

SILBO ALFA DE CIENCIAS QUÍMICA



UNC



Universidad Nacional de Córdoba



**Departamento de
QUÍMICA BIOLÓGICA**
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

Tesis Doctoral en Ciencias Químicas

**Regulación del desarrollo neuronal por
factores de crecimiento, modelos
“ex vivo” e *“in situ”***

Álvaro Fernando Nieto Guil

2016

Córdoba-Argentina

BIblioteca de Ciencias Exactas

autor

1974

1974

1974

1974

1974

1974

1974

1974

1974

1974

R-T

N
13720

Aufer

612-8

03/07/20

Director de Tesis: Dr. Santiago Quiroga



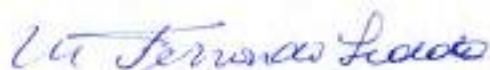
Comisión de tesis: Dra. Mariela Pérez



Dr. Daniel Mascó



Dr. Mario Guido



Dra. Fernanda Ledda

“Por si no nos volvemos a ver: buenos días, buenas tardes y buenas
noches.”

Esta tesis está dedicada a mis abuelos, por haber generado en mí la curiosidad por aprender y siempre estar orgullosos de mí.

Agradecimientos

Agradecer a las instituciones que me albergaron y que financiaron este proyecto todos estos años, la Universidad Nacional de Córdoba, la Facultad de Ciencias Químicas, el Centro de Investigación en Química Biológica de Córdoba y CONICET.

A Santiago por brindarme el espacio en su laboratorio para desarrollar esta tesis.

A las personas de CIQUIBIC que me brindaron su ayuda durante tantos años.

A mis compañeros del lab Diego, Lucas y Flor por su ayuda, por compartir, por las risas, por los consejos y por hacer el laburo más ameno.

A Iván y a Seba quienes fueron los primeros en enseñarme a navegar por las aguas caudalosas de los laboratorios.

A la Dra. Marta Nieto, Linnea y Carlos, gracias por sus enseñanzas, por su profesionalidad y sobre todo por su amistad.

No me olvido de vos Luisito, compañeros de la facu (casi amigos) y a hora más que amigos. Gracias por los recreos, mates y por las charlas de negocios que no llegaron a ninguna parte.

También a NFH durante el doctorado se generó una linda amistad, con mucho fútbol de por medio. Lástima que sos bostero.

Nico Moubesin gracias por los consejos y las magistrales juntadas.

A mi familia que la tengo lejos pero a la vez siempre presente. Si no fuera por sus valores transmitidos no sería quien soy. Gracias por su apoyo incondicional.

A mis amigos de acá y de allá a todos gracias.

Bueno que decir de vos Mari, si algo me dio el doctorado, fue la posibilidad de conocerte y transitar este camino juntos. Sos una gran persona, la mejor compañera. Gracias por ser parte de esto. Agradecer es poco

1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1 EL CEREBRO Y LA NEURONA	11
3. DESARROLLO NEURONAL: MODELOS "EX VIVO" VS MODELO "IN SITU"	11
4. DESARROLLO NEURONAL: EVENTOS DE POLARIDAD Y DIFERENCIACIÓN NEURONAL "EX VIVO"	12
4.1 CULTIVO PRIMARIO: UN MODELO "EX VIVO"	12
4.1.1 Estadio 1	12
4.1.2 Estadio 2	13
4.1.3 Estadio 3	13
4.1.4 Estadio 4	13
4.1.5 Estadio 5	13
5. DESARROLLO DE LA CORTEZA CEREBRAL: "IN SITU"	14
5.1 ORGANIZACIÓN DE LA CORTEZA	14
5.2 NEUROGÉNESIS: ZONAS PROLIFERATIVAS DE LA CORTEZA.....	15
5.3 PROGENITORES NEURALES: DIVISIÓN SIMÉTRICA Y ASIMÉTRICA	16
5.3.1 División Simétrica.....	17
5.3.2 División Asimétrica.....	17
6. MIGRACIÓN NEURONAL EN EL CEREBRO EN DESARROLLO	18
6.1 MODELOS DE MIGRACIÓN	18
7. ESTADIOS DEL DESARROLLO "IN SITU"	19
8. EVENTOS INTRACELULARES Y EXTRACELULARES: PISTAS NEURONALES	20
8.1 VIAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR: SEÑALES PARA EL DESARROLLO NEURONAL "EX VIVO" E "IN SITU"	21
8.1.1 IGF-1R/PI3k	21
8.1.2 TGF- β /Smads	22
9. HIPÓTESIS	25
10. OBJETIVOS	25
11. RESULTADOS PARTE I: RESULTADOS "EX VIVO"	26
11.1 ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE TGF- β 2 Y SU RECEPTOR EN EL CRECIMIENTO NEURONAL	26
11.1.1 Determinación de concentraciones fisiológicas de TGF- β 2 en cultivos primarios.....	26
11.1.2 Estudio de la presencia de la cascada canónica de TGF- β sobre Partículas de cono de Crecimiento (GCPs) y cultivo primario	27
11.1.3 Estudios sobre el efecto de pérdida de función de TGF- β 2R: Silenciamiento específico mediante shRNA.....	30
12. DISCUSIÓN PARTE I:	34
12.1 OBJETIVO I: EXAMINAR EL ROL DE TGF- β 2 Y SU RECEPTOR EN LA POLARIDAD NEURONAL "EX VIVO".	34
13. RESULTADOS PARTE II:	36
13.1 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE IGF-1R A DISTINTOS TIEMPOS SOBRE LA MIGRACIÓN DE NEURONAS PIRAMIDALES DE CORTEZA	37
13.2 RECUPERACIÓN DEL PERFIL MIGRATORIO CON LA SOBREEXPRESIÓN DE PI3K.....	40

