



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

HETEROGENEIDAD VASCULAR EN EL COMPLEJO NEUROGÉNICO  
VENTRICULAR MURINO.

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:  
DANNIA COLÍN CASTELÁN

DIRECTOR DE TESIS  
DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR  
DRA. CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DRA. CARMEN CLAPP JIMÉNEZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MÉXICO, D. F. MAYO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Agradecimientos

A mis padres Sara Castelán Camacho e Ignacio Colín Gutiérrez por todo el amor, apoyo, paciencia y dedicación que siempre me han dado.

A mi hermana Iliana Berenice Colín Castelán por el amor, la solidaridad y el humor con el que siempre me ha acompañado.

A mis amigos Daniel, Alí, Edmundo y Laura por haberme acompañado durante todo el proceso y no dejarme sola ni en mis peores momentos.

A mis compañeros de laboratorio por las discusiones científicas, filosóficas y humorísticas con que siempre acompañé mi trabajo.

A la doctora Angelique Bordey por su hospitalidad y su apoyo.

Al doctor Jesús Ramírez Santos por la ayuda técnica, las discusiones científicas y el apoyo moral.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la fundación Fulbright-García Robles por el apoyo económico.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Yale School of Medicine de Yale University.

A Gabriel por el apoyo, por el cariño, por las largas discusiones, por las reflexiones, por los jalones de oreja, por cuestionarme, por ayudarme a decidir qué clase de científico quiero ser y por ayudarme cada día a ser un mejor ser humano. Por ser la persona de quien más he aprendido fuera de mi núcleo familiar, le estaré eternamente agradecida.

## Índice

Abstract.....	1
Resumen.....	2
Abreviaturas.....	2
1. Introducción.....	3
2. Hipótesis.....	7
3. Objetivos.....	7
4. Estrategia experimental.....	7
5. Materiales y métodos.....	8
5.1. Animales y obtención de muestras.....	8
5.2. Inmunofluorescencia/Inmunohistoquímica.....	10
5.3. Marcaje in vivo de vasos sanguíneos.....	12
5.4. Ensayo de permeabilidad vascular.....	12
5.5. Microscopio y análisis de imágenes.....	13
6. Resultados.....	15
6.1. Los vasos sanguíneos del CNV cambian de orientación durante el desarrollo embrionario .....	15
6.2. Los vasos sanguíneos bordean el CNV y se vuelven más complejos conforme avanza el desarrollo.....	15
6.3. EphB4 se expresa de manera heterogénea a lo largo del CNV y es regulado conforme avanza el desarrollo.....	16
6.4. Los vasos sanguíneos de la ZSV son mucho más permeables que aquellos ubicados en la CRM y BO.....	16
6.5. La pared vascular de la ZSV es discontinua.....	17
6.6. NT3 se distribuye de manera heterogénea a lo largo del CNV en la rata adulta.....	18
6.7. <u>Artículo</u> : EphB4 is developmentally and differentially regulated in blood vessels throughout the forebrain neurogenic niche in the mouse brain: Implications for vascular remodeling .....	22
6.8. <u>Artículo</u> : Differential Vascular Permeability Along the Forebrain Ventricular Neurogenic Niche in the Adult Murine Brain .....	31
7. Discusión.....	40
8. Anexo.....	47
8.1. Materiales y métodos.....	47
8.1.1. Modelo knock-out tejido-específico de TSC1.....	47
8.1.2. Permeabilidad vascular.....	47
8.1.3. Análisis de complejidad vascular.....	48
8.1.4. Inmunofluorescencia.....	49
8.2. Resultados.....	50
9. Bibliografía.....	57

**Abstract**

Adult neurogenesis is restricted to two brain regions; one of them is the forebrain neurogenic niche, which is comprised by the subventricular zone, the rostral migratory stream and the olfactory bulb. Within the forebrain neurogenic niche the processes that underlie neurogenesis tend to segregate. Thus, proliferation occurs in the subventricular zone, migration takes place along the rostral migratory stream and differentiation happens in the olfactory bulb. Given that vascular niches are capable of generating defined microenvironments, we decided to study the possibility that discrete vascular compartments along the forebrain neurogenic niche support the distinct neurogenic phases. Therefore we studied the vascular development along the forebrain neurogenic niche, the molecular identity of the endothelium, the morpho-functional heterogeneity of the vascular bed and the distribution of trophic factors along the forebrain neurogenic niche. Our results show that the blood vessels within the forebrain neurogenic niche change orientation and increase their complexity with age. We also showed that blood vessels along the neurogenic niche express the venous marker EphB4 heterogeneously and that blood vessels in the subventricular zone are permeable to high (2,000 kDa) and low (376 Da) molecular weight molecules. Besides the endothelium present in the subventricular zone is discontinuous. Finally we showed that neurotrophin 3 is expressed heterogeneously along the forebrain neurogenic niche. In conclusion, our results show that there are at least two vascular domains with morpho-functional features that are clearly discernible. On one hand we have the subventricular zone vascular niche that sustains neural proliferation and on the other hand we have the rostral migratory stream/olfactory bulb vascular niche that sustains neural migration and differentiation.

## Resumen

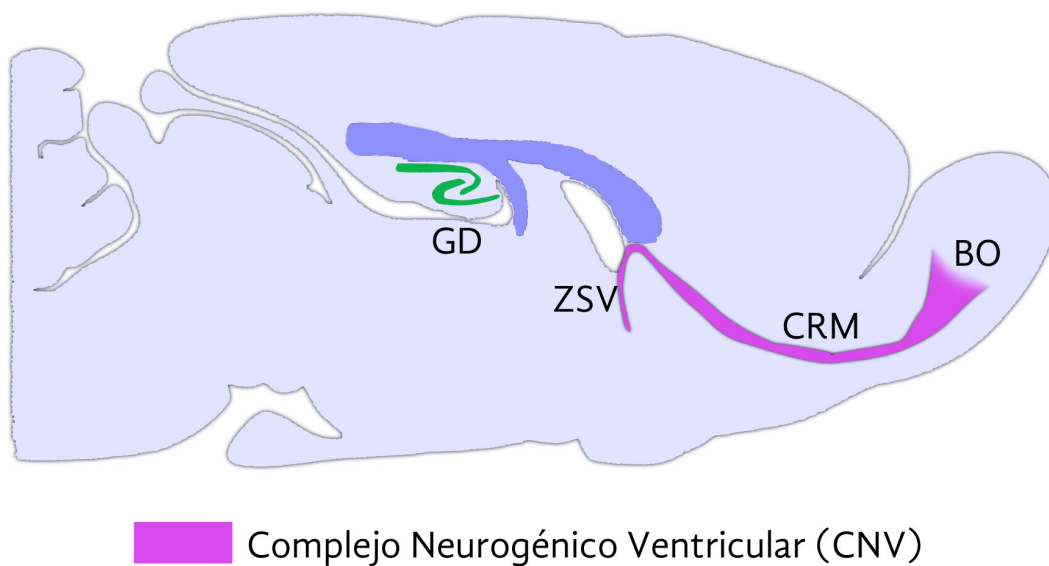
La neurogénesis adulta se restringe a dos zonas, una de ellas es el complejo neurogénico ventricular formado por la zona subventricular, la corriente rostral migratoria y el bulbo olfatorio. En el complejo neurogénico ventricular las distintas fases de la neurogénesis se segregan. De modo que observamos proliferación en la zona subventricular, migración en la corriente rostral migratoria y diferenciación neuronal en el bulbo olfatorio. Dado que los lechos vasculares son capaces de generar nichos micro-ambientales definidos, en este trabajo estudiamos la existencia de compartimentos vasculares discretos a lo largo del complejo neurogénico ventricular que apoyen las distintas fases de la neurogénesis. Para esto caracterizamos el desarrollo vascular, estudiamos la identidad molecular del endotelio, estudiamos la heterogeneidad morfo-funcional de los vasos sanguíneos y evaluamos la distribución de factores tróficos en el complejo neurogénico ventricular. Nuestros resultados muestran que los vasos sanguíneos del nicho neurogénico cambian su orientación y aumentan su complejidad conforme avanza el desarrollo. También muestran que los vasos sanguíneos del complejo neurogénico ventricular expresan el marcador venoso EphB4 de forma heterogénea y que los vasos sanguíneos de la zona subventricular son permeables a moléculas de alto (2,000 kDa) y bajo (376 Da) peso molecular. Morfológicamente el endotelio de la zona subventricular es discontinuo. Finalmente mostramos que la neurotrofina 3 se expresa de manera heterogénea a lo largo del complejo neurogénico. En conclusión nuestros resultados muestran que existen al menos dos dominios vasculares con características morfo-funcionales claramente discernibles, que generan dos nichos micro-ambientales distintos. Por un lado el nicho zona subventricular que mantiene la proliferación de las células troncales neurales y por otro la corriente rostral migratoria y el bulbo olfatorio donde ocurre la migración y diferenciación neuronal.

## Abreviaturas

BO: Bulbo Olfatorio  
CNV: Complejo Neurogénico Ventricular  
CRM: Corriente Rostral Migratoria  
CTN: Células troncales neurales  
DP: Día Postnatal  
E: Día Embrionario  
NT: Neurotrofina  
ZSV: Zona Subventricular

## 1. Introducción

La formación de nuevas neuronas (i.e., neurogénesis) en el sistema nervioso central de los mamíferos adultos es un proceso que parece restringirse al complejo neurogénico ventricular (CNV) y el giro dentado hipocampal<sup>1-5</sup>. En el CNV, las células troncales neurales (CTN) residen a lo largo de una región que se extiende rostralmente adyacente a la pared del ventrículo lateral en donde permanecen quiescentes la mayor parte del tiempo. Al dividirse, las CTN producen precursores neuronales de proliferación rápida llamados células amplificadoras transitorias. Posteriormente, las células generadas a lo largo del CNV migran hacia el bulbo olfatorio (BO) como precursores post-mitóticos llamados neuroblastos. Una vez que alcanza el bulbo olfatorio (BO), los neuroblastos se comprometen, especifican sus fenotipos y finalmente se integran a la red neuronal como neuronas periglomerulares y granulares<sup>6,7</sup>.



**Esquema 1:** Representación de un corte sagital de cerebro murino donde se muestran los dos

nichos neurogénicos adultos. GD: Giro dentado del hipocampo. ZSV: zona subventricular, CRM: corriente rostral migratoria, BO: bulbo olfatorio.

A pesar de toda la investigación que se ha desarrollado en años recientes en torno a la neurogénesis adulta, aún no queda claro cuáles son los procesos que la regulan. Una posibilidad es que las distintas fases de la neurogénesis sean dependientes de programas intrínsecos de las CTN<sup>8</sup>. En apoyo a esta noción se ha reportado que tanto la proliferación como la migración de los precursores neuronales se mantienen constantes en ausencia del BO<sup>9</sup> y que el CVN es un mosaico en el que distintas regiones dan origen a diferentes fenotipos neuronales (neuronas dopaminérgicas, GABAérgicas, Calbinina positivas)<sup>10</sup>. No obstante ello, la neurogénesis podría ser regulada por factores extrínsecos. De hecho, se ha reportado que la proliferación de precursores neuronales aumenta durante el embarazo o después de una lesión isquémica cerebral<sup>3,11,12</sup>, ambas condiciones que modifican localmente los niveles de disponibilidad de diversas hormonas (e.g., prolactina) y factores de crecimiento (e.g., HIF-1, VEGF)<sup>13</sup>. Por otro lado, también se ha reportado que después de una lesión isquémica los neuroblastos migran hacia los sitios lesionados<sup>14-16</sup>. Finalmente, se ha reportado que las CTN adultas son capaces de generar células de distintos fenotipos, incluyendo células epiteliales mamarias, al ser trasplantadas<sup>17</sup>.

En el CNV, los subprocesos celulares que subyacen a la neurogénesis tienden a segregarse espacialmente. En la Zona Subventricular (ZSV), la región más proximal del mismo, se lleva a cabo primordialmente la proliferación y las primeras etapas de diferenciación de los precursores neuronales<sup>18</sup>. Los



neuroblastos que emergen de la ZSV, migran a lo largo de la corriente rostral migratoria (CRM) y mientras lo hacen comienzan su proceso de diferenciación neuronal<sup>7,19</sup>. Una vez alcanzado el BO, los neuroblastos especifican sus fenotipos<sup>20</sup>. La regionalización de los procesos neurogénicos a lo largo del CNV sugiere que existen dominios micro-ambientales que probablemente influyen diferencialmente sobre la proliferación, diferenciación, compromiso y especificación del linaje celular en función de la posición relativa que ocupan los neuroblastos a lo largo del CNV. De esta forma, la caracterización de los micro-ambientes y de los mecanismos que los generan, se torna fundamental para entender la modulación del proceso de neurogénesis en el cerebro adulto.

Uno de los elementos citológicos que genera dominios micro-ambientales es la vasculatura. Estos dominios se generan como el resultado de la heterogeneidad endotelial fenotípica (i.e., arterias, venas, capilares y sinusoides) y funcional (i.e., permeabilidad, transporte y secreción) a lo largo de los lechos vasculares<sup>21-23</sup>. Es probable, por tanto, que la heterogeneidad morfo-funcional vascular a lo largo del CNV pudiese generar dominios micro-ambientales que modulen el proceso neurogénico. En apoyo a esta posibilidad se ha mostrado que las células troncales neurales proliferan en lechos vasculares especializados<sup>24-27</sup>. Los vasos sanguíneos también son utilizados por los neuroblastos como andamios que apoyan su migración<sup>28,29</sup>. Además, se ha mostrado que los nichos micro-ambientales generados por los vasos sanguíneos son capaces de regular la diferenciación de las células troncales en otros tejidos como en el hematopoyético<sup>30</sup>. En el caso del sistema nervioso, se ha reportado que el endotelio derivado de vasos obtenidos de

sitios lesionados favorece la migración y diferenciación *in vitro* de las células progenitoras derivadas de la ZSV. En contraste, el endotelio intacto favorece únicamente la proliferación <sup>31</sup>. Estos datos, indican que los endotelios son heterogéneos y sugieren que pudiesen promover respuestas diferenciales en los precursores neuronales que se desplazan a lo largo del CNV.

En conjunto, hay evidencia que apoya la posibilidad de que existan compartimentos vasculares discretos a lo largo del CNV, y que estos compartimientos apoyen los distintos eventos celulares que se requieren para originar neuronas diferenciadas en el bulbo olfatorio del cerebro adulto. Una caracterización estructural y molecular del lecho vascular que favorece la proliferación, migración y compromiso de los precursores neuronales a lo largo del CNV, mejoraría nuestra comprensión de los elementos ambientales requeridos para el mantenimiento de la neurogénesis postnatal. Adicionalmente, aún se desconoce si en verdad estos vasos sanguíneos aportan factores de manera diferencial tal que participen en la generación de dominios micro-ambientales que promuevan la migración y la diferenciación neurobalística hacia linajes específicos de interneuronas olfativas, conforme estas células migran hacia el bulbo olfatorio. Al respecto, algunos de los factores derivados de la vasculatura que pudiesen estar modulando la diferenciación neurobalística en el cerebro adulto son las neurotrofinas <sup>32-35</sup>. Tomando en cuenta todo lo anterior, en este trabajo decidimos estudiar el desarrollo, la morfología, los marcadores y la permeabilidad del lecho vascular del CNV.

## **2. Hipótesis**

Los vasos sanguíneos localizados a lo largo del CNV son morfo-funcional y molecularmente heterogéneos de modo que distribuyen factores tróficos de manera diferencial formando dominios micro-ambientales distintos a lo largo del CNV.

## **3. Objetivos**

- 1) Caracterizar el desarrollo vascular.
- 2) Establecer la identidad venosa o arterial de las células endoteliales a nivel molecular.
- 3) Estudiar la heterogeneidad morfo-funcional de los vasos sanguíneos.
- 4) Evaluar la distribución de factores tróficos presumiblemente liberados por la vasculatura lo largo del CNV.

## **4. Estrategia experimental**

- 1) Estudiar el desarrollo estructural del lecho vascular a lo largo del CNV a los días embrionarios 14 y 17, y a los días post-natales 1, 7, 15 y 60.
- 2) Identificar vasos venosos a lo largo del CNV a los días embrionarios 14 y 17, y a los días post-natales 1, 7, 15 y 60.
- 3) Caracterizar la morfología vascular a lo largo del CNV en la rata adulta.
- 4) Caracterizar la permeabilidad vascular a lo largo del CNV en la rata adulta.
- 5) Describir y semi-cuantificar la distribución de NT3, NT4 y BDNF a lo largo del CNV en la rata adulta.

## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1 Animales y obtención de las muestras**

Para la ejecución de los experimentos realizados en este trabajo se emplearon embriones (n=8) obtenidos de ratonas adultas preñadas de la cepa CD1 (n=3), ratones neonatos (n=4), juveniles (n=6) y adultos (n=8) de la misma cepa, y ratas macho adultas de la cepa Wistar (n=13), todos estos animales fueron alojados en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. El uso de roedores de distinta especie se debe a que los anticuerpos que se emplearon para la detección de las neurotrofinas y VEGF detectan los antígenos de rata; además, la estructura vascular del CNV es consistente en ambas especies<sup>36</sup>. Los embriones y fetos de ratón fueron obtenidos a las edades gestacionales de 14.5 y 17.5 días a través de una cirugía cesárea ejecutada a las madres gestantes previa anestesia con pentobarbital sódico (45 mg/kg de peso corporal) suministrado por vía intraperitoneal. Posteriormente, los embriones/fetos fueron colocados en PBS a 4°C, decapitados y las cabezas fijadas en PFA 4% por 48 horas a 4°C. Finalizado este período, los cerebros fueron disecados y colocados en una solución amortiguada de sacarosa 30% a 4°C hasta su decantación. Posteriormente los cerebros se congelaron con 2-metil-butano a -45°C y almacenados a menos -70°C hasta su uso.

Por otro lado, los ratones y ratas utilizadas a las edades de 1, 7, 15 y 60 días de vida postnatal fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio hasta su sacrificio. Los roedores de 60 días de edad fueron destetados a los 21 días. En todo

momento, estos animales tuvieron acceso libre y permanente a agua y/o alimento. El día de su sacrificio, los roedores de un día de edad fueron anestesiados por hipotermia. A partir del día 7 de vida los roedores fueron anestesiados con pentobarbital sódico administrado intraperitonealmente (45mg/kg de peso corporal). Los animales utilizados para inmunofluorescencia e inmunohistoquímica fueron perfundidos primero con solución salina isotónica, y posteriormente con paraformaldehído 4%. Inmediatamente después, los cerebros fueron extraídos y post-fijados en paraformaldehído amortiguado (pH 7.4) al 4% por 24 horas a 4°C. A continuación, los cerebros fueron incubados en una solución amortiguada de sacarosa al 30% a 4°C hasta que se decantaron. Las muestras fueron entonces congeladas y cortadas longitudinalmente (50  $\mu\text{m}$ ) en un criostato. Los cortes obtenidos fueron conservados en solución crioprotectora (glicerol 25%, etilenglicol 25%, PBS 50%) a -20°C hasta su utilización. Para los cortes semi-finos, se perfundieron dos ratas del modo descrito anteriormente excepto que se utilizó una solución de Karnovsky modificada (2% paraformaldehído, 2.5% glutaraldehído, en solución de cacodilato 0.1M; pH 7.4). Después se disecaron las subregiones del CNV (1  $\text{mm}^3$ ) y se post-fijaron en la misma solución por 72 hr a temperatura ambiente. El tejido fijado fue lavado con solución de cacodilato, post-fijado en una solución de tetraóxido de osmio al 2% , y teñido *en bloc* con acetato de uranilo antes de ser deshidratado en etanol e incluido en Epon. Se obtuvieron cortes semi-finos que posteriormente fueron teñidos con azul de toluidina y observados por microscopía de luz. Todos los protocolos utilizados siguieron los lineamientos de manejo de animales recomendados por los Institutos Nacionales

de Salud (NIH) y fueron aprobados por el comité de bioética para el uso y cuidado de animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Las edades en las que se sacrificaron los animales corresponden con eventos críticos del desarrollo del CNV. La edad más temprana utilizada fue el día embrionario (E) 14.5. A esta edad la migración de los neuroblastos se da de manera radial, desde la pared ventricular hacia la superficie del cerebro. Tres días después (E17.5) la migración neuroblástica se orienta de forma tangencial partiendo de la eminencia lateral ganglionar hacia el bulbo olfatorio (BO). Al día postnatal (DP) 1 los neuroblastos migran como una masa homogénea de células, y hasta el DP7 están en contacto directo con los vasos sanguíneos de la CRM. Para el DP15 los neuroblastos migran en forma de cadenas, y los astrocitos comienzan a formar los tubos gliales característicos del CNV maduro. Para el DP60, el CNV ya ha madurado por completo.

## **5.2 Inmunofluorescencia/ Inmunohistoquímica**

Cortes longitudinales de 30µm se lavaron tres veces con PBT (PBS+Tritón X-100 0.3%) por 10 minutos en cada ocasión. A continuación, los cortes fueron incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% por 10 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual fueron lavados de nuevo 3 veces con PBT. Luego, se desenmascararon epítopes incubando los cortes en una solución de citratos (Immunoretriever; Bio SB, BSB 0020) por 30 minutos a 65°C. Posteriormente, los cortes fueron lavados 3 veces e incubados por 30 minutos en una solución de bloqueo (5% de suero de caballo + 5% de albúmina sérica bovina en PBT) a temperatura ambiente. Finalizado este período, se agregó a los cortes el anticuerpo primario

correspondiente (Tabla 1) diluido en solución de bloqueo, y se incubó por una noche a 4°C en agitación. Los cortes fueron lavados, para posteriormente ser incubados con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Tabla 2) por 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, los cortes fueron lavados de nuevo e incubados con avidina-peroxidasa según las instrucciones del fabricante (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, PK-4000). Luego, los cortes fueron lavados de nuevo y la localización de la peroxidasa fue revelada utilizando 3, 3'-diaminobenzidina (DAB peroxidase substrate kit; Vector Laboratories, SK-4100) según las instrucciones del fabricante. Finalmente los cortes fueron lavados por última vez, colocados en portaobjetos, deshidratados en una cámara de vacío y montados para su observación utilizando resina (Cytoseal 60; Richard-Allan Scientific, 8310-4).

