responde con activación de la neurogénesis al tratamiento con CSF embrionario.

Nuestros resultados demuestran que la presencia de CSF-E incrementa en más del 100% el número de precursores neurales indiferenciados con respecto a los controles. Este incremento se produce en las tres zonas estudiadas, sugiriendo intensamente que toda la población de precursores del hipocampo adulto, ajenos a los de la ZSG, tienen un origen periventricular y mantienen su capacidad de respuesta al CSF y es especialmente interesante que mantienen la capacidad de respuesta a un tipo de CSF, característico de las etapas tempranas del desarrollo. Este hecho está en consonancia con la teoría de que los precursores neurales cerebrales forman una estirpe celular única que evoluciona a lo largo de la vida del individuo evolucionando desde las células

neuroepiteliales del embrión hacia las células de la glía radial en el feto hasta los astrocitos modificados en el adulto (Lehtinen et al 2011)

La respuesta del nicho de células progenitoras del hipocampo adulto a la acción del CSF-E provoca un incremento de la proliferación, pero manteniendo el carácter indiferenciado de los precursores en un porcentaje alto, esto confirma las propiedades de este fluido como agente mitogénico implicado en los procesos de autorregeneración de los precursores neurales (Alonso et al 2018; Gato et al 2014 y 2020).

Respecto a los mecanismos por los que el CSF embrionario es capaz de regular esta influencia sobre los precursores neurales, podemos decir que este fluido embrionario tiene una compleja composición que varía sustancialmente desde el embrión hasta el adulto (Gato et al., 2004 y 2020; Zappaterra et al., 2007; Miyan et al 2020), en el que se han identificado factores mitogénicos como el FGF2 (Miyan et al., 2003; Chechneva et al., 2005; Martin et al., 2006; Lamus et al. 2020), o el IGF (Lehtinen et al., 2011; Ziegler et al., 2015) no obstante muchos factores tróficos del CSF embrionario permanecen sin identificar.

Nuestros resultados demuestran que, al tiempo que incrementan la replicación de los precursores neurales provocando una expansión de la población de estas células, activa la diferenciación, lo que conduce a un incremento de la neurogénesis (Lehtinen et al., 2011; Zappaterra and Lehtinen, 2012; Perez-Alcazar et al., 2016). Esta actividad neurogénica inducida por el CSF embrionario ha sido puesta en relación con el Ácido Retinoico (Parada et al., 2008; Alonso et al., 2011; Carnicero et al 2013; Chang et al. 2016), de forma que esta molécula está presente en el CSF embrionario y actuaría como un factor neurogénico de difusión en gradiente, al tiempo que la molécula precursora del Ácido Retinoico, el Retinol y la Retinol binding Protein responsable de la internalización del retinol en las células que expresan Retinaldehído deshidrogenasas, que son las responsables de la síntesis del Ácido Retinoico y que tienen una localización concreta en el istmo mesencéfalo rombencéfalo en el embrión y en las meninges que subyacen a la BMD en el adulto (Alonso et al 2014; Goodman et al. 2012). Estos datos sugieren que la producción local de un gradiente de Ácido Retinoico en el nicho del hipocampo adulto, podría ser un mecanismo clave en la regulación de la neurogénesis.