13.3 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE IGF-1R SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA MADURACIÓN EN NEURONAS PIRAMIDALES DE CORTEZA.....	42
13.4 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE IGF-1R EN LA MADURACIÓN Y ORIENTACIÓN DE NEURONAS PIRAMIDALES DE CORTEZA.....	44
14. RESULTADOS PARTE III: RESULTADOS "IN SITU" PARA EL SILENCIAMIENTO DEL RECEPTOR DE TGF-B2.....	48
14.1 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE TGF-B2R A DISTINTOS TIEMPOS SOBRE LA MIGRACIÓN DE NEURONAS PIRAMIDALES DE CORTEZA.....	48
14.2 LA SOBREEXPRESIÓN DE PI3K NO RESCATA EL PERFIL MIGRATORIO.....	49
14.3 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE TGF-B2R SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA MADURACIÓN EN NEURONAS PIRAMIDALES DE CORTEZA.....	50
15. DISCUSIÓN PARTE II Y III: RESULTADOS "IN SITU".....	52
15.1 ESTUDIO "IN SITU" PARA INVESTIGAR SI LOS RECEPTORES IGF-1 Y TGFβ2 SON NECESARIOS PARA EL DESARROLLO NEURONAL DE LA CORTEZA.....	52
16. CONCLUSIONES.....	56
17. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
17.1 CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO DE RATA.....	58
17.2 ANIMALES.....	58
17.3 INMUNOFLORESCENCIA.....	59
17.3.1 Fijación con PFA.....	59
17.4 ANTICUERPOS 1R1OS.....	59
17.5 ANTICUERPOS 2R1OS.....	60
17.6 MICROSCOPIA.....	60
17.7 TRANSFECCIÓN.....	60
17.7.1 Transfección convencional.....	60
17.7.2 Transfección en suspensión.....	61
17.8 ELECTROPORACIÓN "IN UTERO".....	61
17.9 PERFUSIÓN Y FIJACIÓN DE TEJIDOS.....	62
17.10 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	62
17.11 BIOLOGÍA MOLECULAR: PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIONES.....	62
17.11.1 Obtención y construcción de los vectores para expresión de shRNAs.....	63
17.12 OBTENCIÓN DE CONSTRUCCIONES PARA EXPRESIÓN Y RECUPERACIÓN DE FENOTIPO.....	64
17.13 PURIFICACIÓN DE GCPs.....	64
17.14 ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT.....	64
17.15 CUANTIFICACIONES.....	65
18. ABREVIATURAS.....	66
19. BIBLIOGRAFÍA.....	67

1. RESUMEN

Las neuronas se convierten en células asimétricas polarizadas mediante el crecimiento de un único axón, que transmite los potenciales de acción a largas distancias, y varias dendritas ramificadas. Esta asimetría se define en estadios tempranos del desarrollo embrionario y es esencial para la formación y el funcionamiento de los circuitos neurales (Kriegstein and Noctor, 2004). La gran mayoría del conocimiento acerca de la regulación del establecimiento de la polaridad neuronal se obtuvo utilizando cultivos primarios de neuronas piramidales de hipocampo (Dotti et al., 1988), una herramienta que ha sido de gran utilidad en el estudio de diferentes aspectos de la diferenciación neuronal. Un avance metodológico importante en los últimos años involucró el desarrollo de técnicas de transfección de ADN y ARN *in situ* como por ej. la electroporación *in útero* (Saito and Nakatsuji, 2001), que permite estudiar la diferenciación neuronal en su ambiente natural. La neocorteza en sus primeras etapas de crecimiento y desarrollo experimenta una acelerada expansión, resultando en la formación de seis capas horizontales, que contienen poblaciones celulares molecular y funcionalmente distintas. Diferentes factores de crecimiento y sus receptores juegan un papel preponderante en la regulación de la diferenciación de estas neuronas, generando señales necesarias para que las neuronas puedan orientarse, desarrollarse y migrar para ubicarse en estratos superiores de la corteza en un patrón de adentro hacia afuera.

Esta tesis doctoral se enfoca en el estudio de los receptores de dos factores tróficos, uno denominado receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1R), que ha sido ampliamente estudiado por nuestro grupo y el otro el receptor del factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (TGF- $\beta 2R$), sugerido como un factor de crecimiento importante para el establecimiento de la polaridad neuronal (Yi et al., 2010). Nuestros primeros experimentos fueron diseñados para estudiar los efectos de la activación del TGF- $\beta 2R$ sobre el establecimiento de polaridad en células de hipocampo en cultivo. Donde demostramos que la activación de este receptor no promueve el establecimiento de polaridad neuronal. Experimentos de electroporación *in utero* demostraron por su parte que la supresión de la expresión tanto de IGF-1R como de TGF- $\beta 2R$ condujo a fallas en la migración neuronal en distintas fases, aparejadas con distintos defectos en el desarrollo. También estudiamos la implicancia de PI3k (fosfatidilinositol-3 kinasa), el primer efector intracelular de la cadena de señalización del IGF-1R y que ha sido involucrado en el establecimiento de polaridad neuronal de células de hipocampo en cultivo (Shi y col., 2003; Laurino y col.2005). Nuestros experimentos demostraron que la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de PI3k permitió restablecer el programa de desarrollo en neuronas silenciadas para IGF-1R pero no en neuronas silenciadas para TGF- $\beta 2R$. Esto fortalece la participación esencial de PI3k en la diferenciación neuronal y el establecimiento de polaridad neuronal como primer efector intracelular de la vía PI3k-AKT.

