

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía y Radiología. Área de
Anatomía y Embriología Humanas

TESIS DOCTORAL EFECTO NEUROTRÓFICO *IN VIVO* DEL FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO DURANTE EL DESARROLLO DE LA MÉDULA ESPINAL Y EN CÉLULAS MESENQUIMALES Y AMNIÓTICAS

Presentada por

María Esther Valsero Herguedas

para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Valladolid

Dirigida por

José Antonio Moro Balbás

Aníbal de la Mano Bonin

ÍNDICE	i
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
RELACIÓN DE ILUSTRACIONES	viii
INDICE DE ABREVIATURAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
1. FORMACIÓN DEL SNC.....	3
1.1. Derivados de la hoja germinativa ectodérmica.....	3
1.2. Formación del tubo neural.....	5
1.2.1. Neurulación primaria	7
1.2.2. Neurulación secundaria.....	10
1.3. Diferenciación del tubo neural.....	11
1.4. Arquitectura tisular del SNC.....	15
2. FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO	17
2.1. Composición	17
2.2. Regulación del CSF	23
2.3. Papel del CSF en el adulto	25
3. FACTORES DE CRECIMIENTO.....	28
3.1. Factor de Crecimiento Fibroblástico 2 (FGF-2).....	28
3.2. Insulin-like Growth Factor (IGF)	30
3.3. Ácido retinoico (AR)	31
3.4. OSC-Espondina	32
3.5. Citoquinas.....	33
3.5.1. Factor inhibidor de la leucemia (LIF)	33
3.5.2. Otras citoquinas de la familia LIF	34
3.5.3. Interleuquina 1-beta (IL-1 β)	34
3.6. Sonic Hedgehog (Shh)	36
3.7. Neurotrofinas	38
3.7.1. Factor de crecimiento nervioso (Nerve growth factor, NGF).....	38
3.7.2. Otras neurotrofinas.....	38

3.8.	Factor de Crecimiento Transformante β (Transforming Growth Factor β , TGF- β).....	39
3.9.	Apolipoproteínas.....	40
4.	DESARROLLO DE LA MÉDULA ESPINAL.....	41
4.1.	Organización dorso-ventral.....	41
4.1.1.	Organización ventral.....	43
4.1.2.	Organización dorsal.....	43
4.2.	Diferenciación histológica.....	44
4.3.	Células de la cresta neural.....	45
5.	DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS NO NERVIOSAS.....	46
6.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	50
7.	OBJETIVOS.....	51
MATERIAL Y MÉTODOS		52
8.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	53
8.1.	Obtención de embriones de pollo.....	53
8.2.	Extracción de E-CSF.....	54
9.	EFFECTO “IN VIVO” DEL E-CSF SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN MÉDULA.....	55
9.1.	Grupos experimentales.....	55
9.2.	Técnica de implantación de microesferas.....	55
9.3.	Estudio de la proliferación celular.....	59
9.4.	Estudio de la diferenciación neuroepitelial.....	66
9.5.	Número de embriones utilizados.....	68
10.	EFFECTO “IN VIVO” DEL E-CSF SOBRE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CÉLULAS DE ESTIRPE NO NEUROEPITELIAL.....	68
10.1.	Estudio de la diferenciación neuronal en mesénquima.....	69
10.2.	Estudio “in vivo” de la diferenciación neuronal en membrana amniótica.....	72
RESULTADOS		76
11.	EFFECTO “IN VIVO” DEL E-CSF SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN MÉDULA A NIVEL DEL ESBOZO DEL ALA.....	77
11.1.	Efecto del E-CSF sobre la proliferación celular en médula.....	77
11.2.	Efecto del E-CSF sobre la diferenciación neuronal en médula.....	84
12.	EFFECTO “IN VIVO” DEL E-CSF SOBRE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CÉLULAS DE ESTIRPE NO NEUROEPITELIAL.....	86

12.1.	Estudio de la diferenciación neuronal en mesénquima	86
12.2.	Estudio “in vivo” de la diferenciación neuronal en membrana amniótica	88
DISCUSIÓN	93
14.1.	Potencial de diferenciación neuronal del mesénquima.....	102
14.1.1.	Células madre mesenquimales.....	102
14.1.2.	Diferenciación neuronal de células mesenquimales embrionarias inducida in vivo por ácido retinoico y FGF-2.....	104
14.1.3.	Diferenciación neuronal de células mesenquimales inducida “in vivo” por E-CSF.....	106
14.2.	Potencial de diferenciación neuronal de las células amnióticas.....	108
14.2.1.	Células madre amnióticas	108
14.2.2.	Diferenciación neuronal de células epiteliales amnióticas inducida “in vivo” por ácido retinoico y FGF-2	109
14.2.3.	Diferenciación neuronal de células epiteliales amnióticas inducida “in vivo” por E-CSF.....	111
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFÍA	114

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi gratitud a mis Directores, al Doctor José Antonio Moro Balbás y al Doctor Aníbal de la Mano Bonin por enseñarme el trabajo de la investigación básica, por el que he cogido el gusto, por su infinita paciencia, apoyo constante y sus enseñanzas. Sin ellos, este trabajo habría sido imposible.

Al Dr. Ángel Gato Casado por sus ánimos constantes y su contribución a esta tesis y a la Dra. M^a Isabel Alonso Revuelta por su colaboración.

Al personal del laboratorio, por su trabajo y ayuda incondicional.

A mi marido Miguel y a mis hijos, Rubén y Miriam, por su paciencia y apoyo moral.

RESUMEN

Introducción: Durante el desarrollo los componentes más prevalentes del fluido cerebroespinal (CSF) son proteínas, y esta fracción proteica es más completa y de más alta concentración en el embrión que en el adulto y se ha demostrado su función como regulador del comportamiento neuroepitelial a nivel mesencefálico, tanto en embriones de pollo como de rata. El CSF juega un papel importante en el desarrollo del SNC en los estadios embrionarios tempranos, tanto para la expansión de las cavidades cerebrales como para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células madres neuroectodérmicas.

Las células precursoras (CP) o también llamadas células madre, se caracterizan por su capacidad de autorreplicación, así como por su capacidad para generar células diferenciadas. Diversos agentes, como los factores de crecimiento y ciertas citoquinas, pueden actuar directamente sobre las CP e inducir su diferenciación hacia un linaje celular.

Nuestros objetivos son comprobar el efecto "in vivo" del fluido cerebroespinal embrionario (E-CSF) sobre la proliferación y diferenciación de los neuroblastos de la médula espinal en desarrollo, y si el E-CSF y otros factores neurogénicos conocidos, como son el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2) y el ácido retinoico, son capaces de inducir la diferenciación a neuronas en poblaciones celulares no nerviosas pluripotenciales, tales como el mesénquima y el amnios.

Material y métodos: Para el estudio del efecto del E-CSF en la proliferación y diferenciación celular en médula se utilizaron embriones de pollo en estadio 19-20HH y se establecieron los siguientes grupos: I) controles a los que no se realiza ningún tipo de manipulación; II) controles a los que se implanta una microesfera impregnada con solución Ringer; II) embriones a los que se implanta una microesfera impregnada de E-CSF.

Posteriormente se reincubaron durante 24 horas. Para el estudio de la proliferación celular se determinó la incorporación de Bromodeoxiuridina

(BrdU) en los núcleos de los neuroblastos medulares en la zona de implantación de la microesfera. Posteriormente, estos datos se analizaron mediante el test de significatividad estadística ANOVA de un factor. El estudio de la diferenciación neuronal se realizó mediante la determinación inmunohistoquímica de β_3 -Tubulina.

Para conocer el efecto del E-CSF sobre la diferenciación neuronal en células no nerviosas se utilizaron dos grupos celulares: en el mesénquima y en la membrana amniótica. En el grupo del mesénquima se utilizaron embriones en estadio 18HH y se establecieron los siguientes grupos: I) controles a los que no se realiza ningún tipo de manipulación; II) controles a los que se implanta una microesfera impregnada con solución Ringer; III) embriones a los que se implanta una microesfera impregnada de E-CSF; IV) embriones a los que se implanta una esfera impregnada de 10ng/ml de FGF-2 + ácido retinoico 0,1 mM. Se reincubaron durante 24-48 horas y posteriormente se estudió el grado de diferenciación neuronal mediante la determinación inmunohistoquímica de β_3 -Tubulina. Para el grupo del amnios, se implantaron en la membrana amniótica (MA) de embriones de pollo en estadios 19-20HH piezas pequeñas de papel filtro Milipore de 0,22 μ m de diámetro de poro, previamente impregnadas con E-CSF o con una solución de 10ng/ml de FGF-2 + ácido retinoico 0,1 mM y, para el grupo control se utilizó una solución de PBS. Los embriones fueron recultivados durante períodos de 48 y 72 horas. Las MA fueron extraídas y se valoró en ellas el grado de diferenciación neuronal mediante la determinación inmunocitoquímica de β_3 -tubulina y de nestina.

Resultados: En los experimentos realizados en médula espinal no existieron diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular entre los controles, a los que se implantó una microesfera impregnada con solución de Ringer, y los controles sin manipular. Sin embargo, la exposición a la microesfera impregnada en CSF sí produjo un incremento estadísticamente significativo del número de células que incorporan BrdU en ambos cuadrantes dorsales.

En cuanto a la diferenciación neuronal, se apreció un incremento del inmunomarcaje frente a β 3-tubulina a nivel de la placa basal de los embriones expuestos a E-CSF, en el lado que está en contacto con la microesfera, que no existió en los controles.

Se observó, en el estudio de la diferenciación neuronal en células mesenquimales, la presencia de inmunomarcaje frente a β 3-tubulina en el grupo experimental, siendo más intenso en el grupo con E-CSF que en el grupo con la microesfera impregnada en FGF-2 y ácido retinoico.

Las membranas amnióticas tratadas con FGF-2 + ácido retinoico mostraron inmunomarcaje positivo a β 3-tubulina y nestina en todos los casos, al igual que las tratadas con E-CSF pero, con este último, la intensidad del marcate fue mayor. También se observó que el inmunomarcaje fue más intenso después de 3 días de incubación que tras 24 horas, tanto en los grupos tratados con FGF-2 + ácido retinoico como en los tratados con E-CSF.

Conclusiones: El E-CSF produce un aumento estadísticamente significativo de la proliferación celular a nivel de las células neurales de la médula espinal en la placa alar, sin que tenga efecto sobre la placa basal, y favorece la diferenciación neuronal.

El E-CSF provoca diferenciación neuronal sobre las células mesenquimales embrionarias y sobre las células amnióticas *in vivo*.

El ácido retinoico y el FGF-2 conjuntamente tienen una acción neurogénica sobre las células mesenquimales embrionarias y sobre las células epiteliales amnióticas *in vivo*.

RELACIÓN DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

Figura 1: Corte transversal de la región craneal de la línea primitiva que muestra la invaginación de las células epiblasticas.	3
Figura 2: Principales derivados de la capa germinativa ectodérmica.....	6
Figura 3: Inducción de la placa y crestas neurales.	7
Figura 4: Formación del tubo neural.....	8
Figura 5: Formación del tubo neural (Neurulación primaria).....	10
Figura 6: Diagrama de las vesículas cerebrales y algunos de sus derivados en el adulto.....	13
Figura 7: Esquema de una sección transversal de la región del cerebro medio que explica la interdependencia de las interacciones de la presión hidrostática creada por el CSF-E y los factores de crecimiento sobre el comportamiento del neuroepitelio..	17
Figura 8: Sección sagital del mesencéfalo de un embrión de pollo en estadio 23-24HH.....	23
Figura 9: Médula espinal.....	44
Figura 10: Técnica de extracción del E-CSF: inserción de la micropipeta en la cavidad mencefálica de un embrión de pollo del estadio 25HH.....	54
Figura 11: Manipulación de embriones <i>in ovo</i>	57
Figura 12: Técnica de implantación de microesferas <i>in ovo</i>	58
Figura 13: Técnica de microinyección de bromodeoxiuridina (BrdU) <i>in ovo</i>	60
Figura 14: División en cuadrantes del tubo nervioso.....	65

Figura 15: Implantación de microesferas en mesénquima.....	70
Figura 16: Implantación de microesferas en mesénquima.....	71
Figura 17: Implantación de papel filtro Milipore de 0,22 μm de diámetro de poro en la membrana amniótica de un embrión de pollo en estadio 19HH.....	73
Figura 18: Implantación de microesferas, estudio morfológico	79
Figura 19: Estudio morfológico de la proliferación celular en médula	80
Figura 20: Estudio de la proliferación celular en médula.	81
Figura 21: Inmunomarcaje con β 3-tubulina para comprobar diferenciación neuronal a nivel de la placa basal de la médula espinal	85
Figura 22: Inmunomarcaje con β 3-tubulina para comprobar diferenciación neuronal en mesénquima.....	87
Figura 23: Inmunomarcaje con β 3-tubulina en células amnióticas de embrión de pollo tras 48 horas de incubación para comprobar diferenciación neuronal en amnios	90
Figura 24: Inmunomarcaje con β 3-tubulina en células amnióticas de embrión de pollo tras 72 horas de incubación para comprobar diferenciación neuronal en amnios	91
Figura 25: Inmunomarcaje con nestina en células amnióticas de embrión de pollo tras 72 horas de incubación para comprobar diferenciación neuronal en amnios	92

TABLAS

Tabla 1: Factores de crecimiento presentes en el CSF embrionario (Modificada de Mauro et al., 2012) 19

Tabla 2: Clasificación de las proteínas identificadas en el E-CSF de pollo (HH24) según sus características funcionales y estructurales. (Tomado de Parada et al., 2006) 21

Tabla 3: Factores de crecimiento presentes en el CSF del cerebro dañado (Modificada de Mauro et al., 2012)..... 27

Tabla 4: Plantilla de recuento de núcleos BrdU-positivos 65

Tabla 5: Número de embriones utilizados 68

Tabla 6: Número de embriones utilizados 72

Tabla 7: Número de embriones utilizados 75

GRÁFICOS

Gráfico 1: Análisis cuantitativo de síntesis de ADN mediante contabilización de núcleos BrdU positivos a nivel de la médula espinal.....83

INDICE DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosin Monofosfato cíclico
APP	Proteína precursora amiloide beta A4
AR	Ácido Retinoico
BDNF	Factor neurotrófico derivado cerebral
BMP	Proteína Morfogenética Ósea
BMSC	Bone Marrow Stromal Cell
BO₃ H₃	Ácido Bórico
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Seroalbúmina bovina
Ca²⁺	Ión calcio
CD	Cluster of differentiation
CEA	Célula epitelial amniótica
Cl₂ Ca	Cloruro cálcico
Cl Na	Cloruro sódico
Cl K	Cloruro potásico
CNS	Sistema Nervioso Central
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
CMA	Célula mesenquimal amniótica
CSF	Fluido Cerebroespinal
CP	Célula Precursora
CPM	Célula Precursora Multipotencial

CSPG	Condroitin sulfato proteoglicano
DAB	Diaminobencidina
DG	Giro Dentado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
E-CSF	Fluido cerebroespinal embrionario
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas/ Enzyme Linked InmunoSorbent Assay
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGFa, -1, α	Factor de crecimiento fibroblástico ácido, -1, α
FGFb,-2, β	Factor de crecimiento fibroblástico básico,-2 ó β
FGF8	Factor de crecimiento fibroblástico 8
FGFs	Factores de crecimiento fibroblásticos
GDF3	Factor de crecimiento diferenciador 3
GDF8	Factor de crecimiento diferenciador 8
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
H Cl	Ácido clorhídrico
HEL	Hen egg Lisozyme
HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos
HH	Hamburger and Hamilton
HLA	Antígeno leucocitario humano
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-2	Insulin-like growth factor 2

IGFBPs	Proteínas integradoras de IGF /IGF binding proteins
IGFR1,-2	Receptores de membrana para IGF 1,-2
IL-6	Interleuquina 6
IL-1β	Interleuquina 1 β
Ig G	Inmunoglobulina G
IsO	Istmo-mesencéfalo-rombencéfalo
LIF	Leukemia inhibitory factor
N₂	Nitrógeno
Na⁺	Ión sodio
Na OH	Hidróxido de sodio
NGF	Factor de crecimiento neural
NO	Óxido nitroso
NT-3,-4,-5	Neurotrofina-3,-4,-5
MA	Membrana amniótica
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MS	Espectrometría de masas
MSCs	Mesenchymal Stem cells
Oct-4	Octamer-binding Protein-4
OSC	Órgano subcomisural
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa/ Polymerase Chain Reaction
PEDF	Factor derivado del pigmento epitelial
PSI	Libras por pulgada cuadrada
RALDH2	Enzima retinaldehido deshidrogenasa 2

RBP	Proteína de internalización del retinol
Rex-1	RNA exonuclease homologue 1
RFGF-1,-2,-4	Receptores del factor de crecimiento epidérmico-1,-2,-4
sAPP	Proteína precursora amiloide soluble
SCO	Órgano subcomisural
SCF	Stem Cell Factor
Shh	Sonic hedgehog
SNC	Sistema Nervioso Central
SMO	Receptor Smoothened
SSEA-4	Stage Specific Embryonic Antigen 4
SVZ	Zona subventricular
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
Wnts	Wingless-type MMTV integration site family

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. FORMACIÓN DEL SNC

- 1.1. Derivados de la hoja germinativa ectodérmica
- 1.2. Formación del tubo neural
 - 1.2.1. Neurulación primaria
 - 1.2.2. Neurulación secundaria
- 1.3. Diferenciación del tubo neural
- 1.4. Arquitectura tisular del SNC

2. FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO

- 2.1. Composición
- 2.2. Regulación del CSF
- 2.3. Papel del CSF en el adulto

3. FACTORES DE CRECIMIENTO

- 4.1. Factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2)
- 4.2. Insulin-like growth factor (IGF)
- 4.3. Ácido retinoico (AR)
- 4.4. OSC-Espondina
- 4.5. Citoquinas
 - 4.5.1. Leukemia inhibitory factor (LIF)
 - 4.5.2. Otras citoquinas de la familia LIF
 - 4.5.3. Interleuquina 1 β

- 4.6. Sonic hedgehod
- 4.7. Neurotrofinas
 - 4.7.1. Factor de crecimiento neural (Nerve growth factor, NGF)
 - 4.7.2. Otras neurotrofinas
- 4.8. Factor de crecimiento transformante β (Transforming growth factor β , TGF β)
- 4.9. Apolipoproteínas

4. DESARROLLO DE LA MÉDULA ESPINAL

- 4.1. Organización dorso-ventral
 - 4.1.1. Organización ventral
 - 4.1.2. Organización dorsal
- 4.2. Diferenciación histológica
- 4.3. Células de la cresta neural

5. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS NO NERVIOSAS

6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

7. OBJETIVOS

1. FORMACIÓN DEL SNC

1.1. Derivados de la hoja germinativa ectodérmica

El procedimiento mediante el cual se establecen en el embrión las tres capas germinativas (ectodermo, mesodermo y endodermo) se denomina *gastrulación*. La gastrulación comienza con la formación de la *línea primitiva* en la superficie del epiblasto. Poco a poco, esta línea se va definiendo hasta formar un surco angosto limitado hacia los lados por zonas más salientes. El extremo cefálico de esta línea, el *nódulo primitivo*, es una formación ligeramente elevada alrededor de una fosita primitiva.

Las células del epiblasto migran hacia la línea primitiva. Cuando alcanzan la región de la línea adquieren forma de matraz, se desprenden del epitelio y se deslizan debajo de éste, movimiento llamado *invaginación*. Algunas de estas células que se han invaginado se desplazan hacia el hipoblasto, dando lugar al *endodermo* embrionario, mientras que otras se ubican entre el epiblasto y el endodermo para constituir el *mesodermo*. Las células que quedan en el epiblasto forman el *ectodermo* (Figura 1).

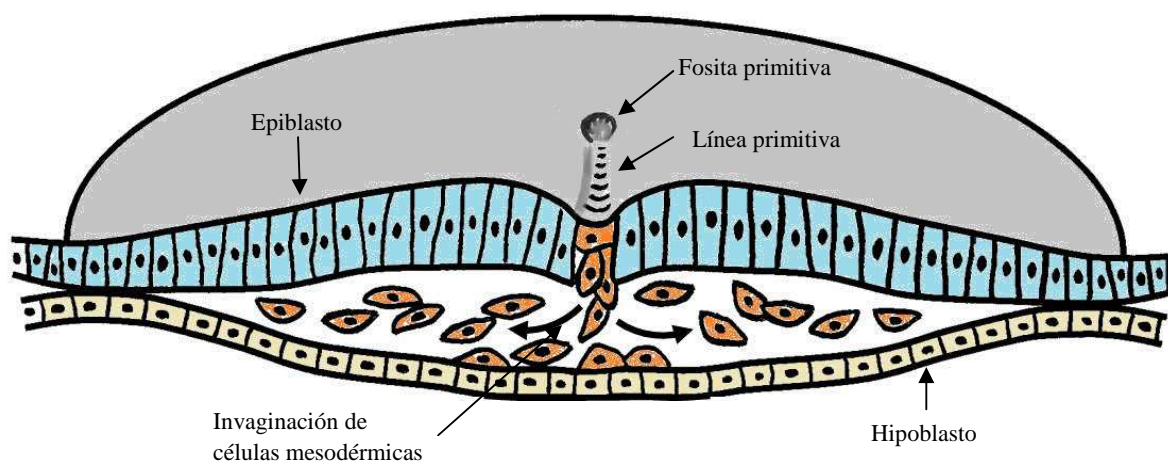


Figura 1: Corte transversal de la región craneal de la línea primitiva que muestra la invaginación de las células epiblasticas. Las primeras células que se movilizan hacia dentro se desplazan al hipoblasto para formar el endodermo definitivo. Posteriormente, algunas células del epiblasto se movilizan hacia dentro formando el mesodermo. Las células que quedan en el epiblasto forman el ectodermo. (Fte.: elaboración propia, a partir de Langman: *Embriología médica con orientación clínica*, 2002. 8ª ed.)

Las células prenotocordales que se invaginan en la fosita primitiva emigran directamente en dirección cefálica hasta llegar a la placa precordal. Estas células prenotocordales se intercalan en el hipoblasto de forma que, durante un breve período de tiempo, la línea media del embrión está formada por dos capas celulares que constituyen la *placa notocordal*. A medida que el hipoblasto es reemplazado por células endodérmicas que se desplazan hacia la línea primitiva, las células de la placa notocordal proliferan y se desprenden del endodermo, formando un cordón macizo denominado *notocorda definitiva*.

El proceso del desarrollo neural se divide en siete pasos fundamentales (Jessell y Sanes., 2000):

1. Inducción de la placa neural.
2. Regionalización del tubo neural a través de los ejes dorsoventral y anteroposterior.
3. Generación de neuronas y glía desde precursores multipotenciales.
4. Migración de neuronas.
5. Orientación de axones hacia sus órganos-diana.
6. Formación de sinapsis.

1.2. Formación del tubo neural

El proceso por el que el embrión forma el *tubo neural*, el rudimento del SNC del que se derivan el encéfalo y la médula espinal, se denomina *neurulación*. Durante este proceso, el embrión es llamado *néurula*. Dentro de la neurulación se distinguen dos procesos:

- Neurulación primaria: Las células que rodean a la placa neural inducen a las células de la propia placa a proliferar, invaginarse y separarse de la superficie para formar un tubo hueco. La porción anterior del tubo se produce por neurulación primaria. Este proceso es similar en anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Gallera., 1971) y divide al ectodermo original en tres grupos de células: el tubo neural, la epidermis y las células de la cresta neural (Figura 2).
- Neurulación secundaria: De esta forma se forma la parte posterior del tubo. En este caso, el tubo neural se origina a partir de la unión de las células mesenquimales para formar un cordón sólido que posteriormente se ahueca para crear un tubo. En aves, todo el tubo neural caudal al par de somites 28 (es decir, caudal a las extremidades inferiores) se genera por neurulación secundaria (Pasteels, 1937; Catala et al., 1995). En mamíferos, la neurulación secundaria afecta al extremo posterior de la médula espinal (Schoenwolf y Desmond., 1984a, b; Nievelstein et al., 1993).

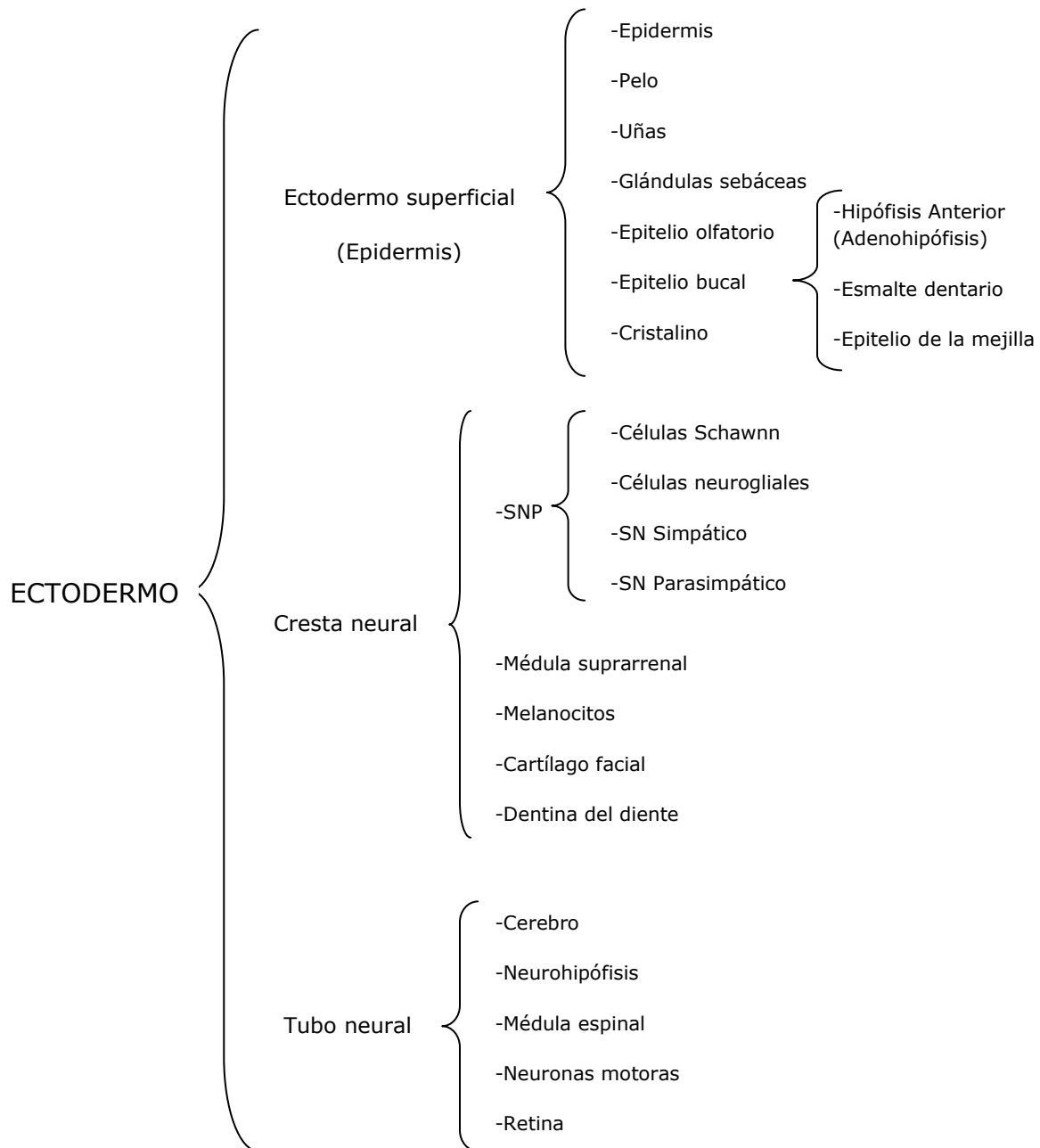


Figura 2: Principales derivados de la capa germinativa ectodérmica. El ectodermo es dividido en tres dominios principales: el *ectodermo superficial* (epidermis primaria), la *cresta neural* (neuronas periféricas, células pigmentarias y cartílago facial) y el *tubo neural* (cerebro y médula espinal).

1.2.1. Neurulación primaria

El proceso comienza cuando la notocorda en desarrollo y el mesodermo adyacente estimulan al ectodermo que está encima de ellos. Sin la presencia de algunas señales extrínsecas, las células del ectodermo sufrirían una transformación neural "por defecto", pero la señalización continua ejercida por las *Proteínas Morfogénéticas Óseas* (BMP) hacia las células ectodérmicas impide normalmente esta diferenciación neural. Previamente a la gastrulación, la señalización por el *Factor de Crecimiento Fibroblástico-8* (FGF8) promueve la diferenciación neural al reprimir la expresión de los genes BMP desde futuras regiones neurales del ectodermo. Durante la gastrulación, antagonistas de las proteínas con actividad BMP como *Noggin*, *Cordina* y *Folistatina* son secretadas por el nodo y aseguran la progresión hacia la diferenciación neural (Weinstein., 1999; Harland., 2000) (Figura 3).

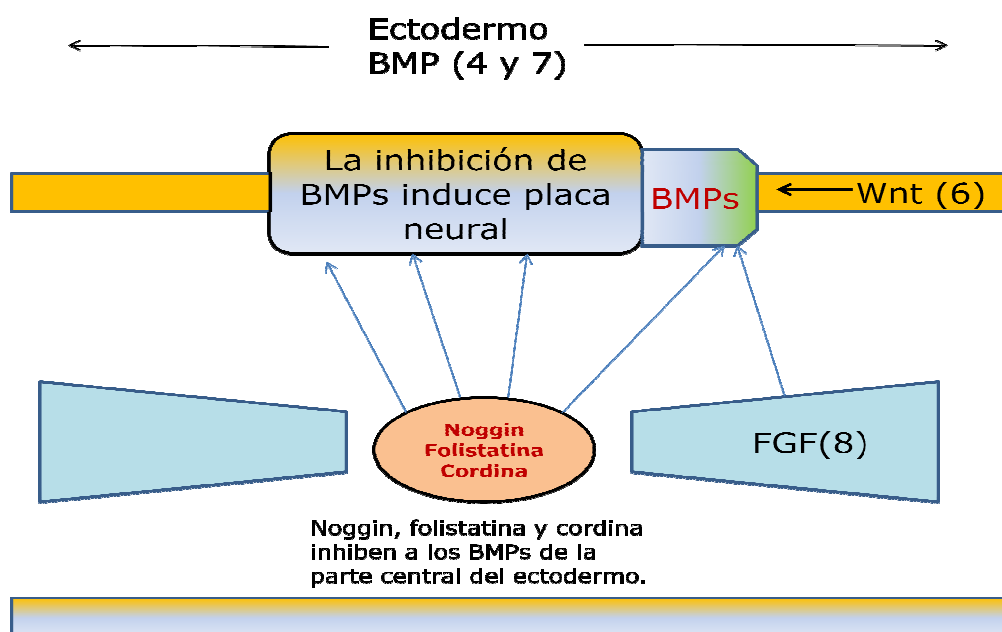


Figura 3: Inducción de la placa y crestas neurales. El ectodermo expresa desde fases muy precoces proteínas de la familia BMP (4 y 7). La notocorda produce tres proteínas inductoras de placa neural, *noggin*, *folistatina* y *cordina*, que inhiben a los BMP de la parte central del ectodermo. Este bloqueo de BMP hace que el ectodermo suprayacente a la notocorda se transforme en placa neural (las células de la placa neural se especifican o comprometen para su transformación en tejido neural). Las células ectodérmicas situadas en los bordes de la placa neural, que siguen expresando BMP (al estar más alejadas de la notocorda la BMP no ha podido ser bloqueado por los inductores neurales, *noggin*, *folistatina* y *cordina*) bajo la acción de *Wnt(6)* (*Winless* e *Int*) procedente del ectodermo lateral y de *FGF(8)* producido posiblemente por el mesodermo paraxial subyacente, se transforman en células de la cresta neural.

Este complejo proceso de inducción notocordal hace que el tejido ectodérmico (neuroectoblasto) se engrose formando la *placa neural*, situada en la región dorsal media por delante de la fosita primitiva. Poco después, sus bordes laterales se elevan y forman los *pliegues neurales* (Figura 4), apareciendo como consecuencia un surco con forma de U en el centro de la placa, denominado *surco neural*.

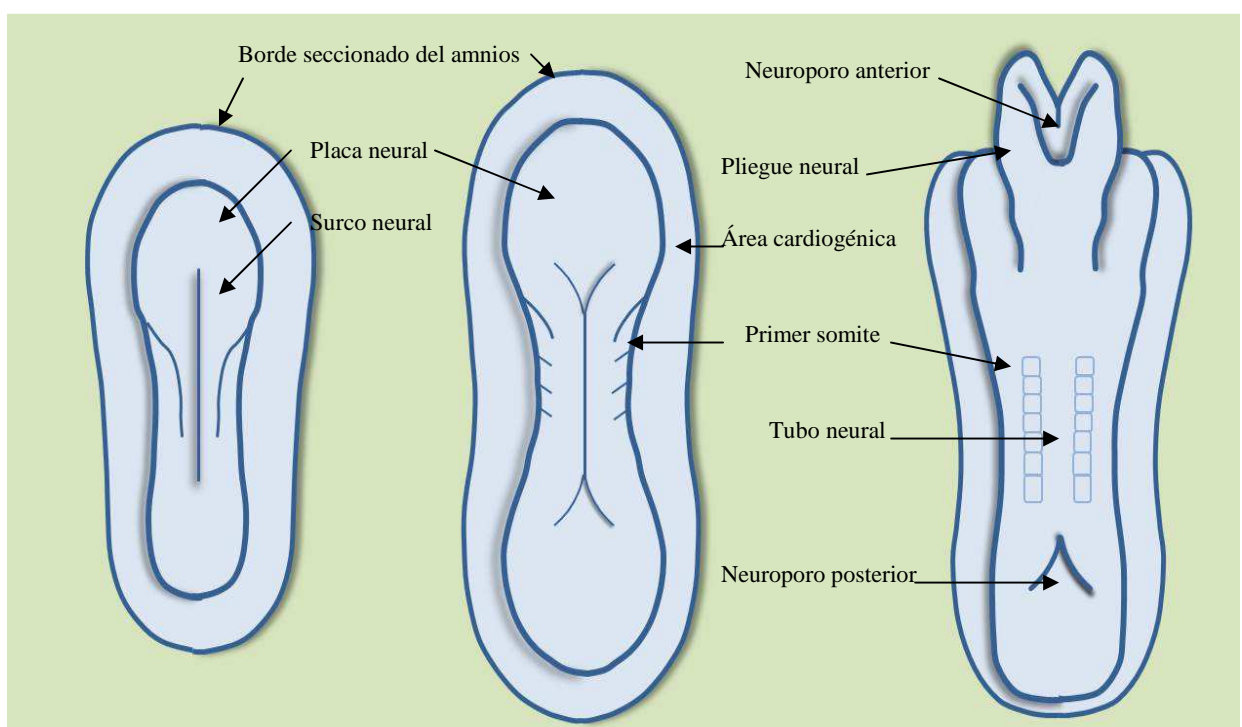


Figura 4: Formación del tubo neural. (Fte.: elaboración propia, a partir de Langman: *Embriología médica con orientación clínica*. 2002. 8ª ed.)

La formación del tubo neural se produce al elevarse aún más los pliegues neurales, su acercamiento a la línea media y su posterior fusión. De la parte interna de los pliegues neurales se desprenden células que se ubican a cada lado del tubo constituyendo las *crestas neurales*. La fusión de los pliegues neurales se produce primero en la región cervical y se extiende en dirección cefálica y caudal; en los extremos del tubo se retarda la fusión, quedando los *neuroporos craneal y caudal* que comunican la luz del tubo neural con la cavidad amniótica.

La pared del tubo neural, inmediatamente después de cerrarse, está formada por células neuroepiteliales que se extienden por todo el espesor de la pared y forman un grueso epitelio pseudoestratificado. Estas células están conectadas entre sí por complejos de unión que se encuentran en la luz. Durante el periodo de surco neural o inmediatamente después de cerrarse el tubo, estas células se dividen y aumentan su número rápidamente; constituyen, en conjunto, la capa neuroepitelial o *neuroepitelio*.

La neurulación primaria, en resumen, puede dividirse en cuatro estadios diferentes pero solapados de manera espacial y temporal (Smith y Schoenwolf., 1997; Colas y Schoenwolf., 2001). (Figura 5).

1. Formación de la placa neural.
2. Modelado de la placa neural.
3. Flexión de la placa neural para formar el surco neural.
4. Cierre del surco neural para formar el tubo neural.

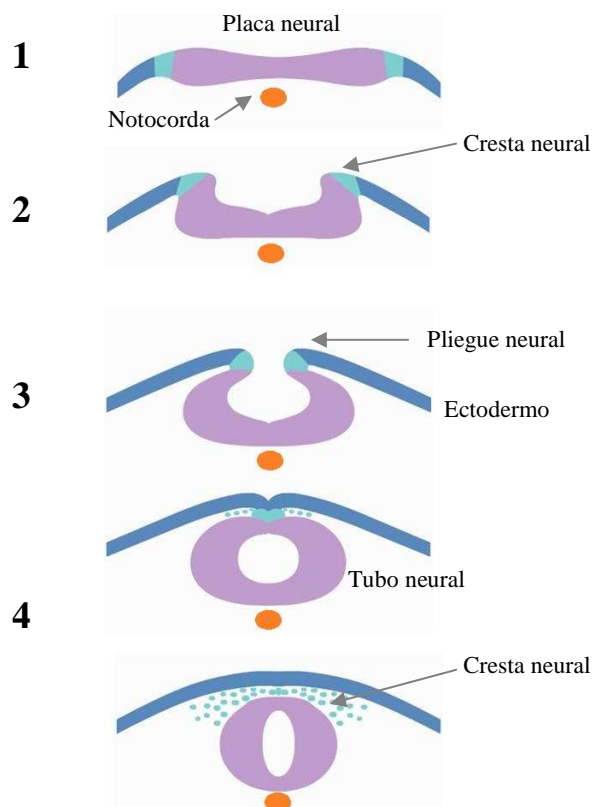


Figura 5: Formación del tubo neural (Neurulación primaria). (Fte.: elaboración propia)

1.2.2. Neurulación secundaria

La neurulación secundaria implica la condensación de las células mesenquimales para formar un cordón medular profundamente al ectodermo superficial, y el posterior ahuecamiento de este cordón que lo transforma en tubo neural.

El proceso es diferente entre especies. En anfibios y aves se produce con frecuencia a nivel de las vértebras lumbares (abdominales) y de la cola, y en ambos casos puede considerarse como una continuación de la gastrulación. En las ranas, las células del labio dorsal del blastoporo, en lugar de crecer hacia el embrión, continúan creciendo ventralmente; la región en crecimiento en la punta del labio se denomina *bisagra cordoneural* (Pasteels., 1937), y contiene precursores de la porción más posterior de la placa neural y de la notocorda; la punta de la cola es el descendiente directo del labio dorsal del blastoporo, y las células que revisten a éste

forman el *canal neuroentérico*; la parte proximal de este canal se fusiona con el ano, mientras que la porción distal se convierte en el canal endimario (la cavidad del tubo neural) (Gont et al., 1993).