Los ensayos de inmunofluorescencia se hicieron siguiendo un protocolo muy similar al anteriormente descrito con las siguientes diferencias: en primer lugar, se omitió la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. En segundo lugar, se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a distintos fluoróforos (Tabla 2); en el caso de PECAM-1 se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado que se identificó con avidina fluoresceinada (1:200; Vector Laboratories, A-1100). Posteriormente los cortes

Antígeno	Especie huésped	Dilución	Compañía	Número de catálogo
PECAM-1 (endotelio)	Rata	1:150	BD Pharmingen	550274
EphB4 (Endotelio venoso)	Cabra	1:150	Santa Cruz Biotechnology	SC-7285
Sox-2 (Células progenitoras neurales)	Conejo	1:1000	Abcam	ab97959
NT-3	Conejo	1:1000	Millipore	AB 15325P
NT-4	Oveja	1:300	Millipore	AB 1519P
BDNF	Conejo	1:300	Millipore	AB 1779SP

fueron lavados y contra-teñidos con DAPI por un minuto. Finalmente los cortes se lavaron por última vez, se colocaron en portaobjetos y fueron montados para su

Espece huésped	Espece Blanco	Etiqueta	Dilución	Compañía	Número de catálogo
Burro	Conejo	Biotina	1:2000	Millipore	AP187B
Burro	Oveja	Biotina	1:1000	Vector	BA-6000
Cabra	Rata	Biotina	1:750	Millipore	AP183B
Burro	Cabra	Alexa Fluor 555	1:750	Invitrogen	A-21432
Avidina		FITC	1:200	Vector	A-2001

observación utilizando medio de montaje anti-decoloración (Fluorescence mounting medium; DAKO, S3023).

### **5.3 Marcaje *in vivo* de vasos sanguíneos**

Con el objeto de visualizar la estructura del lecho vascular del CNV adulto, se realizaron experimentos de marcaje *in vivo* de vasos sanguíneos. Para ésto, ratones macho CD1 DP60 se anestesiaron aplicando una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (45 mg/kg de peso corporal). Una vez anestesiados, los ratones fueron sometidos a una toracotomía para exponer el corazón. Expuesto éste, los ratones recibieron una inyección intracardiaca de heparina (0.5 mg/kg de peso corporal) seguida de una inyección de dextrán fluorescente (1%; dextrán-FITC, 2,000,000 MW, Invitrogen). Dos minutos después de la inyección de dextrán, los ratones fueron decapitados y sus cerebros extraídos. Posteriormente, los cerebros fueron fijados en formalina 10% (Sigma; HT501128) a 4°C por 48 horas. Finalizado este proceso, los cerebros fueron crio-protectados en una solución amortiguada de sacarosa 30% a 4°C hasta su decantación. A continuación, fueron congelados, cortados longitudinalmente en un criostato (50 µm), colocados sobre



portaobjetos gelatinizados para su observación bajo el microscopio.

#### **5.4 Ensayo de permeabilidad vascular**

Con el propósito de estudiar la permeabilidad vascular de los vasos sanguíneos a lo largo del CNV, se realizó una co-inyección de colorantes fluorescentes de distintos tamaños. Para ésto se anestesiaron ratas Wistar macho DP60 mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (45 mg/kg de peso corporal). Después, se hizo una abdominotomía que permitiera acceder al corazón a través del diafragma. Una vez visualizado el corazón a través de diafragma, se inyectó intracardialmente una mezcla de azul de Evans (960 Da; 60 mg/kg de peso) y fluoresceína de sodio (376 Da; 120 mg/kg de peso) teniendo cuidado de no romper el diafragma, dado que su ruptura conduce al colapso pulmonar, situación que conduce a hipoxia cerebral con la consecuente rotura de la barrera hematoencefálica. Esta técnica permite la visualización del patrón vascular con el azul de Evans y la identificación de los sitios vasculares de alta permeabilidad con la fluoresceína de sodio en el animal íntegro. Tres minutos después de la inyección, las ratas fueron decapitadas y sus cerebros fueron extraídos. Inmediatamente después, los cerebros fueron congelados en 2-metil-butano preenfriado a -20°C. Posteriormente se obtuvieron cortes longitudinales (50 µm) en criostato, los cuales se observaron al microscopio de fluorescencia.

Como control, se utilizaron ratas tratadas con manitol 2M (5 ml) cinco minutos antes de la administración de los colorantes; el manitol es un derivado inerte de la manosa que se utiliza a altas concentraciones para generar un choque osmótico y de este modo abrir la barrera hematoencefálica

## **5.5 Microscopía y análisis de imágenes**

Todos los cortes fueron observados utilizando un microscopio Olympus BX51WI equipado con una Unidad de Disco Giratorio (Disk Spinning Unit, DSU; Olympus) y una platina automática (Micro Bright Field Bioscience). Las imágenes de campo claro fueron obtenidas con una cámara digital a color MBF CX9000, mientras que todas las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas con una cámara EM-CCD Hamamatsu C9100. El software utilizado para la obtención de las imágenes fue el Stereo Investigator (Micro Bright Field Bioscience). El software utilizado para el procesamiento de las imágenes fue el ImageJ (NIH).

Para analizar la distribución de neurotrofinas y de VEGF a lo largo del CNV se tomaron micrografías de distintas secciones del CNV (Zona Subventricular, ZSV; Corriente Rostral Migratoria posterior, CRMp; Corriente Rostral Migratoria anterior, CRMa; Bulbo olfatorio, BO). Una vez capturadas las imágenes, se generó una región de interés (ROI) correspondiente sólo al área del CNV. Después, se limitaron los píxeles seleccionados a un rango de intensidad de 0 a 110 unidades para NT3, de 0 a 120 unidades para NT4 y de 0 a 115 unidades para BDNF. Posteriormente se calculó el área ocupada por los píxeles seleccionados y el área total dentro del ROI. Con estos datos se obtuvo el porcentaje de área ocupada por los elementos tisulares inmunoteñidos dentro de las distintas secciones del CNV. Estos datos fueron procesados por análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Se utilizaron tres ratas para cada parámetro.

## **6. Resultados**

**\*NOTA:** Los resultados desarrollados y figuras que ilustran de la sección 5.1 a la 5.5 se presentan en las publicaciones que se hayan al final del capítulo de resultados: a) EphB4 is developmentally and differentially regulated in blood vessels throughout the forebrain neurogenic niche in the mouse brain: Implications for vascular remodeling. b) Differential vascular permeability along the forebrain ventricular neurogenic niche in the adult murine brain.

### **6.1 Los vasos sanguíneos del CNV cambian de orientación durante el desarrollo embrionario <sup>a</sup>.**

Al día embrionario 14.5 (E14.5) los vasos sanguíneos del CNV presuntivo se orientaron predominantemente de forma radial. Tres días después los vasos sanguíneos presentaron una orientación longitudinal al eje del CNV presuntivo, excepto en la placoda olfatoria. A partir de este punto del desarrollo la orientación longitudinal de los vasos sanguíneos se mantuvo hasta la edad adulta.

### **6.2 Los vasos sanguíneos bordean el CNV y se vuelven más complejos conforme va avanzando el desarrollo <sup>a</sup>.**

Al día E14.5 los vasos sanguíneos eran cortos, rectos y relativamente poco ramificados. Al día E17.5 aumentó la longitud y cantidad de ramificaciones de los vasos sanguíneos, particularmente en los bordes de la CRM, esta tendencia continuó al DP1. Al DP7 los vasos sanguíneos bordeaban por completo la CRM, sin embargo, el centro de la CRM contenía muy pocos vasos sanguíneos con excepción de algunas ramificaciones vasculares a la altura del codo de la corriente. En contraste, tanto la ZSV como el BO ya estaban altamente vascularizados a esta edad. A partir del día DP15 la complejidad vascular y densidad vascular de la CRM siguió aumentando hasta alcanzar su máximo al DP60.

### **6.3 EphB4 se expresa de manera heterogénea a lo largo del CNV y es regulado**

**conforme avanza el desarrollo <sup>a</sup>.**

Como parte de la caracterización fenotípica del endotelio que soporta la neurogénesis, decidimos estudiar si el lecho vascular presentaba características arteriales o venosas. Para esto utilizamos el marcador venoso EphB4. Durante el desarrollo embrionario y hasta DP1, todos los vasos sanguíneos del CNV fueron positivos para EphB4. Cabe destacar, que la expresión de EphB4 cambia de ubicación a lo largo del desarrollo postnatal. Para DP7, el endotelio de la ZSV expresó EphB4 mientras que el endotelio de la CRM y del BO fueron negativos para este marcador. A la segunda semana de vida postnatal, los vasos sanguíneos que delimitan la CRM fueron inmunopositivos para EphB4, mientras a la misma edad, los vasos sanguíneos de la ZSV y del BO fueron negativos. Finalmente, para DP60, sólo algunas células endoteliales de la ZSV expresaron EphB4. Ni el lecho vascular de la CRM, ni aquel del BO expresaron EphB4. 218755

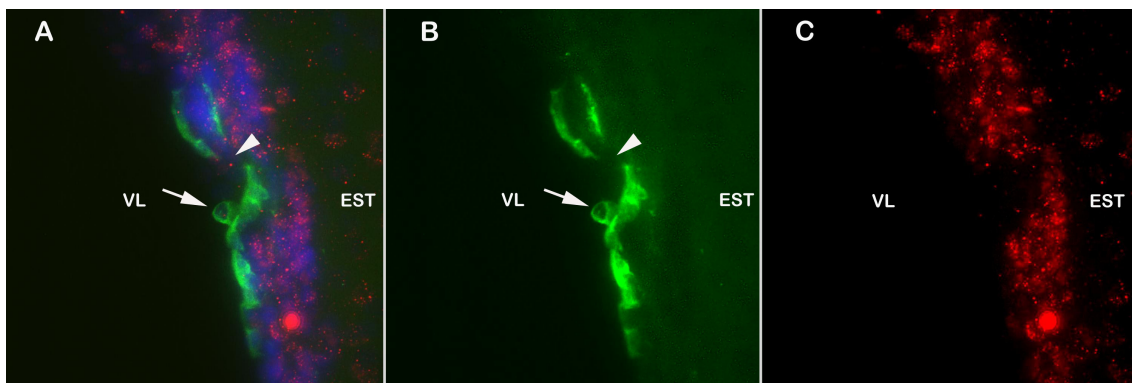
**6.4 Los vasos sanguíneos de la ZSV son mucho más permeables que aquellos ubicados en la CRM y BO <sup>b</sup>.**

Con el objetivo de determinar si la permeabilidad vascular es heterogénea a lo largo del CNV, co-inyectamos dos colorantes fluorescentes de forma intracardiaca. La fluoresceína de sodio (376 Da) administrada a ratas adultas de forma intracardiaca se extravasó y difundió a partir de las paredes vasculares de la ZSV. Por el contrario, los vasos sanguíneos de la CRM y del BO no mostraron extravasación de este colorante. Como control positivo para este ensayo se administró manitol previo a la infusión de fluoresceína de sodio y en efecto, los animales tratados con manitol presentaron mayor permeabilidad a fluoresceína a

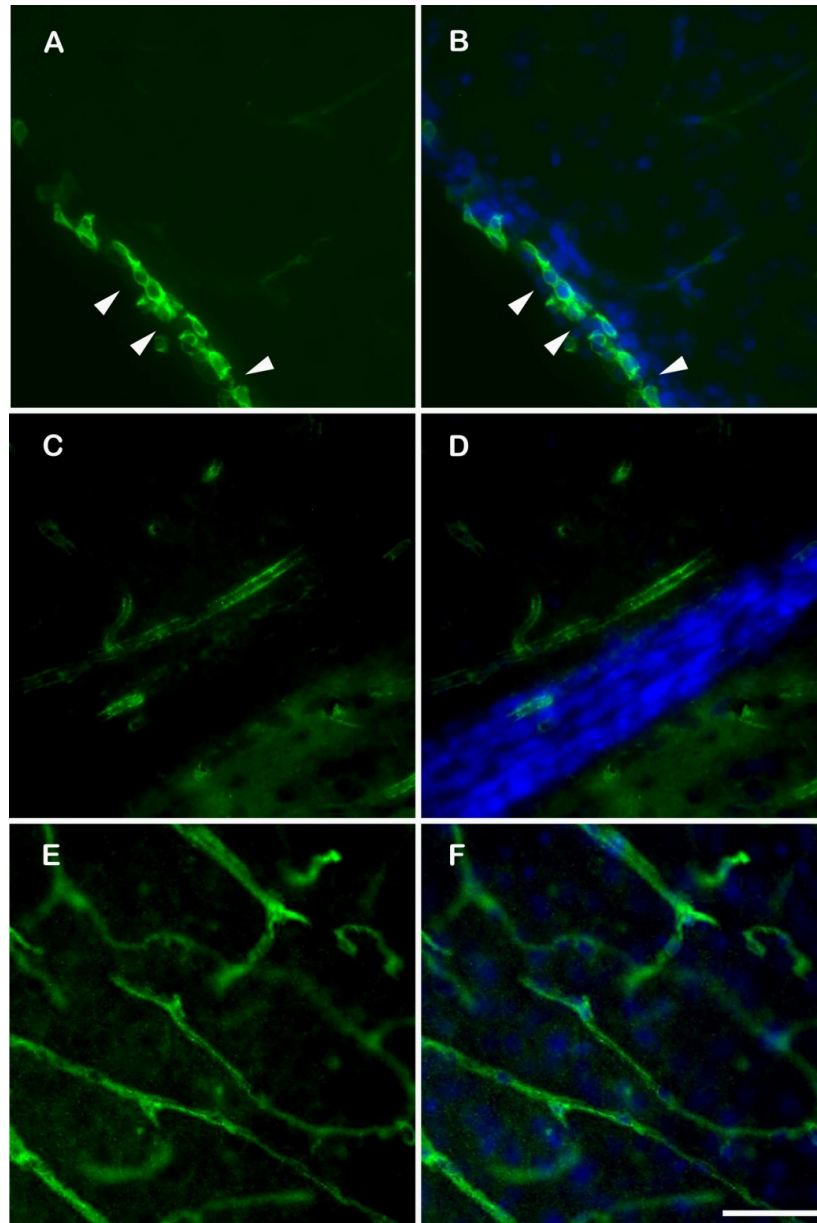
lo largo de la CRM y BO. Adicionalmente estudiamos la permeabilidad vascular a una molécula de gran tamaño (dextran fluorescente; 2,000 kDa) en ratones adultos. Algunos sitios a lo largo del lecho vascular de la ZSV de hecho permitieron la extravasación de dextran fluorescente (2,000 kDa).

### 6.5 La pared vascular de la ZSV es discontinua <sup>b</sup>.

La inmunotinción para el antígeno endotelial PECAM-1 reveló que las paredes vasculares en la ZSV son discontinuas con hendiduras amplias entre células endoteliales con abundante citoplasma y núcleos ovalados. La aperturas en estos vasos desembocan directamente a las colonias de células troncales neurales (Fig. 1). En contraste, las paredes de los vasos sanguíneos capilares ubicados a lo largo de la corriente rostral migratoria y del bulbo olfatorio fueron continuas y conformadas por un endotelio plano simple (Fig.2). Se sabe que estos endotelios están en estrecha relación con los neuroblastos migratorios <sup>29,37</sup>.



**Figura 1.** Inmunofluorescencia contra PECAM-1 en verde (B) y contra SOX-2 en rojo (C) en un corte sagital de cerebro de rata adulta. Los precursores neuronales de la ZSV marcados con Sox-2 se encuentran adyacentes a las células endoteliales de la ZSV algunas de las cuales muestran morfología redondeada (flecha) y discontinuidad del tubo vascular (Cabeza de flecha). Imagen combinada con DAPI en azul (A). VL: ventrículo lateral; EST: estriado. Imagen tomada a 60X.

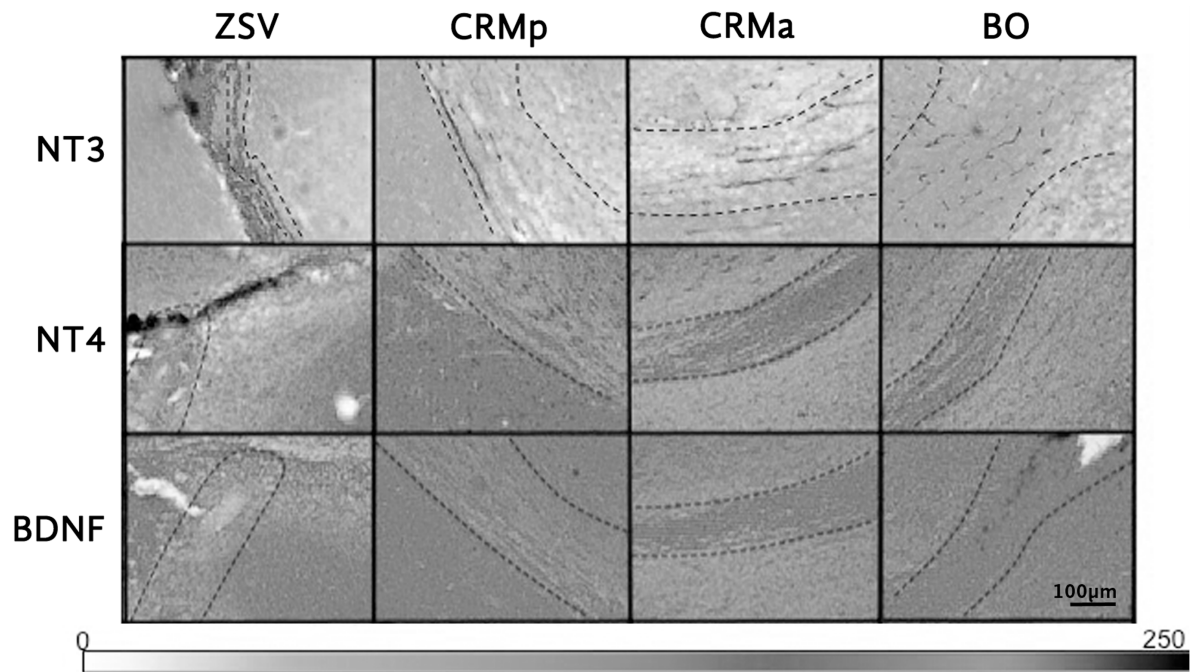


**Figura 2.** Inmunofluorescencia contra PECAM-1 (verde) en un corte sagital de cerebro de rata adulta. Los vasos sanguíneos de la ZSV (A,B) son discontinuos mientras que aquellos de la CRM (C,D) y del BO (E,F) son continuos con endotelio plano. DAPI: azul Barra escala 50  $\mu$ m.

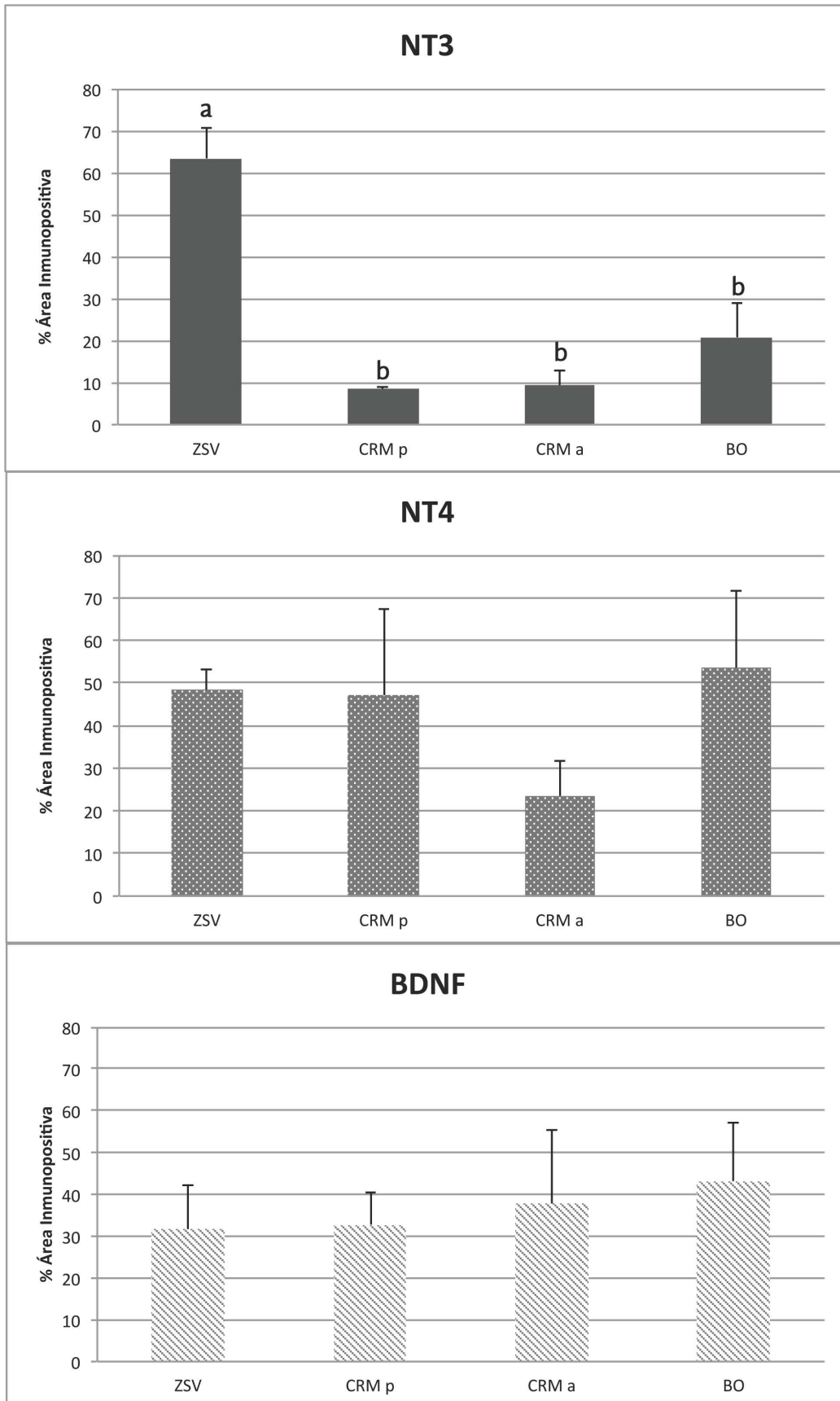
### 6.6 NT3 se distribuye de manera heterogénea a lo largo del CNV adulto.