En, resumen, los experimentos realizados en el presente proyecto tendieron a estudiar y profundizar la implicancia de la cascada de señalización de IGF-1 y TGF $\beta 2$ en el neurodesarrollo mediante los modelos *ex vivo* e *in situ*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El cerebro y la neurona

Existen distintos tipos de neuronas si bien cada una de ellas es altamente específica en su función, todas tienen un rasgo en común, y es su marcada asimetría morfológica. En neuronas corticales o hipocampales, entre otras, se pueden distinguir morfológicamente dos compartimientos funcional y bioquímicamente distintos. Uno llamado compartimento somato-dendrítico, compuesto por el soma celular, lugar de síntesis de proteínas donde además emergen varias prolongaciones cortas llamadas dendritas (entre 4 a 6), encargadas de recolectar la información proveniente de neuronas vecinas. El segundo compartimento llamado axón, es una única fibra de calibre delgado y extremadamente largo (Arimura and Kaibuchi, 2007), y su función primordial es transmitir el impulso nervioso que culmina con la liberación de neurotransmisores con el objetivo de transmitir la información a la neurona contigua (sinapsis). Esta pequeña descripción sobre la morfología y función de una neurona, genera más preguntas. ¿Cómo logra una neurona desarrollarse y adquirir semejante asimetría? ¿Qué procesos externos e internos están involucrados en la especificación y elongación de un axón? Estas interrogantes son las de mayor interés para nuestro grupo.

3. DESARROLLO NEURONAL: MODELOS "EX VIVO" VS MODELO "IN SITU"

La gran mayoría de los datos que se conocen a la fecha, provienen de estudios "ex vivo" utilizando cultivos de neuronas disociadas de hipocampo de roedores. Aunque los estudios "ex vivo" han generado muchas hipótesis sobre los candidatos involucrados para axogénesis, hay varias diferencias importantes respecto a los modelos "in situ" e "ex vivo" (Noctor et al., 2004). En cultivo, después de la disociación, las neuronas vuelven a restablecer su estructura polarizada con un solo axón y varias dendritas. Este crecimiento sucede en un ambiente isotrópico. Actualmente las nuevas metodologías permitieron el desarrollo de técnicas de transferencia genética "in situ" (Saito, 2006), que permite realizar estudios de pérdida y ganancia defunción en la corteza cerebral de embriones. En este contexto las neuronas "in situ" deben ocupar sitios distintos a los sitios de nacimiento, interaccionando en un ambiente polarizado, donde los gradientes y contactos célula-célula marcan la orientación en la cual las neuronas deben migrar con precisa direccionalidad. Otro hecho particular es que el axón y el árbol detritico siempre se extienden desde un lado de la célula (Ayala et al., 2007).

Es interesante destacar que los mecanismos para dirigir el crecimiento axonal son similares a los utilizados en la migración de una neurona piramidal de corteza (Geraldo and Gordon-Weeks, 2009).

4. DESARROLLO NEURONAL: EVENTOS DE POLARIDAD Y DIFERENCIACIÓN NEURONAL "EX VIVO"

Como mencionamos las neuronas son células altamente especializadas con una compleja organización morfológica y funcional. Santiago Ramón y Cajal fue el primero en describir la estructura del sistema nervioso, la cual está constituida por células independientes conectadas entre ellas para transmitir impulsos nerviosos. Donde cada neurona posee estructuras receptoras y emisoras que permiten la transferencia de información entre neuronas, dendritas y axón.

Entender los procesos que gobiernan el desarrollo y diferenciación de las neuronas, en particular las causas que llevan a la "formación del axón", fueron posibles gracias al cultivo primario de neuronas piramidales del hipocampo (Dotti et al., 1988). El principal atractivo de los cultivos primarios de células nerviosas es la posibilidad de acceder de manera inmediata a neuronas vivas para su observación y manipulación; permitiendo definir y clasificar los cambios morfológicos e inmunoquímicos que están presentes en el desarrollo neuronal.

4.1 Cultivo Primario: Un modelo "ex vivo"

A finales de los años 80, se establecieron las bases del cultivo primario de neuronas de hipocampo "ex vivo" (Dotti et al., 1988). En principio, los cultivos neuronales primarios pueden prepararse de cualquier región del cerebro, sin embargo, el hipocampo representa una de las regiones del cerebro más utilizada debido a que su población neuronal es bastante homogénea. La población neuronal del hipocampo está representada por las neuronas piramidales las cuales constituyen el 85% a 90% de la población en esta estructura (Jareb and Banker, 1997). Las neuronas piramidales en cultivo expresan muchas de las características fenotípicas propias de una neurona, como son el desarrollo de un axón simple, y numerosas dendritas basales más cortas, manteniendo su identidad en cultivos "ex vivo" a lo largo del tiempo (Craig and Banker, 1994). De esta manera se puede identificar tanto bioquímica como morfológicamente 5 estadios de desarrollo (**Figura 1**) (Craig and Banker, 1994; Dotti et al., 1988).

