



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

**“EFECTO DEL ESTÍMULO DE CÉLULAS
PROGENITORAS NEURALES
CEREBROCORTICALES CON ACTIVINA A Y
OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO DE LA
FAMILIA DEL *TRANSFORMING GROWTH
FACTOR β* ”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. GRISELDA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. J. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MÉXICO, D. F. a 26 de Octubre de 2012

**“EFECTO DEL ESTÍMULO DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURALES
CEREBROCORTICALES CON ACTIVINA A Y OTROS FACTORES DE
CRECIMIENTO DE LA FAMILIA DEL *TRANSFORMING GROWTH FACTOR β*”**

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Doctorado se realizó bajo la dirección del Dr. J. Iván Velasco Velázquez en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo del proyecto de Doctorado estuvo conformado por:

Dr. J. Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jesús Chimal Monroy	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El proyecto fue apoyado por PAPIIT-UNAM IN224207 e IN224210. Durante los estudios del Doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT.

Esta tesis fue defendida en examen el día _____

El Jurado de Examen Doctoral estuvo conformado por:

Presidente: Dra. Herminia Pasantes Ordoñez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario: Dr. Jesús Chimal Monroy	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal: Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Iván Velasco por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por la confianza que me tuvo durante mi estancia en su laboratorio, por su apoyo y por todo el tiempo que dedico en mi formación profesional. La paciencia y esmero con que me guió durante todo el camino de mi doctorado fueron vitales para mi formación académica.

A los miembros del Comité Tutorial, los Doctores Jesús Chimal Monroy y Marina Macías Silva, por sus valiosas sugerencias en cada tutorial que ayudaron a enriquecer mi proyecto de doctorado y contribuyeron enormemente en mi formación profesional.

A los miembros del Jurado de Examen de Grado, los Doctores Herminia Pasantes Ordoñez, Jesús Chimal Monroy, Ignacio Camacho Arroyo, Fernando López Casillas y Leonor Pérez Martínez, por sus observaciones y críticas tan acertadas durante la elaboración de la presente tesis.

A la Dra. Anayansi Molina por su excelente e insuperable apoyo técnico.

A Sara Noguera, Zenaida Martínez y Angélica Téllez por su apoyo en el área administrativa.

A CONACYT por los recursos que me otorgó para la realización de mi proyecto de Doctorado.

A la UNAM por haber hecho de mi doctorado una experiencia maravillosa. La grandeza y la majestuosidad de sus espacios fueron mi inspiración día con día.

DEDICATORIAS

A mis padres, José Luis y Martha Elena, pues gracias a su amor y apoyo incondicionales he logrado concluir esta etapa de mi vida. Su ejemplo me ha motivado a perseguir mis anhelos con gran dedicación y a no darme por vencida ante las adversidades. La inmensa confianza que han depositado en mí me ha dado la fuerza para mantenerme a flote en los momentos de mayor dificultad. Soy muy afortunada de tenerlos como padres pues siempre han respetado mis decisiones y me han apoyado con mis proyectos pese a que en algunas ocasiones no hayan estado de acuerdo conmigo.

A mi hermana Jess, por ser una maravillosa compañera que me ha apoyado en todo momento. Tu amor, tus consejos y la paciencia que has tenido para conmigo han sido un gran soporte en mi vida. Este logro es de ambas, pues sin ti no lo hubiera podido conseguir.

A mis hermanos Diego, Luis Alberto, Brenda y Rosario quienes me han impulsado a ser mejor día con día. Su cariño y su buen humor han hecho más llevaderos los momentos de dificultad. Gracias por todos los momentos tan maravillosos que me han regalado, a su lado la vida es mucho mejor.

A mi abue Evelia, quien siempre ha creído en mí y ha sido un gran apoyo. Tu amor y tu confianza me han motivado a perseverar para alcanzar mis sueños. Has sido un gran ejemplo en mi vida.

A mis abuelos Luz, Arnulfo y Esteban por todo su amor y su apoyo. Por su inmensa generosidad y comprensión.

A mis tías Evelia, Alma, Maricela y Celia por su amor y cariño. Su apoyo y su ejemplo han sido fundamentales durante mi desarrollo profesional.

A toda mi familia, por su infinito amor y apoyo. Gran parte de este trabajo no hubiera sido posible sin ustedes.

Al Dr. Jesús García, por sus consejos, su apoyo y su esmero. Por ser un ejemplo durante la Licenciatura y por ayudarme a decidir el futuro de mi carrera profesional. Su recuerdo y enseñanzas perdurarán por siempre.

A Erika, por ser una amiga tan maravillosa en toda la extensión de la palabra. Tu amistad es invaluable y ha sido uno de los pilares que me ha ayudado a mantenerme en pie ante las adversidades. Has sido una persona clave durante mi desarrollo académico y personal. Gracias por todos los momentos tan maravillosos que has compartido conmigo.

A Ana, por ser una gran guía y una excelente amiga. Por su gran disposición a ayudarme en todo momento, tus consejos han sido de mucha ayuda. Has sido un gran ejemplo a seguir tanto en lo académico como en lo personal.

A mis amigas de la Licenciatura Diana, Martha, Elia, Bris y Silvia, por su gran amistad y cariño. Me han enseñado que la distancia no es obstáculo para la amistad, y que la amistad, al igual que los vinos, madura y mejora con el tiempo. Gracias por todos los buenos momentos que me han regalado. ¡Jamás los olvidaré!

A Aleida por ser una gran amiga que me ha apoyado en todo momento. Tu amistad y alegría llegaron en el momento adecuado. Tu sentido del humor me ha ayudado a superar más fácilmente los problemas y a ver la vida con otros ojos. Gracias por acompañarme en los momentos de alegría y en los de tristeza.

A chava, por todo el apoyo que me ha brindado. Has sido un gran amigo que ha estado en las buenas y en las malas. Tus consejos y compañía me han ayudado mucho.

A Gretel, por su amistad, paciencia y comprensión. Tocaya, qué gusto haber coincidido en tiempo y espacio. Gracias por todos los buenos momentos que me has dado.

A Laura, Luisa y Carlos por ser tan buenos amigos y excelentes compañeros de tertulia. ¡Las clases de Biología del Desarrollo no hubieran sido lo mismo sin ustedes!

A Elli por su apoyo y cariño incondicionales, has sido una gran amiga que me ha enseñado que la amistad no tiene barreras. Agradezco todos los momentos que hemos pasado juntas, pues aunque breves han sido determinantes en mi vida. Tu alegría y positividad han sido regalos muy valiosos que siempre conservaré.

A mis compañeros del lab: Erika, Nidia, Rodrigo, Itzel, Daniel, Diana, Eugenia, Fer, Fabián y Yola, por hacer más agradable la estadía en el labo y por su disposición para ayudarme en todo momento. Gracias a su compañía las jornadas de trabajo fueron más gratas y llevaderas.

A Noemi, Margarita, Angel Alejandro y Jorge, por su amistad y compañía. Han estado en momentos decisivos de mi vida, gracias a su apoyo he logrado llegar hasta aquí.

A los amigos del instituto Alex, Ari Aparicio, Alex Ruíz, Roberto, Mirian, Francisco y Ari por hacer que mi estadía en el Instituto y en la ciudad haya sido tan grata.

Y finalmente, aunque no menos importante, a Armando por todo su amor y apoyo, por enseñarme que cuando se quiere algo se debe luchar por ello sin importar lo difícil que pueda resultar. Tu apoyo y comprensión han sido indispensables para la culminación de esta etapa de mi vida. Has sido una persona muy valiosa en mi vida y me has regalado momentos maravillosos que jamás olvidaré.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
ANTECEDENTES	
1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	6
1.1 Especificación del telencéfalo	8
2. CORTEZA CEREBRAL	10
2.1 Desarrollo cortical	12
2.2 Histogénesis cortical	13
2.3 Células troncales/progenitoras de la corteza cerebral	14
3. CÉLULAS TRONCALES NEURALES (CTN)	17
3.1 Sistemas <i>in vitro</i> para estudiar las CTN	18
3.1.1 Diferenciación neuronal	19
3.1.2 Diferenciación glial	19
4. FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β	20
4.1 Receptores del TGF- β	21
4.2 Proteínas Smad	23
4.3 Regulación en la vía de señalización de los miembros de la familia del TGF- β 1	25
4.4 Funciones del TGF-B1 en el cerebro	27
4.4.1 Expresión del TGF- β 1	27
4.4.2 Funciones del TGF- β 1	27
A) <i>Efectos durante el desarrollo cerebral</i>	27
B) <i>Efectos en células troncales/ progenitores neurales (CTPN).....</i>	28
C) <i>Efectos en células troncales/progenitoras adultas</i>	29
4.5 Funciones de la Activina A en el cerebro	30
4.5.1 Expresión de la Activina A	31
4.5.2 Funciones de la Activina A	31
A) <i>Durante el desarrollo del cerebro y la diferenciación de células neurales</i>	31
B) <i>En el cerebro adulto</i>	32
4.6 Funciones de Proteínas Morfogénicas de hueso (BMPs)	33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	35

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de cultivos primarios	36
2. Inmunoprecipitación de extractos celulares y Western Blot	38
3. Extracción de RNA total y RT-PCR	39
4. PCR en tiempo real	39
5. Inmunocitoquímica	40
6. Tinción con Faloidina y determinación del área celular	41
7. Ensayo de viabilidad celular por la técnica de cristal violeta	41
8. Ensayo de muerte celular por la técnica de MTT	42
9. Ensayo de exclusión de azul tripano	42
10. Ensayo de incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU)	42
11. Ensayo de muerte apoptótica por la técnica de TUNEL	43
12. Análisis clonal	43
13. Cuantificación de inmunocitoquímicas	43
14. Análisis estadístico	43

RESULTADOS

I. Cultivos primarios de células cerebrocorticales de embriones en E14 presentan características de células progenitoras neurales (CPN)	44
II. Cultivos de CPN responden al estímulo de la Activina A y/o el TGF- β 1	45
III. Efecto durante la proliferación de las CPN	45
IV. Efecto durante la diferenciación de las CPN	49
V. La muerte celular o la salida del ciclo celular no son responsables de los incrementos en la diferenciación neuronal	54
VI. La Activina A incrementa el número de neuronas en ensayos de densidad clonal	56
VII. <i>La inhibición de los receptores de TGF-β tipo I elimina la diferenciación neuronal en los cultivos de CPN corticales</i>	56

DISCUSIÓN	61
-----------------	----

CONCLUSIONES	66
--------------------	----

REFERENCIAS	67
-------------------	----

ARTÍCULOS	73
-----------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
Alk	Receptor de Activina tipo cinasa (del inglés Activin like kinase receptor)
ANOVA	Análisis de varianza
bHLH	Proteínas de hélice-asa-hélice con dominio básico
BMP4	Proteína morfogénica de hueso isoforma 4
BMPs	Proteínas morfogénicas de hueso
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albúmina sérica bovina
CGR	Células de la Glía Radial
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
Co-Smad	Smad común
CPI	Célula progenitora intermedia
CPN	Célula progenitora neural
CR	Cajal-Retzius
CTN	Células troncales neurales
E	Día embrionario
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ES	Error estándar
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
Fn	Fibronectina
Foxg1	Del inglés: Forkhead box G1
FSH	Hormona Folículo estimulante
GABA	Ácido gama aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
I-Smad	Smad inhibitoria
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2
MH1	Dominio de homología a Mad 1
MH2	Dominio de homología a Mad 2
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
Ngn	Neurogenina
P	Día posnatal
PAF	Paraformaldehído
PBS	Buffer de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PLO	Poli-L-ornitina
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA_m	Ácido Ribonucleico mensajero
R-Smad	Smad activada por el receptor
RT	Transcriptasa reversa
Shh	Sonic hedgehog
SMA	Actina de músculo liso (por sus siglas en inglés)
Smad	Del inglés: Small mother against decapentaplegic
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SP	Subplaca
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β isoforma 1
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular
ZV	Zona ventricular

RESUMEN

Los miembros de la familia del TGF- β son expresados de manera ubicua en el organismo, participando en la regulación de muchos procesos celulares tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de las funciones normales de diversos órganos y tejidos. Dentro de los procesos celulares que regulan los miembros de esta familia se encuentran la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. La Activina A y el TGF- β 1 son proteínas que pertenecen a la familia del TGF- β y que han sido ampliamente estudiados en tejidos adultos en los cuales se tiene bien caracterizada su función. Mientras que la Activina A es conocida por su función en la regulación de la síntesis de la hormona folículo estimulante (FSH), el TGF- β 1 es conocido por promover la salida del ciclo celular en células hepáticas. Sin embargo, durante el desarrollo del sistema nervioso no está bien descrita la función que desempeñan estas proteínas, aunque tanto la Activina A como el TGF- β 1 y sus respectivos receptores son expresados durante el desarrollo cerebral, en regiones que se encuentran enriquecidas con células progenitoras neurales (CPN), las cuales son las responsables de la mayoría de los procesos de proliferación y diferenciación que participan en la formación del cerebro. Para determinar si la Activina A o el TGF- β 1 tienen alguna función en CPN durante el desarrollo del sistema nervioso, estudiamos sus efectos en cultivos primarios de CPN obtenidos de embriones de rata de 14 días de gestación. La estimulación de las CPN con la Activina A o el TGF- β 1 indujo la fosforilación y la translocación nuclear de Smad 2/3. En presencia del factor mitogénico FGF2 (Factor de crecimiento fibroblástico), ambas proteínas disminuyeron el área celular e incrementaron el número de neuronas en los cultivos. Sin embargo, los porcentajes de células que incorporaron BrdU, o positivas para los marcadores de precursores neurales no diferenciados (Sox2 y Nestina) no cambiaron debido al tratamiento. En condiciones de diferenciación, el tratamiento continuo (iniciado en presencia de FGF2) con la Activina A o el TGF- β 1 incrementó de manera significativa el número de neuronas sin afectar la diferenciación de células gliales ni la muerte celular apoptótica. Aunque se observaron efectos semejantes en el incremento de la población neuronal debido al tratamiento con la Activina A o el TGF- β 1, el mecanismo subyacente a estos incrementos parece ser diferente: mientras que la Activina A aumentó la población neuronal en tiempos prolongados de cultivo, TGF- β 1 no incrementó el número de neuronas en esta condición, sugiriendo que TGF- β 1 favorece la diferenciación neuronal al promover la salida del ciclo celular de CPN, en cambio, la Activina A puede tener un papel neurogénico. En ensayos de densidad clonal, la Activina A incrementó el número de neuronas formadas en cada colonia, lo cual da soporte a un papel instructivo de esta citocina en la diferenciación neuronal. La neurogénesis inducida por ambas citocinas fue dependiente de la activación de sus receptores; la incubación con el inhibidor del receptor tipo I, SB431542, o el antagonista de la Activina, Folistatina, disminuyó notablemente la diferenciación neuronal. De manera interesante, SB431542 o Folistatina por sí solos, suprimieron la neurogénesis e incrementaron la gliogénesis, sugiriendo que la señal endógena de estas citocinas es importante para la diferenciación neuronal de los cultivos de CPN. Además, la co-incubación de estos inhibidores con la Activina A y con el inhibidor de la activación de los

receptores de BMP, Dorsomorfina, restauró la diferenciación neuronal y astrocítica a niveles control. Estos resultados sugieren que durante la diferenciación de las CPN el balance entre las vías de BMPs y de Activina/TGF- β podría ser crucial en determinar el destino de las CPN al momento de diferenciarse. Los experimentos presentados en este trabajo muestran que la Activina A posee un efecto neurogénico en CPN *in vitro*, destacando un papel relevante de esta citocina en la especificación de estas células hacia el fenotipo neuronal, y el TGF- β 1, por otro lado tiene un efecto positivo en la diferenciación neuronal al promover la salida del ciclo celular de las CPN *in vitro*.

ABSTRACT

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) family members are ubiquitously expressed, participating in the regulation of many processes in different cell types both in embryonic and adult stages. These proteins regulate several processes such as proliferation, differentiation and cell death. Activin A and TGF- β 1 belong to this family and have been broadly studied in adult tissues where their function is well established. Thus, whereas Activin regulates the follicle stimulating hormone (FSH) synthesis, TGF- β 1 promotes cell cycle exit in hepatic cells. However, their role during central nervous system development is not clear although both, receptors and ligands, are expressed since early stages in brain development, in regions highly enriched in neural progenitor cells, which are the responsible of the main processes dealing with proliferation and differentiation that participates in brain formation. In the present study, we used rat cerebrocortical neural progenitor cells obtained from 14 old-day embryos cortices. After stimulation of NPC with Activin A or TGF- β 1, phosphorylation and nuclear translocation of Smad 2/3 were induced. In proliferating NPC, Activin as well as TGF- β 1 produced a significant decrease in cell area and also a discrete increase in the number of neurons in the presence of the mitogen Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2). The percentages of cells incorporating BrdU, or positive for the undifferentiated NPC markers Nestin and Sox2 were unchanged after incubation with Activin or TGF- β 1. In differentiating conditions, continuous treatment with Activin A or TGF- β 1 significantly increased the number of neurons without affecting astroglial differentiation nor apoptotic death. Although the effects obtained with both cytokines were similar, the mechanism seems different, because in cells cultured by extended periods, Activin A treatment produced further increases in the proportion of neurons, excluding premature cell cycle exit, while TGF- β 1 did not produce any increase in such conditions. In order to test a possible neurogenic role for Activin A, we used clonal assays; Activin significantly increased neuronal numbers per colony, supporting an instructive role. Activin- and TGF- β 1-induced neurogenesis was dependent on activation of its receptors, since incubation with the type I receptor inhibitor SB431542 or the ligand-trap Follistatin prevented neuronal differentiation. Interestingly, SB431542 or Follistatin by themselves abolished neurogenesis and increased astroglial differentiation, suggesting that endogenous signaling is important for neuronal differentiation in the cultures of neural progenitor cells. Since inhibiting type I receptor activation increased glial differentiation to a similar extent to that induced by Bone Morphogenetic Protein (BMP)4, we tested if glial differentiation caused by SB431542 was dependent of BMP signaling. Thus, co-incubation of the TGF- β type I receptor inhibitors with the BMP inhibitor Dorsomorphin restored neuronal and astrocytic differentiation to control levels, indicating that during neuronal differentiation, the balance between BMP and TGF- β signaling participates in establishing the fate of neural progenitor cells. Our results show a neurogenic effect of Activin A in cortical NPC *in vitro*, pointing out to a relevant role of this cytokine in the specification of NPC towards a neuronal phenotype.

ANTECEDENTES

1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso central (SNC) de vertebrados es un sistema muy complejo, encargado de la adquisición y procesamiento de la información sensorial, del control del movimiento y la locomoción, así como de la formación de la memoria y del aprendizaje. Está constituido por 10 billones de neuronas, las cuales son la unidad funcional del tejido neural [1].

El SNC se origina después de la gastrulación, en un proceso conocido como inducción neural. La inducción neural ocurre posterior a la formación de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo, cuando se establecen los planos corporales principales del embrión (antero-posterior y dorso-ventral). La primera evidencia morfológica que ocurre durante la inducción neural es un engrosamiento del ectodermo en la región dorsal que da lugar a la estructura denominada placa neural. Este proceso está ligado con la generación de la notocorda, la cual es una estructura mesodérmica ubicada en la región ventral de la placa neural, que opera como inductor primario (centro señalizador) del embrión primitivo, ya que secreta moléculas con función morfogénica. El inicio de ambos procesos da lugar a lo que se conoce como neurulación [2].

Con base en el tipo de células generadas, el ectodermo se puede dividir en tres regiones: A) La placa neural que dará origen al tubo neural, B) Los pliegues neurales que originarán la cresta neural y C) El ectodermo no neural que dará lugar a la epidermis (Figura 1A) [2]. La formación del tubo neural inicia cuando la placa neural se pliega sobre sí misma (Figura 1B), por la inducción embrionaria primaria del mesodermo notocordal, que se encuentra localizado por debajo del ectodermo. La placa neural se alarga por acción de la notocorda, las células epidérmicas adyacentes se mueven hacia el centro de la placa neural produciendo un plegamiento y una elevación de la placa para formar un surco, y el tubo neural se forma al cerrarse el surco, el cual dará lugar al cerebro y la médula espinal, es decir al SNC [2].

Los bordes de la placa neural (los pliegues neurales) se dirigen desde lados opuestos del ectodermo hacia la línea media (Figura 1B y 1C). Estas células formarán la cresta neural, células que constituyen el sistema nervioso periférico (SNP), que al diferenciarse *in vivo* dan lugar a neuronas simpáticas y sensoriales, condrocitos, osteocitos, melanocitos, células cromafines, células de los ganglios de la raíz dorsal, neuronas adrenomedulares y células de Schwann, entre otras [2, 3]. Por encima del tubo neural (Figura 1C), el epitelio no neural, dará lugar a la epidermis, en un principio, el ectodermo no neural se dispone lateralmente y al final se fusiona recubriendo el tubo neural y todo el embrión [2,4].

En el embrión de vertebrados, la mayor parte del tubo neural da lugar a la médula espinal, mientras que en su extremo rostral comienzan a distinguirse estructuras globulares llamadas vesículas. En el ratón, alrededor del día embrionario 8.5 (E8.5) pueden distinguirse 3 vesículas que constituyen las divisiones básicas del cerebro: el prosencéfalo (o cerebro anterior), el mesencéfalo (o cerebro medio) y el rombencéfalo (o

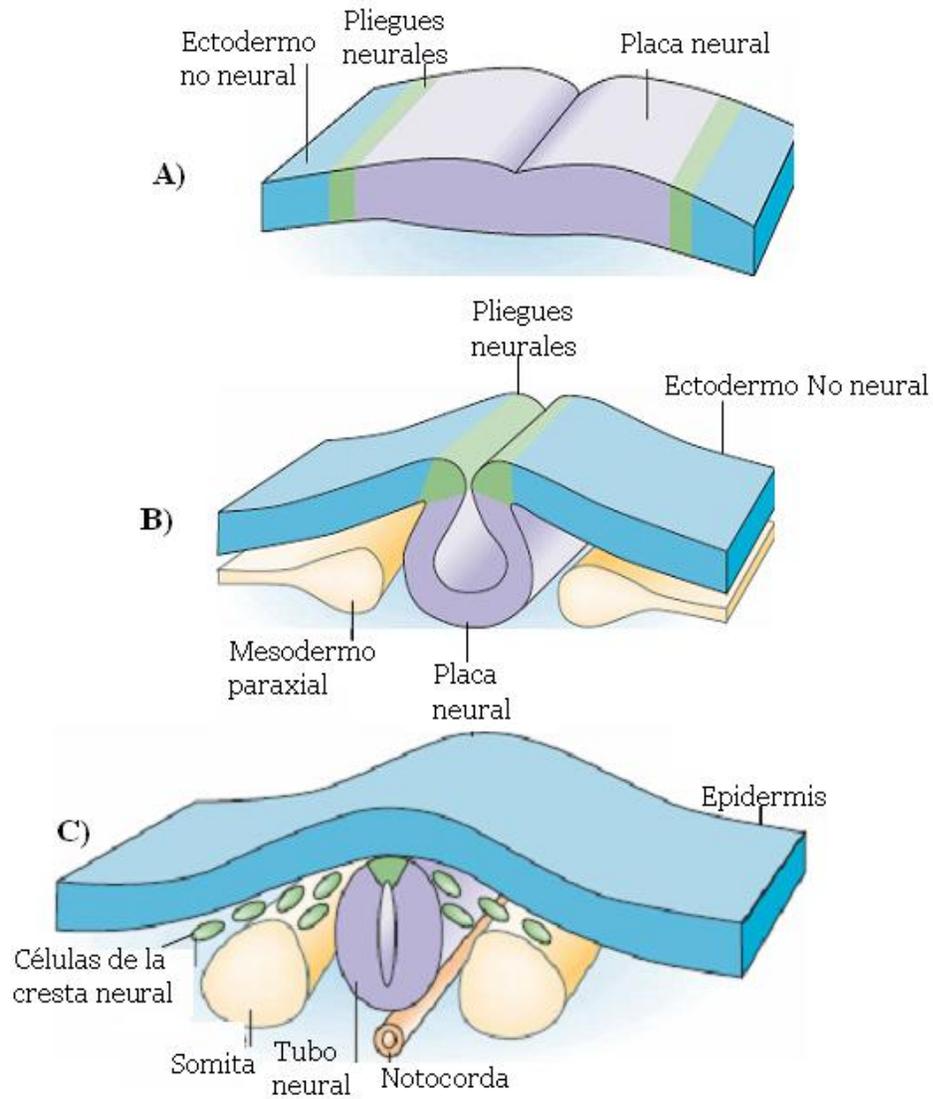


Figura 1. Formación del Sistema Nervioso. **A)** Representación del ectodermo, en donde se distinguen el ectodermo no neural, los pliegues neurales y la placa neural. Las células de la placa neural se encuentran en la región dorsal del ectodermo, seguida de los pliegues neurales y del ectodermo no neural. **B)** Los pliegues neurales se elevan mientras que la futura epidermis avanza hasta la línea media. **C)** Los pliegues neurales van a formar las células de la cresta neural que se dispersan separando al tubo neural de la epidermis. Modificada de [3].

cerebro posterior) (Figura 2A) [1]. Conforme avanza el desarrollo embrionario, las vesículas primarias se subdividen y forman las vesículas secundarias; el prosencéfalo se divide en telencéfalo (porción anterior) y diencéfalo (porción caudal), el mesencéfalo no se divide y el rombencéfalo se divide en metencéfalo y mielencéfalo (Figura 2B). Todas estas regiones producen, a su vez, regiones encefálicas adicionales en el adulto (Figura 2C) [2].

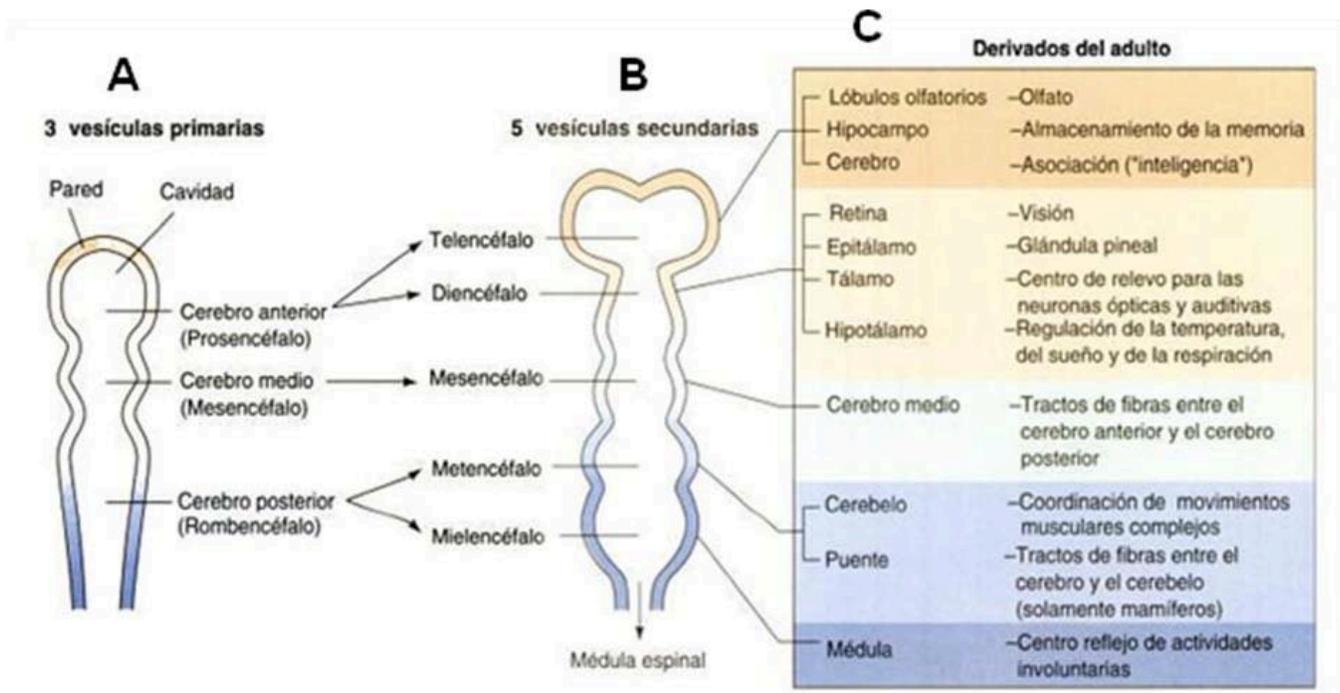


Figura 2. Desarrollo del SNC y estructuras derivadas en el adulto. **A)** Regionalización del tubo neural en 3 vesículas: cerebro anterior, medio y posterior. **B)** Posteriormente estas tres vesículas se subdividen en 5 zonas que constituirán finalmente a todas las regiones del cerebro: telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo. **C)** Origen embrionario de las estructuras específicas del SNC adulto. Modificada de [2].

1.1 ESPECIFICACIÓN DEL TELENCEFALO

Al inicio del desarrollo, la placa neural, en su extremo anterior, da lugar al prosencéfalo (o cerebro anterior), que posteriormente se subdivide en el telencéfalo y el diencefalo [4]. La polaridad dorso-ventral del tubo neural es inducida por señales que vienen de su ambiente inmediato: el patrón ventral es impuesto por la notocorda y la placa del piso, mientras que el dorsal está dado por la epidermis subyacente. La especificación del eje es iniciado principalmente por dos factores parácrinos: la proteína Sonic hedgehog (Shh), que se origina en la notocorda y la parte ventral del tubo neural, y proteínas de la familia del Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) originados del ectodermo dorsal (Figura 3). Shh es secretado de la notocorda e induce a las células del eje medial a ser la placa del piso del tubo neural. A su vez, las células de la placa del piso secretan Shh, el cual forma un gradiente que es más alto en la porción ventral del tubo neural (Figura 3A-3D) [5].

Por otro lado, los destinos dorsales del tubo neural se establecen por proteínas de la superfamilia del TGF- β , especialmente proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) 4 y 7, Dorsalina y Activina. En un inicio, tanto BMP4 como BMP7 se encuentran en la epidermis, pero conforme la notocorda establece un segundo centro de señalización, la epidermis establece un centro secundario de BMPs al inducir la expresión de BMP4 en células de la placa del techo del tubo neural. La proteína BMP4 de la placa del techo induce la

expresión de una cascada de proteínas de la familia del TGF- β en células adyacentes. Posteriormente, grupos de células dorsales son expuestas a concentraciones superiores de proteínas de TGF- β en tiempos más tempranos, en comparación con células que se encuentran en la parte más ventral del tubo neural (Figura 3A-3D).

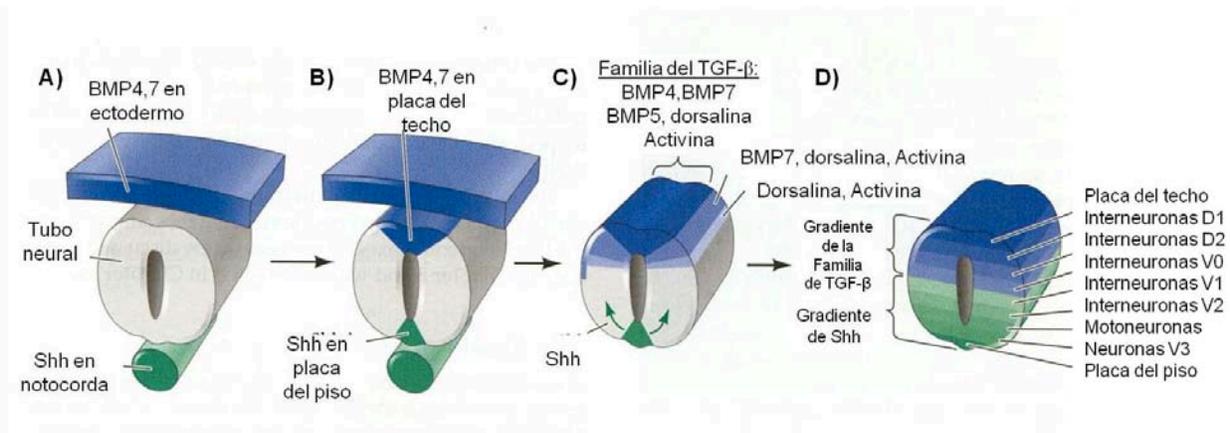


Figura 3. Especificación dorso-ventral del tubo neural. **A)** El tubo neural recién formado es influenciado por dos centros de señalización: el tubo neural en su parte dorsal es expuesto a BMP4 y BMP7 por parte de la epidermis y el tubo neural ventral es expuesto a Shh por la notocorda. **B)** Centros de señalización secundarios se establecen en el tubo neural: BMP4 es expresado y secretado por células de la placa del techo, mientras que Shh es expresado y secretado por células de la placa del piso. **C)** BMP4 establece una cascada de factores de la familia del TGF- β , extendiéndose ventralmente dentro de la placa del techo. Shh se difunde dorsalmente como un gradiente de las células de la placa del piso. **D)** Las neuronas de la médula espinal obtienen su identidad de acuerdo a la identidad y cantidad de factores parácrinos a las que son expuestas.