Además de la permeabilidad diferencial, otro de los factores que podrían contribuir a un micro-ambiente heterogéneo es la distribución de factores tróficos, putativamente producidos por las células endoteliales. Nosotros estudiamos

específicamente la distribución de NT3, NT4 y BDNF. Como resultado encontramos que la inmunoreactividad para NT3 se distribuyó a lo largo de todo el CNV; sin embargo, el área inmunopositiva para esta neurotrofina fue mayor en la ZSV (Fig. 4 ;  $p < 0.05$ ). Cabe destacar que la marca para NT3 se observó asociada con vasos sanguíneos al menos en la CRM y en el BO (Fig. 3). Al estudiar el patrón de distribución de BDNF y NT4 no se encontraron diferencias significativas (Fig. 4).



**Figura 3.** Inmunohistoquímica contra las distintas neurotrofinas en un corte sagital con el CNV delimitado por líneas punteadas. La inmunoreactividad contra NT3 está asociada al lecho vascular en la CRM y en el BO. La disponibilidad de NT3, monitoreada a través de inmunotinciones, fue heterogénea a lo largo del CNV.





**Figura 4.** Gráficos de barras que muestran el porcentaje de área inmunoteñido para las distintas neurotrofinas. La expresión de cada NT entre las diferentes regiones del CNV se comparó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. a,b Literales distintas entre zonas para cada neurotrofina indica diferencias significativa

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)**BRAIN  
RESEARCH**

## Research Report

## EphB4 is developmentally and differentially regulated in blood vessels throughout the forebrain neurogenic niche in the mouse brain: Implications for vascular remodeling

Dannia Colín-Castelán<sup>a</sup>, Bryan V. Phillips-Farfán<sup>b</sup>, Gabriel Gutiérrez-Ospina<sup>a</sup>, Alma Lilia Fuentes-Farias<sup>c</sup>, Armida Báez-Saldaña<sup>a</sup>, Patricia Padilla-Cortés<sup>d</sup>, Esperanza Meléndez-Herrera<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología Celular y Fisiología and Grupo de Investigación de Células Troncales, IMPULSA 02, Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico

<sup>b</sup>Laboratorio de Neuromorfometría, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700, Letra C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Del. Coyoacán, 04530, Mexico

<sup>c</sup>Laboratorio de Ecología Sensorial, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Morelia Michoacán, 58230, Mexico

<sup>d</sup>Unidad de Cromatografía, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 31 January 2011

## Keywords:

Blood vessel

Vein

Neurogenesis

Vascular remodeling

Development

## ABSTRACT

Neurogenesis is a process influenced by environmental cues that create highly specific functional niches. Recently, the role of blood vessels in the maintenance and functioning of neurogenic niches during development and in adult life has been hallmarked. In addition to their trophic support for the highly demanding neurogenic process, blood vessels regulate neuroblast differentiation and migration and define functional domains. Since neurogenesis along the forebrain neurogenic niche (FNN) is a multistage process, in which neuroblast proliferation, differentiation and migration are spatially restricted to specific locations; we evaluated the structural features of vascular beds that support these processes during critical time points in their development. Additionally, we studied the molecular identity of the endothelial components of vascular beds using the expression of the venous marker EphB4. Our results show that blood vessels along the FNN: 1) are present very early in development; 2) define the borders of the FNN since early developmental stages; 3) experience constant remodeling until achieving their mature structure; 4) show venous features during perinatal developmental times; and 5) down-regulate their EphB4 expression as development proceeds. Collectively, our results describe the formation of the intricate vascular network that may support neurogenesis along the FNN and show that blood vessels along this neurogenic niche are dynamic entities that experience significant structural and molecular remodeling throughout development.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author. Fax: +52 443 31674121.

E-mail address: [oazul74@yahoo.com.mx](mailto:oazul74@yahoo.com.mx) (E. Meléndez-Herrera).

Abbreviations: E, embryonic day; FNN, forebrain neurogenic niche; PD, postnatal day

## 1. Introduction

Neurogenesis comprises several stages; including proliferation of stem cells, amplifying-cells and neuroblasts, neuroblast migration and neuroblast terminal differentiation. The forebrain neurogenic niche (FNN), formed by the subventricular zone (SVZ), rostral migratory stream (RMS) and olfactory bulb (OB), constitutes an anatomical entity where neurogenesis remains active postnatally (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Lois and Alvarez-Buylla, 1993). Neuroblasts arising from precursors at each of these sites migrate towards the glomerular and granular layers of the OB (Luskin, 1993, 1998). Substantial experimental evidence supports the concept that the fate of new olfactory interneurons in the postnatal brain is specified by the site where they are born (Mendoza-Torresblanca et al., 2008; Merkle et al., 2007), a circumstance that appears to depend on the embryological origin of the stem cell subsets that colonized distinctive FNN domains earlier during embryonic development (Young et al., 2007). However, the final phenotype of new olfactory interneurons in the postnatal brain seems not to be irreversibly defined by their fate commitment at birth sites, since both transit-amplifying neural precursors and neuroblasts are capable of phenotypic plasticity (Hack et al., 2005; Seidenfaden et al., 2006). Instead, the specification of neuronal fate appears to be a progressive process that occurs as neuronal precursors migrate and lose their ability to proliferate along the FNN (Hack et al., 2005; Luskin, 1998).

In addition to regional identity factors, extrinsic micro-environmental elements may still influence fate specification of new olfactory interneurons (Ninkovic and Gotz, 2007). Indeed, it is now recognized that specialized microenvironments are partly responsible for maintaining postnatal neurogenesis (Ninkovic and Gotz, 2007). Many elements (i.e., cell types and their secreted products) may “condition” such microenvironments. Among them, blood vessels are particularly important because they are likely to provide stem cells and transit-amplifying cells with short and long range signals to help maintain their self-renewal and differentiation properties (Riquelme et al., 2008; Shen et al., 2004, 2008; Tavazoie et al., 2008). Blood vessels may also serve as a scaffold through which neuroblasts find their way while migrating towards the OB (Bovetti et al., 2007; Whitman et al., 2009).

A full characterization of the vascular bed that supports neuroblast proliferation, commitment and migration along the FNN will thus improve our understanding of the requirements for sustaining postnatal neurogenesis. At this time, the precise structural and molecular identities of the vascular elements that support neurogenesis at different stages are not well defined. Thus, in this work we evaluated the presence and developmental pattern of the generic endothelial cell marker PECAM-1 to establish the distribution and developmental remodeling of the vascular bed along the FNN, during selected prenatal and postnatal ages. In addition, we characterized the expression pattern of the ephrin receptor EphB4, a known venous marker.

Our results showed intense vascular remodeling taking place along the FNN during prenatal and early postnatal development. Interestingly, starting at the earliest develop-

mental stages, blood vessels bordered the FNN. In addition, FNN blood vessels first show a venous identity and as development proceeds, the venous marker EphB4 is down regulated and/or restricted to specific domains along the FNN. Together, these results support the existence of highly specialized vascular niches or compartments along the FNN.

## 2. Results

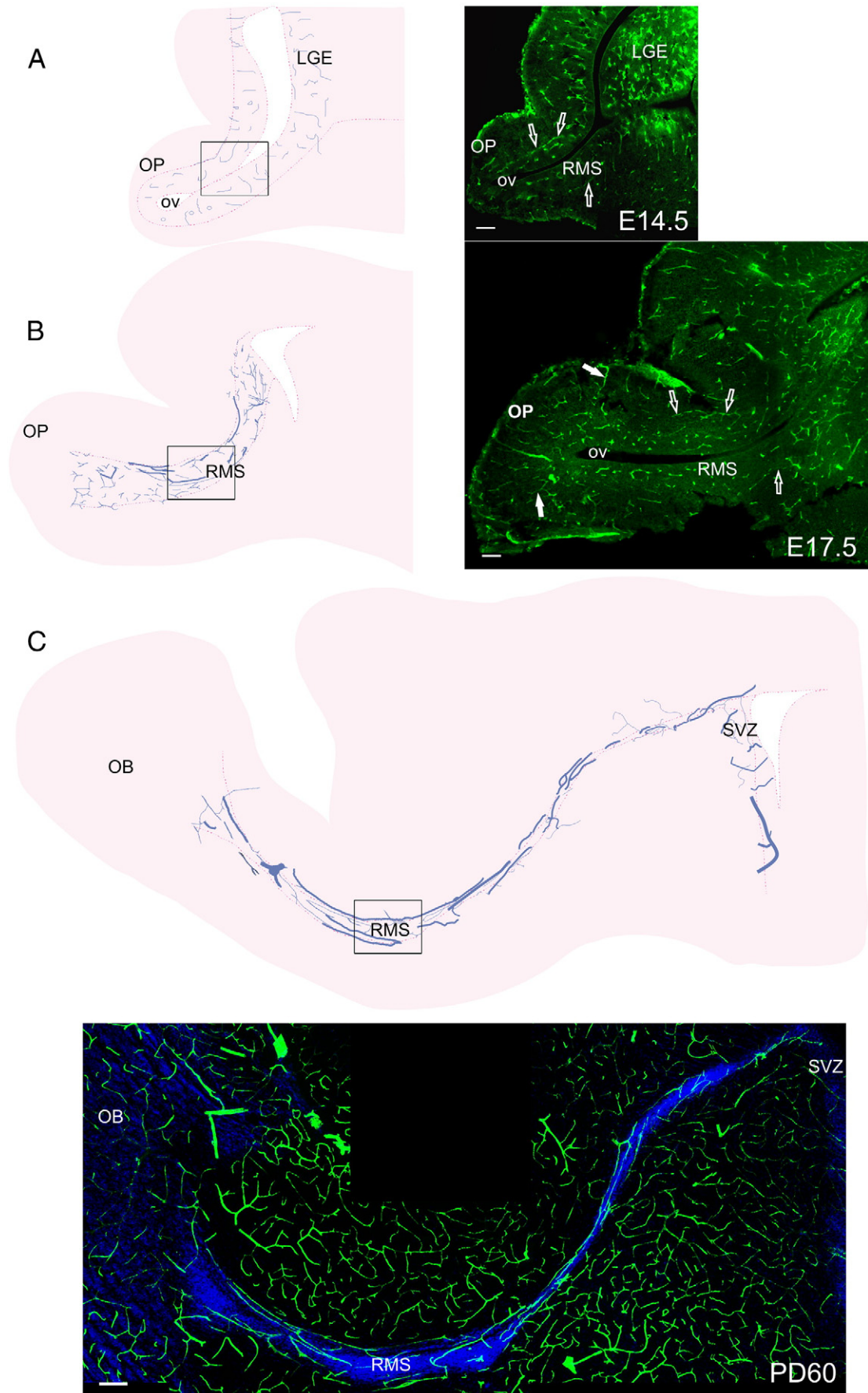
### 2.1. Blood vessels in the developing FNN re-orient during early embryonic stages

Radially oriented blood vessels predominated in the presumptive FNN at embryonic day (E) 14.5 (Fig. 1A). Three days later, blood vessels followed the longitudinal axis of the primordial FNN; with the exception of those located in the olfactory placode, which formed loop-like structures (Fig. 1B). This arrangement persisted until postnatal day (PD) 1 (see below). After this age, the entire vascular bed acquired a longitudinal orientation across the FNN, a configuration that was maintained until adulthood (Fig. 1C).

### 2.2. Blood vessels border the FNN and become more complex as development proceeds

Blood vessels were short, straight and relatively unbranched in the presumptive FNN at E14.5 (Figs. S1A and G, Suppl. Mat.), with the exception of a few longer blood vessels bordering the RMS elbow at its dorso-central aspect (Figs. 1A, 2A). At E17.5, blood vessels became longer and branched and vascular profiles become more frequent along the border of the RMS (Figs. 1B, 2B. See also Figs. S1B and H, Suppl. Mat.). By PD1, blood vessels increased slightly their branching and length along the FNN (Figs. S2C, S1C and I, Suppl. Mat.). At PD7, the formation of the vascular bed lining the borders of the entire RMS ended. However, the core of the RMS had a reduced amount of blood vessels; except at the level of the elbow, where some blood vessels were observed penetrating the RMS core (Fig. 2D). In contrast, blood vessels in the OB and SVZ were already abundant at this age (Figs. S1D and J, Suppl. Mat.). A remarkable change in blood vessel complexity occurred between PD7 and PD15 along the RMS: branches from bordering vessels invaded the RMS core (Figs. 2D, E; see also Figs. S1E and K, Suppl. Mat.). From this age onward, the FNN continued increasing its vascular complexity until reaching its mature form at PD60 (Fig. 2F; see also Figs. S1F and L, Suppl. Mat.).

Although as development proceeds the FNN shows increasing vascular density and complexity, this could be merely related to increasing FNN volume. However, the RMS elbow reached its maximum area at PD1 and was significantly reduced thereafter, until it reached maturity at PD60 ( $F_{(5,11)} = 59.239$ ,  $p \leq 0.001$ ; Fig. 2G). Interestingly, vessel density significantly increased with postnatal age until reaching its maximum value at PD60 ( $F_{(5,11)} = 6.108$ ,  $p = 0.006$ ; Fig. 2H). Additionally, vascular complexity, such as number of branches and number of junctions with three branches, gradually increased with age until achieving maximum values at PD60 ( $H_{(5,11)} = 5.133$ ,  $p = 0.400$  and  $H_{(5,11)} = 4.627$ ,  $p = 0.463$ , respectively; Figs. 2I and J).



### 2.3. EphB4 is developmentally regulated and heterogeneously expressed along the FNN as development proceeds

PECAM-1 positive blood vessels were immunoreactive for EphB4 along the FNN at E14.5, E17.5 and PD1 (Figs. 3A–I). Surprisingly, EphB4 labeling was not associated with FNN blood vessels at PD7 (Figs. 3J–L). At PD15, EphB4 immunoreactivity was again present in blood vessels along the RMS, but not in those located in the OB. A few blood vessels running through the SVZ also displayed EphB4 immunoreactivity (Figs. 3M–O); this was also observed at PD60. Finally, blood vessels along the RMS and within the OB were not EphB4 positive at PD60 (Figs. 3P–R).

## 3. Discussion

Neurogenesis is influenced by the environmental signals that neuronal precursors encounter at different locations. These signals are likely supplied by distinct cellular elements, among which endothelial cells are known to play an important role. In this regard, endothelial cells are critical components of brain homeostasis (Rizzo and Leaver, 2010). They interact with glial and neuronal elements throughout the brain to define highly specific functional domains (De Seranno et al., 2004). Recently, it has been shown that they play a crucial role for the maintenance and function of neurogenic niches during development and in adult life (Palmer et al., 2000; Shen et al., 2004; Tavazoie et al., 2008).

As brain vascular beds are basically composed by veins and arteries, it is likely that the notable physiological and molecular differences between both vessel populations could sustain different neurogenic events, such as neuronal differentiation (Mukouyama et al., 1997) or neuroblast migration (Anstrom et al., 2005).

The expression pattern of the generic endothelial cell marker PECAM-1 and the venous marker EphB4 was studied at selected developmental ages, to characterize the dynamic remodeling of the specialized endothelium that supports neurogenesis along the FNN.

### 3.1. Intense vascular remodeling occurs throughout the FNN during prenatal and perinatal developmental ages

Blood vessels were present in the presumptive FNN as early as E14.5. During this developmental age they were scarce, poorly branched and predominantly radially oriented. From E17.5 until PD1, blood vessels along the FNN underwent gradual

remodeling and became more abundant, longer and more ramified. They also changed their orientation to a longitudinal course. From PD1 until PD60 blood vessels continued increasing in complexity and length, until reaching maximum levels at PD60. At the same time, the area of the FNN decreased with age. These results could be related to the intense angiogenic activity that begins at E14.5 and wanes by PD60 (Figs. S2A and B, Suppl. Mat).

### 3.2. Blood vessels border the FNN from early developmental stages

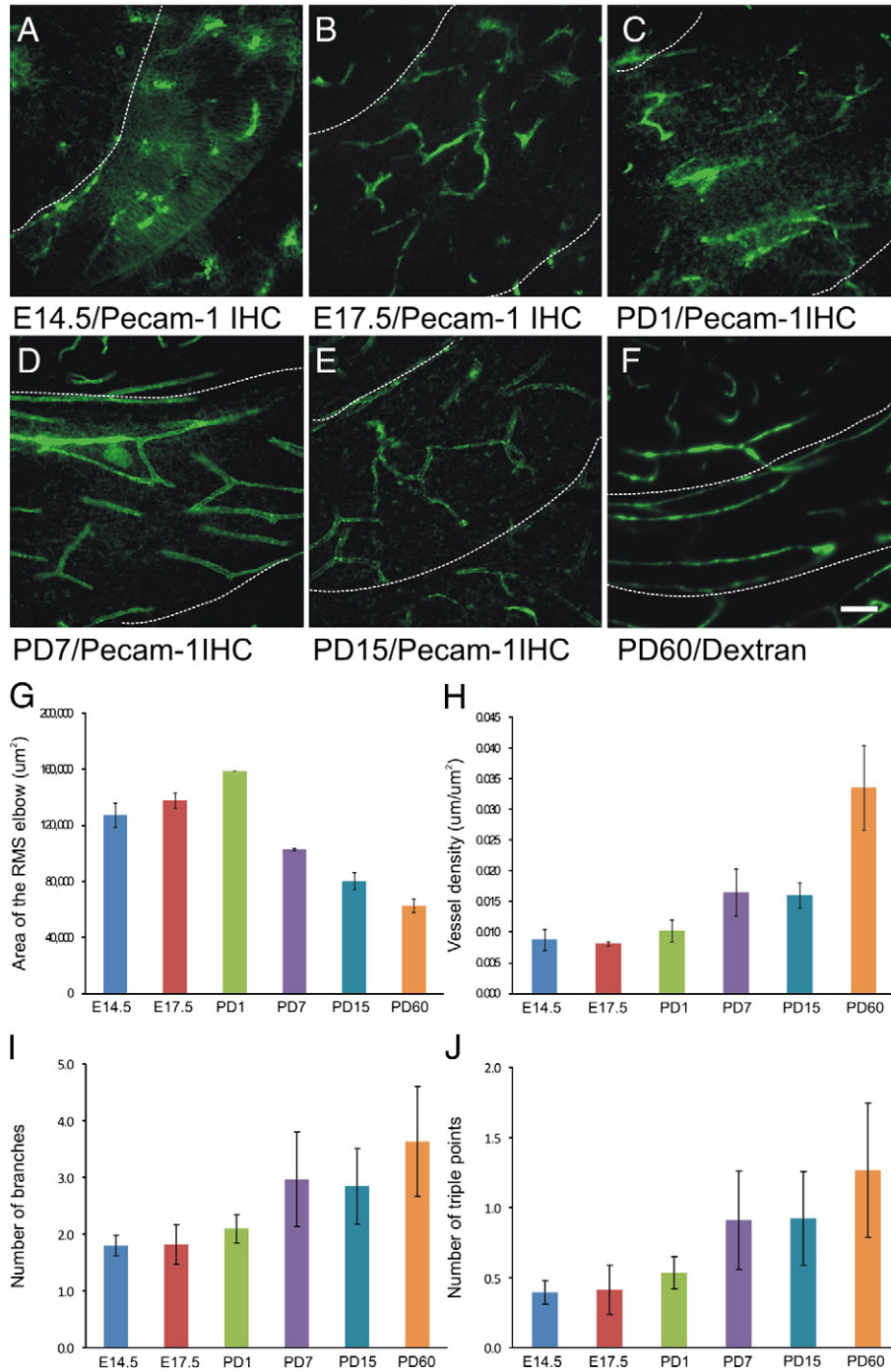
Blood vessels began bordering the dorsal aspect of the FNN as early as E14.5. Then, they appeared more profusely in the ventral aspect of the FNN by E17.5. By around PD7 blood vessels fully bordered the FNN. These observations may be important, since the mechanisms that keep migrating neuroblasts inside the RMS borders are poorly understood (Belvin-drah et al., 2007). In this context, blood vessels could establish a “physical barrier”: by themselves during embryonic and early postnatal ages or together with astrocytes starting at PD7, when astrocytes begin their appearance on the borders of the FNN (De Seranno et al., 2004; Peretto et al., 2005). Interestingly, we have previously shown that FNN blood vessels might function as a local source of semaphorins, molecules known to participate as chemorepellents or chemoattractants (Melendez-Herrera et al., 2008).