1.3. Diferenciación del tubo neural

La diferenciación del tubo neural se produce simultáneamente a tres niveles:

1. Nivel anatómico: el tubo neural y su cavidad sobresalen y se estrechan formando las cámaras del cerebro y de la médula espinal.
2. Nivel tisular: las poblaciones celulares dentro de la pared del tubo neural se reorganizan para formar las diferentes regiones funcionales del cerebro y de la médula espinal. Las células del tubo neural adquieren su identidad regional gracias a la posición que ocupan a lo largo de los dos principales ejes, dorsoventral y anteroposterior. De este modelo se deduce que la posición de las células define sus identidades a través de la exposición a ciertos factores de señalización, limitados regionalmente y que operan sobre los dos ejes neurales. Algunos de los factores propuestos para establecer el patrón regional son (Jessell y Sanes., 2000; Lumsden y Krumlauf., 1996; Lee y Jessell., 1999; Rubenstein y Beachi., 1998):

- Eje dorsoventral: el patrón ventral es impuesto por la notocorda y el patrón dorsal es inducido por la epidermis. Así, en la médula espinal, la región dorsal es el lugar donde las neuronas espinales reciben aferencias de las neuronas sensoriales, y la región ventral es donde residen las neuronas motoras. La especificación de este eje dorso-ventral se debe inicialmente a dos factores paracrinos principales: la proteína Sonic Hedgehog (Shh), originada en la notocorda; y las proteínas del grupo del Factor de Crecimiento Transformante-beta (TGF- β), procedentes del ectodermo dorsal.

- Eje anteroposterior: grupos de células neurales especializadas se organizan a lo largo del eje anteroposterior del tubo neural (p.ej., la zona limitante intratalámica o el istmo), y generan diferentes factores que establecen la identidad regional y el destino neuronal en sus dominios adyacentes del tubo neural. Por ejemplo, las células del istmo secretan FGFs y Wnts, ambos necesarios para la diferenciación y modelaje del mesencéfalo y rombencéfalo.

3. Nivel celular: las células neuroepiteliales se diferencian a numerosos tipos de células nerviosas, conductoras (neuronas) y de sostén (glía).

En la porción más anterior del tubo neural aparecen tres dilataciones denominadas *vesículas primarias*: el cerebro anterior (*prosencefalo*), el cerebro medio (*mesencefalo*) y el cerebro posterior (*rombencefalo*). A su vez, estas vesículas se subdividen en otras: el prosencefalo se subdivide en el *telencefalo* (porción anterior, que formará finalmente los hemisferios cerebrales) y el *diencefalo* (porción caudal, que dará lugar a las regiones talámica e hipotalámica); el mesencefalo no se subdivide y su cavidad se convierte en el *acueducto cerebral*; y el rombencefalo se subdivide en el *metencefalo* (anterior, que da origen al cerebelo y al puente o protuberancia) y en el *mielencefalo* (posterior, que forma el bulbo raquídeo) (Figura 6).

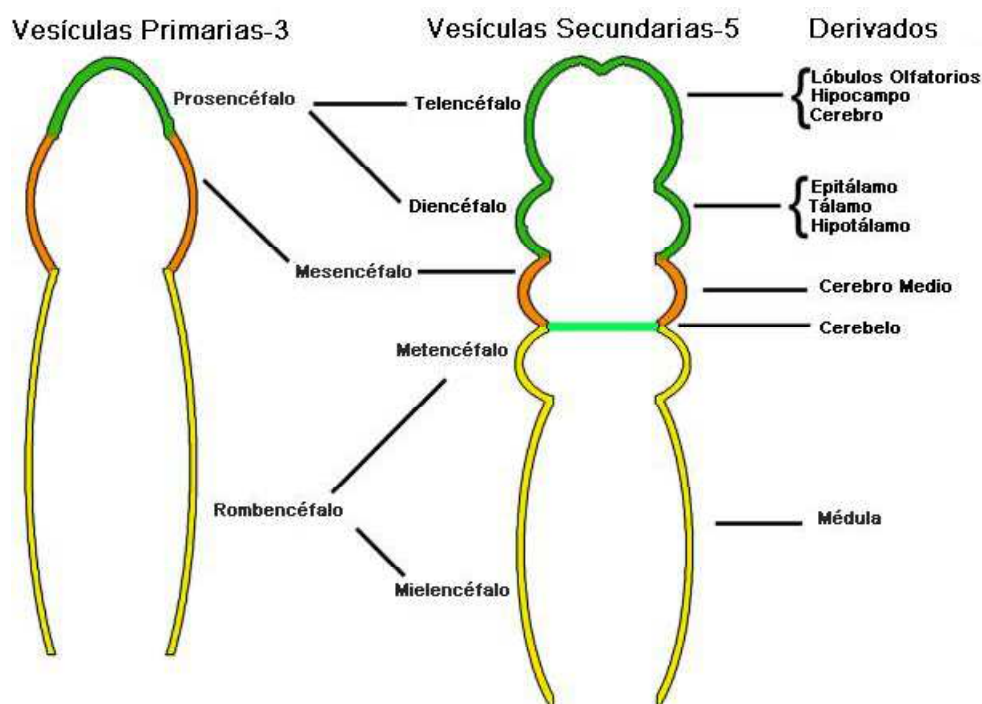


Figura 6: Diagrama de las vesículas cerebrales y algunos de sus derivados en el adulto. (Modificado de Gato y Desmond, 2009).

En el crecimiento de las vesículas cerebrales intervienen dos factores interdependientes: la presión hidrostática ejercida por el CSF y la proliferación celular regulada por factores de crecimiento.

1. Presión hidrostática ejercida por el CSF: en el proceso de dilatación del cerebro son destacables su velocidad y su extensión, y es el resultado de un aumento en el tamaño de la cavidad. El proceso expansivo es diferente en función de la especie, y también varía entre las diferentes vesículas cerebrales (mesencéfalo en aves y telencéfalo en mamíferos), lo que sugiere relaciones filogenéticas y ontogénicas en el proceso (Desmond y O'Rahilly., 1981; De Paz., 1999; Levitan y Desmond., 2009). En el embrión de pollo, el volumen del cerebro aumenta 30 veces entre los días 3 y 5 de desarrollo, probablemente a causa de la presión positiva ejercida por el fluido cerebroespinal (CSF) contra las paredes del tubo neural. Esta presión no se reduce a través de la médula espinal, ya que el tubo neural está cerrado transitoriamente entre ésta y el cerebro primitivo por el

empuje de los tejidos dorsales a los pliegues neurales en esa zona (Schoenwolf y Desmond., 1984a; Desmond y Schoenwolf., 1986; Desmond y Field., 1992). En embriones de pollo, este cierre transitorio se sitúa en una región a nivel del corazón; comienza en el estadio 11 HH y termina en el estadio 14HH (Hamburger and Hamilton., 1951; Schoenwolf y Desmond., 1986), coincidiendo con la finalización de la neurulación (Desmond y Field.,1992), y sería por tanto la oclusión de esta zona lo que permitiría la expansión cerebral (Levitan y Desmond., 2009). A pesar de que esta obstrucción temporal sólo está demostrada experimentalmente en pollo, ha sido descrita desde el punto de vista morfológico en humano, rata, ratón y salamandra (Freeman., 1972; Desmond., 1982; Desmond y Schoenwolf., 1985, 1986; Schoenwolf y Desmond., 1984a, 1984b, 1986; Desmond y Field., 1992). La oclusión requiere de mensajeros secundarios como el Ca^{2+} , calmodulina, AMPc y n-cadherinas (Gato y Desmond., 2009; Desmond et al., 1993; Schoenwolf y Desmond., 1984a; LaConti et al., 2004). La presión positiva en la cavidad se consigue por varios mecanismos: a) por difusión pasiva de agua hacia las vesículas gracias a la presión hidrostática ejercida por la presión sanguínea; b) por difusión pasiva de agua a través de los canales de agua o aquaporinas (Parvas y Bueno., 2010); c) a través del transporte activo de Na^+ hacia las vesículas vía bomba Na^+-K^+ (ATPasa); d) a través del transporte o secreción de proteínas y de proteoglicanos hacia las vesículas. Estos dos últimos mecanismos podrian trabajar conjuntamente para crear un gradiente osmótico, como veremos más adelante. Los proteoglicanos tienen una alta carga negativa por su gran contenido en radicales COO^- y SO_3^- , haciendo que se retengan altas cantidades de iones positivos (Gato y Desmond., 2009). Si se extirpa experimentalmente la posición anterior del tubo neural, la presión de líquido disminuye y consecuentemente el cerebro de pollo aumenta de volumen en un grado menor y contiene muchas menos células que las que se encuentran en los embriones normales.

Por tanto, el CSF juega un papel importante tanto en la coordinación de la expansión cerebral como en la proliferación celular del epitelio (Gato et al., 1993; Alonso et al., 1998, 1999, 2000; Gato et al., 2005; Gato y Desmond., 2009).

2. Proliferación celular: la proliferación celular del neuroepitelio está regulada también por los factores de crecimiento contenidos y transportados por el CSF, que comentaremos más adelante.

1.4. Arquitectura tisular del SNC

En las células de un epitelio pseudoestratificado como es el neuroepitelio, los núcleos migran a lo largo del eje apical-basal dentro del citoplasma durante el ciclo celular, en el proceso denominado *migración nuclear intercinética*: el núcleo se encuentra a nivel basal, hacia la superficie externa del tubo neural, en la fase de síntesis de DNA (fase S); migra hacia el lado apical durante la fase de control (G2); y la mitosis se produce apicalmente, cerca de la superficie luminal de la célula. Aunque la razón de esta migración nuclear es desconocida, señales específicas restringidas en la región apical de la célula podrían regular sucesos intranucleares durante la mitosis (Woods and Bryant., 1993).

El óxido nítrico (NO) ayuda a la progresión del ciclo celular, de forma que altos niveles de NO promueven la entrada a la fase S en la base celular mientras que bajos niveles de NO facilita la entrada a mitosis apicalmente (Traister et al., 2002).

Las células-madre neuroepiteliales tienen las propiedades de autorrenovación y multipotencialidad (neurogénesis y gliogénesis). Parece ser que la división simétrica de las células-madre da lugar a nuevas células-madre, mientras que una división asimétrica da lugar a la diferenciación hacia neurona o hacia célula glial. Sin embargo, los mecanismos que regulan estas vías aún no están bien explicados. Estudios con *Drosophila*

han identificado un conjunto de genes neurogénicos, cuya pérdida da lugar a la generación de un exceso de neuronas a expensas de las células de soporte; por ejemplo, está demostrado que la vía de señalización *Notch* está altamente conservada y ejerce un importante papel en el control de la neurogénesis en los vertebrados: la activación de la señalización vía *Notch* dirige a las células hacia un destino no neural, y su inhibición promueve la diferenciación neuronal (Jessell y Sanes., 2000; Lu et al., 2000; Hassan y Bellen., 2000; Marnellos et al., 2000).

Durante el primer período embriogénico, las células neuroepiteliales se dividen simétricamente produciendo dos células idénticas. Más tarde, estas células sufren una nueva serie de divisiones asimétricas que generan cada vez una célula madre neuroepitelial y un neuroblasto, iniciándose así la neurogénesis (Götz y Huttner., 2005; Caviness et al., 2003). Al final del periodo embriogénico, la capa neuroepitelial comienza a producir glioblastos y se inicia la gliogénesis; más adelante, estos glioblastos se diferenciarán en distintos tipos de células gliales, entre ellas astrocitos y oligodendrocitos, proporcionando a las neuronas del SNC sostén metabólico y estructural.

Tanto las células neuroepiteliales como las células gliales son capaces de autorrenovarse y de generar neuronas, progenitores intermedios (progenitores basales) y glía. Asimismo, ambos tipos celulares están caracterizados por una polaridad apico-basal, presentar el citado proceso de migración nuclear intercinética y ser positivas a nestina y prominin-1 (Götz y Huttner., 2005).

En los mamíferos adultos existen áreas que conservan células con capacidad de autorrenovación y de diferenciación a líneas neurales: la capa subependimaria de la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo (Alvarez-Buylla y Lim., 2004; Ming y Song., 2011).

2. FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO

2.1. Composición

Tanto el neuroepitelio como los ventrículos cerebrales contribuyen al crecimiento cerebral, pero por diferentes mecanismos: el neuroepitelio crece primariamente por proliferación celular, mientras que los ventrículos se expanden debido a la presión hidrostática creada por el fluido cerebroespinal contenido en su interior. Esto demuestra que tanto el tejido como los ventrículos trabajan cooperando en el periodo embrionario para el crecimiento cerebral como una unidad funcional (Gato y Desmond., 2009).

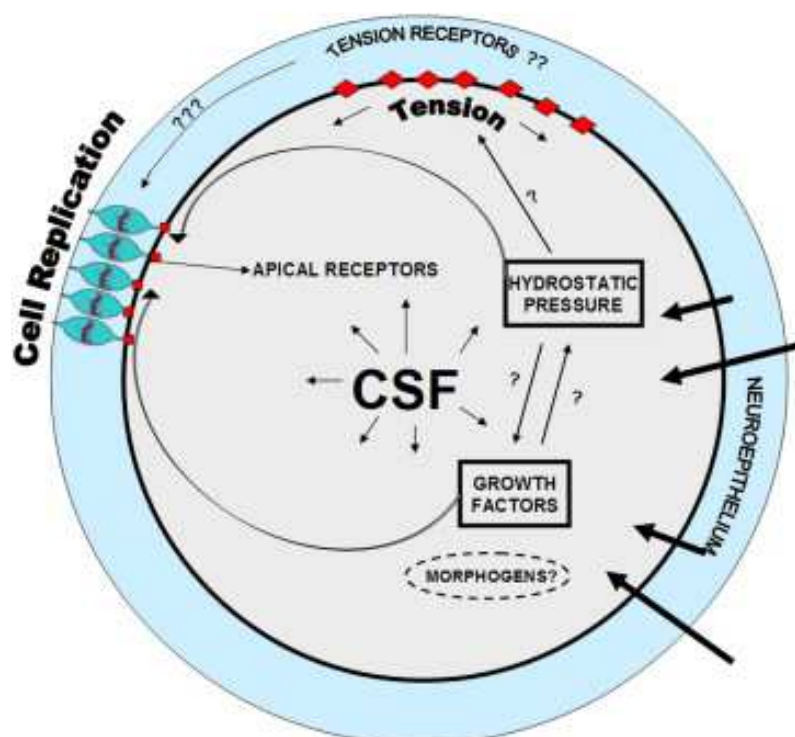


Figura 7: Esquema de una sección transversal de la región del cerebro medio que explica la interdependencia de las interacciones de la presión hidrostática creada por el CSF-E y los factores de crecimiento sobre el comportamiento del neuroepitelio. El fluido atraviesa el neuroepitelio a través de un gradiente osmótico (flechas grandes a la derecha). El CSF-E genera la expansión de la superficie luminal (flechas radiales). Los factores de crecimiento probablemente estimulan la mitosis de las células neuroepiteliales a través de receptores apicales (cajas rojas). También puede haber una influencia mutua entre factores de crecimiento y presión hidrostática. La presión hidrostática genera tensión en la superficie interna del neuroepitelio, estimulando la actividad mitótica a través de receptores de tensión como las quinasas de adhesión focal (FAKs), en la superficie o dentro de las células neuroepiteliales. (Imagen tomada de Gato y Desmond, 2009).

Estudios realizados en las últimas décadas también han demostrado que la presión hidrostática creada por el CSF no sólo favorece la expansión cerebral, sino que además es capaz de regular aspectos del entorno neuroepitelial ejerciendo una influencia trófica en sus células, promoviendo la neurogénesis, la supervivencia celular y aumentando la actividad mitótica y cierta expresión génica (Gato et al., 2005). El neuroepitelio, a través de una secreción autocrina y/o paracrina de distintos factores tróficos, también ejerce por sí mismo un papel en la replicación celular.

Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que durante el desarrollo los componentes más prevalentes del CSF son proteínas, y que esta fracción proteica es más compleja y de mayor concentración en el embrión que en el adulto, lo que hace que muchos autores sugieran que el CSF está envuelto en la regulación del entorno de las células neuroepiteliales, actuando directamente en la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células neuroepiteliales (Martín, 1999).

Aunque el 99% de la composición del CSF es agua, también es rico en una variedad de proteínas, iones, lípidos, hormonas, colesterol, glucosa y otras moléculas y metabolitos (Mauro et al., 2012) (Tabla 1).

Tabla 1: Factores de crecimiento presentes en el CSF embrionario (Modificada de Mauro et al., 2012)

Factor de crecimiento	Método de detección	Especies	Referencias
Proteína precursora amiloide beta A4(APP)	Espectrometría de masa (MS)	Rata. Humano.	Zappaterra et al. 2007
Proteína morfogenética ósea (BMPs)	Luciferase assay	Rata	Lehtinen et al. 2011
Factor de crecimiento fibroblástico 2(FGF2)	Western blot	Pollo	Martin et al.2006
Factor de crecimiento diferenciador 3(GDF3)	MS	Rata	Lehtinen et al. 2011
Factor de crecimiento diferenciador 8(GDF8)	MS	Rata	Lehtinen et al. 2011
Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)	ELISA/Western blot	Ratón. Rata	Lehtinen et al. 2011 Salehi et al. 2009
Insulin-like growth factor-2 (IGF-2)	ELISA/Western blot	Ratón. Rata	Lehtinen et al. 2011
Factor inhibidor de leucemia (LIF)	ELISA	Ratón	Hatta et al.2006
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	ELISA/Western blot	Pollo	Mashayekhi et al. 2009
Factor derivado del pigmento epitelial (PEDF)	MS	Humano	Zapatero et al. 2007
Acido retinoico	HPLC-MS, cell based assay	Pollo, rata	Lehtinen et al. 2011 Parada et al.2008
Sonic hedgehog (Shh)	ELISA	Ratón	Huang et al. 2010
Wingless-type MMTV integration site family (Wnts)	Cell based assay	Rata	Lehtinen et al. 2011
Otros: <ul style="list-style-type: none"> • OCS- espondina • IL-6. IL-1β • Factor de crecimiento transformante β (TGFβ) 	ELISA/Western blot ELISA/Western blot ELISA	Pollo Pollo Pollo	Vera et al.2013 De la mano. García-Campany y Martí.2007

El CSF del embrión de pollo entre los estadios 18 y 30-HH tiene una mayor concentración de proteínas que en el adulto, que aumenta constantemente durante este periodo para después disminuir en el período fetal (Gato et al., 2004). Como ya se ha comentado, el CSF desempeña un importante papel en el desarrollo del SNC durante los estadios embrionarios tempranos, tanto para la expansión de las cavidades cerebrales como para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células-madre neuroectodérmicas, y por esta razón es importante caracterizar e identificar las proteínas que componen el CSF.

El proteoma del E-CSF muestra similitudes con el CSF humano adulto y contiene proteínas envueltas en procesos degenerativos o que sirven de marcadores de los mismos (Puchades et al., 2003; Johnson et al., 1992). Las proteínas identificadas se pueden clasificar en ocho grupos de acuerdo a sus características funcionales o estructurales (Parada et al., 2006) Tabla 2.

Diversos autores han demostrado que el descenso de la presión del CSF causa severa dismorfogénesis y colapso cerebral (Miyan et al., 2003; Desmond et al., 1977; Jelinek et al., 1970). Sugieren que la expansión normal se debe a la presencia de una matriz extracelular dentro de las cavidades cefálicas que contienen moléculas con actividad osmótica como son los proteoglicanos sulfatados (Martín, 1999); por tanto, las alteraciones en las concentraciones de estos proteoglicanos (condroitín-sulfato intraluminal, ácido hialurónico) producen cambios en el crecimiento cerebral del esbozo cefálico, como ocurre en el modelo de embrión de pollo, en el que aparecen severas alteraciones que afectan principalmente al cerebro anterior y medio (Alonso et al., 1999, 2000).

Así pues, el proteoma del E-CSF muestra la presencia tanto de moléculas descritas en la matriz extracelular (Grupo 1) que pueden estar envueltas en el crecimiento cerebral del esbozo cefálico, como de moléculas implicadas en el control de la presión osmótica (Grupo 2) que pueden ser también responsables de la fuerza expansiva ejercida por este fluido.

Tabla 2: Clasificación de las proteínas identificadas en el E-CSF de pollo (HH24) según sus características funcionales y estructurales. (Tomado de Parada et al., 2006)

Grupo 1: Proteínas de la matriz extracelular	Grupo 2: Proteínas de presión osmótica y transportadoras de metales	Grupo 3: Proteínas relacionadas con la quiescencia y muerte celular	Grupo 4: Apolipoproteínas
<p>Proteoglicanos, Colágeno, Colágeno alfa 1 (III) precursor de cadena, Colágeno alfa 1 (V) precursor de cadena, Fibrinógeno beta precursor de cadena, Gelatinasa A, Agrin-related protein 1, N-Cadherin.</p>	<p>Hemoglobina (α-D y π'), Ovotransferrina.</p>	<p>Precursor de cistatina (en huevo blanco), Quiescence-specific protein precursor.</p>	<p>Apolipoproteína A-I, Apolipoproteína A-IV.</p>
Grupo 5: Retinol y transportadoras de vitamina D	Grupo 6: Antioxidantes y proteínas antimicrobianas	Grupo 7: Proteínas intracelulares	Grupo 8: Proteínas desconocidas
<p>Plasma retinol binding protein, Transtiretina, Vitamin-D binding protein precursor.</p>	<p>Ovoalbúmina, Precursora de la Vitellogenina I, Hen egg Lysozyme (HEL).</p>	<p>β-actina.</p>	<p>AGENAE Gallus gallus multitissue standardized library, CSEQCHN04 Gallus gallus cDNA clone ChEST44n15, Chicken activated T cell cDNA Gallus gallus cDNA clone pat.pk0017.f7 5' similar a la proteína de la capa externa de la membrana vitelina. Pnl-b.pk0001.b9 hígado de pollo cDNA library Gallus allus cDNA clone pnl-b.pk0001.b9, producto proteico sin nombre.</p>

Como ya se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que el E-CSF ejerce un papel trófico sobre el neuroectodermo *in vitro* que contribuye a la neurogénesis y colabora con el istmo organizador en el establecimiento de modelos apropiados de expresión génica (Gato et al., 2005). Respecto a esto, el proteoma del E-CSF muestra la presencia de moléculas implicadas en la quiescencia y muerte celular (Grupo 3), relacionadas con la activación MAP-Kinasa, una familia de proteínas implicadas en cascadas de transducción de señales como las apolipoproteínas (Grupo 4), que pueden ayudar a regular el crecimiento y modelaje del SNC, y moléculas implicadas en la proliferación celular, diferenciación y morfogénesis (Grupo 5), que pueden ayudar a regular la neurogénesis y la morfogénesis del esbozo cefálico.

También se han identificado algunas proteínas con propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Grupo 6) que pueden contribuir a la generación de un entorno propio para la acción del resto de los productos génicos; y proteínas intracelulares (Grupo 7), que también están presentes en el CSF del humano adulto (Sánchez et al., 1995; Davidsson et al., 2001).

Respecto a la procedencia de las proteínas del CSF, éstas tienen tres diferentes orígenes:

1. Transporte desde una fuente externa a través del neuroepitelio (Martin et al., 2006; 2009).
2. Síntesis ubicua y secreción apical desde las células neuroepiteliales (Gato et al., 1993).
3. Síntesis y secreción apical desde una población celular específica, como en el órgano subcomisural (SCO), situado en el techo del tercer ventrículo, u otros órganos circunventriculares.

2.2. Regulación del CSF

Como ya se ha comentado anteriormente, la expansión cerebral es debida, entre otros factores, a la presión hidrostática ejercida por el CSF, y esta presión no se disipa por la médula espinal ya que el tubo neural está cerrado de forma transitoria hasta el final de la neurulación. Por tanto, se hace necesario conocer cómo se acumula el fluido dentro de los ventrículos y, consecuentemente, cómo se genera la presión del CSF.

Gato et al. (1993) demostraron que la ósmosis es el mecanismo responsable de la acumulación del fluido dentro de los ventrículos. Proponen que los componentes osmóticos entran en los ventrículos por dos posibles mecanismos: desde el exterior, atravesando el neuroepitelio; o directamente secretados a los ventrículos por las células neuroepiteliales siguiendo un gradiente osmótico, que implica el paso de agua hacia la cavidad y el aumento consiguiente de la presión hidrostática (Figura 8).

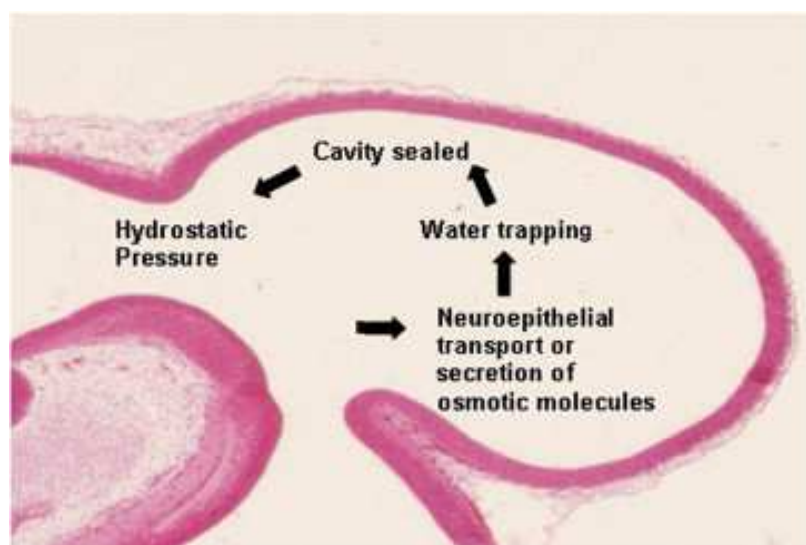


Figura 8: Sección sagital del mesencéfalo de un embrión de pollo en estadio 23-24HHH, que representa cómo las moléculas osmóticamente activas son secretadas o transportadas a través del neuroepitelio hacia el CSF en un sistema ventricular cerrado, generando presión hidrostática dentro del ventrículo. (Tomado de Gato y Desmond, 2009).

Esta hipótesis de los componentes osmóticos es apoyada por investigaciones que demuestran la presencia de material precipitable dentro de los ventrículos cerebrales en embriones de pollo y rata, morfológicamente compatible con una matriz extracelular, y también la presencia de estructuras secretoras tales como vesículas y aparatos de Golgi en la porción apical de las células neuroepiteliales, lo que sugiere una actividad secretora significativa en estas células (Gato et al., 1993). Diversas investigaciones sugieren que el Na^+ existente en el CSF crea un potencial eléctrico trans-neuroepitelial que permite dirigir estos procesos en la morfogénesis normal (Hotary y Robinson., 1991; Shi y Borgens., 1994; Borgens y Shi., 1995). Se ha demostrado también que el Na^+ cruza el neuroepitelio vía bomba Na^+-K^+ ATPasa, dado que los embriones a los que se bloquea esta bomba desarrollan ventrículos más pequeños de lo normal (Li y Desmond., 1991); asimismo, el incremento de Na^+ en los ventrículos inducido por β -D-xilósido (que aumenta los canales libres de condroitín sulfato y de Na^+) ocasiona ventrículos hiperexpandidos (Alonso et al., 1998).

Por tanto, la presencia en el CSF de moléculas de alto potencial osmótico como los proteoglicanos contribuye a este gradiente osmótico, trabajando de manera conjunta con el Na^+ como elementos esenciales de la génesis y de la regulación de la presión del CSF (Alonso et al., 1998, 1999, 2000; Gato et al., 2004).

2.3. Papel del CSF en el adulto

Un gran número de factores de crecimiento aumentan en el cerebro y en el CSF después de sufrir un daño cerebral, incluyendo: IGF1 (Kazanis et al., 2004), IGF2 (Walter et al., 1999), FGF (Endoh et al., 1994), factor de crecimiento neural (NGF) (Patterson et al., 1993), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Doyle et al., 2010), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) (Cheng et al., 2008), factor neurotrófico derivado cerebral (BDNF) (Kazanis et al., 2004; Korhonen et al., 1998), neurotrofina 3 (NT-3) (Kazanis et al., 2004), neurotrofina 4/5 (Royo et al., 2006), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Shore et al., 2004), eritropoyetina (Brines et al., 2000), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) (Stover et al., 2000), proteína precursora amiloide soluble (sAPP) (Olsson et al., 2004) (Tabla 3).

El aumento de IGF-1 en el lugar de la contusión cerebral a las 48 horas del daño, en un modelo de ratón con traumatismo cerebral, sugiere un posible papel de neuroprotección y neurogénesis de esta molécula; asimismo, IGF-2 está altamente expresada en los plexos coroideos, meninges, y en el CSF tanto embrionario como adulto. Los plexos coroideos también secretan proteínas integradoras de IGF (IGFBPs), que colaboran en el transporte de las IGFs y también se cree que modulan su actividad.

El CSF puede actuar como un vehículo para la transmisión y el transporte de importantes nutrientes y factores de crecimiento hacia las zonas dañadas del cerebro (y globalmente al SNC) para ayudar a mantener la homeostasis, promover la neuroprotección y la neurogénesis, y remover los productos tóxicos generados por el daño cerebral. En este sentido, diversos estudios han probado que la administración directa de factores de crecimiento conocidos dentro de los ventrículos dañados en animales de experimentación induce neurogénesis y promueve la neuroprotección: Sun et al. (2009) administraron intraventricularmente FGF-2 (también llamado FGF- β o bFGF) una semana después del traumatismo cerebral en ratas, y registraron un aumento de la proliferación celular en regiones neurogénicas

de la zona subventricular (SVZ) y del giro dentado (DG), así como un incremento de la supervivencia de las nuevas neuronas generadas. Asimismo, se ha demostrado un efecto neuroprotector tras la administración intraventricular de FGF-2 en modelos de rata con isquemia cerebral focal (Kawamata et al., 1996).

Otros factores neurotróficos como el VEGF, GDNF y la eritropoyetina, han demostrado también su capacidad de promover la neurogénesis y la neuroprotección tras su administración intraventricular (Araujo et al., 1997; Lee y Agoston., 2010; Schabitz et al., 1997; Sharma et al., 2007; Storkebaum et al., 2005; Takeshima et al., 2011; Thau-Zuchman et al., 2010).

Se ha demostrado también la capacidad de las células-madre neuronales de migrar hacia regiones dañadas del SNC, y que este proceso es mediado en parte por la vía de señalización SCF/c-kit (Sun et al., 2004).

Se ha intentado también la administración de factores de crecimiento por otras vías. En este sentido, la administración intranasal de FGF- α (FGF-1 o aFGF) en modelos de rata con isquemia focal aumenta la neurogénesis en la SVZ y el DG (Cheng et al., 2011); asimismo, cuando se administra insulina por vía intranasal en personas con enfermedad de Alzheimer de grado moderado, ésta atraviesa la barrera hemato-encefálica y mejora la memoria y la función cognitiva de estos pacientes. Además, el CSF constituye un potencial vehículo para la transmisión de implantes de células madre neuronales en regiones dañadas de la médula espinal y del cerebro, como se ha demostrado en numerosos estudios sobre modelos animales (Johanson et al., 2011; Ohta et al., 2004; Wu et al., 2001; Wu et al., 2002).

Tabla 3: Factores de crecimiento presentes en el CSF del cerebro dañado (Modificada de Mauro et al., 2012)

Factor de crecimiento	Posible función en el cerebro dañado	Especies. Tipo de daño cerebral
BDNF	Neuroprotección	Humano. Isquemia
Eritropoyetina	Neuroprotección	Humano. Isquemia
IGF-2	Neurogénesis y homeostasis tisular. Probable promoción de la actividad fagocítica	Rata. Lesión penetrante
NGF	Soporte en la supervivencia y proliferación neuronal	Humanos. Traumatismo.
sAPP	Neuroprotección. Estimulación de la proliferación de las células madre neuronales	Humano. Traumatismo
TGF- β	Soporte de la supervivencia, expresión inflamatoria, regulación de la formación de la escara glial, fibrosis y activación microglial	Humano. Traumatismo
TNF- α	Neuroprotección	Humano. Rata. Traumatismo
VEGF	Neuroprotección	Humano. Traumatismo
FGF2	Soporte en la supervivencia y proliferación neuronal	Rata. Isquemia. Taumatismo
GDNF	Neuroprotección	Rata. Isquemia
NT-3	Neuroprotección	Rata. Lesión penetrante
NT-4,-5	Neuroprotección	Rata. Traumatismo
FGF1	Neurogénesis	Rata. Isquemia

En el adulto existen zonas con capacidad de neurogénesis como la citada zona subventricular (SVZ), el hipocampo, el bulbo olfatorio, etc. El CSF, como ya se ha visto, tiene un importante papel en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células madre neuronales tras el daño cerebral. Estos mecanismos de regulación pueden reproducirse también en células-madre no nerviosas, como son las de la médula ósea (MSCs): se ha demostrado que la adición de CSF obtenido tras una isquemia cerebral a un medio de cultivo *in vitro* de MSCs acelera la proliferación de estas células; este efecto es más potente con CSF procedente de una isquemia de corta duración, y la morfología y características antigénicas de la superficie celular de las MSCs se mantienen (Orito et al., 2010). Este hecho sugiere que el uso de este "CSF isquémico" en medios de cultivo podría facilitar el trasplante autólogo de MSCs.

3. FACTORES DE CRECIMIENTO

3.1. Factor de Crecimiento Fibroblástico 2 (FGF-2)

Está demostrado que el E-CSF controla la replicación de las células neuroepiteliales mediante la presencia de factores de crecimiento del tipo del FGF-2 y/o EGF, según especies (Martin et al., 2006). En cultivos de tejido neuroepitelial mesencefálico, añadiendo E-CSF al medio o bien implantando microesferas impregnadas en E-CSF, se produce una reducción significativa del número de células en apoptosis y se activan los procesos de replicación y diferenciación. De igual forma, si se anula la actividad biológica del FGF-2 en el CSF se reduce significativamente el número de células neuroepiteliales en fase de replicación celular.

Las células del neuroepitelio son capaces de sintetizar FGF-2 y además poseen la capacidad de respuesta al mismo, ya que desde fases tempranas del desarrollo expresan receptores de los FGFs 1, 2 y 4 (RFGFs) (Kalyani et al., 1999). El FGF-2 estimula tanto *in vivo* como *in vitro* la proliferación de

neuroblastos, células gliales y otros tipos celulares no neurales (Gensburger et al., 1987; Tao et al., 1997).

La regulación de la división de las células del sistema nervioso central por parte del FGF-2 parece estar en relación con la acción de otros factores. En este sentido, algunos estudios prueban la relación entre FGF-2 y el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), de forma que el primero estimula la proliferación de células multipotenciales y el segundo regula las poblaciones postmitóticas, especialmente gliales (Kilpatrick y Bartlett, 1995). También parece existir una actividad sinérgica de FGF-2 con factores que posibilitan la supervivencia neuronal (TGF β s + FGF-2) (Stern et al., 1997), la diferenciación (NT-3 + FGF-2) (Ghosh y Greenberg., 1995) y la reorganización de las sinapsis (NT-4, -5 + FGFs). La interacción con IGF-1 también se ha apreciado *in vivo* en relación con el control de la proliferación y diferenciación de oligodendrocitos: el FGF-2 incrementa el número de células y enlentece el proceso de mielinización, mientras el IGF-1 la promueve (Goddard et al., 1999). En el SNC en desarrollo, el FGF-2 influye sobre la diferenciación celular tanto en sentido positivo como negativo, en función del estado de diferenciación, entorno celular (Stern et al., 1997) y tipo celular (Qian et al., 1997).

Así pues, el FGF-2 es uno de los principales factores implicados en la regulación de la proliferación y la diferenciación de los precursores neurales en estadios tempranos del desarrollo (Tropepe et al., 1999; Vaccarino et al., 1999; Junier, 2000; Ford-Perriss et al., 2001; Panchision y McKay, 2002; Dono, 2003). Se ha sugerido que actúa de un modo autocrino-paracrino (Vaccarino et al., 1999; Panchision y Mc Kay, 2002), lo que implicaría que el tejido sería autosuficiente para la regulación del comportamiento celular; sin embargo, no existe consenso al respecto, ya que se ha demostrado en cultivos *in vitro* que el entorno de las células neuroepiteliales no es suficiente para ello: Martín et al (2006) demostraron que, durante los estadios tempranos del desarrollo en embriones de pollo, existe otra fuente de FGF-2, distinta del neuroepitelio, que afecta al cerebro en desarrollo, ya que el CSF contiene varias isoformas de este factor; asimismo demostraron, tanto *in vivo* como *in vitro*, que el FGF-2 contenido en el E-CSF tiene un

efecto sobre la regulación del comportamiento de las células neuroepiteliales, incluyendo la proliferación celular y la neurogénesis; y se detectaron también, mediante hibridación *in situ*, niveles altos de expresión de mRNA en la notocorda, mesonefros y en el primordio hepático, y bajos en el neuroectodermo cerebral (Martín et al., 2006).

El FGF-2 es transportado normalmente por vía extracelular unido a heparán-sulfato (HSPG) o a condroitín-sulfato proteoglicanos (CSPG), para facilitar su desplazamiento, protegerlo de la degradación enzimática y, en algunos casos, concentrarlo cerca de las células-diana o colaborar en su unión con el receptor (Yayon et al., 1991; Nugent y Edelman, 1992; Joseph et al., 1996; Brickman et al., 1998). La presencia de diversos proteoglicanos sulfatados en el E-CSF ha sido ampliamente demostrada (Gato et al., 1993; Alonso et al., 1998; Martín, 1999; Parada et al., 2005). Todos estos datos sugieren que la actividad del FGF-2 en el CSF está regulada por mecanismos complejos en los que otras moléculas como los proteoglicanos juegan un papel importante.

3.2. Insulin-like Growth Factor (IGF)

Los IGFs (IGF-1 y IGF-2) son un grupo de factores de crecimiento presentes en numerosos tejidos y fluidos biológicos, incluido el CSF (Lehtinen et al., 2011; Salehi et al., 2009; Jones et al., 1995; Holm et al., 1994; Margolis et al., 1967). Forman parte de importantes vías de señalización durante el desarrollo, incluyendo el crecimiento cerebral, y son factores principales relacionados con la supervivencia, proliferación y diferenciación cerebrales (Russo et al., 2005).

Estos factores circulan unidos a seis proteínas transportadoras (IGF binding proteins o IGFbps 1 a 6), y se unen a dos posibles receptores de membrana diferentes (IGFR 1 y 2). IGF-1 actúa en la división celular al promover la fase S del ciclo celular, y también participa en la diferenciación y el metabolismo (LeRoith et al., 1995; Ozdinler et al., 2006). El IGF-2 del CSF

está relacionado con el crecimiento y la supervivencia durante la neurogénesis.

La mayor parte del IGF del suero es secretado por las células hepáticas, aunque los principales órganos también lo sintetizan. El IGF sistémico no atraviesa completamente la barrera hematoencefálica, por lo que la principal fuente de IGF para las células cerebrales es la producción local. La concentración de IGF en el CSF aumenta coincidiendo con el inicio de la migración neuronal, la proliferación y la organización de la citoarquitectura durante el desarrollo cortical; después de este período, la concentración de proteínas totales y de IGF en el CSF van disminuyendo hasta el nacimiento (Salehi et al., 2009).