Dos factores de transcripción del tipo homeodominio, *Lim1* y *Otx2*, son esenciales en el desarrollo de las estructuras del SNC anterior. Ambos genes se expresan en los tejidos subyacentes de la placa neural rostral. Estos factores, junto con un gradiente de señalización de *Wnt8*, subdividen los segmentos prosencéfalo/mesencéfalo y rombencéfalo/médula espinal [6]. El establecimiento del primordio telencefálico comienza con la expresión del factor de transcripción *Foxg1* (del inglés Forkhead box G1), el cual regula el desarrollo del telencéfalo (hemisferios cerebrales) y la especificación regional en el cerebro anterior, incluidos el telencéfalo basal y la retina (Figura 4A). Al constituirse los límites entre el cerebro anterior y el cerebro medio, aparecen dos centros organizadores: la cresta neural anterior, ubicada en el polo anterior del cerebro, y el istmo, localizado entre el cerebro medio y el cerebro posterior (Figura 4B). El factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) es la señal molecular clave en ambas localizaciones e induce la expresión posterior de genes que regulan la diferenciación.

La subdivisión que define lo que se convertirá en el telencéfalo dorsal y ventral, se regula, en parte, por los efectos dorsalizantes de la expresión de *Gli3* y la influencia ventralizante de la expresión de *Shh*. *Shh* ventraliza al telencéfalo al antagonizar los efectos dorsalizantes de *Gli3*. Al reprimir *Gli3*, *shh*, junto con *Foxg1* activan la expresión de FGF8, el cual a su vez puede promover la expresión de *Foxg1* (Figura 4B). Las señales de

Foxg1 y FGF son necesarias para formar todas las regiones del telencéfalo, a excepción de la región dorsomedial [7].

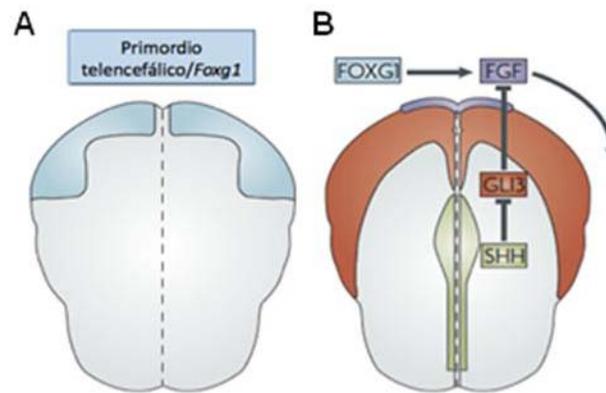


Figura 4. Principales factores que establecen las subdivisiones del telencéfalo ventral y dorsal. **A)** La región que se convertirá en el telencéfalo está definida por la expresión de *Foxg1* (región de color azul). **B)** *Foxg1* y *SHH* (región verde) promueven la expresión de *FGF8* (región morada) en la cresta neural anterior. *Shh* promueve indirectamente la expresión de *FGF* mediante la inhibición de la actividad represora de *Gli3* (región magenta). En consecuencia, *shh* promueve la formación de una subdivisión telencefálica ventral mediante la inhibición de los efectos dorsalizantes de *Gli3*. Modificado de [8].

Por su parte, en el telencéfalo dorsal, la expresión de proteínas BMPs y Wnts, promovida por *Gli3*, es necesaria para la expresión de los genes *Emx*. *Gli3* y *Emx*, junto con *Pax6* y *Lhx2*, participan en la división posterior del telencéfalo dorsal (Figura 5) [9]. *Emx2* es expresado de manera predominante en el polo caudo-medial, mientras que *Pax6* se expresa en el polo rostro-lateral. Mutaciones de *Pax6* causan expansión del dominio de *Emx2* y de áreas derivadas de la corteza medial caudal. Por el otro lado, mutaciones en *Emx2*, causan que el dominio de *Pax6* se expanda, resultando en expansión del área motora y de la región frontal [10].

2. CORTEZA CEREBRAL

La corteza es la región del cerebro responsable de las funciones cognitivas, de la percepción sensorial y de la conciencia. La corteza de mamíferos es una estructura sumamente organizada y compleja. Su estructura consiste de seis capas que contiene cientos de tipos neuronales, y glía; las formas adultas de estas capas se completan hasta mediados de la adolescencia. Cada capa de la corteza difiere de la otra en sus propiedades funcionales, los tipos de neuronas que la conforman y los tipos de conexiones que establece. Además de las seis capas corticales, la corteza cerebral se organiza horizontalmente en más de 40 regiones que regulan anatómica y funcionalmente diversos procesos [1].

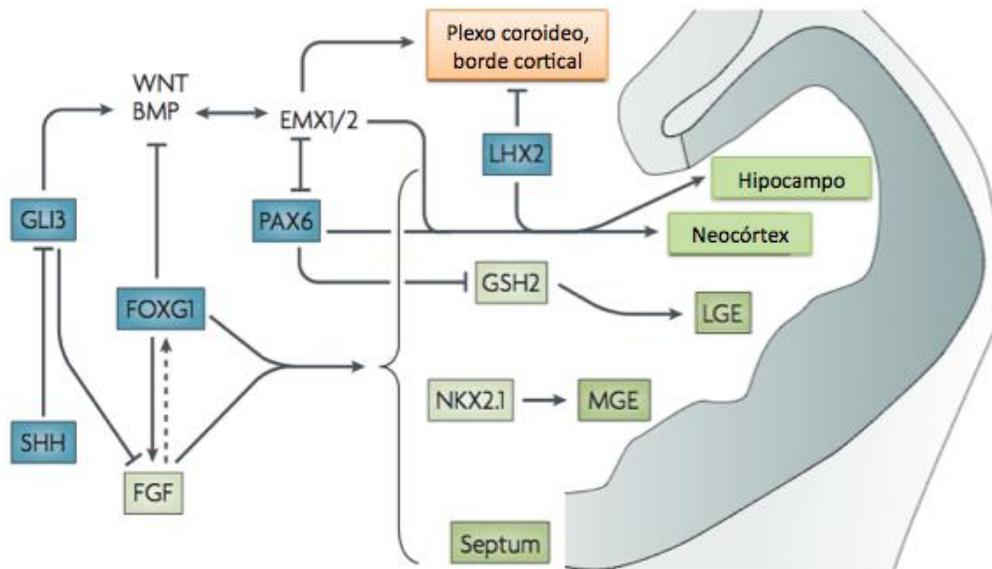


Figura 5. Principales redes génicas que interactúan para formar y regionalizar el telencéfalo. Los factores que actúan de manera temprana para establecer amplias regiones telencefálicas se muestran en azul. La señalización de Foxg1, así como la de FGF son necesarias para formar todas las regiones del telencéfalo (mostradas en verde), excepto la región dorsomedial (mostrada en naranja). LGE= Eminencia ganglionar lateral; MGE= Eminencia ganglionar media. Modificado de [8].

En la corteza se encuentran dos tipos de neuronas corticales: neuronas de Proyección, que extienden sus axones a blancos subcerebrales, subcorticales e intracorticales distantes, e interneuronas, las cuales se encargan de hacer conexiones locales.

Las neuronas de proyección son de carácter glutamatérgico y se caracterizan por una morfología piramidal que transmite la información entre diferentes regiones de la neocorteza y a otras regiones cerebrales. Durante el desarrollo, las neuronas de proyección se generan de los progenitores de la zona germinal de la corteza, localizada en la pared dorsolateral del telencéfalo (Figura 6) [11].

En contraste, las interneuronas conteniendo al ácido gama-aminobutírico (GABA) y las células Cajal-Retzius se originan a partir de las zonas germinales fuera de la corteza y migran distancias grandes hasta su sitio final. La mayoría de las interneuronas corticales se originan en las eminencias ganglionares medial y caudal en el telencéfalo ventral, y poblaciones pequeñas se producen en la eminencia ganglionar lateral y el septo. Por otro lado, los diferentes subtipos de las células Cajal-Retzius de la capa I se originan de al menos tres regiones externas de la corteza: el hem cortical, el límite palio-subpalio y el septum. El hem cortical es la región que origina la mayoría de las células Cajal-Retzius (Figura 6 y 7) [12].

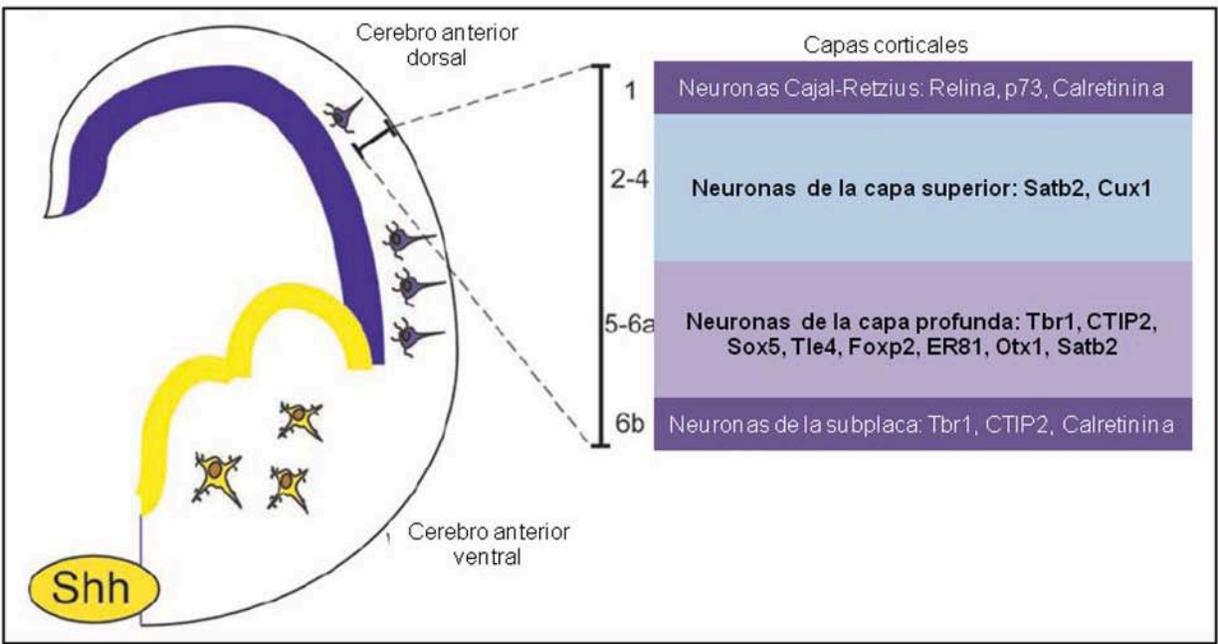


Figura 6. Representación esquemática del telencéfalo en desarrollo. La parte más anterior del cerebro contiene nichos dorsales y ventrales de células que muestran competencia para generar distintos tipos de neuronas. Dentro del telencéfalo dorsal, las neuronas piramidales que se encuentran en distintas capas corticales, expresan una combinación de marcadores específicos de capa, mientras que en el telencéfalo ventral se originan las interneuronas.

2.1 DESARROLLO CORTICAL

Se ha propuesto que durante el desarrollo cortical la aparición de centros de señalización dentro de y cercanos al neuroepitelio cortical secretan algunos grupos selectos de moléculas señalizadoras. Estas moléculas confieren información posicional y regulan el crecimiento regional [9]. Los principales morfógenos (moléculas que generan respuestas diferenciales de acuerdo a gradientes de concentración) expresados y secretados dentro de los centros de señalización son los siguientes (Figura 7):

- Ligandos de la familia del FGF (FGF8, 15, 17 y 18) en la placa comisural (el extremo más rostral del telencéfalo), los cuales imparten señales de posicionamiento en el eje anterior-posterior [9, 11, 13, 14].
- BMP/Wnt en el hem cortical (ubicado en la región dorso medial) [7, 9, 15, 16]. Sin una señal canónica de Wnt del hem cortical, el hipocampo adyacente no se desarrolla [16]; además, cuando la actividad de BMP proveniente del telencéfalo es bloqueada parcialmente, se generan pocas células epiteliales del plexo coroideo a partir del neuroepitelio medial [8]. Por el contrario, activación continua de la señal de BMP transforma el primordio cortical a células epiteliales del plexo coroideo [17].
- FGF7, FGF15 y TGF- α en el antihem (también denominado límite palio-subpalio) en la región lateral del telencéfalo [14].

Dichos morfógenos inducen la expresión de factores de transcripción como Pax6, Emx2, Coup-Tf1 y Sp8 en células neuroepiteliales de la zona ventricular cortical, de

acuerdo a patrones de gradiente únicos que permiten la formación de las diferentes áreas corticales.

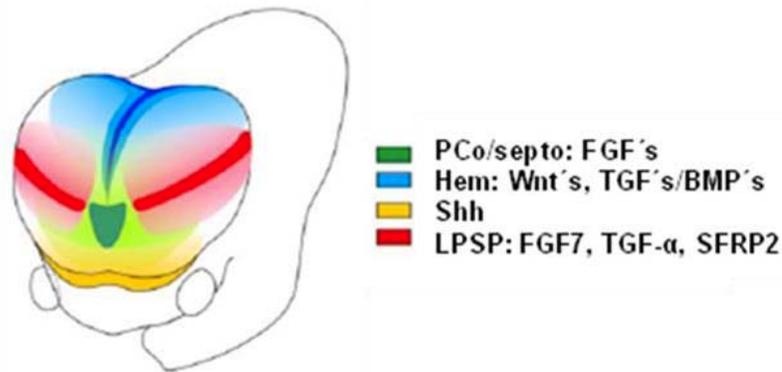


Figura 7. Representación esquemática de la localización de los centros de señalización durante el desarrollo telencefálico. Al día embrionario 10.5-12.5, después de que se da la expansión de las vesículas telencefálicas, FGF's (FGF8, FGF5, FGF17, FGF18) son expresados anteriormente en la placa comisural (PCo) y el septo. Wnt's y BMP's se localizan en la línea media de la placa del techo y el hem cortical, y shh en el telencefalo ventral y en la placa precordial. Un organizador adicional, el límite palio-subpalio (LPSP o el antihem) se localiza en el extremo anterior del palio y se caracteriza por la expresión de FGF7, SFRP2 (proteína relacionada a la proteína secretada frizzled 2) y TGF- α . Modificado de [14].

2.2 HISTOGÉNESIS CORTICAL

Hay dos parámetros del ciclo celular que determinan el número de neuronas que se generan en la corteza: la velocidad de la progresión del ciclo celular y el balance entre la re-entrada o la salida del ciclo celular [18]. Mientras que las divisiones simétricas generan dos progenitores que re-entran al ciclo celular, las divisiones asimétricas resultan en al menos una célula hija que sale del ciclo celular para diferenciarse. Además, conforme incrementa el desarrollo, la longitud del ciclo celular se alarga. Por ejemplo, las células progenitoras de la rata incrementan el tiempo de su ciclo celular de 11 horas en E12 a 19 horas en E18. Así mismo, también ocurren cambios en el tiempo que las células pasan en la fase G1 durante el ciclo celular, de tal manera que la fase G1 se triplica en su longitud de E10 a E19 [1].

Después de los estadios tempranos de formación de dominios, la corteza crece en tamaño por neurogénesis. El balance de proliferación y salida del ciclo celular define la población de células de la glía radial (CGR), la cual produce células progenitoras intermedias (CPI), neuronas y, finalmente glía, regulando el número final de las células corticales [19,20]. La neurogénesis en este estadio contribuye enormemente al grosor de la corteza [18]. La diversidad de poblaciones neuronales está asociada con el tiempo de la salida del ciclo celular de las células progenitoras y la expresión génica.

La especificación cortical ocurre durante la neurogénesis en las zonas germinales. La determinación de la identidad laminar (a cuál capa va a migrar cada célula) de cada neurona se realiza durante la división celular final. Las neuronas que se generan primero forman las capas más cercanas al ventrículo (capas profundas), mientras que las neuronas generadas después viajan distancias más grandes para formar las capas más superficiales

de la corteza, formando un gradiente de desarrollo de “adentro hacia afuera” (Figura 8). Sin embargo, mientras que las CPN que se forman en etapas tempranas del desarrollo tienen el potencial de formar cualquier tipo de neurona (de las capas 2-6), las CPN generadas después dan origen sólo a neuronas de la capa superior (capa 2) [21]. Una vez que las células llegan a su destino final, producen moléculas de adhesión particulares que las organizan juntas como un núcleo cerebral [22].

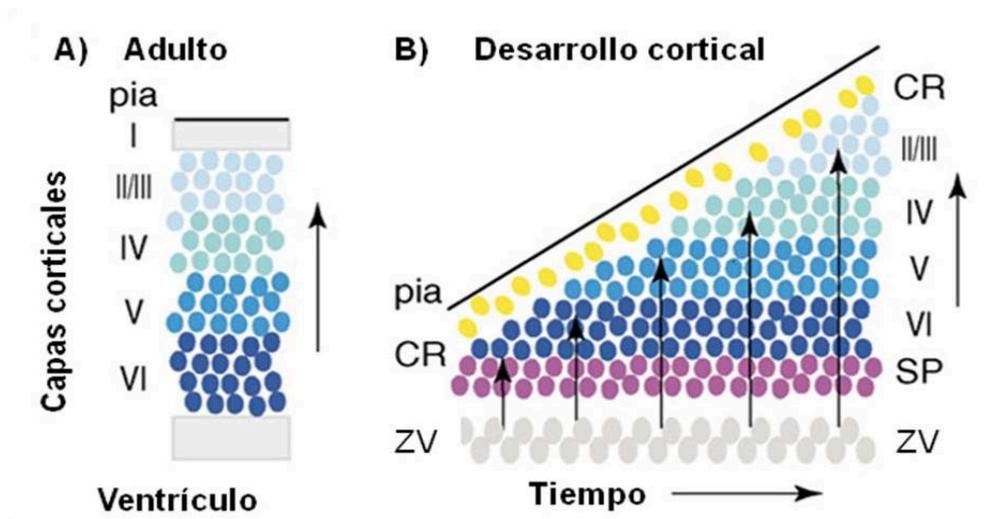


Figura 8. Esquema representativo de la corteza adulta y embrionaria. A) La corteza adulta normal se divide en capas que van de la capa I a la capa VI, numeradas desde afuera (superficie pial) hacia dentro (zona ventricular). En el adulto, la capa I y la región debajo de la placa cortical están pobladas con neuritas (zona gris). Neuronas de proyección en la placa cortical se agrupan con las neuronas más viejas en la parte inferior y las neuronas más jóvenes en la parte superior (mostradas en varios tonos de azul). La flecha de la derecha indica el orden de formación de las capas corticales. **B)** Curso de tiempo del desarrollo de la placa cortical normal. Las flechas proyectándose hacia arriba de la zona ventricular (ZV) muestran migración de diferentes tipos neuronales. Las células Cajal-Retzius (CR) son representadas por círculos amarillos, mientras que las células de la subplaca (SP) se representan por círculos morados, ambos tipos de células degeneran durante el nacimiento, por lo cual ya no están presentes en el adulto. Modificado de [23].

2.3 CÉLULAS TRONCALES Y PROGENITORAS DE LA CORTEZA CEREBRAL

Las células troncales neurales (CTN) de la corteza se generan por división simétrica del epitelio del tubo neural antes de que la neurogénesis ocurra. En la rata, las primeras células comprometidas al linaje neuronal son detectadas en el E9 y la neurogénesis continua hasta E18 [24], mientras que la generación de astrocitos se retrasa y comienza hasta E14, continuando hasta el desarrollo postnatal (Figura 9a). Las CTN multipotenciales y los progenitores neurales se encuentran presentes en el SNC embrionario, y conforme el desarrollo procede, estas células son restringidas progresivamente a progenitores de linaje neuronal o glial (Figura 9b) [24].

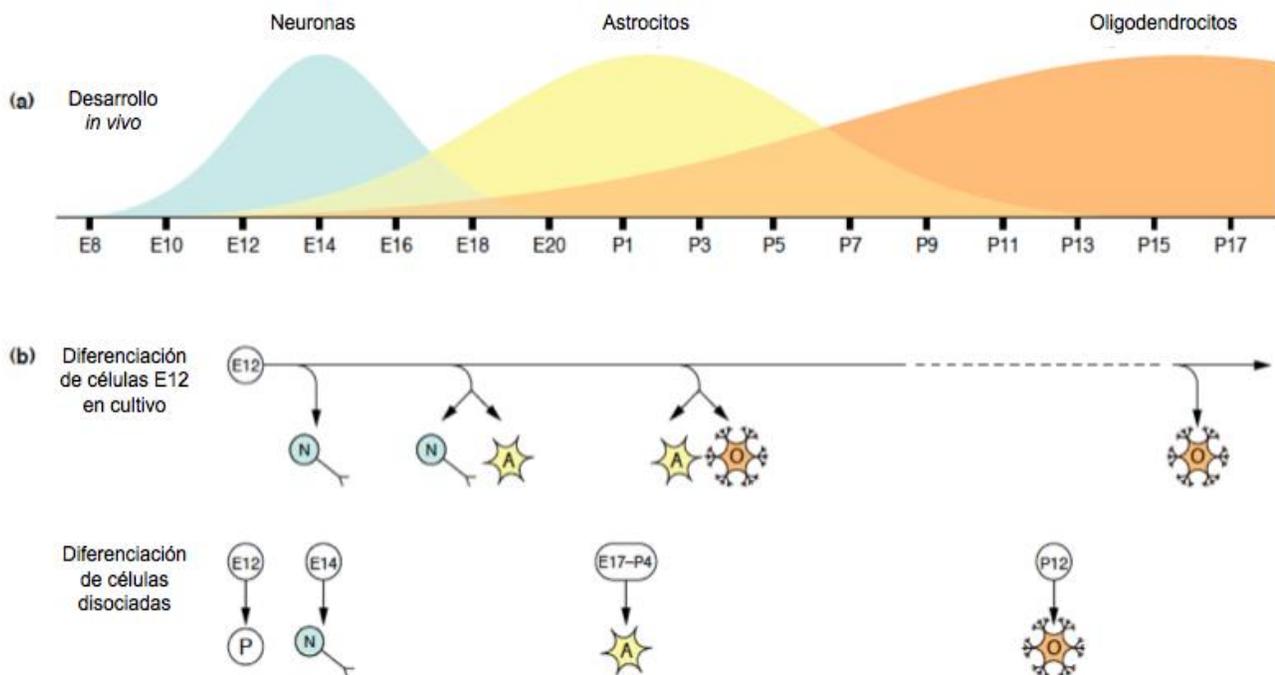


Figura 9. Las células progenitoras corticales siguen una secuencia intrínseca de desarrollo tanto *in vivo* como *in vitro*. (a) En ratas, la neurogénesis alcanza su máximo en E14, la astrogénesis en el día posnatal 2 (P2) y la oligodendrogénesis en P14. (b) Los cultivos *in vitro* recapitulan el patrón de diferenciación observado *in vivo*, lo que sugiere que estas células son preparadas intrínsecamente para un destino determinado en un período del desarrollo determinado. Células disecadas en diferentes periodos del desarrollo se diferencian a una progenie que refleja la actividad que ocurre en el momento de la disección. Modificado de [24].

Inicialmente, la capa proliferativa de la corteza murina forma la zona ventricular (ZV), posteriormente (E13 en ratón y E15 en rata) se divide para dar origen a una zona subventricular (ZSV) arriba de ella. En conjunto, ambas zonas forman el estrato germinal que genera los neuroblastos que migran a la placa cortical y forman las distintas capas neuronales. La ZV formará las capas inferiores o profundas, de neuronas, mientras que la ZSV formará a las células de las capas superiores [21]. Esta fase inicial del desarrollo cortical se caracteriza por la rápida proliferación de las células progenitoras corticales a través de divisiones simétricas, controlado, en gran medida, por factores de transcripción de la familia hélice-asa-hélice con dominios básicos (bHLH, del inglés basic helix-loop-helix) [25]. De esta manera, se ha visto que los progenitores corticales son mantenidos en un estado de proliferación gracias a la acción de factores bHLH de las familias Id (inhibidor de diferenciación) y Hes (por sus siglas en inglés Hairy/enhancer of split). La transición del estado proliferativo a la neurogénesis implica un aumento coordinado en la actividad de los factores transcripcionales Mash1, Neurogenina 1 (Ngn1) y Neurogenina 2 (Ngn2), así como una disminución en la actividad de los factores Id y Hes. Ambas Neurogeninas son expresadas en el telencéfalo dorsal, que da lugar a las neuronas glutamatérgicas, mientras que Mash1 se expresa predominantemente en el telencéfalo ventral, el cual da origen a neuronas GABAérgicas y colinérgicas [25].

Hay tres tipos principales de células progenitoras en el estrato germinal: las células de la glía radial (CGR), las CPN y las células progenitoras intermedias (CPI) (Figura 10). Las CGR (las cuales no son realmente glía, pero presentan características de este tipo celular) son células con carácter de CTN y se localizan en la ZV. En cada división, generan una célula que permanece indiferenciada en la ZV y otra célula que está más comprometida. Durante cada división, la célula que recibe el centriolo viejo permanece en la ZV, y la célula que recibe el centriolo nuevo sale de la ZV para diferenciarse. Las células más comprometidas pueden ser neuroblastos (los cuales se dividen para generar neuronas) o CPI, las cuales migran a la ZSV donde generan neuroblastos. Las CPN también generan neuroblastos, pero de la ZV (Figura 10) [2].

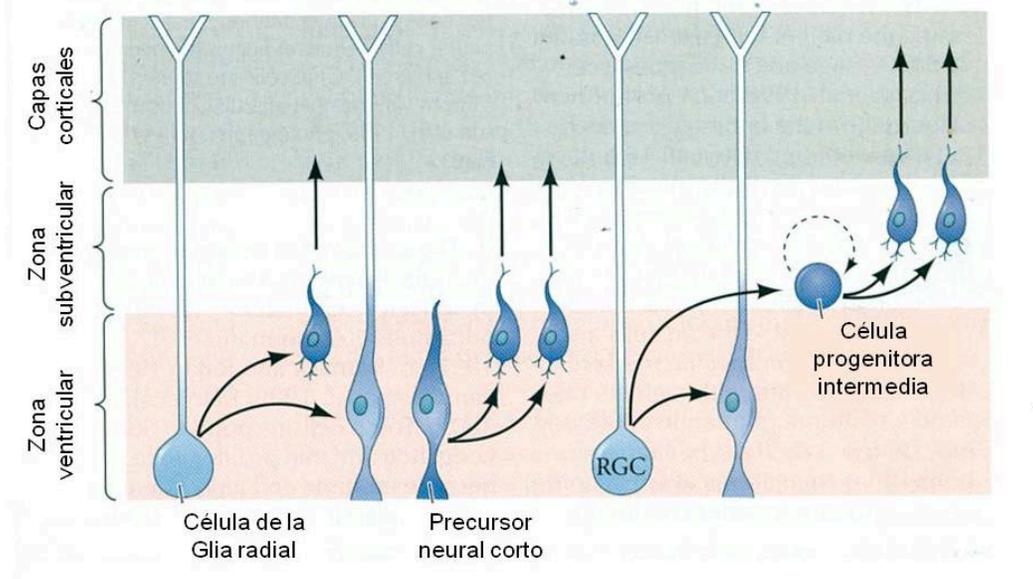


Figura 10. Las neuronas corticales son generadas de tres tipos de células precursoras neurales: células de la glía radial, precusores neurales cortos y células progenitoras intermedias. Los primeros dos tipos de células se dividen en la superficie apical de la capa ventricular. Mediante divisiones asimétricas, CGR dan origen a precusores neurales intermedios que migran a la ZSV. La ZV genera neuronas de la capa inferior, mientras que la ZSV genera neuronas de la capa superior. La mayoría de las CPI sufren divisiones neurogénicas, con una pequeña fracción teniendo divisiones proliferativas simétricas (línea punteada). Modificado de [2].

Las primeras neuronas corticales que se generan durante el desarrollo migran a la zona germinal para formar la preplaca [26]. Las neuronas generadas posteriormente migran dentro de la preplaca, separándola en dos capas: la capa de células Cajal-Retzius y la subplaca. La capa de células Cajal-Retzius es la capa de células más superficial de la corteza, estas células expresan a la glicoproteína Relina. La subplaca es la capa de células más profunda, en la cual ondas sucesivas de neuroblastos viajan para formar la placa cortical. Las células productoras de Relina de la capa cortical de células Cajal-Retzius juegan un papel crítico en la separación de la preplaca. Mediante la activación de la vía de Notch, la Relina, en la superficie de las células Cajal-Retzius, permite a la CTN producir una larga fibra que se extiende hacia la placa cortical; dicho proceso llega a ser

crítico para la migración de las células neurales que se producen en las zonas germinales [27, 28].

Dentro de los genes que modulan la división celular cortical se encuentra el gen que codifica al factor de transcripción Foxg1. Cuando las CPN de ratón se dividen para generar a las neuronas destinadas para las capas 4 y 5, expresan este gen. Si se elimina el gen Foxg1 en este linaje neuronal, las CPN continuamente originan neuronas de la capa 1 [29], implicando que Foxg1 se requiere para suprimir el destino neuronal de la capa 1.

Las organizaciones vertical y horizontal no son clonalmente especificadas, es decir, que ninguna de las unidades funcionales se forma de la progenie de una célula sencilla; en lugar de eso, el desarrollo de la corteza procede de la mezcla de células derivadas de numerosas CTN. La regionalización de la corteza se organiza por factores parácrinos secretados por la epidermis y células de la Cresta neural en los márgenes del cerebro en desarrollo. Los factores parácrinos inducen la expresión de factores de transcripción en regiones específicas del cerebro, los cuales participan en la sobrevivencia, diferenciación, proliferación y migración de las neuronas recién generadas [2].

A medida que avanza el desarrollo, la inhibición de los factores proneurales bHLH en progenitores corticales, promueve la formación de los astrocitos [30]. Dicha astrogénesis también se ve promovida por la activación de la vía de Notch, por un lado, y la acción de las BMPs por otro. La vía de Notch actúa inhibiendo la actividad de genes proneurales, promoviendo así la entrada a la vía de diferenciación glial; por su parte, las BMPs inducen la expresión de factores Id y Hes que a su vez conducen a la reducción de la activación de Ngn1 y Mash1 [24, 25, 31].

3. CÉLULAS TRONCALES NEURALES

Una característica intrínseca del SNC es su enorme diversidad celular. En el cerebro adulto existe una producción continua de neurotransmisores y receptores, generados por neuronas específicas. Durante el desarrollo cerebral, las CTN son las células que dan lugar a la gran diversidad de tipos celulares especializados que caracteriza al SNC. Las CTN se caracterizan por su capacidad de generar a más células troncales por división simétrica (autorrenovación), así como a los progenitores más maduros de todos los linajes neuronales por división asimétrica (multipotencialidad). De esta manera, dan origen a los 3 principales tipos celulares que componen este sistema: neuronas, astrocitos, oligodendrocitos [32-34].