4.1.1 Estadio 1

La disociación de hipocampos de cerebros embrionarios de rata a estadio embrionario 18 (E18). Se realiza a través de mecanismos químicos y físicos permite obtener células neuronales en suspensión. Luego de ser sembradas, los neuroblastos comienzan a interactuar con sustrato. Inmediatamente las neuronas adquieren un aspecto redondeado. En la periferia de las neuronas comienza a desarrollarse una estructura altamente dinámica llamada lamelipodia,

asociada a unos pocos filopodios, estructuras ricas en filamentos de actina y proteínas asociadas (α -actinina, filamina, vinculina, etc.).

4.1.2 Estadio 2

Al cabo de un par de horas (entre 6-12h.) la estructura lamepodica comienza a cambiar, dejando al descubierto pequeñas protrusiones llamadas neuritas. Estos procesos menores inmaduros, son morfológicamente idénticos. Poseen una distribución uniforme alrededor de la neurona (4 a 6 procesos), encontrándose en un evento dinámico de crecimiento y retracción continuo. Aunque no es visible morfológicamente, se desencadena un programa de eventos tempranos de polaridad a nivel molecular.

4.1.3 Estadio 3

El siguiente evento (entre 12 y 24 horas), es la ruptura de la asimetría morfológica, dando como resultado el crecimiento neto de una única neurita. Este desarrollo acelerado dará lugar al futuro axón. Durante este proceso podemos distinguir una nueva estructura llamada "cono de crecimiento". Esta estructura encargada de guiar el crecimiento axonal, censa el espacio extracelular en respuesta a diferentes señales moleculares (factores de crecimiento, moléculas señal presentes en el sustrato, interacciones célula-matriz-, etc.). Estos estímulos pueden ser tanto de carácter atractivo como repulsivo. Como si fuera poco el cono de crecimiento es el lugar donde se adiciona nueva membrana plasmática permitiendo el crecimiento del axón.

4.1.4 Estadio 4

Las neuritas remanentes a la especificación axonal, comienzan a crecer y desarrollarse. Esta transformación se caracteriza por un aumento del calibre de estas neuritas, aparición de ramificaciones en "Y", y el adelgazamiento próximo distal de los tallos neuríticos, morfología típica de las dendritas. Es importante destacar que la diferenciación de las dendritas ocurre aproximadamente de 2 a 3 días posterior al crecimiento axonal y no es consecuencia de un programa temporal fijo, sino que depende del desarrollo previo del axón (Kosik and Cáceres, 1991).

4.1.5 Estadio 5

Al cabo de 7 días de cultivo comienza el paso final de maduración. No involucra cambios en la polaridad, pero se refiere a la continua maduración del árbol dendrítico y axonal, incluyendo ramificación dendrítica, sinaptogénesis y formación de espinas dendríticas. En esta etapa se observan contactos sinápticos funcionales pudiéndose generar corrientes eléctricas (Bartlett and Banker, 1984; Segal, 1983).

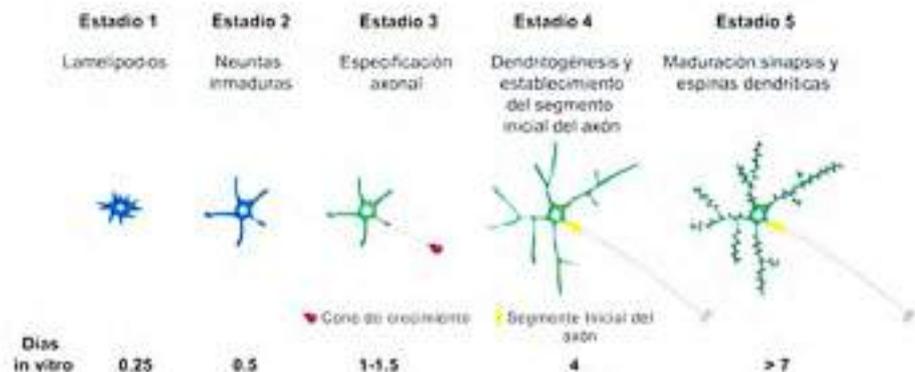


Figura 1. Esquema de desarrollo de neuronas hipocampaes “ex vivo” y su división siguiendo una secuencia de 5 estadios diferenciables. Adaptado (Barnes and Polleux, 2009)

5. DESARROLLO DE LA CORTEZA CEREBRAL: “IN SITU”.

5.1 Organización de la Corteza

La corteza de mamíferos superiores, posee seis capas horizontales, cada una con distintas poblaciones neuronales que presentan diferentes características bioquímicas y funcionales. Durante la formación de la corteza deben suceder distintos eventos celulares como la **neurogénesis**, **migración neuronal** y **desarrollo neuronal**, en un tiempo preciso (**Figura 2**).