3.3. Ácido retinoico (AR)

Un hallazgo remarcable que ha contribuido a comprender el efecto del E-CSF sobre la neurogénesis de precursores neuroepiteliales es la presencia en el E-CSF de pollo y rata de dos proteínas necesarias para la síntesis de AR: all-trans-retinol y Proteína de Fijación del Retinol (Retinol binding protein, RBP) (Parada et al., 2005, 2006, 2008b; Parvas et al., 2008). El AR es un importante inductor de la neurogénesis, tanto en el embrión como en el adulto (Gonçalves et al., 2005; Wang et al., 2005; Jacobs et al., 2006). Mediante análisis proteómico del E-CSF de pollo se ha demostrado que la concentración de all-trans-retinol aumenta logarítmicamente durante el período de máxima neurogénesis, esto es, durante los estadios 20 al 29HH, con los picos máximos durante los estadios 20 al 24HH (Parada et al., 2008b). Asimismo, el AR es crucial para la organización de los ejes antero-posterior y dorso-ventral (Maden, 2002; Diez del Corral y Storey., 2004; Kudoh et al., 2002).

Durante el desarrollo temprano del cerebro del embrión de pollo, únicamente el istmo rombo-mesencefálico (IsO) tiene la capacidad de

synthetizar AR, pero el CSF desempeña un importante papel en este proceso (Alonso et al., 2011):

3. El E-CSF ayuda a controlar la síntesis de AR en el IsO, dado que contiene la molécula transportadora de all-trans retinol, RBP y el precursor all-trans-retinol.
4. El E-CSF tiene una actividad neurogénica similar a la del AR, lo que sugiere que podría actuar como una ruta de difusión para este factor.
5. La influencia del E-CSF sobre la neurogénesis en el cerebro embrionario es debida en gran medida a su participación en la síntesis de AR.

3.4. OSC-Espondina

Otra molécula difusible del CSF que ha resultado ser crucial en la regulación del balance entre la proliferación y diferenciación de las células neuroepiteliales cerebrales es la espondina del órgano subcomisural (OSC-espondina), una glicoproteína larga secretada por el techo del diencéfalo en etapas tempranas del desarrollo (Rodríguez et al., 1992, 1998; Meiniel y Meiniel., 2007). Niveles bajos de OSC-espondina provocan un incremento en la proliferación de células neuroepiteliales asociado a un descenso en la diferenciación celular de todas las líneas neuronales. Además, esta glicoproteína es necesaria para la correcta morfogénesis de la comisura posterior y de la glándula pineal; en este sentido, se ha demostrado que la adición de OSC-espondina en el medio de cultivo de explantes mesencefálicos causa incremento en la neurodiferenciación, mientras que el cultivo de los mismos en presencia de anticuerpos bloqueantes de la glicoproteína produce una reducción de la diferenciación y un aumento de las mitosis (Vera et al., 2013).

3.5. Citoquinas

3.5.1. Factor inhibidor de la leucemia (LIF)

El LIF es una citoquina esencial para el desarrollo hematopoyético (Ratajczak et al., 1997; Metcalf, 1997) y del Sistema Nervioso Central (Oshima et al., 2007) al promover la proliferación de las células-madre neurales y de las células progenitoras neuronales induciendo su entrada al ciclo celular (Hatta et al., 2002). En el feto de ratón, la placa cortical aparece alrededor del día gestacional 13.5-14.5 (Kauffman., 1992; Angevine y Sidman., 1961), al mismo tiempo que aparece el máximo nivel de LIF en el CSF (Hatta et al., 2006), lo que sugiere que LIF actúa como un efector en la neurogénesis cerebral. En ratas, la placa cortical aparece en el día 16.5 de desarrollo mediante la acción sinérgica de LIF y de BMP (Gasser y Hatten., 1990). También en humanos existe una elevación temporal de los niveles de LIF en el embarazo, con picos máximos durante las semanas 14 a 33 de gestación (Pitard et al., 1998).

Simamura et al. (2010) demostraron que la administración de LIF por vía intravenosa en la rata gestante causa un aumento de los niveles de LIF en el CSF fetal, que a su vez produce un aumento de la producción neuronal en la zona ventricular de la corteza cerebral fetal. En el mismo trabajo se sugiere que la mayor fuente de LIF fetal son las células rojas nucleadas sanguíneas, y la secreción fetal de LIF es estimulada por la señal maternal-LIF vía ACTH placentaria: el LIF maternal estimula la secreción de ACTH en las células del sincitiotrofoblasto, lo que a su vez aumenta la síntesis de LIF por las células rojas sanguíneas; este LIF pasa a la circulación periférica fetal y también al CSF, donde contribuye a mantener la mitosis neuronal, la proliferación de células progenitoras neuronales y células-madre neurales y la diferenciación de los astrocitos. Por tanto, la neurogénesis cerebral cortical es conducida indirectamente por la señal maternal-LIF.

3.5.2. Otras citoquinas de la familia LIF

Las citoquinas de la familia de interleukina-6 (IL-6) como son el factor neurotrófico ciliar (CNTF), Oncostatina-M, Cardiotrofina-1, IL-6 e IL-11 están caracterizadas por el pleiotrofismo y la redundancia en sus acciones biológicas. Intervienen en procesos inflamatorios, en la proliferación celular y en la hematopoyesis, y son neurotróficas.

Todas estas citoquinas, al igual que LIF, contienen la glicoproteína gp130 en sus respectivos complejos receptores como un componente en la vía de transducción de señal, lo que explica sus similares funciones (Taga et al., 1989; Taga y Kishimoto, 1997): actúan en la supervivencia de neuronas motoras (Oppenheim et al., 2001), inducen propiedades colinérgicas en cultivos de neuronas del sistema nervioso autónomo (Patterson., 1994) e intervienen en el proceso de diferenciación de astrocitos (Johe et al., 1996; McKay., 1997).

Se ha demostrado que IL-6 tiene efectos sobre la supervivencia neuronal, especialmente en el periodo fetal tardío (Horton et al., 1998). Actúa de manera sinérgica con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Levison et al., 2000) y con NGF (Hama et al., 1989) sobre la proliferación de los astrocitos. Además, IL-6 presenta un efecto inductor de la síntesis de NGF, NT-3, NT-4 y NT-5 (März et al., 1999) y la administración de IL-6 produce un aumento de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

3.5.3. Interleuquina 1-beta (IL-1 β)

IL-1 β es otra citoquina neurotrófica que, además, está implicada en múltiples procesos como la mediación de las reacciones inflamatorias, la modulación de la proliferación de células tumorales, y en procesos trombogénicos y coagulantes, entre otros. Se ha descrito su papel como estimulante de la proliferación y diferenciación de la glía, tanto de los

oligodendrocitos y astrocitos como de la microglía, fundamentalmente en experimentos *in vitro* (Merrill et al., 1991). Vela et al. (2002) observaron que IL-1 β inhibe la proliferación y estimula la diferenciación *in vitro* de precursores de oligodendrocitos, y favorece la maduración y la supervivencia de los que se encuentran en fase de diferenciación. También se sabe que IL-1 β favorece la proliferación en cultivos de células progenitoras mesencefálicas de embriones de rata, que finalmente se diferencian a neuronas dopaminérgicas (Akaneya et al., 1995; Carvey et al., 2001). En experimentos *in vivo*, esta interleuquina produce un aumento estadísticamente significativo de la proliferación celular neuroepitelial a nivel de la porción dorsal de la médula espinal (placa alar) a la vez que reduce la proliferación a nivel ventral (placa basal), en estadios precoces del desarrollo del embrión de pollo (De la Mano, 2006). Se sabe también que esta interleuquina tiene efectos sobre la proliferación neuronal en otras regiones del SNC; en concreto, IL-1 β incrementa la actividad histidina-decarboxilasa en cultivos primarios de células diencefálicas de embriones de rata, lo que sugiere su actuación sobre la proliferación de estas células (Niimi et al., 1997). También *in vivo*, se ha demostrado su efecto estimulante de la proliferación de la población glial tras la lesión de la sustancia nigra en ratón (Parish et al., 2002).

IL-1 β actúa también como factor de diferenciación neuronal: el tratamiento de cultivos expandidos de neuroblastos de mesencéfalo humano con IL-1 β , IL-11, LIF y GDNF produce la diferenciación de hasta un 1% de ellos a neuronas dopaminérgicas (Storch et al., 2001), y en rata se consigue hasta un 23% de células diferenciadas. El trasplante de estas nuevas neuronas a animales con una depleción inducida de dopamina mejora los síntomas de parkinsonismo (Carvey et al., 2001).

Como factor de supervivencia neuronal, la acción de IL-1 β es dosis-dependiente: el tratamiento de neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas con IL-1 β o con TNF- α a bajas concentraciones (1-10 UI/ml) no tiene efectos estadísticamente significativos sobre la supervivencia neuronal, mientras que a una concentración de 1000 UI/ml se produce una reducción

del 30-40% de la supervivencia de neuronas dopaminérgicas (Jarskog et al., 1997).

IL-1 β se correlaciona con otros factores neurotróficos. En este sentido, se ha demostrado que contribuye al crecimiento y diferenciación neuronal actuando mediante su interacción con NGF; también induce la síntesis de NGF, FGF-2 y factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), factores que a su vez favorecen la supervivencia de neuronas colinérgicas (Albrecht et al., 2002).

Durante el desarrollo temprano del SNC, tanto IL-1 β como IL-6 tienen un efecto proliferativo muy acusado en la placa alar (sensitiva); en la placa basal (motora), en cambio, predomina un efecto de "secuestro" de la proliferación y estímulo de la diferenciación neuronal. El inmunobloqueo local de IL-1 β y de IL-6 a ese nivel produce una disminución de la expresión de β_3 -tubulina a nivel de la placa basal de la médula espinal en embriones de pollo, lo que indica que estas dos citoquinas podrían estar implicadas en la diferenciación neuronal motora (De la Mano, 2006).

3.6. Sonic Hedgehog (Shh)

Diversos miembros de la familia de proteínas Hedgehog (HH) están envueltas en abundantes procesos del desarrollo embrionario (Ingham y McMahon, 2001). En los vertebrados, el morfógeno Sonic hedgehog y sus homólogos juegan un papel crítico en el patrón de desarrollo del tubo neural, de las extremidades, del esqueleto axial y de otros derivados de los somites (Chiang et al., 1996). En el tubo neural, la señalización Shh es fundamental para el desarrollo, proliferación y supervivencia de progenitores y estructuras ventrales (Rowitch et al., 1999), así como para la especificación de neuronas ventrales como las motoneuronas de la médula espinal (Ericson et al., 1995; Roelink et al., 1995; Briscoe et al., 2000) y las interneuronas GABAérgicas en la corteza cerebral (Xu et al., 2005; Huang et al., 2010).

Shh también se expresa en el telencéfalo dorsal durante las fases medias y finales de la corticogénesis relacionándose con el crecimiento de las estructuras corticales (Dahmane et al., 2011) y con la generación y el mantenimiento de las células-madre neurales postnatales y del adulto (Machold et al., 2003; Ahn y Joyner, 2005; Palma et al., 2005; Han et al., 2008).

Komada et al. (2008) demostraron que la delección genética selectiva de Shh o de su receptor Smoothed (SMO) en el telencéfalo dorsal causa un descenso de la proliferación de las células progenitoras y un aumento de la muerte celular que reducen significativamente la neurogénesis cortical, lo que sugiere el papel esencial de Shh en el control de este proceso.

En el estudio realizado por Araújo et al. (2014), se demostró que Shh afecta a la supervivencia celular, a la duración del ciclo celular, al crecimiento y al modo de división de los progenitores corticales aislados del telencéfalo dorsal durante la corticogénesis temprana. El bloqueo de la señalización Shh usando ciclopamina en cultivo produce un alargamiento del ciclo celular, un aumento de las divisiones simétricas terminales y un aumento de la muerte celular, lo que resulta en una depleción de células progenitoras y en una disminución de la gliogénesis, aunque sin afectar directamente a la neurogénesis; asimismo, la estimulación de la vía Shh aumenta la proliferación y la generación de células astrogiales sin afectar tampoco a la generación de neuronas.

3.7. Neurotrofinas

3.7.1. Factor de crecimiento nervioso (Nerve growth factor, NGF)

El NGF pertenece a la familia de las neurotrofinas. Su función biológica es la del desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso al estimular la proliferación de las células precursoras neuronales (Mashayekhi et al., 2002, 2007). En el embrión de pollo, la concentración de proteínas totales y de NGF aumenta en los días E17 y E18, período que coincide con la proliferación y migración celular y con la construcción de la citoarquitectura durante el desarrollo cerebral. Cambios en el NGF y en la concentración de las proteínas totales en el CSF pueden afectar a la proliferación celular, supervivencia y migración (Mashayekhi et al., 2008, 2009). El NGF es un importante factor neurotrófico en el desarrollo de los ganglios sensitivos, tanto a nivel espinal como craneal (Levi-Montalcini, 1987; Hallböök et al., 1990) y también tiene un papel importante en las células no neuronales: por ejemplo, es un factor autocrino para la supervivencia de los linfocitos T memoria (Torcia et al., 1996).

3.7.2. Otras neurotrofinas

Además del NGF, la neurotrofina 3 (NT-3), el factor neurotrófico derivado del cerebro (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) y las neurotrofinas 4 y 5 pertenecen a este grupo. Todas ellas intervienen en el trofismo y la plasticidad neuronal: regulan el desarrollo neuronal y la supervivencia, inician el crecimiento de neuritas y participan en la remodelación sináptica (Baydyuk y Xu, 2014).

3.8. Factor de Crecimiento Transformante β (Transforming Growth Factor β , TGF- β)

El grupo de proteínas del TGF- β incluye factores morfogenéticos óseos, hormona anti-mülleriana, activinas e inhibinas (Burt y Law, 1994). Estas proteínas comparten algunas estructuras homólogas, pero poseen receptores separados y participan en diferentes funciones. Los TGF- β s tienen funciones pleiotrópicas en varios órganos: regulan el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de diferentes tipos celulares, y también influyen sobre distintas células del sistema inmune, por lo que pueden ser consideradas citoquinas (Clark y Coker, 1998).

Durante el desarrollo del sistema nervioso central, TGF- β está más presente en zonas donde ocurre la neurodiferenciación y menos en zonas con proliferación activa (Flanders et al., 1991): en este sentido, se ha demostrado que TGF- β inhibe la proliferación y aumenta significativamente la neurogénesis en cultivos *in vitro* de células de la cresta neural de codorniz (Zhang et al., 1997; Aigner y Bogdahn, 2008).

TGF- β también es requerido para la generación de las diferentes clases de interneuronas dorsales durante el desarrollo del eje dorso-ventral de la médula espinal, y para la supervivencia de las motoneuronas al actuar como factor trófico sobre las fibras musculares u otros tipos celulares. Gouin et al. (1996) demostraron, en cultivos de motoneuronas de embrión de pollo, que los TGF- β s actúan sinérgicamente con los FGFs para mantener vivas a estas células.

Se ha descrito también la función neuroprotectora de los TGF- β ante una lesión cerebral, actuando en varios niveles: como factor antiinflamatorio que protege de los daños colaterales producidos por la activación del sistema inmune, si bien posee también propiedades proinflamatorias al ser un potente quimioatrayente de neurotrofinas (Mantel y Schmidt-Weber, 2011); interviene en la formación de la cicatriz nerviosa al promover la astrogliosis (Johns et al., 1992); muestra una acción anti-apoptótica

(Buisson et al., 2003); y promueve la angiogénesis (Dobolyi et al., 2012) y la regeneración neuronal (Abe et al., 1996).

3.9. Apolipoproteínas

Otras moléculas localizadas en el E-CSF con papel en la neurodiferenciación son las apolipoproteínas, cuya función es transportar vitaminas y lípidos y, entre ellos el colesterol. En el embrión defectos en la biosíntesis de colesterol, en el transporte de lípidos o de colesterol o defectos en las lipoproteínas conlleva defectos en el desarrollo y en la función del CNS (Farese y Herz, 1998; Woollett, 2005; Waterham, 2006).

El colesterol tiene numerosas funciones, las que incluyen:

1. Modular la fluidez y la permeabilidad de la membrana celular.
2. Servir de precursor para las hormonas esteroideas y síntesis de ácido biliar.
3. Modificar la convalencia de las proteínas.

El LDL del E-CSF contribuye a la diferenciación neuronal y junto a la VLDL son responsables de transportar lípidos desde sus lugares de origen (Parada et al., 2008a).

4. DESARROLLO DE LA MÉDULA ESPINAL

La pared del tubo neural, poco después de cerrarse, está formada por células neuroepiteliales que constituyen un epitelio pseudoestratificado grueso. Estas células se dividen rápidamente y forman en conjunto la capa neuroepitelial o neuroepitelio.

Una vez formado el tubo neural, las células neuroepiteliales comienzan a originar otro tipo celular denominado *células primitivas o neuroblastos*, de citoplasma claro y núcleo redondo de gran tamaño con nucléolo. Estas células rodean la capa neuroepitelial y forman la *capa del manto*; más adelante, la capa del manto formará la sustancia gris de la médula espinal.

La capa más externa de la médula espinal se denomina *capa marginal*, y está formada por las fibras nerviosas que salen de los neuroblastos de la capa del manto. Esta capa adquiere un aspecto blanquecino debido a la mielinización de las fibras nerviosas, y dará origen a la sustancia blanca de la médula espinal (Langman, 2002).

4.1. Organización dorso-ventral

A cada lado del tubo neural se forman dos engrosamientos, uno ventral y otro dorsal, por la continua adición de neuroblastos a la capa del manto. Los engrosamientos ventrales o *placas basales* y los engrosamientos dorsales o *placas alares* tienen diferentes ritmos de proliferación y muestran una organización dorsoventral, ya que las neuronas ya diferenciadas, que expresan distintos genes marcadores, están anatómicamente segregadas; de esta forma, neuronas sensoriales forman circuitos en la médula espinal dorsal mientras que las neuronas motoras y viscerales se localizan a lo largo de la médula espinal ventral (Wilson y Maden, 2004; Jessell, 2000) (Figura 9).

Conectando ambas placas, existen varias poblaciones de interneuronas que forman distintas trayectorias axonales y circuitos. Además, ambas zonas están separadas por un surco longitudinal, *el surco limitante*. La línea media de las porciones dorsal y ventral, denominadas respectivamente *placas del techo* y *del suelo*, no poseen neuroblastos y sirven como vías para las fibras nerviosas que se cruzan en la médula. Además, a nivel torácico y lumbar superior de la médula espinal, entre las astas motora (ventral) y sensitiva (dorsal), se localiza el *asta lateral o intermedia*, formada por neuronas de la porción simpática del sistema nervioso autónomo.

Las neuronas dorsales se subdividen después en 6 grupos, las interneuronas y las neuronas ventrales se dividen en 5 grupos, y cada dominio está caracterizado por la expresión de distintos genes marcadores (Wilson y Maden, 2005).

Se ha identificado a la notocorda y a los somites como los responsables de la organización dorsoventral del tubo neural. Se conocen cuatro moléculas señalizadoras generadas por estas estructuras y que están envueltas en este proceso: los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), principalmente FGF8, producidos por el mesodermo caudal y que deben ser regulados antes de que ocurra la diferenciación neural; el ácido retinoico (AR), producido por el mesodermo paraxial mediante la enzima retinaldehído-deshidrogenasa 2 (RALDH2), que actúa como inductor de la diferenciación neural y del modelaje, y como antagonista de los FGFs; Sonic hedgehog (Shh), producido por la notocorda y la placa del suelo y responsable de inducir la diferenciación de células-madre ventrales de forma dosis-dependiente, como veremos más adelante; y las proteínas morfogenéticas del hueso (bone morphogenetic protein, BMPs), producidas por la placa del techo y responsables de la diferenciación de células neurales dorsales también de manera dependiente de la concentración (Wilson y Maden, 2005; Zhuang y Sockanathan, 2006; Yamada et al., 1993; Yamada et al., 1991; Gouldin et al., 1993; Novitch et al., 2003).

Estas cuatro moléculas señaladoras también interactúan entre sí, generalmente de manera represora, por lo que el patrón dorso-ventral resulta de la compleja interacción de éstas.

4.1.1. Organización ventral

La notocorda induce una inhibición local de la mitosis para hacer a la placa del suelo más fina; de hecho, si se elimina la notocorda, se produce un sobrecrecimiento considerable del tubo neural (Burda, 1968). A la inversa, los somites inducen una estimulación local de la mitosis para hacer las paredes laterales más gruesas. Además, la notocorda es capaz de inducir efectos opuestos dependiendo de la concentración de los factores que produce: cuando la notocorda se sitúa cerca del tubo neural inhibe la proliferación e induce a la placa del suelo, mientras que cuando está más alejada estimula la proliferación e induce neuroblastos (neuronas motoras) (Wilson y Maden, 2005). La eliminación de la notocorda reduce la diferenciación de las células del suelo y de las neuronas motoras (Van Straaten y Hekking, 1991; Yamada et al., 1991; Ericson et al., 1992., Liem et al., 1995), lo que sugiere que las señales procedentes de la notocorda, presumiblemente Shh, son necesarias para la diferenciación de las células madre ventrales.

4.1.2. Organización dorsal

Existen evidencias de que la identidad y el patrón de generación de las neuronas dorsales depende de señales mediadas por BMPs, principalmente BMP4 y BMP7, que derivan del ectodermo epidérmico e inducen la formación de células de la línea media de la placa del techo (Watanabe y Le Douarin, 1996; Liem et al., 1997). A su vez, las células del techo proporcionan una fuente secundaria de TGF- β , factor requerido para la generación de las diferentes clases de interneuronas dorsales. Estas

interacciones inductivas involucran tanto diferencias cualitativas como cuantitativas en la señalización por los factores TGF- β y cambios temporales en la respuesta de las células progenitoras dorsales (Liem et al., 1997; García-Campmany y Martí, 2007; Chesnutt et al., 2004) (Figura 9).

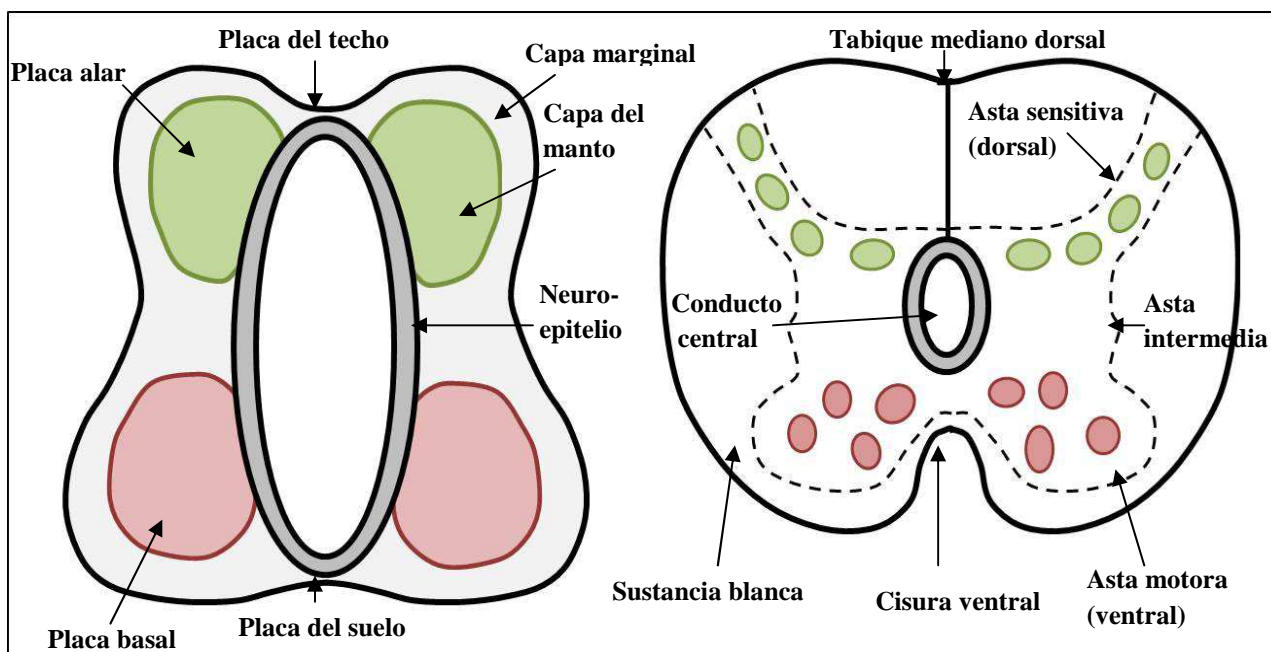


Figura 9 : Médula espinal

4.2. Diferenciación histológica

Las *células neuroepiteliales* se dividen y originan otro tipo celular: los *neuroblastos* (células nerviosas primitivas); estos neuroblastos muestran inicialmente una prolongación central denominada *dendrita transitoria*. Al emigrar a la zona del manto, esta prolongación desaparece y los neuroblastos adquieren temporalmente una forma redondeada (*neuroblasto apolar*). Posteriormente, aparecen dos nuevas prolongaciones citoplasmáticas situadas en los lados opuestos del cuerpo celular, (*neuroblasto bipolar*). La prolongación de un extremo de la célula se alarga y se forma el *cilindroeje* o *axón primitivo*, mientras que en el otro extremo presenta varias arborizaciones citoplasmáticas, las *dendritas primitivas*; en

esta etapa, la célula se denomina *neuroblasto multipolar*, y finalmente dará lugar a la célula nerviosa adulta o *neurona*.

Una vez formados los neuroblastos, éstos pierden la capacidad de dividirse. Los axones de las neuronas de la placa basal atraviesan la zona marginal y emergen en la superficie ventral de la médula espinal formando la *raíz motora (ventral) del nervio raquídeo o espinal*, que conduce los impulsos motores hacia los músculos. Los axones de las neuronas de la placa alar penetran en la capa marginal de la médula y ascienden o descienden a otros niveles para formar neuronas de asociación.

La mayor parte de las células de sostén primitivas, *los glioblastos*, son formados por las células neuroepiteliales cuando ha terminado la producción de neuroblastos (Langman, 2002).

4.3. Células de la cresta neural

Las células de la cresta neural son un grupo de células de origen ectodérmico situadas a cada lado del surco neural. Forman de forma temporal una zona intermedia entre el ectodermo superficial y el tubo neural, extendida a lo largo del tubo neural, y desde esta región las células de la cresta emigran lateralmente. Algunas de estas células originan los *ganglios sensitivos o ganglios de la raíz dorsal* de los nervios raquídeos; los neuroblastos de estos ganglios originan las *neuronas de la raíz dorsal*.

Las células de la cresta neural dan origen también a los neuroblastos simpáticos, células de Schwann, células pigmentarias (p.ej. los melanocitos), odontoblastos, meninges y mesénquima de los arcos faríngeos (Langman, 2002).

5. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS NO NERVIOSAS

Como ya hemos comentado, las células precursoras o células-madre se caracterizan por su capacidad de autorreplicación, así como por su capacidad para generar diferentes tipos celulares diferenciados. Funcionan en diversos tejidos para reemplazar, en ciertas condiciones, poblaciones de células maduras que no pueden dividirse y propagarse (Albert et al., 2001). Las células-madre producen factores de transcripción que controlan su autorrenovación y su destino final. Por otra parte, factores externos, como los factores de crecimiento y ciertas citoquinas, pueden actuar directamente sobre las células-madre e inducir su diferenciación hacia un linaje celular determinado. La plasticidad de estas células es definida como su capacidad para diferenciarse en prácticamente cualquier tipo celular, ya sea *in vivo* o *in vitro* (Raff, 2003; Jahagirdar y Verfaillie, 2005). Las células-madre embrionarias tienen una mayor capacidad de división que las postnatales (Bodnar et al., 1998).

Clásicamente, las células-madre se clasifican en tres tipos:

1. *Células totipotenciales*: Son el cigoto y los primeros blastómeros, capaces de dar lugar a todos los tipos celulares del organismo.
2. *Células pluripotenciales*: Células que pueden dar origen a diversos linajes o estirpes celulares, como las células de las tres hojas blastodérmicas: ectodermo, endodermo y mesodermo. Estas células-madre embrionarias proliferan y pueden diferenciarse, dependiendo de las condiciones en las que se encuentren, hacia diferentes tipos de tejido (Mitchell et al., 2003). Durante este proceso generan también tipos celulares aún indiferenciados que mantienen su capacidad de formar diferentes clases de células, denominados aún como células-madre.
3. *Células multipotenciales*: Células precursoras que pueden generar diversos fenotipos de células, generalmente dentro de un mismo linaje.

Algunos autores consideran otro tipo de células-madre, denominadas *unipotenciales*, que dan lugar únicamente a un tipo celular (Raff., 2003).

En etapas posnatales, las células-madre pueden encontrarse en algunos tejidos maduros formando nichos, y su capacidad para proliferar y autorrenovarse puede mantenerse a lo largo de la vida del organismo. Residen en tejidos y órganos específicos, que incluyen la médula ósea, la sangre, la piel, el tracto gastro-intestinal, la pulpa dental, la retina, el músculo esquelético, el hígado, el páncreas y el cerebro, entre otros. Sin embargo, a diferencia de las células-madre embrionarias, las del adulto son más difíciles de mantener en cultivo *in vitro*.

En principio se consideró que las células-madre del adulto eran multipotenciales, y que sólo podían dar lugar a uno o dos linajes exclusivamente. Sin embargo, en la médula ósea se ha identificado un tipo especial de células, denominadas *células precursoras del mesénquima* (mesenchymal stem cells, MSC), capaces de producir tipos celulares de distintos tejidos como hueso, cartílago, sangre, grasa, tejido conectivo (Rojas y Ortuño, 2011) y también células nerviosas (Ye et al., 2011; Ge et al., 2014). Posteriormente, se han logrado aislar estas células en otros tejidos como la placenta, tejido adiposo, músculo, riñón, páncreas, hígado y cerebro (Guan et al., 2013; Samokhvalov et al., 2013), tejido dental (Rodríguez-Lozano et al., 2011) y sangre del cordón umbilical (Erices et al., 2000).

Recientemente se ha demostrado que la plasticidad de las células-madre hace posible su transdiferenciación, es decir, la posibilidad de una célula de dar origen a otra de distinta capa embrionaria de la cual ella misma proviene. Investigaciones recientes indican que las células precursoras neurales multipotenciales pueden transdiferenciarse a precursores hematopoyéticos y viceversa (Josefson, 1999; Vescovi et al., 2001; Udani, 2006; Montzka et al., 2009).

En la actualidad, existen muchos métodos utilizados para inducir la diferenciación de MSCs *in vitro* en células neurales como son: la exposición a citoquinas como NGF, EGF y FGFb (Low et al., 2008); la inducción química con sustancias como el 2-mercaptoetanol y el dimetilsulfóxido (DMSO) (Kang et al., 2006); la exposición de una combinación de citoquinas y químicos (Kogler et al., 2004; Woodbury et al., 2000); la exposición a tejido cerebral homogeneizado (Yong-Zhou et al., 2008); la transfección génica (Lim et al., 2008); la exposición de sustancias pertenecientes a la medicina china como el *Astragalus mongholicus* (Wang et al., 2009) y la *Salvia miltiorrhiza* (Lu et al., 2008); y la exposición a CSF (Ye et al., 2011; Ge et al., 2014). Respecto a este último método, Ge et al. (2014) demostraron que la inducción de MSCs con CSF para su diferenciación a células neurales es más rápida y en más alta proporción que la inducida con citoquinas; esto es debido a que el CSF contiene numerosos factores inductores de esta diferenciación, además de proveer el mejor entorno para la diferenciación de MSCs a células neurales.

Aunque la capacidad de diferenciación neuronal de las MSC *in vitro* ha sido ampliamente explorada, la respuesta *in vivo* de este tipo de células injertadas directamente en el cerebro no se ha estudiado adecuadamente. Se ha demostrado que el trasplante de células previamente cultivadas aumenta significativamente la tasa de supervivencia y el desarrollo de neuronas maduras (Cao et al., 2001). Joannides et al. (2007) describieron también la importancia de los factores externos, de la localización y del tipo de tejido (lesionado o sano) en la diferenciación de células multipotenciales trasplantadas hacia el linaje glial o neuronal; asimismo, sugieren que la inducción de estas células multipotenciales hacia células precursoras neurales antes del trasplante ayuda a controlar la diferenciación de las células trasplantadas en un entorno dañado.

En este mismo sentido, en el amnios se ha descrito también la presencia de células precursoras. En el amnios humano existen dos tipos celulares principales: las células epiteliales amnióticas (CEA), que derivan del ectodermo; y las células mesenquimales amnióticas (CMA), de origen

mesodérmico (Whittle et al., 2000). Las CEA se originan a partir de las células epiblasticas a partir del 8º día tras la fertilización, período anterior a la organogénesis, por lo que mantienen el potencial de diferenciarse en muy diversos tipos celulares. Se sabe que las CEA expresan tanto marcadores neuronales como gliales (Sakuragawa et al., 1996; Ishii et al., 1999), y que sintetizan y liberan factores comunes a los de las células de estirpe neural (Sakuragawa et al. 2001): acetilcolina (Sakuragawa et al., 1997), factores neurotróficos como BDNF, NT-3 y NGF (Uchida et al., 2000), activina y noggin (Koyano et al., 2002). También son capaces de producir factores no neurales como la albúmina (Sakuragawa et al., 2000) o la eritropoyetina (Matsuura et al., 2001), al igual que los hepatocitos y las células estromales óseas respectivamente.

Las CMA, por su parte, poseen la capacidad de producir prostaglandinas (Whittle et al., 2000) y de sintetizar colágeno (Casey y McDonald, 1996). Las CMA humanas poseen características fenotípicas de células progenitoras neuronales; en este sentido, Sakuragawa et al. (2004) demostraron que las CMA *in vitro* presentan inmunomarcaje positivo para nestina y Musashi-1, proteínas expresadas por las células progenitoras neurales (Kaneko et al., 2000), lo que indica que estas células están realmente preparadas para la diferenciación neural (Woodbury et al., 2002). Asimismo, la capacidad de las células-madre mesenquimales para diferenciarse a derivados no mesenquimales como las células neuronales ya ha sido demostrada *in vitro* (Neuhuber et al., 2004), pero no así *in vivo*. Estos estudios abren la posibilidad de futuras aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas: el trasplante intracraneal alogénico de células amnióticas sería una fuente de catecolaminas y factores neurotróficos, y no produciría rechazo porque estas células apenas expresan antígenos leucocitarios humanos (HLA I y II) (Sakuragawa et al., 1995). La placenta podría ser una fuente apropiada de células amnióticas al no existir problemas éticos para su uso.

6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

El E-CSF tiene una composición proteica muy compleja y diferente a la del líquido cefalorraquídeo del SNC del adulto y se ha demostrado su función como regulador del comportamiento neuroepitelial a nivel mesencefálico tanto en embriones de pollo como de rata. Los estudios previos realizados en nuestro laboratorio demuestran acciones neurotróficas de algunos de los componentes hallados en el E-CSF (tales como el FGF-2, EGF, interleuquinas, ácido retinoico o apolipoproteínas), así como del propio E-CSF en conjunto sobre cultivos neuroepiteliales mesencefálicos. Así pues, se sabe que el E-CSF tiene un papel directo sobre la supervivencia, proliferación y diferenciación del neuroepitelio durante el desarrollo nervioso temprano, pero se desconoce si el E-CSF puede tener acciones similares sobre el neuroepitelio medular "in vivo" en fases precoces del desarrollo en las que en condiciones normales no presenta contacto directo con el fluido cerebroespinal de las vesículas cerebrales.

Las células mesenquimales tanto embrionarias como adultas de diferente origen, al igual que las células epiteliales amnióticas, en cultivo, se pueden transformar en neuronas bajo el estímulo de diferentes citoquinas. Se desconoce si las células mesenquimales embrionarias y las células del epitelio amniótico presentan esta misma capacidad "in vivo". Tampoco se sabe si el E-CSF tiene efecto neurogénico "in vivo" en estos tipos celulares". Por esto pretendemos analizar si factores neurogénicos conocidos como el FGF2 y el ácido retinoico pueden inducir diferenciación neural "in vivo" en células mesodérmicas y en células amnióticas.

7. OBJETIVOS

- Comprobar el efecto "in vivo" del E-CSF sobre la proliferación y diferenciación de los neuroblastos de la médula espinal en desarrollo.
- Determinar si el FGF2 y el ácido retinoico tienen capacidad neurogénica sobre células epiteliales amnióticas y células mesenquimales, "in vivo".
- Comprobar si el E-CSF es capaz de inducir la diferenciación a neuronas en poblaciones celulares no nerviosas pluripotenciales, tales como el mesénquima y el amnios.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

8. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

- 8.1. Obtención de embriones de pollo
- 8.2. Extracción de E-CSF

9. EFECTO "IN VIVO" DEL E-CSF SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN MÉDULA

- 9.1. Grupos experimentales
- 9.2. Técnica de implantación de microesferas
- 9.3. Estudio de proliferación celular
- 9.4. Estudio de diferenciación neuroepitelial
- 9.5. Número de embriones utilizados

10. EFECTO "IN VIVO" DEL E-CSF SOBRE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CÉLULAS DE ESTIRPE NO NEUROEPITELIAL

- 10.1. Estudio de la diferenciación neuronal en mesénquima
- 10.2. Estudio "in vivo" de la diferenciación neuronal en membrana amniótica

8. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

8.1. Obtención de embriones de pollo

Los huevos fertilizados provenientes de la Granja Santa Isabel (Córdoba) se incuban en estufa a una temperatura de 38°C y a una humedad relativa al 70%. Se anota el día y hora del comienzo de la incubación.

Para la manipulación de los embriones, en el momento en que se alcanza el estadio deseado se abre una amplia ventana en la cáscara de huevo, o bien se vierte el contenido del huevo en un recipiente con solución de Ringer a 37°C. A continuación, se recorta con tijeras la zona del vitelio en la que se encuentra el embrión y se transfiere a una placa de Petri con solución de Ringer, donde mediante microdissección bajo lupa se eliminan las membranas extraembrionarias y la membrana amniótica. Se realizan varios lavados con solución Ringer para eliminar restos de vitelio y se procede a la clasificación del embrión de acuerdo a los criterios temporales y morfológicos de Hamburger & Hamilton (1951).

SOLUCIÓN DE RINGER

Cl Na.....	7 g.
Cl K.....	0,42 g.
Cl ₂ Ca.....	0,24 g.
H ₂ O destilada.....	hasta 1.000 cc.

8.2. Extracción de E-CSF

En todos nuestros experimentos hemos utilizado E-CSF de embriones de pollo del estadio 25HH (3.5 días), para obtener los embriones se vierte el contenido del huevo en un recipiente con solución Ringer a 37°C, se extrae el embrión con la parte circundante del área vascular y a continuación bajo lupa se le libera de las cubiertas extraembrionarias y del amnios y posteriormente se deposita en seco en una placa de Petri, donde se elimina todos los restos de Ringer mediante aspiración con una aguja de insulina. Posteriormente utilizando un micromanipulador (Leitz®), se inserta una micropipeta biselada de 50 micras de diámetro efectivo (diámetro interno) en la cavidad mesencefálica del embrión (Figura 10). Se aspira lentamente su contenido (E-CSF) utilizando la presión de vacío de un microinyector PLI-100 Medical Systems Co®. El E-CSF procedente de varios embriones se recolecta en un Eppendorf y durante todo el proceso de extracción se mantiene a 4°C para evitar la degradación proteica, una vez obtenida una cantidad suficiente (0,5 ml) se ultracongela con N₂ líquido y se liofiliza inmediatamente en un biofilizador Lyoquest (Telstar®). Posteriormente se conserva a -40°C, hasta el momento de su utilización.