Las CTN aparecen durante la formación de la placa neural y constituyen el tipo celular predominante en el neuroectodermo temprano. A medida que avanza el desarrollo, se forma el tubo neural y las CTN se vuelven progresivamente menos abundantes y emergen progenitores celulares más restringidos (Figura 11A) [32].

En el adulto, la neurogénesis persiste en diversas zonas del cerebro. Este proceso es regulado por procesos dependientes de la experiencia como el aprendizaje, la memoria, el enriquecimiento del medio, el ejercicio y el estrés. En el SNC adulto, las CTN residen en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo y en la ZSV adyacente a los ventrículos laterales [32, 35]; estas CTN son responsables de la formación de nuevas neuronas en el hipocampo y en el bulbo olfatorio, respectivamente. Las neuronas que se

originan en la ZSG migran hacia capas más profundas del giro dentado del hipocampo en donde se diferencian en células granulares. Por el otro lado, la ZSV produce constantemente CTN a lo largo de la vida del sujeto, y en condiciones normales, los neuroblastos generados allí entran a la corriente migratoria rostral para alcanzar su destino final en el bulbo olfatorio (Figura 11B) [2]. Se ha propuesto que en las regiones con CTN existen nichos que se parecen al ambiente embrionario que permiten el mantenimiento de las CTN en el adulto [36].

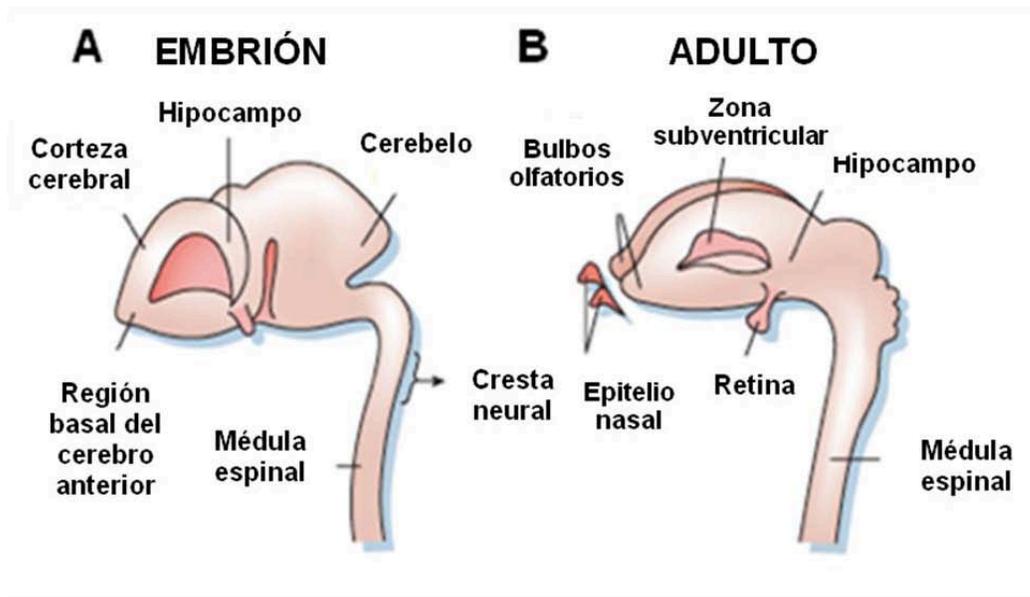


Figura 11. Localización de las células troncales neurales (CTN). Principales zonas del sistema nervioso embrionario (A) y adulto (B) en donde se han identificado a las CTN. Modificado de [32].

3.1 SISTEMAS *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LAS CTN

A la fecha existen dos principales sistemas de cultivo que permiten la propagación de células indiferenciadas del sistema nervioso [37]. Ambos sistemas requieren la participación de factores de crecimiento como EGF y FGF [38, 39], los cuales participan en la autorrenovación o proliferación de precursores neurales. El primer sistema se caracteriza por la inducción de la proliferación de células en cajas de cultivo no adherentes, induciendo la generación de agregados heterogéneos (neuroesferas) que crecen en suspensión [40]. El sistema de neuroesferas fue el primero en describirse para inducir la proliferación de las CTN adultas y embrionarias [41]. Este sistema es empleado para demostrar la presencia de poblaciones de CTN; además, a densidades clonales, se utiliza para demostrar la autorrenovación y multipotencialidad de las CTN. En el segundo sistema, el cultivo se realiza sobre una caja con matriz extracelular que favorece la adhesión de los precursores neurales, los cuales proliferan hasta cubrir completamente la superficie del cultivo. Este procedimiento selecciona a precursores en proliferación y es el preferido para propagar *in vitro* poblaciones que mantienen un comportamiento homogéneo [42]. En ambos casos se pueden mantener los cultivos por períodos de tiempo

prolongados (más de 10 pasajes), aunque en algunos tejidos esto se reduce sólo a 5, lo cual pueda deberse a la presencia de progenitores neurales de amplificación transitoria o comprometidos [43].

Las células neuroepiteliales que se localizan en la región de la zona ventricular que originará la corteza tienen características de células troncales neurales; es decir, tienen la capacidad de autorrenovarse y de dar origen a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos cuando se diferencian [32, 44]. Estas células pueden aislarse de la corteza cerebral en desarrollo de embriones de rata de 14 días y crecidas como cultivos adherentes (Figura 11A). De este modo, su proliferación es estimulada por factores de crecimiento, en especial FGF1 y FGF2 estimulan la proliferación de células neuroepiteliales aisladas de telencéfalo y mesencéfalo murino [45].

3.1.1 DIFERENCIACIÓN NEURONAL

En el SNC y el SNP el primer fenotipo terminal que se genera es el neuronal. Como se mencionó previamente, los genes que controlan este proceso son conocidos como genes proneurales. Dichos genes pertenecen a la familia de factores de transcripción de bHLH. Durante la fase proliferativa de las CTN, es sobre estos factores donde se ejerce represión por los genes que participan en la autorrenovación y proliferación de las CTN. El primer gen en activarse es Mash, el cual a su vez activará la expresión de Ngn, para posteriormente activar a NeuroD. Finalmente, este gen participará en el proceso de activación de los diferentes genes que le confieren las características de fenotipo terminal a la neurona [46].

En los cultivos de células neuroepiteliales, el PDGF induce la formación de neuronas [47]. Este factor, al igual que CNTF (ver en el párrafo siguiente), actúa de forma instructiva sobre una célula progenitora dirigiéndola hacia diferentes destinos [48]. Debido a que se requiere síntesis de novo para que se dé este proceso, se sugiere que tanto PDGF como CNTF estimulan la expresión de genes que codifican para mediadores intracelulares en la elección del destino de estas células.

3.1.2 DIFERENCIACIÓN GLÍAL

Las células gliales son las últimas en generarse durante el desarrollo cerebral. Estas células llegan a formar hasta el 90% de las poblaciones del tejido adulto. Aunque en un inicio se consideró que las células gliales eran únicamente células de soporte para las neuronas, actualmente se ha demostrado que llevan a cabo funciones adicionales relevantes para la regulación de las funciones neuronales, entre las que destacan: mantener la integridad de la barrera hematoencefálica, regular los flujos de calcio, liberar D-serina, producir neuropéptidos y modular la transmisión sináptica. Los astrocitos y los oligodendrocitos se generan de la glía radial [49]. Las células gliales son también susceptibles de recibir información de la regionalización que se produce durante el desarrollo del sistema nervioso; de esta manera, los morfógenos como Shh, BMP, Wnt, Notch y FGF son relevantes en los procesos de determinación y compromiso glial [50]. Dentro de los factores que participan en la diferenciación de astrocitos se ha identificado a LIF, BMP y CNTF. Estas vías de señalización activan a sus mediadores intracelulares

(STAT, SMAD y p300, respectivamente), con los cuales es posible formar un complejo capaz de activar transcripcionalmente a los genes asociados al linaje astrocítico [51].

4. FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β

La familia del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés) es un grupo de factores de crecimiento extracelulares que controlan muchos procesos durante el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis de muchos órganos y sistemas. TGF- β fue descrito por primera vez en 1981, siendo aislado de células químicas o viralmente transformadas. Se le dio este nombre debido a los efectos transformantes que produjo en conjunto con EGF; posteriormente, se demostró su presencia en tejidos normales tales como el hígado, el corazón y el riñón [52].

Entre los procesos celulares que controlan los miembros de esta familia se encuentran proliferación celular, formación de matriz extracelular, angiogénesis, hematopoyesis, diferenciación, migración celular, respuestas inflamatorias, sobrevivencia celular, apoptosis y especificación del destino celular durante el desarrollo embrionario, esto se observa en una amplia gama de organismos que van desde moscas y gusanos hasta mamíferos [53-55]. Además, estas proteínas regulan la homeostasis y reparación en tejidos adultos [53]. Estas actividades dependen tanto del contexto celular y el estadio de la célula blanco como de la identidad y la dosis del ligando [53, 56].

La familia del TGF- β comprende más de 100 proteínas distintas, de las cuales más de 40 han sido descritas en mamíferos. De acuerdo a similitud de secuencias y vías de señalización que se activan, las proteínas pertenecientes a esta familia se agrupan en dos subfamilias: la subfamilia de TGF- β /Activina/Nodal y la subfamilia de BMP/GDF (Growth and Differentiation Factor)/MIS (Mullerian Inhibiting Substance) (Figura 12).

Estructuralmente, la forma activa de las proteínas de la familia del TGF- β es un dímero estabilizado por interacciones hidrófobas, las cuales se encuentran reforzadas por puentes disulfuro inter e intra subunidad. En el dominio maduro, seis a nueve residuos de cisteína forman enlaces inter e intra moleculares característicos de esta familia de proteínas. Cada monómero está compuesto por varias cadenas entrelazadas por tres enlaces disulfuro que forman una estructura estrecha conocida como el “nudo de cisteína”. Ocho residuos de cisteína forman cuatro puentes disulfuro intramoleculares, y la cisteína remanente hace el puente intermolecular que une a los dos monómeros, dando la estabilización necesaria para que se forme un dímero funcional [53, 57].

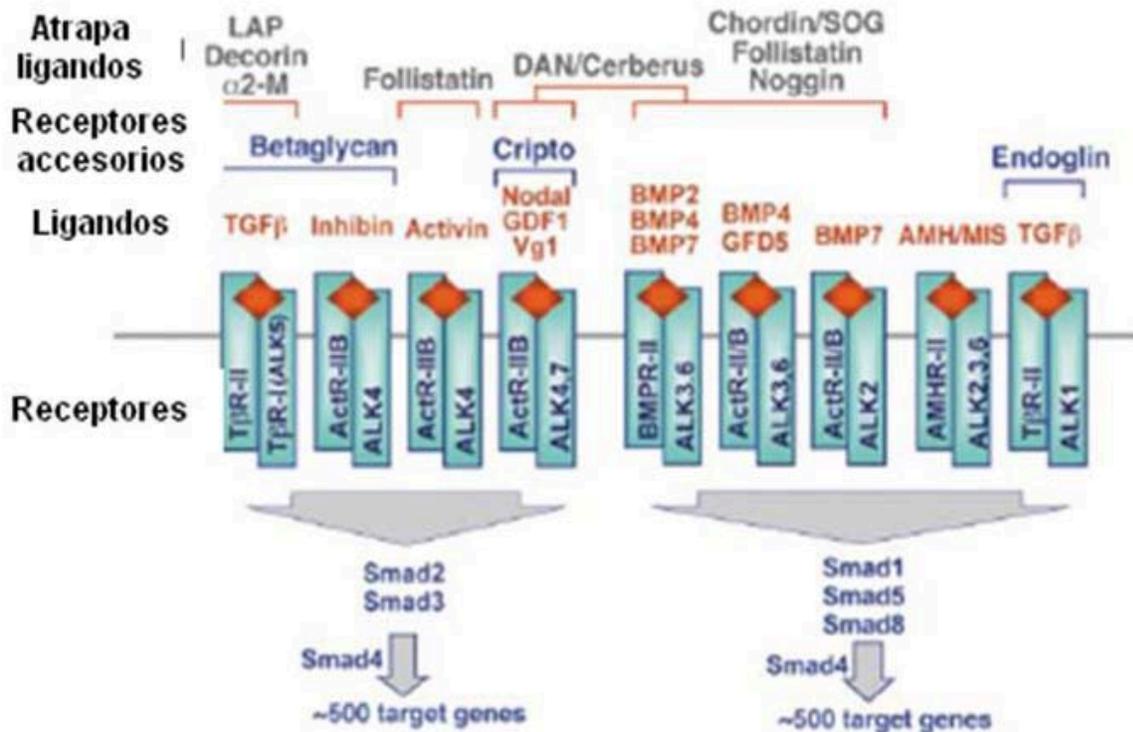


Figura 12. Representación esquemática de los ligandos, receptores y moléculas accesorias que participan en la vía de señalización de los miembros de la familia del TGF-β en vertebrados. Modificado de [55].

4.1 RECEPTORES DE TGF-β

La señalización de los miembros de la familia del TGF-β se efectúa a través de la unión a una familia de receptores transmembranales con actividad de cinasa de serina/treonina. Estos receptores son glicoproteínas compuestas de un dominio extracelular corto, rico en cisteínas, encargado de la unión del ligando, una región transmembranal sencilla y un dominio en la parte carboxilo terminal con actividad de cinasa de serina/treonina [57]. Con base en propiedades estructurales y funcionales, los receptores se dividen en dos subfamilias: receptores tipo I y receptores tipo II. Los receptores tipo I tienen un peso molecular cercano a 55 kDa, mientras que el peso molecular de los receptores tipo II es de alrededor de 70 kDa. Se han descrito 7 receptores tipo I, también denominados receptores de Activina tipo cinasas (Alks, del inglés: Activin-receptor like kinases), los cuales van del 1 al 7, y 5 clases de receptores tipo II: TβR-II, ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II, AMHR-II (ver Figura 12 para los juegos de receptores que son utilizados para cada ligando). En la región intracelular, los receptores tipo I o Alks, contienen una secuencia SGSGSG (dominio GS) precediendo al dominio cinasa [58].

Para que se pueda dar la señalización por los miembros de la familia del TGF-β se requiere la unión del ligando dimérico al dominio extracelular de los receptores tipo II, formando una estructura tetramérica [59]. Esta unión produce que ambos receptores se

acerquen, lo que induce una conformación activa de los dominios cinasa intracelulares mediante la fosforilación del dominio GS del receptor tipo I por el receptor tipo II, ya que este último está activo de manera constitutiva [58]. Los receptores de la subfamilia del TGF- β se unen al ligando mediante interacciones cooperativas, es decir, que los complejos ligando-receptor se unen a través del reclutamiento del receptor tipo I de baja afinidad al ligando unido al receptor tipo II de alta afinidad [60]. Mientras que para los receptores de la subfamilia de BMP los dominios extracelulares de los receptores tipo I y tipo II se unen al ligando [60]. Una vez que el ligando se ha unido a sus receptores, la cinasa de los receptores tipo II fosforilan múltiples residuos de serina y treonina en la región citoplasmática “GS” del receptor tipo I, dando como resultado su activación [54]. Posteriormente, los receptores tipo I activados fosforilan proteínas intracelulares denominadas Smad, responsables de propagar la señal del citoplasma al núcleo (Figura 13) [61].

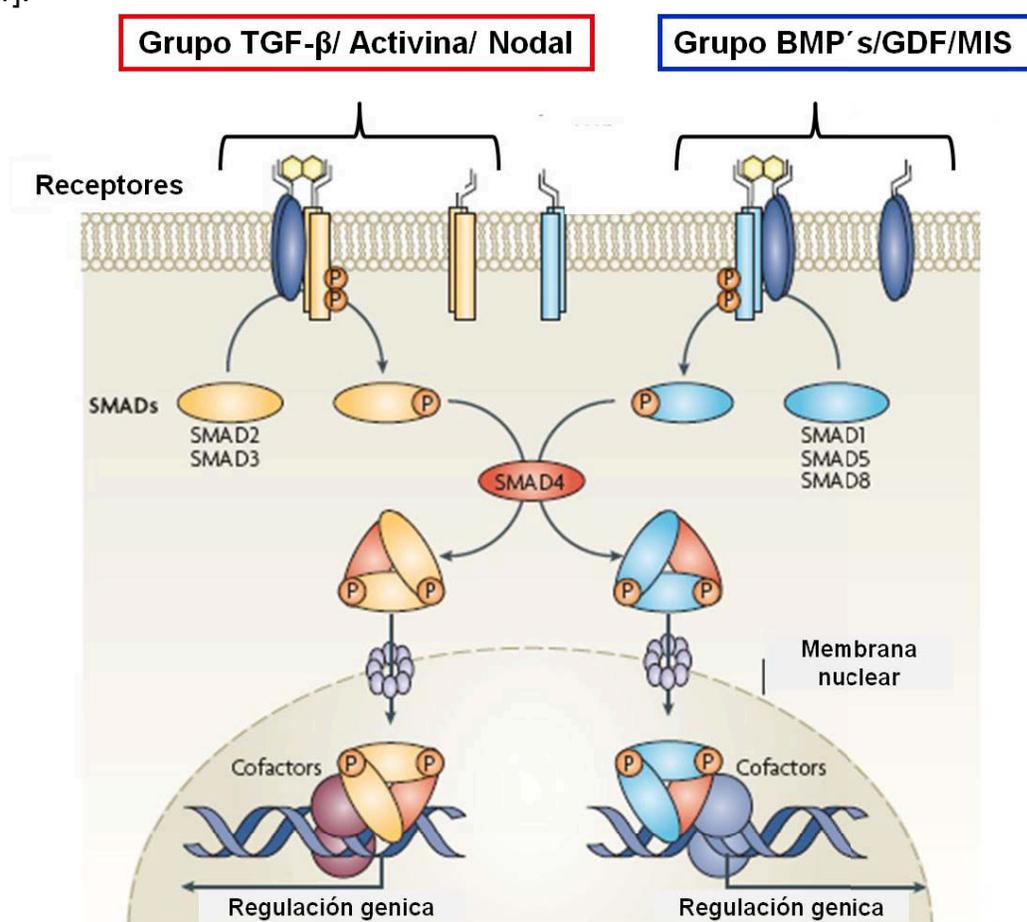


Figura 13. Diagrama esquemático que muestra la señalización de los miembros de la familia del TGF- β de la membrana celular al núcleo. Las flechas indican el flujo de la señal. Un ligando de la vía se une a sus receptores y, mediante fosforilación, se activa al receptor tipo I, lo cual promueve la fosforilación de las R-Smads que posteriormente forman un complejo heterotrimérico con Smad4. Este complejo se acumula en el núcleo para asociarse con diversas proteínas de unión al DNA y de este modo modular la actividad de promotores específicos. Tomado de [55].

Además de los receptores tipo I y tipo II, hay otro tipo de receptores para los ligandos de la familia del TGF- β , denominados receptores tipo III debido a su alto peso molecular [62]. Los receptores tipo III incrementan la afinidad del ligando al receptor tipo II. Dentro de los receptores tipo III más conocidos se encuentran Betaglicano y endogлина. Endogлина es una proteína de superficie celular enriquecida en células endoteliales [63]. Betaglicano es un proteoglicano anclado a la membrana con un dominio extracelular grande y una región intracelular que carece de dominio cinasa. Betaglicano se une a TGF- β 2 y facilita su interacción con el receptor tipo II al incrementar la afinidad de éste hacia dicho ligando [64]. Betaglicano también puede unir a Inhibina y promover su unión al receptor tipo II, produciendo una mayor competencia con la unión de estos receptores a Activinas, lo que da como resultado un antagonismo de la señal de Activinas [65].

4.2 PROTEÍNAS SMAD

Las proteínas Smad son componentes intracelulares de la vía de transducción de los miembros de la familia del TGF- β . Estas proteínas fueron descritas por primera vez en *Drosophila*, donde fueron nombradas “MAD” por Mothers Against Decapentaplegic [66]. Posteriormente, se encontró que estas proteínas también están presentes en *C. elegans*, donde fueron denominadas sma (sma2, sma3 y sma4), debido a que la mutación de estos genes causó una disminución en el tamaño de las larvas [67]. En vertebrados, estas proteínas son nombradas Smad, nombre que acuña a los términos MAD y sma. Con base en la estructura y la función, las proteínas Smad se dividen en tres clases: R-Smad (Smads activadas por el receptor), Co-Smad (Smad común) e I-Smad (Smads inhibitorias). Como su nombre lo indica, las R-Smads son las únicas que pueden ser fosforiladas de manera directa por la cinasa del receptor tipo I. Dentro de las R-Smad se encuentran Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8. Smad2 y Smad3 son activados en respuesta a la subfamilia de TGF- β /Activin/Nodal, mientras que Smad1/5/8 son activadas por los receptores de la subfamilia de BMP (Figura 12 y 13) [55].

R-Smads y Co-Smad contienen 500 aminoácidos y están formados por dos dominios estructurales altamente conservados: el dominio amino terminal, denominado MH1 de las palabras en inglés MAD homology, y el dominio carboxilo terminal MH2. Las R-Smads son activadas en su dominio MH1 por la fosforilación mediada por la cinasa del receptor tipo I. R-Smads y Co-Smads contienen secuencias con actividad de unión a DNA en su dominio MH1. El dominio MH2 es el encargado de interactuar con el receptor tipo I y formar complejos Smad homo- y heteroméricos. También es el responsable de contactar al complejo del poro nuclear para el intercambio citoplasmático. Además de los dominios MH1 y MH2, hay otra región en las Smads llamada la región linker, la cual es muy variable. En esta región se encuentran múltiples sitios de fosforilación que permiten la interacción con otras vías de señalización. Así mismo, esta región contiene un motivo PY, que es mediador de interacciones con proteínas Smurf. Smurf son proteínas con dominio HECT para E3 ubiquitin ligasas que dirigen a las Smads y a los receptores de TGF- β hacia su degradación por el proteosoma 26S [53, 55].

La proteína Co-Smad tiene una inserción en el dominio MH2 y carece del motivo SSXS en la región carboxilo terminal, razón por la que no puede ser fosforilada por el receptor tipo I. La co-Smad puede formar complejos con las R-Smads, facilitando la traslocación al núcleo y promoviendo la activación de cascadas de señalización. En vertebrados, la Co-Smad es Smad4. Cuando la vía de BMP es activada, Smad4 forma un complejo con Smad1, Smad5 o Smad8, y cuando la vía de TGF- β /Activina es activada, Smad4 forma complejos con Smad2 o Smad3 (Figura 13) [68].

En vertebrados, las proteínas I-Smads comprenden a Smad6 y Smad7. I-Smads, al igual que las otras Smads, contienen un dominio MH1 en la región amino terminal y un dominio MH2 en la región carboxilo terminal; sin embargo, el dominio MH1 posee poca similitud con el dominio MH1 de las R-Smads [68]. La función de las I-Smads es inhibir la fosforilación mediada por los receptores tipo I de las R-Smads. Smad6 inhibe la señal de la vía de las BMPs, mientras que Smad7 inhibe tanto a la vía de BMPs como a la de Activina/TGF- β [54, 55]. Smad7 produce un efecto inhibitorio de la vía de la Activina, el TGF- β y las BMPs al unirse al receptor tipo I e impedir la fosforilación de las R-Smads, mientras que Smad6 inhibe la señal de las BMPs al competir con Smad4 para unirse a las R-Smads activadas por el receptor tipo I, formando un complejo inactivo de R-Smad – Smad6. Los niveles de las I-Smads incrementan en respuesta a la estimulación de la señal de Activina, TGF- β y BMPs [53].

En ausencia de estimulación del ligando, R-Smads y Smad4 sufren un constante intercambio entre el citoplasma y el núcleo, pero la fosforilación de R-Smads dirige su translocación del citoplasma al núcleo debido a una reducción en la velocidad de exportación nuclear y a un incremento en la velocidad de entrada, produciendo acumulación nuclear de complejos Smad [55, 61, 69]. Una vez que el complejo R-Smad – Smad4 ingresa en el núcleo, puede participar en la regulación de genes blanco debido a que las Smads reconocen secuencias del DNA que tengan los pares de bases CAGAC (denominado elemento de unión a Smad o SBE, por sus siglas en inglés), así como secuencias ricas en G+C; sin embargo, dicha unión es de baja afinidad, por lo que la activación de los genes blanco resulta difícil [70]. Por esta razón el complejo de las Smads requiere asociarse con cofactores de DNA (proteínas que simultáneamente pueden contactar a R-Smads y a secuencias específicas del DNA) para unirse con mayor fuerza a elementos promotores que se encuentran en genes blanco [68]. De esta manera, la expresión selectiva de cofactores sólo en algunas células es la responsable de los efectos específicos del tipo celular de los miembros de esta familia. [71, 72], Por lo tanto, el contexto celular será central en determinar qué genes responderán a un complejo activado de Smad una vez que éste llega al núcleo.

4.3 REGULACIÓN EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA DEL TGF- β

La señalización de los miembros del TGF- β es regulado a múltiples niveles: activación del receptor mediante la modulación del acceso del ligando a los receptores, activación de los receptores tipo I, activación de proteínas Smad y regulación de la transcripción dependiente de proteínas Smad.

4.3.1 REGULACIÓN DEL ACCESO DEL LIGANDO AL RECEPTOR

El acceso del ligando a su receptor es regulado por tres clases de moléculas:

- a) Proteínas solubles que tienen la capacidad de unirse al ligando, secuestrándolo e impidiendo su unión a los receptores. En este grupo se encuentran la pro-región del precursor de TGF- β la proteína pequeña Decorina y la proteína circulante α 2-Macroglobulina que se une a TGF- β . Dentro de estas proteínas también se encuentra Folistatina, la cual se une a Activinas y BMP's, aunque a estos últimos lo hace con menos afinidad, previniendo la unión a sus receptores. Además, hay tres familias de proteínas distintas: Noggin, chordin/SOG y DAN/Cerberus, cuyos miembros se unen a BMP's impidiendo la unión con sus receptores [53, 54].
- b) Moléculas que activan al ligando como TSP-1, la cual es una proteína homotrimérica que al unirse a las formas latentes de TGF- β 1 las activa [53] [73].
- c) Proteínas que se encuentran ancladas a la membrana celular, actuando como receptores accesorios (co-receptores), promoviendo la unión del ligando a los receptores. Dentro de estas moléculas se encuentra el betaglicano, o receptor de TGF- β tipo III, el cual promueve la unión de TGF- β 2 al receptor tipo II al incrementar la afinidad del ligando al receptor [54]. La endogлина, una proteína relacionada a betaglicano, facilita la unión de TGF- β 1 al receptor Alk1 en células endoteliales, lo cual es muy importante durante la homeostasis vascular [74]. Cripto y otros miembros de la familia de CFC-EGF facilitan la unión de Nodal, Vg1 y GDF1 a receptores de Activina [75, 76]. La proteína BAMBI (de las palabras en inglés BMP and Activin receptor membrane bound inhibitor) impide la activación del receptor tipo I al competir con el receptor tipo II en la formación de complejos de receptor tipo I y tipo II inducidos por el ligando [53].

4.3.2 REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR

FKBP12 es una proteína intracelular que se une al dominio GS no fosforilado de los receptores de TGF- β tipo I para regular su actividad basal al impedir la unión espontánea de los receptores tipo I y tipo II en ausencia de ligando [77]. TRIP-1 (del inglés TGF- β type II receptor interacting protein) es otra proteína que se une al dominio citoplasmático del receptor tipo II de TGF- β y actúa como modulador de la actividad de TGF- β al inhibir la expresión de algunos genes inducidos por TGF- β [78].

Una vez que la señalización es iniciada, existen algunos moduladores de la fosforilación de R-Smads: Smad7, del grupo de las I-Smads, se une a los receptores

activados, compitiendo con la unión de R-Smads y regulando la activación prolongada de la vía [79].

4.3.3 REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE SMAD

El reconocimiento y activación de R-Smads por los receptores tipo I puede ser regulado por proteínas auxiliares. Una de estas proteínas es SARA (del inglés Smad anchor for receptor activation). SARA inmoviliza a Smad2 y Smad3 cerca de la membrana celular [80], lo que permite un reclutamiento eficiente de Smad2 o Smad3 a los receptores para que sean fosforiladas rápidamente después de la estimulación del ligando [81]. En ausencia de fosforilación por el receptor tipo I, los complejos de SARA con Smad2 se encuentran en endosomas. Sin embargo, la fosforilación de Smad por el receptor tipo I desestabiliza la interacción de Smad con SARA lo que produce su disociación del complejo y permite la exposición de una región de importe nuclear en el dominio MH2 de Smad [82].

4.3.4 REGULACIÓN DE LA ACUMULACIÓN NUCLEAR DE SMAD

Una vez que las R-Smads han sido fosforiladas, se forma el complejo R-Smad-Smad4, el cual es retenido dentro del núcleo. Pero esta retención sólo es posible cuando R-smad está fosforilada, así que los mecanismos de de-fosforilación juegan un papel primordial para el exporte nuclear. A la fecha se han identificado dos fosfatasa que participan en la regulación de Smad: la fosfatasa piruvato deshidrogenasa de la fosfatasa de Smad1 (PDP) y la fosfatasa del extremo carboxilo terminal pequeña (SCP1, 2 y 3), que puede de-fosforilar a las R-Smads [54, 55]. Otro nivel de regulación es la fosforilación de las R-Smads en residuos no convencionales, por ejemplo Ras puede fosforilar a Smad1, Smad2 y Smad3 en residuos de serina/treonina presentes en la región linker, atenuando la acumulación nuclear inducida por los ligandos así como la transcripción dependiente de Smad [83].

4.3.5 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEPENDIENTE DE SMAD

c-Ski y SnoN son dos miembros de la familia ski de oncogenes, los cuales regulan de manera negativa la función transcripcional de Smad. Estas proteínas antagonizan la señal de TGF- β al competir con R-Smads por la unión a Smad4. Ski, además de interrumpir la formación de un complejo funcional de R-Smad con Smad4, modula la transcripción mediada por R-Smads al reclutar al co-represor transcripcional nuclear (N-coR) y a desacetilasas de histona [68].

La proteína 1 de interacción con Smad (SNIP1, de sus siglas en inglés) también previene la señal mediada por TGF- β al impedir la asociación de Smad4 y CBP/p300 [68]. Además, las proteínas TGIF y TGIF2 se unen a R-Smads fosforiladas y reprimen la transcripción mediada por TGF- β al reclutar desacetilasas de histonas. TGIF se une a CBP y compete con p300 para unirse al complejo de Smad2 [68].

4.4 FUNCIONES DE TGF- β EN EL CEREBRO

El subgrupo del TGF- β está compuesto por tres isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Todas las isoformas se expresan en el SNC en desarrollo, tanto en neuronas como en células gliales [84], sugiriendo que las señales mediadas por TGF- β pueden jugar papeles importantes durante el desarrollo cerebral y en el mantenimiento y diferenciación de células troncales neurales [56].

4.4.1 EXPRESIÓN DE TGF- β 1

TGF- β 2 y TGF- β 3 son expresados de manera ubicua en el SNC: tanto los ligandos como los receptores se encuentran durante los estadios iniciales del desarrollo del embrión en la corda dorsalis y la subplaca, así como durante el establecimiento del cerebro medio. A nivel celular, tanto las células gliales como las neuronas expresan ambas isoformas [85, 86]. Sin embargo, los reportes en relación a la expresión de TGF- β 1 son contradictorios, pues por una parte se ha reportado que la expresión de esta proteína se encuentra restringida al plexo coroideo y a las meninges, mientras que en otros reportes se ha encontrado su expresión en áreas corticales durante el desarrollo cerebral [53, 56, 85]. Debido a la falta de homogeneidad en los efectos de TGF- β 1 descritos a la fecha durante el desarrollo cerebral, la información se enfocará en la isoforma 1.