### 3.3. EphB4-positive blood vessels support early neurogenesis throughout the FNN

During perinatal developmental stages (E14.5, E17.5 and PD1), FNN blood vessels show a venous identity, as suggested by EphB4 expression. As development proceeds (PD7), EphB4 is down-regulated along the FNN. Interestingly, during early stages in the formation of the FNN, a time during which neuroblasts migrate in clusters directly associated to blood vessels without a glial scaffold (E14.5–PD1), blood vessels show EphB4 expression. Together, these observations are in agreement with previous data showing that germinal cells are associated to venous vessels while migrating (Anstrom et al., 2005). At later stages this might not be the case, because from PD7 until adulthood, EphB4 is down-regulated in blood vessels inside the FNN.

Alternatively, EphB4 expression in perinatal blood vessels could be an indicator of capillary sprouting and not specifically a venous marker, as has been recently suggested (Taylor et al., 2007). However, it is precisely at the developmental times when major remodeling is occurring (between PD1 and

**Fig. 1 – Blood vessels change their orientation as embryonic development proceeds. Diagrams representing blood vessels in sagittal sections of the FNN and their corresponding photomicrographs showing immunofluorescence against PECAM-1 (green) at E14.5 (A) and E17.5 (B) and *in-vivo* blood vessel filling with dextran (green) and DAPI counterstaining (blue) at PD60. Notice the radial orientation of most blood vessels at E14.5 (A). In contrast, at E17.5 (B) blood vessels were tangentially oriented following the direction of neuroblast migration except for some blood vessel loops in the OP (white arrows). This orientation persisted until adulthood (C). Empty arrows on E14.5 and E17.5 photomicrographs show long vessels delimiting FNN borders. The location of RMS elbow is shown by boxes. LGE, lateral ganglionic eminence; OP, olfactory placode; OV olfactory ventricle; RMS, rostral migratory stream; SVZ, subventricular zone. Scale bar 50  $\mu$ m.**



**Fig. 2** – Blood vessels border the FNN since early developmental stages and experience constant remodeling during prenatal and postnatal ages. Blood vessels stained by immunofluorescence against PECAM-1 (A-E) or by *in-vivo* blood vessel filling with dextran (F), in sagittal sections of the RMS elbow at different developmental ages. Blood vessels at E14.5 were scarce and did not show a lot of branching (A). The vascular tree increased in complexity with increasing age along the FNN (B-F). However, blood vessels were present in the borders of the presumptive FNN (dashed lines) since early development and at all ages studied. Scale bar 50 μm. All graphs show means ± S.E.M. The area of the RMS elbow decreased with increasing developmental stage (G; all pair-wise comparisons were significantly different,  $p \leq 0.05$  or  $0.01$ , except E14.5 vs. E17.5) and the total length of vessels per observation area at every age is shown as vessel density (H; PD60 was significantly different from all other ages,  $p \leq 0.05$ , except for PD7). Number of branches and number of vessels with three branches is also shown (no significant differences were found).

PD60) that EphB4 expression is down-regulated throughout the FNN.

Finally, the fact that EphB4 expression along FNN vascular bed shifts to different locations depending on the developmental stage, supports the concept of the existence of vascular compartments across this neurogenic niche.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Age selection

Several critical developmental ages were selected to study the establishment of the vascular niche that supports neurogenesis throughout the FNN. The earliest prenatal age studied was E14.5, an age during which neuroblast migration is radial from the lateral ventricle to the olfactory placode. Three days later, at E17.5, neuroblasts change their orientation and migrate as a continuous stream from the lateral ventricles to the OB (Tucker et al., 2006). During PD1, neuroblasts in the RMS migrate as a homogenous mass and until PD7 migrating cells along the FNN are in direct contact with blood vessels (Peretto et al., 2005). By PD15, chain migration starts and mature astrocytes appear in the RMS (Peretto et al., 2005). By PD60, the FNN has acquired its mature non-vascular and vascular structure (Melendez-Herrera et al., 2008) and neuroblasts migrate as chains ensheathed by astrocytes (Lois et al., 1996; Peretto et al., 2005) and associated to blood vessels.

We described the vascular architecture of the lateral ganglionic eminence (LGE) during prenatal ages, because it has been shown that the SVZ is a remnant of this structure (Tucker et al., 2006; Young et al., 2007).

### 4.2. Animals

The CD1 mice we used were bred in the animal facility of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Mice had free access to food and water. Animal handling and experimentation followed the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health. All of the experimental protocols were approved by the animal rights' committee at the Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Timed-pregnant mothers were intraperitoneally injected with sodium pentobarbital (45 mg/kg body weight) and embryos were surgically removed from uterus, anesthetized by hypothermia and decapitated. The brains were dissected and then fixed by immersion in buffered paraformaldehyde for 24 h at 4 °C. Postnatal mice were anesthetized with sodium pentobarbital on the day of sacrifice and perfused transcardially with saline (0.9%, Sigma) followed by buffered paraformaldehyde (4%; Sigma). The brains were removed, post-fixed in the same fixative overnight at 4 °C, cryo-protected with a solution of buffered sucrose (30%; J.T. Baker) at 4 °C until they sank, frozen in pre-chilled 2-methylbutane (Sigma) and stored at –80 °C. Sagittal sections (30 µm thick) were obtained with a cryostat and either mounted onto gelatin-coated slides (E14.5, E17.5 and PD1) or preserved as free floating sections (PD7, PD15 and PD60) in a cryoprotective solution containing glycerol (25%; Sigma), ethylene glycol (25%; J.T. Baker) and phosphate

buffered saline (PBS, 50%). Finally, sections were processed for immunofluorescence.

For each experimental procedure, at least two brains from each developmental stage were processed. For immunohistochemistry protocols we frequently use consecutive sections for different antigens and try to employ at least two sections by protocol to minimize the number of animals employed. However, since the thickness of the FNN changes as development proceeds, it is difficult to quantify the exact number of sections that were used per animal. Vascular complexity analysis was performed in independent sections of at least two animals by studied age.

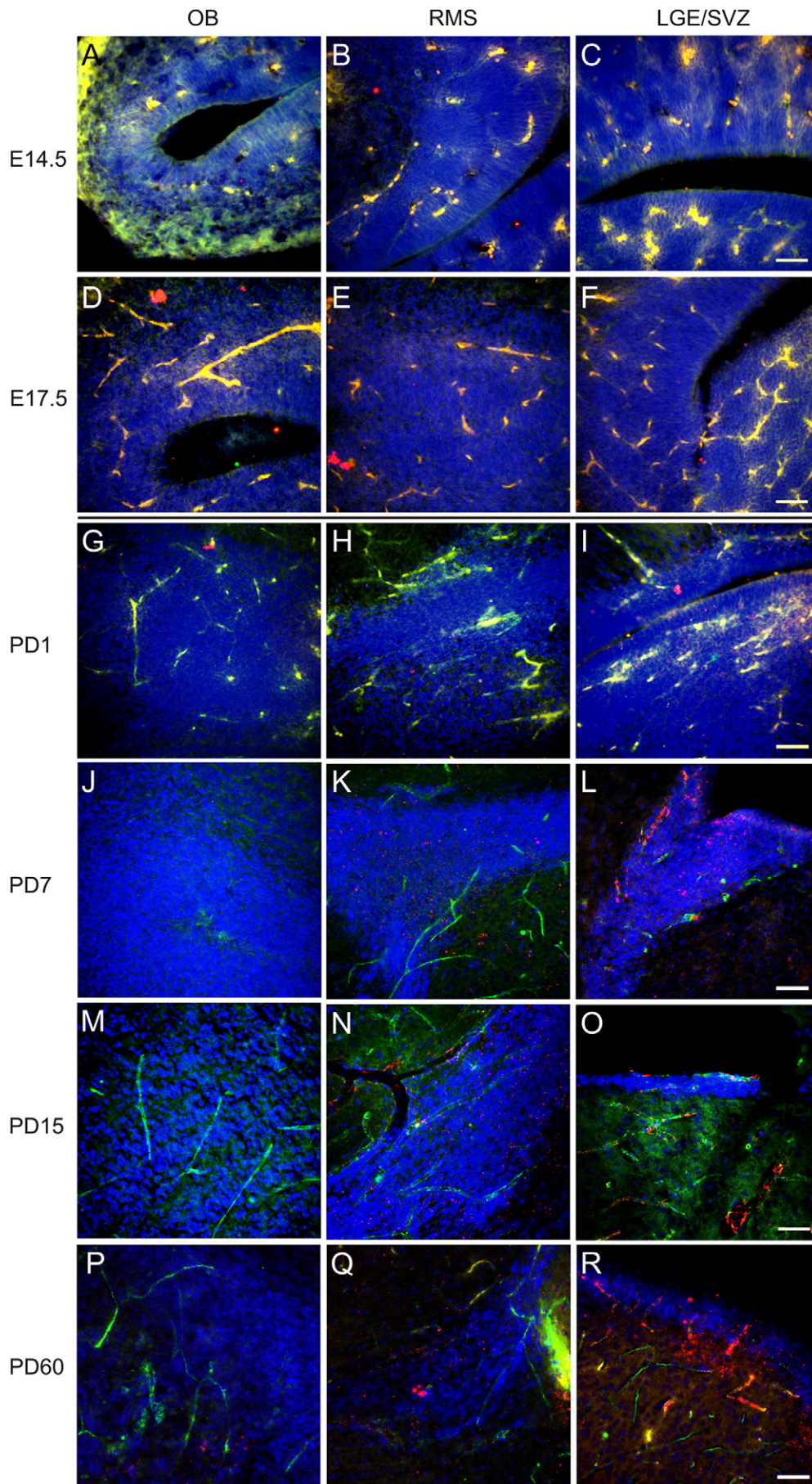
### 4.3. Immunofluorescence

Single or double immunofluorescence experiments were performed using a rat anti PECAM-1 monoclonal antibody (1:150; MEC13.3, BD Pharmingen) to specifically identify endothelial cells and a goat anti-EphB4 polyclonal antibody to identify venous endothelial cells (1:150; SC-7285, Santa Cruz Biotechnology).

Sections were rinsed twice with PBS plus 0.3% Triton X-100 (PBTx; Sigma) and then incubated in an immuno-retriever solution with citrate (Bio SB Inc.) for 30 min at 65 °C. Subsequently, sections were incubated with a blocking solution containing 5% horse normal serum (Gibco) and 5% albumin (Roche) diluted in PBTx, for 30 min at room temperature. Then, they were incubated with anti-PECAM-1 antibody at 4 °C overnight. After washing with PBTx, sections were incubated with a goat anti-rat biotinylated secondary antibody (1:750; Chemicon) for two hours at room temperature. Afterwards, sections were washed and incubated with fluorescein-conjugated avidin (1:200; Vector Laboratories) diluted in bicarbonate buffer (NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M and NaCl 0.1 M pH 8.3) for 90 min. Sections were stained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) and mounted onto glass slides with an anti-fading agent (DAKO) or processed by double immunofluorescence incubating them with anti-EphB4 antibody overnight at 4 °C. At the end of this period, sections were thoroughly washed with PBTx and incubated for 2 h with a donkey anti-goat Alexa Fluor 555 (1:750; A-21432, Invitrogen) secondary antibody. Finally, after washing overnight at 4 °C, sections were incubated 2 min with DAPI and mounted as described above.

### 4.4. In-vivo blood-vessel filling

We performed in-vivo blood-vessel filling experiments using fluorescein labeled dextran (1%; dextran, 2,000,000 MW, Invitrogen) in order to visualize the vascular bed in the adult mouse brain. PD60 mice were anesthetized by intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital. Animals received an intra-cardiac injection of heparin (0.5 mg/kg body weight), followed by dextran. Mice were decapitated and their brains were dissected 2 min after dextran injection. The brains were post-fixed in buffered formalin (10%; Sigma) at 4 °C for 48 h and cryo-protected with buffered sucrose at 30% for another 48 h. Afterwards, brains were frozen in pre-chilled 2-methylbutane with dry ice. Sagittal sections (50 µm thick) were obtained with a cryostat, mounted onto gelatinized slides and counterstained





with DAPI for 2 min. After rinsing with PBS, sections were covered with an anti-fading agent (Dako).

#### 4.5. Image acquisition and analysis

All the sections were observed using an Olympus BX51WI microscope equipped with a Disk Scanning Unit (DSU; Olympus) and an automatic slide (Micro Bright Field Bioscience). All images were taken with the Stereo Investigator software (Micro Bright Field Bioscience) and processed with ImageJ (NIH).

For vascular complexity analysis the ImageJ Analyze-Skeleton plugin was employed (<http://pacific.mpi-cbg.de/AnalyzeSkeleton>). Briefly, original photomicrographs were used as templates to draw blood vessels conserving their thickness features. This drawn image was made binary and then skeletonized. The analysis provided results of total vessel length, number of branches, number of triple points, etc. In every image, FNN total area was measured and graphed against developmental age (Fig. S1G, Suppl. Mat.). For vessel density the total length of vessels per observation area was analyzed (Leunig et al., 1992). All statistical comparisons were made with SigmaStat software. Area and vessel density comparisons were made with one-way ANOVAs and the Holm-Sidak post-hoc test was used for pair-wise multiple comparison procedures. On the other hand, the number of branches and triple points were compared with Kruskal-Wallis tests and Dunn's test was used for pair-wise multiple comparison procedures.

Supplementary materials related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.brainres.2011.01.110](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.110).

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT no. IN210105) and from IMPULSA 02, Universidad Nacional Autónoma de México. Additional funding was provided by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT no. P45872-M). Esperanza Meléndez-Herrera was a postdoctoral fellow that received support from DGAPA-UNAM.

#### REFERENCES

Anstrom, J.A., Thore, C.R., Moody, D.M., Challa, V.R., Block, S.M., Brown, W.R., 2005. Germinal matrix cells associate with veins and a glial scaffold in the human fetal brain. *Brain Res. Dev.* 160, 96–100.

Belvindrah, R., Hankel, S., Walker, J., Patton, B.L., Muller, U., 2007. Beta1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. *J. Neurosci.* 27, 2704–2717.

Bovetti, S., Hsieh, Y.C., Bovolin, P., Perroteau, I., Kazunori, T., Puche, A.C., 2007. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J. Neurosci.* 27, 5976–5980.

De Seranno, S., Estrella, C., Loyens, A., Cornea, A., Ojeda, S.R., Beauvillain, J.C., Prevot, V., 2004. Vascular endothelial cells promote acute plasticity in ependymogial cells of the neuroendocrine brain. *J. Neurosci.* 24, 10353–10363.

Doetsch, F., Alvarez-Buylla, A., 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 14895–14900.

Hack, M.A., Saghatelian, A., de Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P.M., Gotz, M., 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat. Neurosci.* 8, 865–872.

Leunig, M., Yuan, F., Menger, M.D., Boucher, Y., Goetz, A.E., Messmer, K., Jain, R.K., 1992. Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res.* 52, 6553–6560.

Lois, C., Alvarez-Buylla, A., 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 2074–2077.

Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978–981.

Luskin, M.B., 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173–189.

Luskin, M.B., 1998. Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate. *J. Neurobiol.* 36, 221–233.

Melendez-Herrera, E., Colin-Castelan, D., Varela-Echavarría, A., Gutierrez-Ospina, G., 2008. Semaphorin-3A and its receptor neuropilin-1 are predominantly expressed in endothelial cells along the rostral migratory stream of young and adult mice. *Cell Tissue Res.* 333, 175–184.

Mendoza-Torreblanca, J.G., Martinez-Martinez, E., Tapia-Rodriguez, M., Ramirez-Hernandez, R., Gutierrez-Ospina, G., 2008. The rostral migratory stream is a neurogenic niche that predominantly engenders periglomerular cells: in vivo evidence in the adult rat brain. *Neurosci. Res.* 60, 289–299.

Merkle, F.T., Mirzadeh, Z., Alvarez-Buylla, A., 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317, 381–384.

Mukoyama, Y., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T., Tomoda, T., Saffen, D., Oishi, M., Watanabe, T., 1997. Induction of protein tyrosine phosphatase epsilon transcripts during NGF-induced neuronal differentiation of PC12D cells and during the development of the cerebellum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 50, 230–236.

Ninkovic, J., Gotz, M., 2007. Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 338–344.

Palmer, T.D., Willhoite, A.R., Gage, F.H., 2000. Vascular niche for

**Fig. 3 – The venous marker EphB4 is developmentally and differentially regulated in blood vessels throughout the FNN. EphB4 (red) expression pattern on PECAM-1-positive blood vessels (green) in sagittal sections of the OB (A, D, G, J, M, P), RMS (B, E, H, K, N, Q) and LGE/SVZ (C, F, I, L, O, R) at E14.5 (A–C), E17.5 (D–F), PD1 (G–I), PD7 (J–L), PD15 (M–O) and PD60 (P–R). All PECAM-1 positive blood vessels were immunoreactive for EphB4 at E14.5 (A–C), E17.5 (D–F) and PD1 (G–I). Notice that EphB4 was not associated with blood vessels at PD7 (J–L). At PD15 there was some EphB4 immunoreactivity associated with blood vessels in the RMS (N) and SVZ (O), but not in the OB (M). At PD60 blood vessels along the RMS (Q) and OB (P) were negative for this marker, in contrast to the SVZ (R). Scale bar 50 μm.**

- adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 425, 479–494.
- Peretto, P., Giachino, C., Aimar, P., Fasolo, A., Bonfanti, L., 2005. Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *J. Comp. Neurol.* 487, 407–427.
- Riquelme, P.A., Drapeau, E., Doetsch, F., 2008. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363, 123–137.
- Rizzo, M.T., Leaver, H.A., 2010. Brain endothelial cell death: modes, signaling pathways, and relevance to neural development, homeostasis, and disease. *Mol. Neurobiol.* 42, 52–63.
- Seidenfaden, R., Desoeuvre, A., Bosio, A., Virard, I., Cremer, H., 2006. Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 187–198.
- Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., Temple, S., 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304, 1338–1340.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., Temple, S., 2008. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell–cell interactions. *Cell Stem Cell* 3, 289–300.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., Doetsch, F., 2008. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 279–288.
- Taylor, A.C., Murfee, W.L., Peirce, S.M., 2007. Expression along adult rat microvascular networks: EphB4 is more than a venous specific marker. *Microcirculation* 14, 253–267.
- Tucker, E.S., Polleux, F., LaMantia, A.S., 2006. Position and time specify the migration of a pioneering population of olfactory bulb interneurons. *Dev. Biol.* 297, 387–401.
- Whitman, M.C., Fan, W., Relu, L., Rodriguez-Gil, D.J., Greer, C.A., 2009. Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J. Comp. Neurol.* 516, 94–104.
- Young, K.M., Fogarty, M., Kessaris, N., Richardson, W.D., 2007. Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *J. Neurosci.* 27, 8286–8296.

# Differential Vascular Permeability Along the Forebrain Ventricular Neurogenic Niche in the Adult Murine Brain

Dannia Colín-Castelán,<sup>1,2</sup> Jesús Ramírez-Santos,<sup>1</sup> and Gabriel Gutiérrez-Ospina<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F., Ciudad de México, México

<sup>2</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F., Ciudad de México, México

<sup>3</sup>Coordinación de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F., Ciudad de México, México

Adult neurogenesis is influenced by blood-borne factors. In this context, greater or lesser vascular permeability along neurogenic niches would expose differentially neural stem cells (NSCs), transit amplifying cells (TACs), and neuroblasts to such factors. Here we evaluate endothelial cell morphology and vascular permeability along the forebrain neurogenic niche in the adult brain. Our results confirm that the subventricular zone (SVZ) contains highly permeable, discontinuous blood vessels, some of which allow the extravasation of molecules larger than those previously reported. In contrast, the rostral migratory stream (RMS) and the olfactory bulb core (OBc) display mostly impermeable, continuous blood vessels. These results imply that NSCs, TACs, and neuroblasts located within the SVZ are exposed more readily to blood-borne molecules, including those with very high molecular weights, than those positioned along the RMS and the OBc, subregions in which every stage of neurogenesis also takes place. These observations suggest that the existence of specialized vascular niches is not a precondition for neurogenesis to occur; specialized vascular beds might be essential for keeping high rates of proliferation and/or differential differentiation of neural precursors located at distinct domains. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** adult neurogenesis; neurovascular niche; vascular permeability; RRID:AB\_393571; RRID:RGD\_2312511; RRID:AB\_393571; RRID:AB\_2336202

Neurogenesis in the adult brain is a process tightly controlled by endothelial cells (Seki, 2003; Wurmser et al., 2004). Accordingly, clusters of proliferating neural stem cells (NSCs) and transit amplifying cells (TACs) lie on specialized vascular niches whose endothelial cells release soluble factors (Mackenzie and Ruhrberg, 2012) that stimulate NSC/TAC self-renewal, inhibit NSC/TAC differentiation, and enhance neuron production (Shen et al., 2004). Endothelial cells not only influence the ability of NSCs/TACs to proliferate and differentiate, they also work as vascular scaffolds that guide adult migrating neuroblasts to their final location in the

olfactory bulb (Bovetti et al., 2007). This process likely occurs along the rostral migratory stream (RMS), where migrating neuroblasts and endothelial cells are positioned in close proximity (Snayyan et al., 2009; Whitman et al., 2009).