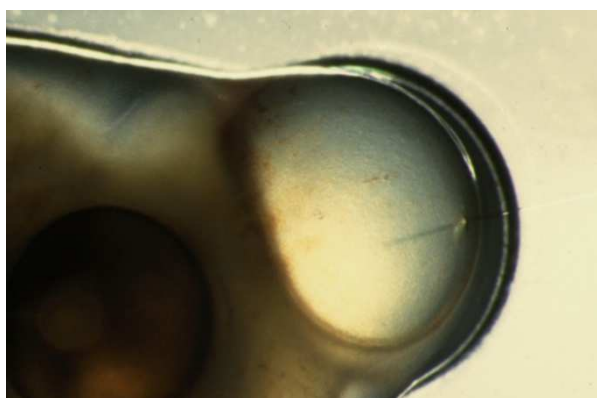


Figura 10: Técnica de extracción del E-CSF: inserción de la micropipeta en la cavidad mesencefálica de un embrión de pollo del estadio 25 HH.

9. EFECTO "IN VIVO" DEL E-CSF SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN MÉDULA

9.1. Grupos experimentales

Se emplearon microesferas de heparina (Sigma®) de un diámetro entre 125-250 μm ., previamente impregnadas con E-CSF mediante inmersión a 4°C al menos durante 24 horas previas al experimento.

Para conocer el efecto del E-CSF sobre la proliferación y diferenciación celular, se establecen los siguientes grupos:

1. Controles a los que no se realiza ningún tipo de manipulación. Sirven de referencia para analizar los datos obtenidos en los siguientes grupos.
2. Controles a los que se implanta una microesfera impregnada con solución Ringer. Sirven para comprobar si la manipulación embrionaria tiene algún efecto posterior.
3. Grupo experimental: embriones a los que se implanta una microesfera impregnada de E-CSF de embrión de pollo del estadio 25 HH.

9.2. Técnica de implantación de microesferas

Finalizadas las 65-72 horas de incubación, se abrió una ventana amplia en la cáscara de huevo para dejar expuesto el embrión y toda el área vascular circundante. Mediante observación bajo lupa, se seleccionó a los embriones que alcanzaron el estadio 19-20HH (Figura 11A y E). El resto de embriones que no llegaban o se sobrepasaban este estadio se desechó. En los embriones del estadio adecuado se procedió de la siguiente forma: bajo lupa, con ayuda de una aguja de tungsteno se secciona y retira parcialmente la membrana vitelina (Figura 11B), posteriormente se coloca al embrión sobre una placa de sujeción por debajo de la zona donde se va a

practicar la microcirugía para facilitar su manipulación y visualización (Figura 11C), con unas pinzas de relojero se abre la membrana amniótica (Figura 11D y F) en la zona en la que se va a implantar la microesfera. Seguidamente se practicó una pequeña incisión con una aguja de tungsteno en un espacio intersomático (Figura 12A, B y E) a nivel del esbozo del ala derecha (que se toma como nivel de referencia).

Para introducir la microesfera, se colocó en el micromanipulador una micropipeta con una microesfera en la punta depositándola en la incisión (Figura 12C, D y F) y con la ayuda de unas pinzas de relojero se presionó suavemente sobre la microesfera, para que no quedara demasiado superficial.

Se desechó todos aquellos embriones que sufrieron alguna hemorragia durante su manipulación.

Seguidamente, se selló la abertura de la cáscara de huevo con cinta adhesiva transparente y se procedió a su reincubación durante 24 horas, hasta alcanzar los estadios 23-24HH.

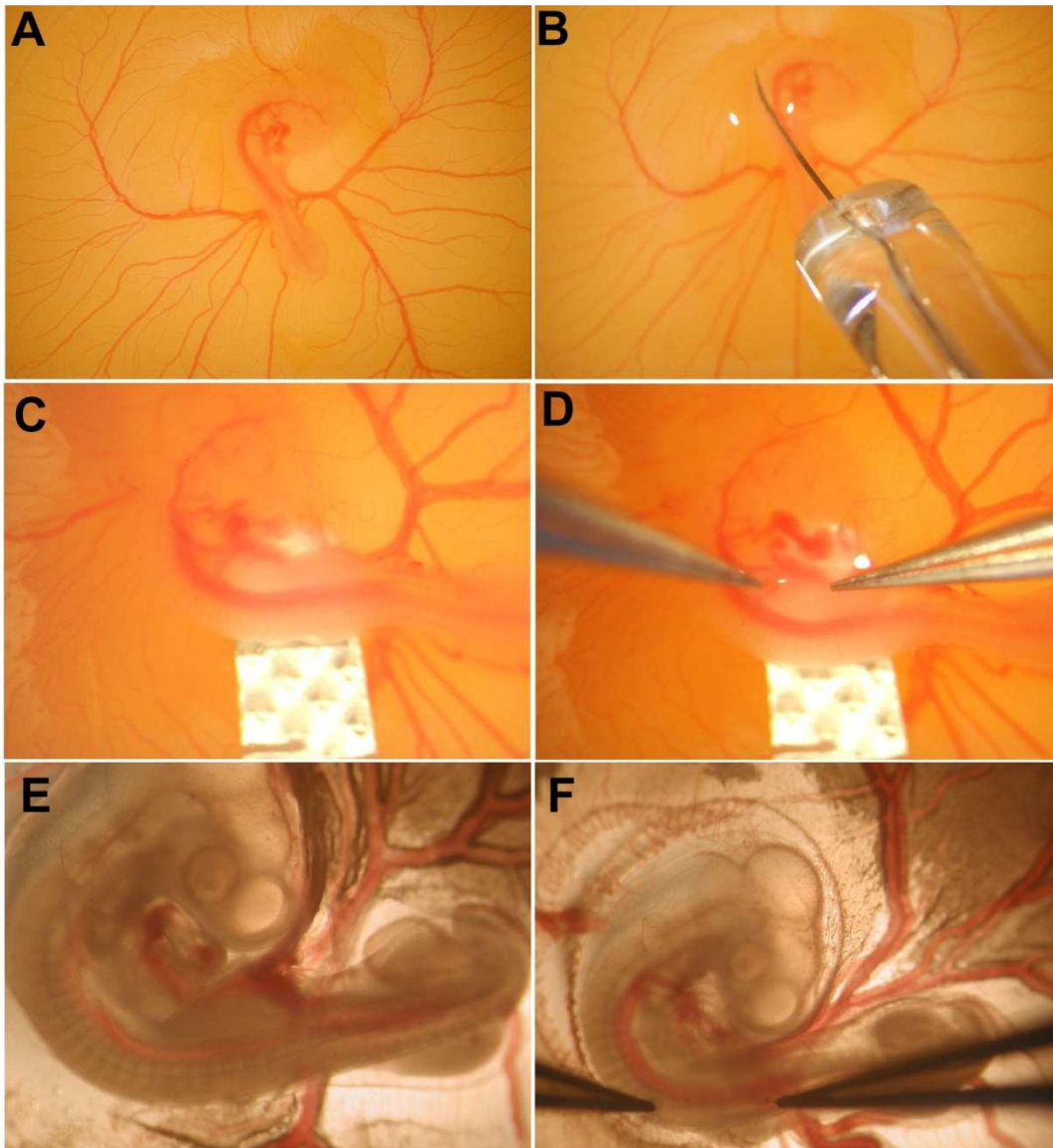


Figura 11: Manipulación de embriones *in ovo*. **A:** Imagen bajo lupa de un embrión de pollo en el estadio 19 de Hamilton-Hamburger, tal como aparece al abrir una ventana en el huevo. **B:** Apertura de la membrana vitelina en la región dorsal con una aguja de tungsteno. **C:** Introducción del microelevador por debajo del tronco del embrión. **D:** Apertura de la membrana amniótica de la región dorsal, mediante pinzas finas de relojero. **E:** Imagen del embrión en estadio 19HH, extraído del huevo y extendido sobre una placa de Petri. **F:** Disección de la membrana amniótica bajo lupa y en placa de Petri (misma técnica que en **D**).

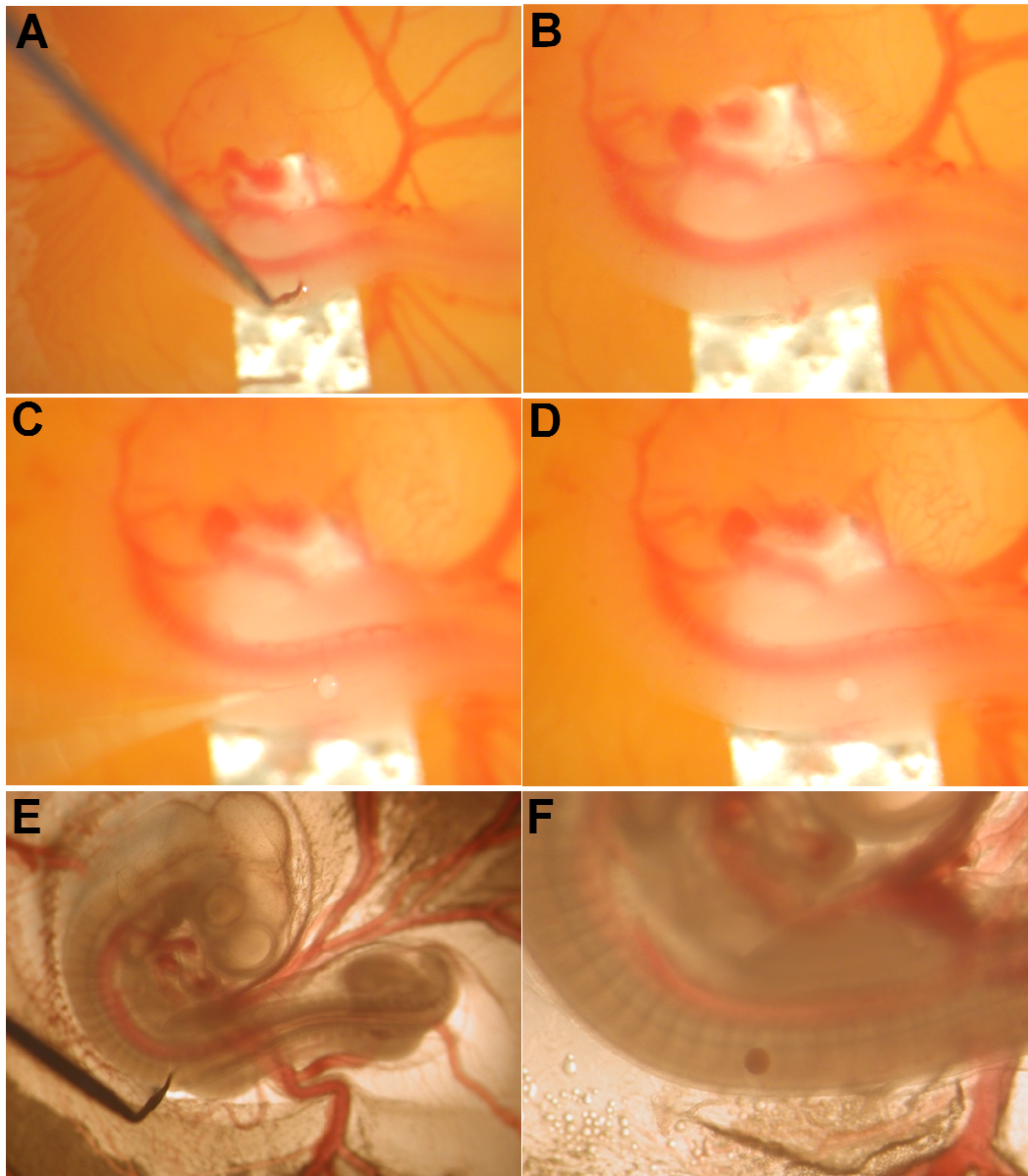


Figura 12: Técnica de implantación de microesferas *in ovo*. **A:** Imagen bajo lupa de un embrión de pollo en el estadio 18 de HH, colocado sobre el microelevador, al que se le practica una incisión en uno de los espacios intersomáticos a nivel del esbozo del ala derecha, utilizando una aguja de tungsteno afilada y doblada. **B:** Aspecto de la incisión; se aprecia una ligera hemorragia local que cesa en pocos instantes y no tiene consecuencias. **C:** Colocación de la microesfera sobre la incisión: la esfera se sujeta con una micropipeta de borosilicato de 10 μm . de calibre, y se maneja con un micromanipulador. **D:** Aspecto de la microesfera una vez colocada. **E:** Imagen del embrión, extraído del huevo y extendido sobre una placa de Petri, al practicarle la incisión (misma técnica que en A). **F:** Aspecto de la microesfera inmediatamente después de ser colocada.

9.3. Estudio de la proliferación celular

Para el estudio de la proliferación celular se determinó la incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) en los núcleos de las células neuroepiteliales medulares en la zona de implantación de la microesfera. Transcurridas las 24 horas de re-incubación después de la implantación, los embriones fueron reexpuestos y se les administró un volumen total de 10µl de una solución 10mM BrdU (Sigma®) en PBS con 1% en volumen de azul de metileno como colorante con el fin de visualizar si la microinyección se está realizando correctamente. Se aplicaron 20-25 microinyecciones de 100mseg de duración cada una y a una presión de 8 PSI intracardiacas a través de una micropipeta de 10 µ de diámetro interno, comprobándose como la solución se extiende por el árbol circulatorio. Se desecharon aquellos embriones que sufrieron alguna hemorragia durante su manipulación. Inmediatamente se reincubaron durante 60 minutos para permitir que la BrdU se incorporara a las células en fase de síntesis de ADN (Figura 13).

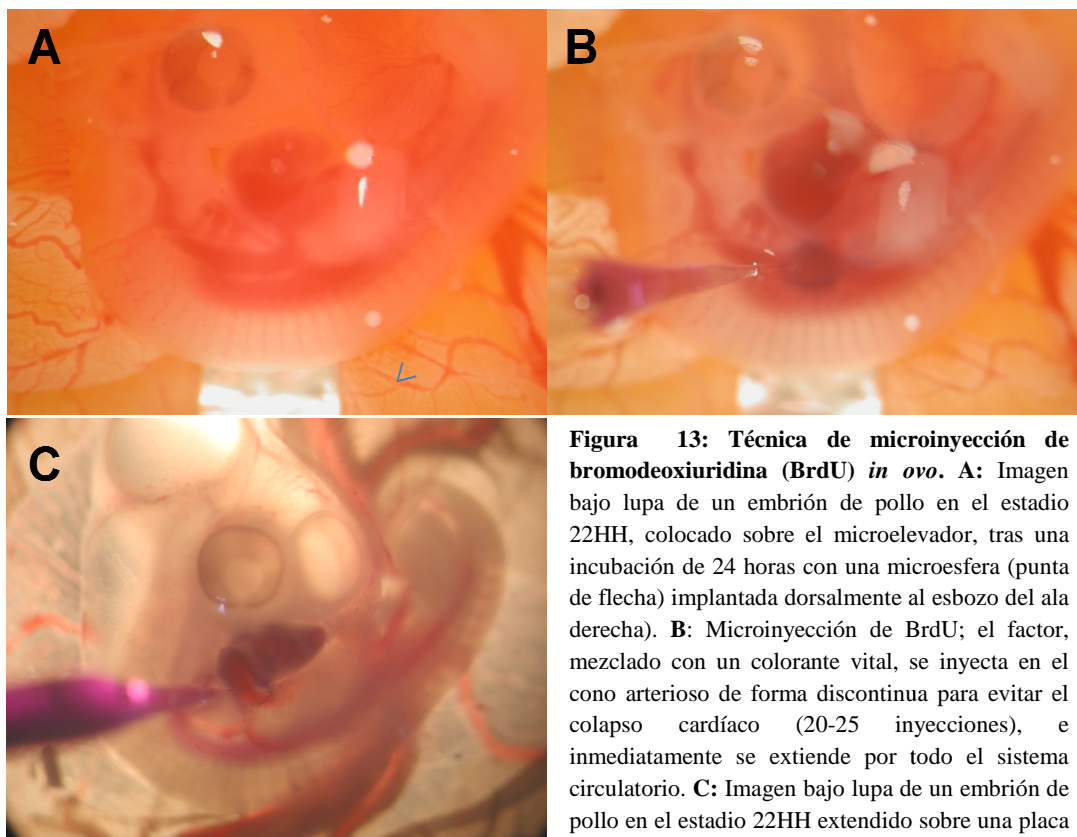


Figura 13: Técnica de microinyección de bromodeoxiuridina (BrdU) *in ovo*. A: Imagen bajo lupa de un embrión de pollo en el estadio 22HH, colocado sobre el microelevador, tras una incubación de 24 horas con una microesfera (punta de flecha) implantada dorsalmente al esbozo del ala derecha). B: Microinyección de BrdU; el factor, mezclado con un colorante vital, se inyecta en el cono arterioso de forma discontinua para evitar el colapso cardíaco (20-25 inyecciones), e inmediatamente se extiende por todo el sistema circulatorio. C: Imagen bajo lupa de un embrión de pollo en el estadio 22HH extendido sobre una placa de Petri, que permite ver más claramente la técnica de microinyección cardíaca empleada en B.

Posteriormente, los embriones fueron extraídos del huevo para su datación y procesamiento histológico.

Datación de embriones

Los embriones utilizados en los experimentos fueron extraídos del huevo y depositados en una placa de Petri con solución Ringer a 4°C para eliminar sus membranas de envoltura. Cada embrión fue datado siguiendo los criterios de Hamburger & Hamilton (1951). Según estos criterios a las 24 horas los embriones alcanzaron un estadio 23-24HH. Todos aquellos que sobrepasaron a que no llegaron a este estadio fueron desechados, al igual que los embriones muertos, defectuosos, con alteraciones visibles en la zona de implantación o aquellos a los que no se les localizó la microesfera.

Fijación y procesamiento de los embriones

Parte de los embriones fueron destinados para estudio histológico, con el fin de comprobar si la colocación de la microesfera produce algún tipo de alteración morfológica en las estructuras cercanas a la implantación de la misma. Los embriones seleccionados para este estudio fueron fijados en solución de Bouin, deshidratados en alcoholes de graduación creciente, e incluidos en parafina blanda (Paraplast®) y se obtuvieron mediante microtomía series de cortes histológicos transversales en la región del esbozo del ala de 8 µm de grosor. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina, se deshidrataron de nuevo y se montaron para su observación y fotografiado al microscopio óptico (Nikon® Macrophot-FXA).

Los embriones destinados al estudio de la proliferación celular y diferenciación neural se fijaron en solución de Carnoy, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente, se incluyeron en parafina para obtener cortes histológicos de la región del esbozo del ala de 8 µm de grosor con un microtomo Leitz® W 1512.

SOLUCIÓN DE BOUIN

Ácido pícrico saturado	75 %
Formaldehído comercial (35-37%)	20%
Ácido acético glacial	5%

SOLUCIÓN DE CARNOY

Alcohol absoluto.....	60%
Cloroformo.....	30%
Ácido acético glacial....	10%

Detección inmunocitoquímica de BrdU

Una vez obtenidas las secciones se procedió a la inmunocitoquímica para BrdU. Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Desparafinación, mediante dos baños de 10 minutos cada uno de Xilol.
2. Rehidratación, mediante dos pases de 7 minutos cada uno en alcoholes de 100°. Posteriormente lavado en agua corriente durante 15-20 minutos.
3. Desnaturalización, sumergiendo las secciones en una solución de HCl 2M a 37°C durante 60 minutos.

HCl "fumante" (37%)..... 14,588 ml

H₂O destilada..... enrasar a 200 ml

4. Neutralización, mediante inmersión en una dilución de ácido bórico 0,1M a pH 8,5 durante 10 minutos.

BO₃H₃..... 1,2368 g

H₂O destilada..... enrasar a 200 ml.

Ajustar el pH a 8,5 con NaOH gota a gota.

5. Incubación en una dilución 1:100 en tampón Tris-HCl del anticuerpo monoclonal IgG anti-BrdU obtenido en ratón (Dako®), en cámara húmeda durante la noche.

Tampón Tris-HCl:

Trizma base..... 1,210 g

ClNa..... 16 g

HCl 1N..... 8,6 ml

H₂O destilada..... hasta 2000 ml

Ajustar el pH a 7,4 con HCl 1N gota a gota.

6. Para detectar el anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo secundario anti-Mouse IgG biotinado. Se incubaron las secciones en una dilución 1:20 en tampón Tris-HCl del anticuerpo secundario durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
7. Lavado en tampón Tris-HCl mediante tres baños de 10 minutos de duración cada uno.
8. Incubación en una dilución 1:20 en tampón Tris-HCl de Extravidina-Peroxidasa durante 10 minutos.
9. Revelado de la tinción con 3,3'-diaminobencidina (Sigma®), diluída 1:1500 en tampón Tris-HCl y activada con 0,08% de H₂O₂.

-Preparar la solución 3,3'-diaminobencidina (DAB) bajo campana de extracción:

Tris-HCl, pH 7,4..... 15 ml

DAB..... 10 mg (1 tableta)

Dejar 15-20 minutos em agitación y luego filtrar.

-Añadir 12 µl H₂O₂ al 30% justo antes de su uso.

10. Finalmente, los cortes se deshidrataron y se montaron para su observación y fotografiado al microscopio óptico (Nikon® Macrophot-FXA).

Contaje de núcleos BrdU-positivos y estudio estadístico

Una vez realizada la inmunocitoquímica con BrdU, se procedió al recuento de las células del tubo nervioso cuyos núcleos aparecieran marcados con el anticuerpo anti-BrdU (considerándose a dichas células BrdU positivas), con la ayuda de un microscopio óptico Nikon Macrophot-FXA.

Se seleccionaron los cortes correspondientes al área de implantación de las microesferas. Se contabilizaron los núcleos de 1 de cada 4 cortes a intervalos regulares a lo largo de toda el área de interés, reuniendo un total de 10 cortes por embrión.

Cada corte seleccionado se dividió, en cuatro cuadrantes mediante el eje longitudinal medio del tubo neural y un eje transversal que pasa por el punto medio del tubo neural. De esta forma, el tubo nervioso queda dividido en los cuadrantes cuatro cuadrantes dorsal-ventral y derecha izquierda (Figura 14). La división dorso-ventral permite valorar las posibles diferencias entre las placas alar y basal y la división derecha-izquierda si existen diferencias de lateralidad en relación a la microesfera, ya que ésta se colocó en todos los casos en el lado derecho.

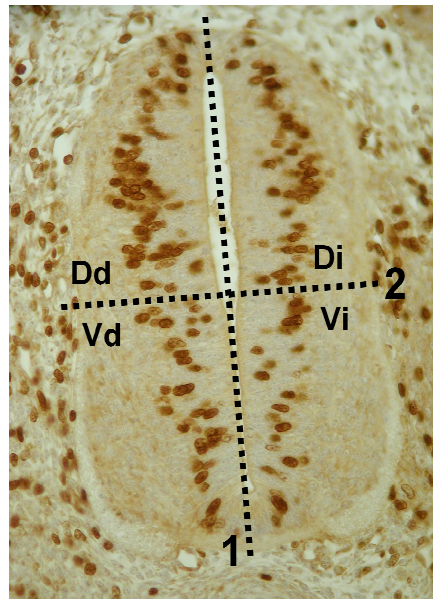


Figura 14: División en cuadrantes del tubo nervioso. El eje longitudinal o dorso-ventral (1) divide el tubo en mitades izquierda (i) y derecha (d). El eje transversal (2), trazado sobre el punto medio del anterior, divide el tubo en mitades dorsal (D) y ventral (V).

Los datos se registraron en una plantilla en la que figuran la nomenclatura numérica del embrión, el porta en el que se encuentra la microesfera, el corte en el que se realiza el conteo y el número de núcleos BrdU-positivos en cada cuadrante del tubo nervioso (Tabla 4).

Tabla 4: Plantilla de recuento de núcleos BrdU-positivos

Embrión nº:.....Porta:.....Corte:.....			
DERECHA		IZQUIERDA	
VENTRAL	DORSAL	VENTRAL	DORSAL

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos objeto de estudio, se obtuvo la media de núcleos BrdU-positivos por cuadrantes en cinco embriones de cada condición experimental, determinándose en cada caso el error estándar y practicándose un test de significatividad estadística ANOVA de un factor.

Los resultados globales han sido expuestos en diagramas de barras para facilitar su comprensión.

9.4. Estudio de la diferenciación neuroepitelial

Para el estudio de la diferenciación neuronal se realizó la determinación inmunohistoquímica de β_3 -Tubulina, cuyos pasos son los siguientes:

1. Tras la desparafinación y la rehidratación de los cortes, se realiza un bloqueo con una solución de PBS /BSA (Seroalbúmina bovina) al 1% durante 20 minutos.

PBS 0,1 M, pH 7,4

Na H₂ PO₄H₂O.....2,964 g

Na H₂ PO₄.....11,4615 g

H₂O destilada.....1 litro

2. Se añadió el anticuerpo primario IgGMouse anti-human III β -tubulina (BAbCo®) en dilución 1:200 en PBS (10 μ l de anticuerpo + 5 ml de PBS). Se incubó durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda.
3. Transcurrido el tiempo de incubación se realizan tres baños en PBS de 5 minutos de duración cada uno.
4. Se añade el anticuerpo secundario, anti-mouse IgG Alexa-488 (dilución 1:3000 en PBS). Se incubó a temperatura ambiente durante una hora en cámara húmeda protegida de la luz.
5. Finalmente, los cortes se lavan 3 veces en PBS durante 5 minutos cada uno y se realiza el montaje en medio acuoso para ser visualizados y fotografiados con un microscopio confocal Zeiss LSM-310.

9.5. Número de embriones utilizados

En la Tabla 5 se expresa el número total de embriones empleados en cada condición experimental.

Tabla 5: Número de embriones utilizados

	Experimentales	Control Ringer	Control sin manipular
Hematoxilina-eosina	5	5	5
BrdU	5	5	5
Tubulina	4	4	4
Desechados*	40	36	0
Total	54	50	14

***Embriones desechados:** se incluyen en este apartado los embriones muertos o malformados durante el cultivo, embriones que sufrieron alguna hemorragia durante su manipulación y embriones en los que la microesfera no se implantó adecuadamente. No se incluyen embriones muertos, malformados o fuera de estadio antes de su manipulación.

10. EFFECTO "IN VIVO" DEL E-CSF SOBRE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CÉLULAS DE ESTIRPE NO NEUROEPITELIAL

Se realizaron experimentos en dos grupos celulares: en el mesénquima cefálico y en la membrana amniótica.

10.1. Estudio de la diferenciación neuronal en mesénquima

Para conocer el efecto del E-CSF sobre la diferenciación neuronal en el mesénquima se establecen los siguientes grupos:

1. Controles a los que no se realiza ningún tipo de manipulación. Sirven de referencia para analizar los datos obtenidos en los siguientes grupos.
2. Controles a los que se implanta una microesfera impregnada con solución Ringer. Sirven para comprobar si la manipulación embrionaria tiene algún efecto posterior.
3. Grupo experimental: embriones a los que se implanta una microesfera impregnada de E-CSF.
4. Grupo experimental: embriones a los que se implanta una esfera impregnada de 10ng/ml de FGF-2 + ácido retinoico 0,1 mM, mediante inmersión a 4°C al menos durante 24 horas previas al experimento.

Siguiendo la técnica detallada anteriormente de implantación de microesferas, se introdujo en los embriones (que alcanzaron el estadio 18HH tras 65-69 horas de incubación), una microesfera en el mesénquima situado en posición dorsal al primer arco aórtico, próximo al ectodermo (Figura 15).

Posteriormente los embriones se reincubaron durante 24-48 horas, hasta alcanzar los estadios 22-25HH (Figura 16), y se estudió el grado de diferenciación neuronal mediante la determinación inmunohistoquímica de β_3 -Tubulina, siguiendo el protocolo descrito con anterioridad.

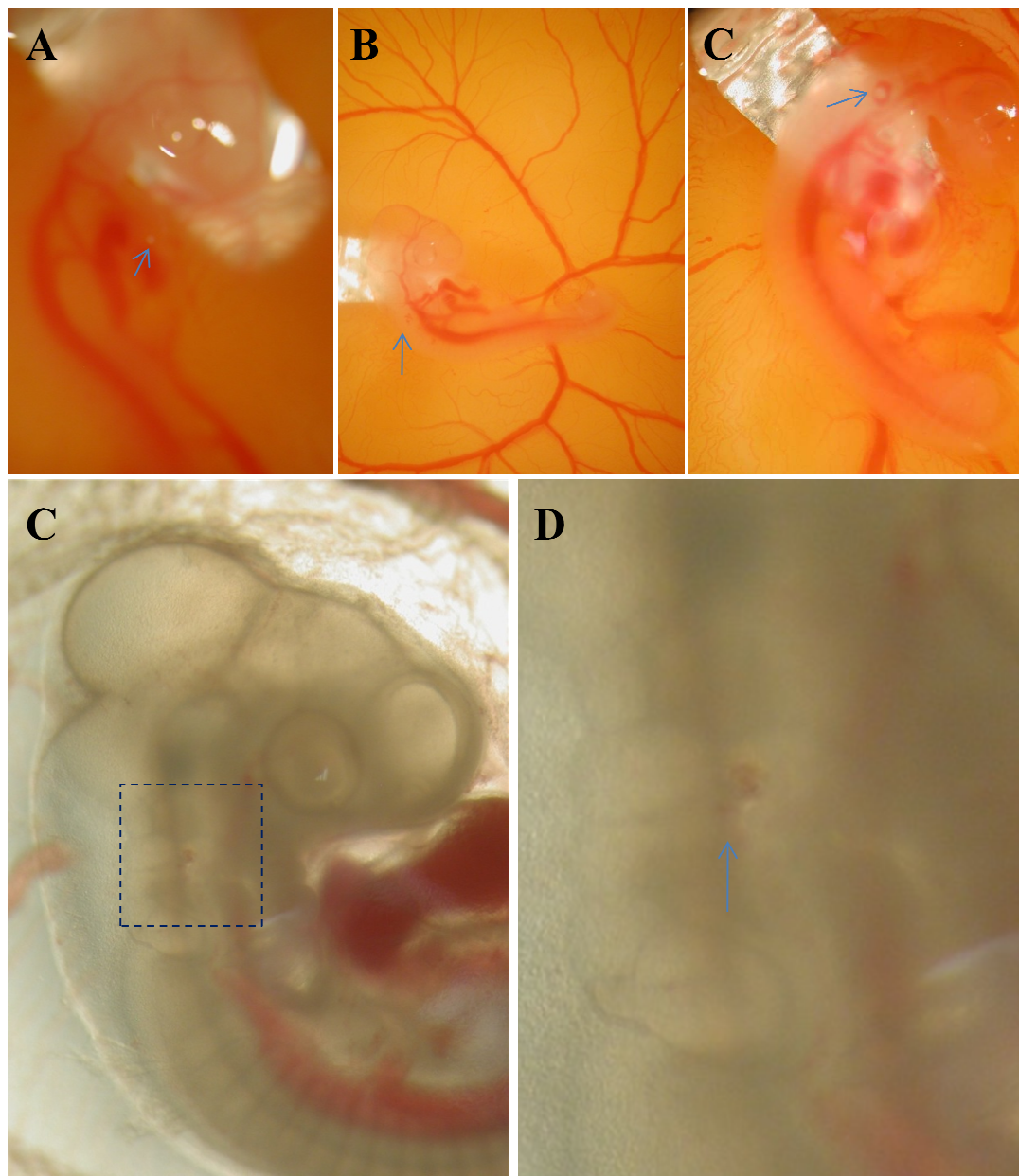


Figura 15: Implantación de microesferas en mesénquima. Implantación de una microesfera (impregnada en CSF, FGF-2 o PBS) en el mesénquima de un embrión de pollo en estadio 19HH, mediante una incisión con una aguja de tungsteno afilada y doblada, a nivel dorsal al primer arco branquial próximo al ectodermo **A,B,C**: Aspecto de la microesfera una vez colocada en el embrión *in ovo*. **D, E**: Imagen del embrión, extraído del huevo y extendido sobre una placa de Petri, una vez colocada la microesfera (flecha).

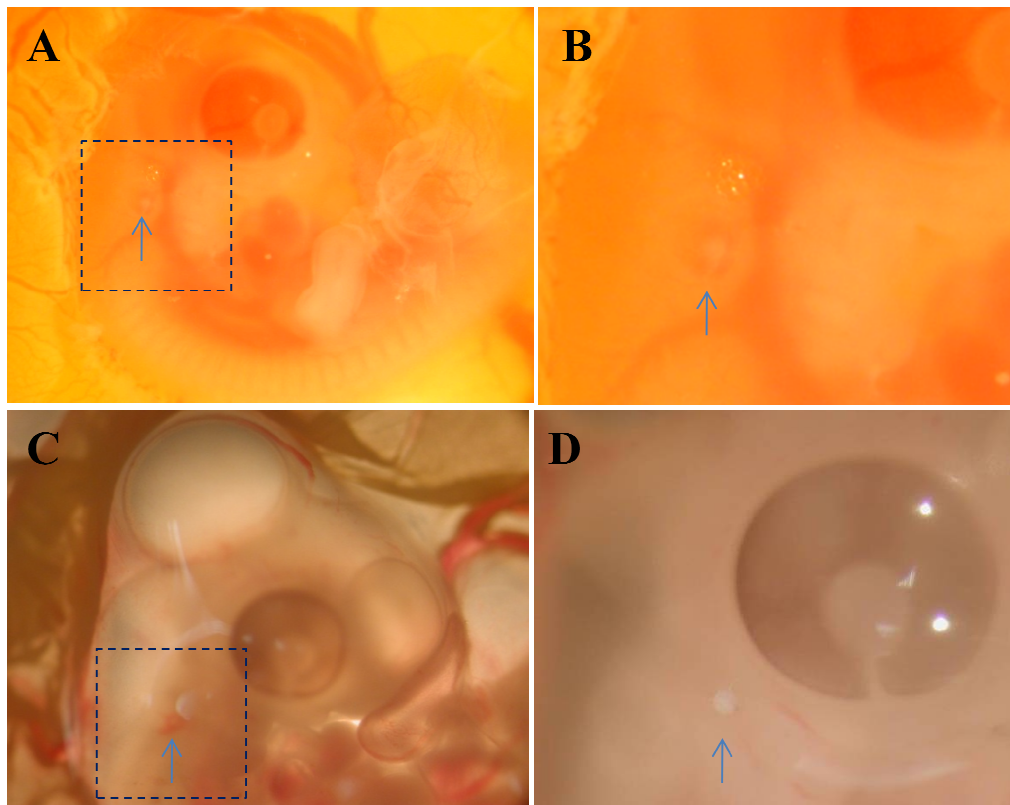


Figura 16: Implantación de microesferas en mesénquima. Implantación de una microesfera (impregnada en CSF, FGF2 o PBS) en el mesénquima de un embrión de pollo en estadio 19HH, mediante una incisión con una aguja de tungsteno afilada y doblada, a nivel dorsal al primer arco branquial próximo al ectodermo **A, B:** Aspecto de la microesfera una vez colocada en el embrión *in ovo* en el estadio 23HH, después de 24 de incubación. **C, D:** Imagen del embrión en estadio 23 HH, extraído del huevo y extendido sobre una placa de Petri, una vez colocada la microesfera (flecha), después de 24 horas de incubación.

En la Tabla 6 se expresa el número total de embriones empleados en cada condición experimental.

Tabla 6: Número de embriones utilizados

	CSF	FGF2 + Retinoico	Control PBS	Control sin manipular
Tubulina	4	3	3	3
Desechados*	3	3	1	3
Total	7	6	4	6

***Embriones desechados: se incluyen en este apartado los embriones muertos, contaminados o malformados durante el cultivo, embriones que sufrieron alguna hemorragia durante su manipulación y embriones en los que el papel no se implantó adecuadamente. No se incluyen embriones muertos, malformados o fuera de estadio antes de su manipulación.**

10.2. Estudio "in vivo" de la diferenciación neuronal en membrana amniótica

Se implantaron en la membrana amniótica (MA) de embriones de pollo en estadios 19-20HH piezas pequeñas de papel filtro Milipore de 0,22 μm de diámetro de poro, previamente impregnadas con E-CSF o con una solución de 10ng/ml de FGF-2 + ácido retinoico 0.1 mM mediante inmersión a 4°C, al menos durante 24 horas previas al experimento; para el grupo control se utilizó una solución de PBS (Figura 17). Posteriormente, los embriones fueron recultivados durante períodos de 48 y 72 horas, hasta alcanzar los estadios 26-27 y 29-30 HH, respectivamente. Seguidamente, las MA fueron extraídas y se valoró en ellas el grado de diferenciación neuronal mediante la determinación inmunocitoquímica "in toto" de β 3-tubulina y de nestina.



Figura 17: Implantación de papel filtro Milipore de 0,22 μm de diámetro de poro en la membrana amniótica de un embrión de pollo en estadio 19HH.

Protocolo de inmunohistoquímica para nestina

1. Desparafinación con xilol mediante dos baños de 10 minutos cada uno.
2. Rehidratación: se realizan dos baños con alcohol 100° de 10 minutos cada uno. Posteriormente se lava durante 15 minutos en H_2O corriente y a continuación con H_2O destilada mediante 3 baños de 5 minutos cada uno.
3. Se realiza una inmersión en buffer de citrato sódico durante 15 minutos en microondas, con cuidado de que no hierva (se cambia el buffer 4 veces) y se dejar enfriar después.

BUFFER CITRATO SÓDICO, pH 6:

- 95 ml. ácido cítrico 0.1M
- 415 ml. citrato sódico 0.1M
- H₂O destilada hasta 1.000 ml.
- Ajustar pH a 6.

4. Se procede al bloqueo mediante un baño de 20 minutos de duración con la solución PBS/BSA 1%.
5. Se añade el anticuerpo primario IgG monoclonal anti-mouse nestina (ChemiCon®) mediante una dilución 1:200 en PBS, y se incuba toda la noche a 4°C en cámara húmeda.
6. Lavar en PBS mediante 3 baños de 5 minutos cada uno.
7. Se añade el anticuerpo secundario Anti-Mouse IgG Alexa-488 en una dilución 1:1000 en PBS. Se incubar 60 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda.
8. Lavar en PBS mediante 3 baños de 5 minutos cada uno.
9. Montaje en medio acuoso.

En la Tabla 7 se expresa el número total de embriones empleados en cada condición experimental.