4.4.2 FUNCIONES DE TGF- β

A) Efectos durante el desarrollo cerebral

TGF- β 2 y TGF- β 3 han sido reportados como factores esenciales para la sobrevivencia neuronal de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral [87, 88], efecto acorde a los patrones de expresión durante etapas tempranas del desarrollo embrionario en notocorda, placa del piso y mesencéfalo [89]. Sin embargo, el papel del TGF- β 1 durante el desarrollo embrionario no está bien definido, debido en parte a que sus efectos son altamente dependientes del contexto, además de que durante muchos años se creyó que la expresión del TGF- β 1 estaba ausente durante el desarrollo embrionario y que sólo estaba presente durante la edad adulta en las meninges y en el plexo coroideo [90]. En los últimos años se ha reportado la expresión de TGF- β 1 en regiones proliferativas de la placa cortical y de la pared cerebral tanto de embriones de rata de 16 días de gestación como de ratas de 30 días de nacidas [86]. Además, se ha encontrado la presencia de células inmunoreactivas a TGF- β 1 en zonas proliferativas de la corteza, así como la expresión de los receptores tipo I y tipo II en neuronas migrando y en glía radial, sugiriendo un papel para TGF- β 1 en la migración neuronal durante la laminación cortical [86].

Datos adicionales que demuestran un papel de TGF- β 1 en funciones neuronales provienen de ratones knock-out para el TGF- β 1, pues la ausencia de esta proteína produce un incremento en el número de neuronas apoptóticas, así como una reducción en la integridad presináptica cortical y en la expresión de la proteína de la matriz extracelular laminina [91]. Además de los hallazgos en ratones transgénicos, la administración exógena de TGF- β 1 en rebanadas corticales modifica la migración celular de manera dependiente de la concentración, observando que bajas concentraciones la incrementaron, pero altas

concentraciones la inhibieron [92]. Este efecto está mediado por un incremento en los niveles de proteínas de adhesión como NCAM e integrinas, indicando una función de TGF- β 1 en el control de la laminación cortical. Además de su papel en la migración de células corticales, se ha visto que TGF- β 1 participa en la regulación del ciclo celular de dichas células. Así, en neuronas corticales obtenidas de embriones de rata de 16 días de gestación sembrados en cultivos adherentes con polilisina, TGF- β 1 disminuyó el número de células en proliferación [93]. Otro efecto del TGF- β 1 es el de promover la salida del ciclo celular en la ZV de células de la corteza mediante la regulación de la expresión de proteínas del ciclo celular, sobre todo del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina, p21 [94]. Coincidente con un papel en la regulación de la proliferación cortical, ratones knock-out a la proteína Foxg1 presentaron un incremento en la expresión de p21, el cual está correlacionado con salida prematura del ciclo celular de células de la zona proliferativa de la corteza cerebral [95]. Debido a que el efecto anti-proliferativo de TGF- β 1 es inhibido por el factor de transcripción específico del cerebro anterior Foxg1, la disminución en la proliferación celular observada en los ratones knock-out a foxg1 pudo ser resultado de la desregulación en la señal de TGF- β 1, dando como resultado una regulación inapropiada de p21 en células corticales de la zona ventricular [95].

Hallazgos adicionales que sustentan un papel para el TGF- β 1 durante el desarrollo cerebral vienen de ratones mutantes en los cuales se eliminó de manera selectiva al receptor tipo II de TGF- β en cerebro medio y posterior. Estos ratones transgénicos mostraron un incremento en el tamaño del mesencéfalo y del cerebelo debido a un incremento en la autorrenovación de las células troncales/progenitores neurales (CTPN) de dichas regiones. Estos ratones también presentaron expresión ectópica de los componentes de la vía de FGF y Wnt, sugiriendo que la señal de TGF- β controla el tamaño de un área específica del cerebro al regular de manera negativa la capacidad de auto renovación de las CTPN mediante el antagonismo de las vías de señalización de FGF y Wnt [96]. Además, ratones knock-out para el Smad4 en el sistema nervioso presentaron una disminución en el número de células de Purkinje del cerebelo y control motor anormal [97]. Sin embargo, contrario a los resultados obtenidos *in vitro*, la eliminación del receptor de TGF- β tipo II en el cerebro anterior no produjo alteraciones corticales fenotípicas ni afectó la proliferación de células neuroepiteliales al día embrionario 12.5 [96]. La falta de alteraciones en los ratones carentes del receptor tipo II puede deberse a la existencia de señales redundantes en el cerebro anterior que activen las mismas R-Smads (posiblemente las Activinas o Nodal), pues aunque en estos ratones se eliminó al receptor tipo II, la fosforilación de Smad3 fue aún observada en estos ratones transgénicos [96].

B) Efectos en células troncales/ progenitores neurales (CTPN)

Durante el desarrollo del cerebro, el receptor tipo II de TGF- β es expresado en regiones neurogénicas que contienen CTN, sugiriendo un papel para TGF- β en la regulación de alguno de los procesos de estas células. Coincidente con su expresión, en cultivos de progenitores de corteza y de hipocampo de embriones de ratón, TGF- β 1 promueve la salida del ciclo celular y promueve la adopción de un destino neuronal *in vitro*

e *in vivo*. Este efecto es dependiente de la señal de Smad4 y de la inducción de la proteína de la señalización de integrina Nedd9/Hef1 [98]. De manera similar a lo ocurrido en las células del cerebro anterior, en cultivos de mesencéfalo ventral de embriones de rata, el arresto del ciclo celular durante la fase G1/S induce la expresión de TGF- β 1, lo cual promueve un incremento en la diferenciación neuronal a través de la translocación nuclear de Smad3 y posterior activación de p27^{kip1} en los cultivos de CTPN. La disminución en la proliferación celular inducida por TGF- β 1 dominó sobre el efecto mitogénico de EGF y FGF2, posiblemente debido a un efecto inhibitorio de la vía de Smad sobre la señal de FGF [99].

En cuanto a una función del TGF- β en la regulación de la diferenciación y la especificación del destino celular, se ha reportado que durante la formación del telencéfalo, la señal de TGF- β 1 participa en la especificación de células neuronales GABAérgicas mediante la interacción de R-Smads con factores de transcripción de la familia Dlx. Dlx y R-Smads son co-expresadas, interactúan físicamente con promotores/potenciadores que regulan el gen de Dlx en la región del subpalio en desarrollo para la activación sinérgica de la transcripción del promotor al gen blanco Dlx. Esto sugiere que la señalización del grupo del TGF- β y homeoproteínas del grupo Dlx trabajan en conjunto para promover el desarrollo de neuronas telencefálicas [100]. Así mismo, la señal de TGF- β dirige la neurogénesis de células Cajal-Retzius en zonas deficientes a Foxg1 a través de Foxo3a, el cual se transloca al núcleo para actuar como un co-activador transcripcional de la sobre-regulación dependiente de TGF- β de p21. Así, TGF- β y Foxo3a pueden trabajar juntos para regular la expresión de p21 durante la generación de neuronas Cajal-Retzius [95].

C) Efectos en células troncales/progenitoras adultas

La neurogénesis adulta también es regulada por factores que afectan la proliferación celular, la determinación del destino celular, la diferenciación y la sobrevivencia. En esta línea, la señal del TGF- β ha sido implicada en la proliferación de las CTN adultas [34].

En el cerebro adulto, TGF- β 2 y TGF- β 3 se encuentran en todas las áreas del SNC, tanto en células gliales como en células neuronales [56, 90, 101], mientras que el TGF- β 1 sólo se localiza en el plexo coroideo y en las meninges, pero después de lesiones cerebrales o en casos de neurodegeneración TGF- β 1 es sobre- expresado por astrocitos, neuronas y células de la microglía [56, 84, 85, 101]. Por otro lado, los receptores tipo I y tipo II de TGF- β son expresados en el hipocampo y también en la ZSV del eje rostro-migratorio del bulbo olfatorio, la cual es la región neurogénica más grande del cerebro adulto [34]; además, se ha demostrado que CTN adultas derivadas de la ZSV expresan ambos tipos de receptores de TGF- β [102].

De manera semejante al efecto que produce en CTPN embrionarias, en cultivos de CTN adultas, TGF- β 1 reduce la proliferación celular y produce arresto en el crecimiento celular mediante un incremento en la expresión de RNAm de p21, aunque dicha disminución en la proliferación no afectó la capacidad de auto-renovación y multipotencia

de CTPN adultos *in vitro*. Esta inhibición fue específica del TGF- β 1, pues TGF- β 2 no tuvo ningún efecto en la proliferación celular [102].

Datos adicionales indicando un papel potencial para el TGF- β en la neurogénesis adulta vienen de ratas adrenalectomizadas, las cuales presentan un incremento de 10 veces en la expresión del RNAm para TGF- β 1. El aumento de la expresión de TGF- β correlaciona con la cantidad de neurogénesis adulta y con el número de células de la microglía. Acorde con un papel de TGF- β en la neurogénesis, el bloqueo de la actividad biológica de TGF- β reduce la proliferación de CTN adultas, mientras que su adición a los cultivos de CTN adultas la promueve [103].

En el SNC lesionado, el TGF- β 1 coordina respuestas celulares asociadas con actividades benéficas para la regeneración [89, 104]. Por ejemplo, protege a las neuronas del hipocampo, del cerebelo y de la corteza, de la toxicidad mediada por N-metil-D-aspartato (NMDA). Esta actividad neuroprotectora requiere de la inducción de la síntesis y de la liberación del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 por los astrocitos después de la activación de los receptores de TGF- β y posterior reclutamiento de Smad3 [105].

4.5 FUNCIONES DE LA ACTIVINA EN EL CEREBRO

La Activina es una proteína que regula la diferenciación y la proliferación de una gran variedad de células. Las proteínas biológicamente activas consisten de homo o heterodímeros de dos subunidades β de Activina, lo cual da lugar a diferentes proteínas: Activina A (β A/ β A), Activina B (β B/ β B) o Activina AB (β A/ β B). La inhibina, el antagonista de la Activina, consiste de subunidades α -Inhibina combinadas con una subunidad β -A o β -B [53]. Las Activinas fueron aisladas por primera vez de los fluidos ováricos y caracterizadas por su capacidad de regular la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH, del inglés Follicle-stimulating hormone) [106]. Los términos “activina” e “inhibina” fueron usados debido a los efectos antagónicos que mostraron en la regulación de la síntesis de la FSH. La Activina estimuló la síntesis de la hormona en células gonadotropas pituitarias [106], mientras que la inhibina bloqueó su producción [107].

Las Activinas son proteínas multifuncionales que ejercen efectos más allá del sistema endócrino, entre los que destacan el control del crecimiento y el desarrollo [108], la función inmune [109] y la muerte celular [110]. Recientemente se ha reportado que la Activina A tiene un papel importante en procesos inflamatorios y de reparación, tales como cicatrización de heridas y daño cerebral [111]. Además, la Activina también participa en la inducción del mesodermo en explantes de embriones de *Xenopus* [108].

4.5.1 EXPRESIÓN DE LA ACTIVINA A

Durante el desarrollo del cerebro de rata, el RNAm de la Activina A se encuentra en la región anterior y lateral de la corteza cerebral y en el lado dorsal del estriado a partir del día embrionario 15.5 y 16, respectivamente; la expresión se vuelve más prominente en días posteriores. A nivel celular, la expresión de la Activina A se encuentra enriquecida en neuronas posmitóticas en la parte inferior de la placa cortical, zona en la cual las neuronas maduran y desarrollan estructuras dendríticas y sinápticas. Conforme el desarrollo embrionario progresa, la Activina continua su expresión en neuronas de la capa cortical profunda. Esta progresión de adentro hacia afuera en la expresión de la Activina A coincide con el gradiente radial descrito durante el desarrollo cortical. Es de hacerse notar que el RNAm de la Activina A es sobre-regulado en la corteza y el estriado en etapa posnatal en respuesta a estímulo con los antagonistas de GABA y glutamato [112]. De manera semejante al patrón de expresión de la Activina, el receptor tipo II de la Activina es expresado en regiones del cerebro anterior en E13-E20, mientras que el RNAm del receptor tipo IIB se expresa en etapas más tempranas del desarrollo en el tubo neural, con señales muy intensas en el neuroepitelio cerebral en E12-E20 [113]. Estos patrones de expresión sugieren un papel de la señal de Activina A durante el desarrollo neuronal y la diferenciación de las neuronas corticales [112].

4.5.2 FUNCIONES DE LA ACTIVINA

A) Durante el desarrollo del cerebro y la diferenciación de células neurales

Los ratones knock-out para la Activina A no presentan alteraciones fenotípicas del SNC. Estos ratones se desarrollan a término, carecen de bigotes e incisivos inferiores, tienen defectos en el paladar y mueren después de 24 horas de haber nacido [114], razón por la cual durante mucho tiempo se creyó que las funciones de la Activina estaban restringidas a la regulación de la síntesis de la FSH. Sin embargo, en los últimos años se han publicado varios reportes que sugieren que los componentes de la señal de la Activina juegan papeles importantes en el mantenimiento y en la diferenciación de las CTN tanto *in vitro* como durante el desarrollo embrionario.

La Activina A tiene efectos en el crecimiento, la sobrevivencia y la diferenciación celular, los cuales dependen del tipo celular. Así, en células P19 pluripotentes no diferenciadas de carcinoma embrionario, la Activina A promovió su diferenciación [115], mientras que en precursores neurales derivados de células troncales embrionarias, la presencia de Activina A indujo la diferenciación neuronal al disminuir la proliferación inducida por Shh, con la participación del ácido retinoico. Los precursores neurales tratados con la Activina A produjeron de manera preferencial interneuronas GABAérgicas de cerebro anterior positivas para el marcador Calretinina. Estos mismos efectos fueron reportados también para precursores neurales obtenidos a partir de células troncales embrionarias humanas [116].

Debido a que los efectos de la Activina A dependen de manera notable del tipo celular, en ocasiones pareciera que sus funciones son paradójicas. Así, por ejemplo, en células de neuroblastoma P19 e IMR, la adición de la Activina A inhibe la diferenciación neuronal inducida por ácido retinoico, así como la diferenciación neuronal de células de

neuroblastoma GOTO al exponerlas a medio con baja concentración de suero [115]; mientras que en células de neuroblastoma de la línea SK-N-SH, el tratamiento con la Activina A produjo un incremento tanto en el crecimiento neurítico como en la expresión de marcadores neuronales [117]. Además, la Activina A favorece la aparición de marcadores fenotípicos de cultivos de neuronas del hipocampo: por un lado, suprime la aparición de interneuronas GABAérgicas, y por el otro, aumenta el número de células granulares dentadas; el co-tratamiento de estas células con el antagonista de Activina, Folistatina, eliminó por completo los efectos de la Activina A [118]. Además de los hallazgos *in vitro*, estudios en ratones transgénicos en los cuales se ha eliminado de manera selectiva la actividad de la Activina en neuronas posnatales de la región anterior del cerebro, han demostrado que la actividad endógena de Activina A es necesaria para el desarrollo de neuronas excitatorias y de células granulares dentadas del hipocampo [118, 119].

B) En el cerebro adulto

En el cerebro adulto, la Activina A es producida de manera constitutiva y se encuentra distribuida en todo el SNC, aunque predomina en el cerebro anterior en las regiones de la corteza y del hipocampo [119]. Así mismo, dos subtipos del receptor de la Activina, ActRII y Alk4, se expresan en la formación del hipocampo [120]. Además de su expresión basal, el RNAm de la Activina A es inducido rápida y transitoriamente en neuronas del cerebro adulto como respuesta al aporte sináptico excitatorio. La Activina A también protege a neuronas del cerebro adulto de daño isquémico, y su expresión es regulada por la actividad neuronal [121]. También se ha visto que la Activina A modula la morfología de las espinas dendríticas tanto de las neuronas del hipocampo como de las neuronas del ganglio del tallo dorsal, las cuales son muy importantes para la plasticidad sináptica en el hipocampo durante los procesos de aprendizaje y memoria [122, 123].

La expresión de la Activina A incrementa durante la inflamación y el estrés isquémico, sugiriendo que esta proteína puede participar en los mecanismos protectores del cerebro [112], pues *in vitro*, la presencia de la Activina A es suficiente para promover la sobrevivencia celular siete días después de haber removido el suero del medio de cultivo, lo cual sugiere un uso potencial para aplicaciones clínicas [117].

Además, la expresión de la Activina A incrementa en neuronas del hipocampo de roedores adultos en modelos de isquemia cerebral transitoria e hipoxia, y también subsecuentemente a daño cerebral debido a tratamiento con ácido kainico [121, 124]. Abdipranoto-Cowley et al. mostraron que la Activina A es esencial para que se dé la neurogénesis posterior a la neurodegeneración, ya que su infusión interventricular incrementa el número de neuronas generadas en el giro dentado del hipocampo tanto de los animales tratados con lipopolisacáridos como los normales. Consistente con estos efectos, la infusión interventricular de Folistatina disminuyó la neurogénesis e incrementó el número de microglía y de astrocitos reactivos después de neurodegeneración inducida por ácido kaínico. Estos resultados sugieren que la Activina A participa en la neurogénesis en el cerebro adulto subsecuentemente a la neurodegeneración excitotóxica [125].

Datos adicionales que sustentan un papel de la Activina A en el cerebro adulto, vienen de experimentos con ratones transgénicos para Folistatina. En estos ratones, la sobre-expresión de Folistatina estuvo dirigida por el promotor de la enzima CAMKII α (enzima que se presenta de manera específica en las neuronas de la segunda semana posnatal del cerebro anterior, especialmente de las que se encuentran en el hipocampo) produjo un incremento en la ansiedad y disminución en el número de neuronas que se generaron de novo en la ZSG del hipocampo adulto, lo cual sugiere un papel para esta proteína en la regulación de la neurogénesis posnatal [119]. Así mismo, ratones transgénicos expresando una forma mutante del receptor tipo I de Activina (Alk4) bajo el promotor de CAMKII α presentaron alteraciones de la plasticidad sináptica GABAérgica [126], este hallazgo, aunado al hecho de que la infusión de Activina A dentro del giro dentado del hipocampo produce un efecto tipo anti-depresivo en ratones que fueron sometidos a la prueba de nado forzado [127], tiene implicaciones terapéuticas para el uso de Activina como tratamiento en desórdenes afectivos tales como la depresión y la ansiedad.

4.6 FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS MORFOGÉNICAS DE HUESO (BMPs)

El grupo de BMPs controla muchos pasos clave en la formación y diferenciación del sistema nervioso de vertebrados (ver sección 1.1 y 2.1), de tal manera que actúan en diferentes etapas del desarrollo neural y adulto, en diferentes regiones del SNC, regulando la proliferación, la diferenciación y el destino celular [128]. En general, las proteínas BMPs potencian la neurogénesis o gliogénesis dependiendo de la edad de las células corticales en cultivo. De esta manera, las BMPs son neurogénicas durante las primeras etapas del desarrollo cortical, y gliogénicas durante el desarrollo postnatal temprano y tardío [24].

Dentro de los miembros de la familia de BMP, BMP4 es conocida por participar en la diferenciación astrocítica de las CTPN [128-130]. Además, se ha visto que el tratamiento con BMP4 induce eficientemente la generación de células de músculo liso o glía en cultivos de células troncales neurales, de una manera dependiente de la densidad celular [131, 132]. Debido a que los efectos gliogénicos de BMP4 están bien descritos en cultivos primarios de CPN corticales de embriones de rata, en el presente estudio decidimos emplear a BMP4 como control positivo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los miembros de la familia del TGF- β se expresan de manera ubicua en el organismo, participando en la regulación de muchos procesos celulares tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de las funciones normales de diversos órganos y tejidos. Algunos miembros de la familia, incluyendo Activina, TGF- β y Nodal, han sido implicados en el desarrollo y mantenimiento de algunos órganos en los que las células troncales juegan papeles importantes. A pesar de que tanto los ligandos como los receptores se expresan durante el desarrollo del SNC, el papel que desempeñan en la formación de éste aún no es claro, ya que los efectos que se han reportado en relación a ambas proteínas son muy contrastantes, lo cual es debido, en gran parte, a que los efectos celulares de los miembros de esta familia son altamente dependientes del contexto celular. Dada la falta de homogeneidad en relación al papel que poseen la Activina A y el TGF- β 1 durante el desarrollo del SNC, decidimos estudiar los efectos de estas proteínas en cultivos primarios de CPN obtenidos de las vesículas telencéflicas de embriones de rata de 14 días de gestación, ya que se ha reportado que estos factores se expresan en áreas corticales desde etapas tempranas del desarrollo. Lo anterior con la finalidad de contribuir al conocimiento de las señales y los mecanismos que participan en la diferenciación de las CPN hacia la generación de los diversos linajes celulares que conforman el SNC.

HIPÓTESIS

La estimulación de CPN de rata con la Activina y el TGF- β 1 producirá activará la vía canónica de las Smads, dando como resultado un aumento en la diferenciación neuronal debido a una salida prematura del ciclo celular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la estimulación de células progenitoras neurales obtenidas de la corteza cerebral embrionaria con la Activina A y el TGF- β 1, con especial énfasis sobre la proliferación y la diferenciación celular, utilizando a BMP4 como citocina de referencia, por estar sus efectos ampliamente descritos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si los cultivos de CPN son responsivos a la Activina A y/o el TGF- β 1.
- Establecer si la estimulación de CPN con la Activina y/o el TGF- β 1 promueven la activación canónica de las proteínas R-Smad.
- Determinar si la Activina A y/o el TGF- β 1 modifican la tasa de proliferación de las CPN.
- Establecer si la Activina A y/o el TGF- β 1 tienen un efecto neurogénico en los cultivos de CPN.
- Determinar si el efecto mediado por la Activina A y/o el TGF- β 1 es dependiente de la activación de los receptores tipo I de ambas proteínas.

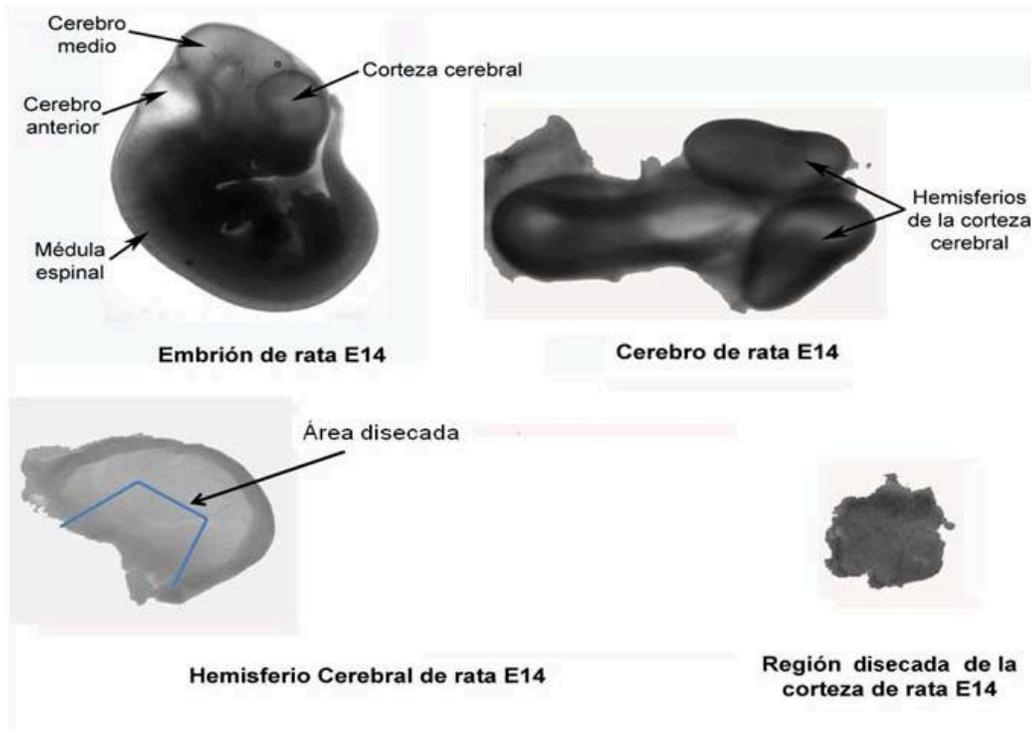
MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de cultivos primarios

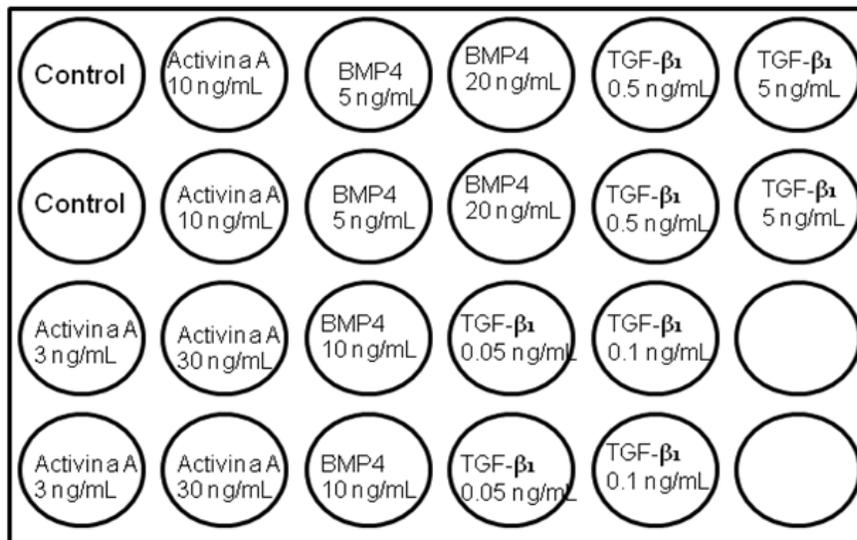
Para estos cultivos se utilizaron ratas hembras gestantes de 14 días, las cuales fueron sacrificadas por decapitación para obtener a los embriones. Los embriones se colocaron en solución de Krebs fría (NaCl 100 mM, KCl 2 mM, KH_2PO_4 0.6 mM, NaHCO_3 12 mM, Glucosa 7 mM, Rojo fenol al 0.1%, Albúmina sérica bovina al 0.3% y MgSO_4 al 0.3%, pH = 7.4) y con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ 1500) se disecó la región media de la corteza en cada hemisferio cerebral de cada embrión (Esquema I). El tejido cortical obtenido fue centrifugado 5 minutos a 1 000 r.p.m. El sobrenadante obtenido fue descartado y la pastilla resuspendida en 1 ml de medio N2 (DMEM/F12 1:1, suplementado con 25 $\mu\text{g/L}$ of insulina humana, Selenito de sodio 30 nM, Putrescina 100 μM , Progesterona 20 nM y 100 mg/l de apotransferrina) para disociarlo mecánicamente con una pipeta de 1 000 μl . La suspensión celular fue recuperada y se volvió a centrifugar para obtener una pastilla que se resuspendió nuevamente en medio N2. Las células viables fueron determinadas por exclusión con la ayuda del colorante azul tripano y contadas en una cámara de Neubauer. De 1 - 1.4 millones de células fueron sembradas en cajas de cultivo de 10 cm de diámetro, previamente tratadas con 15 $\mu\text{g/ml}$ de poli-ornitina (PLO) y 1 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina (Fn) con medio N2 y 10 ng/mL de FGF2. Estos cultivos, denominados en pasaje cero (P0), fueron incubados a 37°C con 5% de CO_2 para su expansión, con una adición diaria de 10 ng/ml de FGF2 y cambiando el medio cada 2 días, hasta alcanzar una confluencia de 70 a 80%.

Una vez que los cultivos de P0 llegaron a la confluencia deseada, las células fueron despegadas y resembradas en cajas de cultivo de 10 cm de diámetro (tratadas previamente con PLO y Fn) en medio N2 y con 10 ng/ml de FGF2 a una densidad de 850 mil células. El mantenimiento de estas células, en P1, se realizó de la misma manera que los cultivos en P0, es decir, adicionando FGF2 diariamente y cambiando el medio cada 2 días. Se dejó que estas células alcanzaran una confluencia del 60 - 80% y las células se despegaron y se pasaron a cajas de 24 pozos, previamente tratadas con PLO y Fn. En estos pozos se sembraron 10 000 células con 400-500 μl de medio N2 y 10 ng/ml de FGF2 y se procedió a dar los tratamientos como se indica en el esquema II.

Las células fueron mantenidas con medio N2 y 10 ng/mL de FGF2 a 37°C con 5% de CO_2 . Los cambios de medio se hacen cada dos días, mientras que el FGF2 se adiciona diariamente. La diferenciación de las células fue promovida al remover el FGF2 y manteniendo a las células durante 6 días en medio N2 con 200 μM de ácido ascórbico en la presencia o ausencia de las citocinas. La adición de Activina A, TGF- β 1 y BMP4 se hizo cada dos días con cada cambio de medio (ver esquema). SB431542 a 5 μM fue usado como inhibidor de la cinasa de los receptores tipo I de TGF- β (Alk4, Alk5 y Alk7); y como inhibidor selectivo de la vía de Activina, se usó a Folistatina a 20 ng/ml. Ambos compuestos se adicionaron a las células una hora antes del tratamiento con las citocinas respectivas durante cada cambio de medio.

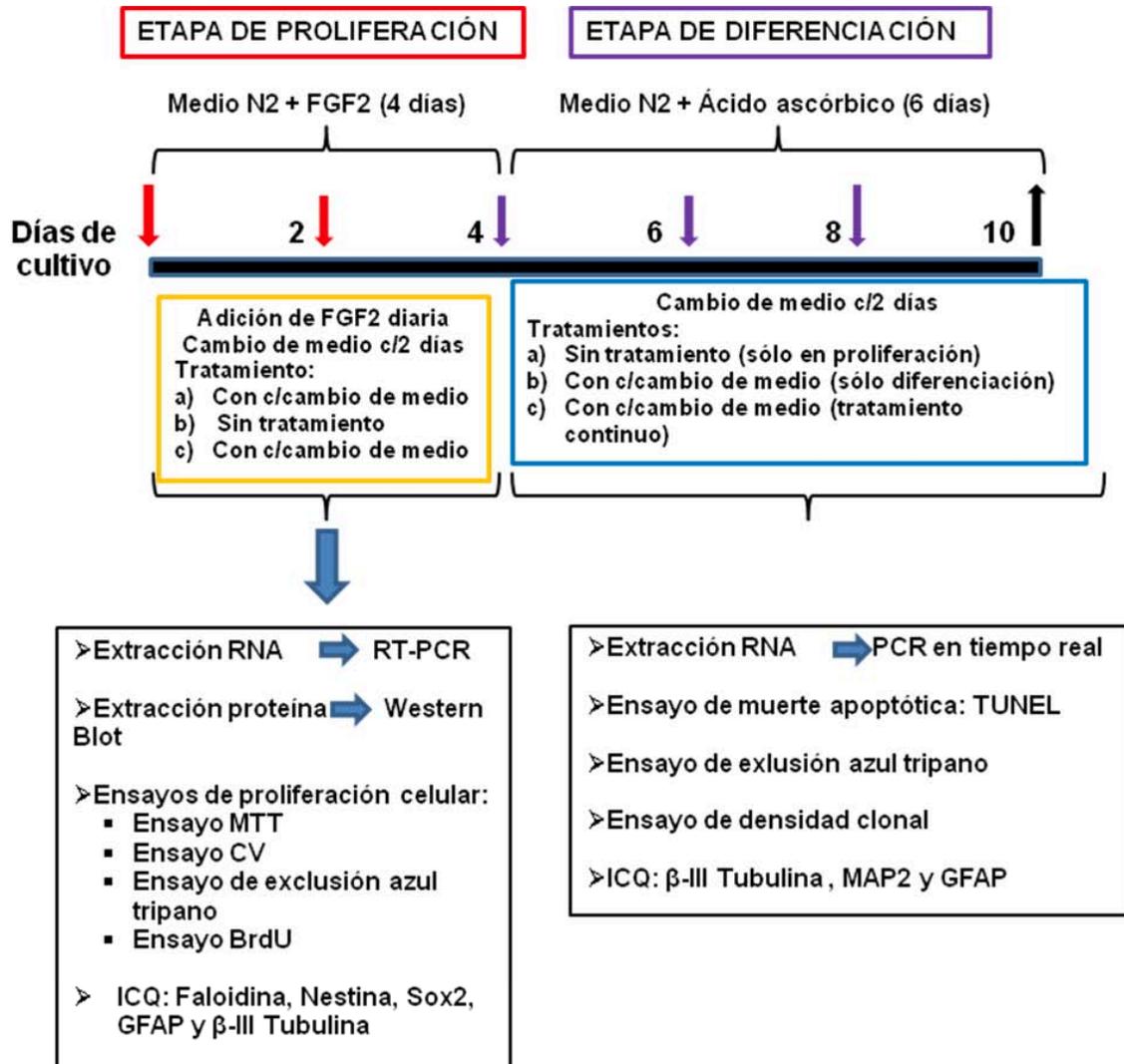


Esquema I. Disección de CPN de la corteza cerebral de embriones de ratas de 14 días de gestación. Los embriones son obtenidos de hembras con 14 días de gestación, de los cuales se extrajo el cerebro para obtener los hemisferios cerebrales. Los rectángulos muestran la región diseccionada de cada hemisferio cerebral que fue utilizada para la obtención de los cultivos primarios de células precursoras neurales.