Las primeras neuronas en nacer, aparecen al día embrionario 10.5 (E 10.5) las cuales forman la capa llamada **zona ventricular (ZV)**, ubicada adyacente al ventrículo, y se hace presente desde que se cierra el tubo neural. El día E11.5 aparece el **pre-plata (PP)**, situándose inmediatamente arriba de **ZV**. El **PP** y **ZV** son capas primigenias que se dividen en capas superiores e inferiores respectivamente. Entre los días E12.5 –E13.5 aparece la **zona sub ventricular (ZSV)**, ubicada arriba de la **ZV** y surge previo a la aparición del pico de neurogénesis (**corticogénesis**) en la corteza cerebral de los vertebrados (Bayer et al., 1991). En esta etapa se generan las neuronas de todas las capas superiores. La **ZSV** se divide y aparece la **ZI (Zona Intermedia)** y a partir del **PP** emergen **sub-placa (SP)**, la **placa cortical (PC)** y la **zona marginal (ZM)**. La **PC**, dará lugar a la neocorteza (varias capas), que se desarrolla en medio de estas dos capas (**SP** y **ZM**), de manera que las neuronas que nacieron más tarde llegan a la placa cortical y migran pasando a las neuronas que nacieron antes, **modelo de adentro hacia afuera** (Molyneaux et al., 2007). Por lo tanto cada nueva ronda de división celular genera las distintas capas que termina por definir la corteza. Por ej. el E12.5 se generan las células corticotalámicas (capa VI), el E13.5 aparecen las neuronas de proyecciones sub-cerebrales (capa V), el E14.5 las neuronas granulares (IV) y las neuronas con proyecciones al cuerpo calloso (II/III) (Greig et al., 2013).

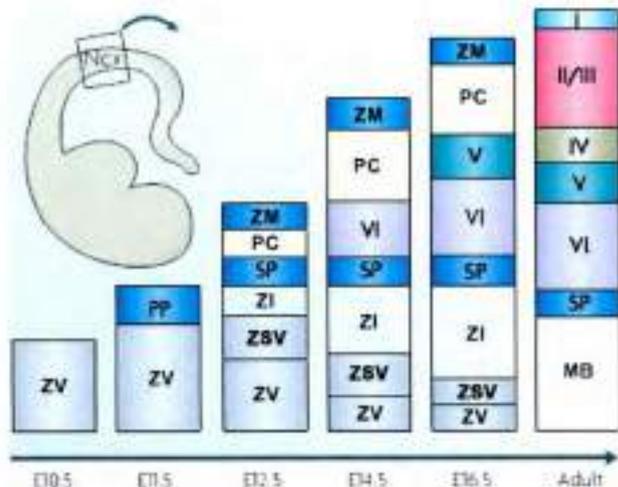
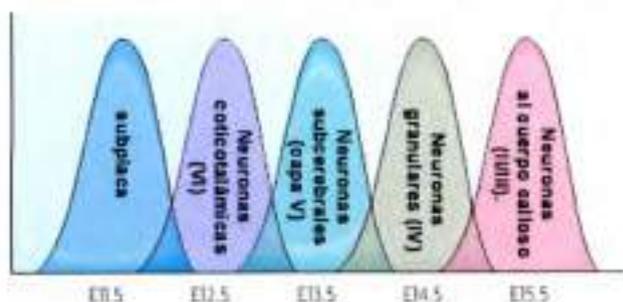


Figura 2. Representación de los eventos temporales que llevan a la formación de las distintas capas de la corteza (corticogénesis). Note el modelo de adentro hacia afuera. Las neuronas que nacieron inicialmente ocupan capas más profundas. Adaptado de (Molyneaux et al., 2007)



5.2 Neurogénesis: Zonas proliferativas de la corteza

La corteza de un cerebro adulto contiene entre 20-25 miles de millones de neuronas y entre 30-40 miles de millones de células gliales (Pelvig et al., 2008). Curiosamente esta proliferación y diversidad celular sucede en un breve pero muy intenso momento. Por ej. 5 mil millones de células nacen entre las semanas 13 y 20 de gestación (Ayala et al., 2007), esto quiere decir que 1000 nuevas neuronas son producidas cada segundo durante el período de mayor desarrollo en la corteza.

Las **células neuroepiteliales (CNP)**, son los primeros progenitores neurales ubicados en una delgada capa pseudoestratificada, ellas se dividen **simétricamente** (ver la siguiente sección), expandiendo el número de células pluripotentes. Por otro lado, las CNP también se pueden dividir **asimétricamente** generando las primeras neuronas de la corteza. Con el progreso de la neurogénesis, las CNP se transforman en las **células gliales radiales (GR)**. Las GR son los principales precursores neuronales ubicados en la **zona ventricular (ZV)**. Estas células de morfología bipolar, ubican su soma en la ZV con su proceso descendiente en contacto con el lumen ventricular, mientras que el proceso ascendente se extiende y hace contacto con la

membrana de la pía (**Figura 3**). Las **GR** proporcionan el andamiaje que dicta la organización de la corteza cerebral y el guiado de neuronas recién nacidas a través de la corteza, en un proceso de migración conocido como **migración radial** (Geraldo and Gordon-Weeks, 2009; Rakic, 1971). La **zona sub ventricular (ZSV)**, se encuentra arriba de la **ZV** y aparece justo antes de la aparición del pico de neurogénesis en la corteza cerebral de los vertebrados (Bayer et al., 1991). Las células precursoras de la **ZSV** son generadas también por el células **GR** en la **ZV** (Noctor et al., 2004), luego migran radialmente y se establecen en la **ZSV** (Bayer et al., 1991). La **GR** además puede generar un movimiento ascendente de su núcleo hacia la **ZSV**, donde también puede dividirse asimétricamente aumentando la población de neuronas piramidales de corteza. Los precursores de **ZSV** son conocidos por el nombre de **Glia Radial externa (exGR)** (Bellion et al., 2005) y **progenitores intermedios (PI)** (Noctor et al., 2004). Durante los estadios prenatales del desarrollo cortical los **PI** también producen neuronas corticales. (Hansen et al., 2010; Miyata et al., 2001; Nieto et al., 2004; Noctor et al., 2004). Los cuales migran radialmente a lo largo de las fibras radiales para ubicarse también en el **CP** (Vallee et al., 2009).