Tabla 7: Número de embriones utilizados

	CSF	FGF2 + Retinoico	Control PBS
Tubulina	7	6	7
Desechados*	4	5	4
Total	11	11	11

	CSF	FGF2 + Retinoico	Control PBS
Nestina	5	4	4
Desechados*	7	6	4
Total	12	10	8

***Embriones desechados: se incluyen en este apartado los embriones muertos, contaminados o malformados durante el cultivo, embriones que sufrieron alguna hemorragia durante su manipulación y embriones en los que el papel no se implantó adecuadamente. No se incluyen embriones muertos, malformados o fuera de estadio antes de su manipulación.**

RESULTADOS

RESULTADOS

11. EFECTO "IN VIVO" DEL E-CSF SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN MÉDULA A NIVEL DEL ESBOZO DEL ALA

- 11.1. Efecto del E-CSF sobre la proliferación celular en médula
- 11.2. Efecto del E-CSF sobre la diferenciación celular en médula

12. EFECTO "IN VIVO" DEL E-CSF SOBRE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CÉLULAS DE ESTIRPE NO NEUROEPITELIAL

- 12.1. Estudio de la diferenciación neuronal en mesénquima
- 12.2. Estudio "in vivo" de la diferenciación neuronal en membrana amniótica

11. EFECTO "IN VIVO" DEL E-CSF SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN MÉDULA A NIVEL DEL ESBOZO DEL ALA

Estos experimentos se realizaron mediante la implantación por microcirugía, en embrión de pollo en estadio 19-20HH, de una microesfera impregnada en E-CSF, procedente de embriones de pollo de estadio 25HH, en el espacio intersomático a nivel del esbozo del ala derecha y su posterior incubación durante 24 horas, hasta alcanzar el estadio 23-24HH. El uso de E-CSF procedente de embriones de pollo en estadio 25HH se debe a que Gato et al. (2005) demostraron su efecto sobre la proliferación y la diferenciación neuronal en cultivos organotípicos de neuroepitelio mesencefálico. Además estos autores comprobaron que apenas existían diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición del E-CSF entre el estadio 20 HH y el 25HH.

11.1. Efecto del E-CSF sobre la proliferación celular en médula

Inicialmente se realizó un estudio morfológico con objeto de comprobar si la propia manipulación embrionaria, mediante la implantación de microesferas, producía alteraciones histológicas en el neuroepitelio. Para ello se colocaron microesferas en el espacio intersomático a nivel del esbozo del ala derecha a un total de 5 embriones control en estadio 19-20HH, se reincubaron durante 24 horas hasta alcanzar el estadio 23-24 HH. Una vez obtenidos los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina. En estos experimentos no se observaron cambios en la estructura neuroepitelial (Figuras 18A, B y C) y, en algunos casos sólo leves deformaciones mecánicas que no produjeron modificaciones en la arquitectura tisular (Figura 18D). Únicamente se observó la presencia de condensaciones mesenquimatosas en torno a la microesfera (Figura 19).

También pudimos observar variaciones en la posición dorso-ventral de la microesfera en relación a la médula espinal, aunque todos los casos estaban en contacto o muy próximos a la superficie neuroepitelial.

También pudimos observar variaciones en la posición dorso-ventral de la microesfera en relación a la médula espinal, aunque todos los casos estaban en contacto o muy próximos a la superficie neuroepitelial.

Sin embargo, en los grupos experimentales a los que se les implantó la microesfera impregnada en CSF sí se observaron modificaciones significativas en la arquitectura tisular (Figura 19). Fundamentalmente se apreciaron alteraciones a nivel de la placa alar, consistentes en un excesivo crecimiento de la misma desarrollándose en muchos casos, estructuras tubulares con aspecto de epitelio pseudoestratificado, similar a la que presenta el tubo neural normal en fases tempranas del desarrollo.

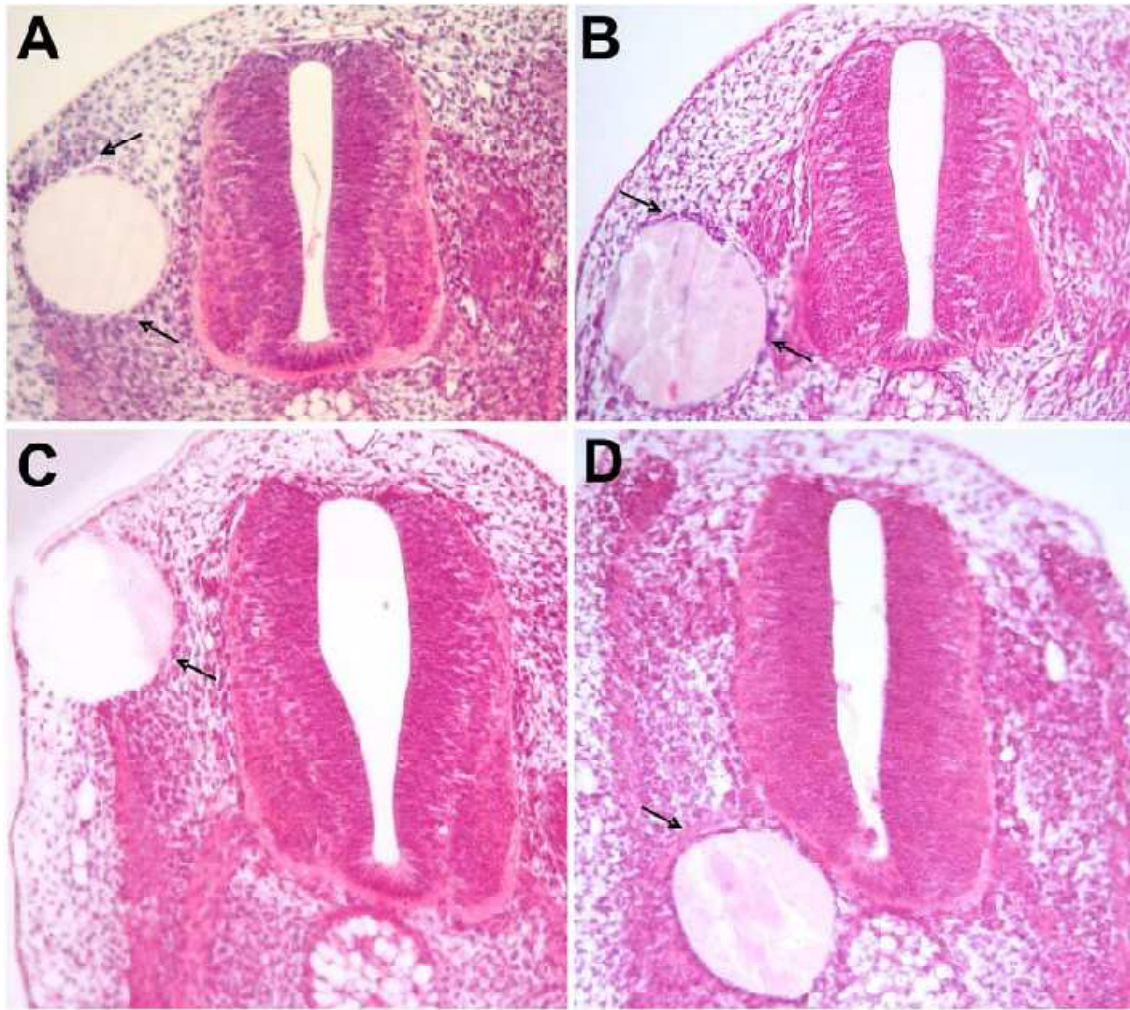


Figura 18: Implantación de microesferas, estudio morfológico. Tinción con hematoxilina-eosina de embriones de pollo en estadio 21HH a los que se les implantó una microesfera en el estadio 18HH (24 horas antes). Se observa que la microesfera, a pesar de su tamaño relativo, no causa alteraciones morfológicas en la médula espinal (A, B, C), o produce deformaciones mecánicas leves que no alteran la arquitectura neuroepitelial (D). Únicamente se aprecian ligeras condensaciones del mesénquima que rodea a la microesfera (flechas).

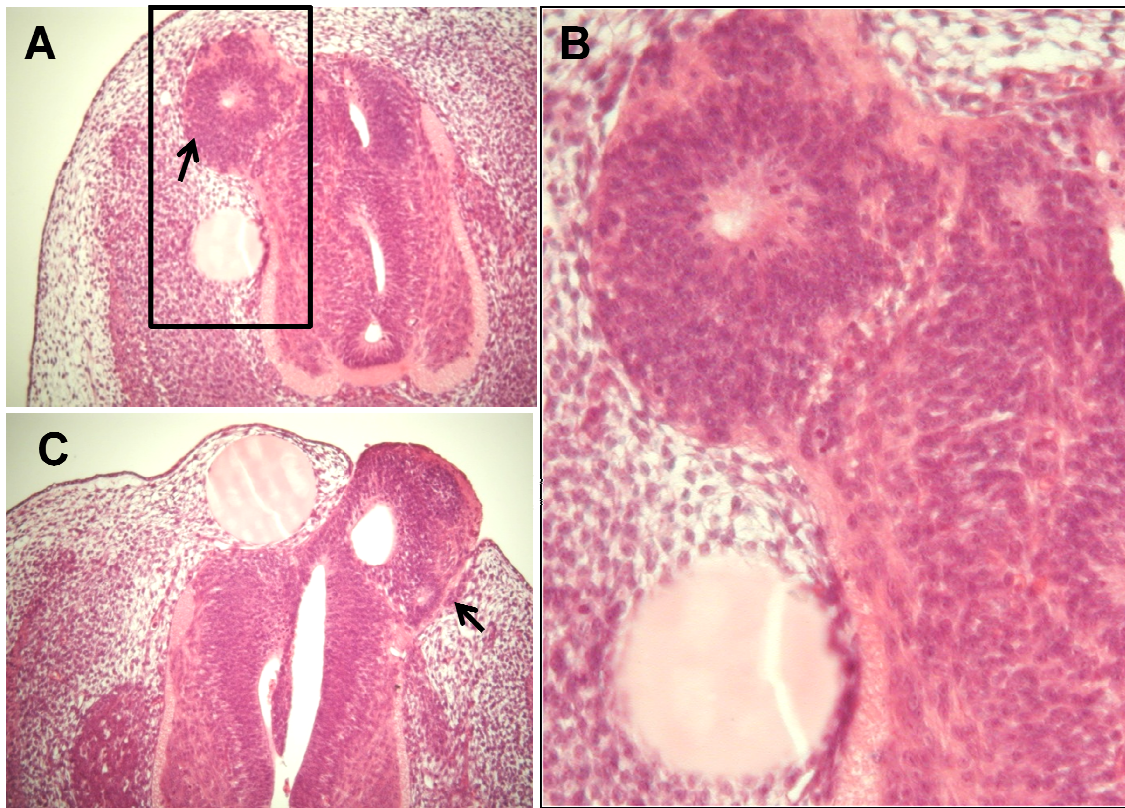


Figura 19: Estudio morfológico de la proliferación celular en médula. Tinción con hematoxilina-eosina en embriones de pollo en estadio 23-24HH a los que se implantó una microesfera en estadio 19-20HH (24 horas antes) impregnada en E-CSF a nivel del espacio intersomítico del esbozo del ala. La implantación de una microesfera impregnada en CSF produce una alteración en la arquitectura neuroepitelial como la aparición de un nuevo tubo neural (Punta de flecha).

Para determinar si el E-CSF presenta efectos sobre la proliferación neuroepitelial durante el desarrollo de la médula espinal hemos realizado un conteo en la zona de implantación de la microesfera, de las células que han incorporado Bromodeoxiuridina (BrdU) administrada por vía intracardiaca una hora previa a la fijación del embrión. En algunos embriones se observó, al igual que ocurría con la tinción de hematoxilina-eosina, diferencias morfológicas entre los grupos controles y los experimentales (Figura 20) traducidas en una condensación celular únicamente (Figura 20E) o asociado a una neoformación tubular (Figura 20D).

Para el recuento de los núcleos se seleccionaron los cortes correspondientes al área de implantación de las microesferas y de ellos, se escogieron 1 de cada 4 cortes a intervalos regulares a lo largo de toda el área de interés, reuniendo un total de 10 cortes por embrión. Cada corte seleccionado se dividió, en cuatro cuadrantes mediante el eje longitudinal medio del tubo neural y un eje transversal que pasa por el punto medio del tubo neural. De esta forma, el tubo nervioso queda dividido en los cuatro cuadrantes dorsal-ventral y derecha-izquierda.

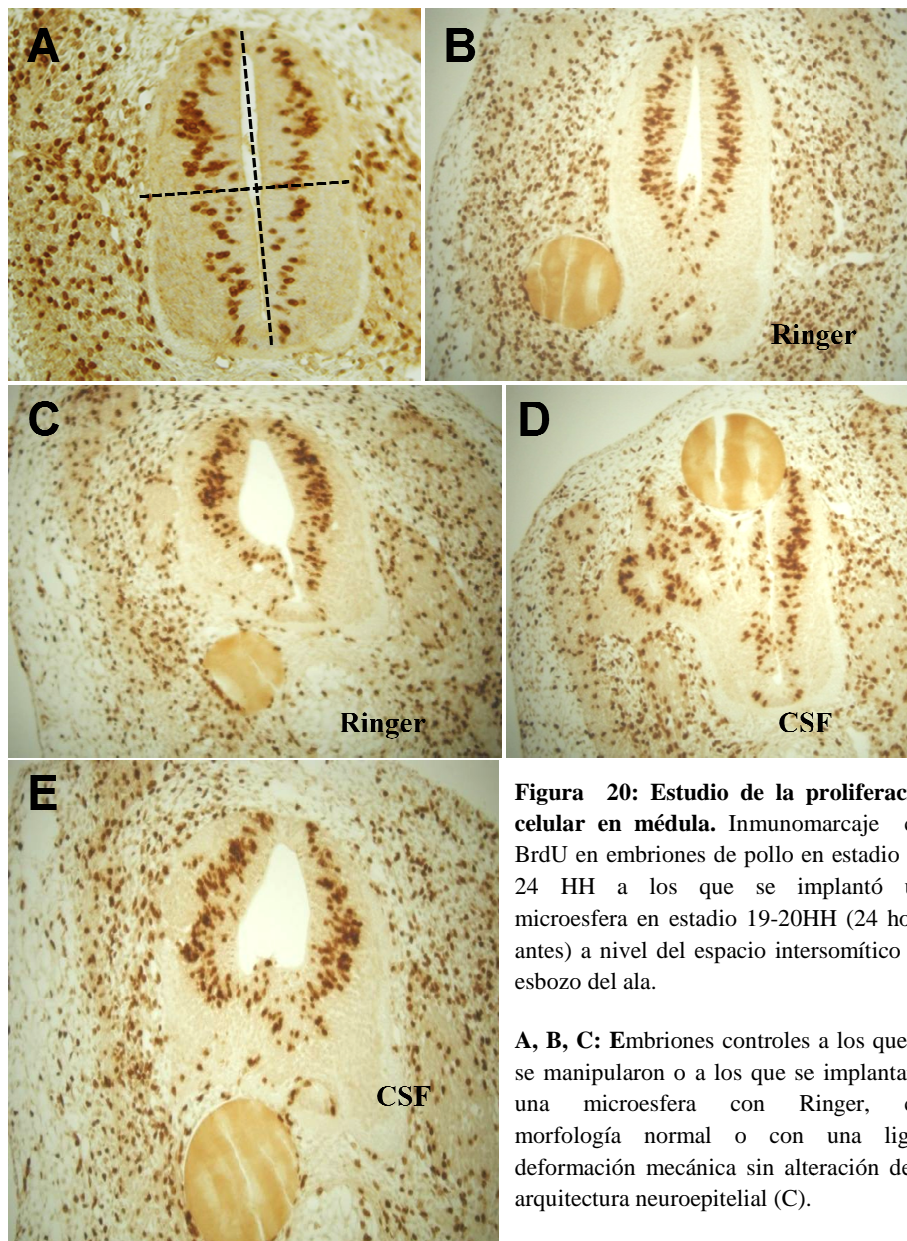


Figura 20: Estudio de la proliferación celular en médula. Inmunomarcaje con BrdU en embriones de pollo en estadio 23-24 HH a los que se implantó una microesfera en estadio 19-20HH (24 horas antes) a nivel del espacio intersomático del esbozo del ala.

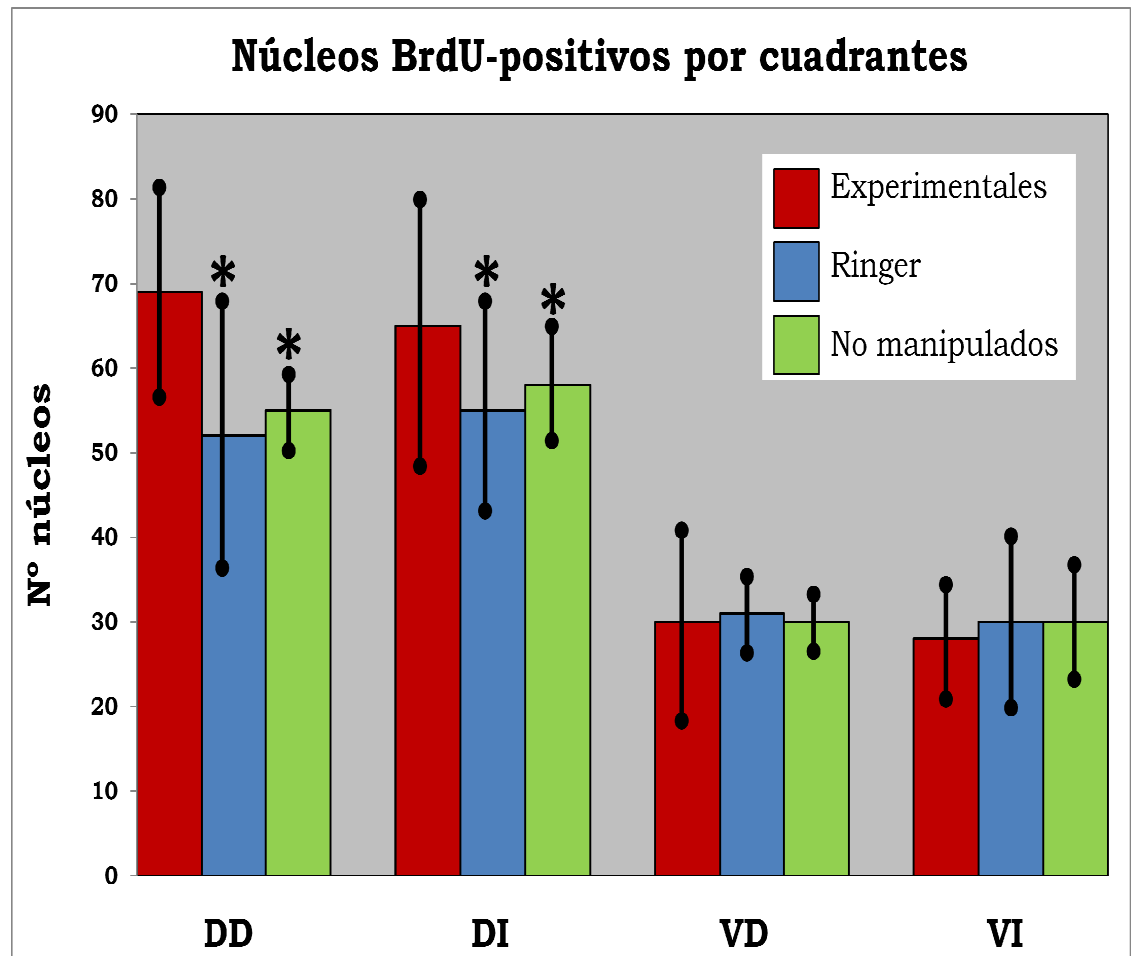
A, B, C: Embriones controles a los que no se manipularon o a los que se implantaron una microesfera con Ringer, con morfología normal o con una ligera deformación mecánica sin alteración de la arquitectura neuroepitelial (C).

D, E: Neoformaciones tubulares neuroepiteliales que sobresalen de la médula espinal (D) y engrosamiento de la pared neuroepitelial (E) en embriones con la microesfera impregnada en CSF.

En los embriones control no manipulados se comprobó que la tasa de replicación celular fue visiblemente mayor en los cuadrantes dorsales que en los ventrales (Gráfico 1).

Los controles a los que se implantó una microesfera impregnada con solución de Ringer presentaban un grado de incorporación de BrdU muy similar al de los controles sin manipular (Gráfico 1), y no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Estos resultados indican que la manipulación, como la microdissección y la implantación de la microesfera, no influye en la proliferación celular en la médula espinal.

Respecto al grupo experimental, la exposición a la microesfera impregnada en CSF, produjo un incremento estadísticamente significativo del número de células que incorporan BrdU en ambos cuadrantes dorsales. En el cuadrante dorsal izquierdo, estos efectos fueron de intensidad ligeramente menor (Gráfico 1), sin que existan diferencias estadísticamente significativas entre ellos. En los cuadrantes ventrales paradójicamente se produjo una reducción de la tasa de replicación celular de los embriones experimentales en relación con los controles.



EXP	69 ± 11	65 ± 14	30 ± 10	28 ± 6
RINGER	52 ± 14	55 ± 11	31 ± 4	30 ± 9
NO	55 ± 4	58 ± 6	30 ± 3	30 ± 6

Gráfico 1: Análisis cuantitativo de síntesis de ADN mediante contabilización de núcleos BrdU positivos a nivel de la médula espinal. Las barras indican el promedio de núcleos BrdU positivos contabilizados en cada cuadrante de la médula espinal, y por cada condición experimental. En la tabla se expresan estos mismos valores numéricamente \pm la desviación estándar. Nótese el incremento de la proliferación, estadísticamente significativo, en los cuadrantes dorsal derecho (Dd) y dorsal izquierdo (Di) en el grupo experimental, de acuerdo con la prueba de significatividad estadística ANOVA de un factor, y la disminución en los dos cuadrantes ventrales, derecho (Vd) e izquierdo (Vi).

11.2. Efecto del E-CSF sobre la diferenciación neuronal en médula

El grado de diferenciación neuronal se ha estudiado mediante la determinación inmunocitoquímica de la expresión de microtúbulos citoplasmáticos denominados β 3-tubulina en embriones de pollo en los que se ha implantado, mediante microdisección, una microesfera con CSF (grupos experimentales). En los embriones controles, se implantó una microesfera impregnada con solución de Ringer mientras que en otros no se realizó ninguna intervención con el fin de observar si la manipulación producía algún efecto sobre la diferenciación.

En los embriones experimentales se aprecia un incremento del inmunomarcaje frente a β 3-tubulina a nivel de la placa basal en el lado que está en contacto con la microesfera en relación con los controles. En ocasiones las microesferas se implantaron en el interior de la cavidad neural, en estos casos los embriones tratados con E-CSF presentaban un intenso inmunomarcaje frente a β 3-tubulina en torno a la microesfera (Figura 21C) y también aparecieron células marcadas en la capa endodimeal (Figura 21D), incluso con la formación de nuevas vesículas (Figura 21D), que no aparecen en los embriones control (embriones con implantación de una microesfera impregnada de Ringer y embriones no manipulados) (Figuras 21E, F y G).

Estos datos parecen indicar que el E-CSF puede potenciar la diferenciación neuronal a nivel de la médula espinal durante los estadios del desarrollo analizados especialmente en la placa basal.

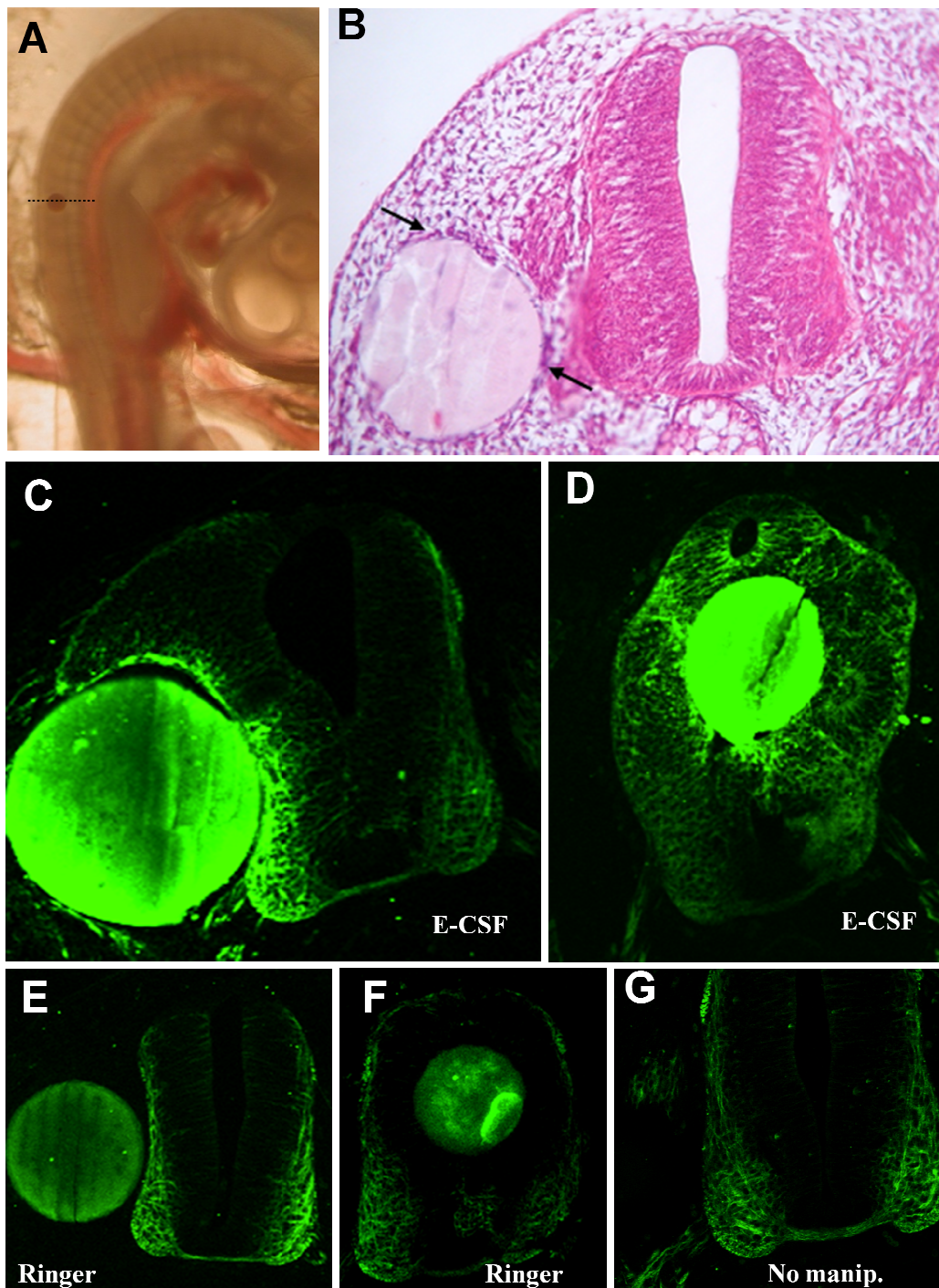


Figura 21: Inmunomarcaje con $\beta 3$ -tubulina para comprobar diferenciación neuronal a nivel de la placa basal de la médula espinal. Se ha implantado una microesfera en el espacio intersomático a nivel de la base del esbozo del ala en embriones de pollo de estadio 19-20HH, y se les ha reincubado hasta alcanzar el estadio 23-24HH (A). La línea de puntos en A marca el nivel de sección de B, C, D, E, F y G correspondiente a la zona de implantación de la microesfera. Los embriones tratados con E-CSF (C, D) muestran una mayor intensidad de inmunomarcaje que los embriones control e incluso la formación de formaciones vesiculares (D). Los embriones control tratados con Ringer (E, F) y los no manipulados (G) presentan un grado de diferenciación normal para el estadio 23-24 HH, a nivel de la placa basal, y no muestran diferencias entre ellos.

12. EFECTO "IN VIVO" DEL E-CSF SOBRE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CÉLULAS DE ESTIRPE NO NEUROEPITELIAL

12.1. Estudio de la diferenciación neuronal en mesénquima

Para el estudio de la diferenciación neuronal en mesénquima, se introdujo en los embriones en estadio 18HH, según la técnica ya detallada en material y métodos, una microesfera en el mesénquima situado en posición dorsal al primer arco aórtico, próximo al ectodermo. Tras su reincubación durante 24-48 horas, hasta alcanzar los estadios 22-25HH, se estudió el grado de diferenciación neuronal mediante la determinación inmunohistoquímica de β_3 -Tubulina. Se establecieron dos grupos controles y dos experimentales. Un grupo control sin manipular y otro con la microesfera impregnada en PBS. En el grupo experimental la microesfera implantada se impregnó bien en E-CSF o bien en una solución con 10ng/ml de FGF-2 + ácido retinoico 0,1 mM, mediante inmersión a 4°C al menos durante 24 horas previas al experimento.

Se observó en los grupos experimentales la presencia de inmunomarcaje frente a β_3 -tubulina (Figuras 22E,F) e incluso, la aparición de prolongaciones que sugieren el desarrollo de axones primitivos (Figuras 22G,H). Este inmunomarcaje fue más intenso en el grupo con E-CSF que en el grupo con la microesfera impregnada en FGF-2 y ácido retinoico. Sin embargo, en los controles no apareció ningún inmunomarcaje lo que indica, la ausencia de diferenciación neuronal en este grupo (Figuras 22C,D).

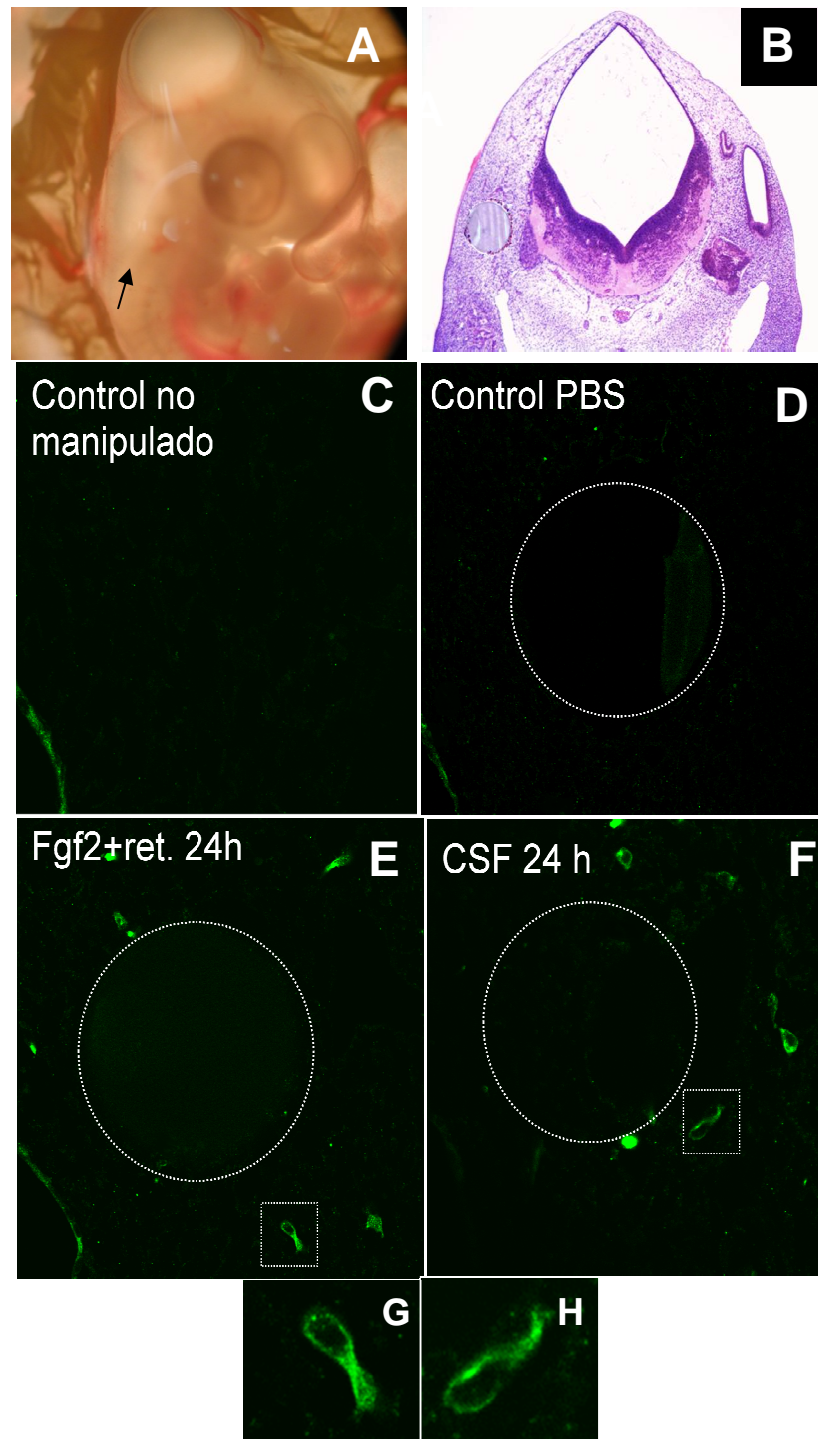


Figura 22: Inmunomarcaje con $\beta 3$ -tubulina para comprobar diferenciación neuronal en mesénquima. Microesfera implantada en el mesénquima situado en posición dorsal al primer arco aórtico, próximo al ectodermo, en embriones de pollo de estadio 18HH, y se les ha reincubado hasta alcanzar el estadio 22-25HH. Punta de flecha en A: Lugar de implantación de la microesfera, existiendo alrededor de ella una ligera hemorragia. B: Tinción con H-E del corte de embrión de pollo donde se observa la localización de la microesfera en el mesénquima. Las circunferencias señalan el lugar donde se sitúa la microesfera. Grupos controles (C, D): no se objetiva inmunomarcaje, lo que indica la ausencia de diferenciación neuronal. Existencia de inmunomarcaje frente a $\beta 3$ -tubulina en la imagen con la microesfera impregnada en en FGF-2 + ácido retinoico y en E-CSF, siendo más intenso en este último (E, F). G, H: Ampliaciones de E y F. Se aprecian prolongaciones citoplásmicas indicando el desarrollo de axones primitivos.

12.2. Estudio "in vivo" de la diferenciación neuronal en membrana amniótica

Para el estudio de la diferenciación neuronal en amnios se implantaron en la membrana amniótica (MA) de embriones de pollo en estadios 19-20-HH piezas pequeñas de papel filtro Milipore de 1mm² de área y de 0,22 μm de diámetro de poro, previamente impregnadas con E-CSF o con factores diferenciadores a células nerviosas ya conocidos como son el FGF-2 (Gensburger et al., 1987; Tao et al., 1997; Low et al., 2008) y el ácido retinoico (Gonçalves et al., 2005; Wang et al., 2005; Jacobs et al., 2006). Nosotros utilizamos una solución de factores de 10ng/ml de FGF-2 + ácido retinoico 0.1 mM mediante inmersión a 4°C, al menos durante 24 horas previas al experimento; para el grupo control se utilizó una solución de PBS. Posteriormente, los embriones fueron recultivados durante períodos de 48 y 72 horas, hasta alcanzar los estadios 26-27 y 29-30 HH, respectivamente. Seguidamente, las MA fueron extraídas y se valoró en ellas el grado de diferenciación neuronal mediante la determinación inmunocitoquímica de β₃-tubulina y de nestina.

En ningún caso se obtuvo inmunomarcaje frente a β₃-tubulina o nestina en la membranas amniótica de los embriones del grupo control (Figura 23F; Figura 24 B; Figura 25B), indicando que los marcadores neuronales empleados no están presentes de forma natural *in vivo* en las fases del desarrollo estudiadas por nosotros. Las MA tratadas con FGF-2 + ácido retinoico (Figura 23E; Figura 24G; Figura 25F) mostraron inmunomarcaje positivo a β₃-tubulina y nestina en todos los casos, lo que indica que las células amnióticas pueden diferenciarse *in vivo* a neuronas frente a estímulos neurogénicos conocidos.

En los grupos tratados con E-CSF, la MA presentó también inmunomarcaje positivo a β_3 -tubulina y nestina (Figura 23B; Figura 24C; Figura 25C), si bien en este caso la intensidad del marcaje fue mayor que en el grupo tratado con FGF₂ + ácido retinoico, pudiéndose observar en algunas ocasiones prolongaciones celulares que podrían indicar neuritogénesis (Flechas blancas en Figuras 23, 24 y 25). También se observa que el inmunomarcaje es más intenso después de 3 días de incubación que tras 24 horas, tanto en los grupos tratados con FGF-2 + ácido retinoico como en los tratados con E-CSF, por lo que este efecto diferenciador es directamente proporcional al tiempo de exposición de los estímulos neurogénicos (Figuras 23, 24, 25).

Estos datos indican que el E-CSF presenta un efecto neurodiferenciador sobre poblaciones celulares que en condiciones normales no están en contacto con él.

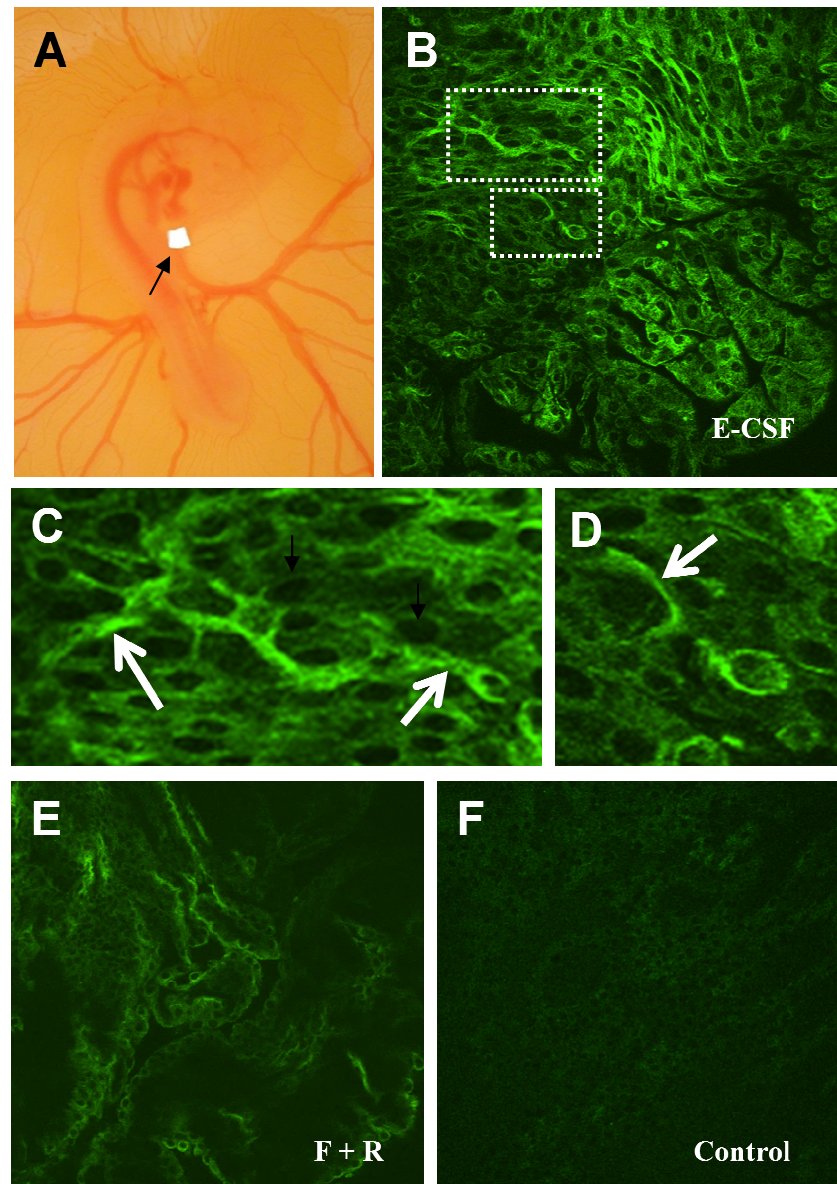


Figura 23: Inmunomarcaje con β_3 -tubulina en células amnióticas de embrión de pollo tras 48 horas de incubación para comprobar diferenciación neuronal en amnios. Se ha implantado una pieza de papel filtro Milipore de 1mm^2 de área y de $0,22\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro en la membrana amniótica, previamente impregnadas con E-CSF o con una solución de FGF-2 + ácido retinoico en los grupos experimentales y para el grupo control se utilizó una solución de PBS, en embriones de pollo en estadio 19-20HH. Posteriormente, los embriones fueron recultivados durante períodos de 24 hasta alcanzar los estadios 26-27. La punta de flecha en **A** indica el lugar de implantación del papel filtro Milipore. **B:** Extensión de un fragmento de membrana amniótica situada por debajo del papel impregnado con E-CSF donde se observa inmunomarcaje positivo para β_3 -tubulina. **C, D:** Ampliaciones de **B** donde se observan marcaje citoplásmico de tubulina (flechas negras) y en algunas células se observan también prolongaciones citoplásmicas con inmunomarcaje positivo de forma fibrilar que corresponden al desarrollo de axones primitivos (flechas blancas). **E:** Extensión de un fragmento de membrana amniótica situada por debajo del papel impregnado con una solución de FGF-2 + ácido retinoico donde se observa inmunomarcaje positivo para β_3 -tubulina aunque de menor intensidad que con E-CSF. **F:** Extensión de un fragmento de membrana amniótica situada por debajo del papel impregnado con PBS (grupo control) con inmunomarcaje negativo.