## CONCLUSIONES

1. En ratones adultos, existe una población de precursores neurales en el entorno del hipocampo, ajenos a la ZSG.
2. Estos precursores se localizan tanto en la ZSVp (ZSE) como en la BMD y en el hilus.
3. En las tres zonas descritas hemos detectado precursores indiferenciados, precursores con capacidad migratoria, y con actividad neurogénica.
4. El patrón de distribución deferencial de la expresión de los marcadores de maduración neuronal sugiere la persistencia de un proceso de emigración y maduración neurogénico desde las proximidades del ventrículo lateral hacia el Giro Dentado del Hipocampo, tal y como ocurre en el periodo embrionario.
5. Nuestros resultados sugieren la persistencia, en el adulto, de un nicho neurogénico amplio que incluye una región periventricular de autorrenovación de la población de precursores, una vía de emigración y una diferenciación y maduración neuronal en el giro dentado. Estos datos unificarían el concepto de nicho neurogénico cerebral en mamíferos adulto.
6. No podemos descartar que la zona periventricular del nicho contribuya a generar neuronas en otras localizaciones diferentes al giro dentado.
7. La actividad autorregenerativa y neurogénica del nicho responde a la influencia activadora del CSF embrionario.
8. Este estudio sugiere la posibilidad de activar la neurogénesis hipocampal en procesos degenerativos, empleando factores del CSF embrionario como herramienta terapéutica.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso MI, Martín 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.
2. Alonso MI, 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
3. Alonso MI, Gato A. Cerebrospinal fluid and neural stem cell niche control. *Neural Regeneration Research*. 2018; 13:1546-1547.
4. Alonso MI, Lamus F, Carnicero E, et al. Embryonic Cerebrospinal Fluid Increases Neurogenic Activity in the Brain Ventricular-Subventricular Zone of Adult Mice. *Front Neuroanat*. 2017; 11:124
5. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965 Jun; 124(3):319-35.
6. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 2004 Mar 4; 41(5):683-6. Review.
7. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Apr; 2(4):287-93.
8. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*. 2002 Feb 1; 22(3):629-34.
9. Benraiss A, Goldman SA. Cellular therapy and induced neuronal replacement for Huntington's disease. *Neurotherapeutics*. 2011 Oct; 8(4):577-90.
10. Benraiss A, Toner MJ, Xu Q, Bruel-Jungerman E, Rogers EH, Wang F, Economides AN, Davidson BL, Kageyama R, Nedergaard M, Goldman SA. Sustained

mobilization of endogenous neural progenitors delays disease progression in a transgenic model of Huntington's disease. *Cell Stem Cell*. 2013 Jun 6; 12(6):787-99.

11. Berg DA, Bond AM, Ming GL, Song H. Radial glial cells in the adult dentate gyrus: what are they and where do they come from?. *F1000Res*. 2018;7:277
12. Brown NA, Fabro S. Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. *Teratology*. 1981;24(1):65–78.
13. Brunne B, Zhao S, Derouiche A, et al. Origin, maturation, and astroglial transformation of secondary radial glial cells in the developing dentate gyrus. *Glia*. 2010;58(13):1553-1569
14. Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med*. 2013 May; 2(5):384-93.
15. Carnicero E, Alonso MI, Carretero R, Lamus F, Moro JA, de la Mano A, Fernández JM, Gato A. 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.
16. Chang JT, Lehtinen MK, Sive H. Zebrafish cerebrospinal fluid mediates cell survival through a retinoid signaling pathway. *Dev Neurobiol*. 2016;76(1):75-92
17. Cheffer A, Tárnok A, Ulrich H. Cell cycle regulation during neurogenesis in the embryonic and adult brain. *Stem Cell Rev*. 2013 Dec;9(6):794-805
18. Chechneva O, Dinkel K, Schrader D, Reymann KG. Identification and characterization of two neurogenic zones in interface organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience*. 2005;136(1):343–355
19. Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, Mahoney WM, Van Biber B, Cook SM, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem HP, Laflamme MA, Murry CE. Human embryonic-stem-cell-derived

- cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014 Jun 12; 510(7504):273-7.
20. Clarke L, van der Kooy D. The adult mouse dentate gyrus contains populations of committed progenitor cells that are distinct from subependymal zone neural stem cells. *Stem Cells*. 2011;29(9):1448–1458
  21. Cuccioli V, Bueno C, Belvindrah R, Lledo PM, Martinez S. Attractive action of FGF-signaling contributes to the postnatal developing hippocampus. *Hippocampus*. 2015;25(4):486–499
  22. Del Río J. A, Heimrich B, Borrell V, Förster E, Drakew A, Alcántara S, et al. A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 1997 385, 70–74
  23. Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. 1997 Jul 1; 17(13):5046-61.
  24. Dziegielewska KM, Knott GW, Saunders NR. The nature and composition of the internal environment of the developing brain. *Cell Mol Neurobiol*. 2000 Feb; 20(1):41-56.
  25. Eckenhoff MF, Rakic P. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *J Neurosci*. 1998 Aug; 8(8):2729-47.
  26. Encinas JM, Sierra A, Valcárcel-Martín R, Martín-Suárez S. A developmental perspective on adult hippocampal neurogenesis. *Int J Dev Neurosci*. 2013;31(7):640–645
  27. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998 Nov; 4(11):1313-7.