Vascular regulatory actions on adult neurogenesis might not be mediated only by cell-to-cell contacts and paracrine signaling (Bovetti et al., 2007; Tavazoie et al., 2008; Bozoyan et al., 2012). Differentially permeable blood vessels could allocate blood-borne soluble factors

## SIGNIFICANCE:

The formation of new neurons in the adult brain opens the possibility of developing measures to restore neural function by replacing damaged neurons. Blood vessels could provide messengers traveling through the bloodstream that may influence the decisions of neuron precursors to become specific neuron types. This work reveals that the permeability properties of blood vessels in sites where new neurons are being actively produced vary significantly; some of them are discontinuous and highly permeable, whereas others are continuous and impermeable. We think that different types of blood vessels may help in maintaining differential proliferation and/or neuronal differentiation paths.

Contract grant sponsor: Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México; Contract grant number: PAPIIT IN203912; Contract grant sponsor: Programa Universitario de Investigación en Células Troncales Neuronales IMPULSA 02, Universidad Nacional Autónoma de México; Contract grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (to D. C.-C. fellowship number 334825).

\*Correspondence to: Gabriel Gutiérrez-Ospina, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Ciudad de México 04510, México. E-mail: gabo@biomedicas.unam.mx

Received 17 March 2015; Revised 24 September 2015; Accepted 5 October 2015

Published online 22 October 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23682

into distinct domains of the neurogenic niche. In support of this notion, Tavazoie et al. (2008) reported the absence of tight junctions, astroglial endfeet, and pericyte coverage at sites where NSCs and TACs contact endothelial cells in the subventricular zone (SVZ). They also showed that blood-borne molecules do indeed reach the SVZ. Nevertheless, it remains an open question whether these specialized vascular beds also exist in other areas along the forebrain neurogenic niche, such as the RMS and the olfactory bulb core (OBC), where all stages of neurogenesis also take place (Luskin, 1998; Coskun and Luskin, 2002; Mendoza-Torreblanca et al., 2008). Thus, the current study undertakes a description, evaluating the permeability properties of the vascular bed along the adult forebrain neurogenic niche (FNN).

## MATERIALS AND METHODS

### Animal Handling and Procedures

Adult male Wistar rats (PD60; RRID:RGD\_2312511; n = 13) and adult male CD1 mice (PD60; n = 4) born and raised at the animal facility of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), were maintained on a 12-hr light–dark cycle in humidity- and temperature-controlled rooms, with *ad libitum* access to food and water. On the sacrifice day, animals were euthanized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (45 mg/kg body weight [BW]). Rats used for immunofluorescence and immunocytochemistry were perfused with isotonic saline solution and then with 4% buffered paraformaldehyde. Afterward, the brains were dissected and postfixed in 4% buffered paraformaldehyde for 24 hr at 4 °C. Brain cryoprotection was achieved by placing the brains into a 30% buffered sucrose solution at 4 °C until they sank. The samples were then frozen and sliced in a cryostat (30 µm). Sagittal slices were kept in cryopreserving solution (25% glycerol, 25% ethylene glycol, 50% phosphate-buffered saline [PBS]) at –20 °C until further processing. For semithin sectioning, two rats were perfused as described above with the exception that a modified Karnovsky's solution (2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, in 0.1 M cacodylate buffer) was used. Then, FNN subregions were dissected (~1 mm<sup>3</sup>) and postfixed in the same buffer for 72 hr at room temperature. The fixed tissue was then rinsed in cacodylate buffer, postfixed in 2% aqueous osmium tetroxide, and stained *en bloc* with uranyl acetate before being dehydrated in ethanol and included in Epon. Semithin sections were cut and stained with toluidine blue and examined via light microscopy. The bioethics committee for animal use at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, approved all the protocols.

### Vascular Permeability Assay

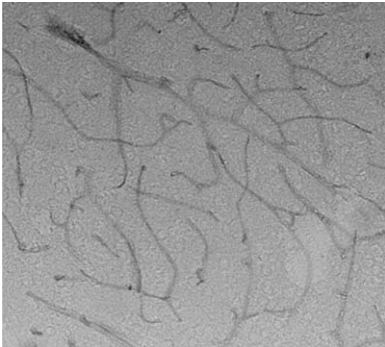

To study brain vascular permeability along the FNN, we coinjected two different-sized fluorescent dyes. Rats (n = 4) were anesthetized (ketamine:xylazine, 55 mg/kg BW, 6.8 mg/kg BW intraperitoneally), and an abdominal incision was performed to expose the diaphragm. Fluorescent dyes (a mixture of Evan's blue 960 Da, 60 mg/kg BW + sodium fluorescein 376 Da, 120 mg/kg BW) were then injected intracardially

through the diaphragm after having ensured this muscle's integrity to avoid pulmonary collapse. This technique allows both the visualization of the vascular pattern with Evan's blue, because this dye does not extravasate under normal circumstances (Hawkins and Eggleton, 2006; del Valle et al., 2008; Kaya and Ahishali, 2011), and the identification of highly permeable vascular sites with sodium fluorescein. Three minutes after the injection, the animals were decapitated, and their brains were rapidly dissected and immediately frozen in prechilled 2-methylbutane at –45 °C. The entire procedure prevents the leakage of the cerebrospinal fluid (CSF) from the ventricular cavities. Thus, if the dyes had reached the CSF during their infusion, the ventricular lumen would have appeared stained. The sagittal sections (50 µm) were obtained by using a cryostat mounted on gelatin-coated slides and were observed via fluorescence microscopy. As a positive control, we used mannitol-pretreated rats (n = 4). These animals were injected with 5 ml of 2 M mannitol 5 min before dye infusion. Mannitol is an inert mannose derivative that, when administered intracardially in high concentrations, causes an osmotic opening of the blood–brain barrier. The FNN was located in fluorescein-infused brain sections by inferring its position from the adjacent cresyl violet-stained sections. We also studied vascular permeability to high-molecular-weight molecules in mice (n = 4), given the cost of the fluorescent dextran (1%; dextran–fluorescein isothiocyanate, 2,000,000 MW; Invitrogen, Carlsbad, CA). Two minutes after the injection of the dye, the animals were decapitated, and their brains were obtained and postfixed in 10% formalin for 48 hr at 4 °C. Later, the brains were incubated in a 30% buffered sucrose solution at 4 °C until they precipitated. The samples were then frozen and sliced in a cryostat (50 µm). Finally, the sections were counterstained with 4',6-diamidino-2 phenylindole (DAPI), washed, and mounted for observation.

### Immunofluorescence

Floating sections were washed three times (10 min each) with PBS + 0.3% Triton X-100 (PBST). The sections were then incubated in a citrate solution for antigen retrieval for 30 min at 65 °C (Immuno-Retriever, BSB 0020; Bio SB, Santa Barbara, CA). Afterward, the sections were washed three times with PBS and then incubated in a blocking solution (5% horse serum + 5% bovine serum albumin diluted in PBST) for 30 min at room temperature. After this, the rat anti-mouse CD31/PECAM-1 monoclonal antibody MEC 13.3 was added (catalog No. 550274, RRID:AB\_393571; BD Pharmingen, San Diego, CA; see Table I), and sections were incubated overnight at 4 °C. Later, the sections were washed again and then incubated with a biotinylated goat anti-mouse IgG secondary antibody for two hours (catalog No. BA-9400, RRID:AB\_2336202; Vector Laboratories, Burlingame, CA See Table I). The location of the signal was revealed by the addition of fluorescein-coupled avidin (1:200, A-1100; Vector Laboratories). Later, all the sections were counterstained with DAPI, washed, and mounted onto slides with an antifade mounting medium. The morphology and distribution of the PECAM-1 staining are appropriate to what has been reported previously (Akers et al., 2010).

TABLE I. Antibodies Used

Antibody	Immunogen	Identifiers	Concentration	Control
Rat anti-mouse CD31	129/Sv mouse-derived endothelioma cell line tEnd.1	Monoclonal clone MEC 13.3; host species, rat; catalog No. 550274; RRID:AB_393571; BD Pharmingen	1:150	 <p>Immunohistochemical staining of endothelial cells; frozen section of cerebral cortex in mouse brain was stained with MEC13.3 mAb; morphology and distribution of the staining is appropriate to what has been reported previously (Akers et al., 2010); image <math>\times 20</math></p>
Biotinylated goat anti-rat IgG antibody	Rat IgG Fc portion	Polyclonal; host species, goat; catalog No. BA-9400; RRID:AB_2336202; Vector Laboratories	1:750	 <p>Immunohistochemical staining of endothelial cells; frozen section of cerebral cortex in mouse brain without secondary antibody; the absence of secondary antibody did not produce any staining; image <math>\times 20</math></p>

### Microscopy and Image Analysis

All observations were conducted with an Olympus (Tokyo, Japan) BX51WI microscope equipped with a disk scanning unit (Olympus) and an automated slide scanner. Brightfield images were obtained with a digital MBF CX9000 camera, and all fluorescence images were captured with an EM-CCD Hamamatsu (Bridgewater, NJ) C9100 camera. Image acquisition and digitalization were controlled in Stereo Investigator (RRID:SciRes\_000114; MBF Bioscience, Williston, VT). Image analysis and processing were performed in ImageJ (RRID:nif-0000-30467; NIH, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

### Evaluation of Dye Leakage

Brain sections obtained from sodium fluorescein/Evan's blue-perfused control and mannitol-treated rats or dextran injected mice were used to acquire eight-bit, gray-scale, high-power digital images. These images were then used to estimate the intensity of the green fluorescence emitted by sodium fluorescein (see Fig. 2) or dextran (see Fig. 5) along a 15- $\mu\text{m}$  tran-

sect traced from the geometric center of randomly selected Evan's blue-stained blood vessels located in the SVZ, RMS, or OBc in ImageJ. Contrast, brightness, and gain were all kept constant during image acquisition. Data are presented in plot profiles of intensity gray value in function of distance.

### RESULTS

The SVZ blood vessels were much more permeable than those located along the RMS-OBc axis. Indeed, sodium fluorescein (376 Da) leaked out and diffused significantly from SVZ blood vessels compared with those vessels running through the RMS and the OBc that did not permeate this compound (Figs. 1, 2). The differential permeability of blood vessels along the FNN was confirmed by administering mannitol prior to the infusion of sodium fluorescein. Indeed, blood vessels running along the RMS-OBc axis increased their permeability to fluorescein after mannitol treatment (Figs. 1, 2). With regard to the SVZ, vessel permeability was not restricted

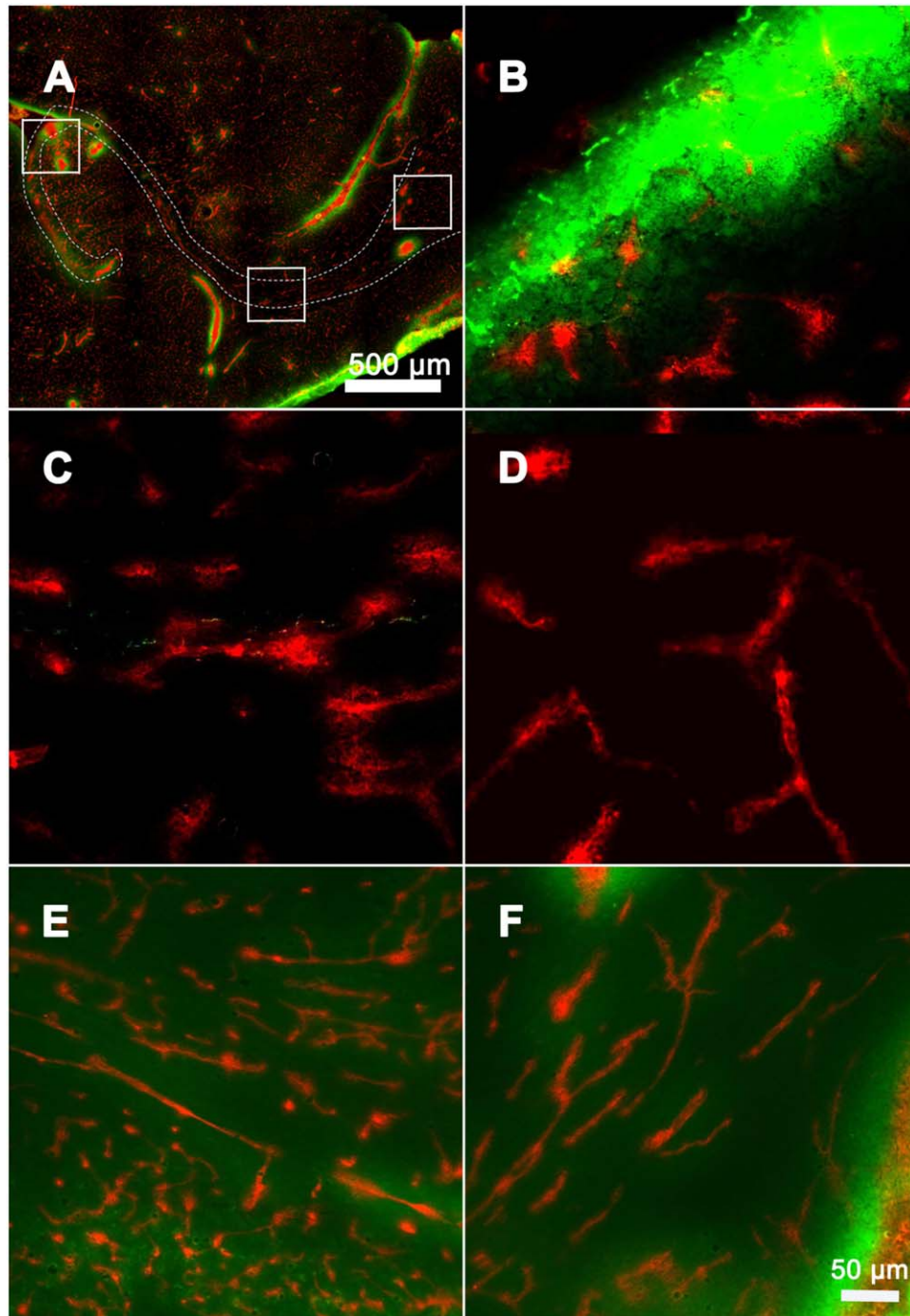


Fig. 1. Sodium fluorescein readily diffuses from blood vessels located in the SVZ but not from vessels running along the RMS or OBc under normal circumstances. **A:** A virtual sagittal slice that illustrates the relative location of the FNN; dotted lines outline FNN dorsal and ventral boundaries. **Insets:** Approximate locations from which high-power magnifications were taken for B–F. **B–F:** Brain sagittal sections show examples of the interstitial distribution of sodium fluorescein in the SVZ (B), RMS (C), and OBc (D) under basal conditions and in the RMS (E) and the OBc (F) after mannitol infusion. Note the intense green fluores-

cent background associated with sodium fluorescein extravasation in the SVZ (B) but not in the RMS (C) or the OBc (D) in control rats. In contrast, a subtle green background associated with the extravasation of sodium fluorescein is observed in the RMS (E) and OBc (F) of mannitol-infused rats. Traces of Evan's blue are also observed in the ventricular space (B). Blood vessel profiles are seen in red (Evan's blue staining). Sodium fluorescein extravasation is seen in green. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

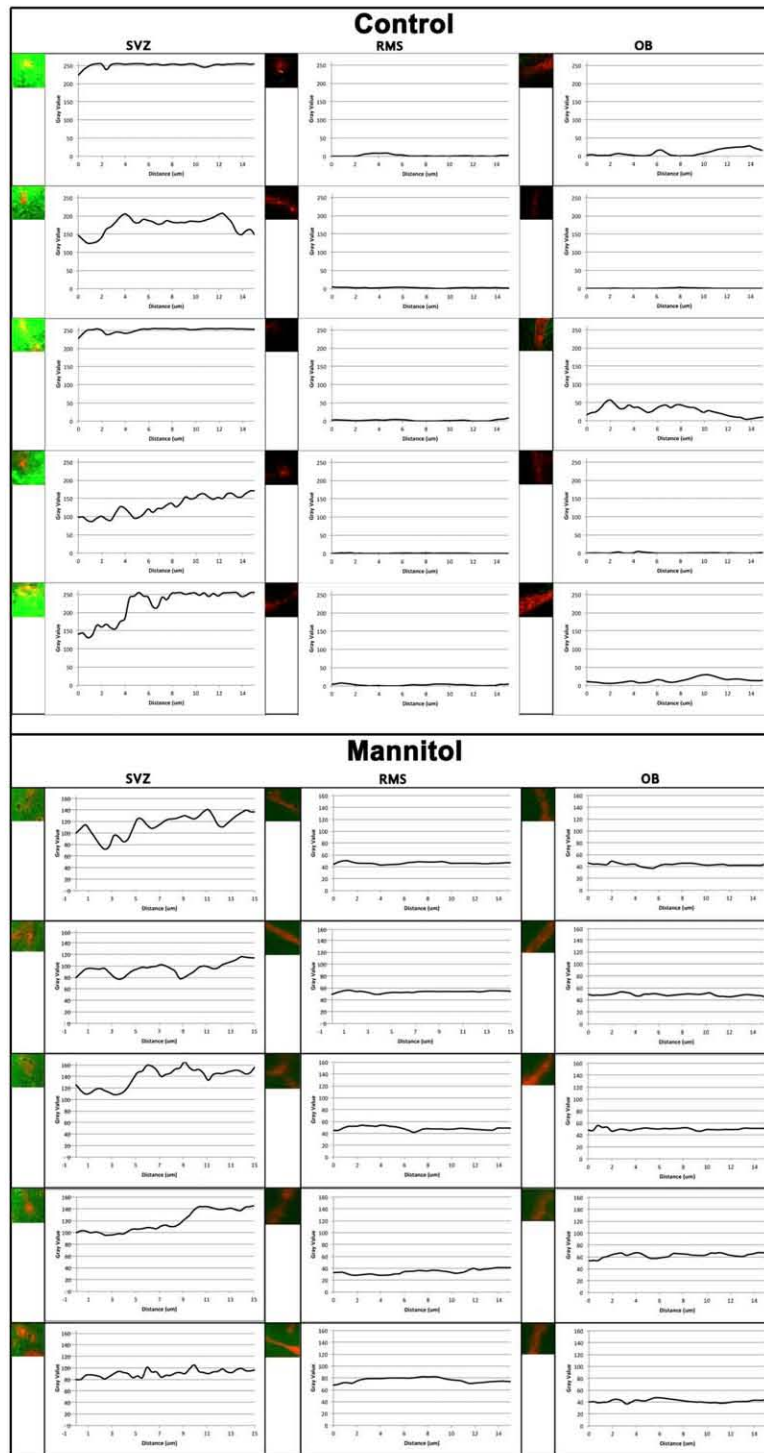


Fig. 2. Sodium fluorescein diffuses from blood vessels located in the SVZ but not from those running along the RMS or the OBc under physiological circumstances. Photomicrographs at left next to the intensity plots show five examples of individual blood vessels located in the SVZ, RMS, and OBc of control rats or in the RMS and the OBc of mannitol-infused rats. The adjacent histograms depict the intensity values of green fluorescence emitted by extravasated sodium

fluorescein along a 15- $\mu$ m transect traced from the geometric center of each vessel when exposed to UV light (437-nm wavelength). Note that the intensity of the perivascular, interstitial fluorescence is very high in the SVZ but not in the RMS or the OBc under basal conditions. Blood vessel profiles are seen in red (Evan's blue staining). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

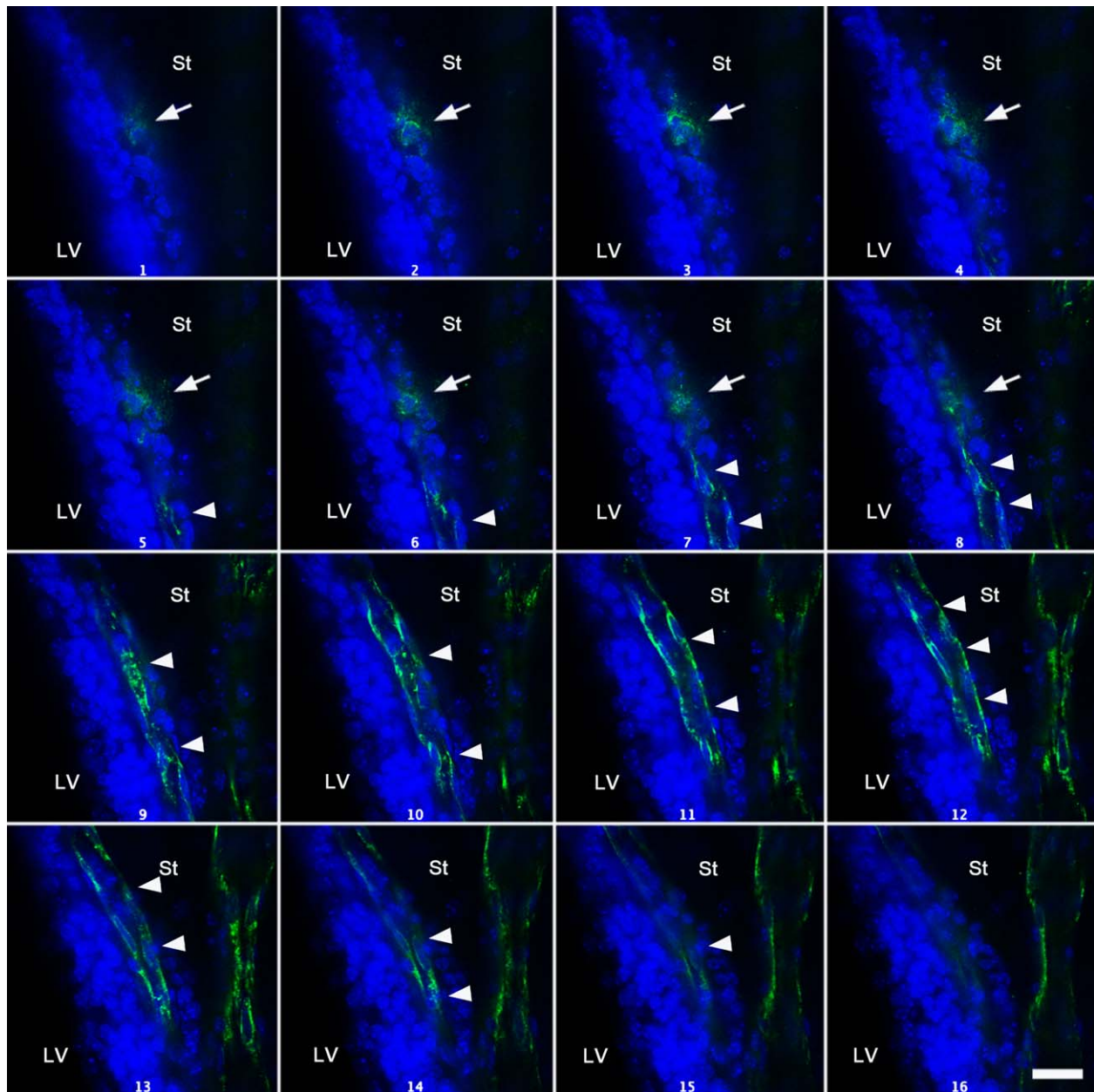


Fig. 3. Few SVZ blood vessels are dextran permeable. Optical slices taken through the Z-axis (1.5- $\mu$ m apart from each other) of a mouse coronal SVZ section counterstained with DAPI. Dextran diffusion (arrows) was observed through seven optical slices before the SVZ vascular wall (arrowheads) appeared. This extravasation was not observed in the striatum (St)

or lateral ventricle (LV). Dextran extravasation is seen in green. The walls of blood vessels are also delineated in green. Scale bar = 25  $\mu$ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

to fluorescein. Indeed, some vascular sites throughout the SVZ allowed the extravasation of 2,000-kDa dextran. The leakage was discrete and diffused for only a relatively short distance (Figs. 3, 4). Both results suggest the presence of vascular discontinuities in the SVZ. Accordingly, both PECAM-1 immunofluorescence staining (Fig. 5A) and toluidine blue staining (Fig. 5B) of a semithin section revealed gaps among SVZ endothelial cells similar to those observed in sinusoids of the liver and the spleen.