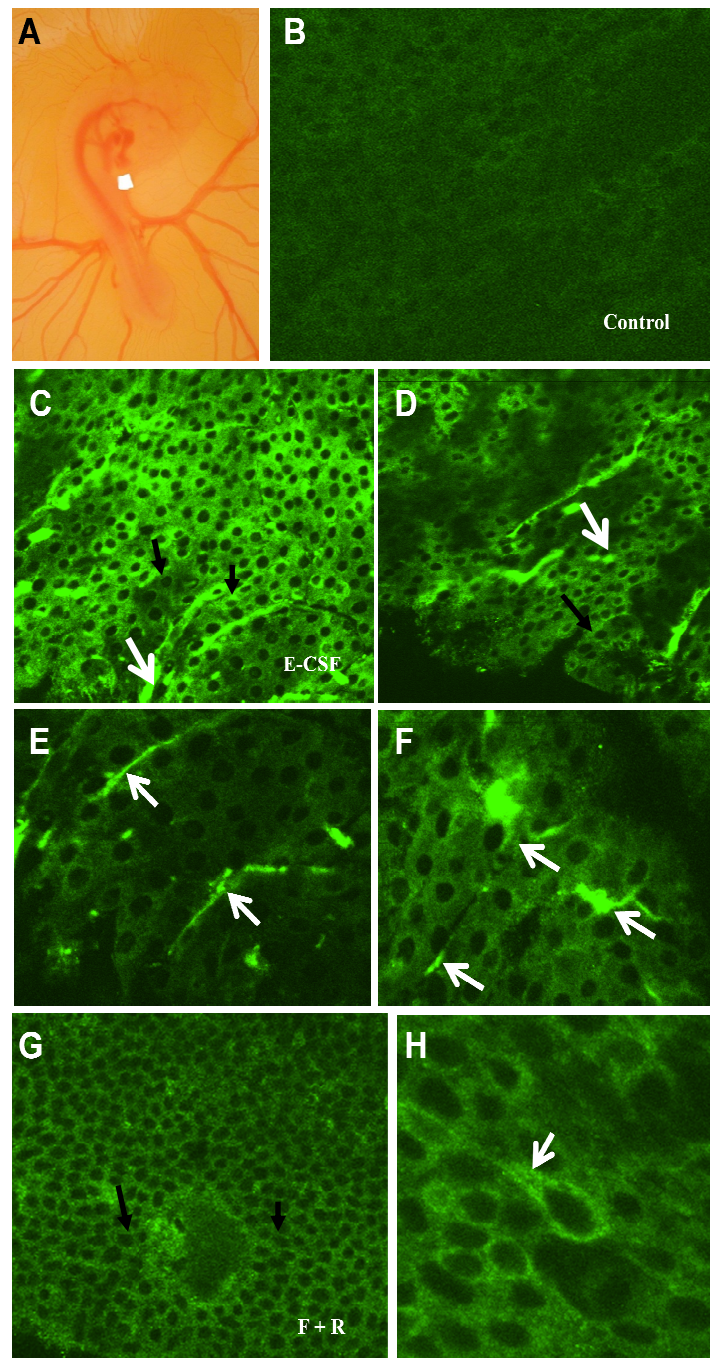


Figura 24: Inmunomarcaje con β_3 -tubulina en células amnióticas de embrión de pollo tras 72 horas de incubación para comprobar diferenciación neuronal en amnios. Se ha implantado una pieza de papel filtro Milipore en la membrana amniótica (A), previamente impregnadas con E-CSF o con una solución de FGF-2 + ácido retinoico en los grupos experimentales y para el grupo control se utilizó una solución de PBS, en embriones de pollo en estadio 19-20HH. Posteriormente, los embriones fueron recultivados durante períodos de 72 hasta alcanzar los estadios 29-30HH. **B:** Extensión de un fragmento de membrana amniótica situada por debajo del papel impregnado con PBS (grupo control) con inmunomarcaje negativo. **C, D, E y F:** Extensión de un fragmento de membrana amniótica situada por debajo del papel impregnado con E-CSF donde se observa inmunomarcaje positivo citoplásmico para β_3 -tubulina (flechas negras). Se observa también prolongaciones celulares con inmunomarcaje positivo indicando neuritogénesis (flechas blancas). **G, H:** Extensión de un fragmento de membrana amniótica situada por debajo del papel impregnado con una solución de FGF-2 + ácido retinoico donde se observa inmunomarcaje positivo para β_3 -tubulina aunque de menor intensidad que con E-CSF.

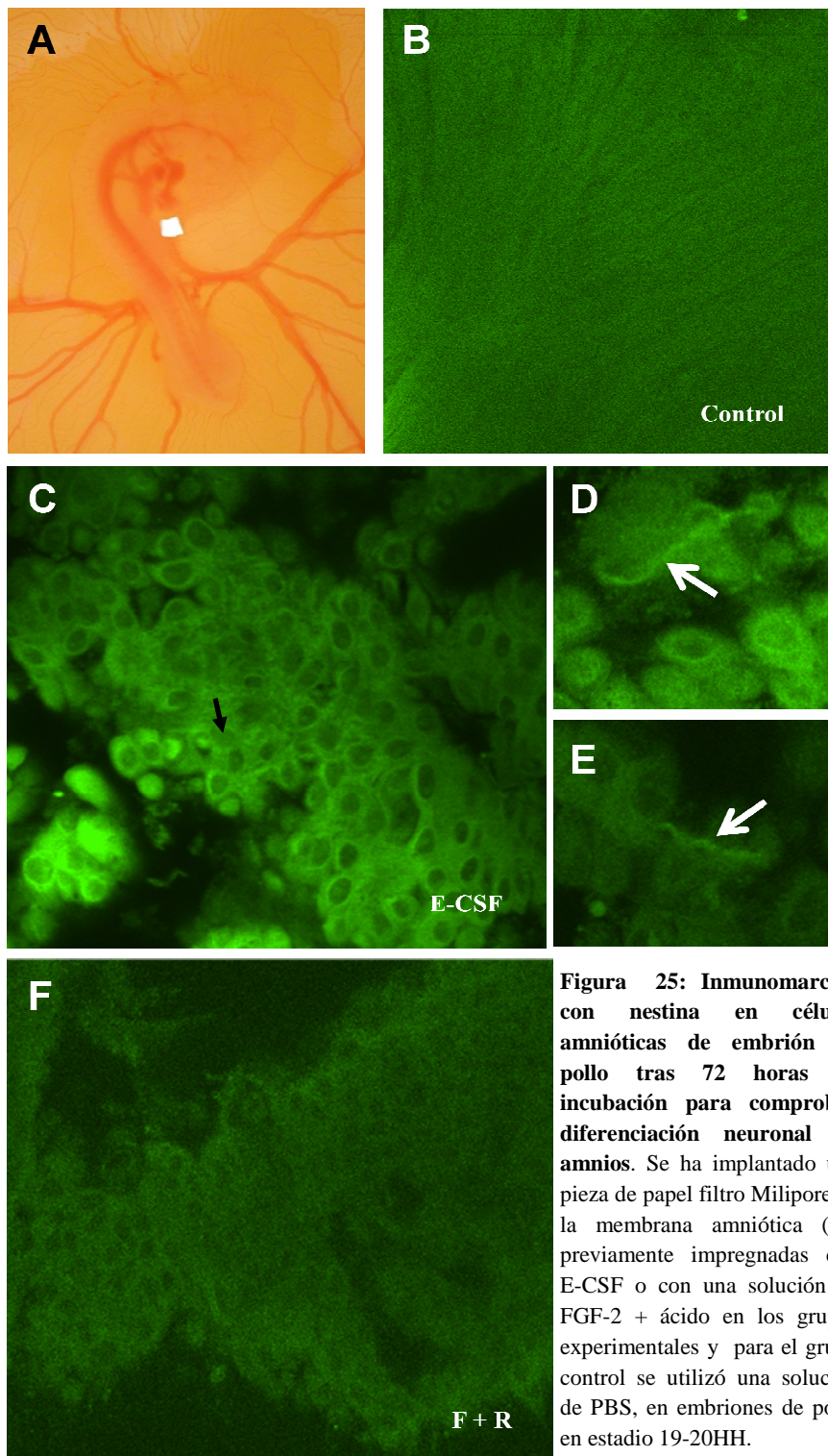


Figura 25: Inmunomarcaje con nestina en células amnióticas de embrión de pollo tras 72 horas de incubación para comprobar diferenciación neuronal en amnios. Se ha implantado una pieza de papel filtro Milipore en la membrana amniótica (A), previamente impregnadas con E-CSF o con una solución de FGF-2 + ácido en los grupos experimentales y para el grupo control se utilizó una solución de PBS, en embriones de pollo en estadio 19-20HH.

Posteriormente, los embriones fueron recultivados durante períodos de 72 hasta alcanzar los estadios 29-30HH. **B:** Extensión de un fragmento de membrana amniótica situada por debajo del papel impregnado con PBS (grupo control) con inmunomarcaje negativo. **C,D,E:** Extensión de un fragmento de membrana amniótica situada por debajo del papel impregnado con E-CSF. Flechas negras: inmunomarcaje positivo citoplásmico para nestina. Flechas blancas: prolongaciones celulares con inmunomarcaje positivo para nestina que corresponde a un desarrollo axonal primitivo. **F:** Extensión de un fragmento de membrana amniótica situada por debajo del papel impregnado con una solución de FGF-2 + ácido retinoico donde se observa inmunomarcaje positivo para nestina aunque de menor intensidad que con E-CSF.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

13. EFECTO DEL E-CSF SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN MÉDULA

- 13.1. Efecto del E-CSF sobre la proliferación neuroepitelial en médula espinal
- 13.2. Efecto del E-CSF sobre la diferenciación neuroepitelial en médula espinal

14. POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CÉLULAS NO NERVIOSAS

- 14.1. Potencial de diferenciación neuronal del mesénquima
 - 14.1.1. Células madre mesenquimales
 - 14.1.2. Diferenciación neuronal de células mesenquimales embrionarias inducida *in vivo* por ácido retinoico y FGF-2
 - 14.1.3. Diferenciación neuronal de células mesenquimales embrionarias inducida *in vivo* por E-CSF
- 14.2. Potencial de diferenciación neuronal de las células amnióticas
 - 14.2.1. Células madre amnióticas
 - 14.2.2. Diferenciación neuronal de células epiteliales amnióticas inducida *in vivo* por ácido retinoico y FGF-2
 - 14.2.3. Diferenciación neuronal de células epiteliales amnióticas inducida *in vivo* por E-CSF

13. EFECTO DEL E-CSF SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN MÉDULA

13.1. Efecto del E-CSF sobre la proliferación neuroepitelial en médula espinal

Los resultados aportados en la presenta tesis doctoral demuestran, mediante la implantación de microesferas de heparina impregnadas con E-CSF próximas a la médula espinal, que el E-CSF produce un aumento estadísticamente significativo de la proliferación celular a nivel de las células neurales de la médula espinal en la placa alar, sin que tenga efecto sobre la placa basal, visualizándose como un excesivo crecimiento de la misma desarrollándose en muchos casos estructuras tubulares con aspecto de epitelio pseudoestratificado, similar a la que presenta el tubo neural normal en fases tempranas del desarrollo.

Se sabe que el E-CSF es importante para la proliferación neuroepitelial mesencefálica en fases precoces del desarrollo tanto en embriones de pollo como de rata. En cultivos organotípicos de neuroepitelio mesencefálico en medio químicamente definido y sin complementos añadidos se produce una apoptosis masiva de las células neuroepiteliales y un cese dramático de la proliferación celular, pero esto no ocurre si se añade E-CSF al medio de cultivo (Gato et al., 2005; Martín et al., 2009). Gran parte del efecto del E-CSF sobre la proliferación neuroepitelial puede deberse a la presencia de FGF-2, ya que el bloqueo de este factor de crecimiento con anticuerpos específicos reduce considerablemente la proliferación neuroepitelial en cultivos organotípicos de mesencéfalo suplementados con E-CSF, por otro lado la microinyección de anticuerpos frente a FGF-2 en la cavidad de las vesículas cerebrales reduce considerablemente la proliferación neuroepitelial *in vivo* en embriones de pollo y rata (Martin et al., 2006; Gato et al., 2014).

También es sabido que en el crecimiento de las vesículas cerebrales intervienen dos factores interdependientes que son: la presión hidrostática ejercida por el CSF y la proliferación celular regulada por los factores de crecimiento (Gato et al., 1993; Alonso et al. 1998, 1999, 2000; Gato et al., 2005; Gato y Desmond., 2009). La presión hidrostática creada por el CSF además de favorecer la expansión cerebral, es capaz de regular aspectos del entorno neuroepitelial al ejercer una influencia trófica en sus células, al promover la neurogénesis, la supervivencia celular y al aumentar la actividad mitótica y cierta expresión génica (Gato et al., 2005; Martín et al., 2009). Pero, en condiciones normales durante las fases precoces del desarrollo embrionario (periodo de máxima expansión cerebral) el E-CSF de las vesículas cerebrales no está en contacto con el neuroepitelio medular, puesto que hay un sellado fisiológico pasajero de la luz del tubo nervioso a nivel de la parte más caudal del rombencéfalo y esto hace que el E-CSF no se propague en dirección caudal (Desmond y Schoenwolf, 1986; Desmond et al., 1993).

Pero estos efectos del E-CSF no se habían estudiado en otras regiones del sistema nervioso central. Nosotros hemos comprobado que la exposición a E-CSF exógeno a nivel de la médula espinal modifica el grado de proliferación neuroepitelial, sugiriendo que moléculas presentes en el fluido cerebroespinal pueden actuar como factores mitogénicos.

En el E-CSF hay otras moléculas que pueden inducir proliferación neuroepitelial, descritas ampliamente en la introducción:

- Mashayekhi et al. (2007,2009) han descrito la presencia de NGF en fluido cerebroespinal de embrión de pollo y han comprobado que su bloqueo mediante anticuerpos produce un descenso considerable de la replicación celular a nivel de la capa germinal del neuroepitelio de la corteza cerebral.

- Sonic hedgehog (Shh) es un factor pleiotrópico en el desarrollo del sistema nervioso central y se ha demostrado que tiene efecto mitogénico sobre precursores neuroepiteliales en diferentes localizaciones durante el desarrollo embrionario (Fucillo et al., 2006). Se ha comprobado que Shh está presente en E-CSF de ratón (Huang et al., 2010), por otro lado el bloqueo de Shh inhibe la proliferación e incrementa la muerte celular de las células neuroepiteliales en el tubo neural de embriones de pollo en estadios tempranos del desarrollo (Cayuso et al., 2006). Recientemente se ha demostrado que Shh puede activar la proliferación en algunos nichos de células germinales (células madre neurales) de cerebro adulto (Álvarez-Buylla y Ihrie, 2014).
- IGF-1 también está presente en fluido cerebroespinal embrionario (Lehtinen et al., 2011; Salehi et al., 2009) y se sabe que este factor puede estar implicado en la proliferación de células neuroblásticas, en concreto, el bloqueo de IGF-1 inhibe la proliferación e induce muerte celular en cultivos de células neuroepiteliales aisladas de embrión de ratón (Drago et al., 1991).
- Es conocida la acción de Wnt sobre la proliferación neuroblástica durante el desarrollo embrionario, además esta proteína está presente en el E-CSF de embrión de rata (Lehtinen et al., 2011). Se ha comprobado que la sobreexpresión de Wnt en embriones de ratón mutantes deficientes en TGF- β produce un incremento en la proliferación de las células neuroepiteliales a nivel mesencefálico (Falk et al., 2008). También se ha visto que Wnt provoca activación de la proliferación neuroepitelial en áreas ventrales de la médula espinal en embriones de rata (Ille et al., 2007), sin embargo en nuestros experimentos hemos constatado que el incremento de la proliferación se produce en áreas dorsales, por lo

que Wnt no parece ser el responsable del aumento de proliferación neuroepitelial detectado en nuestros experimentos.

- IL 1 β ha sido detectada mediante western-blot en E-CSF de embrión de pollo (Martín, 1999), además esta citoquina se expresa en fases iniciales del desarrollo de la médula espinal en embriones de anfibios, aves y mamíferos (Jelaso et al., 1998; De la Mano et al., 2007) y tiene efectos importantes sobre la proliferación del neuroepitelio durante el desarrollo de la médula espinal en embriones de pollo a partir del estadio 17HH. En concreto la colocación de microesferas impregnadas con IL 1 β recombinante próximas a la médula espinal en embriones de pollo provoca un marcado incremento en la proliferación neuroepitelial en áreas dorsales, mientras que la colocación de microesferas impregnadas con anticuerpos frente a IL 1 β reduce de forma significativa la incorporación nuclear de BdrU en dichas áreas (De la Mano et al., 2007), estos resultados son muy similares a los obtenidos por nosotros por lo que IL 1 β podría estar implicada en el incremento de la proliferación neuroepitelial inducida por E-CSF.

13.2. Efecto del E-CSF sobre la diferenciación neuroepitelial en médula espinal

Nuestros resultados demuestran que el E-CSF produce un incremento del inmunomarcaje frente a β 3-tubulina a nivel de la médula espinal, fundamentalmente a nivel de la placa basal, lo que parecen indicar que el fluido cerebroespinal embrionario puede potenciar la diferenciación neuronal a este nivel durante los estadios del desarrollo analizados, esto sugiere que moléculas presentes en el fluido cerebroespinal pueden actuar como factores neurogénicos.

El efecto neurogénico del E-CSF durante el desarrollo del cerebro embrionario ha sido demostrado en embriones de pollo y rata (Gato et al., 2005, Martín et al., 2009) y también en la zona subventricular de cerebro adulto de ratón (Carnicero et al., 2013).

El FGF-2 es una molécula clave para la diferenciación neuronal de las células neuroepiteliales durante el desarrollo embrionario y está presente en el E-CSF (Martín et al., 2006). Yamada et al. (2004) han comprobado que células neuroepiteliales aisladas de embriones de rata de estadios tempranos, cultivadas en medio definido suplementado con FGF-2 inicialmente proliferan hasta formar neuroesferas y a los siete días de cultivo la mayoría de las células se han diferenciado en neuronas. Es este mismo sentido se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que el bloqueo mediante anticuerpos del FGF-2 del fluido cerebroespinal altera la diferenciación neuronal del neuroepitelio mesencefálico de embriones de pollo (Martín et al., 2006, Gato et al., 2014).

Otro factor neurogénico importante es el ácido retinoico que también está presente en el E-CSF de embriones de pollo y rata (Parada et al., 2008b; Lehtinen et al., 2011). El ácido retinoico promueve la diferenciación neuronal de células madre embrionarias de ratón (Okada et al., 2004) y se ha comprobado que en embriones de anfibios activa la neurogénesis a nivel de la médula espinal donde la adición de retinoico exógeno produce un exceso de neuronas (Sharpe y Goldstone, 2000). En embriones de pollo Alonso et al. (2014) han demostrado que el ácido retinoico promueve la diferenciación neuronal a nivel del neuroepitelio mesencefálico *in vivo*.

En el fluido cerebroespinal embrionario de rata y ratón se ha descrito la presencia de IGF-1 (Salehi et al., 2009; Lehtinen et al., 2011), además este factor se expresa de forma ubicua en neuroepitelio y parece ser esencial para el normal desarrollo del sistema nervioso central (Bondy et al., 1990; Bateman y McNeill, 2006). En ratones mutantes con sobreexpresión de IGF-1 se produce un sobrecrecimiento cerebral con incremento del número de neuronas. IGF-1 también tiene acción neurogénica en embriones de pollo, en concreto se ha comprobado en esta especie que IGF-1 es requerido para la diferenciación neuroblástica en vesícula ótica (Camarero et al., 2003).

NGF es otro factor neurotrófico que está presente en el E-CSF de pollo (Mashayekhi et al., 2009) y puede estar implicado tanto en la proliferación como en la neurogénesis neuroepitelial, en este sentido se ha comprobado que en progenitores neurales obtenidos de ganglio estatoacústico de embriones de ratón concentraciones bajas de NGF (2,5 ng/ml) promueven la proliferación mientras que concentraciones mayores (20-40 ng/ml) estimulan la diferenciación neuronal (Zhang et al., 2011). La acción neurogénica de IGF-1 también se ha demostrado en embriones de anfibio, en esta especie Maufroid et al. (1996) consiguieron diferenciación neuronal y crecimiento de neuritas a partir de células neuroepiteliales de placa neural en cultivo suplementado con IGF-1.

IL 1 β ha sido detectada mediante western-blot en E-CSF de embrión de pollo (Martín, 1999) y se expresa en fases iniciales del desarrollo de la médula espinal en embriones de anfibios, aves y mamíferos (Jelaso et al., 1998; De la Mano et al., 2007). Se ha comprobado mediante colocación de microesferas impregnadas con IL 1 β recombinante o anticuerpos frente a IL 1 β próximas a la médula espinal que esta interleuquina influye en la diferenciación neuronal en la placa basal de embriones de pollo (De la Mano et al., 2007).

Otros factores de crecimiento contenidos en el E-CSF que intervienen en la diferenciación neuronal son la glicoproteína SCO-Spondin (Vera et al., 2013), la neurotrofina-3, el factor neurotrófico derivado del cerebro (brain-derived neurotrophic factor. BDNF) y la neurotrofina-4,-5 (Baydyuk y Xu., 2014) o el factor de crecimiento transformante β (TFG- β) (Flanders et al., 1991; Zhang et al., 1997; Aigner y Bogdahn, 2008).

14. POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CÉLULAS NO NERVIOSAS

Como ya hemos visto, las células precursoras o también llamadas células madre se caracterizan por su capacidad de autorreplicación, así como por su capacidad para generar células diferenciadas. Diversos agentes, como los factores de crecimiento y ciertas citoquinas, pueden actuar directamente sobre estas células e inducir su diferenciación hacia un linaje celular (Raff, 2003; Jahagirdar et al., 2005).

Se ha estudiado *in vitro* diversos métodos para inducir la diferenciación de las células precursoras en células neurales, los cuales se han descrito previamente en la introducción, uno de ellos mediante la exposición a CSF (Ye et al., 2011; Ge et al., 2014).

Pero la capacidad de diferenciación de las células precursoras no ha sido explorada *in vivo*. En esta tesis se ha demostrado la capacidad de diferenciación neuronal del FGF-2, ácido retinoico y del E-CSF en poblaciones celulares no nerviosas, que en condiciones normales no están en contacto con él, pero con plasticidad celular, como son el mesénquima y el amnios.

14.1. Potencial de diferenciación neuronal del mesénquima

14.1.1. Células madre mesenquimales

Bajo esta denominación se agrupan células de aspecto mesenquimatoso de muy diferentes procedencias:

- Células madre mesenquimales procedentes de tejidos adultos, las más conocidas y utilizadas en terapias regenerativas se obtienen a partir de médula ósea (Pittenger et al., 1999) pero también, se han obtenido de otros tejidos como periostio (Ferretti y Mattioli-Belmonte, 2014), hueso tanto trabecular como compacto (Short et al., 2009; Wang et al., 2015), tejido adiposo (Kokai et al., 2014), membrana sinovial (Gullo y De Bari, 2013), piel (Orciani y Di Primi, 2013) o pulpa dentaria (Gronthos et al., 2000).
- Células madre mesenquimales de origen fetal, las más conocidas son las procedentes del cordón umbilical (Erices et al., 2000) pero también se han conseguido aislar de órganos fetales como el páncreas (Hu et al., 2003), músculo esquelético y dermis (Young et al., 2001), sangre fetal (Campagnoli et al., 2001), placenta y fluido amniótico (In`t Anker et al., 2003 y 2004).
- Células madre mesenquimales obtenidas a partir de células embrionarias totipotenciales procedentes de la masa celular interna del blastocisto.

Las células madre mesenquimales son células indiferenciadas pluripotentes. Se han caracterizado multitud de moléculas que pueden ser detectadas en la superficie celular mediante anticuerpos para identificar a estas células, son las CD (cluster of differentiation).

Las células mesenquimales de diferentes orígenes, tanto de tejidos adultos como fetales y en diferentes especies animales incluido el pollo, expresan CD-15, CD-24, CD-29, CD-44, CD-49, CD-73, CD-90, CD-105 y CD-166 (Roche et al., 2007; Pruszek et al., 2009; Bai et al., 2013; Liu et al., 2013; Ulrich et al., 2014). Algunas de estas moléculas (CD-44, CD-73, CD-90 y CD-105), se expresan en niveles más altos en células mesenquimales procedentes de tejidos fetales, como placenta humana del primer trimestre y estas células tienen una mayor potencialidad para generar derivados ectodérmicos (Park et al., 2013). En este mismo sentido, Pruszek et al. (2009) demuestran que los antígenos de superficie de células madre embrionarias CD-15, CD-24 y CD-29 son linajes celulares más susceptibles de transformarse en neuronas.

Las células madre mesenquimales también expresan marcadores característicos de pluripotencialidad (Roche et al., 2007; Bai et al., 2013; Liu et al., 2013; Ulrich et al., 2014) como Nanog, Oct-4, SSEA-4 (stage specific embryonic antigen 4) y Rex-1 (RNA exonuclease homologue 1).

Se sabe desde hace tiempo que las células madre mesenquimales, tras su trasplante, pueden integrarse y diferenciarse en diferentes tejidos. Algunos estudios sugieren la posibilidad de que las células mesenquimales trasplantadas podrían sufrir una diferenciación espontánea o bien podrían fusionarse con las células del huésped (Terada et al., 2002; Álvarez-Dolado et al., 2003). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la diferenciación de las células mesenquimales después del trasplante es independiente de un mecanismo de fusión celular (Harris et al., 2004; Kajstura et al., 2005).

Las células madre mesenquimales, bajo la acción de determinadas citoquinas o factores de crecimiento, se pueden diferenciar en cultivo en diferentes líneas celulares adultas derivadas de las tres hojas germinativas embrionarias.

Se ha demostrado la diferenciación de células mesenquimales de distintas procedencias en células de músculo esquelético (Wakitani et al., 1995; Mizuno et al., 2002; Di Rocco et al., 2006), células de músculo cardiaco (Makino et al., 1999; Kadivar et al., 2006; Yan et al., 2011) células endoteliales (Oswald et al., 2004; Cao et al., 2005; Gang et al., 2006), hepatocitos (Snykers et al., 2009; Pournasr et al., 2011), células productoras de insulina (Timper et al., 2006; Chao et al., 2008), células sensoriales del oído interno (Alonso et al., 2012) y neuronas (Woodbury et al., 2000; Sánchez-Ramos et al., 2002; Safford et al. 2002).

14.1.2. Diferenciación neuronal de células mesenquimales embrionarias inducida in vivo por ácido retinoico y FGF-2

En nuestros experimentos, hemos conseguido diferenciar *in vivo* células mesenquimatosas embrionarias en derivados neuronales que expresan β -III-tubulina, colocando subectodérmicamente microesferas de heparina impregnadas con moléculas neurogénicas, en concreto con FGF-2 (10 ng/ml) y ácido retinoico (0.1mM), en embriones de pollo de estadio 18HH. La diferenciación neuronal se produce tras un corto periodo de exposición a los factores neurogénicos, tan sólo de 24-48 horas.

Numerosos estudios demuestran que las células madre mesenquimales, de diferentes procedencias, presentan capacidad neurogénica *in vitro* sometidas a la acción de FGF-2 o ácido retinoico, ya sea por separado o mezclando ambas moléculas.

En relación con las células madre mesenquimales de procedencia embrionaria, Nishikawa et al. (2013) han comprobado que células mesenquimatosas embrionarias (E14 mESC cell line) cultivadas en medio químicamente definido y suplementado con 20ng/ml de FGF-2 y 20ng/ml de factor de crecimiento endotelial (VEGF), expresaban marcadores de neuronas gabaérgicas como Pax2, Dlx2, GAD67 NCAM y β -III-tubulina a los 6 días de cultivo.

También se ha conseguido diferenciación neuronal *in vitro* a partir de células mesenquimales de embriones de pollo de 12 días (Bai et al., 2013), tras incubarlas en medios de cultivo con diferentes agentes neurogénicos, las células presentaban morfología y marcadores específicos neuronales. Las células mesenquimales de origen embrionario se pueden integrar *in vivo* en el sistema nervioso central. En este sentido, Liu et al. (2009) utilizando células mesenquimales embrionarias consiguieron regeneración cortical en ratas, a las que se había producido una lesión isquémica por oclusión de la arteria cerebral media; además en la zona de lesión, aparecían células en proceso de diferenciación neural β -III-tubulina positivas.

Las células madre mesenquimales de origen fetal también tienen capacidad neurogénica. Portmann-Lanz et al. (2010) han conseguido diferenciar *in vitro* células madre mesenquimales, procedentes de placenta del primer trimestre, en neuronas añadiendo al medio ácido retinoico, FGF, factor de crecimiento epitelial (EGF) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Jin et al. (2010) obtienen resultados similares cultivando células mesenquimales, procedentes de cordón umbilical, en medios suplementados con 0,5 μ mol de ácido retinoico all trans, sin embargo concentraciones iguales o superiores a 1.0 μ mol de ácido retinoico inhiben la proliferación e incrementan significativamente la apoptosis. Las células madre mesenquimales de origen fetal presentan también capacidad neurogénica *in vivo*; la implantación de estas células en médula espinal de fetos de rata con espina bífida abierta, mediante cirugía exoútero, produce una disminución de la apoptosis en la zona de cierre medular, incrementando la regeneración neuronal y mejorando significativamente las funciones motoras y sensitivas (Li et al., 2012).

El ácido retinoico y el FGF-2 también puede inducir *in vitro* diferenciación neuronal en células madre mesenquimales procedente de tejidos adultos como médula ósea, tejido adiposo, tejido subcutáneo y endometrio (Zemez`ko et al., 2013). Por otro lado, el efecto neurogénico del FGF-2 puede ser inhibido bloqueando su receptor como se ha demostrado en células mesenquimales procedentes de pulpa dental (Osathanon et al., 2011).

14.1.3. Diferenciación neuronal de células mesenquimales inducida "in vivo" por E-CSF

En nuestros resultados hemos comprobado *in vivo*, que las células mesenquimatosas embrionarias se pueden transformar en derivados neuronales que expresan β -III-tubulina, colocando subectodérmicamente microesferas de heparina impregnadas con E-CSF en embriones de pollo de estadio 18 HH. La diferenciación neuronal se produce tras un corto periodo de exposición a E-CSF en tan sólo de 24-48 horas. Además, el efecto neurogénico inducido E-CSF es superior al obtenido mediante tratamiento con FGF₂ y ácido retinoico. Esto es debido a que el CSF contiene los suficientes componentes y en más alta proporción para inducir esta diferenciación.

Se sabe que la inducción de células madre mesenquimales, con CSF para su diferenciación a células neurales *in vitro*, es más rápida y en más alta proporción que la inducida con citoquinas (Ge et al., 2014).

El efecto neurogénico del FGF-2 es hoy día bien conocido, Gato et al. (2005) y Martín et al. (2006) han comprobado que el E-CSF de embriones de pollo entre los estadios 18 y 25HH contiene diferentes isoformas de FGF-2 y han demostrado *in vivo* e *in vitro* que este factor de crecimiento tiene un importante efecto en la regulación de la proliferación y neurogénesis neuroepitelial a nivel mesencefálico.

El E-CSF de embriones de pollo también contiene ácido retinoico así como RBP, la proteína transportadora de ácido retinoico (Parada et al., 2008b; Lehtinen et al., 2011), además el bloqueo de la actividad biológica de RBP mediante anticuerpos produce una considerable reducción de la neurogénesis a nivel del neuroepitelio mesencefálico (Alonso et al., 2011, 2014).

Como hemos comentado anteriormente, el ácido retinoico y FGF-2 puede inducir *in vitro* diferenciación neurogénica en células madre mesenquimales de diferentes procedencias, tanto de tejidos fetales y embrionarios como adultos.

El E-CSF contiene también otras moléculas que podrían intervenir en la diferenciación neural:

- Huang et al. (2010) han demostrado la presencia de Sonic hedgehog (Shh) en fluido cerebroespinal de ratón. Se ha comprobado *in vitro* que Shh, junto con otros factores, tiene un efecto neurogénico sobre células madre mesenquimales obtenidas a partir de tejidos adultos (Zemez`ko et al., 2013) y, por otro lado Kondo et al. (2005) que Shh tiene un efecto sinérgico con ácido retinoico en la diferenciación neuronal de células mesenquimales procedentes de médula ósea de ratón.
- El factor de crecimiento nervioso (NGF) también está presente en E-CSF de embrión de pollo (Mashayekhi et al., 2009). Se ha comprobado que este factor de crecimiento potencia la expresión de β -III-Tubulina y MAP-2 (marcadores neuronales) y la aparición de marcadores sinápticos (sinaptosinas) en cultivos de células mesenquimales procedentes de sangre del cordón umbilical y de médula ósea (Cho et al., 2010; Brecu et al., 2013).
- Recientemente se ha demostrado la presencia de IGF-1 (Insulin-like growth factor tipo 1) en fluido cerebroespinal de ratón y rata (Lehtinen et al., 2011; Salehi et al., 2009) y hoy día se sabe que IGF-1 promueve la proliferación y supervivencia celular durante las fases iniciales de la diferenciación neural en cultivos de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea de rata (Huat et al., 2014).
- Wnt está presente en E-CSF (Lehtinen et al., 2011) y se sabe que esta molécula promueve diferenciación neuronal en células madre de procedencia embrionaria y de tejidos adultos (Michaelidis y Lie, 2008; Hübner et al., 2010). En este mismo sentido Yu et al. (2013) han comprobado que el bloqueo de la señal de Wnt reduce la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea de rata adulta.

- Mashayekhi et al. (2009) han demostrado la presencia de NGF en fluido cerebro espinal de embrión de pollo.

14.2. Potencial de diferenciación neuronal de las células amnióticas

14.2.1. Células madre amnióticas

Hay día se sabe que tanto las células epiteliales como mesenquimales amnióticas, en mamíferos, son células pluripotentes que expresan marcadores característicos de células indiferenciadas (células madre) como Oct-4 (Octamer-binding Protein-4), Rex-1, Runx-1, SSEA-4 y Nanog (Prusa et al., 2003; Bossolasco et al., 2006; De Coppi et al., 2007; Miki et al., 2007; Easley et al., 2012). Más recientemente Gao et al. (2012) han comprobado que las células epiteliales amnióticas de pollo en estadios tempranos del desarrollo también presentan algunos de estos marcadores en concreto Oct-4, Nanog, Sox-2 y Ck-19. Nanog parece ser uno de los factores más importantes para el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre embrionarias, en este sentido se ha demostrado en ratón que las células Nanog-deficientes pierden su pluripotencialidad y solo se diferencian hacia el linaje de endodermo extraembrionario (Mitsui et al., 2003).

Las células epiteliales amnióticas, bajo la acción de determinadas citoquinas o factores de crecimiento, se pueden diferenciar en cultivo en diferentes líneas celulares adultas derivadas de las tres hojas germinativas embrionarias. Se ha conseguido la obtención a partir de estas células de adipocitos, hepatocitos, miocitos, osteoblastos, células endoteliales, células pancreáticas productoras de insulina y células del epitelio corneal (Bossolasco et al., 2006; Fatimath et al., 2010; Zou et al., 2011; Paracchini et al., 2012; Choi et al., 2013).

14.2.2. Diferenciación neuronal de células epiteliales amnióticas inducida "in vivo" por ácido retinoico y FGF-2

Uno de los principales focos actuales en la investigación sobre células epiteliales amnióticas es el estudio de los factores implicados en su diferenciación neuronal y la posible utilización de estas células madre en terapias regenerativas del sistema nervioso central. En este sentido se sabe ya desde hace tiempo que las células epiteliales amnióticas en cultivo, sin adición de factores diferenciadores exógenos, son capaces de producir y segregar catecolaminas y acetilcolina y además expresar mRNA para receptores de dopamina (Elwan et al., 1997; Sakuragawa et al., 2000).

En nuestros experimentos, hemos comprobado que las células de la membrana amniótica (MA) en fases tempranas del desarrollo no presentan inmunomarcaje frente a β_3 -tubulina o nestina, indicando que los marcadores neuronales empleados no están presentes de forma natural *in vivo* en las fases del desarrollo estudiadas por nosotros. Sin embargo las MA tratadas con FGF-2 (10ng/ml) + ácido retinoico (0.1mM) mostraron inmunomarcaje positivo a β_3 -tubulina y nestina que se incrementaba claramente al aumentar el tiempo de tratamiento (de 24 a 72 horas), lo que indica que las células amnióticas pueden diferenciarse *in vivo* a neuronas frente a estímulos neurogénicos conocidos.

En este mismo sentido diferentes publicaciones refieren que las células amnióticas, tanto epiteliales como mesenquimales, pueden diferenciarse a células de estirpe nerviosa tanto neural como glial; se ha comprobado que el cultivo de células epiteliales amnióticas humanas, obtenidas de placenta a término, pueden generar neuronas si se cultivan en medios estándar suplementados con ácido retinoico a concentraciones entre 10^{-4} y 10^{-6} M (Niknejad et al., 2010; Miki et al., 2007; Maraldi et al., 2014). Un efecto parecido tiene el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), en concreto la variedades 2 (básico) y 4, cuando se añaden al medio de cultivo combinados o no con ácido retinoico; en este sentido, Sakuragawa et al.