28. Falcao AM, Marques F, Novais A, Sousa N, Palha JA, Sousa JC. The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow! *Front Cell Neurosci.* 2012 Aug 9; 6:34.
29. Filareto A, Parker S, Darabi R, Borges L, Iacovino M, Schaaf T, Mayerhofer T, Chamberlain JS, Ervasti JM, McIvor RS, Kyba M, Perlingeiro RC. An ex vivo gene therapy approach to treat muscular dystrophy using inducible pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2013; 4:1549.
30. Fox IJ, Daley GQ, Goldman SA, Huard J, Kamp TJ, Trucco M. Stem cell therapy. Use of differentiated pluripotent stem cells as replacement therapy for treating disease. *Science.* 2014 Aug 22; 345(6199):1247391.
31. Fragoso YD, Shearer KD, Sementilli A, de Carvalho LV, McCaffery PJ. High expression of retinoic acid receptors and synthetic enzymes in the human hippocampus. *Brain Struct Funct.* 2012;217(2):473-483
32. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000 Feb 25; 287(5457):1433-8.
33. Gato A, Martín P, Alonso MI, Martín C, Pulgar MA, Moro JA. Analysis of cerebrospinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2004;301(4):280-289
34. Gato; A.; Moro; J.A.; Alonso; MI.; Bueno; D.; De La Mano; A. and Martín C. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation and neurogenesis in chick Embryos. *Anat. Rec.* 2005; 284(1), pp. 475 - 484.
35. Gato A, Desmond ME. Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histogenesis. *Dev Biol.* 2009 Mar 15; 327(2):263-72.
36. Gato A, Alonso MI, Martín C, et al. Embryonic cerebrospinal fluid in brain development: neural progenitor control. *Croat Med J.* 2014;55(4):299-305
37. Gato A, Alonso MI, Lamus F, Miyayama J. Neurogenesis: A process ontogenically linked to brain cavities and their content, CSF. *Semin Cell Dev Biol.* 2020; 102:21-27

38. Gilbert SF. *Formation of the Neural Tube*. *Developmental Biology* 6<sup>a</sup> ed. 2001.
39. Gilbert S.F. *Developmental Biology, (Eight Edition)* 2006. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
40. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy*. *Circ Res*. 2008 Nov 21; 103(11):1204-19.
41. Goodman T, Crandall JE, Nanescu SE, Quadro L, Shearer K, Ross A, McCaffery P. *Patterning of retinoic acid signaling and cell proliferation in the hippocampus*. *Hippocampus*. 2012; 22:2171-2183.
42. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. *Neurogenesis in the neocortex of adult primates*. *Science*. 1999 Oct 15; 286(5439):548-52.
43. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation*. *J Neurosci*. 1997 Apr 1; 17(7):2492-8.
44. Grove EA, Fukuchi-Shimogori T. *Generating the cerebral cortical area map*. *Annu Rev Neurosci*. 2003; 26:355-80
45. Guo W, Patzlaff NE, Jobe EM, Zhao X. *Isolation of multipotent neural stem or progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse*. *Nat Protoc*. 2012 Nov; 7(11):2005-12.
46. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, et al. *Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin*. *Science*. 2007 Dec 21; 318(5858):1920-3.
47. Hatami M, Conrad S, Naghsh P, Alvarez-Bolado G, Skutella T. *Cell-Biological Requirements for the Generation of Dentate Gyrus Granule Neurons*. *Front Cell Neurosci*. 2018 Nov 12;12:402

48. Hartfuss E, Galli R, Heins N, Götz M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol.* 2001 Jan 1; 229(1):15-30.
49. Hevner RF. Evolution of the mammalian dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 2016 Feb 15;524(3):578-94
50. Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, et al. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci.* 2008 Oct; 11(10):1153-61.
51. Johansson PA, Cappello S, Götz M. Stem cells niches during development--lessons from the cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol.* 2010 Aug; 20(4):400-7.
52. Johansson PA, Irmeler M, Acampora D, Beckers J, Simeone A, et al. The transcription factor *Otx2* regulates choroid plexus development and function. *Development.* 2013 Mar; 140(5):1055-66.
53. Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, et al. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron.* 2010; 67:213–223
54. Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science.* 1977 Sep 9; 197(4308):1092-4.
55. Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M, Umbach JA, Richter L, et al. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells.* 2009 Apr;27(4):806-11
56. Kazanis I, Lathia J, Moss L, French-Constant C. The neural stem cell microenvironment. 2008 Aug 31. *StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008.*
57. Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development.* 2003 Jan; 130(2):391-9.