Esquema II. Esquema que muestra los tratamientos que recibieron las CPN en pasaje 2 una vez que fueron sembradas en las cajas multipozos. Los tratamientos fueron dados cada tercer día y en todos los experimentos cada condición se realizó por duplicado.

Para los experimentos se manejaron tres condiciones: Proliferación, Diferenciación y Diferenciación con tratamientos, las cuales se describen en el siguiente esquema.



Esquema III. Representación esquemática de los períodos de tratamiento con las proteínas y las técnicas que se realizaron a las CPN en cada una de las condiciones de estudio.

2. Inmunoprecipitación de extractos celulares y Western Blott

Las células, al día 4 de proliferación, se estimularon durante 15, 30, 45 ó 60 minutos con la citocina respectiva. Terminado el tiempo de la estimulación se hicieron tres lavados a las células. Las células se lisaron con buffer de lisis (Buffer TNTE: Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, y EDTA 5 mM conteniendo 0.5% de Triton X-100) conteniendo inhibidores de fosfatasa y proteasas. Las cajas se rasparon para despegar a las células, y el líquido resultante se recuperó en tubos eppendorf, a los cuales se les dio una incubación de 15 minutos a 4°C. Después de la incubación, los tubos se centrifugaron 15 minutos a 13 800 r.p.m. y el sobrenadante se transfirió a tubos limpios. La proteína resultante se cuantificó por el método de Bradford. 1 mg de proteína total fue inmunoprecipitada con 200 μ g/mL de anticuerpo Smad 2/3 durante toda la noche a 4°C, esta incubación fue seguida por otra incubación de 2 horas a 4°C con 50 μ L de proteína G-sefarosa.

Terminada la incubación se centrifugaron los tubos a 14 000 r.p.m. durante 10 segundos y se realizaron tres lavados con buffer Tris-NaCl. La pastilla resultante fue resuspendida en solución de Laemmli, y desnaturalizada al someterla a ebullición durante 3-5 minutos. Las muestras de las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 8%, sometidas a 120-150 Volts durante 1 – 1.2 horas. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y bloqueado con una solución de leche al 5% en TBS-Tween 20 durante 2 horas. Se realizaron tres lavados de la membrana y se incubó a 4°C toda la noche con el anticuerpo fosforilado Smad2 (pSmad2, Ser465/467), pSmad3 (Ser423/425) a una dilución de 1:1000, o Smad 2/3 (1:100). Al día siguiente las membranas fueron lavadas e incubadas durante 1 hora con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rabano (1:10 000). Bandas inmunoreactivas fueron detectadas usando un método quimioluminiscente y revelado en placas fotográficas. El anticuerpo Smad 2/3 fue utilizado como un control de carga.

3. Extracción de RNA y RT-PCR

El RNA total de las células mantenidas en 4 días de proliferación o en condiciones de diferenciación fue obtenido usando TRIZOL. Para la extracción de RNA, las células fueron sembradas en cajas de cultivo de 6 pozos con 3×10^5 células en cada pozo. 500 ng de RNA total fue tratado con DNAsa I para eliminar la presencia de ADN contaminante y retro-transcrito a ADN complementario (ADNc) con oligodT. El ADNc fue utilizado como sustrato para PCR de punto final.

Para la PCR de los receptores tipo I y tipo II de la Activina y del TGF- β 1, 500 ng del ADNc obtenido de la retro-transcripción de las células mantenidas en proliferación fue usado en la reacción de PCR conteniendo 2 U de Taq polimerasa de ADN, 20 pmol de los oligos específicos (ver Tabla 1 para descripción de secuencias), 500 μ M de deoxi-nucleosidos trifosfatos y 1-2 mM de MgCl₂ (ver tabla 1). Para todos los oligos se uso: desnaturalización a 95°C por 15 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación durante 1 min (con temperaturas variables dependiendo del oligo, ver tabla 1), y elongación a 72°C por 1 min. La extensión final se realizó a 74°C por 10 min seguida de un enfriamiento rápido de 4°C. Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y el tamaño de los productos de reacción fue determinado por comparación con el peso molecular del marcador de peso molecular después de tinción con bromuro de etidio. Reacciones con RNA sin retro transcribir fueron usadas como control negativo, y no se detectó amplificación.

4. PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR para β -III Tubulina, MAP2 and GFAP se hicieron usando 2.5 U de Taq Polimerasa recombinante, 0.4 mM de cada oligonucleotido y de dNTPs, y 1.5 mM de MgCl₂ diluido en el buffer recomendado por el fabricante (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, and pH 8.4) y 5 μ M de Syto 9 (ver tabla 1 para condiciones de amplificación y secuencia de los oligos). El análisis cuantitativo de la amplificación de ADNc se realizó utilizando el sistema Rotor gene 600. Se hicieron las curvas de fusión para cada reacción para confirmar que sólo se amplificó un producto. La enzima Gliceraldehído 3-fosfato

deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizada como un control de normalización debido a que su expresión fue constante en todas las condiciones del estudio. El valor reportado es el producto de la normalización con respecto a la condición control.

Tabla 1. Información de los oligos utilizados para la PCR y PCR en tiempo real.

Nombre del gen	Temperatura de alineación	Concentración de MgCl ₂	Secuencia del oligo sentido	Secuencia del oligo anti sentido	Tamaño del fragmento
Alk1	57°C	1 mM	GGGCAAGAGACAAG ATCAGC	GCGTTAGGAAGCA TTTGGAG	503
Alk2	57°C	1.5 mM	GTTGGCCTTATCAT CCTCCTC	ATTCGTGCTCTGG GAATGCAT	729
Alk3	60°C	2 mM	GATCAGGGAGAAAC CACGTTA	AGCTAACTTGAGT AGGGCTCT	730
Alk4	57°C	1.5 mM	CACGCACTGCTGCT ATATTGA	CGACCTTTTCGATT TCCTCAA	1062
Alk5	52°C	1.5 mM	AAGAACAATTGCAA GGACCATT	CTATGGGCAATAG CTGGTTTTTC	420
Alk6	60°C	2 mM	ATGCTCTTACGACG CTCTGGA	AGGTCGGGCTTCT TTGTCTTTT	473
ActRII	60°C	2 mM	AAGTTGGCGTTTCGC CGTCTTT	CACAGGTCCACAT CAACACTG	776
ActRIIB	60°C	2 mM	ACTCGGGAGTGCAT CTACTAC	CAGCTCGTTCCAC GTGATGA	789
BMPRII	60°C	2 mM	AGAGGATGGCTGAA CTCATGA	CAAATTTTAGCCG GGGTTCTT	825
TbRII	62°C	1 mM	ACGGCGTTTTCATGC TAAGGGCAACC	CCCTCGGGGTCG TGGTCCCAGCACT	607
PCR en tiempo real					
β-III Tubulina	60°C	1.5 mM	TGCAGGCAGTCACA ATTCTC	GGCCTTTGGACAC CTATTCA	199
GAPDH	60°C	1.5 mM	GGATGGAATTGTGA GGGAGA	GTGGACCTCATGG CCTACAT	157
GFAP	60°C	1.5 mM	GCACACCTCACATC ACATCC	GAAGAAAACCGCA TCACCAT	190
MAP2	60°C	1.5 mM	TGGGCAAGGGATTT CTACAG	CAAAGAGAAGGTG GCAAAGC	156

5. Inmunocitoquímicas

Las células se lavaron dos veces con PBS 1X para eliminar cualquier residuo de medio de cultivo, y las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno, con una solución de 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés bovine serum albumin) en PBS 1X, y fueron bloqueadas durante 45 minutos con una solución conteniendo 0.3% de tritón X-100 y 10% de suero normal de cabra. A continuación se hicieron tres lavados y se incubó a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos

primarios en solución de bloqueo sin tritón: anticuerpo policlonal de conejo anti- β -III Tubulina (1:2000); anticuerpo policlonal de conejo anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP;1:2000); anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2; 1:500); anticuerpo monoclonal de ratón anti-Nestina (1:100), anticuerpo monoclonal anti-O4 (1:400); anticuerpo policlonal de cabra Smad 2/3 (1:100). Alexa-Fluor 488 anti-conejo IgG, Alexa 568 anti-ratón IgG, Alexa-Fluor 488 anti-ratón IgG, Alexa-Fluor 488 anti-cabra y Alexa 568 anti-conejo IgG fueron utilizados como anticuerpos secundarios diluidos 1:1000 en PBS 1X y suero normal de cabra al 10%, incubados por 1 – 2 horas a temperatura ambiente. Los núcleos se identificaron mediante tinción con 1 ng/ml de Hoechst 33258. Las inmunotinciones se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse TE2000-U) y fotografiadas con una cámara digital (DMX1200 F). En paralelo se realizaron controles negativos a los cuales no se les agregó el anticuerpo primario, estos controles no presentaron tinción inespecífica debida a los anticuerpos secundarios.

6. Tinción con Faloidina y determinación del área celular

El citoesqueleto de actina de células precursoras neurales fue estudiado mediante el empleo del anticuerpo contra faloidina. Las células se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con Formol al 10% en PBS, pH = 7.4; se permeabilizaron y se bloquearon por 30 minutos con 0.1% de Triton X-100 y 10% de suero normal de cabra en PBS 1X. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 30 minutos con Faloidina acoplada a Alexa Fluor 488 diluido en PBS de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los núcleos fueron teñidos con 1 ng/ml de Hoechst 33258. Las fotos fueron tomadas como se describió en la sección anterior. El área celular fue determinada de fotos tomadas con una cámara digital Nikon usando el software de acceso libre Image Tool 3.0 UTHSCSA. Las medidas del área celular fueron hechas al determinar el área celular en las células teñidas con Faloidina en al menos 10 campos tomados al azar, por duplicado de 3 experimentos independientes.

7. Ensayo de viabilidad por la técnica de Cristal Violeta

El número total de células viables fue determinado usando el ensayo de cristal violeta, en el cual la densidad óptica es correlacionada con la cantidad de células viables. Las células fueron fijadas con Formol al 10% en PBS 1X, pH 7.4, lavadas e incubadas con solución de cristal violeta al 0.5% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de rigurosos lavados con agua bi-destilada, se agregó ácido acético al 33% para eluir el colorante. La densidad óptica del líquido eluido fue determinada usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados son expresados como porcentajes en relación a la condición control [45].

8. Ensayo de muerte celular por la técnica de MTT

Este ensayo fue usado para determinar la viabilidad celular en las células proliferando o las células diferenciadas siguiendo el protocolo descrito por Mosmann [51]: al día 4 de proliferación o 6 de diferenciación, las células fueron incubadas con 500 ng/ml de bromuro de tetrazolio, azul tiazol (MTTT) durante 3 horas. El precipitado formado por la reducción de MTT fue solubilizado con isopropanol acidificado y la absorbancia fue medida a 570 nm usando un espectrofotómetro. Las mediciones obtenidas son expresadas como porcentaje en relación a la condición control.

9. Ensayo de exclusión de azul tripano

El azul tripano es un colorante polar que no puede incorporarse dentro de las células viables, penetrando exclusivamente las células que tienen la membrana celular dañada, haciéndolo un colorante específico para células no viables. De esta manera, se utilizó este ensayo para determinar el número de células viables en condiciones de proliferación o de diferenciación. Las células al día 4 de proliferación o al día 6 de diferenciación fueron despegadas de las placas de cultivo mediante incubación de 10 minutos con 0.05 % de tripsina. La acción de la tripsina fue neutralizada por la incubación con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células fueron centrifugadas a 1 000 r.p.m durante 5 minutos y la pastilla resultante fue re-suspendida en medio N2. La suspensión celular fue mezclada con solución de azul tripano al 4% y el número de células se determinó por conteo en un hematocitómetro. Las células excluyendo el colorante se consideraron como células viables, mientras que las células azules se consideraron células muertas. Las mediciones son expresadas como el porcentaje de células viables en relación a las células muertas.

10. Ensayo de incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU)

Para el análisis de proliferación celular, las células tratadas con FGF2 al tercer día de la proliferación fueron incubadas durante 3 horas con 10 μ M de 5-bromo-2-deoxiuridina, lavadas con medio N2 fresco e incubadas durante 24 horas. Pasado este tiempo las células fueron fijadas durante 20 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS 1X. Después de fijarlas, las células se incubaron durante 30 minutos a 25°C con HCl 1N; para neutralizar el ácido, se dieron tres lavados con buffer de boratos 0.1 M, pH 8.5. Posteriormente, las células fueron bloqueadas por 1 hora en una solución de 0.1% de BSA, 0.3% tritón X-100 y 10% de suero normal de cabra. Después del bloqueo, se dieron tres lavados de cinco minutos cada uno con PBS-BSA 0.1%, y después se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal de rata anti-BrdU (1:100) en solución de bloqueo sin tritón. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario y se dieron tres lavados. Las células se incubaron por 1 – 2 horas a temperatura ambiente y se protegieron de la luz con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG; 1:1000) en solución de bloqueo sin tritón; al finalizar la incubación, se dieron tres lavados. Los núcleos se tiñeron con 1 ng/ml de Hoechst 33258. La inmunotinción fue observada con un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse TE2000-U) y fotografiadas con una cámara digital (DMX1200 F). En paralelo se realizaron controles negativos a los cuales no se les agregó

el anticuerpo primario, estos controles no presentaron tinción inespecífica debida a los anticuerpos secundarios.

11. Ensayo de muerte apoptótica por la técnica de TUNEL

Células precursoras neurales en P2 en condiciones de diferenciación y tratadas con las citocinas fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 40 minutos, seguido de tres lavados con PBS pH=7.4. Para la detección de células apoptóticas, el ensayo de TUNEL (del inglés: Terminal deoxy-transferase-mediated dUTP nick-end labeling) fue usado siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células apoptóticas fueron analizadas usando microscopia de fluorescencia.

12. Análisis clonal

Células precursoras neurales de P2 fueron sembradas a baja densidad (1 000 células en cajas de cultivo de 6 cm), y cuando las células se pegaron a la caja de cultivo (aproximadamente 12 horas después de haberse sembrado), se seleccionaron a las células que estaban aisladas marcándolas con un círculo de 3 mm, impregnado con tinta china, en el fondo de la placa. Las células fueron mantenidas durante 12 días (6 días en condiciones de proliferación y 6 días en condiciones de diferenciación) con el tratamiento con las citocinas cada dos días. Después de la etapa de diferenciación, se analizan los tipos celulares de las clonas mediante dobles inmunotinciones para marcadores neuronales y gliales (β -III Tubulina y GFAP, respectivamente).

13. Cuantificación de inmunocitoquímicas

Las preparaciones fueron observadas al microscopio de fluorescencia con amplificación de 40X y se fotografiaron usando una cámara digital Nikon y utilizando el software ACT-1. Se fotografiaron los canales separados para fluorescencia azul, verde y roja. Las fotografías de los diferentes canales correspondientes al mismo campo fueron empalmadas utilizando el programa Adobe Photoshop 7.0 y se utilizaron al menos 10 campos por condición de tres experimentos independientes para cuantificar el número de células positivas a Nestina, β -III Tubulina, GFAP, Sox2, BrdU, MAP2, SMA y TUNEL presentes en cada una de las condiciones analizadas. En cada uno de los campos se cuantificó el número total de núcleos teñido con Hoechst. Para la cuantificación del total de células por campo se utilizó el programa Image J 1.34s.

14. Análisis estadístico

Todos los datos son presentados como promedio \pm error estándar (E.E.). ANOVA de una vía fue empleado para el análisis estadístico. La prueba Student-Newman-Keuls se utilizó como prueba post-hoc para comparaciones múltiples entre los grupos control y los que fueron tratados con las citocinas. Valores de $p^* < 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos. Las gráficas se generaron empleando el software GraphPad Instat 2.01.

RESULTADOS

I. Cultivos primarios de células cerebrocorticales de embriones de rata en E14 presentan características de CPN.

Las células obtenidas de la corteza embrionaria de ratas pueden mantenerse en cultivo en condiciones de proliferación con FGF2. Cuando las células crecieron en dichas condiciones, expresaron Nestina (Figura 14A y 14B) y no presentaron marcadores de células diferenciadas (neuronas o glía), ni de células musculares (actina de músculo liso, SMA), descartando una contaminación inicial de los cultivos con células diferenciadas (Figura 14A y 14B). Además, cuando el FGF2 no se agregó al medio de cultivo, las CPN se diferenciaron y dieron lugar a los tres tipos celulares del linaje neural: neuronas (positivas para la proteína β -III tubulina), astrocitos (positivos para la proteína ácido fibrilar glíar o GFAP) y oligodendrocitos (positivos para la proteína O4) (Figura 14C y 14D). Aunque la mayoría de las células presentaron inmunopositividad para los marcadores de células troncales/progenitoras neurales, los cultivos se sembraron directamente del tejido obtenido de la disección sin hacer una selección para CTN, los cultivos con heterogéneos, es decir, hay una mezcla de CTN con progenitores neurales, razón por la cual se hará referencia a estas células como células progenitoras neurales (CPN).

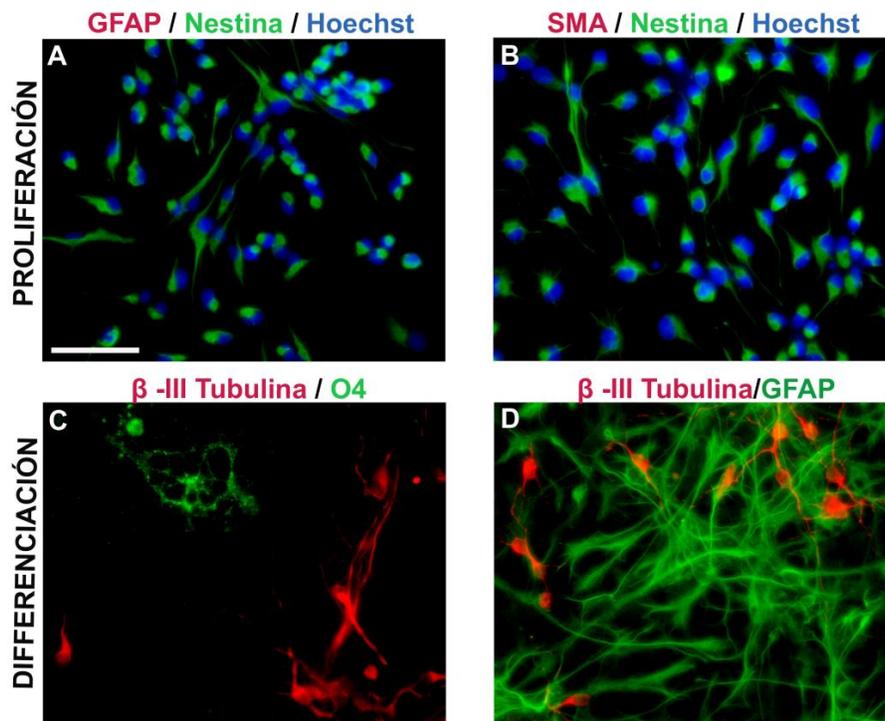


Figura 14. Cultivos primarios de CPN son positivas para marcadores de células troncales/progenitores neurales y presentan multipotencia. A) Inmunocitoquímica de CPN mantenidas en cultivo en la presencia de FGF2 para Nestina/ GFAP o para Nestina/ Actina de músculo liso (SMA). En condiciones proliferativas las células no presentaron inmunopositividad para los marcadores de diferenciación GFAP o SMA. **B)** Cuando el FGF2 se remueve del medio, las células se diferencian y muestran positividad a marcadores de diferenciación: β -III Tubulina para neuronas (**C y D**), O4 para oligodendrocitos (**C**) y GFAP para astrocitos (**D**).

II. Los cultivos de CPN responden al estímulo con la Activina A y/o el TGF- β 1

Para que se den los efectos debidos al estímulo con ambas proteínas, se requiere que las células presenten los receptores tipo I y tipo II. Hay varios reportes en los cuales se ha demostrado la presencia de los receptores de algunos miembros de la familia del TGF- β en cultivos primarios obtenidos de embriones de rata, entre los que se encuentran trabajos sobre la expresión de los receptores para la subfamilia de BMPs. Por ello se inició el estudio identificando la expresión de los receptores tipo I y tipo II de la vía de la Activina A y del TGF- β 1 en los cultivos de CPN. La figura 15A muestra que los cultivos primarios de CPN poseen tanto al receptor tipo I (Alk4) como a los receptores tipo II (ActRII y ActRIIB) de la vía de señalización de la Activina A. Además, se observó la expresión de los receptores tipo I (Alk5) y tipo II (TbRII) de la vía del TGF- β , y de la vía de las BMPs (Alk3 y Alk6, así como BMPRII). Este hallazgo sugiere que las CPN poseen los receptores necesarios para responder al estímulo de la Activina A o del TGF- β 1.

Como se mencionó en la introducción, una vez que el ligando se une con los receptores tipo I y tipo II, se da la activación de las R-Smads (Smad2 y Smad3 para la subfamilia de Activina/TGF- β /Nodal). Las R-Smads fosforiladas se asocian con Smad4 y el complejo se transloca al núcleo, en donde puede modular la transcripción génica. Como la presencia de los receptores en los cultivos celulares no es suficiente prueba de la responsividad de las CPN a las citocinas, analizamos el nivel de fosforilación de Smad2 y Smad3, así como la proporción de acumulación nuclear después de la estimulación con la Activina A o el TGF- β 1. En la figura 15B se presenta el patrón temporal de la fosforilación de Smad2 y Smad3 en respuesta a la adición de la Activina A o del TGF- β 1. Para ambas proteínas, el nivel de fosforilación de Smad2 fue máximo a los 30 minutos después de la estimulación, y decayó completamente 1 hora después del tratamiento (Figura 15B). Igualmente, el nivel máximo de fosforilación de Smad3 se presentó 30 minutos después de dar el tratamiento con la Activina A; sin embargo, en este caso, el nivel de fosforilación permaneció aún después de la hora de haber dado el estímulo (Figura 15B). De manera semejante a los resultados obtenidos del Western Blott, 30 minutos después de estimular a las células con 3 ng/ml de Activina A o 0.5 ng/ml de TGF- β 1 hubo un incremento de 3 veces en el número de células que presentaron acumulación nuclear de Smad 2/3 (Figura 15C y 15D). En conjunto, estos datos sugieren que la adición exógena de la Activina A o del TGF- β 1 a cultivos de CPN es capaz de activar la vía canónica de las Smads y promover su translocación nuclear, sugiriendo que tanto el TGF- β 1 como la Activina A, podrían modificar la proliferación y/o diferenciación de los cultivos de CPN.

III. Efecto de la adición de la Activina A y/o el TGF- β 1 durante la proliferación de las CPN

Debido a que la mayoría de los miembros de la familia del TGF- β se caracterizan por modular de manera negativa la proliferación celular en diferentes tipos celulares [56], nos interesó ver si tanto la Activina A como el TGF- β 1 presentaban efectos anti proliferativos al ser adicionados a los cultivos de CPN mantenidos en proliferación con 10 ng/ml del factor mitogénico FGF2.

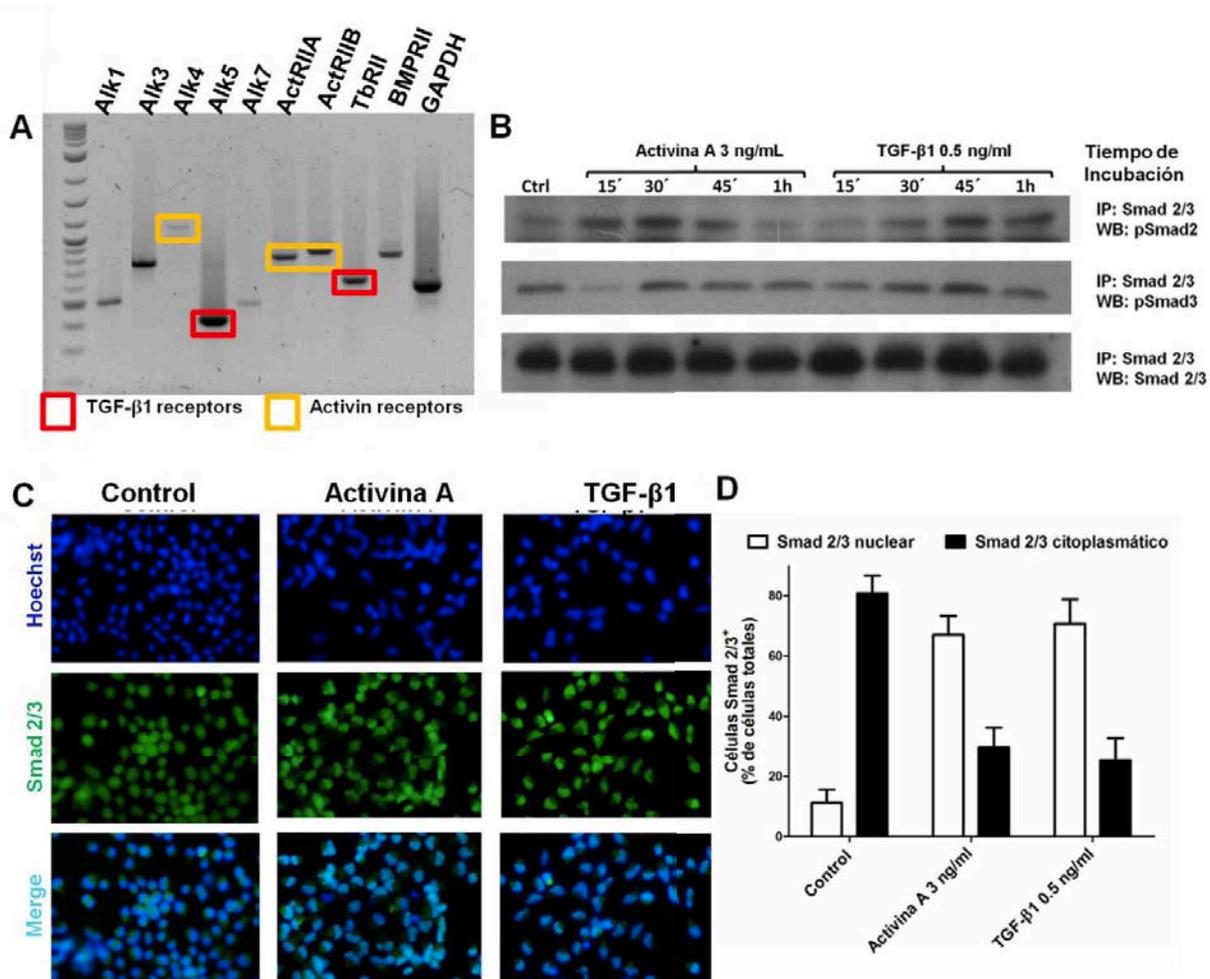


Figura 15. Las células progenitoras neurales son responsivas a la adición de la Activina A y del TGF-β1. Las CPN en pasaje 2 fueron mantenidas en proliferación con FGF2 durante 4 días. **A)** Se extrajo el RNA de los cultivos de CPN en proliferación para detectar la expresión de los receptores tipo I y tipo II de Activina y de TGF-β mediante RT-PCR. **B)** Las CPN se estimularon con 3 ng/ml de Activina o 0.5 ng/ml de TGF-β1 durante los tiempos indicados y se obtuvo la proteína. Western blott (WB) de proteína total inmunoprecipitada (IP) con Smad 2/3 fue empleado para detectar las formas fosforiladas de Smad 2 y de Smad 3 (pSmad2 y pSmad3, respectivamente). **C)** Inmunocitoquímica para Smad 2/3 en células control (no tratadas) y tratadas durante 30 minutos con la Activina A o el TGF-β1. **D)** Cuantificación de la translocación nuclear de Smad 2/3 en respuesta al tratamiento con la Activina A o el TGF-β1. Los valores de la gráfica son presentados como el promedio ± Error estándar (E.S.) del porcentaje de células totales (detectadas por la tinción con Hoechst) que presentaron predominantemente tinción nuclear para Smad 2/3 (marca verde). La barra de la escala corresponde a 50 μm.

En un screening inicial en el que se utilizaron diferentes concentraciones de las citocinas (3, 10 y 30 ng/ml de la Activina A; 0.05, 0.5, 1 y 5 ng/ml del TGF-β1 y 5, 10 y 20 ng/ml del BMP4; ver esquema II de materiales y métodos), se observaron cambios morfológicos que no dependían de la concentración de la citocina, si no de la identidad de la misma. De esta manera, para fines prácticos, en adelante sólo se hará referencia a una concentración de cada citocina, siendo de 3 ng/ml para Activina A, de 0.5 ng/ml para TGF-β y de 5 ng/ml para BMP4.

En presencia del FGF2, las CPN al observarse en microscopia de campo claro normalmente presentan 2 o 3 proyecciones y un soma redondo (Figura 16A). Sin embargo, el tratamiento con la Activina A o con el TGF- β 1 causó una disminución en el tamaño del soma, así como una disminución en el número de proyecciones; BMP4, por el contrario, incrementó el tamaño de las células, además de producir un ensanchamiento de las mismas (Figura 16A). Con el objetivo de realizar un análisis más detallado de los cambios morfológicos obtenidos con las citocinas, se realizaron inmunocitoquímicas para la detección de actina polimerizada a través de la tinción con faloidina acoplada a Alexa 488, combinada con nestina (marcador de células troncales/progenitores neurales). Al realizar la cuantificación del área de las células (ver los materiales y los métodos para más detalle), encontramos que el tratamiento con la Activina A o el TGF- β 1 produjo una compactación del cuerpo celular, lo cual se reflejó en la disminución de casi la mitad en el área celular (Figura 16B-2C), mientras que BMP4 incrementó tanto el número de proyecciones como el área celular (Figura 16B-2C).

Para determinar si los cambios morfológicos observados anteriormente son el resultado de una diferenciación prematura de los cultivos de CPN, se estudió el fenotipo celular mediante la realización de inmunotinciones dobles para Nestina (componente de filamentos intermedios característico de CPN/CTN [133]), Sox2 (factor transcripcional presente en células pluripotentes y multipotentes [134]), β -III Tubulina (marcador de neuronas jóvenes) y GFAP (marcador de astrocitos). La proporción de células positivas a Nestina fue mayor a 95% en los cultivos control, y este porcentaje no cambió debido al tratamiento con las citocinas (Figura 16D y 16E). Consistente con la alta proporción de células expresando nestina, el número de células positivas a Sox2 fue mayor al 90% y tampoco cambió debido a los tratamientos. En cuanto a los marcadores de células diferenciadas, se observó un incremento pequeño, aunque significativo, en el número de neuronas jóvenes debido al tratamiento con la Activina A o con el TGF- β 1 (1.51 ± 0.21 para la Activina A; 2.19 ± 0.26 para el TGF- β 1, y 0.50 ± 0.07 para el control)(Figura 16D y 16F), sin observar células gliales positivas al marcador GFAP. Como el incremento en el número de neuronas fue pequeño, esto no repercutió en la población total de CPN, por lo que la proporción de células no diferenciadas no se vio alterada (Figura 16E).