### DISCUSSION

Accumulating evidence indicates that endothelial cells control different phases of the neurogenic process in the adult brain. Indeed, blood vessels modulate NSCs, TACs, and/or neuroblast proliferation, commitment, differentiation, and cell fate by providing information through cell-to-cell contacts and paracrine communication (Shen et al., 2008; Plane et al., 2010; Bozoyan et al., 2012). However, blood vessels could also differentially pour



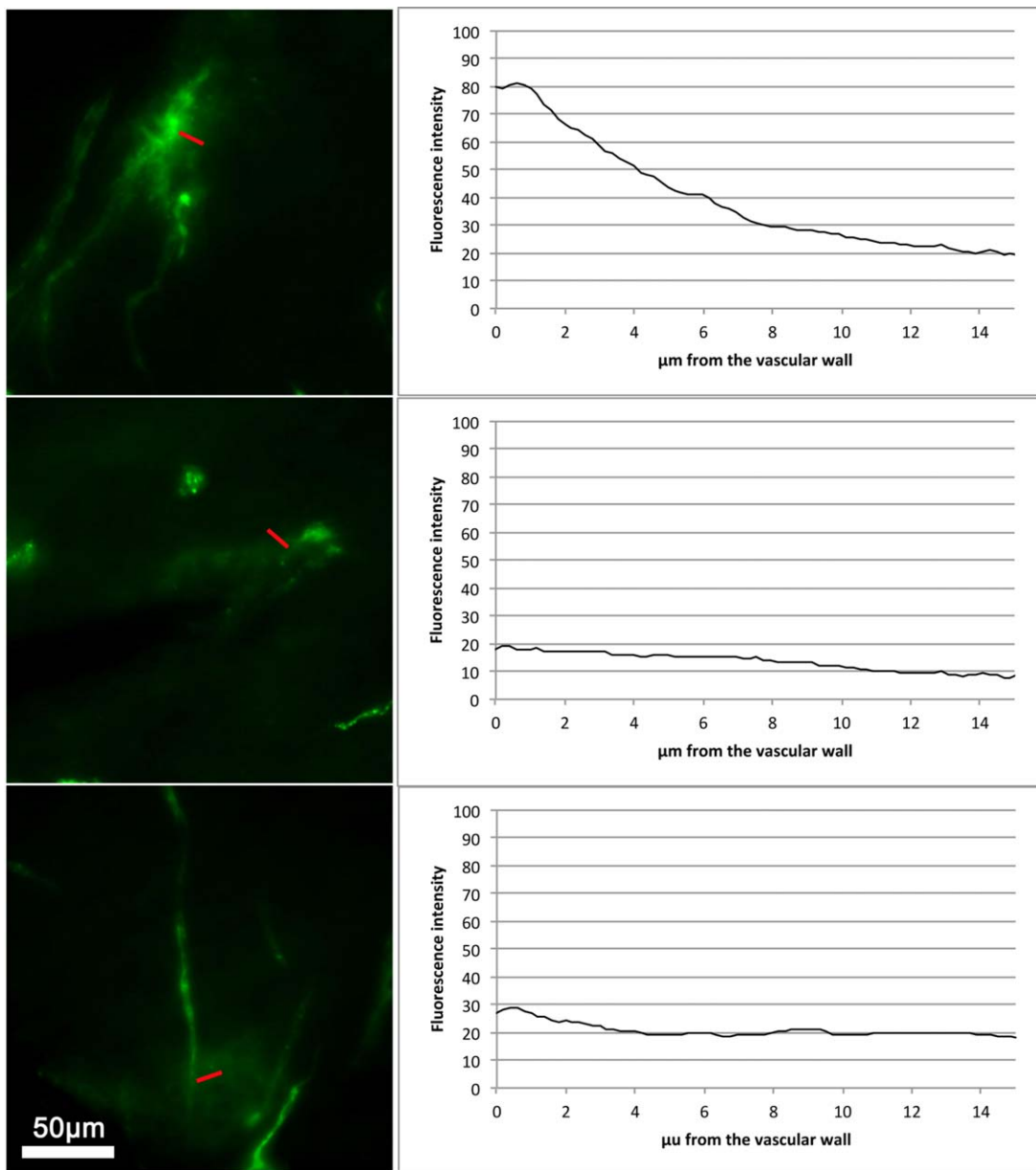


Fig. 4. Dextran diffuses from some blood vessels located in the SVZ under physiological circumstances. The photomicrographs shown at left next to the intensity plots display three examples of individual blood vessels located in the SVZ of control rats. The adjacent histograms depict the intensity values of green fluorescence emitted by extravasated dextran along a 15-µm transect (line in

red) traced from the geometric center of each vessel when exposed to UV light (437-nm wavelength). Note that the intensity of the perivascular interstitial fluorescence is greater near the blood vessel and decays with distance. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

blood-borne soluble factors along the FNN (e.g., cytokines, hormones) because they might be differentially permeable. In support of this notion, our results indicate that, whereas SVZ blood vessels are highly permeable (for a similar result see Tavazoie et al., 2008), those that form the vascular bed within the RMS/OBc are essentially impermeable. Thus, the neurogenic processes ongoing within the RMS/OBc are less likely to be influenced by blood-borne substances. This circumstance is important

because different proportions of olfactory neurons are produced in distinct locations along the FNN. Indeed, most granule cells and some periglomerular neurons are produced predominantly in subcompartments of the SVZ (Merkle et al., 2007). In contrast, an important fraction of periglomerular neurons is generated along the RMS/OBc by local NSCs (Mendoza-Torreblanca et al., 2008). Hence, granule cell precursors may respond more readily to blood-borne factors, whereas periglomerular neuron

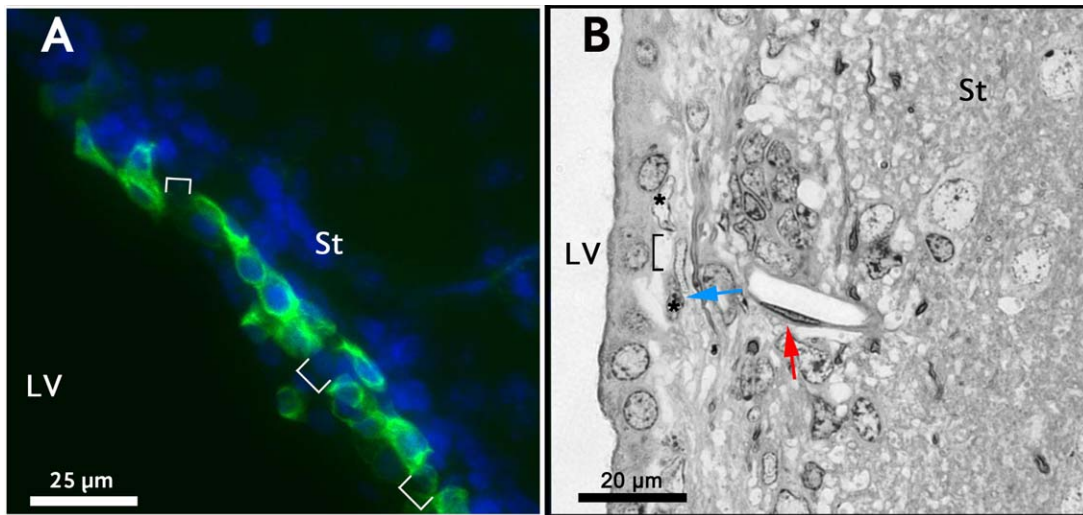


Fig. 5. Vascular walls are discontinuous at some sites of the SVZ. **A:** Photomicrograph shows blood vessels immunostained for PECAM-1 (green) taken from a sagittal section of the rat SVZ counterstained with DAPI (blue). Note that the endothelial wall shows discontinuities (brackets). **B:** Photomicrograph shows toluidine blue-stained blood vessels taken from a sagittal section of the rat SVZ. A dis-

continuous blood vessel is indicated by the blue arrow; the gap (bracket) is flanked by two endothelial cells (asterisks). An SVZ continuous blood vessel is indicated by the red arrow. LV, lateral ventricle; St, striatum. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

progenitors may require fewer extraneural signals and/or a tighter microenvironmental regulation. In addition, because the proliferation rate in the SVZ is greater than that observed along the RMS/OBc axis, highly permeable blood vessels might contribute to maintaining higher rates of proliferation. Also, we believe that this differential permeability would explain why NSC proliferation is easily modified by systemic hormonal changes, such as those seen during pregnancy (Shingo et al., 2003). Because migration and differentiation occur more readily within the RMS/OBc, our results could also indicate that these cell processes may be more sensitive to changes in the extracellular fluid, thus requiring a tighter blood-brain barrier.

Tavazoie et al. (2008) suggested that sodium fluorescein reaches the SVZ of perfused mice from the lateral ventricles via cerebrospinal fluid (CSF). From our experiments, this seems an untenable presumption because we observed no trace of fluorescein staining inside the lateral ventricles of freshly cut, rapidly mounted sections despite the fact that the choroid plexus vasculature was fluorescein stained. In contrast, traces of Evan's blue, a supravital dye capable of reaching the CSF through transcytosis, were observed inside the lateral ventricles (Fig. 1B). In addition, the discrete foci of dextran extravasation from some SVZ blood vessels reinforce the notion that the likely source of the fluorescent dyes is the SVZ vascular bed.

Finally, it is believed that impermeable physical barriers prevent blood-borne substances from reaching the brain's parenchyma by passive diffusion. However, our results, together with those published by Tavazoie et al. (2008), support the notion that SVZ blood vessels lack a

blood-brain barrier and/or are discontinuous, thus allowing the extravasation of small and large molecules. In the context of the current study, after fluorescein and dextran are freed in the extracellular space, differences in the molecular weight and/or charge among these compounds could explain why fluorescein diffuses more readily than dextran. This observation is not entirely surprising given that Nagy et al. (1984) described a reduction in the number of tight junctions as the caliber of brain arterioles, venules, and collecting veins increased. In summary, it appears that neurogenesis not only occurs in association with highly permeable vascular beds such as in the SVZ but can also proceed around much less permeable blood vessels such as those present along the RMS–OBc axis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Alejandro Marmolejo, Pedro Medina, Miguel Tapia-Rodríguez, Silvia Ivonne Mora, and Raymundo Reyes for technical and administrative support. Danna Colín-Castelán was a PhD student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and the work reported in this manuscript was part of her doctoral dissertation supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial or nonfinancial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge, or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this article.

### ROLE OF AUTHORS

DC-C designed the study plan and carried out the tissue sampling, processing, and image acquisition and drafted and edited the manuscript. JR-S provided technical support and participated in the discussion of the results. GG-O evaluated and revised the study design, supervised the execution of the research, and revised and edited the article prior to submission.

### REFERENCES

- Akers SM, O'Leary HA, Minnear FL, Craig MD, Vos JA, Coad JE, Gibson LF. 2010. VE-cadherin and PECAM-1 enhance ALL migration across brain microvascular endothelial cell monolayers. *Exp Hematol* 38:733–743.
- Bovetti S, Hsieh YC, Bovolin P, Perroteau I, Kazunori T, Puche AC. 2007. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27:5976–5980.
- Bozoyan L, Khlghatyan J, Saghatelian A. 2012. Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling. *J Neurosci* 32:1687–1704.
- Coskun V, Luskin MB. 2002. Intrinsic and extrinsic regulation of the proliferation and differentiation of cells in the rodent rostral migratory stream. *J Neurosci Res* 69:795–802.
- del Valle J, Camins A, Pallas M, Vilaplana J, Pegleri C. 2008. A new method for determining blood–brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans Blue–Hoechst cocktail. *J Neurosci Methods* 174:42–49.
- Hawkins BT, Egleton RD. 2006. Fluorescence imaging of blood–brain barrier disruption. *J Neurosci Methods* 151:262–267.
- Kaya M, Ahishali B. 2011. Assessment of permeability in barrier type of endothelium in brain using tracers: Evans blue, sodium fluorescein, and horseradish peroxidase. *Methods Mol Biol* 763:369–382.
- Luskin MB. 1998. Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate. *J Neurobiol* 36:221–233.
- Mackenzie F, Ruhrberg C. 2012. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development* 139:1371–1380.
- Mendoza-Torreblanca JG, Martinez-Martinez E, Tapia-Rodriguez M, Ramirez-Hernandez R, Gutiérrez-Ospina G. 2008. The rostral migratory stream is a neurogenic niche that predominantly engenders periglomerular cells: in vivo evidence in the adult rat brain. *Neurosci Res* 60:289–299.
- Merkle F, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317:381–384.
- Nagy Z, Peters H, Huttner I. 1984. Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic conditions. *Lab Invest* 50:313–322.
- Plane J, Andjelkovic A, Keep R, Parent J. 2010. Intact and injured endothelial cells differentially modulate postnatal murine forebrain neural stem cells. *Neurobiol Dis* 37:218–227.
- Seki T. 2003. Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis. *Anat Sci Int* 78:69–78.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S. 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304:1338–1340.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang S, Goderie S, Roysam B, Temple S. 2008. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell–cell interactions. *Cell Stem Cell* 3:289–300.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299:117–120.
- Snayman M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Gotz M, Barker PA, Parent A, Saghatelian A. 2009. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 29:4172–4188.
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo J, Doetsch F. 2008. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3:279–288.
- Whitman MC, Fan W, Relat L, Rodriguez-Gil DJ, Greer CA. 2009. Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J Comp Neurol* 516:94–104.
- Wurmser AE, Palmer TD, Gage FH. 2004. Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science* 304:1253–1255.

## **7. Discusión**

La neurogénesis se restringe espacio-temporalmente en el cerebro de los mamíferos. En el cerebro adulto hay sólo dos zonas neurogénicas que se mantienen activas. En la mayor de estas zonas (CNV), las distintas fases de la neurogénesis aparentemente se segregan en dominios definidos. Aunque es posible que la regulación de la neurogénesis y sus fases esté dada por un programa intrínseco, existe evidencia que apoya una regulación ambiental. En este trabajo evaluamos la existencia de distintos nichos micro-ambientales a lo largo del CNV que pudiesen modular la neurogénesis. En particular nos enfocamos al posible papel de la vasculatura en la generación de micro-dominios ambientales que pudiesen regular las distintas fases de la neurogénesis.

En conjunto, los resultados obtenidos nos muestran una primera caracterización del lecho vascular que soporta la neurogénesis en el CNV. En primer lugar, observamos que existe una remodelación vascular intensa durante el desarrollo embrionario y perinatal. Cabe destacar que el arreglo y cambio de orientación de los vasos sanguíneos del CNV, coinciden con la orientación en que migran los neuroblastos en todos los puntos del desarrollo estudiados<sup>38</sup>. Se ha reportado que durante el desarrollo embrionario, las células endoteliales migran por lo menos un día antes que las neuronas GABAérgicas en el telencéfalo de ratón<sup>39</sup>. Es muy posible que el lecho vascular favorezca la migración de los neuroblastos desde etapas tempranas del desarrollo al formar un andamio y “trazar” un camino

permisivo. De hecho, se ha observado que los neuroblastos que están en contacto con el lecho vascular migran de forma continua, mientras que los neuroblastos que migran en masa, sin tener contacto con los vasos sanguíneos migran de manera intermitente<sup>28</sup>. Curiosamente, los neuroblastos están en contacto directo con las células endoteliales en la CRM y en el BO en etapas prenatales y hasta DP15<sup>20,37,40</sup>. Sin embargo, en estos puntos la densidad vascular es relativamente baja y la mayoría de las células migran en masa. En el CNV adulto la densidad vascular es mucho mayor y la eficiencia migratoria es mucho mejor.

Por otro lado, encontramos que en edades prenatales y hasta DP1 todos los vasos sanguíneos del CNV fueron positivos para el marcador venoso EphB4. Esto es interesante si consideramos que durante este período se da el mayor pico de neurogénesis, y que es durante esta etapa que los precursores neuronales están en contacto directo con el lecho vascular<sup>40</sup>. Cabe destacar que existen reportes de que las células germinales migran asociadas a lechos venosos, no arteriales<sup>41</sup>. Por lo tanto, es posible que los lechos vasculares venosos sean más favorables para la proliferación y migración de células precursoras que los lechos arteriales. Otro hecho interesante es que, junto con estos resultados, diversos estudios han mostrado que las células endoteliales del cerebro embrionario expresan marcadores moleculares de manera homogénea; aparentemente la heterogeneidad molecular se desarrolla con la edad<sup>42,43</sup>. Sin embargo, sería interesante comprobar estos resultados haciendo hibridación *in situ* fluorescente en tejido perfundido para descartar que la señal observada sea fondo derivado de los eritrocitos. En el

caso de EphB4, encontramos que a partir de DP7, la expresión de este marcador variaba dependiendo de la región del CNV y de la etapa del desarrollo. Es posible que la formación de subgrupos específicos de células endoteliales sea clave para el proceso de organogénesis y homeostasis en el cerebro adulto.

Por otra parte, es posible que la expresión de EphB4 en etapas pre y perinatales, esté relacionada con crecimiento vascular y no con la identidad venosa del endotelio <sup>44</sup>. Sin embargo, es durante la vida postnatal, cuando la expresión de EphB4 es menor, que se da el mayor aumento en la densidad vascular. Aunque es importante usar otros marcadores para establecer la identidad arterio-venosa del endotelio, es importante resaltar que la heterogeneidad en la expresión de EphB4 sugiere la existencia de distintos dominios vasculares. Es por esta razón que decidimos estudiar el arreglo estructural y funcionalidad del lecho vascular.

Nuestros resultados mostraron que las paredes de los vasos sanguíneos de la ZSV adulta son discontinuos. El endotelio que conforma estos vasos sanguíneos parece estar estructurado de forma similar a los sinusoides esplénicos. Esta estructura discontinua permite que el lecho vascular de la ZSV sea permeable a moléculas que alcanzan por lo menos los 2,000 kDa, a diferencia de lo que ocurre en la CRM y en el BO, donde el lecho vascular es continuo e impermeable. El hecho de que el lecho vascular de la ZSV sea tan permeable pudiera favorecer que la proliferación de las CTN responda fácilmente a estímulos sistémicos como ocurre durante el embarazo <sup>11</sup>. Adicionalmente, se ha reportado que el aumento de la

proliferación de las CTN de la ZSV, derivado del aumento en factores de crecimiento, va acompañado de un aumento en el flujo sanguíneo <sup>45</sup>. Dado el grado de permeabilidad del lecho vascular de la ZSV, es posible que al aumentar el flujo sanguíneo, aumente también la cantidad de factores provenientes de la sangre que difunden hacia el parénquima cerebral en la ZSV. Curiosamente, en artículo se menciona que el efecto de los factores de crecimiento sobre los vasos sanguíneos es indirecto, ya que al inyectar los factores de crecimiento en la corteza o en el estriado, no se observó el mismo efecto sobre el flujo sanguíneo. Aunque esto es factible, también es posible que las células vasculares de la ZSV sean capaces de responder a los factores de crecimiento directamente, a pesar de que endotelio de otras regiones cerebrales no lo haga.