58. Kintner C. Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *J Neurosci*. 2002 Feb 1; 22(3):639-43. PubMed PMID: 11826093.
59. Kørbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*. 2003 Aug 7; 349(6):570-82.
60. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. 2009; 32:149-84.
61. Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*. 2011 Nov 6; 480(7378):547-51.
62. Lamus F, Martin C, Carnicero E, Moro JA, Fernandez JMF, Mano A, Gato A, Alonso MI. FGF2/EGF contributes to brain neuroepithelial precursor proliferation and neurogenesis in rat embryos: the involvement of embryonic cerebrospinal fluid. *Developmental Dynamics*. 2020; 249:141-153.
63. Lehtinen MK, Walsh CA. Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011; 27:653-79.
64. Lehtinen MK, Bjornsson CS, Dymecki SM, Gilbertson RJ, Holtzman DM, Monuki ES. The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy. *J Neurosci*. 2013 Nov 6; 33(45):17553-9.
65. Lepore AC, O'Donnell J, Kim AS, Williams T, Tuteja A, et al. Human glial-restricted progenitor transplantation into cervical spinal cord of the SOD1 mouse model of ALS. *PLoS One*. 2011; 6(10):e25968.
66. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21:605-31
67. Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Moebius JM, Lützwow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK, Steinhoff G. Bcl-2 engineered

- MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells*. 2007 Aug; 25(8):2118-27.
68. Liang H, Zhao H, Gleichman A, et al. Region-specific and activity-dependent regulation of SVZ neurogenesis and recovery after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(27):13621-13630
69. Lindvall O. Dopaminergic neurons for Parkinson's therapy. *Nat Biotechnol*. 2012 Jan 9; 30(1):56-8.
70. Liu Y, Weick JP, Liu H, Krencik R, Zhang X, Ma L, Zhou GM, Ayala M, Zhang SC. Medial ganglionic eminence-like cells derived from human embryonic stem cells correct learning and memory deficits. *Nat Biotechnol*. 2013 May; 31(5):440-7.
71. Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Mar; 7(3):179-93.
72. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994 May 20; 264(5162):1145-8.
73. Luskin MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*. 1993 Jul; 11(1):173-89.
74. Maia J, Santos T, Aday S, et al. Controlling the neuronal differentiation of stem cells by the intracellular delivery of retinoic acid-loaded nanoparticles. *ACS Nano*. 2011;5(1):97-106
75. Malatesta P, Hartfuss E, Götz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*. 2000 Dec; 127(24):5253-63.
76. Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 24; 112(47):14452-9.

77. 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
78. 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
79. Mazurier C, Douay L, Lapillonne H. Red blood cells from induced pluripotent stem cells: hurdles and developments. *Curr Opin Hematol.* 2011 Jul;18(4):249-53
80. McCaffery P, Zhang J, Crandall JE. Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J Neurobiol.* 2006 Jun; 66(7):780-91.
81. Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Dec; 18(6):704-9.
82. Merkle FT, Tramontin AD, García-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.
83. Mironov V, Visconti RP, Markwald RR. What is regenerative medicine? Emergence of applied stem cell and developmental biology. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 Jun; 4(6):773-81.
84. Miyayama JA, Nabiyouni M, Zindah M. Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003 Apr; 81(4):317-28.
85. Miyayama J, Cains S, Larcombe S, et al. Subarachnoid cerebrospinal fluid is essential for normal development of the cerebral cortex. *Semin Cell Dev Biol.* 2020; 102:28-39.
86. Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H, Ochi K, Fujita K, Koike T, Harimoto K, Dohda T, Watanabe A, Okita K, Takahashi N, Sawaguchi A, Yamanaka S, Nakauchi H, Nishimura S, Eto K. Expandable megakaryocyte cell

lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014 Apr 3; 14(4):535-48.