(2004) obtuvieron un 94,5% de células Nestina positivas y un 72,5% de células β -III-tubulina

positivas al cultivar durante 24 horas células amnióticas mesenquimales humanas en un medio definido suplementado con 10 ng/ml de FGF-2, lo que indica que las células amnióticas pueden expresar marcadores neuronales tras cortos periodos de cultivo. Este efecto ha sido demostrado también en aves, Gao et al. (2012) han conseguido obtener células nestina positivas tras cultivar, en medio suplementado con ácido retinoico + FGF₄, células epiteliales amnióticas en embriones de pollo de 6 días.

Por otro lado, se sabe que las células amnióticas pueden integrarse y diferenciarse en el tejido nervioso. Se ha comprobado que células amnióticas humanas (recolectadas de placenta) que producen dopamina sobreviven tras su implantación en el estriatum o en la sustancia nigra de ratas con enfermedad de Parkinson, por lo que podrían ser una potencial fuente de dopamina para terapias regenerativas con células madre de fácil obtención (Kakishita et al. 2000, 2003). En este mismo sentido, Wu et al. (2006) trasplantaron células epiteliales amnióticas humanas a ratas a las que se había seccionado la médula a nivel medio torácico; estas células se integraron en la médula espinal del huésped sin producir reacción inmunológica y además promovieron el crecimiento y la regeneración axónica y mejoraron la función motora. Más recientemente Maraldi et al. (2014) en rata recién nacida, mediante la inyección intraventricular de células procedentes de líquido amniótico humano, han comprobado que estas células se integran en diferentes regiones del sistema nervioso central, como hipocampo, cuerpo calloso, área preóptica, corteza motora y corteza somatosensorial y además un porcentaje en torno al 25% de estas células expresaban β -III-Tubulina.

14.2.3. Diferenciación neuronal de células epiteliales amnióticas inducida "in vivo" por E-CSF

En nuestros experimentos, hemos comprobado que las células epiteliales de la membrana amniótica expuestas a E-CSF procedente de la vesícula mesencefálica de embriones de estadio 25 HH, presentaban inmunomarcaje positivo a β_3 -tubulina y nestina, con una intensidad de marcaje mayor que en el grupo tratado con FGF-2 + ácido retinoico, pudiéndose observar en algunas ocasiones prolongaciones celulares que podrían indicar neuritogénesis. El efecto neurogénico del E-CSF es bien conocido, previamente nuestro grupo (Gato et al., 2005; Martín et al., 2009) había demostrado que el E-CSF promueve la supervivencia de las células neuroepiteliales e induce proliferación y diferenciación neuronal en cultivos de explantes de neuroepitelio mesencefálico de embrión de pollo.

Por otro lado, Carnicero et al. (2013) comprobaron que el E-CSF es un potente inductor de neurogénesis en cerebro adulto ya que incrementa significativamente la diferenciación neuronal de células madre de la región subventricular de cerebro de ratón.

El E-CSF en fases precoces del desarrollo tiene una composición proteica compleja, habiéndose detectado la presencia en el mismo de diferentes factores de crecimiento, citoquinas y vitaminas. Gato et al. (2006) y Martín et al. (2006) demostraron que el E-CSF de embriones de pollo entre los estadios 18 y 25HH contiene diferentes isoformas de FGF-2 y, han comprobado *in vivo* e *in vitro* que este factor de crecimiento, tiene un importante efecto en la regulación de la proliferación y neurogénesis neuroepitelial a nivel mesencefálico. Como se ha comentado anteriormente, el FGF-2 puede inducir diferenciación neuronal en células amnióticas, tanto epiteliales como mesenquimales, en cultivo y podría explicar, al menos en parte, porque aparece marcaje positivo a β_3 -tubulina y nestina en las células de las MA tratadas con E-CSF.

Otra molécula que produce diferenciación neuronal en células amnióticas en cultivo es el ácido retinoico, esta vitamina así como su proteína transportadora (RBP) están también presentes en E-CSF de pollo en fases

tempranas del desarrollo, además el bloqueo de la actividad biológica de RBP mediante anticuerpos produce una considerable reducción de la neurogénesis a nivel del neuroepitelio mesencefálico (Parada et al., 2008b; Alonso et al., 2011 y 2014).

Todos los datos comentados anteriormente demuestran que el E-CSF puede producir diferenciación neuronal en células madre de estirpe neuroepitelial. Sin embargo, apenas hay datos de que pueda inducir neurogénesis en células madre de otras procedencias, en este sentido se sabe que células PC-12 cultivadas en medio estándar suplementado con E-CSF sufren transformación neuronal expresando marcadores neuronales y adquiriendo el aspecto morfológico de neuronas (comunicación personal de Estela Carnicero). En este mismo sentido, nuestros experimentos avalan la hipótesis de que el E-CSF obtenido en fases tempranas del desarrollo tiene efecto neurogénico sobre otras células madre embrionarias que de forma habitual no se diferencian en tejido nervioso.

También en este estudio se observa, que este efecto diferenciador es directamente proporcional al tiempo de exposición de los estímulos neurogénicos, ya que el inmunomarcaje es más intenso después de 3 días de incubación que tras 24 horas, tanto en los grupos tratados con FGF-2 + ácido retinoico como en los tratados con E-CSF.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.** El E-CSF produce un aumento estadísticamente significativo de la proliferación celular a nivel de las células neurales de la médula espinal en la placa alar sin que tenga efecto sobre la placa basal.
- 2.** El E-CSF favorece la diferenciación neuronal a nivel de la placa basal cuando la microesfera se implanta lateralmente, y en todo el epitelio cuando la microesfera se introduce dentro de la cavidad.
- 3.** El ácido retinoico y el FGF-2 conjuntamente tienen una acción neurogénica sobre las células mesenquimales embrionarias *in vivo*.
- 4.** El E-CSF provoca diferenciación neuronal sobre las células mesenquimales embrionarias *in vivo*, posiblemente por la presencia de factores neurogénicos.
- 5.** El ácido retinoico y el FGF-2 conjuntamente tienen una acción neurogénica sobre las células epiteliales amnióticas *in vivo*.
- 6.** El E-CSF induce diferenciación neuronal sobre las células epiteliales amnióticas *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. ABE K., CHU P.J., ISHIHARA A., SAITO H. (1996). Transforming growth factor-beta 1 promotes re-elongation of injured axons of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 3; 723(1-2):206-9.
2. AHN, S., JOYNER, A.L. (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437, 894-897.
3. AIGNER L., BOGDAHN U. (2008). TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 331(1):225-41. Review.
4. AKANEYA Y., TAKAHASHI M., HATANAKA H. (1995). Interleukin-1 beta enhances survival and interleukin-6 protects against MPP+ neurotoxicity in cultures of fetal rat dopaminergic neurons. *Exp. Neurol.* 136(1): 44-52.
5. ALBERT M.R., FOSTER R.A., VOGEL J.C. (2001). Murine epidermal label-retaining cells isolated by flow cytometry do not express the stem cell markers CD34, Sca-1, or Flk-1. *J Invest Dermatol.* 117(4):943-8.
6. ALBRECHT P.J., DAHL J.P., STOLTZFUS O.K., LEVENSON R., LEVISON S.W. (2002). Ciliary neurotrophic factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2, to increase motor neuron survival. *Exp. Neurol.* 173 (1): 46-62.
7. ALONSO M.I., GATO A., MORO J.A., BARBOSA E. (1998). Disruption of proteoglycans in neural tube fluid by β -d-xyloside alters brain enlargement in chick embryos. *Anat. Rec.*, 252: 499-508.

8. ALONSO M.I., GATO A., MORO J.A., MARTIN P., BARBOSA E. (1999). Involvement of sulfated proteoglycans in embryonic brain expansion at earliest stages of development in rat embryos. *Cells Tissues Organs*, 165: 1–9.
9. ALONSO M.I., MORO J.A., MARTIN P., BARBOSA E., GATO A. (2000). Enzymatic digestion of neural tube fluid proteoglycans leads to brain growth disruption. *Eur. J. Anat.*, 4(3): 161–167.
10. ALONSO M.I., MARTÍN C., CARNICERO E., BUENO D., GATO A. (2011). Cerebrospinal fluid control of neurogenesis induced by retinoic acid during early brain development. *Dev. Dyn.*, 240 (7): 1650-1659.
11. ALONSO M.I., CARNICERO E., CARRETERO R., DE LA MANO A., MORO J.A, LAMUS F., MARTÍN C., GATO A. (2014). Retinoic Acid, under Cerebrospinal Fluid Control, induces neurogenesis during early brain development. *J. Dev. Biol.* 2014, 2, 72-8.
12. ÁLVAREZ-BUYLLA A., LIM DANEURON.(2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Mar* 4; 41(5):683-6.
13. ÁLVAREZ-BUYLLA A., IHRIE R.A. (2014). Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain. *Semin Cell Dev Biol.* Sep; 33:105-11.
14. ALVAREZ-DOLADO M., PARDAL R., GARCIA-VERDUGO J.M., FIKE J.R., LEE H.O., PFEFFER K., LOIS C., MORRISON S.J., ALVAREZ-BUYLLA A. (2003). Fusion of bone-marrow derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* Oct 30; 425(6961):968-73.
15. ANGEVINE Jr J.B., SIDMAN R.L. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192:766–768.

16. ARAUJO D.M., HILT D.C. (1997). Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates the excitotoxin-induced behavioral and neurochemical deficits in a rodent model of Huntington's disease. *Neuroscience*. Dec; 81(4):1099-110.
17. ARAUJO G.L., ARAUJO J.A., SCHROEDER T., TORT A.B., COSTA M.R. (2014). Sonic hedgehog signaling regulates mode of cell division of early cerebral cortex progenitors and increases astrogliogenesis. *Front Cell Neurosci*. 11; 8:77.
18. BAI C., LI X., HOU L., ZHANG M., GUAN W., MA Y. (2013). Biological characterization of chicken mesenchymal stem/progenitor cells from umbilical cord Wharton's jelly. *Mol Cell Biochem*. Apr; 376(1-2):95-102.
19. BATEMAN J.M., McNEILL H. (2006). Insulin/IGF signalling in neurogenesis. *Cell Mol Life Sci*. Aug; 63(15):1701-5.
20. BAYDYUK M., XU B. (1994). BDNF signaling and survival of striatal neurons. *Front Cell Neurosci*. 28; 8:254. Review.
21. BERCU M.M., ARIEN-ZAKAY H., STOLER D., LECHT S., LELKES P.I., SAMUEL S., OR R., NAGLER A., LAZAROVICI P., ELCHALAL U. (2013). Enhanced survival and neurite network formation of human umbilical cord blood neuronal progenitors in three-dimensional collagen constructs. *J Mol Neurosci*. Oct; 51(2):249-61.
22. BODNAR A.G., OUELLETTE M., FROLKIS M., HOLT S.E., CHIU C.P., MORIN G.B., HARLEY C.B., SHAY J.W., LICHTSTEINER S., WRIGHT W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 16; 279(5349):349-52.

23. BONDY C.A., WERNER H., ROBERTS C.T. Jr, LEROITH D. (1990). Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Mol Endocrinol.* 1990 Sep; 4(9):1386-98.
24. BORGENS R.B., SHI R. (1995). Uncoupling histogenesis from morphogenesis in the vertebrate embryo by collapse of the transneural tube potential. *Dev Dyn.* 1995 Aug; 203(4):456-67.
25. BOSSOLASCO P., MONTEMURRO T., COVA L., ZANGROSSI S., CALZAROSSA C., BUIATIOTIS S., SOLIGO D., BOSARI S., SILANI V., DELILIERIS G.L., REBULLA P., LAZZARI L. (2006). Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res.* Apr; 16(4):329-36
26. BUISSON A., LESNE S., DOCAGNE F., ALI C., NICOLE O., MACKENZIE E.T., VIVIEN D. (2003). Transforming growth factor-beta and ischemic brain injury. *Cell Mol Neurobiol.* 23(4-5):539-50. Review.
27. BURDA D.J. (1968). Studies on the experimental induction of over growth in chick embryos. *Anat. Rec.* 161:419-426.
28. BURT D.W., LAW A.S. (1994). Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res.* 5(1):99-118. Erratum in: *Prog Growth Factor Res* 1994; 5(2): following 261.
29. BRICKMAN Y.G., FORD M.D., GALLAGHER J.T., NURCOMBE V., BARTLETT P.F., TURNBULL J.E. (1998). Structural modification of fibroblast growth factor binding heparan sulfate at a determinative stage of neural development. *J. Biol. Chem.* 273(8):4350-4359.

30. BRINES M.L., GHEZZI P., KEENAN S., AGNELLO D., DE LANEROLLE N.C., CERAMI C., ITRI L.M., CERAMI A. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97(19):10526–10531.
31. BRISCOE, J., PIERANI, A., JESSELL, T.M., AND ERICSON, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435–445.
32. CAMARERO G., LEON Y., GOROSPE I., DE PABLO F., ALSINA B., GIRALDEZ F., VARELA-NIETO I. (2003). Insulin-like growth factor 1 is required for survival of transit-amplifying neuroblasts and differentiation of otic neurons. *Dev Biol.* Oct 15; 262(2):242-53.
33. CAMPAGNOLI C., ROBERTS I.A., KUMAR S., BENNETT P.R., BELLANTUONO I., FISK N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first- trimester fetal blood, liver, and bone marrow. (2001). *Blood*; 98:2396–2402.
34. CAO Q.L., ZHANG Y.P., HOWARD R.M., WALTERS W.M., TSOULFAS P., WHITTEMORE S.R. (2001). Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp Neurol.* 167(1):48-58.
35. CAO Y., SUN Z., LIAO L., MENG Y., HAN Q., ZHAO R.C. (2005). Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 1; 332(2):370-9.
36. CARNICERO E., ALONSO M.I., CARRETERO R, LAMUS ., MORO J.A., DE LA MANO A., FERNÁNDEZ J.M., GATO A. (2013). Embryonic cerebrospinal fluid activates neurogenesis of neural precursors within the subventricular zone of the adult mouse brain. *Cells Tissues Organs.*198(5):398-404.

37. CARVEY P.M., LING Z.D., SORTWELL C.E., PITZER M.R., McGUIRE S.O., STORCH A., COLLIER T.J. (2001). A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 171(1): 98-108.
38. CASEY M.L., McDONALD P.C. (1996). Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells. *Biol Reprod.* Dec; 55(6):1253-60.
39. CATALA, M.; TEILLET, M.A.; LE DOUARIN, N. (1995). Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system. *Mech. Dev.* 51: 51-65.
40. CAVINESS V.S. Jr, GOTO T., TARUI T., TAKAHASHI T., BHIDE P.G., NOWAKOWSKI R.S. (2003). Cell output, cell cycle duration and neuronal specification: a model of integrated mechanisms of the neocortical proliferative process. *Cereb Cortex.* Jun; 13(6):592-8.
41. CAYUSO J., ULLOA F., COX B., BRISCOE J., MARTÍ E. (2006). The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development.* Feb; 133(3):517-28.
42. CLARK D.A., COKER R. (1998). Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *nt J Biochem Cell Biol.* 30(3):293-8.
43. COLAS J.F., SCHOENWOLF G.C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev. Dyn.*, 221 (2): 117-45. (Review).
44. CHAO K.C., CHAO K.F., FU Y.S., LIU S.H. (2008). Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One.* Jan 16; 3(1):e1451.

45. CHO Y.I., CHOI J.S., JEONG S.Y., YOO H.S. (2010). Nerve growth factor (NGF)-conjugated electrospun nanostructures with topographical cues for neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* Dec; 6(12):4725-33.
46. CHENG Q., DI LIBERTO V., CANIGLIA G., MUDO G. (2008). Timecourse of GDNF and its receptor expression after brain injury in the rat. *Neurosci. Lett.* 439(1):24-29.
47. CHENG X., WANG Z., YANG J., MA M., LU T., XU G., LIU X. (2011). Acidic fibroblast growth factor delivered intranasally induces neurogenesis and angiogenesis in rats after ischemic stroke. *Neurol Res.* Sep; 33(7):675-80.
48. CHESNUTT C., BURRUS L.W., BROWN A.M.C., NISWANDER L. (2004). Coordinate regulation of neural tube patterning and proliferation by TGF β and WNT activity. *Dev. Biol.* 274:334-347.
49. CHIANG, C., LITINGTUNG, Y., LEE, E., YOUNG, K. E., CORDEN, J. L., WESTPHAL, H., BEACHY P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.
50. CHOI S.A., CHOI H.S. KIM K.J., LEE D.S., LEE J.H., PARK J..Y, KIM E., LI X., OH H.Y., LEE D.S., KIM M.K. (2013). Isolation of canine mesenchymal stem cells from amniotic fluid and differentiation into hepatocyte-like cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* Jan; 49(1):42-51.
51. DAHMANE, N., SANCHEZ, P., GITTON, Y., PALMA, V., SUN, T., BEYNA, M., Ruiz i Altaba A. (2001). The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 128,

52. DAVIDSSON P., PAULSON L., HESSE C., BLENNOW K., NILSSON C.L. (2001). Proteome studies of human cerebrospinal fluid and brain tissue using a preparative two-dimensional electrophoresis approach prior to mass spectrometry. *Proteomics*. Mar; 1(3):444-52.
53. DE COPPI P., BARTSCH G. Jr, SIDDIQUI M.M., XU T., SANTOS C., PERIN L., MOSTOSLAVSKY G., SERRE A.C., SNYDER E.Y., YOO J.J, FURTH M.E., SOKER S., ATALA A. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*. Jan; 25(1):100-6.
54. DE LA MANO, A. (2006). Expresión neuroendocrina de interleuquinas 1 β y 6 durante el desarrollo embrionario. efecto sobre la proliferación y diferenciación en la médula espinal. Tesis Doctoral (Departamento de Anatomía y Radiología Área de Anatomía y Embriología Humanas. Universidad de Valladolid).
55. DE LA MANO A., GATO A., ALONSO M.I., CARNICERO E., MARTÍN C., MORO J.A. (2007). Role of interleukin-1beta in the control of neuroepithelial proliferation and differentiation of the spinal cord during development. *Cytokine*. Feb; 37(2):128-37.
56. DE PAZ F. (1999). Morphometric study of the brain expansion in birds and mammals. Dotoral thesis presented to the Faculty of Medicine, University of Valladolid, Valladolid, Spain, 223 pp.
57. DESMOND M.E, JACOBSON A.G. (1977). Embryonic brain enlargement requires cerebrospinal fluid pressure. *Dev Biol*. May; 57(1):188-98.
58. DESMOND M.E., O'RAHILLY R. (1981). The growth of the human brain during the embryonic period proper. *Anat. Embryol.*, 162: 137-151.
59. DESMOND M.E. (1982). Description of the occlusion of the spinal cord lumen in early human embryos. *Anat Rec.Sep*; 204(1):89-93.

60. DESMOND M.E., SCHOENWOLF A.G. (1985). Timing and positioning of occlusion of the spinal neurocoel in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.*, 235: 479–487.
61. DESMOND M.E., SCHOENWOLF A.G. (1986). Evaluation of the roles of intrinsic and extrinsic factors in occlusion of the spinal neurocoel during rapid brain enlargement in the chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 97: 26-46.
62. DESMOND M.E., FIELD M.C. (1992). Evaluation of neural fold fusion and coincident initiation of spinal cord occlusion in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.*, 319 (2): 246-60.
63. DESMOND M.E., DUZY M.J., FEDERECI B.D. (1993). Second messenger regulation of occlusion of the spinal neurocoel in the chick embryo. *Dev. Dyn.*, 197: 291–306.
64. DIEZ DEL CORRAL R., STOREY K. (2004). Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays*. 26:857-869.
65. DI ROCCO G., IACHININOTO M.G. TRITARELLI A., STRAINO S., ZACHEO A., GERMANI A., CREA F.CAPOGROSSI .C. (2006). Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci*. Jul 15; 119(Pt 14):2945-52.
66. DOBOLYI A., VINCZE C., PÁL G., LOVAS G. (2012). The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins. *Int J Mol Sci*. 13(7):8219-58.
67. DONO R. (2003). Fibroblast growth factor as regulators of central nervous system development and function. *Am. J. Physiol*. 284:R867-881.
68. DOYLE K.P., CEKANAVICIUTE E., MAMER L.E., BUCKWALTER M.S. (2010). TGFbeta signaling in the brain increases with aging and signals to astrocytes and innate immune cells in the weeks after stroke. *J. neuroinflammation* 7:62.

69. DRAGO J., MURPHY M., CARROLL S.M., HARVEY R.P., BARTLETT P.F. (1991). Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 15; 88(6):2199-203.
70. EASLEY C.A., MIKI T., CASTRO C.A., OZOLEK J., MINERVINI C.F., BEN-YEHUDAH A., SCHATTEN G.P. (2012). Human amniotic epithelial cells are reprogrammed more efficiently by induced pluripotency than adult fibroblasts. *Cell Reprogram*. Jun; 14(3):193-203.
71. ELWAN M.A., SAKURAGAWA N. (1997). Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *Neuroreport*. Nov 10; 8(16):3435-8.
72. ENDOH M., PULSINELLI W.A., WAGNER J.A. (1994) Transient global ischemia induces dynamic changes in the expression of Bfgf and the FGF receptor. *Brain. Res. Mol. Brain Res.* 22(1-4):76-88.
73. ERICES A., CONGET P., MINGUELL J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 109(1):235-42.
74. ERICSON J., THOR S., EDLUND T., JESSELL T.M., YAMADA T. (1992). Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256:1555-1560.
75. ERICSON, J., MUHR, J., PLACZEK, M., LINTS, T., JESSELL, T. M., AND EDLUND, T. (1995). Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81, 747-756.

76. FALK S., WURDAK H., ITTNER L.M., ILLE F., SUMARA G., SCHMID M.T., DRAGANOVA K., LANG K.S., PARATORE C., LEVEEN P., SUTER U., KARLSSON S., BORN W., RICCI R., GÖTZ M., SOMMER L. (2008). Brain area-specific effect of TGF-beta signaling on Wnt-dependent neural stem cell expansion. *Cell Stem Cell*. May 8; 2(5):472-83.
77. FATIMAH S.S., NG S.L., CHUA K.H., HAYATI A.R., TAN A.E., TAN G.C. (2010). Value of human amniotic epithelial cells in tissue engineering for cornea. *Hum Cell*. Nov; 23(4):141-51.
78. FARESE R.V. Jr, HERZ J. (1998). Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends Genet*. Mar; 14(3):115-20.
79. FERRETTI C., MATTIOLI-BELMONTE M. (2014). Periosteum derived stem cells for regenerative medicine proposals: Boosting current knowledge. *World J Stem Cells*. Jul 26; 6(3):266-77. doi: 10.4252/wjsc.v6.i3.266. Review.
80. FLANDERS K.C., LÜDECKE G., ENGELS S., CISSEL D.S., ROBERTS A.B., KONDAIAH P., LAFYATIS R., SPORN M.B., UNSICKER K. (1991). Localization and actions of transforming growth factor-betas in the embryonic nervous system. *Development*. Sep; 113(1):183-91.
81. FORD PERRISS M., ABUD H., MURPHY M. (2001). Fibroblast growth factor in the developing central nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 28(7):493-503.
82. FREEMAN B.G. (1972). Surface modifications of neural epithelial cells during formation of the neural tube in the rat embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 28: 437- 448.
83. FUCCILLO M., JOYNER A.L., FISHELL G. (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci*. Oct; 7(10):772-83. Review. Erratum in: *Nat Rev Neurosci*. 2006 Nov; 7(11):902.

84. GALLERA J. (1971). Primary induction in birds. *Adv. Morphog.*, 9: 149-180. (Review).
85. GANG E.J., JEONG J.A., HAN S., YAN Q., JEON C.J., KIM H. (2006). In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 8(3):215-27.
86. GAO Y., PU Y., WANG D., HOU L., GUAN W., MA Y. (2012). Isolation and biological characterization of chicken amnion epithelial cells. *Eur J Histochem*. Aug 29; 56(3):e33.
87. GARCÍA-CAMPANY L., MARTÍ E. (2007). The TGF β intracellular effector Smad3 regulates neuronal differentiation and cell fate specification and cell fates specification in the developing spinal cord. *Development* 134:65-75.
88. GASSER U.E, HATTEN M.E. (1990). Neuron-glia interactions of rat hippocampal cells in vitro: glial-guided neuronal migration and neuronal regulation of glial differentiation. *J Neurosci* 10:1276-1285.
89. GATO A., MORO J.A., ALONSO M.I., PASTOR J.F., REPRESA J.J., BARBOSA E. (1993). Chondroitin sulfate proteoglycan and embryonic brain enlargement in the chick. *Anat. Embryol.*, 188: 101-106.
90. GATO A., MARTÍN P., ALONSO M.I., MARTÍN C., PULGAR M.A., MORO J.A. (2004). Analysis of cerebro-spinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J. Exp. Zool.*, 301A: 280-289.
91. GATO A., MORO J.A., ALONSO M.I., BUENO D., DE LA MANO A., MARTÍN C. (2005). Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat. Rec. A.*, 284A: 475-484.

92. GATO A., DESMOND M.E. (2009). Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histiogenesis. *Dev. Biol.*, 327 (2): 263-272.
93. GATO A., ALONSO M.I., MARTÍN C., CARNICERO E., MORO J.A., DE LA MANO A., FERNÁNDEZ J.M., LAMUS F., DESMOND M.E. (2014). Embryonic cerebrospinal fluid in brain development: neural progenitor control. *Croat Med J.* Aug 28; 55 (4):299-305.
94. GE W., REN C., DUAN X., GENG D., ZHANG C., LIU X., CHEN H., WAN M., GENG R. (2014). Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Neural Stem Cells Using Cerebrospinal Fluid. *Cell Biochem Biophys.* Sep 13. [Epub ahead of print].
95. GENSBURGER C., LABOURDETTE G., SENSENBRENNER M. (1987). Brain fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro. *FEBS letters.* 217 (1):1-5.
96. GHOSH A., GREENBERG M.E. (1995). Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron.* 15: 89-103.
97. GODDARD D.R., BERRY M., BUTT A.M. (1999). In vivo actions of FGF-2 and IGF-1 on oligodendrocyte development and myelination in the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research.* 57 (1): 74-85
98. GONÇALVES M.B., BOYLE J., WEBBER D.J., HALL S., MINGER S.L., CORCORAN J.P.(2005).Timing of the retinoid-signalling pathway determines the expression of neuronal markers in neural progenitor cells. *Dev Biol.* Feb 1; 278(1):60-70.
99. GONT L.K., STEINBEISSER H., BLUMBERG B., DE ROBERTIS E.M. (1993).Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development.* Dec; 119(4):991-1004.

100. GÖTZ M., HUTTNER W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Oct; 6(10):777-88.
101. GOUIN A., BLOCH-GALLEGO E., TANAKA H., ROSENTHAL A., HENDERSON C.E. (1996). Transforming growth factor-beta 3, glial cell line-derived neurotrophic factor, and fibroblast growth factor-2, act in different manners to promote motoneuron survival in vitro. *J Neurosci Res.* 15; 43(4):454-64.
102. GOULDING M.D., LUMSDEN A., GRUSS P. (1993). Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development* 117:1001-1016.
103. GRONTHOS S. MANKANI M., BRAHIM J., ROBEY P.G., SHI S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 5; 97(25):13625-30.
104. GUAN J.L., SIMON A.K., PRESCOTT M., MENENDEZ J.A., LIU F., WANG F., WANG C., WOLVETANG E., VAZQUEZ-MARTIN A., ZHANG J. (2013). Autophagy in stem cells. *Autophagy.* 2013 Jun 1; 9(6):830-49.
105. GULLO F., DE BARI C. (2013). Prospective purification of a subpopulation of human synovial mesenchymal stem cells with enhanced chondro-osteogenic potency. *Rheumatology (Oxford).* Oct; 52(10):1758-68.
106. HALLBÖÖK F., AYER-LELIÈVRE C., EBENDAL T., PERSSON H. (1990). Expression of nerve growth factor receptor mRNA during early development of the chicken embryo: emphasis on cranial ganglia. *Development.* Apr; 108(4):693-704.
107. HAN, Y. G., SPASSKY, N., ROMAGUERA-ROS, M., GARCIA-VERDUGO, J. M., AGUILAR, A., SCHNEIDER MAUNOURY, S., ALVAREZ-BUYLLA A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 11, 277-284.

108. HAMA T., MIYAMOTO M., TSUKUI H., NISGIO C., HATANAKA H. (1989). Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Neurosci. Lett.* 104 (3): 340-344.
109. HAMBURGER V., HAMILTON H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* Jan; 88(1):49-92.
110. HARRIS R.G., HERZOG E.L., BRUSCIA E.M., GROVE J.E., VAN ARNAM J.S., KRAUSE D.S. (2004). Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science.* Jul 2; 305(5680):90-3.
111. HASSAN B.A., BELLEN H.J. (2000). Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development?. *Genes Dev.* 14: 1852-1865.
112. HARLAND R. (2000). Neural induction. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:357-362.
113. HATTA T., MORIYAMA K., NAKASHIMA K., TAGA T., OTANI H. (2002). The role of gp130 in cerebral cortical development: in vivo functional analysis in a mouse exo utero system. *J Neurosci* 22:5516-5524.
114. HATTA T., MATSUMOTO A., ONO A., UDAGAWA J., NIMURA M., HASHIMOTO R., OTANI H. (2006). Quantitative analyses of leukemia inhibitory factor in the cerebrospinal fluid in mouse embryos. *Neuroreport* 17:1863-1866.
115. HOLM N.R., HANSEN L.B., NILSSON C., GAMMELTOFT S. (1994). Gene expression and secretion of insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor binding protein-2 from cultured sheep choroid plexus epithelial cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 21:67-74.

116. HORTON A.R., BARLETT P.F., PENNICA D., DAVIES A.M. (1998). Cytokines promote the survival of mouse cranial sensory neurons at different developmental stages. *Eur. J. Neurosci.* 10 (2): 673-679.
117. HOTARY K.B., ROBINSON K.R. (1991). The neural tube of the *Xenopus* embryo maintains a potential difference across itself. *Brain Res Dev Brain Res.* Mar 18; 59(1):65-73.
118. HU Y., LIAO L., WANG Q., MA L., MA G., JIANG X., ZHAO R.C. (2003). Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med*; 141:342-349.
119. HUANG X., LIUA J., KETOVA T., FLEMINGA J.T., GROVERB V.K., COOPERB M.K., LITINGTUNGA Y., CHIANGA C. (2010). Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 4; 107(18):8422-7.
120. HUAT T.J., KHAN A.A., PATI S., MUSTAFA Z., ABDULLAH J.M., JAAFAR H. (2014). IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. *BMC Neurosci.* Jul 22; 15:91.
121. HÜBNER R., SCHMÖLE A.C., LIEDMANN A., FRECH M.J., ROLFS A., LUO J. (2010). Differentiation of human neural progenitor cells regulated by Wnt-3a. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 24; 400(3):358-62.
122. ILLE F., ATANASOSKI S., FALK S., ITTNER L.M., MÄRKI D., BÜCHMANN-MØLLER S., WURDAK H., SUTER U., TAKETO M.M., SOMMER L. (2007). Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Dev Biol.* Apr 1; 304(1):394-408.

123. INGHAM, P.W., McMAHON, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15, 3059–3087.
124. IN 'T ANKER P.S., NOORT W.A., SCHERJON S.A., KLEIJBURG-VAN DER KEUR C., KRUISSELBRINK A.B., VAN BEZOOIJEN R.L., BEEKHUIZEN W., WILLEMZE R., KANHAI H.H., FIBBE W.E. (2003). Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*; 88:845–852.
125. IN 'T ANKER P.S., SCHERJON S.A., KLEIJBURG-VAN DER KEUR C., DE GROOT-SWINGS G.M., CLAAS F.H., FIBBE W.E., KANHAI H.H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells.* 22(7):1338-45.
126. ISHII T., OHSUGI K., NAKAMURA S., SATO K., HASHIMOTO M, MIKOSHIBA K, SAKURAGAWA N. (1999). Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type-specific expression system. *Neurosci Lett.* Jun 25; 268(3):131-4.
127. JACOBS S., LIE D.C., DECICCO K.L., SHI Y., DELUCA L.M., GAGE F.H., EVANS R.M. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 7; 103(10):3902-7.
128. JAHAGIRDAR B.N, VERFAILLIE C.M. (2005). Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity. *Stem Cell Rev.* 1(1):53-9. Review.
129. JARSKOG L.F., XIAO H., WILKIE M.B., LAUDER J.M. y GILMORE J.H. (1997). Cytokine regulation of embryonic rat dopamine and serotonin neuronal survival *in vitro*. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15(6): 711-716.

130. JELASO A.M., ACEVEDO S., DANG T., LEPERE A., IDE C.F. (1998). Interleukin-1beta and its type 1 receptor are expressed in developing neural circuits in the frog, *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol*. May 4; 394(2):242-51.
131. JELINEK R., PEXIEDER T. (1970). Pressure of the CSF and the morphogenesis of the CNS. I. Chick embryo. *Folia Morphol (Praha)*. 18(2):102-10.
132. JESSELL T.M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signal and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.* 1, 20-29.
133. JESSELL T.M., SANES J.R. (2000). Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol.*10:599-611.
134. JIN W., XING Y.Q., YANG A.H., YANG Y.N., AI M. (2010). Differentiation and apoptosis effects of all-trans retinoic acid on inducing umbilical cord mesenchymal stem cells into neuron-like cells. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. Jun; 46(6):542-9. Chinese.
135. JOANNIDES A.J., WEBBER D.J., RAINETEAU O., KELLY C., IRVINE K.A., WATTS C., ROSSER A.E., KEMP P.J., BLAKEMORE W.F., COMPSTON A., CALDWELL M.A., ALLEN N.D., CHANDRAN S. (2007). Environmental signals regulate lineage choice and temporal maturation of neural stem cells from human embryonic stem cells. *Brain*. 130(Pt 5):1263-75.
136. JOHANSON C., STOPA E., BAIRD A., SHARMA H. (2011). Traumatic brain injury and recovery mechanisms: peptide modulation of periventricular neurogenic regions by the choroid plexus-CSF nexus. *J Neural Transm*. Jan; 118(1):115-33.
137. JOHE K.K., HAZEL T.G., MULLER T., DUGICH-DJORDJEVIC M.M., MCKAY R.D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.*15; 10(24):3129-40.

138. JOHNS .LD., BABCOCK G., GREEN D., FREEDMAN M., SRIRAM S., RANSOHOFF R.M. (1992). Transforming growth factor-beta 1 differentially regulates proliferation and MHC class-II antigen expression in forebrain and brainstem astrocyte primary cultures. *Brain Res.* 585(1-2):229-36.
139. JOHNSON G., BRANE D., BLOCK W., VAN KAMMEN D.P., GURKLIS J., PETERS J.L., WYATT R.J., KIRCH D.G., GHANBARI H.A., MERRIL C.R. (1992). Cerebrospinal fluid protein variations in common to Alzheimer's disease and schizophrenia. *Appl Theor Electrophor.* 1992; 3(2):47-53.
140. JONES J.I., CLEMMONS D.R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16:3-34.
141. JOSEFSON D. (1999). Adult stem cells may be redefinable. *BMJ.* 318(7179):282B.
142. JOSEPH S.J., FORD M.D., BARTH C., PORTBURY S., BARTLETT P.F., NURCOMBE V., GREFERATH U. (1996). A proteoglycan that activates fibroblast growth factors during early neuronal development is a perlecan variant. *Development.* 122(11):3443-3452.
143. JUNIER M.P. (2000).What role(s) for TGF alpha in the central nervous system? *Prog. Neurobiol.* 62(5):443-473.
144. KADIVAR M., KHATAMI S., MORTAZAVI Y., SHOKRGOZAR M.A., TAGHIKHANI M., SOLEIMANI M. (2006).In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 10; 340(2):639-47.

145. KAJSTURA J., ROTA M., WHANG B. CASCAPERA S., HOSODA T., BEARZI C., NURZYNSKA D., KASAHARA H., ZIAS E., BONAFÉ M., NADAL-GINARD B. TORELLA D., NASCIMBENE A., QUAINI F., URBANEK K., LERI A., ANVERSA P. (2005). Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res.* Jan 7; 96(1):127-37.
146. KALYANI A.J., MUTJABA T., RAO M.S. (1999). Expression of EGF receptor and FGF receptor isoforms during neuroepithelial stem cell differentiation. *Journal of Neurobiology.* 38: 207-24.
147. KANEKO Y., SAKAKIBARA S., IMAI T., SUZUKI A., NAKAMURA Y., SAWAMOTO K., OGAWA Y., TOYAMA Y., MIYATA T., OKANO H. (2000). Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci.* 22(1-2):139-53.
148. KANG X.Q., ZANG W.J., BAO L.J., LI D.L., XU X.L., YU X.J. (2006). Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int.* 30(7):569-75.
149. KAKISHITA K., NAKAO N., SAKURAGAWA N., ITAKURA T. (2003). Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopaminergic neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res.* Aug 1; 980(1):48-56.
150. KAUFMAN M.K. (1992). *The atlas of mouse development.* London: Academic Press.
151. KAWAMATA T., ALEXIS N.E., DIETRICH W.D., FINKLESTEIN S.P. (1996). Intracisternal basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances behavioral recovery following focal cerebral infarction in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16(4):542-7.

152. KAZANIS I., GIANNAKOPOULOU M., PHILIPPIDIS H., STYLIANOPOULOU F. (2004). Alterations in IGF-I, BDNF and NT-3 levels following experimental brain trauma and the effect of IGF-I administration. *Exp. Neurol.* 186(2):221–234.
153. KILPATRICK T.J., BARTLETT P.F. (1995). Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF2 or EGF. *J. Neurosci.* 15: 3653-61.
154. KÖGLER G., SENSKEN S., AIREY J.A., TRAPP T., MÜSCHEN M., FELDHAHN N., LIEDTKE S., SORG R.V., FISCHER J., ROSENBAUM C., GRESCHAT S., KNIPPER A., BENDER J., DEGISTIRICI O., GAO J., CAPLAN A.I., COLLETTI E.J., ALMEIDA-PORADA G., MÜLLER H.W., ZANJANI E., WERNET P. (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med.* 200(2):123-35.
155. KOKAI L.E., MARRA K., RUBIN J.P. (2014). Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res. Apr;* 163(4):399-408. Review.
156. KONDO T., JOHNSON S.A., YODER M.C., ROMAND R., HASHINO E. (2005). Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 29; 102(13):4789-94.
157. KOMADA, M., SAITSU, H., KINBOSHI, M., MIURA, T., SHIOTA, K., ISHIBASHI, M. (2008). Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development* 135, 2717–2727.
158. KORHONEN L., RIIKONEN R., NAWA H., LINDHOLM D. (1998). Brain derived neurotrophic factor is increased in cerebrospinal fluid of children suffering from asphyxia. *Neurosci. Lett.* 240(3):151–154.