Otra diferencia que encontramos fue la morfología de las células endoteliales. Las células endoteliales de la ZSV tienen núcleos de mayor tamaño, más citoplasma y en general, una forma mucho más redondeada que las células endoteliales de la CRM y del BO. Dada la discontinuidad de la pared vascular de la ZSV, es poco probable que las macromoléculas se transporten por trancitosis hacia el parénquima cerebral en esta región. Por otro lado, es posible que el endotelio de la ZSV sintetice y secrete grandes cantidades de factores tróficos que ayuden a sostener el nicho proliferativo. En este trabajo, también consideramos la posibilidad de que distintos factores tróficos se encontraran distribuidos de manera diferencial a lo largo del CNV. Es por eso que estudiamos la presencia de neurotrofinas en el CNV adulto. Encontramos que la inmunoreactividad para

todos los factores estudiados se distribuyó a lo largo de todo el CNV. Sin embargo, la inmunoreactividad para NT3 fue mayor en la ZSV. Se ha reportado en estudios recientes que NT3 es capaz de activar a las CTN embrionarias y promover su proliferación<sup>34,46</sup>. Es muy posible que NT3 esté jugando un papel similar en el CNV adulto. Por otro lado, encontramos que NT3 se encuentra asociada al lecho vascular en la CRM y en el BO. Este hallazgo concuerda con el planteamiento de que hay distintos dominios vasculares que generan micro-ambientes heterogéneos a lo largo del CNV, al menos dos: el nicho de la zona subventricular que mantiene la proliferación de las células troncales neurales y por otro la corriente rostral migratoria y el bulbo olfatorio donde ocurre la migración y diferenciación neuronal.

Ahora bien, con estos resultados pareciera que sólo la fase proliferativa de la neurogénesis requiere de un micro-ambiente vascular especializado. Aunque esto es claramente posible, debemos tomar en cuenta que los precursores neuronales se mantienen asociados al lecho vascular a lo largo de todo el proceso neurogénico y a lo largo de todo el CNV, especialmente en el cerebro adulto<sup>28,29,37</sup>. Es muy probable que esta asociación espacial tan cercana se deba a que los vasos sanguíneos de todo el CNV soportan de algún modo todas las fases del proceso neurogénico. El hecho de que aquí sólo hayamos encontrado dos grandes dominios vasculares (ZSV vs CRM+BO) no significa que los vasos de la CRM y del BO no aporten otros factores de manera diferencial, generando así otros dominios ambientales. Por ejemplo, en un trabajo anterior del laboratorio encontramos que



las células endoteliales de la CRM secretan moléculas guía como Semaforina 3A<sup>47</sup>. Sería interesante hacer un estudio de proteómica en las células endoteliales de las distintas regiones del CNV para establecer si existen más dominios vasculares, y con qué factores están contribuyendo al nicho micro-ambiental.

Con los resultados discutidos anteriormente queda claro que la vasculatura conforma distintos nichos micro-ambientales dentro del CNV en condiciones fisiológicas, lo que presumiblemente favorece la neurogénesis. Ahora bien, para ahondar en la relevancia de los lechos vasculares especializados en la neurogénesis evaluamos algunas características morfo-funcionales de la vasculatura en un modelo de neurogénesis aberrante. Como se mencionó anteriormente la neurogénesis postnatal se restringe normalmente a dos nichos neurogénicos; sin embargo, existen condiciones patológicas en las cuales la neurogénesis puede exacerbarse, ocurrir de forma ectópica y/o presentar alteraciones en el proceso de diferenciación. Una de estas condiciones es la esclerosis tuberosa<sup>48</sup>. La esclerosis tuberosa es una enfermedad se caracteriza por la formación de tumores benignos en la piel, riñones y sistema nervioso, como consecuencia de la sobre-activación de la vía de señalización de mTOR-TSC. Uno de los signos principales de la esclerosis tuberosa son los tumores (tuberosidades) en el sistema nervioso central. Estudios realizados en el laboratorio de la Dra. Angélique Bordey han demostrado que estas lesiones son producto de alteraciones en la proliferación, migración y diferenciación neuronal dadas por mutaciones en el gen TSC1 (siglas en inglés de: Tuberous Sclerosis Complex 1)<sup>49,50</sup>.

Durante una estancia en el laboratorio de la Dra. Angélique Bordey evaluamos la permeabilidad y morfología vascular en un modelo de neurogénesis aberrante (ratones knock-out tejido-específico de TSC1). En este caso encontramos que aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos corticales de los ratones que carecían de TSC1 en el cerebro. Dado que en condiciones fisiológicas la alta permeabilidad vascular se asocia a la proliferación de las CTN, es decir en la ZSV, es interesante que en los ratones donde hay alta permeabilidad vascular cortical (Tsc1 -/-) también haya un aumento en la proliferación ectópica de CTN en la corteza<sup>51,53</sup>. Adicionalmente observamos un aumento aparente en la complejidad vascular en los ratones TSC1 -/- en edades tempranas (Resultados detallados en Anexo I). Los resultados preliminares obtenidos durante esta estancia apoyan la idea de que los lechos vasculares juegan un papel importante en la regulación de la neurogénesis. En particular que la alta permeabilidad vascular favorece la proliferación de las CTN aunque aún no queda claro el mecanismo detrás de esta relación.

En conclusión, nuestros resultados muestran que existen al menos dos dominios vasculares con características morfo-funcionales claramente discernibles, que generan dos nichos micro-ambientales distintos. Sin embargo, aún hace falta determinar qué otros factores pudieran estar presentes en estos nichos micro-ambientales. Además es necesario establecer si estos dominios vasculares regulan el proceso neurogénico y cómo lo hacen.

## **8. Anexo I**

### **Caracterización del lecho vascular morfológica y funcionalmente en un modelo de neurogénesis aberrante.**

#### **8.1 Materiales y métodos**

##### **8.1.1 Modelo knock-out tejido-específico de TSC1.**

Para caracterizar el lecho vascular morfológica y funcionalmente en un modelo de neurogénesis aberrante, se utilizó un modelo de ratón knock-out (KO) tejido específico para TSC-1. Estos ratones presentan el gen TSC1 flanqueado por secuencias LoxP (fl); adicionalmente tienen el gen Cre bajo el control del gen homeótico Emx1 (Emx1-Cre). Emx-1 controla la expresión de genes en el neuro-epitelio telencefálico específicamente. De este modo, sólo las neuronas y los astrocitos telencefálicos pierden el gen TSC1, mientras que las células vasculares y el resto del SNC se mantienen genéticamente intactos <sup>51</sup>. Se utilizaron ratones Emx1-Cre, TSC1 fl/wt como control y ratones Emx1-Cre, TSC1 fl/mut como grupo experimental. Se utilizaron 3 diferentes edades: día postnatal 3, 7 y 14 (P3, P7 y P14 respectivamente). Todos los protocolos utilizados siguieron los lineamientos de manejo de animales recomendados por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y fueron aprobados por el comité de bioética para el uso de animales de la Yale School of Medicine, Yale University.

##### **8.1.2 Permeabilidad vascular**

Para estudiar la permeabilidad vascular en el modelo knock-out tejido-específico de TSC1 se inyectó llevó a cabo una inyección intracardiaca de dextran

fluorescente (0.5%, Dextran-FITC, 2,000,000 MW, Invitrogen) con algunas modificaciones de un protocolo descrito anteriormente <sup>52</sup>. Brevemente, los ratones fueron anestesiados en una cámara de isofluorano, posteriormente recibieron la inyección intracardiaca de dextran. Tres minutos después los ratones fueron decapitados, los cerebros extraídos y post-fijados en una solución de paraformaldehído al 4%. Tres días después, los cerebros se lavaron en PBS y se incluyeron en agarosa de bajo punto de fusión (3% en PBS). Posteriormente se hicieron cortes de 100 µm en el vibratomo, se montaron y se observaron al microscopio. Todas las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal (Olympus Fluo View 1000).

### **8.1.3 Análisis de complejidad vascular**

Para evaluar la complejidad vascular se utilizó el software ImageJ, en particular el complemento de conteo celular. Brevemente, se utilizaron microfotografías originales de inmunofluorescencias contra PECAM-1 a un aumento de 20X para contar los puntos de entronque de los vasos sanguíneos. Los puntos de entronque de dos vasos sanguíneos fueron contados como puntos dobles y señalados con un marcador; los puntos de entronque de tres vasos sanguíneos fueron contados como puntos triples y señalados con otro marcador, y así sucesivamente. Al terminar de marcar todos los puntos de entronque en una imagen el software nos proporcionó el número de puntos dobles, triples, etc. Una mayor cantidad de puntos de entronque indica una mayor complejidad vascular. Para cada marcador (puntos dobles, puntos triples, etc.) se compararon los pares TSC1 fl/wt vs TSC1

fl/mut. utilizando la prueba estadística U de Mann-Whitney. Todas las comparaciones estadísticas se hicieron utilizando el software XLSTAT.

#### **8.1.4 Inmuofluorescencia**

Con el objetivo de determinar si hay inflamación asociada al aumento en la permeabilidad vascular, se realizaron inmunofluorescencias en contra de Iba1 (marcador de microglía) e IL-6 (citocina pro-inflamatoria). Además, para determinar si había astrogliosis reactiva, realizamos inmunotinciones contra la proteína de filamentos intermedios GFAP que es un marcador de astrocitos. Se utilizaron cortes coronales de 100  $\mu$ m obtenidos en el vibratomo, se lavaron dos veces en PBS por 30 minutos cada vez. Después fueron lavados una vez en PBT (PBS+Tritón X-100 0.1%) por 30 minutos. Los cortes fueron incubados en suero de bloqueo (PBT+ suero de caballo inactivado 5%) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C (Iba1 1:200, 5076 abcam; PECAM-1 1:300, 28364 abcam; IL-6 1:500, 6672 abcam; GFAP 1:500, Z0334). Al día siguiente los cortes fueron lavados tres veces en PBS por 30 minutos cada vez y se incubaron en el anticuerpo secundario correspondiente por dos horas a temperatura ambiente (Dk $\alpha$ Rb Alexa Fluor 633 o Dk $\alpha$ Gt Alexa Fluor 647). Después, los cortes fueron lavados nuevamente, contrateñidos con DAPI, montados y observados al microscopio.

#### *Tratamiento con Rapamicina*

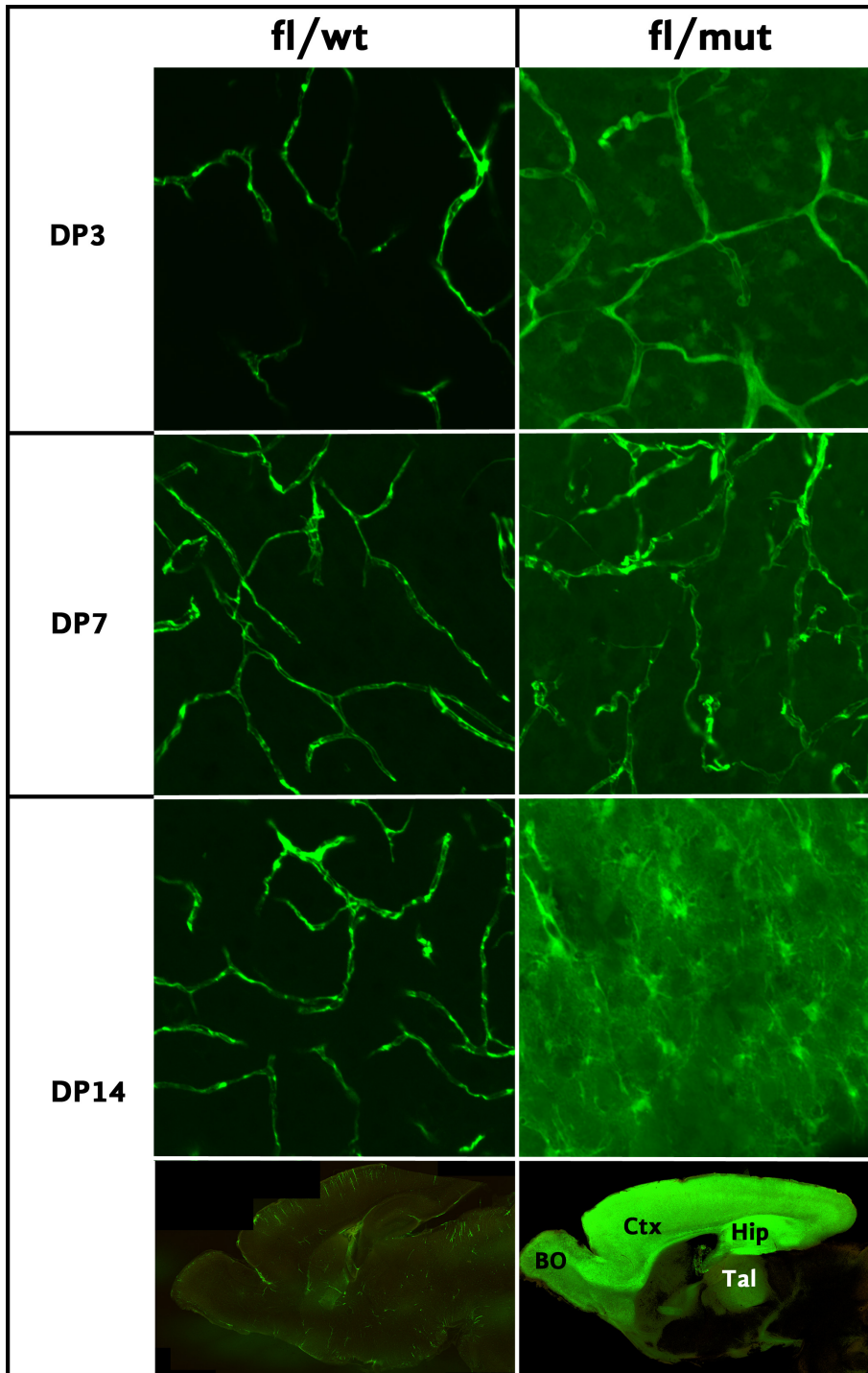
Para determinar si las alteraciones vasculares son reversibles, se trataron algunos

animales con rapamicina La rapamicina actúa como inhibidor de la vía TSC1/mTOR al bloquear la actividad de serina/treonina proteína cinasa de mTOR. Los animales a tratar se dividieron en 4 grupos: 1) TSC1<sup>fl/wt</sup> + Vehículo, 2) TSC1<sup>fl/wt</sup> + Rapamicina, 3) TSC1<sup>fl/mut</sup> + Vehículo y 4) TSC1<sup>fl/mut</sup> + Rapamicina. Los ratones de los grupos 2 y 4 recibieron 0.5 mg/kg de rapamicina administrada por inyección intraperitoneal desde DP7 a DP16, cada 2 días. Los ratones de los grupos 1 y 3 recibieron el vehículo (DMSO) con la misma frecuencia que sus contrapartes.

## 8.2 Resultados

*Los ratones TSC1<sup>fl/mut</sup> presentan extravasación masiva en la corteza cerebral*

Desde P3 y al día P7 se observó extravasación en el parénquima cortical en el grupo TSC1<sup>fl/mut</sup>. En ambos casos, la estructura vascular es claramente visible. Sin embargo, al día P14 la extravasación en el grupo TSC1<sup>fl/mut</sup> fue tan masiva, que la estructura vascular ya no es discernible (Fig.1). Por el contrario, los ratones TSC1<sup>fl/wt</sup> mantuvieron la integridad de la barrera hemato-encefálica en todas las edades estudiadas. Curiosamente, en todos los casos donde hubo extravasación, se observaron células marcadas de verde; como consecuencia de la incorporación del dextran. Cabe destacar que la extravasación se presentó principalmente en la corteza, hipocampo y bulbo olfatorio, y en menor medida en el tálamo (Paneles inferiores). Éstas regiones cerebrales corresponden al patrón de expresión de Emx1-Cre, y por lo tanto corresponden a las regiones nulas para TSC1 (13).



**Figura 1.** Permeabilidad vascular a dextran fluorescente (2,000,000 Da; verde) en la corteza cerebral de ratones  $TSC1^{fl/wt}$ ,  $TSC1^{fl/mut}$ . DP3, DP7, DP14. Los ratones  $TSC1^{fl/mut}$  mostraron extravasación de dextran desde P3. La extravasación de dextran en P14 fue masiva. Imágenes tomadas a 20X. Paneles inferiores: rebanadas virtuales de cortes sagitales que muestran el patrón de extravasación del dextran fluorescente. La extravasación en el cerebro  $TSC1^{fl/mut}$  se presentó en la corteza (Ctx), bulbo olfatorio (BO), hipocampo (Hip) y tálamo (Tal).

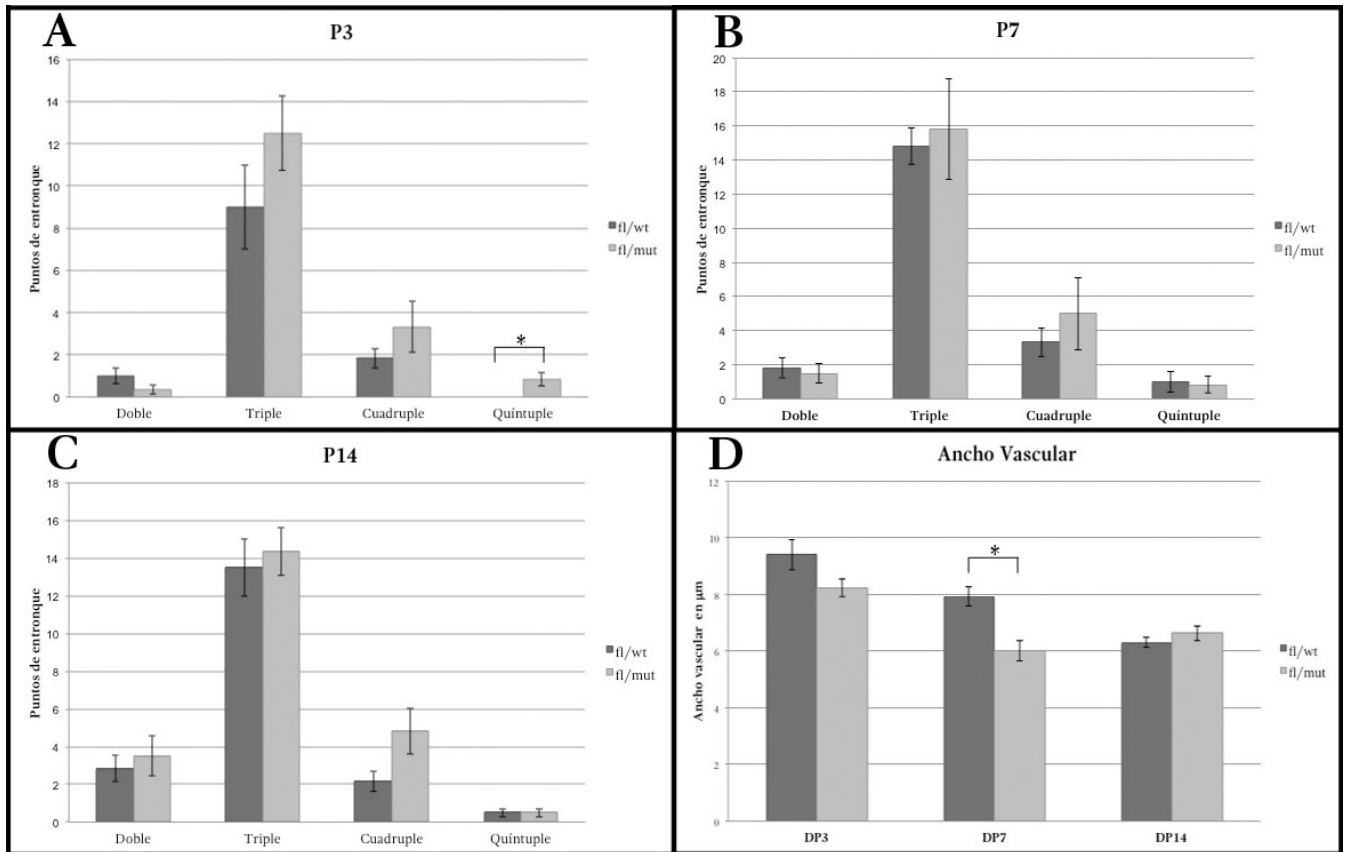
*Los lechos vasculares son más complejos en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$  al día P3 .*

Al día P3 se encontró un número mayor de puntos quíntuples en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$  ( $p=0.027$ ). Tanto los puntos triples como los cuádruples tendieron a incrementarse en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$  aunque no se observó ninguna diferencia estadística (Fig. 2A). Al día P14 y al día P7 se observó que los lechos vasculares de los ratones  $TSC1^{fl/mut}$  tendieron a ser más complejos que los lechos vasculares de los animales  $TSC1^{fl/wt}$ ; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas (Fig. 2B, 2C).

*Los vasos sanguíneos corticales son más delgados en los ratones  $Tsc1^{fl/mut}$  al día P7.*

El ancho vascular es en promedio 2  $\mu\text{m}$  menor en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$  al día P7 (Fig. 2D;  $p<0.0001$ ). A pesar de que al día P3 se observó una tendencia a la baja en el ancho vascular de los ratones  $TSC1^{fl/mut}$ , la diferencia no fue significativa ( $p=0.104$ ). Tampoco se encontraron diferencias al día P14.