87. Nicholas CR, Chen J, Tang Y, Southwell DG, Chalmers N, Vogt D, Arnold CM, Chen YJ, Stanley EG, Elefanty AG, Sasai Y, Alvarez-Buylla A, Rubenstein JL, Kriegstein AR. Functional maturation of hPSC-derived forebrain interneurons requires an extended timeline and mimics human neural development. *Cell Stem Cell*. 2013 May 2; 12(5):573-86.
88. Nicola Z, Fabel K, Kempermann G. Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Front Neuroanat*. 2015; 9:53
89. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*. 2001 Feb 8; 409(6821):714-20.
90. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2000 Oct 2; 425(4):479-94.
91. Parada C, Escolà-Gil JC, Bueno D. Low-density lipoproteins from embryonic cerebrospinal fluid are required for neural differentiation. *J Neurosci Res*. 2008;86(12):2674-2684
92. Parada C, Gato A, Aparicio M, Bueno D. Proteome analysis of chick embryonic cerebrospinal fluid. *Proteomics*. 2006 Jan;6(1):312-20
93. Parisot J, Flore G, Bertacchi M, Studer M. COUP-TFI mitotically regulates production and migration of dentate granule cells and modulates hippocampal *Cxcr4* expression. *Development*. 2017;144(11):2045-2058
94. Perez-Alcazar M, Culley G, Lyckenvik T, et al. Human Cerebrospinal Fluid Promotes Neuronal Viability and Activity of Hippocampal Neuronal Circuits In Vitro [published correction appears in *Front Cell Neurosci*. 2016 Oct 10;10 :227]. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:54

95. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992 Mar 27; 255(5052):1707-10.
96. Rideout WM 3rd, Hochedlinger K, Kyba M, Daley GQ, Jaenisch R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*. 2002 Apr 5; 109(1):17-27.
97. Rousseau GF, Giarratana MC, Douay L. Large-scale production of red blood cells from stem cells: what are the technical challenges ahead? *Biotechnol J*. 2014 Jan; 9(1):28-38.
98. Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med*. 2006 Nov; 12(11):1259-68. Epub 2006 Oct 22. Erratum in: *Nat Med*. 2007 Mar; 13(3):385.
99. Ryu JR, Hong CJ, Kim JY, Kim EK, Sun W, Yu SW. Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain. *Mol Brain*. 2016 Apr 21; 9:43.
100. Sachewsky N, Leeder R, Xu W, et al. Primitive neural stem cells in the adult mammalian brain give rise to GFAP-expressing neural stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014;2(6):810–824
101. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res*. 2013 Aug 30; 113(6):810-34.
102. Sawamoto, K; Wichterle, H; Gonzalez-Perez, O; Cholfin, JA; Yamada, M ; Spassky, N; Murcia, NS; Garcia-Verdugo, JM; Marin, O; Rubenstein, JLR; Tessier-Lavigne, M; Okano, H; Alvarez-Buylla, A. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*. Feb 3 2006; 311, 5761:629-632 DOI: 10.1126/science.1119133 Fecha de publicación:
103. Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, Babin MJ, Baetge EE, Bang AG, Bhoumik A, Cepa I, Cesario RM, Haakmeester C, Kadoya K, Kelly JR, Kerr J, Martinson LA,

McLean AB, Moorman MA, Payne JK, Richardson M, Ross KG, Sherrer ES, Song X, Wilson AZ, Brandon EP, Green CE, Kroon EJ, Kelly OG, D'Amour KA, Robins AJ. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2012; 7(5):e37004.

104. Seaberg RM, van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci*. 2002 Mar 1; 22(5):1784-93.
105. Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001 Sep 15; 21(18):7153-60.
106. Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 2004 Oct 25; 478(4):359-78. Erratum in: *J Comp Neurol*. 2004 Dec 20; 480(4):427.
107. Shetty AK, Hattiangady B. Grafted Subventricular Zone Neural Stem Cells Display Robust Engraftment and Similar Differentiation Properties and Form New Neurogenic Niches in the Young and Aged Hippocampus. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(9):1204–1215
108. Simpson D, Liu H, Fan TH, Nerem R, Dudley SC Jr. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem Cells*. 2007 Sep; 25(9):2350-7.
109. Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci*. 2002 May; 5(5):438-45.
110. Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci*. 2005 Jan 5; 25(1):10-8.