159. KOYANO S., FUKUI A., UCHIDA S., YAMADA K., ASASHIMA M., SAKURAGAWA N. (2002). Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Dev Growth Differ.* Apr; 44(2):103-12.
160. KUDOH T., WILSON S.W., DAWID I.B. (2002). Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development.* 129:4335-4346.
161. LACONTI J.J., JABLONSKI M.G., DESMOND M.E. (2004). N-cadherin maintains occlusion of the chick neural tube. *FASEB Abstr.* No. LB, p 10.
162. LANGMAN. (2002). *Embriología médica con orientación clínica.* 8ª edición. Editorial médica panamericana. Págs.399-407.
163. LEE C, AGOSTON D.V. (2010). Vascular endothelial growth factor is involved in mediating increased de novo hippocampal neurogenesis in response to traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* Mar; 27(3):541-53.
164. LEE K.J., JESSELL T.M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:261-294.
165. LEHTINEN M.K., ZAPPATERRA M.W., CHEN X., YANG Y.J., HILL A.D., LUN M., MAYNARD T., GONZALEZ D., KIM S., YE P, D'ERCOLE A.J., WONG E.T., LAMANTIA A.S., WALSH C.A. (2011). The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron.* Mar 10; 69(5):893-905.
166. LeROITH D., WERNER H., NEUENSCHWANDER S., KALEBIC T., HELMAN L.J. (1995). The role of the insulin-like growth factor-1 receptor in cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 766:402-8.
167. LEVI-MONTALCINI R. (1987). The nerve growth factor: thirty-five years later. *Biosci Rep.* Sep; 7(9):681-99.

168. LEVISON S.W., JIANG F.J., STOLTZFUS O.K., DUCCESCHI M.H. (2000). IL-6-type cytokines enhance epidermal growth factor-stimulation of astrocyte proliferation. *Glia*. 32 (3): 328-337.
169. LEVITAN M. L., DESMOND M. E. (2009). Expansion of the human embryonic brain during rapid brain growth: area analysis. *Anat. Rec.*, 292 (4): 472-480.
170. Li X.Y., DESMOND M.E. (1991). Modulation of Na⁺/K⁺ -ATPase pumps in the heart of the chick embryo influences brain expresion. *Soc. Neurosci. Abstr.* 17.21.16.
171. LI H., GAO F., MA L., JIANG J., MIAO ., JIANG M., FAN Y., WANG L., WU D., LIU B., WANG W., LUI V.C., YUAN Z. (2012). Therapeutic potential of in utero mesenchymal stem cell (MSCs) transplantation in rat foetuses with spina bífida aperta. *J Cell Mol Med.* Jul 16(7):1606-17.
172. LIM J.Y., PARK S.I., OH J.H., KIM S.M., JEONG C.H., JUN J.A., LEE K.S., OH W., LEE J.K., JEUN S.S. (2008). Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *J Neurosci Res.*1; 86(10):2168-78.
173. LIEM K.F., TREMMI J.G., ROELINK H., JESSELL T.M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediates signals from epidermal ectoderm. *Cell. Sep.* 82(22):969-979.
174. LIEM K.F., TREMMI J.G., JESSELL T.M. (1997). A role for the roof plate and its resident TGFβ-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell.* Oct. 91(3):127-138.

175. LIU Y.U., SEÇKIN H., IZCI Y., DU Z.W., YAN Y.P., BAŞKAYA M.K. (2009). Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29(4):780-91.
176. LIU Y., LIU L., MA X., YIN Y., TANG B., LI Z. (2013). Characteristics and neural-like differentiation of mesenchymal stem cells derived from foetal porcine bonemarrow. *Biosci Rep.* Mar 28; 33(2):e00032.
177. LOW C.B., LIOU Y.C., TANG B.L. (2008). Neural differentiation and potential use of stem cells from the human umbilical cord for central nervous system transplantation therapy. *J Neurosci Res.* 86(8):1670-9. Review.
178. LU B., JAN L., JAN Y.N. (2000). Control of cell divisions in the nervous system: symmetry and asymmetry. *Annu. Rev. Neurosci.* 23:531-556.
179. LU C.Q.L.R., ZHANG Q.B. (2008). Gene expression in differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells into neurocyte-like cells induced by *salvia mitiorrhiza*. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research.* 47, 9363-9366.
180. LUMSDEN A., KRUMLAUF R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science.* 274:1109-1115.
181. MACHOLD, R., HAYASHI, S., RUTLIN, M., MUZUMDAR, M.D., NERY, S., CORBIN, J. G., GRITLI-LINDE A, DELLOVADE T, PORTER J.A., RUBIN L.L., DUDEK H, MCMAHON A.P., FISHELL G. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39, 937-950.

182. MADEN M. (2002). Retinoid signalling in the development of central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:843-853.
183. MAKINO S., FUKUDA K., MIYOSHI S., KONISHI F., KODAMA H., PAN J., SANO M., TAKAHASHI T., HORI S., ABE H., HATA ., UMEZAWA A., OGAWA S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest. Mar;* 103(5):697-705.
184. MANTEL P.Y., SCHMIDT-WEBER C.B. (2011). Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. *Methods Mol Biol.* 677:303-38.
185. MARALDI T., BERTONI L., RICCIO M., ZAVATTI M., CARNEVALE G., RESCA E., GUIDA M., BERETTI .F, LA SALA G.B., DE POL A. (2014). Human amniotic fluid stem cells: neural differentiation in vitro and in vivo. *Cell Tissue Res. Jul;* 357(1):1-13
186. MARGOLIS R.U., ALTSZULER N. (1967). Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature.* 215:1375-1376.
187. MARNELLOS G., DEBLANDRE G.A., MJOLSNESS E., KINTNER C. (2000). Delta-Notch lateral inhibitory patterning in the emergence of ciliated cells in xenopus: experimental observations and a gene network model. *Pac. Symp. Biocomput.* 329-340.
188. MARTÍN P. (1999): Estudio de la composición proteica del fluido intracavitario cerebral en embriones de pollo; papel del Fibroblast Growth Factor-2 intracavitario en la replicación de las células neuroepiteliales (Tesis Doctoral). Departamento de Anatomía Humana, Universidad de Valladolid.
189. MARTÍN C., BUENO D., ALONSO M.I, MORO J.A., CALLEJO S., PARADA C., MARTÍN P., CARNICERO E., GATO A. (2006). FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells. *Dev Biol. Sep 15;* 297(2):402-16.

-
-
190. MARTIN C., ALONSO M.I., SANTIAGO C., MORO J.A., DE LA MANO A., CARRETERO R., GATO A. (2009). Early embryonic brain development in rats requires the trophic influence of cerebrospinal fluid. *Int J Dev Neurosci.* Nov; 27(7):733-40.
 191. MÄRZ P., HEESE K., DIMITRIADES-SCHMUTZ B., ROSE-JOHN S., OTTEN U. (1999). Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression. *Glia.* 26 (3): 191-200.
 192. MASHAYEKHI F., DRAPER C.E., BANNISTER C.M., POURGHASEM M., OWEN-LYNCH P.J., MIYAN J.A. (2002). Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-Tx) rat: a role for CSF. *Brain.* 125(Pt 8):1859-74.
 193. MASHAYEKHI F., SALEHI Z. (2007). Infusion of anti-nerve growth factor into the cisternum magnum of chick embryo leads to decrease cell production in the cerebral cortical germinal epithelium. *Eur J Neurol.* 14(2):181-6.
 194. MASHAYEKHI F. (2008). Neural cell death is induced by neutralizing antibody to nerve growth factor: an in vivo study. *Brain Dev.* 30(2):112-7.
 195. MASHAYEKHI F., AZARI M., MOGHADAM L.M., YAZDANKHAH M., NAJI M., SALEHI Z. (2009). Changes in cerebrospinal fluid nerve growth factor levels during chick embryonic development. *J Clin Neurosci.* Oct; 16(10):1334-7.
 196. MATSUURA K., TERADA S., KOYANO S., MIYAJIMA T., HOSHIKA A., SAKURAGAWA N. (2001). Synthesis and release of erythropoietin by human amniotic epithelial cells. *J Tokyo Med Univ* 59:38-44.

197. MAUFROID J.P., BRADSHAW R.A., BOILLY B., HONDERMARCK H. (1996). Nerve growth factor induced neurite outgrowth from amphibian neuroepithelial precursor cells is prevented by dipeptides inhibiting ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Dev Biol.* Jun; 40(3):609-11.
198. MAURO W. ZAPPATERA, MARIA K. LEHTINEN. (2012). The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cell. Mol. Life Sci.* 69:2863–2878.
199. MCKAY R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science.* 4; 276(5309):66-71. Review.
200. MEINIEL O., MEINIEL A. (2007). The complex multyidomain organisation of SCO- spondin protein is highly conserved in mammals. *Brain. Res. Rev.* 53:321-327.
201. MERRILL J.E. (1991). Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. *Dev. Neurosci.* 13 (3): 130-137.
202. METCALF D. (1997). Murine hematopoietic stem cells committed to macrophage/dendritic cell formation: stimulation by Flk2-ligand with enhancement by regulators using the gp130 receptor chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11552–11556.
203. MICHAELIDIS T.M., LIE D.C. (2008). Wnt signaling and neural stem cells: caught in the Wnt web. *Cell Tissue Res.* Jan; 331(1):193-210.
204. MIKI T., MITAMURA K., ROSS M.A., STOLZ D.B., STROM S.C. (2007). Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol.* 75(2):91-6.
205. MING G.L., SONG H. (2001). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron.* May 26; 70(4):687-702. Review.

206. MITCHELL K.E., WEISS M.L., MITCHELL B.M., MARTIN P., DAVIS D., MORALES L., HELWIG B., BEERENSTRAUCH M., ABOU-EASA K., HILDRETH T., TROYER D., MEDICETTY S. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*.21(1):50-60.
207. MITSUI K., TOKUZAWA Y., ITOH H., SEGAWA K., MURAKAMI M., TAKAHASHI K., MARUYAMA M., MAEDA M., YAMANAKA S. (2003).The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.*Cell*. May30;113(5):631-42.
208. MIYAN J.A., NABIYOUNI M., ZENDAH M. (2003). Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *J Physiol Pharmacol*. Apr; 81(4):317-28.
209. MIZUNO H., ZUK P.A., ZHU M., LORENZ H.P., BENHAIM P., HEDRICK M.H. (2002). Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*. Jan; 109(1):199-209; discussion 210-1.
210. MONTZKA K., LASSONCZYK N., TSCHÖKE B., NEUSS S., FÜHRMANN T., FRANZEN R., SMEETS R., BROOK G.A., WÖLTJE M. (2009). Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci*. 10:16.
211. NEUHUBER B., GALLO G., HOWARD L., KOSTURA L., MACKAY A., FISCHER I. (2004). Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res*. Jul 15; 77(2):192-204.
212. NIEVELSTEIN R.A., HARTWIG N.G., VERMEIJ-KEERS C., VALK J. (1993). Embryonic development of the mammalian caudal neural tube. *Teratology*., 48 (1): 21-31.

213. NIIMI M., YAMAMOTO Y., TAKEMORI H., UNO A., KONDO Y., YAMATODANI A. (1997). Lipopolysaccharide and interleukin-1beta augmented histidine decarboxylase activity in cultured cells of the rat embryonic brain. *J. Neurochem.* 69(2): 851-858.
214. NIKNEJAD H., PEIROVI H., AHMADIANI A., GHANA VI J., JORJANI M. (2010). Differentiation factors that influence neuronal markers expression in vitro from human amniotic epithelial cells. *Eur Cell Mater.* 19:22-9.
215. NISHIKAWA M., YANAGAWA N., YURI S., HAUSER P., JO O.D., YANAGAWA N. (2013). Effective induction of cells expressing GABAergic neuronal markers from mouse embryonic stem cell. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2013 Aug; 49(7):479-85.
216. NOVITCH B.G., WICHTERLE H., JESSELL T.M., SOCKANATHAN S. (2003). A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron.* Sep. 40(25):81-95.
217. NUGENT M.A., EDELMAN E.R. (1992). Kinetics of fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: a mechanism for cooperativity. *Biochemistry* 31:8876-8883.
218. OHTA M., SUZUKI Y., NODA T., KATAOKA K., CHOU H., ISHIKAWA N., KITADA M., MATSUMOTO N., DEZAWA M., SUZUKI S., IDE C. (2004). Implantation of neural stem cells via cerebrospinal fluid into the injured root. *Neuroreport.* 2004 Jun 7; 15(8):1249-53.
219. OKADA Y., SHIMAZAKI T., SOBUE G., OKANO H. (2004). Retinoic acid concentration dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol.* Nov 1; 275(1):124-42.

220. OLSSON A., CSAJBOK L., OST M., HOGLUND K., NYLEN K., ROSENGREN L., NELLGARD B., BLENNOW K. (2004). Marked increase of betaamyloid (1-42) and amyloid precursor protein in ventricular cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *J. Neurol.* 251(7):870-876.
221. OPPENHEIM R.W., WIESE S., PREVETTE D., ARMANINI M., WANG S., HOUENOU L. J., HOLTMANN B., GOTZ R., PENNICA D., SENDTNER M. (2001). Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons. *J Neurosci.* 15; 21(4):1283-91.
222. ORCIANI M., DI PRIMIO R. (2013). Skin-derived mesenchymal stem cells: isolation, culture, and characterization. *Methods Mol Biol;* 989:275-83.
223. ORITO K., HARADA H., HARA M., YAMASHITA S., KIKUCHI K., SHIGEMORI M. (2010). Cerebrospinal fluid following cerebral ischemia accelerates the proliferation of bone marrow stromal cells in vitro. *Kurume Med J.;* 57(1-2):21-8.
224. OSATHANON T., NOWWAROTE N., PAVASANT P. (2011). Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through aFGFR and PLC γ signaling pathway. *J Cell Biochem.* Jul; 112 (7): 1807-16.
225. OSHIMA K., TEO D.T, SENN P., STARLINGER V., HELLER S. (2007). LIF pro- motes neurogenesis and maintains neural precursors in cell populations derived from spiral ganglion stem cells. *BMC Dev. Biol.* 7:112.
226. OSWALD J., BOXBERGER S., JØRGENSEN B., FELDMANN S., EHNINGER G., BORNHÄUSER M., WERNER C. (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 22(3):377-84.

-
-
227. OZDINLER P.H., MACKLIS J.D. (2006). IGF-1 specifically enhances axón outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat. Neurosci.* 9:1371-1381.
228. PALMA, V., LIM, D.A., DAHMANE, N., SANCHEZ, P., BRIONNE, T.C., HERZBERG, C.D., GITTON Y., CARLETON A., ALVAREZ-BUYLLA A., RUIZ I ALTABA A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132, 335-344.
229. PANCHISION D.M., McKAY R.D.G. (2002). The contro of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:478-487.
230. PARACCHINI V., CARBONE A., COLOMBO F., CASTELLANI S., MAZZUCHELLI S., GIOIA S.D., DEGIORGIO D., SEIA M., PORRETTI L., COLOMBO C., CONESE M. (2012). Amniotic mesenchymal stem cells: a new source for hepatocyte-like cells and induction of CFTR expression by coculture with cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Biomed Biotechnol.* 2012:575471.
231. PARADA C., GATO A., BUENO D. (2005). Mammalian embryonic cerebrospinal fluid proteome has greater apolipoprotein and enzyme pattern complexity than the avian proteome. *J Proteome Res* 4:2420-2428.
232. PARADA C., GATO A., APARICIO M., BUENO D. (2006). Proteome analysis of chick embryonic cerebrospinal fluid. *Proteomics.* Jan; 6(1):312-20.
233. PARADA C., ESCOLÀ-GIL J.C., BUENO D. (2008a). Low-density lipoproteins from embryonic cerebrospinal fluid are required for neural differentiation. *J Neurosci Res.* 86(12):2674-84.

-
-
240. PARADA C., GATO A., BUENO D. (2008b). All trans retinol and retinol-binding proteins from embryonic cerebrospinal fluid exhibit dynamic behaviour during early central nervous system development. *Neuroreport*, 19 (9): 945–950.
241. PARISH C.L., FINKELSTEIN D.I., TRIPANICHKUL W., SATOSKAR A.R., DRAGO J., HORNE M.K. (2002). The role of interleukin-1, interleukin-6, and glia in inducing growth of neuronal terminal arbors in mice. *J. Neurosci.* 22(18): 8034-8041.
242. PARK S., KOH S.E., HUR C.Y., LEE W.D., LIM J., LEE Y.J. (2013). Comparison of human first and third trimester placental mesenchymal stem cell. *Cell Biol Int. Mar*; 37(3):242-9.
243. PARVAS M., PARADA C., BUENO D. (2008). A blood-CSF barrier function controls embryonic CSF protein composition and homeostasis during early CNS development. *Dev. Biol.*, 321 (1): 51-63.
244. PARVAS M., BUENO D. (2010). The embryonic blood-CSF barrier has molecular elements to control E-CSF osmolarity during early CNS development. *J Neurosci Res.* May 1; 88(6):1205-12.
245. PASTEELS, J. (1937) *Arch. Biol.* 48, 381-488.
246. PATTERSON S.L., GRADY M.S., BOTHWELL M. (1993). Nerve growth factor and a fibroblast growth factor-like neurotrophic activity in cerebrospinal fluid of brain injured human patients. *Brain Res.* 605(1):43–49.
247. PATTERSON P.H. (1994). Leukemia inhibitory factor, a cytokine at the interface between neurobiology and immunology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16; 91(17):7833-5. Review.
248. PITARD V., LORGEOT V., TAUPIN J.L., AUBARD Y., PRALORAN V., MOREAU J.F. (1998). The presence in human serum of a circulating soluble leukemia inhibitory factor receptor (sgp190) and its evolution during pregnancy. *Eur Cytokine Netw* 9:599–605.

249. PITTENGER M.F., MACKAY A.M., BECK S.C., JAISWAL R.K., DOUGLAS R., MOSCA J.D., MOORMAN M.A., SIMONETTI D.W., CRAIG S., MARSHAK D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. Apr 2; 284(5411):143-7.
250. PORTMANN-LANZ C.B., SCHOEBERLEIN A., PORTMANN R., MOHR S., ROLLINI P., SAGER R., SURBEK D.V. (2010). Turning placenta into brain: placental mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes. *Am J Obstet Gynecol*. Mar; 202(3):294.e1-294.e11.
251. POURNASR B., MOHAMADNEJAD M., BAGHERI M., AGHDAMI N., SHAHSAVANI M., MALEKZADEH R., BAHARVAND H. (2011). In vitro differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Arch Iran Med*. 2011 Jul; 14(4):244-9.
252. PRUSA A.R., MARTON E., ROSNER M., BERNASCHEK G., HENGSTSCHLÄGER M. (2003). Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research. *Hum Reprod*. Jul; 18(7):1489-93.
253. PRUSZAK J., LUDWIG W., BLAK A., ALAVIAN K., ISACSON O. (2009). CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem Cells*. Dec; 27(12):2928-40.
254. PUCHADES M., HANSSON S.F., NILSSON C.L., ANDREASEN N., BLENNOW K., DAVIDSSON P. (2003). Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003 Oct 21; 118(1-2):140-6.
255. QIAN X., DAVIS A.A., GODERIE, S.K.; TEMPLE S. (1997). FGF-2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron*. 18: 81-93.

-
-
256. RAFF M. (2003). Adult stem cell plasticity: fact or artifact?. *Annu Rev Cell Dev Biol.*19:1-22. Review.
257. RATAJCZAK J., MACHALÍNSKI B., MARLICZ W., HALASA M., RATAJCZAK M.Z. (1997). Influence of leukemia inhibitory factor (LIF) on the survival, proliferation and differentiation of human erythroid progenitor cells. In vitro studies under serum free conditions. *Folia Histochem Cytobiol* 35:63-68.
258. ROCHE S., RICHARD M.J., FAVROT M.C. (2007). Oct-4, Rex-1, and Gata-4 expression in human MSC increase the differentiation efficiency but not hTERT expression. *J Cell Biochem. J Cell Biochem.* May 15; 101(2):271-80.
259. RODRIGUEZ E.M., OKSCHE A., HEIN S., YULIS C.R. (1992). Cell biology of the subcommissural organ. *Int. Rev. Cytol.* 135:39-121.
260. RODRÍGUEZ E.M., RODRÍGUEZ S., HEIN S. (1998). The subcommissural organ. *Microsc Res Tech.* Apr 15; 41(2):98-123.
261. RODRÍGUEZ-LOZANO F.J., BUENO C., INSAUSTI C.L., MESEGUER L., RAMÍREZ M.C., BLANQUER M., MARÍN N., MARTÍNEZ S., MORALEDA J.M. (2011). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J.* 44(9):800-6.
262. ROELINK, H., PORTER, J. A., CHIANG, C., TANABE, Y., CHANG, D.T., BEACHY, P.A., JESSELL T.M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell*81, 445-455.
263. ROJAS MAYORQUÍN A.E., ORTUÑO SAHAGÚN D. (2011). Diferenciación celular en el sistema nervioso, el caso de las células precursoras neuro-gliales. *Bio Ciencias.* 1(2): 3-17.

-
-
264. ROWITCH, D.H., S-JACQUES, B., LEE, S.M., FLAX, J.D., SNYDER, E. Y., MCMAHON, A.P. (1999). Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J. Neurosci.* 19, 8954–8965.
 265. ROYO N.C., CONTE V., SAATMAN K.E., SHIMIZU S., BELFIELD C.M., SOLTESZ K.M., DAVIS J.E., FUJIMOTO S.T., MCINTOSH T.K. (2006). Hippocampal vulnerability following traumatic brain injury: a potential role for neurotrophin-4/5 in pyramidal cell neuroprotection. *Eur. J. Neurosci.* 23(5):1089–1102.
 266. RUBENSTEIN J.L., BEACHY P.A. (1998). Patterning of the embryonic forebrain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8:18-26.
 267. RUSSO V.C., GLUCKMAN P.D., FELDMAN E.L., WERTHER G.A. (2005). The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr. Rev.* 26:916-43.
 268. SAFFORD K.M., HICOK K.C., SAFFORD S.D., HALVORSEN Y.D., WILKISON W.O., GIMBLE J.M., RICE H.E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jun 7; 294(2):371-9.
 269. SALEHI Z., MASHAYEKHI F. (2006). The role of cerebrospinal fluid on neural cell survival in the developing chick cerebral cortex: an in vivo study. *Eur J Neurol.* Jul; 13(7):760-4.
 270. SALEHI Z., MASHAYEKHI F., NAJI M., PANDAMOOZ S. (2009). Insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid during the development of mouse embryos. *J Clin Neurosci.* Jul;16(7):950-3
 271. SANCHEZ J.C., APPEL R.D., GOLAZ O., PASQUALI C., RAVIER F., BAIROCH A., HOCHSTRASSER D.F. (1995). Inside SWISS-2DPAGE database. *Electrophoresis.* Jul; 16(7):1131-51.
 272. SANCHEZ-RAMOS J.R. (2002). Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res.* 2002 Sep 15; 69(6):880-93. Review.

-
-
273. SAMOKHVALOV I.M. (2013). Deconvoluting the ontogeny of hematopoietic stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 71(6):957-78. Review.
274. SAKURAGAWA N., TOHYAMA J., YAMAMOTO H. (1995). Immunostaining of human amniotic epithelial cells: possible use as a transgene carrier in gene therapy for inborn errors of metabolism. *Cell Transplant.* May-Jun; 4(3):343-6.
275. SAKURAGAWA N., THANGAVEL R., MIZUGUCHI M., HIRASAWA M., KAMO I. (1996). Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett.* May 3; 209(1):9-12.
276. SAKURAGAWA N., MISAWA H., OHSUGI K., KAKISHITA K., ISHII T., THANGAVEL R., TOHYAMA J., ELWAN M., YOKOYAMA Y., OKUDA O., ARAI H., OGINO I., SATO K. (1997). Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease. *Neurosci Lett.* Aug 22; 232(1):53-6.
277. SAKURAGAWA N., ENOSAWA S., ISHII T., THANGAVEL R., TASHIRO T., OKUYAMA T., SUZUKI S. (2000). Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet.*; 45(3):171-6.
278. SAKURAGAWA N., ELWAN M.A., UCHIDA S., FUJII T., KAWASHIMA K. (2001). Non-neuronal neurotransmitters and neurotrophic factors in amniotic epithelial cells: expression and function in humans and monkey. *Jpn J Pharmacol.* Jan;85(1):20-3.
279. SAKURAGAWA N., KAKINUMA K., KIKUCHI A., OKANO H., UCHIDA S., KAMO I., KOBAYASHI M., YOKOYAMA Y. (2004). Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J Neurosci Res.* Oct 15; 78(2):208-14. Erratum in: *J Neurosci Res.* 2005 Mar 1; 79(5):725.

-
-
280. SIMAMURA E., SHIMADA H., HIGASHI N., UCHISHIBA M., OTANI H., HATTA T. (2010). Maternal Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Promotes Fetal Neurogenesis via a LIF-ACTH-LIF Signaling Relay Pathway. *Endocrinology*, 151(4):1853–1862.
 281. SCHÄBITZ W.R., SCHWAB S., SPRANGER M., HACKE W. (1997). Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* May; 17(5):500-6.
 282. SCHOENWOLF G.C., DESMOND M.E. (1984a). Descriptive studies of occlusion and reopening of the lumen of the spinal cord of the early chick embryo. *Anat. Rec.*, 209: 251-263.
 283. SCHOENWOLF G.C., DESMOND M.E. (1984b). Neural tube occlusion precedes rapid brain enlargement. *J. Exp. Zool.*, 230: 405-407.
 284. SCHOENWOLF G.C., DESMOND M.E. (1986). Timing and positioning of reopening of the occluded spinal neurocele in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.*, 246 (4): 459-466.
 285. SHARMA H.S., JOHANSON C.E. (2007). Intracerebroventricularly administered neurotrophins attenuate blood cerebrospinal fluid barrier breakdown and brain pathology following whole-body hyperthermia: an experimental study in the rat using biochemical and morphological approaches. *Ann N Y Acad Sci.* Dec; 1122:112-29.
 286. SHARPE C., GOLDSTONE K. (2000). The control of *Xenopus* embryonic primary neurogenesis is mediated by retinoid signalling in the neurectoderm. *Mech Dev.* Mar 1; 91(1-2):69-80.
 287. SHI R., BORGENS R.B. (1994). Embryonic neuroepithelial sodium transport, the resulting physiological potential, and cranial development. *Dev Biol.* Sep; 165(1):105-16.

288. SHORE P.M., JACKSON E.K., WISNIEWSKI S.R., CLARK R.S., ADELSON P.D., KOCHANEK P.M. (2004). Vascular endothelial growth factor is increased in cerebrospinal fluid after traumatic brain injury in infants and children. *Neurosurgery* 54(3): 605–611 (discussion 611–2).
289. SHORT B.J., BROUARD N., SIMMONS P.J. (2009). Prospective isolation of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Methods Mol Biol.* 482:259-68.
290. SMITH J.L., SCHOENWOLF G.C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci.*, 20 (11): 510-517. (Review).
291. SNYKERS S., DE KOCK J., ROGIERS V., VANHAECKE T. (2009). In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells*. Mar; 27(3):577-605. doi: 10.1634/stemcells.2008-0963. Review.
292. STERN H.M., LIN JONES J., HAUSCHKA S.D. (1997). Synergistic interactions between bFGF and TGF- β family member may mediate myogenic signals from the neural tube". *Development*. 124: 3511-23.
293. STORCH A., PAUL G., CSETE M., BOEHM B.O., CARVEY P.M., KUPSCH A., SCHWARZ J. (2001). Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp. Neurol.* 170(2): 317-325.
294. STORKEBAUM E., LAMBRECHTS D., DEWERCHIN M., MORENO-MURCIANO M.P, APPELMANS S., OH H, VAN DAMME P., RUTTEN B., MAN W.Y., DE MOL M., WYNS S., MANKA D., VERMEULEN K., VAN DEN BOSCH L., MERTENS N., SCHMITZ C., ROBBERECHT W., CONWAY E.M., COLLEN D., MOONS L., CARMELIET P. (2005). Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci.* Jan; 8(1):85-92.

295. STOVER J.F., SCHONING B., BEYER T.F., WOICIECHOWSKY C., UNTERBERG A.W. (2000). Temporal profile of cerebrospinal fluid glutamate, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in relation to brain edema and contusion following controlled cortical impact injury in rats. *Neurosci. Lett.* 288(1):25-28.
296. SUN L., LEE J., FINE H.A. (2004). Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *J Clin Invest.* May; 113(9):1364-74.
297. SUN D., BULLOCK M.R., MCGINN M.J., ZHOU Z., ALTEMEMI N., HAGOOD S., HAMM R., COLELLO R.J. (2009). Basic fibroblast growth factor enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 216(1):56-65.
298. TAGA T., HIBI M., HIRATA Y., YAMASAKI K., YASUKAWA K., MATSUDA T., HIRANO T., KISHIMOTO T. (1986). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell.* 11; 58(3):573-81.
299. TAGA T., KISHIMOTO T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* 15:797-819. Review.
300. TAKESHIMA Y., NAKAMURA M., MIYAKE H., TAMAKI R., INUI T., HORIUCHI K., WAJIMA D., NAKASE H. (2011). Neuroprotection with intraventricular brain-derived neurotrophic factor in rat venous occlusion model. *Neurosurgery.* May; 68(5):1334-41.
301. TAO Y., BLACK I.B., DICICCO-BLOOM E. (1997). In vivo neurogenesis is inhibited by neutralizing antibodies to basic Fibroblast Growth Factor. *Journal of Neurobiology.* 33: 289-296.
302. TERADA N., HAMAZAKI T., OKA M., HOKI M., MASTALERZ D.M., NAKANO Y., MEYER E.M., MOREL L., PETERSEN B.E., SCOTT E.W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* Apr 4; 416(6880):542-5.

-
-
303. THAU-ZUCHMAN O., SHOHAMI E., ALEXANDROVICH A.G., LEKER R.R. (2010). Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* May; 30(5):1008-16.
304. TIMPER K., SEBOEK D., EBERHARDT M., LINSCHIED P., CHRIST-CRAIN M., KELLER U., MÜLLER B., ZULEWSKI H. (2006). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Mar 24; 341(4):1135-40. Epub 2006 Jan 26.
305. TORCIA M., BRACCI-LAUDIERO L., LUCIBELLO M., NENCIONI L., LABARDI D., RUBARTELLI A., COZZOLINO F., ALOE L., GARACI E. (1996). Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell.* 3; 85(3):345-56.
306. TRAISTER A., ABASHIDZE S., GOLD V., PLACHTA N., KARCHOVSKY E., PATEL K., WEIL M.(2002). Evidence that nitric oxide regulates cell-cycle progression in the developing chick neuroepithelium. *Dev Dyn.* Nov; 225(3):271-6.
307. TROPEPE V., SIBILIA M., CIRUNA B.G., ROSSANT J., WAGNER E.F., VAN DER KOOY D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev. Biol.* 208:166-188.
308. UCHIDA S., INANAGA Y., KOBAYASHI M., HURUKAWA S., ARAIE M., SAKURAGAWA N. (2000). Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. *J Neurosci Res.* Nov 15; 62(4):585-90.
309. UDANI V.M. (2006). The continuum of stem cell transdifferentiation: possibility of hematopoietic stem cell plasticity with concurrent CD45 expression. *Stem Cells Dev.* 15(1):1-3. Review.

-
-
310. ULRICH H., DO NASCIMENTO I.C., BOCSI J., TÁRNOK A. (2014). Immunomodulation in Stem Cell Differentiation into Neurons and Brain Repair. *Stem Cell Rev.* Sep 30. [Epub ahead of print].
 311. VACCARINO F.M., SCHWARTZ M.L., RABALLO., R., RHEE J., LYNCOOK R. (1999). Fibroblast growth factor signaling regulates growth and morphogenesis at multiple steps during brain development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 46:179-201.
 312. VAN STRAATEN H.M.W., HEKKING J.W.M. (1991). Development of floor plate, neurons and axonal outgrowth pattern in the early spinal cord of the notochord-deficient chick embryo. *Anat. Embryol.* 184:55-63.
 313. VELA J.M., MOLINA-HOLGADO E., ARÉVALO-MARTÍN A., ALMAZÁN G. y GUAZA C. (2002). Interleukin-1 regulates proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 20(3): 489-502.
 314. VERA A., STANIC K., MONTECINOS H., TORREJÓN M., MARCELLINI S., CAPRILE T. (2013). SCO-spondin from embryonic cerebrospinal fluid is required for neurogenesis during early brain development. *Front Cell Neurosci.* Jun 3; 7:80.
 315. VESCOVI A.L., GALLI R., GRITTI A. (2001). The neural stem cells and their transdifferentiation capacity. *Biomed Pharmacother.* 55(4):201-5. Review.
 316. WAKITANI S., SAITO T., CAPLAN A.I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* Dec; 18(12):1417-26.
 317. WALTER H.J., BERRY M., HILL D.J., CWYFAN-HUGHES S., HOLLY J.M., LOGAN A. (1999). Distinct sites of insulin-like growth factor (IGF)-II expression and localization in lesioned rat brain: possible roles of IGF binding proteins (IGFBPs) in the mediation of IGF-II activity. *Endocrinology* 140(1):520-532.

-
-
318. WANG T.W., ZHANG H., PARENT J.M. (2005). Retinoic acid regulates postnatal neurogenesis in the murine subventricular zone-olfactory bulb pathway. *Development*. 132(12):2721-32.
 319. WANG X., ZHAO Y., LI H.F., ZHANG X.L. (2009). *Astragalus mongholicus*-induced differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*. 19,3785-378.
 320. WANG W., STRECKER S., LIU Y., WANG L., ASSANAH F., SMITH S., MAYE P. (2015). Connective Tissue Growth Factor reporter mice label a subpopulation of mesenchymal progenitor cells that reside in the trabecular bone region. *Bone*. Feb; 71:76-88.
 321. WATANABE Y., LE DOUARIN N.M. (1996). A role for BMP-4 in the development of subcutaneous cartilage. *Mech. Dev.* 57:69-78.
 322. WATERHAM H.R. (2006). Defects of cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* Oct 9; 580(23):5442-9.
 323. WHITTLE W.L., GIBB W., CHALLIS J.R. (2000). The characterization of human amnion epithelial and mesenchymal cells: the cellular expression, activity and glucocorticoid regulation of prostaglandin output. *Placenta*. May; 21 (4):394-401.
 324. WEINSTEIN D.C., HEMMATI-BRIVANLOU A. (1999). Neural induction. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15:411-433.
 325. WILSON L., MADEN M. (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol.* Jun 1; 282(1):1-13. Review.
 326. WOODBURY D., SCHWARZ E.J., PROCKOP D.J., BLACK I.B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 61(4):364-70.

-
-
327. WOODBURY D., REYNOLDS K., BLACK I.B. (2002). Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res.* Sep 15; 69(6):908-17.
328. WOODS D.F., BRYANT P.J. (1993). Apical junctions and cell signalling in epithelia. *J Cell Sci Suppl.* 17:171-81.
329. WOOLLETT L.A. (2005). Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. *Am J Clin Nutr.* Dec; 82(6):1155-61.
330. WU S., SUZUKI Y., KITADA M., KITAURA M., KATAOKA K., TAKAHASHI J., IDE C., NISHIMURA Y. (2001). Migration, integration, and differentiation of hippocampus-derived neurosphere cells after transplantation into injured rat spinal cord. *Neurosci Lett.* 2001 Oct 26; 312(3):173-6.
331. WU S., SUZUKI Y., KITADA M., KATAOKA K., KITAURA M., CHOU H., NISHIMURA Y., IDE C. (2002). New method for transplantation of neurosphere cells into injured spinal cord through cerebrospinal fluid in rat. *Neurosci Lett.* Jan 25; 318(2):81-4.
332. WU Z.Y., HUI G.Z., LU Y., WU X., GUO L.H. (2006). Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury. *Chin Med J (Engl).* Dec 20; 119(24):2101-7.
333. XU, Q., WONDERS, C.P., AND ANDERSON, S.A. (2005). Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon. *Development* 132, 4987-4998.
334. YAMADA T., PLACZEK M., TANAKA H., DODD J., JESSELL T.M. (1991). Control cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell.* Feb. 64(8):635-647.

-
-
335. YAMADA T., PFAFF S.L., EDLUND T., JESSELL T.M. (1993). Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell*. May 73(21):673-686.
336. YAMADA M., UCHIDA K., HAYASHI T., MINE Y., KAWASE T. (2004). Vigorous neuronal differentiation of amplified and grafted basic fibroblast growth factor-responsive neurospheres derived from neuroepithelial stem cells. *Cell Transplant*. 13(4):421-8.
337. YAN X., LV A., XING Y., LIU B., HOU J., HUANG W., LI Y. (2011). Inhibition of p53-p21 pathway promotes the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*. Aug; 354(1-2):21-8.
338. YAYON A., KLAGSBRUN M., ESKO J.D., LEDER P., ORNITZ J.D. (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64:841-848.
339. YEN B.L., HUANG H.I., CHIEN C.C., JUI H.Y., KO B.S., YAO M., SHUN C.T., YEN M.L., LEE M.C., CHEN Y.C. (2005). Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*. 23(1):3-9.
340. YE Y., ZENG Y.M., WAN M.R., LU X.F. (2011). Induction of human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neural-like cells using cerebrospinal fluid. *Cell Biochem Biophys*. 59(3):179-84.
341. YON-ZHOU S., HUI-XIAN C., ZHE L., XIN-SHENG L., ZHENG-XIAN W., ZHENG-LIAN S. (2008). Effects of brain homogenate on the differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neuron-like cells following traumatic brain injury. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation Tissue Engineering Research*. 12,5.

342. YOUNG H.E., STEELE T.A., BRAY R.A., HUDSON J., FLOYD J.A., HAWKINS K., THOMAS K., AUSTIN T., EDWARDS C., CUZZOURT J., DUENZL M., LUCAS P.A., BLACK A.C. Jr. (2001). Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec.* 264(1):51-62.
343. YU Q., LIU L., DUAN Y., WANG Y., XUAN X., ZHOU L., LIU W. (2013). Wnt/ β -catenin signaling regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 20; 439(2):297-302.
344. ZEMEL'KO V.I., KOZHUKHAROVA I.B., ALEKSEENKO L.L., DOMNINA A.P., RESHETNIKOVA G.F., PUZANOV M.V., DMITRIEVA R.I., GRINCHUK T.M., NIKOL'SKIĬ N.N., ANISIMOV S.V. (2013). Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue and endometrium: a comparative study. *Tsitologiya.* 55(2):101-10. [Article in Russian]
345. ZHANG J.M., HOFFMANN R., SIEBER-BLUM M. (1997). Mitogenic and anti-proliferative signals for neural crest cells and the neurogenic action of TGF- β 1. *Dev Dyn.* Mar; 208(3):375-86.
346. ZHANG Y., SHEN W., SUN B., LV C., DOU Z. (2011). Plasticity of marrow mesenchymal stem cells from human first-trimester fetus: from single-cell clone to neuronal differentiation. *Cell Reprogram.* Feb; 13 (1):57-64.
347. ZHUANG B., SOCKANATHAN S. (2006). Dorsal-ventral patterning: a view from the top. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16:20-24.
348. ZOU G., LIU T., ZHANG L., LIU Y., LI M., DU X., XU F., GUO L., LIU Z. (2011). Induction of pancreatic β -cell-like cells from CD44+/CD105+ human amniotic fluids via epigenetic regulation of the pancreatic and duodenal homeobox factor 1 promoter. *DNA Cell Biol.* Sep; 30(9):739-48.