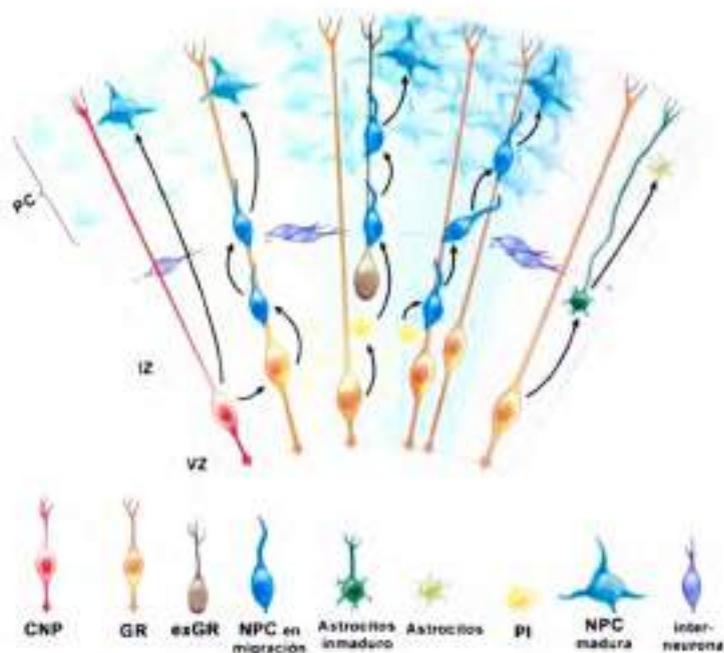


Figura 3. Esquema de la corteza de ratón. Zona ventricular (siglas en ingles VZ), zona intermedia (siglas en ingles IZ), plato cortical (de sus siglas en Ingles CP). Representación de las distintas poblaciones celulares durante el neurodesarrollo de la corteza, Células Neuroepiteliales (CNP), Glia Radial (GR), Glia Radial externa (exGR), Neurona Piramidal de corteza (NPC), Progenitor intermedio(PI). Adaptado de www.sciencemag.org.

5.3 Progenitores neurales: división simétrica y asimétrica

En la sección anterior dimos a conocer a los progenitores principales y también la zona donde se ubican en la corteza. Cabe preguntarse ¿Cómo estos progenitores llevan la tarea de poblar y expandir la corteza? Existen dos modelos de división celular que explican la neurogénesis, llamados división simétrica y división asimétrica.

5.3.1 División Simétrica:

Este caso es el menos común de división (9,6%) en el cual una GR se divide en dos hijas que a su vez pueden dividirse simétrica o asimétricamente. Este paso particular de división asimétrica se da en los estadios más tempranos de neurogénesis cortical. Este tipo de división es responsable de la expansión de la población proliferativa celular (Figura 4).

5.3.2 División Asimétrica:

Este tipo de división celular es el más común (78,9 %), es llevado a cabo por GR en la ZV. El resultado de esta división genera dos células hijas una GR y una neurona piramidal de corteza. Dentro de la división asimétrica encontramos 3 subtipos. La división principal (65,8%) es para neurogénesis de neuronas piramidales de corteza (NPC) más una GR, el segundo subtipo (7,3%) división asimétrica de progenitores, ambas hijas (una es GR y PI), comienzan de nuevo un ciclo de división donde los PI migra hacia la ZSV. Por último, encontramos una división asimétrica final (26,9%), en este caso las GR pierden su contacto con ZV y migran fuera de la ZV (Figura 4). Un 11,5% no ha sido clasificado dentro de ninguno de los dos modelos. En la ZSV también suceden divisiones celulares, como mencionamos los PI generados de la ZV se translocan hacia ZSV, donde un 10,5% de las divisiones dan origen a 2 nuevos PI, mientras que el resto son 89,5% da origen a 2 NPC que migran hacia la corteza. Los progenitores neurales son responsables de múltiples tareas de vital importancia. Su gran actividad proliferativa durante los procesos iniciales de crecimiento explica la asombrosa expansión en el número de células que pueblan una corteza en desarrollo. En las fases finales de la mayoría de los progenitores neurales dan lugar a dos células hijas que se diferencian en neuronas provocando la desaparición de los precursores neurales.