Existen numerosos reportes de que varios miembros de la familia del TGF- β poseen funciones anti-proliferativas [56, 94, 99], por lo que nos interesó investigar si el tratamiento de las CPN con la Activina A, el TGF- β 1 o el BMP4 afecta la proliferación de los cultivos de las CPN en la presencia del FGF2. Para tal fin, realizamos ensayos de MTT, cristal violeta y azul tripano para determinar el número total de células vivas en los cultivos de CPN debido al tratamiento con las citocinas. Así, el tratamiento con la Activina A, el TGF- β 1 o el BMP4 no produjo cambios en los ensayos de MTT y cristal violeta (Figura 17A y 17B). De

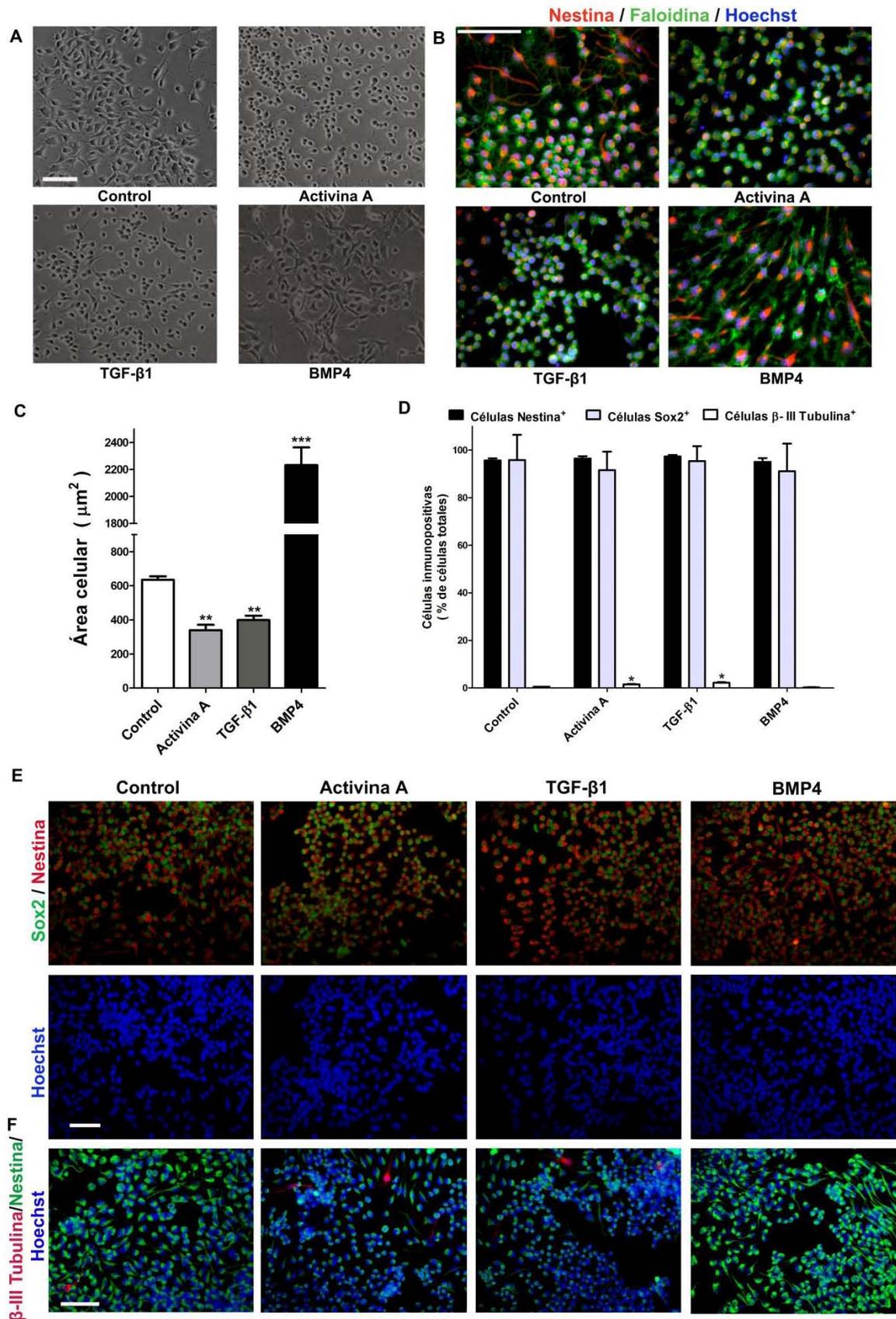


Figura 16. La Activina A, el TGF-β1 y/o la BMP4 afectan la morfología celular e incrementan el número de neuronas durante la proliferación de las CPN. Las células se mantuvieron en medio N2 en la presencia

de 10 ng/ml de FGF2 y de la citocina especificada durante 4 días. **A)** Microfotografías representativas de campo claro de células que fueron tratadas con 3 ng/ml de Activina A, 0.5 ng/ml de TGF- β 1 o 5 ng/ml de BMP4. **B)** Imágenes representativas de CPN teñidas con Faloidina (verde), Nestina (rojo) y Hoechst (azul), mostrando que el tratamiento con la Activina A o con el TGF- β 1 redujo tanto el número de extensiones celulares como el área celular, mientras que BMP4 causó el efecto opuesto. **C)** Cuantificación del área celular de las células teñidas con Faloidina. El tratamiento con la Activina A o con el TGF- β 1 disminuyó a la mitad el área celular de las CPN, en tanto que BMP4 incrementó al triple el área celular. **D)** Cuantificación del porcentaje de células positivas para los marcadores indicados (el porcentaje está dado en relación al número total de núcleos). La adición de la Activina A o del TGF- β 1 provocó un incremento discreto, pero significativo, en los porcentajes de neuronas en relación a la condición control; sin embargo, los incrementos no afectaron el número de células expresando los marcadores de multipotencialidad Nestina y Sox2. **E)** Imágenes representativas de inmunocitoquímicas (ICQ) para Sox2 (verde), Nestina (rojo) y núcleos (azul). El tratamiento con las citocinas no modificó la proporción de células inmunopositivas para dichos marcadores. **F)** Imágenes representativas de ICQ para β -III Tubulina (rojo), Nestina (verde) y núcleos (azul). Tanto la Activina A como el TGF- β 1 inducen un incremento pequeño pero significativo en la proporción de neuronas diferenciadas en la presencia de FGF2, la cuantificación se muestra en **(D)**. Los datos de las gráficas aparecen como promedio \pm E. S., expresados como el porcentaje de células totales teñidas con Hoechst. Se realizó un ANOVA seguido de la prueba post hoc Student-Newman Keuls, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus la condición control. La barra de la escala equivale a 50 μ m.

manera semejante, el número de células viables que excluyeron el colorante azul tripano fue muy parecido en la condición control y en las condiciones que recibieron el tratamiento (Figura 17C). Para probar de manera directa que el tratamiento con estas proteínas no altera la proliferación celular, se incubó a las células durante 3 horas con BrdU, un análogo de la timidina que se integra con el ADN recién sintetizado de las células en proliferación, sirviendo así de marcador para células que se encuentran en la fase S del ciclo celular [135]. Como se esperaba, el tratamiento con la Activina A, el TGF- β 1 o la BMP4 no indujo cambios en la proliferación celular, pues las células se dividieron en la misma proporción que las células control (Figura 17D y 17E). Aunque en células corticales se ha reportado que el TGF- β 1 produce una disminución en el número de células en proliferación [94], en este sistema, el TGF- β 1 fue incapaz de modular la tasa de proliferación celular. La discrepancia en resultados podría deberse a la presencia de FGF2, el cual podría estar reprimiendo los efectos anti proliferativos del TGF- β 1.

IV. Efecto de la Activina A y/o el TGF- β 1 durante la diferenciación de las CPN

Cuando se omite la adición del FGF2 en los cultivos de CPN, las células se diferencian en los tres linajes neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos [33]. Como durante la etapa de proliferación se observó un aumento en el número de células positivas para el marcador de neuronas jóvenes β -III tubulina debido al tratamiento con la Activina A o el TGF- β 1, nos interesó determinar el efecto de las citocinas en ausencia del FGF2. Para esto, se realizaron experimentos en los cuales se dejó diferenciar a estas células durante 6 días, en ausencia de factor mitogénico y en presencia de ácido ascórbico para disminuir la muerte celular; en estos experimentos se emplearon tres condiciones:

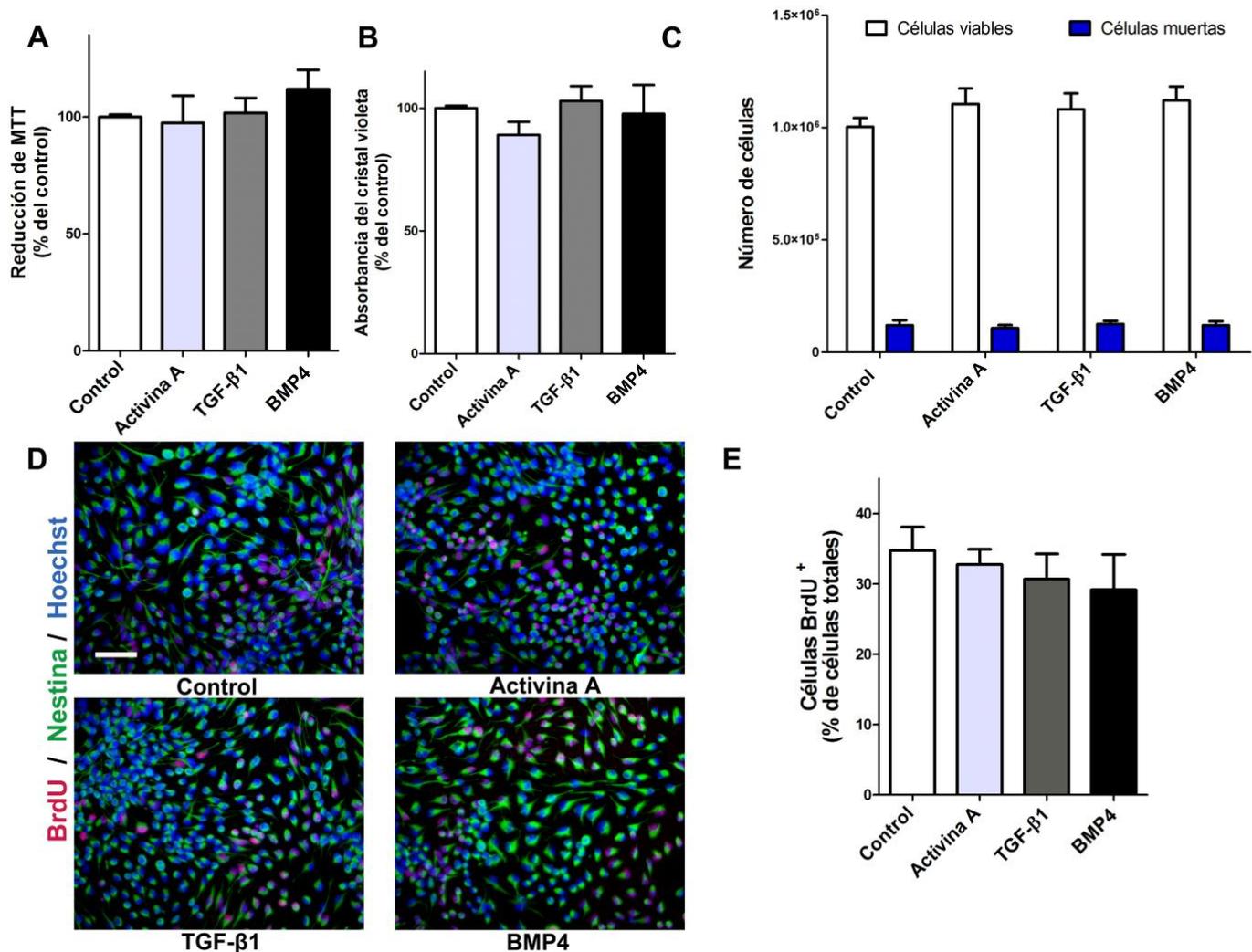


Figura 17. La Activina A, el TGF-β1 o el BMP4 no modificaron el número de células totales en los cultivos ni la proporción de células que incorporaron el BrdU en condiciones de proliferación. Las células se mantuvieron en medio N2 en presencia de FGF2 y de la citocina respectiva durante 4 días. En los ensayos de MTT (A) o de cristal violeta (B) las absorbancias resultantes de cada condición experimental es expresada como el porcentaje en relación a la condición control. C) Cuantificación de las células que excluyeron el colorante azul tripano, los datos se presentan como el porcentaje de células que excluyen el colorante (células vivas) en relación a las células totales. D) Imágenes representativas de inmunocitoquímicas para Nestina (verde), BrdU (rojo) y núcleos (azul). E) Cuantificación de núcleos positivos a BrdU. Los resultados son presentados como promedio ± E.S. expresado como porcentaje de células BrdU positivas en relación al número de células totales. La barra de la escala corresponde a 50 μm.

una en la cual las células que se dejaron diferenciar sólo recibieron tratamiento durante la etapa de proliferación, la segunda en la cual las células sólo recibieron el tratamiento durante la etapa de diferenciación y, una tercera en la que las células recibieron el tratamiento durante todo el experimento; esto con la finalidad de determinar si se requiere la presencia continua de la Activina A o del TGF-β1 o sólo durante una ventana de tiempo específica (ver esquema III de materiales y métodos para una mejor descripción de estas condiciones).

Cuando Activina A y/o TGF- β 1 se agregaron sólo durante la fase de proliferación, y las células se dejaron diferenciar seis días, no se observaron cambios en la proporción de neuronas o de astrocitos debidos a los tratamientos con la Activina A o el TGF- β 1 (Figura 18A); de la misma manera, cuando estas citocinas se agregaron sólo en la etapa de diferenciación, tampoco se observó cambio alguno (Figura 18B). Sin embargo, cuando la Activina A y/o el TGF- β 1 fueron agregados de manera continua a los cultivos de CPN, el número de neuronas (positivas para los marcadores β -III tubulina o para la proteína asociada a microtúbulos, MAP2) incrementó al doble, y este incremento en la proporción neuronal no afectó la proporción de células gliales positivas para GFAP (Figura 18C y 18D). Cabe mencionar que el incremento en la diferenciación neuronal debido al tratamiento por el TGF- β 1 ha sido reportado tanto en células progenitoras de corteza y de hipocampo como de meséncéfalo ventral [98, 99], mientras que para el caso de la Activina A, es la primera ocasión en la que se describen dichos efectos.

De manera similar a los resultados obtenidos de la cuantificación de las inmunocitoquímicas, la Activina A produjo una inducción considerable en la expresión de β -III tubulina y MAP2 estimada por RT-PCR cuantitativo de cultivos tratados continuamente con la Activina A; dichos incrementos fueron de 2 veces para la expresión del RNAm para β -III tubulina y 2.5 veces para la expresión de MAP2, mientras que la expresión de GFAP no cambió (Figura 18E). Sin embargo, y contrario a lo que se esperaba, el tratamiento con TGF- β 1 no modificó los niveles de expresión de los genes anteriormente mencionados (Figura 18E). En cuanto al tratamiento con BMP4, éste incrementó al doble los niveles de RNAm de GFAP y disminuyó a la mitad los niveles de expresión de β -III tubulina y MAP2 (Figura 18E).

BMP4, por otro lado, disminuyó considerablemente el número de neuronas, mientras que incrementó al doble el número de células gliales al ser agregado sólo durante la fase de proliferación o sólo durante la fase de diferenciación. Cuando fue agregado de manera continua, hubo un efecto dosis dependiente de BMP4, en el que a concentraciones menores (5 ng/ml) incrementó el número de células gliales, mientras que a concentraciones mayores (20 ng/ml) causó incrementos progresivos en la proporción de células positivas a actina de músculo liso (SMA), a expensas de la población glial (Figura 19A y 19B). Dicho efecto de BMP4 ha sido previamente reportado en cultivos corticales, aunque en dicho estudio los efectos de BMP4 estuvieron dados por la densidad celular en lugar de la concentración: el tratamiento de BMP4 en cultivos de baja densidad produjo células SMA positivas, mientras que el tratamiento a cultivos de alta densidad promovió la diferenciación a células gliales, mediados por la activación diferencial de las vías Smad y Stat, respectivamente [132]. Cabe señalar que los tratamientos con Activina A o TGF- β 1 no indujeron la expresión de SMA en ninguna condición (datos no mostrados).

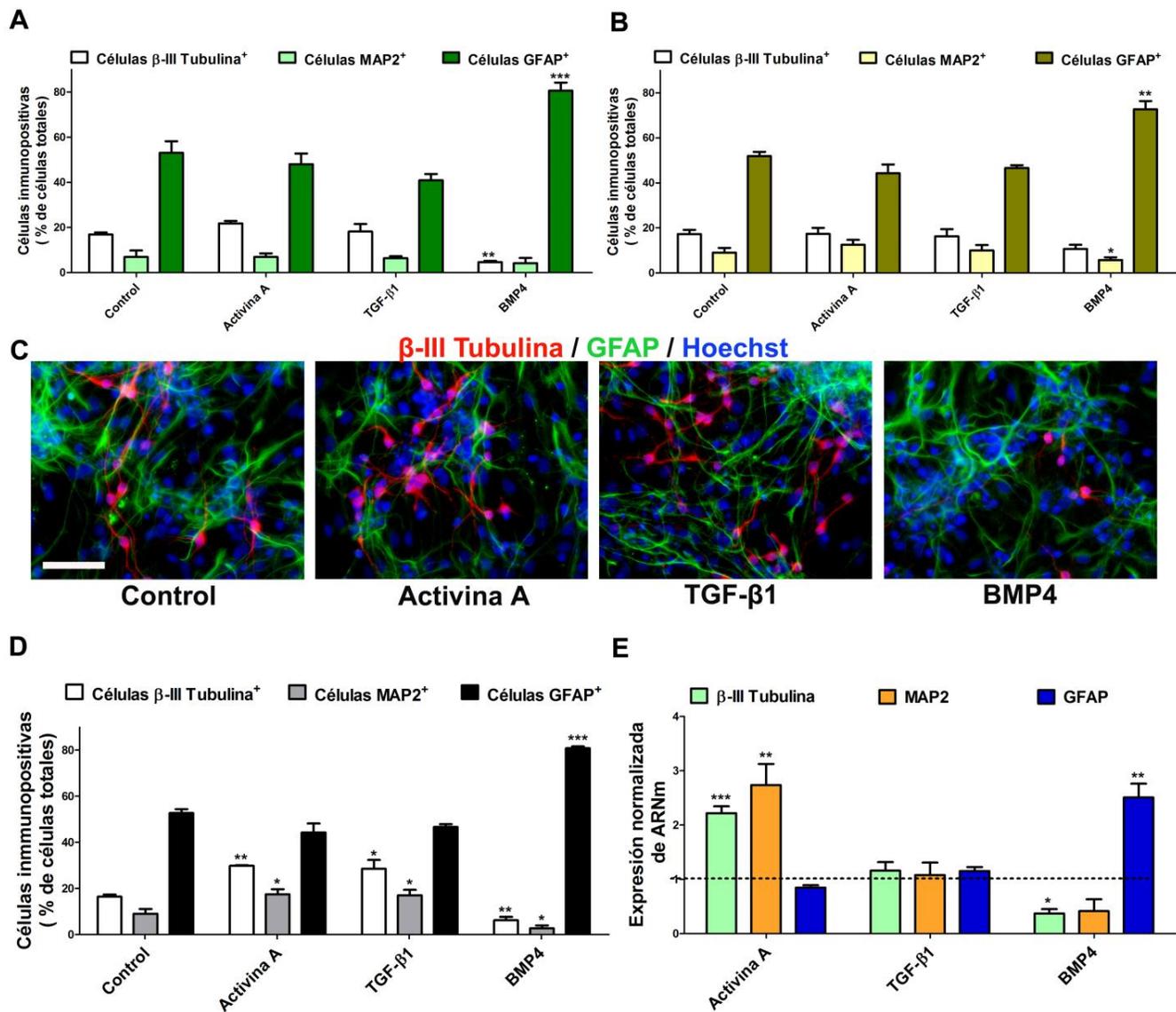


Figura 18. El tratamiento continuo con Activina y/o TGF-β1 a CPN incrementó la diferenciación neuronal en condiciones de diferenciación. Los cultivos de CPN fueron mantenidos en medio N2 durante 10 días (4 días en proliferación en presencia de FGF2 y 6 días en diferenciación). **A-B)** Cuantificación del porcentaje de células positivas para los marcadores neuronales (β-III Tubulina y MAP2) y astrocíticos (GFAP) relativo al número total de células. El tratamiento con Activina A o TGF-β1 sólo durante la etapa de proliferación (**A**) o sólo en la etapa de diferenciación (**B**) no incrementó el número de neuronas, mientras que BMP4 significativamente disminuyó el número de neuronas en ambas condiciones. **C)** Imágenes representativas de inmunocitoquímicas para β-III Tubulina (rojo) o GFAP (verde) y detección nuclear con Hoechst (azul), a los 10 días de cultivo que recibieron tratamiento continuo de las citocinas. **D)** Cuantificación del porcentaje de neuronas y de astrocitos que recibieron tratamiento continuo con la Activina A, el TGF-β1 o BMP4. No se encontraron células que co-expresaran β-III Tubulina y GFAP. **E)** RT-PCR cuantitativo de células tratadas continuamente con las citocinas. Los valores se normalizaron por el nivel de expresión del gen constitutivo GAPDH, asignando un valor de 1 a la condición control. La Activina A incrementó al doble el nivel de expresión de los marcadores neuronales; mientras que BMP4 incrementó al doble el nivel de expresión de GFAP con una reducción concomitante en los niveles de los genes neuronales. Los resultados son presentados como promedio ± E.S. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 y ****p* < 0.001 versus la condición que no recibió tratamiento. La barra de escala equivale a 50 μm.

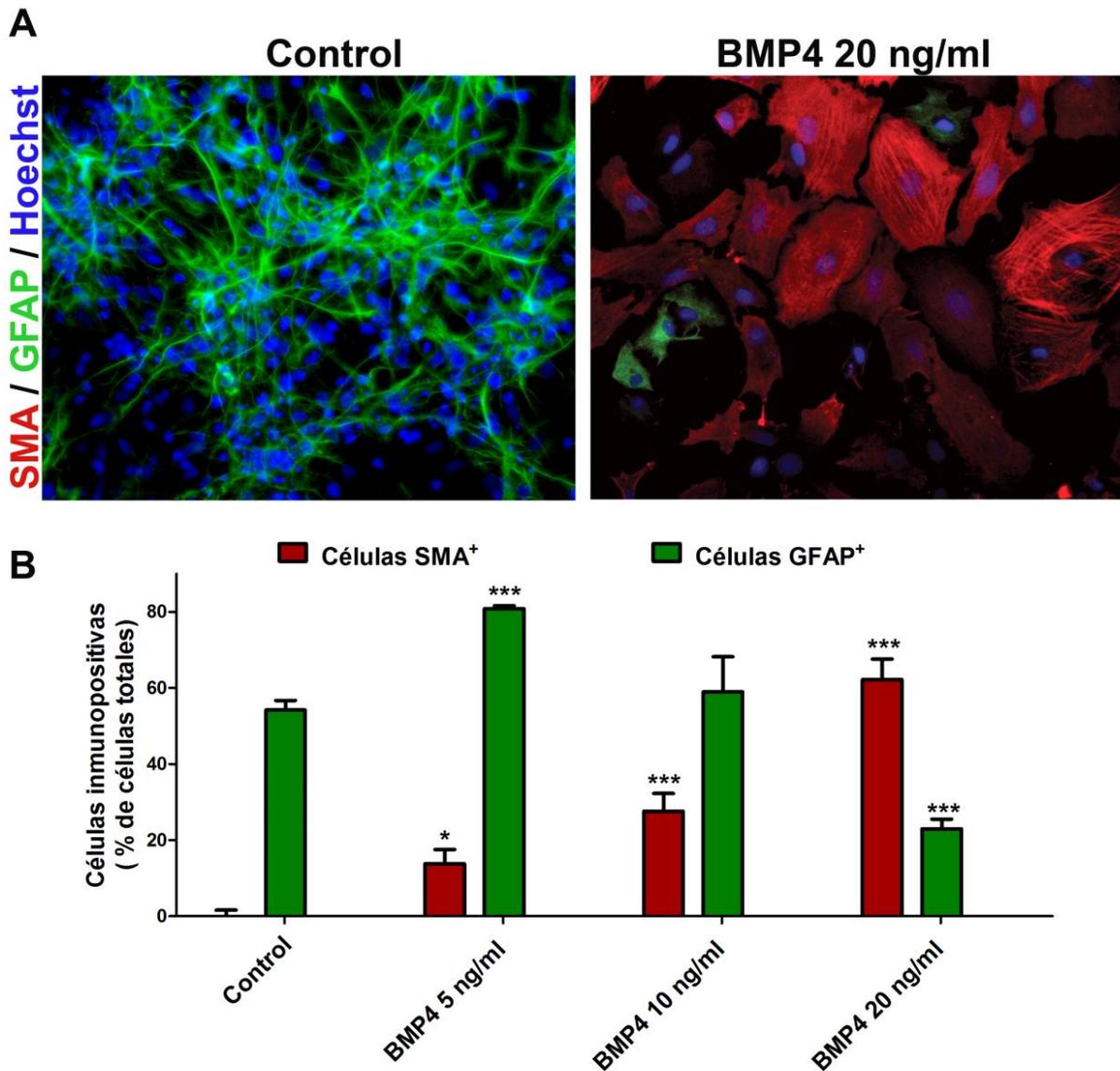


Figura 19. El tratamiento continuo con BMP4 tiene efectos dosis dependientes en la diferenciación celular de las CPN. Las células fueron mantenidas en cultivo por 10 días y recibieron tratamiento continuo con concentraciones ascendentes de BMP4. **A)** Imágenes representativas de inmunocitoquímicas para GFAP (verde), actina de músculo liso (SMA, rojo) y Hoechst (azul), mostrando el efecto de 20 ng/ml de BMP4 sobre el porcentaje de células positivas para GFAP y SMA. A esta concentración, BMP4 indujo una alta proporción de células positivas a SMA. **B)** Cuantificación del porcentaje de astrocitos y de células de músculo liso en relación al número total de células. Los resultados se presentan como promedio \pm E.S. La prueba post-hoc Student-Newman-Keuls fue empleada después del análisis ANOVA de una vía. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ versus la condición control. La barra de la escala representa 50 μ m.

V. La muerte celular o la salida del ciclo celular no son responsables de los incrementos en la diferenciación neuronal

El incremento en la población neuronal debido al tratamiento con la Activina o el TGF- β 1 puede ser el resultado de los siguientes fenómenos:

- 1) Incremento en la sobrevivencia celular
- 2) Promoción de la salida del ciclo celular

Mecanismo neurogénico

Para probar la primera hipótesis, analizamos la muerte celular apoptótica de los cultivos tratados continuamente con las citocinas (10 días de tratamiento continuo: 4 días en condiciones de proliferación y 6 días en condiciones de diferenciación) mediante el ensayo de TUNEL. Como puede observarse en la Figura 20A, ninguna de los tratamientos cambió el número de células apoptóticas. Así mismo, la proporción de células viables que excluyeron el colorante azul tripano o el número total de núcleos no cambiaron por el tratamiento con las proteínas de estudio (Figura 20B y 20C, respectivamente). Estos datos indican que el incremento en la diferenciación neuronal debido al tratamiento por la Activina A y el TGF- β 1 no es debido a una reducción en la muerte celular. Aunque se ha reportado que la Activina A promueve la sobrevivencia en varios tipos celulares [117, 120, 136, 137], en cultivos de CPN el tratamiento con esta citocina no fue capaz de causar una disminución en la sobrevivencia de las células. Coincidente con el papel de BMP4 en dirigir el compromiso de las células [132], no se obtuvieron cambios en la sobrevivencia de las células debido al tratamiento con este factor.

Una vez que se demostró que la sobrevivencia celular no participa en el incremento neuronal causado por la Activina A o el TGF- β 1, se analizó la segunda hipótesis. Para probar esto, los cultivos de CPN se dejaron diferenciar durante más días (10, 12 y 14 días: 4 días en etapa de proliferación y 6, 8 ó 10 días en etapa de diferenciación, respectivamente). En la condición control, las células que no recibieron tratamiento incrementaron el número de neuronas en los días sucesivos de cultivo (Figura 20D y 20E). Las células tratadas con la Activina A presentaron incrementos en la población neuronal en todos los tiempos analizados (Figura 20C-20E), aunque sin alterar significativamente la proporción de células gliales. Por el contrario, el TGF- β 1 sólo produce incrementos en la proporción neuronal al día 10 de diferenciación sin tener efecto en la población glial (Figura 20D-20F), lo cual está acorde con trabajos en los que se ha reportado que esta proteína promueve la salida del ciclo celular en células corticales [56, 94, 98, 138]. La diferenciación de células gliales y disminución de neuronas debido al tratamiento por 5 ng/ml de BMP4 se presentó en todos los tiempos analizados. De manera consistente, ninguno de los tratamientos con las citocinas alteró el número de núcleos (Figura 20G). Esto sugiere que mientras la Activina A incrementa la diferenciación neuronal al inducir el fenotipo neuronal, el TGF- β 1 produce este incremento al promover la salida del ciclo celular, por lo que el número de neuronas es máximo en días tempranos, pero en días posteriores ya no hay diferenciación neuronal porque ya se extinguió el reservorio de progenitores neuronales.