- 111.** Stern JH, Temple S. Stem cells for retinal replacement therapy. *Neurotherapeutics*. 2011 Oct; 8(4):736-43.
- 112.** Stolp HB, Molnár Z. Neurogenic niches in the brain: help and hindrance of the barrier systems. *Front Neurosci*. 2015 Feb 3; 9:20.
- 113.** Stolp HB. Neuropoietic cytokines in normal brain development and neurodevelopmental disorders. *Mol Cell Neurosci*. 2013 Mar; 53:63-8.
- 114.** Stoney PN, Fragoso YD, Saeed RB, et al. Expression of the retinoic acid catabolic enzyme CYP26B1 in the human brain to maintain signaling homeostasis. *Brain Struct Funct*. 2016;221(6):3315-3326.
- 115.** Stubbs D, DeProto J, Nie K, Englund C, Mahmud I, Hevner R, Molnár Z. Neurovascular congruence during cerebral cortical development. *Cereb Cortex*. 2009 Jul; 19 Suppl 1:i32-41.
- 116.** Sugiyama T, Osumi N, Katsuyama Y. A novel cell migratory zone in the developing hippocampal formation. *J Comp Neurol*. 2014;522(15):3520–3538
- 117.** Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30; 131(5):861-72.
- 118.** Tamamaki N, Nakamura K, Okamoto K, Kaneko T. Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci Res*. 2001 Sep; 41(1):51-60.
- 119.** Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6; 282(5391):1145-7. Erratum in: *Science* 1998 Dec 4; 282(5395):1827.
- 120.** Thurairajah K, Broadhead ML, Balogh ZJ. Trauma and Stem Cells: Biology and Potential Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 7; 18(3). pii: E577.

- 121.** Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex*. 2003 Jun; 13(6):580-7.
- 122.** Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*. 2015 Jul 2; 17(1):11-22.
- 123.** Urban N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles [published correction appears in *Front Cell Neurosci*. 2015;9:160]. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:396
- 124.** Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, Milwid J, Kobayashi N, Tilles A, Berthiaume F, Hertl M, Nahmias Y, Yarmush ML, Uygun K. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*. 2010 Jul; 16(7):814-20.
- 125.** Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002:369-91.
- 126.** von Bohlen und Halbach O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 2011 Jul; 345(1):1-19.
- 127.** Vukovic J, Blackmore DG, Jhaveri D, Bartlett PF. Activation of neural precursors in the adult neurogenic niches. *Neurochem Int*. 2011 Sep; 59(3):341-6.
- 128.** Windrem MS, Schanz SJ, Guo M, Tian GF, Washco V, Stanwood N, Rasband M, Roy NS, Nedergaard M, Havton LA, Wang S, Goldman SA. Neonatal chimerization with human glial progenitor cells can both remyelinate and rescue the otherwise lethally hypomyelinated shiverer mouse. *Cell Stem Cell*. 2008 Jun 5; 2(6):553-65.
- 129.** Xiong Q, Ye L, Zhang P, Lepley M, Tian J, Li J, Zhang L, Swingen C, Vaughan JT, Kaufman DS, Zhang J. Functional consequences of human induced pluripotent stem cell therapy: myocardial ATP turnover rate in the in vivo swine heart with postinfarction remodeling. *Circulation*. 2013 Mar 5; 127(9):997-1008.

- 130.** Xu L, Tang X, Wang Y, Xu H, Fan X. Radial glia, the keystone of the development of the hippocampal dentate gyrus. *Mol Neurobiol.* 2015;51(1):131-141.
- 131.** Yamada M, Clark J, McClelland C, Capaldo E, Ray A, Iulianella A. Cux2 activity defines a subpopulation of perinatal neurogenic progenitors in the hippocampus. *Hippocampus.* 2015;25(2):253-267
- 132.** Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007 Jun 7; 1(1):39-49.
- 133.** Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto T, Thomas SS, Waeber C, Bakowska JC, Breakefield XO, Moskowitz MA. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 May 8; 98(10):5874-9.
- 134.** 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
- 135.** Zappaterra M, Lehtinen MK. The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Sep;69(17):2863-78
- 136.** Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008 Feb 22; 132(4):645-60.
- 137.** Ziegler AN, Levison SW, Wood TL. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. *Nat Rev Endocrinol.* 2015; 11(3):161-170





---

**Universidad de Valladolid**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN  
EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**TESIS DOCTORAL:**

**TÍTULO**

---

INFLUENCIA DEL E-CSF EN LA APORTACIÓN DE  
PRECURSORES NEURALES DE LA ZONA  
SUBPENDIMARIA AL GIRO DENTADO DEL  
HIPOCAMPO EN EL RATÓN ADULTO

Presentada por **Miguel Madrigal Fernández**  
para optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Ángel Gato Casado

Dra. M<sup>a</sup> Isabel Alonso Revuelta

Dr. Pedro Martín Villamor