División Simétrica

División Asimétrica

División principal

División de progenitores

División final

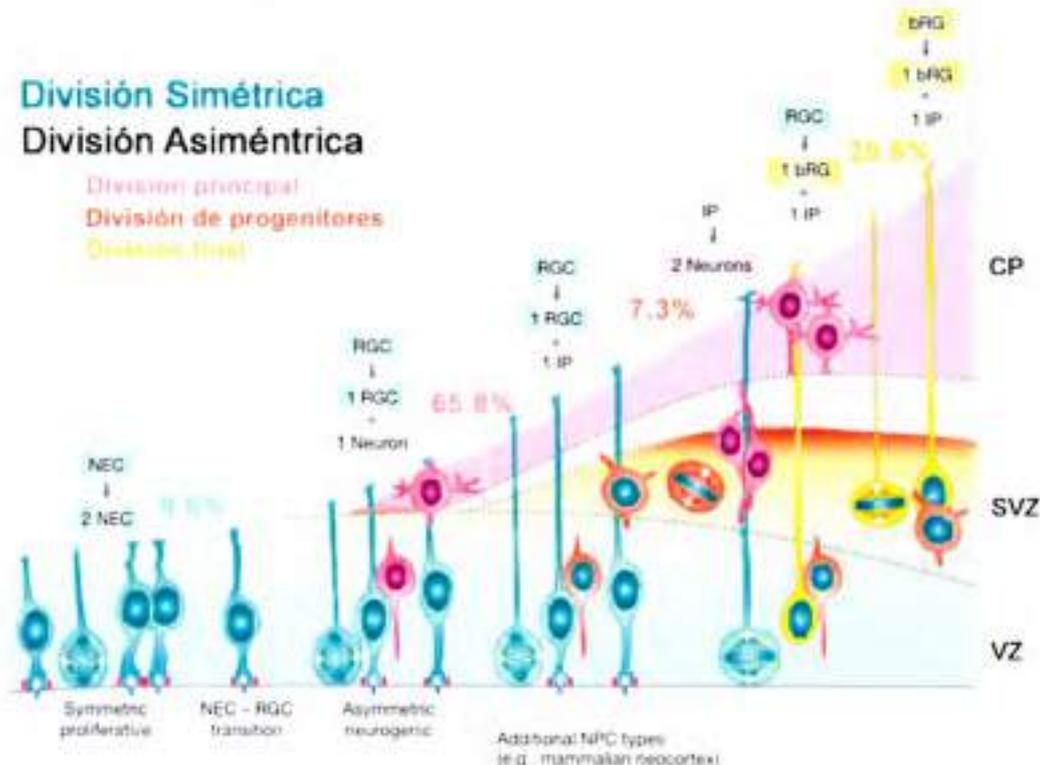


Figura 4. Representación de los modelos de división simétrica y asimétrica durante el desarrollo de la corteza. Adaptado de (Paridaen and Huttner, 2014).

6. MIGRACIÓN NEURONAL EN EL CEREBRO EN DESARROLLO

Uno de los aspectos de mayor importancia durante la neurogénesis, es que las neuronas adultas, no se ubican en su lugar de nacimiento, sino que deben migrar grandes distancias hasta ubicarse en sitio final en la corteza. La migración radial, constituye el principal modo de migración de las neuronas piramidales durante el desarrollo de la corteza cerebral y es el fenómeno responsable de la corticogénesis. La migración tangencial es el otro modelo conocido de migración y es realizado por la mayoría de las interneuronas corticales inhibitorias (Ayala et al., 2007), del cual no trataremos en esta tesis.

Durante el transcurso de la migración las neuronas adquieren su morfología bipolar características siendo el primer cambio morfológico importante durante la migración. En esta etapa se extienden dos procesos, por un lado en el sentido de la migración se encuentra el **Proceso guía (PG)**, mientras que en el sentido opuesto se extiende el **Proceso de Arrastre (PA)** el cual mira al ventrículo (Noctor et al., 2004). Las funciones del PG es controlar el movimiento secuencial del núcleo y de la direccionalidad de la célula adaptándose a las demandas del ambiente gracias a su capacidad de responder a gradientes quimiotácticos. El PG se encuentra en estrecho contacto con las **fibras de las GR (FGR)**, por el contrario **PA** no hace contacto con **FGR** y se extiende lejos de ella (Ayala et al., 2007). Ambas estructuras dan origen al árbol dendrítico y al axón respectivamente.

6.1 Modelos de Migración

La **Migración multipolar** sucede en las primeras 24h luego del nacimiento de una neurona piramidal de corteza. La mayoría de células multipolares permanece dentro de una banda estrecha entre VZ y ZSV llamada **MMZ** (del inglés "multipolar marginal zone") (Vallee et al., 2009). Este tipo de migración se caracteriza por desplazamientos en diferentes direcciones adoptando una morfología multipolar la cual no está asociada a ninguna **FGR**. En este estadio las neuronas extienden y retraen sus procesos con gran dinámica (Kornack and Rakic, 1995). Luego de un día las neuronas cambian a una morfología bipolar para empezar la etapa de **migración por locomoción**. Durante esta etapa las neuronas interactúan con las fibras de las **GR**, para ascender, a lo largo de estas fibras, hacia los estratos superiores de la corteza. (Geraldo and Gordon-Weeks, 2009). Este tipo de locomoción se caracteriza por poseer períodos de ningún movimiento y períodos de rápido movimiento hacia la pía. Por lo tanto las neuronas que tienen este tipo de movimientos nacen de **GR** y usan sus fibras como soporte para su posterior migración (**Figura 6**).

La **translocación del Soma** no involucra a las **FGR** para que suceda (Rakic, 1971). Este tipo de movimientos involucra el desplazamiento del núcleo a través del proceso externo. El soma celular se mueve hacia la pía, mientras que el proceso guía se mantiene en contacto con la

superficie de la pia (Geraldo and Gordon-Weeks, 2009). Interesantemente el proceso de araste pierde su contacto con la ZV, y el proceso guía se va haciendo más corto a medida que el cuerpo celular se va moviendo hacia la ZM (Figura 6). Este tipo de locomoción se debe a que la división asimétrica de GR, en donde una de las células hijas heredó el proceso guía se convierte en una célula postmitótica, mientras que su hermana se convierte en la próxima generación de GR (Vallee et al., 2009).