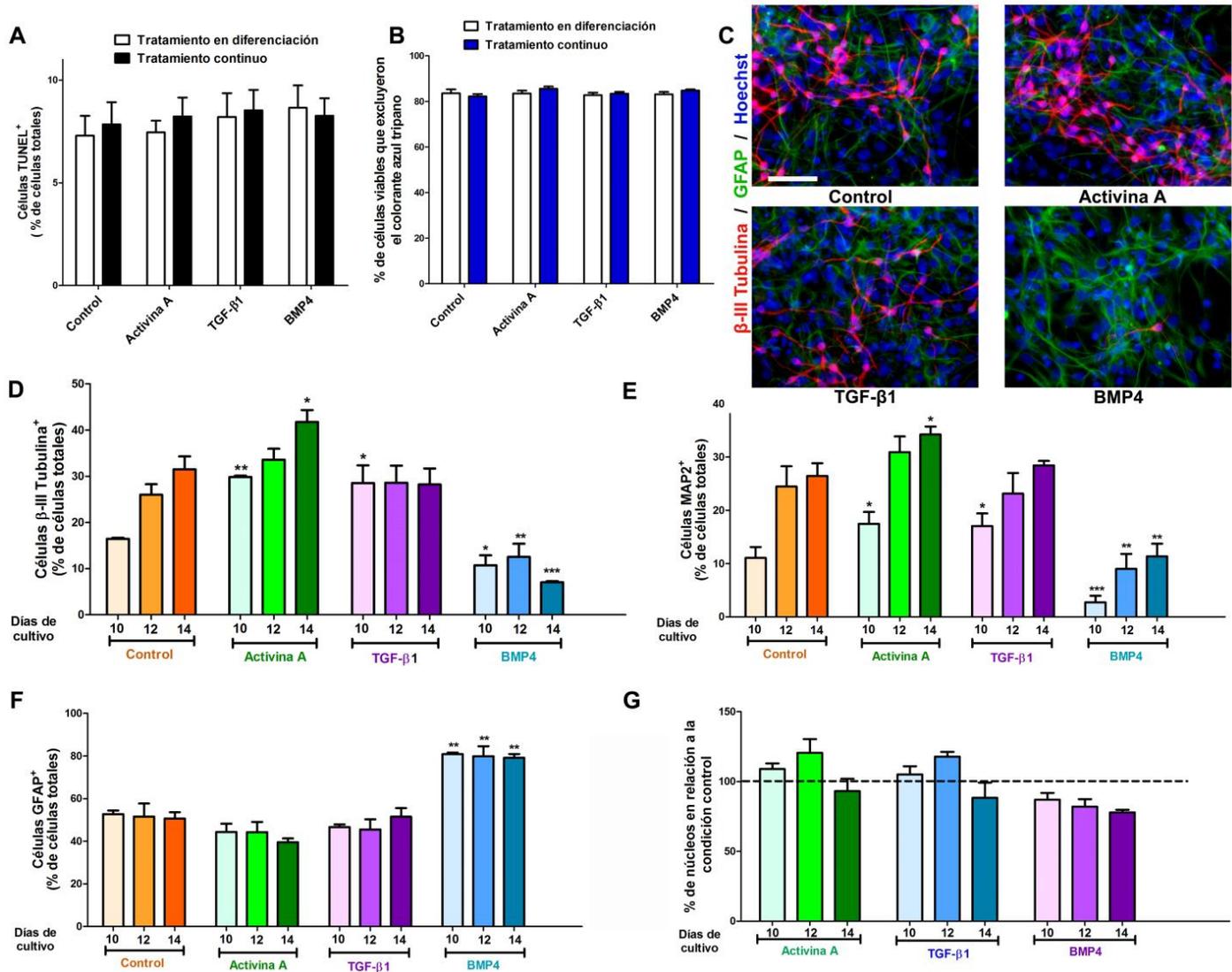


Figura 20. El tratamiento continuo con la Activina, el TGF-β1 o el BMP4 no modifica los niveles de muerte celular ni promueve la salida del ciclo celular. **A)** Las células mantenidas durante 10 días en cultivo (4 días en proliferación y 6 días en diferenciación) fueron tratadas sólo durante la fase de proliferación o durante ambas fases (tratamiento continuo). El tratamiento no afectó el número de células que fueron positivas para el marcador apoptótico TUNEL. **B)** Cuantificación del número de células viable a través del ensayo de exclusión de azul tripano en las mismas condiciones que en el ensayo de la muerte apoptótica, sin encontrarse cambios en el número de células viables debido al tratamiento. Las CPN que se trataron de manera continua se diferenciaron por 6, 8 o 10 días (10, 12 y 14 días en cultivo). **C)** Imágenes representativas de inmunocitoquímicas para β-III Tubulina y GFAP. El efecto positivo de la Activina A sobre la diferenciación neuronal prevaleció a los 14 días de cultivo, en tanto que el efecto del TGF-β1 ya no fue observable. BMP4, por su parte, redujo la diferenciación neuronal e incrementó la diferenciación glial en todos los tiempos analizados. **D-F)** Cuantificación del número de células positivas para β-III Tubulina, MAP2 o GFAP en los tiempos indicados. El número de neuronas (**D & E**) incrementó en la condición control durante los días 10-14, pero la proporción de astrocitos se mantuvo constante (**F**). **G)** Cuantificación del número de núcleos teñidos con Hoechst a los días indicados. No se encontraron cambios en el número de núcleos debidos al tratamiento con las citocinas. Los resultados se presentan como promedio ± E.S. La prueba post-hoc Student-Newman-Keuls fue utilizada después del análisis ANOVA de una vía. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ versus la condición control. La barra de escala representa 50 μm .

VI. La Activina A incrementa el número de neuronas en ensayos de densidad clonal

Para probar el efecto neurogénico de Activina A al nivel de células sencillas, se diseñaron experimentos de densidad clonal para determinar si el tratamiento con la Activina A puede modificar la proporción de neuronas diferenciadas. Para este ensayo se sembraron células a baja densidad y las células que estaban lo suficientemente aisladas se marcaron con un objetivo impregnado con tinta china, para identificar la identidad de las células a las que da origen esta célula (clona). Después de 14 días en cultivo (6 días en condiciones de proliferación y 8 días en condiciones de diferenciación) se observó que en la condición control, las células neuronales se agruparon en el centro de la colonia, mientras que las células gliales se encontraron predominantemente en la periferia (Figura 21A y 21A'), de manera semejante a los resultados obtenidos en los cultivos a baja densidad, la proporción de neuronas fue menor que la de astrocitos. El tratamiento con la Activina A, por su parte, incrementó de manera significativa el número de neuronas presentes en cada clona, y a diferencia del control, se observaron células neuronales distribuidas en toda la colonia, aunque con una abundancia mayor en el centro de la colonia (Figura 21B y 21C). Semejante a los ensayos anteriores, los números de células positivas a GFAP no se modificaron por el tratamiento con Activina A (Figura 21C).

VII. La inhibición de los receptores de TGF- β tipo I elimina la diferenciación neuronal en los cultivos de CPN corticales

Como se mencionó anteriormente, los miembros de la familia del TGF- β ejercen sus efectos a través de la unión a receptores con actividad de serina-treonina cinasa y la posterior activación de las proteínas R-Smad, las cuales una vez activadas, interaccionan con la proteína co-Smad para translocarse al núcleo y activar o reprimir genes blanco [53]. Para determinar si los incrementos en la población neuronal mediados por el tratamiento con la Activina A y el TGF- β 1 son por un efecto directo sobre las células, se utilizaron inhibidores farmacológicos para bloquear la señal del receptor tipo I y determinar si el tratamiento conjunto con cada una de las proteínas analizadas puede revertir los incrementos neuronales observados. Los inhibidores empleados fueron: SB431542, el cual es inhibidor del receptor tipo I de TGF- β (Alk5), así como de Alk4 y Alk7 (receptores tipo I de Activina y Nodal, respectivamente), y Folistatina, que es un antagonista de alta afinidad que impide la unión de Activina a sus receptores.

Para estos experimentos se dio el tratamiento conjunto del inhibidor una hora antes de la adición de la Activina A o del TGF- β 1, y estos tratamientos se hicieron de manera continua porque fue en esta condición en la cual se encontraron los incrementos en la población neuronal. Cuando se bloqueó la activación del receptor tipo I de la Activina A mediante el compuesto SB431542, el tratamiento con esta proteína no incrementó la proporción de neuronas, por el contrario la disminuyó (una disminución de tres veces), y esta disminución produjo un número de neuronas incluso menor al obtenido en la condición que no recibió tratamiento alguno. Por otra parte, la población astrocítica

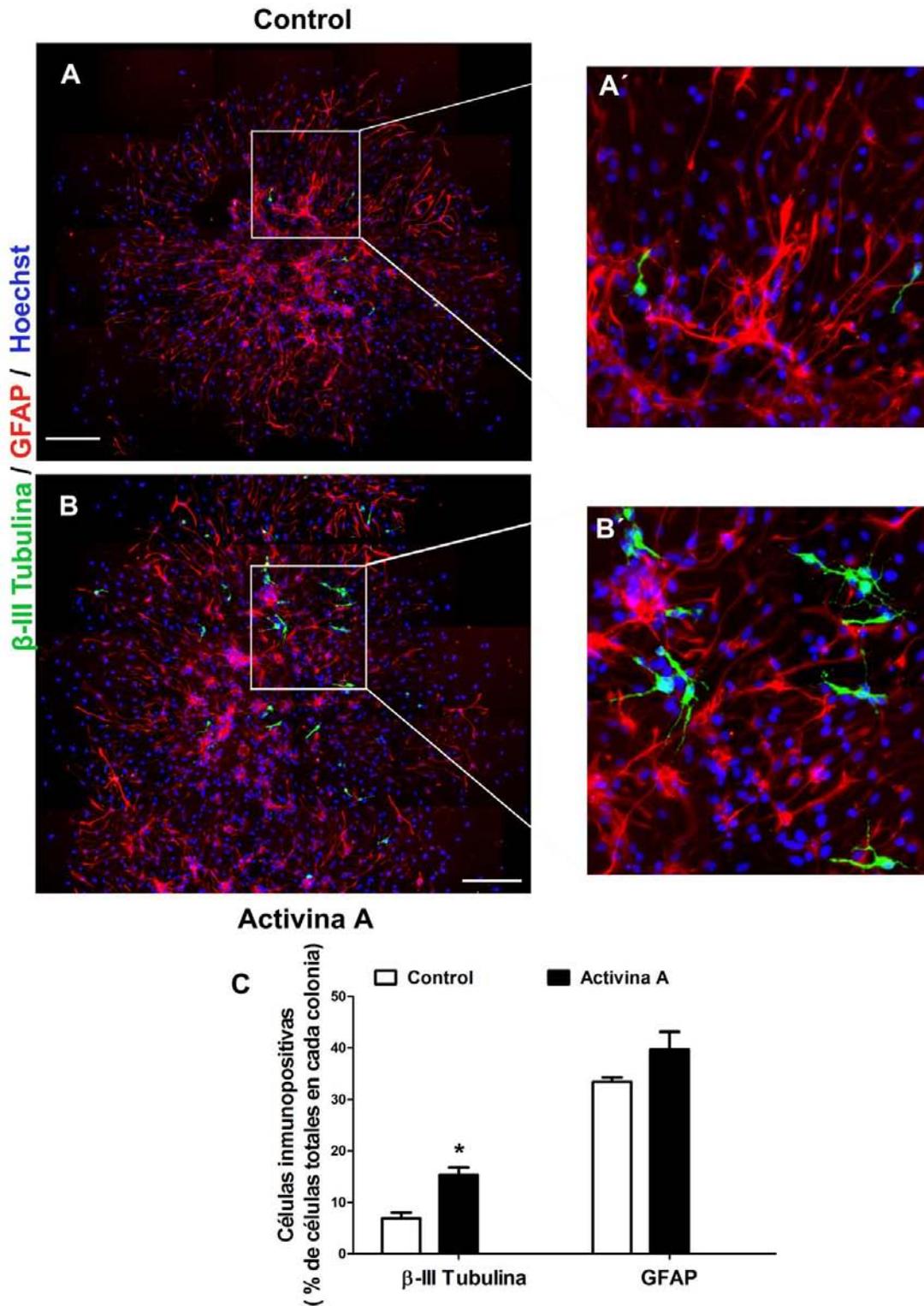


Figura 21. La Activina A incrementa la diferenciación neuronal de CPN en las clonas obtenidas de ensayos de densidad clonal. Las CPN fueron sembradas a baja densidad y las áreas en las que había células aisladas fueron marcadas. Los cultivos se mantuvieron 6 días en la presencia de FGF2 seguido de 8 días de cultivo adicionales. Las células recibieron tratamiento continuo con Activina A y se analizó el número de neuronas y de astrocitos mediante inmunocitoquímica con β -III Tubulina y GFAP. **A)** En la condición control sólo se observaron neuronas en el centro de la colonia, mientras que la Activina A incrementó el número de neuronas diferenciadas, encontrándose éstas tanto en el centro como en la periferia de la colonia

(B). **A'** y **B'** son ampliaciones de la colonia control y de células tratadas con la Activina A, respectivamente. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células neuronales o astrocíticas en las clonas. Los resultados son presentados como promedio \pm E.S. La prueba post-hoc Student-Newman-Keuls fue empleada después del análisis ANOVA de una vía. * $p < 0.05$ versus la condición control. La barra de escala representa 100 μm .

incrementó dos veces en presencia del inhibidor y de la Activina A, a números aún mayores que los obtenidos en la condición control (Figura 22A y 22B). El decremento tan robusto en el número de neuronas sugiere que probablemente las células de los cultivos están produciendo la citocina de forma endógena, y que ésta a su vez participa en la diferenciación neuronal, por lo que al bloquear la señal también se está eliminando la contribución de la citocina endógena. Para determinar si la diferenciación neuronal observada en la condición control es debida a contribución de la citocina endógena, sólo se agregó el inhibidor a los cultivos; en esta condición, el número de neuronas fue mucho menor que el obtenido cuando se dio el tratamiento con la Activina A; de la misma manera, la población astrocítica también se vio incrementada (Figura 22A y 22B). Así mismo, la inhibición de la Activina A con la Folistatina arrojó resultados parecidos a los de SB431542, es decir, un incremento en la población astrocítica y una disminución en la población neuronal, aunque los niveles de cambio fueron ligeramente menores a los obtenidos con SB431542 (Porcentajes, Figura 22A y 22B).

En cuanto al bloqueo de la activación del receptor tipo I mediada por el TGF- β 1, se obtuvieron resultados similares al tratamiento conjunto del inhibidor con la Activina A: disminución de la población neuronal e incremento de la población astrocítica, en relación con el control y con el tratamiento solamente con la citocina (Figura 22A y 22B).

Como los resultados obtenidos al inhibir la activación de los receptores tipo I eran parecidos a los resultados obtenidos por el tratamiento con BMP4, pudiera ser que cuando la señal de Activina/TGF- β o incluso Nodal se bloquea, BMP4 o una molécula similar, promueve la diferenciación glial. Para probar esta hipótesis, se inhibieron de manera simultánea las vías de BMP y de TGF- β mediante la co-incubación de los inhibidores farmacológicos Dorsomorfina y SB431542, respectivamente. Los inhibidores fueron agregados al medio de cultivo una hora antes de la adición de las citocinas. La adición conjunta de Activina A, Dorsomorfina y SB431542 no produjo alteración de la población neuronal o glial, pues los porcentajes de ambos tipos celulares fueron muy parecidos a la condición control (Figura 22A y 22B). Dorsomorfina por sí sola no modificó de manera significativa la diferenciación neuronal o astrocítica, aunque sí se observó un ligero incremento en el número de neuronas (Figura 22B).

Los resultados de las inmunocitoquímicas fueron complementados por análisis de PCR cuantitativo. La adición de Folistatina o SB431542, en la presencia o ausencia de la Activina o del TGF- β 1, redujo el nivel de expresión de los RNAm para β -III tubulina y MAP2, a niveles inferiores que la condición control, e incrementó los transcritos de GFAP (Figura 22C). Semejante a lo obtenido en las inmunocitoquímicas, los efectos de SB431542 disminuyendo los transcritos neuronales e incrementando los gliales fue revertido por la incubación con Dorsomorfina (Figura 22C).

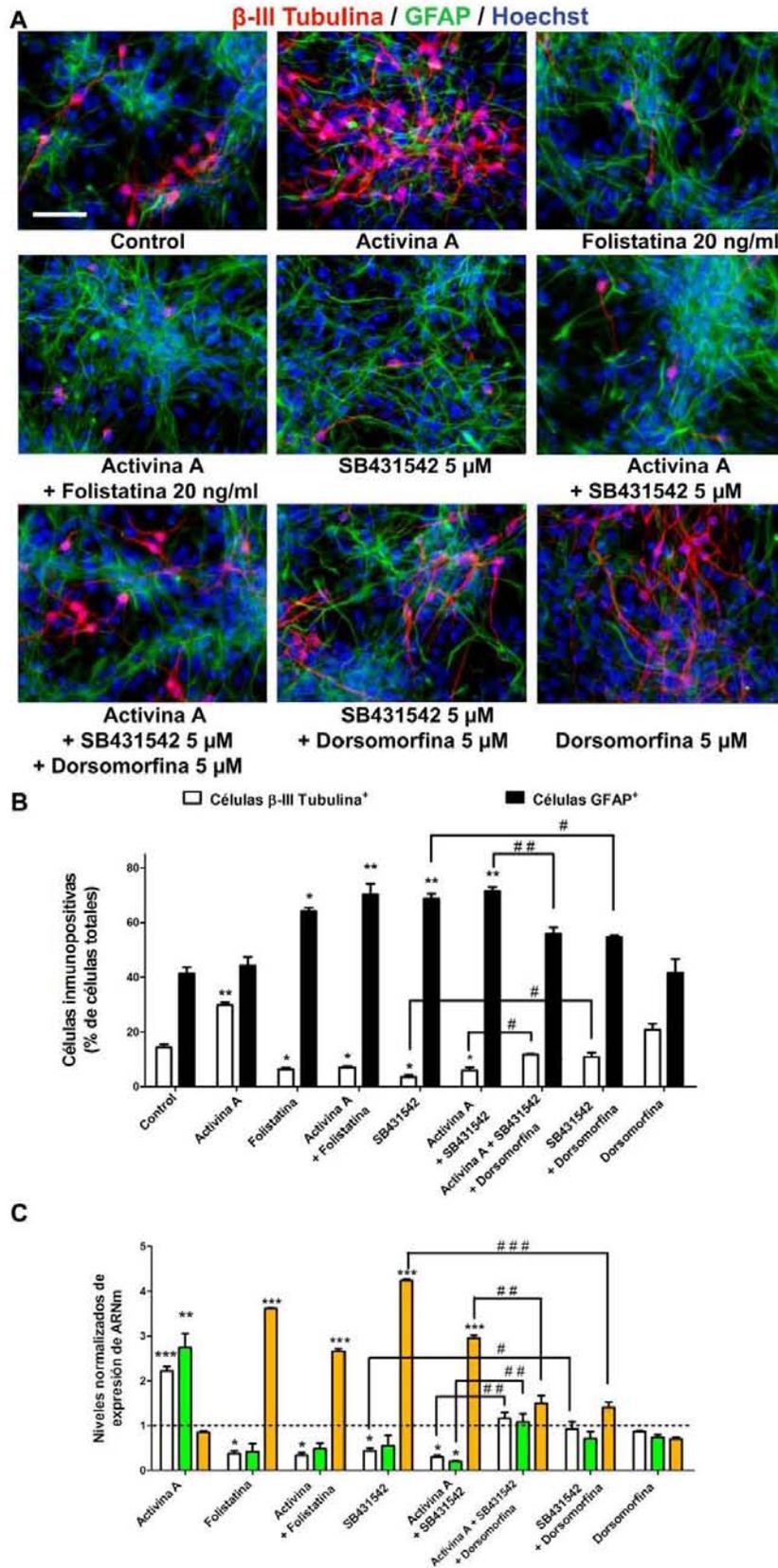


Figura 22. El bloqueo de la activación de los receptores tipo I de TGF- β elimina el incremento en la diferenciación neuronal debido al tratamiento con la Activina A o el TGF- β 1. Las células fueron cultivadas durante 10 días y la adición de las citocinas y de los inhibidores se realizó cada tercer día con el

cambio de medio. 5 μ M de SB431542 (inhibidor de Alk4, Alk5 y Alk7), 20 ng/ml de Folistatina (inhibidor de Activina) o 5 μ M de Dorsomorfina (antagonista de BMP's) fueron agregados a los cultivos 1 hora previa al tratamiento con la citocina. **A)** Imágenes representativas que muestran el efecto antagónico de SB431542 o de Folistatina sobre la diferenciación neuronal. Al tratar las CPN con los inhibidores de la vía de TGF- β y de BMP (SB431542 y Dorsomorfina, respectivamente) se revirtieron los efectos de SB431542. **B)** Cuantificación del número de células β -III Tubulina o GFAP positivas para el tratamiento con los inhibidores. El tratamiento conjunto de la Activina con los inhibidores incrementó la diferenciación astrocítica, pero al adicionar el inhibidor de BMP, Dorsomorfina, la proporción de neuronas fue similar a la condición control y el número de astrocitos no fue tan grande como la condición que sólo recibió SB431542. **C)** RT-PCR cuantitativa de células tratadas con la Activina A o el TGF- β y los inhibidores. Los valores fueron normalizados por el nivel de expresión de GAPDH y representados en relación a la condición control, a la cual se le asignó el valor de 1. El tratamiento conjunto de la Activina A con el SB431542 o con Folistatina disminuyó a la mitad la expresión del RNAm de marcadores neuronales e incrementó la expresión del RNAm para GFAP. El nivel de transcritos debido al tratamiento combinado de Dorsomorfina y SB431542 fue indistinguible de la condición control. Los resultados son presentados como promedio \pm E.S. La prueba post-hoc Student-Newman-Keuls fue empleada después del análisis ANOVA de una vía. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 versus condición control. # p < 0.05, ## p < 0.01, y ### p < 0.001 versus las condiciones indicadas. La barra de escala representa 50 μ m.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran por primera vez que la Activina A promueve la diferenciación de las CPN corticales hacia un fenotipo neuronal. El efecto de la Activina A es neurogénico, ya que la diferenciación neuronal se conserva en las CPN cultivadas por períodos de tiempo prolongados; además, el efecto de la Activina A estuvo presente en experimentos clonales, reforzando la noción del papel neurogénico de esta citocina. Por otro lado, el TGF- β 1 produce incrementos en la diferenciación neuronal al promover la salida del ciclo celular, ya que al extender el tiempo de cultivo de las CPN, la adición del TGF- β 1 no incrementó la diferenciación neuronal. A diferencia de la Activina A, los efectos del TGF- β 1 en células troncales/precursoras ya se han reportado con anterioridad tanto en células de la corteza como del hipocampo y del mesencéfalo ventral [98, 99]. La activación de los receptores tipo I es esencial para que se presente el incremento en la diferenciación neuronal debido al tratamiento con la Activina A o el TGF- β 1, pues su eliminación disminuye casi por completo la diferenciación neuronal, promoviendo la diferenciación de las células hacia un fenotipo predominantemente glial, indicando que, en condiciones normales, la activación de los receptores Alk4 y Alk5 es muy importante para que las CPN adquieran el fenotipo neuronal. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que en la ausencia de la activación de Smad2 y/o Smad3, la activación de la señal de BMP participa en la disminución de la población neuronal y promueve la diferenciación glial.

Los cambios morfológicos observados en las CPN debidos al tratamiento con la Activina A o el TGF- β 1 se correlacionaron con la posterior diferenciación a neuronas. Concorde a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se ha reportado que el TGF- β 1 produce una reducción en el cuerpo celular de cultivos primarios de las CPN obtenidas del hipocampo y de la corteza de embriones de ratón [98]; los cambios morfológicos (reducción en el número de proyecciones y en el tamaño de las células) no modificaron la expresión de Nestina (fenómeno que también se observó en el presente trabajo), y además, cuando las células se diferenciaron, la población neuronal se vio aumentada en comparación con las células que no recibieron tratamiento [98]. BMP4, por otro lado, produjo un ensanchamiento de las células, incrementó el número de proyecciones y el tamaño de las células. Coincidente con nuestros hallazgos, recientemente se reportó que BMP4 produjo ensanchamiento de las CPN corticales, el cual se asoció con latencia [139]; sin embargo, en este trabajo el cambio morfológico no tuvo que ver con latencia ya que no se observaron disminuciones en la tasa de proliferación de las CPN tratadas con BMP4; los cambios en la morfología tuvieron que ver más bien con incrementos en la población astrocítica. Cambios semejantes (retracción en el área celular que promueve la neurogénesis e incremento de la superficie celular que promueve la diferenciación hacia células de músculo liso), se han reportado para células troncales de la cresta neural, aunque no se han cuantificado de manera sistemática [130, 140].

Aunque la Activina A, el TGF- β 1 y BMP4 producen cambios morfológicos de los cultivos de CPN en la etapa de proliferación, esto no genera una diferenciación masiva de dichas células durante la fase de proliferación, lo cual podría deberse a que el efecto

mitogénico de FGF2 es tan fuerte, que el efecto de las citocinas está siendo atenuado por FGF2. En sustento a esta hipótesis, hay reportes en los cuales se ha demostrado que la vía de las MAPK (el efector intracelular del FGF2) es un regulador negativo de la señal de los miembros de la familia del TGF- β , ya que estas cinasas pueden fosforilar la región linker de las R-Smads, lo cual es una señal que promueve la degradación mediada por el proteosoma de dichas Smads [141]. Para probar si el FGF2 realmente está produciendo un efecto antagónico sería interesante determinar el nivel de fosforilación de en la región linker de las R-Smads.

Dentro de las funciones mejores descritas de la Activina A se encuentra su papel neuroprotector tanto *in vitro* (en cultivos neuronales y en células de neuroblastoma) [117, 142] como *in vivo* [121, 137]; sin embargo, en los cultivos de CPN corticales la adición de la Activina A no produjo ningún efecto en la sobrevivencia neuronal o celular pues tanto el número de células totales como el número de células en apoptosis no cambió en respuesta al tratamiento. Incluso cuando se analizó la muerte apoptótica en días tempranos de diferenciación (día 2, 3 o 4 de diferenciación), no se observó un efecto sobre la sobrevivencia celular. Así, el incremento en la diferenciación neuronal en las CPN causado por la Activina A no es debido a un efecto neuroprotector si no más bien a un papel neurogénico. De acuerdo con esto, tanto en células de neuroblastoma de la línea SK-N-SH como en precursores neurales derivados de células troncales embrionarias humanas y de ratón, la Activina A induce la diferenciación neuronal [116, 117]. De manera similar a la Activina A, el TGF- β 1 no tuvo ningún efecto sobre la sobrevivencia celular de las CPN, pues éste no alteró ninguno de los ensayos de muerte celular.

En los últimos años se han reportado varios trabajos en los cuales se describe al TGF- β 1 como una proteína que regula de manera negativa la proliferación celular en las CPN de varias regiones cerebrales (corteza, hipocampo, mesencéfalo ventral y cerebelo [94, 96, 98, 99]). Recapitulando lo reportado por otros grupos, nosotros encontramos que en las CPN cerebrocorticales, el TGF- β 1 incrementa el número de neuronas al promover la salida del ciclo celular de las CPN, ya que en los cultivos en los cuales el proceso de diferenciación fue más largo no presentaron incremento en la diferenciación neuronal, y tampoco se observó incrementos en el nivel de los transcritos para genes neuronales. Además, en etapas tempranas de la etapa de diferenciación (día 2 y 3 de diferenciación) el tratamiento con el TGF- β 1 disminuyó el número de células que incorporaron el BrdU (datos no mostrados), soportando el efecto antiproliferativo de esta proteína. Para que se presente el efecto antiproliferativo del TGF- β 1 es necesaria la ausencia del FGF2, ya que cuando éste se encuentra en el medio de cultivo, no hay cambios en la tasa de proliferación de las CPN. Sin embargo, aún queda por establecer si el efecto del TGF- β 1 es específico para los progenitores neurales, ya que la población astrocítica no se vio afectada en ninguna de las condiciones estudiadas.

Las proteínas BMP y CNTF son factores gliogénicos que ejercen un papel instructivo sobre las CTPN; de acuerdo con esta acción, la presencia de estas proteínas sólo durante la fase de proliferación es suficiente para que se dé el compromiso celular y se produzca la diferenciación glial [48, 128, 139]. Siguiendo esta línea de pensamiento,

resulta poco probable que la Activina A pueda tener un efecto instructivo sobre las CPN, pues para que se presente el incremento en la diferenciación neuronal se requiere la presencia continua de la Activina A, es decir, tanto en la etapa de proliferación como en la etapa de diferenciación; además, si la proteína se adiciona por períodos cortos (4 días de proliferación y 1-4 días de diferenciación), el incremento en la población neuronal no se observa (datos no mostrados), y conforme se incrementan los días de exposición el número de neuronas incrementa de manera directa en relación con el tiempo de exposición (datos no mostrados), sugiriendo que su presencia continua es necesaria para promover el fenotipo neuronal. Posiblemente la Activina A ejerza su efecto neurogénico al final de la división celular de las CPN, por esta razón se requiere la presencia continua de la Activina A en los cultivos, pues como las células no están sincronizadas, algunas de ellas se diferencian en días avanzados de cultivo, prueba de ello es que en la fase de diferenciación algunas células todavía se encuentran proliferando y son positivas a BrdU (datos no mostrados), además cuando las células se dejan diferenciar por más tiempo (8 y 10 días de diferenciación) aún se observan incrementos tanto en el número de las células gliales como de las neuronales. Así mismo, en los ensayos de densidad clonal, el tratamiento con la Activina A indujo la aparición de neuronas en la periferia de la colonia, fenómeno que no se presenta en las colonias control, este hecho es de relevancia porque indica que en condiciones control las neuronas sólo se están generando durante las primeras divisiones de la célula y por eso se observan neuronas sólo en el centro de la colonia; la Activina A, al producir neuronas tanto en el centro como en la periferia de la colonia refuerza nuestra hipótesis de que está actuando durante o después de que se da la última división proliferativa de la célula. En los ensayos de densidad clonal sólo se probó el tratamiento continuo con la Activina A, por lo que sería interesante analizar si tratamientos transitorios son capaces de incrementar el número de neuronas en las colonias, sobre todo las neuronas de la periferia encontradas sólo en la condición que recibió el tratamiento con la Activina A.

La superfamilia del TGF- β está dividida en dos grupos: el grupo de BMP/GDF y el grupo de TGF- β /Activina. El primer grupo ha sido relacionado con funciones predominantemente gliogénicas (BMP2/4 inhiben la diferenciación neuronal y estimulan la formación de astrocitos [129, 131, 132, 143, 144]), mientras que el segundo grupo se ha relacionado con funciones neurogénicas debido a que: a) el TGF- β 1 promueve la aparición de neuronas al inhibir la proliferación de cultivos de progenitores obtenidos de la corteza y del hipocampo [94, 98], b) la eliminación del TGF- β 2 y del TGF- β 3 en ratones produce un incremento en la proliferación de células progenitoras y una disminución de la neurogénesis del telencéfalo y mesencéfalo [98, 145], y c) el tratamiento con TGF- β 1 en CTN del mesencéfalo ventral induce la diferenciación neuronal prematura al promover la expresión del inhibidor del ciclo celular p27^{kip1} [99]. Semejante a lo reportado en la literatura, nosotros mostramos que mientras BMP4 regula positivamente la diferenciación de CPN hacia células gliales, TGF- β 1 y Activina tienen efectos positivos en la diferenciación neuronal. El que hayamos reproducido lo que se ha reportado con anterioridad cobra relevancia porque los experimentos presentados en este trabajo se

hicieron en cultivos primarios, por lo que podemos asegurar que los resultados que estamos reportando no son debidas a particularidades del sistema, si no que son confiables y reproducibles.

Los incrementos en la diferenciación neuronal debidos al tratamiento con la Activina A o el TGF- β 1 no repercuten en la población glial, sugiriendo que el efecto de ambas citocinas podría ser específico sobre progenitores neuronales o neuroblastos. Este efecto específico sobre el fenotipo neuronal ha sido reportado previamente en cultivos de hipocampo y de corteza tratados con TGF- β 1 [98], en este estudio el incremento de la población neuronal fue mediada por la inducción de la proteína Nedd9 en progenitores neuronales [98]. En este sentido, sería interesante determinar si en las CPN corticales la especificidad de la función está dada por la presencia de los receptores de manera exclusiva en progenitores neuronales, o si la especificidad es mediada por componentes intracelulares presentes solamente en los progenitores neuronales, sobre todo porque las neuronas representan menos del 40% de la población de los cultivos diferenciados.

La activación de los receptores tipo I (Alk4, Alk5 e inclusive Alk7) es esencial para que se presente la diferenciación neuronal en respuesta al estímulo con la Activina A o el TGF- β 1. Así, el bloqueo farmacológico de los receptores tipo I disminuyo drásticamente la diferenciación neuronal, tanto a nivel de proteína como de transcritos neuronales (β -III Tubulina y MAP2), mientras que promueve la diferenciación astrocítica. Un dato interesante es que cuando SB431542 o Folistatina se agregaron a las células sin ser estimuladas con las citocinas, también se produce una disminución neuronal que es menor a la condición control, implicando que la señal endógena del grupo de TGF- β /Activina es de suma importancia para la diferenciación neuronal de CPN corticales *in vitro*. En apoyo a esta aseveración, se han detectado transcritos para Activina A, Activina B y TGF- β 1-3 en CPN corticales [98, 139]. El hecho de que la co-incubación de SB431542 con Dorsomorfina, en presencia o ausencia de la Activina A, haya restaurado la diferenciación glial y neuronal a niveles control, nos sugiere una posible competencia entre las dos vías de la familia del TGF- β , la cual podría determinar la diferenciación neurogénica o gliogénica de CPN *in vitro*, pues además de la producción de Activinas y TGF- β s estas células también producen y secretan BMPs en los cultivos de CPN [139]. Recientemente se ha descrito el papel antagónico de BMP sobre la vía de TGF- β en la diferenciación neuronal, así en cultivos de CPN la adición simultánea de TGF- β 1-BMP4 o Activina A-BMP4 produce ligeros incrementos en la diferenciación astrocítica sin afectar la diferenciación neuronal [146], lo cual da soporte a la hipótesis del antagonismo de estas vías en la diferenciación de las CPN. Este antagonismo no es específico de las células del sistema nervioso, pues durante la proliferación y diferenciación de los condrocitos *in vivo*, BMP2 reduce de manera significativa los niveles de la señalización del TGF- β [147]. Estos resultados demuestran que la modulación de ambas vías puede ser utilizada para dirigir la diferenciación de las CPN hacia un linaje específico.