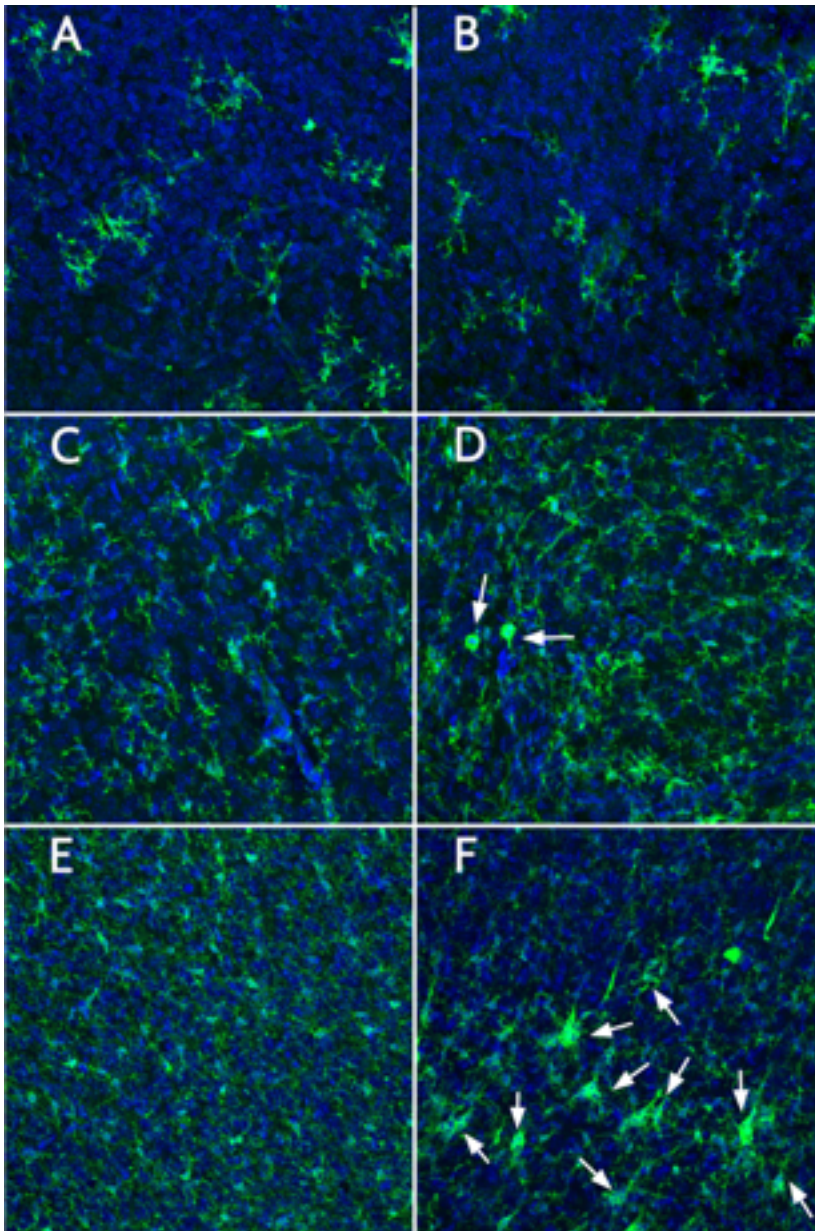
**Figura 2.** Complejidad vascular (cantidad de puntos dobles, triples, cuádruples y quintuples) en P3 (A), P7 (B) y P14(C). En P3 ( $p=0.027$ ) los lechos vasculares son más complejos en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$ . Comparación del ancho vascular en  $\mu\text{m}$  entre ratones  $TSC1^{fl/wt}$  y  $TSC1^{fl/mut}$  al día P3, P7 y P14. Todas las gráficas muestran promedios  $\pm$  error estándar. Las comparaciones estadísticas se hicieron con la prueba U de Mann-Whitney.

*Hay señales de inflamación en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$ .*

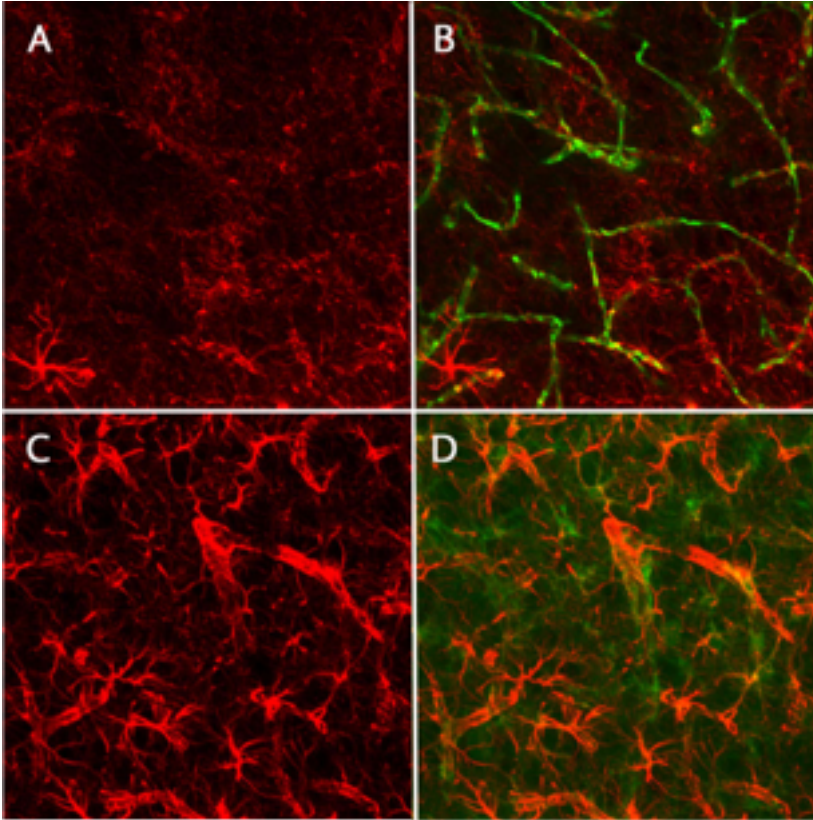
Una clara señal de inflamación cerebral es la presencia de microglía activada. Para determinar si había inflamación asociada al aumento en la permeabilidad vascular, realizamos inmunofluorescencias contra el marcador de microglía Iba1. Como resultado encontramos que al día P3, las células Iba1-positivas presentaron una morfología ramificada típica de microglía quiescente en ambos grupos (Fig. 3A, 3B). Al día P7 se encontraron algunas células con pocas ramificaciones y soma hipertrófico en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$  (flechas Fig. 3D). Al día P14, se observó hipertrofia y pocas ramificaciones en la mayor parte de las células positivas para

Iba1 en los cerebros  $TSC1^{fl/mut}$  (flechas Fig. 3F). Por el contrario, la microglía en los cerebros  $TSC1^{fl/wt}$  pareció morfológicamente quiescente a las mismas edades (Fig. 3C, 3E).

Adicionalmente, se encontraron astrocitos reactivos (de morfología fibrosa e hipertrófica) en los cerebros  $TSC1^{fl/mut}$  al día P14 (Fig.4). No se encontraron diferencias en IL-6 en ninguna de las edades (datos no mostrados).



**Figura 3.** Inmunofluorescencia contra Iba1 (verde) contrateñida con DAPI (azul) en la corteza cerebral de ratones  $TSC1^{fl/wt}$  (A, C, E),  $TSC1^{fl/mut}$  (B, D, F). P3 (A,B), P7 (C,D), P14 (E,F). Desde el día P7 hubo algunas células con morfología de microglía activada en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$  (flechas, D). Al día P14 la mayoría de las células Iba1 positivas mostraron hiperftrofia en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$  (flechas, F). Imágenes tomadas a 20X.

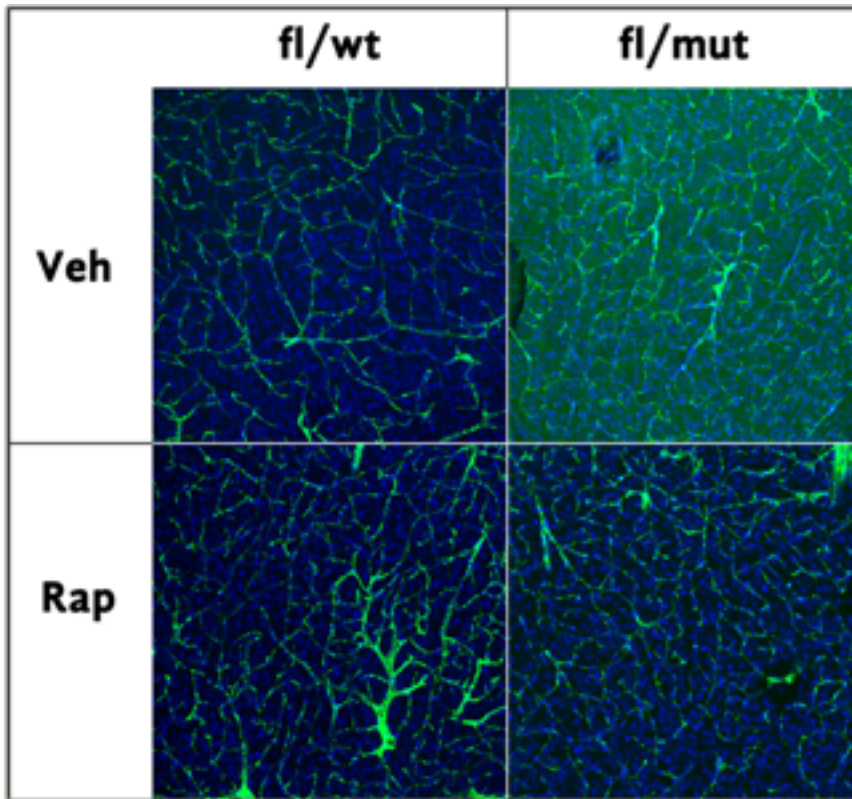


**Figura 4.** Inmunofluorescencia contra GFAP (rojo), inyección intravital de dextran (verde) en cortes coronales de corteza de ratones P14,  $TSC1^{fl/wt}$  (A, B),  $TSC1^{fl/mut}$  (C, D). Los ratones  $TSC1^{fl/mut}$  mostraron astrogliosis reactiva. Imágenes tomadas a 20X.

*El aumento en la permeabilidad vascular es reversible al tratar con rapamicina.*

Cuando analizamos la permeabilidad vascular al dextran fluorescente de 2,000,000 Da en un conjunto de animales tratados con el inhibidor de la vía TSC1/mTOR, rapamicina, encontramos que el tratamiento revierte la extravasación cortical observada en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$ . En este caso, a pesar de la extravasación masiva observada en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$  la estructura vascular sigue siendo

discernible.



**Figura 5.** Permeabilidad vascular a dextran fluorescente (verde) en la corteza cerebral de ratones  $TSC1^{fl/wt}$ ,  $TSC1^{fl/mut}$  DP16 tratados con rapamicina. El tratamiento con rapamicina revierte la extravasación de dextran en los ratones  $TSC1^{fl/mut}$ . Imágenes tomadas a 20X.

## 9. Bibliografía

- 1 Burghardt, N. S., Park, E. H., Hen, R. & Fenton, A. A. Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus*, doi:10.1002/hipo.22013 (2012).
- 2 Belvindrah, R., Nissant, A. & Lledo, P. M. Abnormal neuronal migration changes the fate of developing neurons in the postnatal olfactory bulb. *J Neurosci* **31**, 7551-7562, doi:10.1523/JNEUROSCI.6716-10.2011 (2011).
- 3 Kernie, S. G. & Parent, J. M. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* **37**, 267-274, doi:10.1016/j.nbd.2009.11.002 (2010).
- 4 Eriksson, P. S. *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* **4**, 1313-1317, doi:10.1038/3305 (1998).
- 5 Alvarez-Buylla, A. & Lois, C. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells* **13**, 263-272, doi:10.1002/stem.5530130307 (1995).
- 6 Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* **17**, 5046-5061 (1997).
- 7 Luskin, M. B. Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate. *Journal of neurobiology* **36**, 221-233 (1998).
- 8 Hack, M. A. *et al.* Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* **8**, 865-872, doi:10.1038/nn1479 (2005).
- 9 Kirschenbaum, B., Doetsch, F., Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci* **19**, 2171-2180 (1999).
- 10 Merkle, F., Mirzadeh, Z. & Alvarez-Buylla, A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* **317**, 381-384, doi:1144914 [pii] 10.1126/science.1144914 (2007).
- 11 Shingo, T. *et al.* Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* **299**, 117-120, doi:10.1126/science.1076647 (2003).
- 12 Ohab, J. J., Fleming, S., Blesch, A. & Carmichael, S. T. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* **26**, 13007-13016, doi:10.1523/JNEUROSCI.4323-06.2006 (2006).
- 13 Smith, M. T., Pencea, V., Wang, Z., Luskin, M. B. & Insel, T. R. Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. *Hormones and behavior* **39**, 11-21, doi:10.1006/hbeh.2000.1630 (2001).
- 14 Ohab, J. J. & Carmichael, S. T. Poststroke neurogenesis: emerging principles of migration and localization of immature neurons. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **14**, 369-380, doi:10.1177/1073858407309545 (2008).
- 15 Yamashita, T. *et al.* Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* **26**, 6627-6636, doi:10.1523/JNEUROSCI.0149-06.2006 (2006).
- 16 Thored, P. *et al.* Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke*;

- a journal of cerebral circulation* **38**, 3032-3039, doi:10.1161/STROKEAHA.107.488445 (2007).
- 17 Booth, B. W. *et al.* The mammary microenvironment alters the differentiation repertoire of neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14891-14896, doi:10.1073/pnas.0803214105 (2008).
- 18 Luskin, M. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* **11**, 173-189, doi:0896-6273(93)90281-U [pii] (1993).
- 19 Choi, Y., Borghesani, P., Chan, J. & Segal, R. Migration from a mitogenic niche promotes cell-cycle exit. *J Neurosci* **25**, 10437-10445, doi:25/45/10437 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.1559-05.2005 (2005).
- 20 Bovetti, S., Peretto, P., Fasolo, A. & De Marchis, S. Spatio-temporal specification of olfactory bulb interneurons. *Journal of molecular histology* **38**, 563-569, doi:10.1007/s10735-007-9111-8 (2007).
- 21 Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research* **100**, 158-173, doi:10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a (2007).
- 22 Aitsebaomo, J., Portbury, A. L., Schisler, J. C. & Patterson, C. Brothers and sisters: molecular insights into arterial-venous heterogeneity. *Circulation research* **103**, 929-939, doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.184937 (2008).
- 23 Saubamea, B., Cochois-Guegan, V., Cisternino, S. & Scherrmann, J. M. Heterogeneity in the rat brain vasculature revealed by quantitative confocal analysis of endothelial barrier antigen and P-glycoprotein expression. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **32**, 81-92, doi:10.1038/jcbfm.2011.109 (2012).
- 24 Palmer, T., Willhoite, A. & Gage, F. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* **425**, 479-494, doi:10.1002/1096-9861(20001002)425:4<479::AID-CNE2>3.0.CO;2-3 [pii] (2000).
- 25 Shen, Q. *et al.* Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* **3**, 289-300, doi:S1934-5909(08)00397-4 [pii] 10.1016/j.stem.2008.07.026 (2008).
- 26 Tavazoie, M. *et al.* A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* **3**, 279-288, doi:S1934-5909(08)00396-2 [pii] 10.1016/j.stem.2008.07.025 (2008).
- 27 Yang, X. T., Bi, Y. Y. & Feng, D. F. From the vascular microenvironment to neurogenesis. *Brain Res Bull* **84**, 1-7, doi:10.1016/j.brainresbull.2010.09.008 (2011).
- 28 Bozoyan, L., Khlghatyan, J. & Saghatelyan, A. Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling. *J Neurosci* **32**, 1687-1704, doi:10.1523/JNEUROSCI.5531-11.2012 (2012).
- 29 Bovetti, S. *et al.* Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* **27**, 5976-5980, doi:10.1523/JNEUROSCI.0678-07.2007 (2007).

- 30 Kopp, H. G., Avecilla, S. T., Hooper, A. T. & Rafii, S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)* **20**, 349-356, doi:10.1152/physiol.00025.2005 (2005).
- 31 Plane, J., Andjelkovic, A., Keep, R. & Parent, J. Intact and injured endothelial cells differentially modulate postnatal murine forebrain neural stem cells. *Neurobiol Dis* **37**, 218-227, doi:S0969-9961(09)00285-X [pii] 10.1016/j.nbd.2009.10.008 (2010).
- 32 Barnabe-Heider, F. & Miller, F. D. Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci* **23**, 5149-5160 (2003).
- 33 Bibel, M. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & Development* **14**, 2919-2937, doi:10.1101/gad.841400 (2000).
- 34 Ghosh, A. & Greenberg, M. Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* **15**, 89-103, doi:0896-6273(95)90067-5 [pii] (1995).
- 35 McAllister, A. K. Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1054-1060 (2001).
- 36 Meléndez-Herrera, E., Colín-Castelán, D., Varela-Echavarría, A. & Gutiérrez-Ospina, G. Semaphorin-3A and its receptor neuropilin-1 are predominantly expressed in endothelial cells along the rostral migratory stream of young and adult mice. *Cell Tissue Res* **333**, 175-184, doi:10.1007/s00441-008-0643-3 (2008).
- 37 Whitman, M. C., Fan, W., Rela, L., Rodriguez-Gil, D. J. & Greer, C. A. Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J Comp Neurol* **516**, 94-104, doi:10.1002/cne.22093 (2009).
- 38 Tucker, E. S., Polleux, F. & LaMantia, A. S. Position and time specify the migration of a pioneering population of olfactory bulb interneurons. *Developmental biology* **297**, 387-401, doi:10.1016/j.ydbio.2006.05.009 (2006).
- 39 Vasudevan, A. & Bhide, P. G. Angiogenesis in the embryonic CNS: a new twist on an old tale. *Cell Adh Migr* **2**, 167-169 (2008).
- 40 Peretto, P., Giachino, C., Aimar, P., Fasolo, A. & Bonfanti, L. Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *J Comp Neurol* **487**, 407-427, doi:10.1002/cne.20576 (2005).
- 41 Anstrom, J. A. et al. Germinal matrix cells associate with veins and a glial scaffold in the human fetal brain. *Brain research. Developmental brain research* **160**, 96-100, doi:10.1016/j.devbrainres.2005.07.016 (2005).
- 42 Aird, W. C., Jahroudi, N., Weiler-Guettler, H., Rayburn, H. B. & Rosenberg, R. D. Human von Willebrand factor gene sequences target expression to a subpopulation of endothelial cells in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4567-4571 (1995).
- 43 Deutsch, U. et al. Inducible endothelial cell-specific gene expression in transgenic mouse embryos and adult mice. *Experimental cell research* **314**, 1202-1216, doi:10.1016/j.yexcr.2007.12.026 (2008).

- 44 Taylor, J. P., Hardy, J. & Fischbeck, K. H. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296, **1991-1995**, doi:10.1126/science.1067122 (2002).
- 45 Lacar, B., Herman, P., Hartman, N. W., Hyder, F. & Bordey, A. S phase entry of neural progenitor cells correlates with increased blood flow in the young subventricular zone. *PloS one* 7, e31960, doi:10.1371/journal.pone.0031960 (2012).
- 46 Cruz Gaitan, A. M., Torres-Ruiz, N. M. & Carri, N. G. Embryonic neural stem cells in a 3D bioassay for trophic stimulation studies. *Brain Res Bull* 115, **37-44**, doi:10.1016/j.brainresbull.2015.04.006 (2015).
- 47 Melendez-Herrera, E., Colin-Castelan, D., Varela-Echavarria, A. & Gutierrez-Ospina, G. Semaphorin-3A and its receptor neuropilin-1 are predominantly expressed in endothelial cells along the rostral migratory stream of young and adult mice. *Cell Tissue Res* 333, **175-184**, doi:10.1007/s00441-008-0643-3 (2008).
- 48 Wegiel, J. et al. *The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes.* *Acta neuropathologica* 119, **755-770**, doi:10.1007/s00401-010-0655-4 (2010).
- 49 Feliciano, D. M., Quon, J. L., Su, T., Taylor, M. M. & Bordey, A. Postnatal neurogenesis generates heterotopias, olfactory micronodules and cortical infiltration following single-cell Tsc1 deletion. *Human molecular genetics* 21, **799-810**, doi:10.1093/hmg/ddr511 (2012).
- 50 Lafourcade, C. A. et al. *Rheb* activation in subventricular zone progenitors leads to heterotopia, ectopic neuronal differentiation, and rapamycin-sensitive olfactory micronodules and dendrite hypertrophy of newborn neurons. *J Neurosci* 33, **2419-2431**, doi:10.1523/JNEUROSCI.1840-12.2013 (2013).
- 51 Magri, L. et al. *Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions.* *Cell Stem Cell* 9, **447-462**, doi:10.1016/j.stem.2011.09.008 (2011).
- 52 Colin-Castelan, D., Ramirez-Santos, J. & Gutierrez-Ospina, G. Differential vascular permeability along the forebrain ventricular neurogenic niche in the adult murine brain. *J Neurosci Res* 94, **161-169**, doi:10.1002/jnr.23682 (2016).
- 53 Magri, L. & Galli, R. mTOR signaling in neural stem cells: from basic biology to disease. *Cell Mol Life Sci*, doi:10.1007/s00018-012-1196-x (2012).
- 54 Feliciano, D. M., Zhang, S., Quon, J. L. & Bordey, A. Hypoxia-inducible factor 1a is a Tsc1-regulated survival factor in newborn neurons in tuberous sclerosis complex. *Human molecular genetics* 22, **1725-1734**, doi:10.1093/hmg/ddt018 (2013).
- 55 Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M. & Dvorak, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146, **1029-1039** (1995).
- 56 Raymond, A. A. et al. *Abnormalities of gyration, heterotopias, tuberous sclerosis, focal cortical dysplasia, microdysgenesis, dysembryoplastic neuroepithelial tumour and dysgenesis of the archicortex in epilepsy. Clinical, EEG and neuroimaging features in 100 adult patients.* *Brain : a journal of neurology* 118 ( Pt 3), **629-660** (1995).



- 57 Oby, E. & Janigro, D. The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia* 47, 1761-1774, doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00817.x (2006).