Sin embargo, el BMP endógeno sólo tiene un efecto notable en la diferenciación astrocítica cuando se inhibe la vía de Activina/TGF- β , pues cuando sólo se agregó el inhibidor (Dorsomorfina) a los cultivos, no se obtuvo disminución alguna en la

diferenciación glial, lo que indica que hay otra(s) señal(es) responsable(s) de promover la gliogénesis en estos cultivos. Dentro de los factores que podrían participar en la diferenciación glial de los cultivos se encuentra el factor inhibidor de leucemia (LIF), pues se ha visto que las CPN corticales lo secretan de manera abundante, y una vez que activa a sus efectores intracelulares promueve la diferenciación astrocítica de estas células [148, 149]. Para demostrar si el LIF es el responsable de la diferenciación glial, sería conveniente analizar el efecto de inhibir la vía de LIF en las CPN ya sea sólo la inhibición de LIF o en conjunto con la inhibición de Alk4, Alk5 y Alk7 en presencia o ausencia de la Activina A.

Aunque en este trabajo sólo se analizaron condiciones *in vitro*, los resultados obtenidos podrían correlacionarse con efectos *in vivo* durante el desarrollo cerebral, pues durante el desarrollo de la corteza, tanto la Activina A como el TGF- β 1 y sus respectivos receptores están enriquecidos en las zonas de proliferación donde ocurre la mayor parte de la neurogénesis ([112], aunque no hay reportes de un efecto directo sobre la diferenciación neuronal. Además, ratones transgénicos en los cuales se ha eliminado específicamente al receptor de TGF- β tipo II en el cerebro anterior, muestran una fosforilación persistente de Smad 2/3 en dicha región y carecen de alteraciones morfológicas [96], sugiriendo que la señal de la Activina podría estar compensando la carencia de la señal de TGF- β . Además, los ratones que sobre-expresan Folistatina, dirigida por el promotor de la enzima del cerebro anterior CaMKII α , presentan una disminución en la neurogénesis así como un incremento en el comportamiento relacionado con la ansiedad [119]. Consistente con un papel *in vivo* de Activina A en la edad adulta, se ha reportado que Activina participa en inducir la proliferación de CTPN durante la neurogénesis adulta en respuesta a daño excitotóxico, y semejante a lo obtenido en nuestro estudio, la infusión de Folistatina en estos ratones inhibió la neurogénesis adulta [125]. Recientemente se ha reportado que Activina promueve la diferenciación hacia neuronas GABAérgica en precursores neurales obtenidos de células troncales embrionarias [116], como los cultivos empleados en este estudio son derivados del teléncedalo dorsal (región que origina predominantemente a neuronas de proyección que tienen carácter glutamatérgico) sería interesante determinar si en este caso el efecto de Activina es específico de algún fenotipo neuronal.

CONCLUSIONES

Los cultivos de CTN y CPN son herramientas muy útiles para el estudio de los mecanismos involucrados en los procesos de diferenciación neural, y tener una aproximación de lo que podría estar ocurriendo durante el desarrollo cerebral. En los últimos años, el estudio de las CTPN ha cobrado mucha fuerza debido a su uso potencial para la generación de fuentes renovables de neuronas en terapias de reemplazo celular en enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, antes de iniciar los ensayos clínicos, es necesario conocer los mecanismos involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación de estas células.

Con la realización de este trabajo determinamos que la Activina A tiene un papel neurogénico en los cultivos de las CPN cerebrocorticales de rata. Estos hallazgos contribuyen al enriquecimiento del campo de las CPN, pues apuntan a una posible utilización de la Activina A en los protocolos de diferenciación existentes de estos cultivos para promover la diferenciación neuronal en estudios de terapias de reemplazo celular en modelos animales. Sin embargo, como el incremento neuronal debido a la Activina A no llega al 50% de la población total, sería conveniente utilizar a esta proteína en combinación con otras moléculas que promuevan la diferenciación neuronal y así obtener eficiencias mayores en la diferenciación neuronal de dichos cultivos.

En los cultivos de CPN, la activación de las R-Smads (Smad2/3 y Smad 1/5/8) juega un papel importante en la especificación celular, ya que cuando Smad 2/3 esta activa, se favorece la diferenciación neuronal; por el contrario, la activación de Smad 1/5/8 favorece la diferenciación astrocítica. Estos hallazgos podrían ser aplicables también en los protocolos de diferenciación para dirigir la diferenciación de las CPN hacia un fenotipo particular.

REFERENCIAS

- [1] Sanes, D.H.R., Thomas A.; Harris, William A. Development of the nervous system. Third edition. Academic Press, Elsevier, **2012**.
- [2] Gilbert, F.S., Ninth edition. Developmental Biology. SINAUER Associates Inc. Publishers: Massachussetts, USA, **2010**.
- [3] Gammill, L.S.; Bronner-Fraser, M. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci*, **2003**, 4(10), 795-805.
- [4] Sadler, T.W. Embryology of neural tube development. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **2005**, 135C(1), 2-8.
- [5] Briscoe, J.; Ericson, J. The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling. *Semin Cell Dev Biol*, **1999**, 10(3), 353-62.
- [6] Rubenstein, J.L.; Shimamura, K.; Martinez, S.; Puelles, L. Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci*, **1998**, 21(445-77).
- [7] Grove, E.A.; Tole, S.; Limon, J.; Yip, L.; Ragsdale, C.W. The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development*, **1998**, 125(12), 2315-25.
- [8] Hebert, J.M.; Mishina, Y.; McConnell, S.K. BMP signaling is required locally to pattern the dorsal telencephalic midline. *Neuron*, **2002**, 35(6), 1029-41.
- [9] Shimogori, T.; Banuchi, V.; Ng, H.Y.; Strauss, J.B.; Grove, E.A. Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. *Development*, **2004**, 131(22), 5639-47.
- [10] Muzio, L.; Mallamaci, A. Emx1, emx2 and pax6 in specification, regionalization and arealization of the cerebral cortex. *Cereb Cortex*, **2003**, 13(6), 641-7.
- [11] Grove, E.A.; Fukuchi-Shimogori, T. Generating the cerebral cortical area map. *Annu Rev Neurosci*, **2003**, 26(355-80).
- [12] Sur, M.; Rubenstein, J.L. Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science*, **2005**, 310(5749), 805-10.
- [13] Fukuchi-Shimogori, T.; Grove, E.A. Emx2 patterns the neocortex by regulating FGF positional signaling. *Nat Neurosci*, **2003**, 6(8), 825-31.
- [14] Borello, U.; Pierani, A. Patterning the cerebral cortex: traveling with morphogens. *Curr Opin Genet Dev*, **2010**, 20(4), 408-15.
- [15] Furuta, Y.; Piston, D.W.; Hogan, B.L. Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development*, **1997**, 124(11), 2203-12.
- [16] Lee, S.M.; Tole, S.; Grove, E.; McMahon, A.P. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development*, **2000**, 127(3), 457-67.
- [17] Panchision, D.M.; Pickel, J.M.; Studer, L.; Lee, S.H.; Turner, P.A., et al. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev*, **2001**, 15(16), 2094-110.
- [18] Pontious, A.; Kowalczyk, T.; Englund, C.; Hevner, R.F. Role of intermediate progenitor cells in cerebral cortex development. *Dev Neurosci*, **2008**, 30(1-3), 24-32.
- [19] Kowalczyk, T.; Pontious, A.; Englund, C.; Daza, R.A.; Bedogni, F., et al. Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb Cortex*, **2009**, 19(10), 2439-50.
- [20] Kowalczyk, T.; Pontious, A.; Englund, C.; Daza, R.A.; Bedogni, F., et al. Intermediate Neuronal Progenitors (Basal Progenitors) Produce Pyramidal-Projection Neurons for All Layers of Cerebral Cortex. *Cereb Cortex*, **2009**.
- [21] Frantz, G.D.; McConnell, S.K. Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron*, **1996**, 17(1), 55-61.
- [22] Matsunami, H.; Takeichi, M. Fetal brain subdivisions defined by R- and E-cadherin expressions: evidence for the role of cadherin activity in region-specific, cell-cell adhesion. *Dev Biol*, **1995**, 172(2), 466-78.
- [23] Cooper, J.A. A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci*, **2008**, 31(3), 113-9.
- [24] Sauvageot, C.; Dahia, P.L.; Lipan, O.; Park, J.K.; Chang, M.S., et al. Distinct temporal genetic signatures of neurogenic and gliogenic cues in cortical stem cell cultures. *J Neurobiol*, **2005**, 62(1), 121-33.

- [25] Ross, S.E.; Greenberg, M.E.; Stiles, C.D. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron*, **2003**, 39(1), 13-25.
- [26] Kawachi, T. [In-vivo cell biology reveals the several aspects of cerebral cortical development]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **2008**, 53(15), 1957-67.
- [27] Nomura, T.; Takahashi, M.; Hara, Y.; Osumi, N. Patterns of neurogenesis and amplitude of Reelin expression are essential for making a mammalian-type cortex. *PLoS One*, **2008**, 3(1), e1454.
- [28] Hashimoto-Torii, K.; Torii, M.; Sarkisian, M.R.; Bartley, C.M.; Shen, J., et al. Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron*, **2008**, 60(2), 273-84.
- [29] Hanashima, C.; Li, S.C.; Shen, L.; Lai, E.; Fishell, G. Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science*, **2004**, 303(5654), 56-9.
- [30] Morrison, S.J. Neuronal differentiation: proneural genes inhibit gliogenesis. *Curr Biol*, **2001**, 11(9), R349-51.
- [31] Morrison, S.J. Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, **2001**, 13(6), 666-72.
- [32] Temple, S. The development of neural stem cells. *Nature*, **2001**, 414(6859), 112-7.
- [33] Baizabal, J.M.; Furlan-Magaril, M.; Santa-Olalla, J.; Covarrubias, L. Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Arch Med Res*, **2003**, 34(6), 572-88.
- [34] Gage, F.H. Mammalian neural stem cells. *Science*, **2000**, 287(5457), 1433-8.
- [35] Alvarez-Buylla, A.; Garcia-Verdugo, J.M.; Tramontin, A.D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*, **2001**, 2(4), 287-93.
- [36] Palma, V.; Lim, D.A.; Dahmane, N.; Sanchez, P.; Brionne, T.C., et al. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*, **2005**, 132(2), 335-44.
- [37] Rietze, R.L.; Reynolds, B.A. Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol*, **2006**, 419(3-23).
- [38] Reynolds, B.A.; Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, **1992**, 255(5052), 1707-10.
- [39] Vescovi, A.L.; Reynolds, B.A.; Fraser, D.D.; Weiss, S. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron*, **1993**, 11(5), 951-66.
- [40] Jensen, J.B.; Parmar, M. Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol Neurobiol*, **2006**, 34(3), 153-61.
- [41] Reynolds, B.A.; Tetzlaff, W.; Weiss, S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, **1992**, 12(11), 4565-74.
- [42] Ray, J.; Peterson, D.A.; Schinstine, M.; Gage, F.H. Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1993**, 90(8), 3602-6.
- [43] Conti, L.; Cattaneo, E. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nat Rev Neurosci*, **2010**, 11(3), 176-87.
- [44] Davis, A.A.; Temple, S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature*, **1994**, 372(6503), 263-6.
- [45] Murphy, M.; Drago, J.; Bartlett, P.F. Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. *J Neurosci Res*, **1990**, 25(4), 463-75.
- [46] Ahmed, S.; Gan, H.T.; Lam, C.S.; Poonepalli, A.; Ramasamy, S., et al. Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation. *Cell Adh Migr*, **2009**, 3(4), 412-24.
- [47] Williams, B.P.; Park, J.K.; Alberta, J.A.; Muhlebach, S.G.; Hwang, G.Y., et al. A PDGF-regulated immediate early gene response initiates neuronal differentiation in ventricular zone progenitor cells. *Neuron*, **1997**, 18(4), 553-62.
- [48] Johe, K.K.; Hazel, T.G.; Muller, T.; Dugich-Djordjevic, M.M.; McKay, R.D. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev*, **1996**, 10(24), 3129-40.
- [49] Malatesta, P.; Appolloni, I.; Calzolari, F. Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res*, **2008**, 331(1), 165-78.
- [50] Robel, S.; Berninger, B.; Gotz, M. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci*, 12(2), 88-104.
- [51] Okano, H.; Temple, S. Cell types to order: temporal specification of CNS stem cells. *Curr Opin Neurobiol*, **2009**, 19(2), 112-9.
- [52] Sporn, M.B. The early history of TGF-beta, and a brief glimpse of its future. *Cytokine Growth Factor Rev*, **2006**, 17(1-2), 3-7.

- [53] Chang, H.; Brown, C.W.; Matzuk, M.M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev*, **2002**, 23(6), 787-823.
- [54] Massague, J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **1998**, 67(753-91).
- [55] Shi, Y.; Massague, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, **2003**, 113(6), 685-700.
- [56] Bottner, M.; Kriegelstein, K.; Unsicker, K. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem*, **2000**, 75(6), 2227-40.
- [57] Sun, P.D.; Davies, D.R. The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **1995**, 24(269-91).
- [58] Wrana, J.L.; Attisano, L.; Wieser, R.; Ventura, F.; Massague, J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, **1994**, 370(6488), 341-7.
- [59] Padgett, R.W.; Savage, C.; Das, P. Genetic and biochemical analysis of TGF beta signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev*, **1997**, 8(1), 1-9.
- [60] Groppe, J.; Hinck, C.S.; Samavarchi-Tehrani, P.; Zubieta, C.; Schuermann, J.P., et al. Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol Cell*, **2008**, 29(2), 157-68.
- [61] Macias-Silva, M.; Abdollah, S.; Hoodless, P.A.; Pirone, R.; Attisano, L., et al. MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*, **1996**, 87(7), 1215-24.
- [62] Cheifetz, S.; Weatherbee, J.A.; Tsang, M.L.; Anderson, J.K.; Mole, J.E., et al. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell*, **1987**, 48(3), 409-15.
- [63] Gougos, A.; Letarte, M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*, **1990**, 265(15), 8361-4.
- [64] Lopez-Casillas, F.; Cheifetz, S.; Doody, J.; Andres, J.L.; Lane, W.S., et al. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell*, **1991**, 67(4), 785-95.
- [65] Lewis, K.A.; Gray, P.C.; Blount, A.L.; MacConell, L.A.; Wiater, E., et al. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature*, **2000**, 404(6776), 411-4.
- [66] Sekelsky, J.J.; Newfeld, S.J.; Raftery, L.A.; Chartoff, E.H.; Gelbart, W.M. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **1995**, 139(3), 1347-58.
- [67] Savage, C.; Das, P.; Finelli, A.L.; Townsend, S.R.; Sun, C.Y., et al. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1996**, 93(2), 790-4.
- [68] Massague, J.; Wottn, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*, **2000**, 19(8), 1745-54.
- [69] Schmierer, B.; Tournier, A.L.; Bates, P.A.; Hill, C.S. Mathematical modeling identifies Smad nucleocytoplasmic shuttling as a dynamic signal-interpreting system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2008**, 105(18), 6608-13.
- [70] Shi, Y.; Wang, Y.F.; Jayaraman, L.; Yang, H.; Massague, J., et al. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell*, **1998**, 94(5), 585-94.
- [71] Chen, X.; Weisberg, E.; Fridmacher, V.; Watanabe, M.; Naco, G., et al. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature*, **1997**, 389(6646), 85-9.
- [72] Hata, A.; Seoane, J.; Lagna, G.; Montalvo, E.; Hemmati-Brivanlou, A., et al. OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell*, **2000**, 100(2), 229-40.
- [73] Crawford, S.E.; Stellmach, V.; Murphy-Ullrich, J.E.; Ribeiro, S.M.; Lawler, J., et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, **1998**, 93(7), 1159-70.
- [74] Goumans, M.J.; Valdimarsdottir, G.; Itoh, S.; Rosendahl, A.; Sideras, P., et al. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*, **2002**, 21(7), 1743-53.
- [75] Cheng, S.K.; Olale, F.; Bennett, J.T.; Brivanlou, A.H.; Schier, A.F. EGF-CFC proteins are essential coreceptors for the TGF-beta signals Vg1 and GDF1. *Genes Dev*, **2003**, 17(1), 31-6.
- [76] Rosa, F.M. Cripto, a multifunctional partner in signaling: molecular forms and activities. *Sci STKE*, **2002**, 2002(158), pe47.
- [77] Chen, Y.G.; Liu, F.; Massague, J. Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J*, **1997**, 16(13), 3866-76.

- [78] Choy, L.; Derynck, R. The type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-beta response. *J Biol Chem*, **1998**, 273(47), 31455-62.
- [79] ten Dijke, P.; Hill, C.S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*, **2004**, 29(5), 265-73.
- [80] Wu, G.; Chen, Y.G.; Ozdamar, B.; Gyuricza, C.A.; Chong, P.A., et al. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science*, **2000**, 287(5450), 92-7.
- [81] Tsukazaki, T.; Chiang, T.A.; Davison, A.F.; Attisano, L.; Wrana, J.L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*, **1998**, 95(6), 779-91.
- [82] Xu, L.; Chen, Y.G.; Massague, J. The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol*, **2000**, 2(8), 559-62.
- [83] Chen, Y.G.; Hata, A.; Lo, R.S.; Wotton, D.; Shi, Y., et al. Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev*, **1998**, 12(14), 2144-52.
- [84] Aigner, L.; Bogdahn, U. TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell Tissue Res*, **2008**, 331(1), 225-41.
- [85] Flanders, K.C.; Ludecke, G.; Engels, S.; Cissel, D.S.; Roberts, A.B., et al. Localization and actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system. *Development*, **1991**, 113(1), 183-91.
- [86] Miller, M.W. Expression of transforming growth factor-beta in developing rat cerebral cortex: effects of prenatal exposure to ethanol. *J Comp Neurol*, **2003**, 460(3), 410-24.
- [87] Roussa, E.; Farkas, L.M.; Krieglstein, K. TGF-beta promotes survival on mesencephalic dopaminergic neurons in cooperation with Shh and FGF-8. *Neurobiol Dis*, **2004**, 16(2), 300-10.
- [88] Farkas, L.M.; Dunker, N.; Roussa, E.; Unsicker, K.; Krieglstein, K. Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci*, **2003**, 23(12), 5178-86.
- [89] Krieglstein, K.; Strelau, J.; Schober, A.; Sullivan, A.; Unsicker, K. TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol Paris*, **2002**, 96(1-2), 25-30.
- [90] Unsicker, K.; Krieglstein, K. TGF-betas and their roles in the regulation of neuron survival. *Adv Exp Med Biol*, **2002**, 513(353-74).
- [91] Brionne, T.C.; Tesseur, I.; Masliah, E.; Wyss-Coray, T. Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron*, **2003**, 40(6), 1133-45.
- [92] Siegenthaler, J.A.; Miller, M.W. Transforming growth factor beta1 modulates cell migration in rat cortex: effects of ethanol. *Cereb Cortex*, **2004**, 14(7), 791-802.
- [93] Miller, M.W.; Luo, J. Effects of ethanol and transforming growth factor beta (TGF beta) on neuronal proliferation and nCAM expression. *Alcohol Clin Exp Res*, **2002**, 26(8), 1281-5.
- [94] Siegenthaler, J.A.; Miller, M.W. Transforming growth factor beta 1 promotes cell cycle exit through the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*, **2005**, 25(38), 8627-36.
- [95] Siegenthaler, J.A.; Miller, M.W. Generation of Cajal-Retzius neurons in mouse forebrain is regulated by transforming growth factor beta-Fox signaling pathways. *Dev Biol*, **2008**, 313(1), 35-46.
- [96] Falk, S.; Wurdak, H.; Ittner, L.M.; Ille, F.; Sumara, G., et al. Brain area-specific effect of TGF-beta signaling on Wnt-dependent neural stem cell expansion. *Cell Stem Cell*, **2008**, 2(5), 472-83.
- [97] Zhou, Y.X.; Zhao, M.; Li, D.; Shimazu, K.; Sakata, K., et al. Cerebellar deficits and hyperactivity in mice lacking Smad4. *J Biol Chem*, **2003**, 278(43), 42313-20.
- [98] Vogel, T.; Ahrens, S.; Buttner, N.; Krieglstein, K. Transforming growth factor beta promotes neuronal cell fate of mouse cortical and hippocampal progenitors in vitro and in vivo: identification of Nedd9 as an essential signaling component. *Cereb Cortex*, **2009**, 20(3), 661-71.
- [99] Misumi, S.; Kim, T.S.; Jung, C.G.; Masuda, T.; Urakawa, S., et al. Enhanced neurogenesis from neural progenitor cells with G1/S-phase cell cycle arrest is mediated by transforming growth factor beta1. *Eur J Neurosci*, **2008**, 28(6), 1049-59.
- [100] Maira, M.; Long, J.E.; Lee, A.Y.; Rubenstein, J.L.; Stifani, S. Role for TGF-beta superfamily signaling in telencephalic GABAergic neuron development. *J Neurodev Disord*, **2010**, 2(1), 48-60.
- [101] Flanders, K.C.; Ren, R.F.; Lippa, C.F. Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol*, **1998**, 54(1), 71-85.
- [102] Wachs, F.P.; Winner, B.; Couillard-Despres, S.; Schiller, T.; Aigner, R., et al. Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*, **2006**, 65(4), 358-70.

- [103] Battista, D.; Ferrari, C.C.; Gage, F.H.; Pitossi, F.J. Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, **2006**, 23(1), 83-93.
- [104] Dhandapani, K.M.; Brann, D.W. Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia. *Cell Biochem Biophys*, **2003**, 39(1), 13-22.
- [105] Docagne, F.; Nicole, O.; Gabriel, C.; Fernandez-Monreal, M.; Lesne, S., et al. Smad3-dependent induction of plasminogen activator inhibitor-1 in astrocytes mediates neuroprotective activity of transforming growth factor-beta 1 against NMDA-induced necrosis. *Mol Cell Neurosci*, **2002**, 21(4), 634-44.
- [106] Vale, W.; Vaughan, J.; Jolley, D.; Yamamoto, G.; Bruhn, T., et al. Assay of growth hormone-releasing factor. *Methods Enzymol*, **1986**, 124(389-401).
- [107] Ling, N.; Ying, S.Y.; Ueno, N.; Esch, F.; Denoroy, L., et al. Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1985**, 82(21), 7217-21.
- [108] Smith, J.C.; Price, B.M.; Van Nimmen, K.; Huylebroeck, D. Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature*, **1990**, 345(6277), 729-31.
- [109] Jones, K.L.; de Kretser, D.M.; Patella, S.; Phillips, D.J. Activin A and follistatin in systemic inflammation. *Mol Cell Endocrinol*, **2004**, 225(1-2), 119-25.
- [110] Chen, Y.G.; Lui, H.M.; Lin, S.L.; Lee, J.M.; Ying, S.Y. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. *Exp Biol Med (Maywood)*, **2002**, 227(2), 75-87.
- [111] Munz, B.; Hubner, G.; Tretter, Y.; Alzheimer, C.; Werner, S. A novel role of activin in inflammation and repair. *J Endocrinol*, **1999**, 161(2), 187-93.
- [112] Andreasson, K.; Worley, P.F. Induction of beta-A activin expression by synaptic activity and during neocortical development. *Neuroscience*, **1995**, 69(3), 781-96.
- [113] Funaba, M.; Murata, T.; Fujimura, H.; Murata, E.; Abe, M., et al. Immunolocalization of type I or type II activin receptors in the rat brain. *J Neuroendocrinol*, **1997**, 9(2), 105-11.
- [114] Matzuk, M.M.; Kumar, T.R.; Bradley, A. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature*, **1995**, 374(6520), 356-60.
- [115] Hashimoto, M.; Kondo, S.; Sakurai, T.; Etoh, Y.; Shibai, H., et al. Activin/EDF as an inhibitor of neural differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **1990**, 173(1), 193-200.
- [116] Cambray, S.; Arber, C.; Little, G.; Dougalis, A.G.; de Paola, V., et al. Activin induces cortical interneuron identity and differentiation in embryonic stem cell-derived telencephalic neural precursors. *Nat Commun*, **2012**, 3(15), 841.
- [117] Suzuki, K.; Kobayashi, T.; Funatsu, O.; Morita, A.; Ikekita, M. Activin A induces neuronal differentiation and survival via ALK4 in a SMAD-independent manner in a subpopulation of human neuroblastomas. *Biochem Biophys Res Commun*, **2010**, 394(3), 639-45.
- [118] Sekiguchi, M.; Hayashi, F.; Tsuchida, K.; Inokuchi, K. Neuron type-selective effects of activin on development of the hippocampus. *Neurosci Lett*, **2009**, 452(3), 232-7.
- [119] Ageta, H.; Murayama, A.; Migishima, R.; Kida, S.; Tsuchida, K., et al. Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PLoS One*, **2008**, 3(4), e1869.
- [120] Xia, Y.; Schneyer, A.L. The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. *J Endocrinol*, **2009**, 202(1), 1-12.
- [121] Tretter, Y.P.; Hertel, M.; Munz, B.; ten Bruggencate, G.; Werner, S., et al. Induction of activin A is essential for the neuroprotective action of basic fibroblast growth factor in vivo. *Nat Med*, **2000**, 6(7), 812-5.
- [122] Shoji-Kasai, Y.; Ageta, H.; Hasegawa, Y.; Tsuchida, K.; Sugino, H., et al. Activin increases the number of synaptic contacts and the length of dendritic spine necks by modulating spinal actin dynamics. *J Cell Sci*, **2007**, 120(Pt 21), 3830-7.
- [123] Fang, L.; Wang, Y.N.; Cui, X.L.; Fang, S.Y.; Ge, J.Y., et al. The role and mechanism of action of activin A in neurite outgrowth of chicken embryonic dorsal root ganglia. *J Cell Sci*, **2012**, 125(Pt 6), 1500-7.
- [124] Mukerji, S.S.; Katsman, E.A.; Wilber, C.; Haner, N.A.; Selman, W.R., et al. Activin is a neuronal survival factor that is rapidly increased after transient cerebral ischemia and hypoxia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, **2007**, 27(6), 1161-72.
- [125] Abdipranoto-Cowley, A.; Park, J.S.; Croucher, D.; Daniel, J.; Henshall, S., et al. Activin A is essential for neurogenesis following neurodegeneration. *Stem Cells*, **2009**, 27(6), 1330-46.
- [126] Zheng, F.; Adelsberger, H.; Muller, M.R.; Fritschy, J.M.; Werner, S., et al. Activin tunes GABAergic neurotransmission and modulates anxiety-like behavior. *Mol Psychiatry*, **2009**, 14(3), 332-46.

- [127] Dow, A.L.; Russell, D.S.; Duman, R.S. Regulation of activin mRNA and Smad2 phosphorylation by antidepressant treatment in the rat brain: effects in behavioral models. *J Neurosci*, **2005**, 25(20), 4908-16.
- [128] Panchision, D.M.; McKay, R.D. The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev*, **2002**, 12(4), 478-87.
- [129] Gomes, W.A.; Mehler, M.F.; Kessler, J.A. Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev Biol*, **2003**, 255(1), 164-77.
- [130] Gajavelli, S.; Wood, P.M.; Pennica, D.; Whittemore, S.R.; Tsoulfas, P. BMP signaling initiates a neural crest differentiation program in embryonic rat CNS stem cells. *Exp Neurol*, **2004**, 188(2), 205-23.
- [131] Sailer, M.H.; Hazel, T.G.; Panchision, D.M.; Hoepfner, D.J.; Schwab, M.E., et al. BMP2 and FGF2 cooperate to induce neural-crest-like fates from fetal and adult CNS stem cells. *J Cell Sci*, **2005**, 118(Pt 24), 5849-60.
- [132] Rajan, P.; Panchision, D.M.; Newell, L.F.; McKay, R.D. BMPs signal alternately through a SMAD or FRAP-STAT pathway to regulate fate choice in CNS stem cells. *J Cell Biol*, **2003**, 161(5), 911-21.
- [133] Lagace, D.C.; Whitman, M.C.; Noonan, M.A.; Ables, J.L.; DeCarolis, N.A., et al. Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. *J Neurosci*, **2007**, 27(46), 12623-9.
- [134] Suh, H.; Consiglio, A.; Ray, J.; Sawai, T.; D'Amour, K.A., et al. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, **2007**, 1(5), 515-28.
- [135] Dolbeare, F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J*, **1995**, 27(5), 339-69.
- [136] Kupersmidt, L.; Amit, T.; Bar-Am, O.; Youdim, M.B.; Blumenfeld, Z. The neuroprotective effect of Activin A and B: implication for neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, **2007**, 103(3), 962-71.
- [137] Schubert, D.; Kimura, H.; LaCorbiere, M.; Vaughan, J.; Karr, D., et al. Activin is a nerve cell survival molecule. *Nature*, **1990**, 344(6269), 868-70.
- [138] Flanders, K.C.; Lippa, C.F.; Smith, T.W.; Pollen, D.A.; Sporn, M.B. Altered expression of transforming growth factor-beta in Alzheimer's disease. *Neurology*, **1995**, 45(8), 1561-9.
- [139] Sun, Y.; Hu, J.; Zhou, L.; Pollard, S.M.; Smith, A. Interplay between FGF2 and BMP controls the self-renewal, dormancy and differentiation of rat neural stem cells. *J Cell Sci*, **2011**, 124(Pt 11), 1867-77.
- [140] Shah, N.M.; Groves, A.K.; Anderson, D.J. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell*, **1996**, 85(3), 331-43.
- [141] Moustakas, A.; Heldin, C.H. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci*, **2005**, 118(Pt 16), 3573-84.
- [142] Iwahori, Y.; Saito, H.; Torii, K.; Nishiyama, N. Activin exerts a neurotrophic effect on cultured hippocampal neurons. *Brain Res*, **1997**, 760(1-2), 52-8.
- [143] Chen, H.L.; Panchision, D.M. Concise review: bone morphogenetic protein pleiotropism in neural stem cells and their derivatives--alternative pathways, convergent signals. *Stem Cells*, **2007**, 25(1), 63-8.
- [144] Gross, R.E.; Mehler, M.F.; Mabie, P.C.; Zang, Z.; Santschi, L., et al. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron*, **1996**, 17(4), 595-606.
- [145] Roussa, E.; Wiehle, M.; Dunker, N.; Becker-Katins, S.; Oehlke, O., et al. Transforming growth factor beta is required for differentiation of mouse mesencephalic progenitors into dopaminergic neurons in vitro and in vivo: ectopic induction in dorsal mesencephalon. *Stem Cells*, **2006**, 24(9), 2120-9.
- [146] Alatríste-González, K. Efecto de la estimulación con tratamientos combinados de citocinas de la familia del TGF- β en la neurogénesis y astrogénesis de células troncales neurales. UNAM, México, D.F., 2012.
- [147] Keller, B.; Yang, T.; Chen, Y.; Munivez, E.; Bertin, T., et al. Interaction of TGFbeta and BMP signaling pathways during chondrogenesis. *PLoS One*, **2011**, 6(1), e16421.
- [148] Chang, M.Y.; Park, C.H.; Lee, S.Y.; Lee, S.H. Properties of cortical precursor cells cultured long term are similar to those of precursors at later developmental stages. *Brain Res Dev Brain Res*, **2004**, 153(1), 89-96.
- [149] Rodríguez-Rivera, N.S.; Molina-Hernández, A.; Sánchez-Cruz, E.; Escalante-Alcalde, D.; Velasco, I. Activated Notch1 is a stronger astrocytic stimulus than leukemia inhibitory factor for rat neural stem cells. *Int J Dev Biol*, **2009**, 53(7), 947-53.