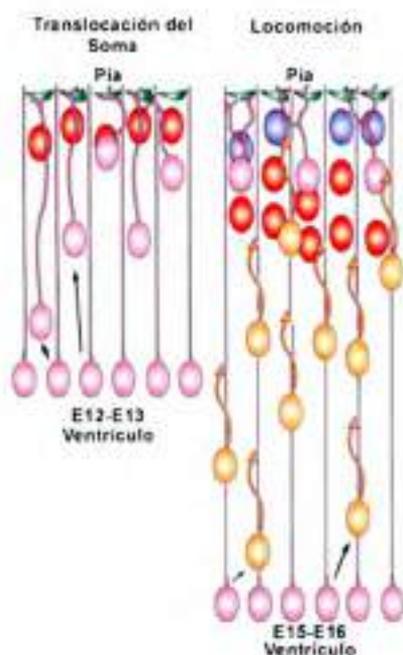


Figura 6. Adaptado de (Gupta et al., 2002)

Los tres modelos (Translocación Somal, Locomoción y Migración multipolar), no son procesos independientes. En diferentes etapas del desarrollo las neuronas pueden desplazarse con un modelo y cambiar a otro tipo de locomoción. Como mencionamos cada tipo de desplazamiento está ligado a una etapa de su desarrollo, y a ciertas poblaciones neuronales.

7. ESTADIOS DEL DESARROLLO "IN SITU"

El marco teórico desarrollado en las secciones anteriores nos permite introducir las distintas etapas del desarrollo de neuronas piramidales de corteza (Figura 7).

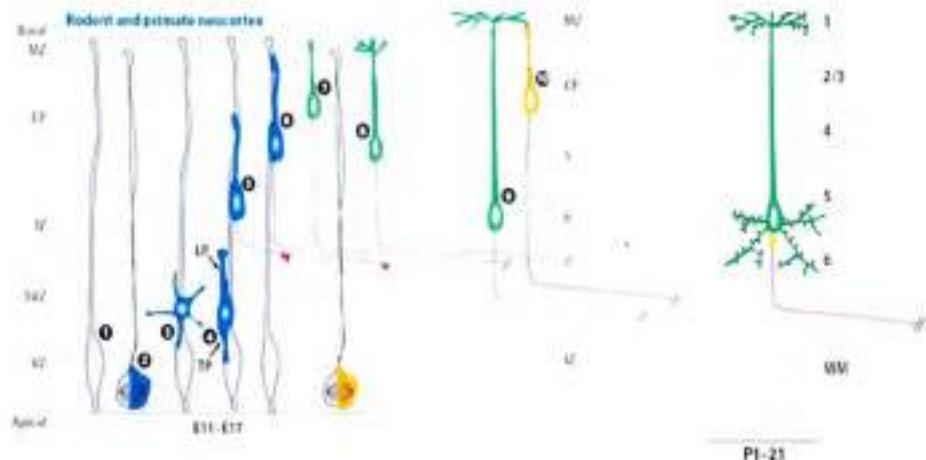


Figura 7. Estadios de desarrollo neuronal "in situ". Adaptado (Barnes and Polleux, 2009)

El pico de neurogénesis sucede entre los días embrionarios 11 al 17 (E11-E17). La GR (1) se divide asimétricamente, generando una neurona postmitótica multipolar (2-3). Al final de la fase multipolar, el proceso menor especificado como futuro axón comienza a establecerse como el proceso de arrastre (PA) previo a la formación del proceso guía (PG) (4) (Namba et al., 2015). Este cambio morfológico, de multipolar a bipolar, permite que la neurona interacciones con las FGR y comience a migrar. Cuando la neurona llega a la ZI el PA se elonga tangencialmente mientras la neurona sigue ascendiendo hacia la CP (5). Este proceso continua hasta que la neurona se ubica un una zona específica de CP y el PA sigue creciendo tangencialmente formando el axón (6-7). El PG comienza a desarrollar ramificaciones que serán el futuro árbol dendrítico en la ZM (8). Una nueva ronda de división celular comienza, donde las neuronas recién nacidas se desplazan hacia los sitios ocupados por neuronas más antiguas. Es por ello que las neuronas que nacieron antes mueven su soma celular hacia abajo (hacia el ventrículo), generando espacio para que se ubiquen las células de nacimiento posteriores (9-10). La última etapa las neuronas adquieren su arborización a nivel somal, crecen espinas dendríticas, y se observa el segmento inicial del axón.

8. EVENTOS INTRACELULARES Y EXTRACELULARES: PISTAS NEURONALES

Las neuronas piramidales de corteza se valen de distintos procesos intracelulares como extracelulares para poder realizar los eventos que desencadenan los procesos de orientación, migración y desarrollo de manera conjunta. Dentro de los eventos intracelulares podemos mencionar la relación funcional del aparato de Golgi y el centrosoma. Ambas organelas se mueven hacia el proceso guía (Umeshima et al., 2007) y desde allí, el huso mitótico sujeta al núcleo generando la fuerza motora que lo moviliza durante la migración, este proceso es conocido como **nucleokinesis** y es el mecanismo clave involucrado en los procesos de

migración. El citoesqueleto de actina y los microtúbulos son necesarios para que se produzca esta asociación (Brownhill et al., 2009). Inicialmente un subconjunto de microtúbulos son esenciales para conectar al Golgi fragmentado, ubicados en la periferia de la célula (Miller et al., 2009). Luego los microtúbulos del centrosoma capturan a la membrana del Golgi, transportándola hasta el centro de la célula (Cole et al., 1996). Cuando el complejo se encuentra ubicado en el centro de la célula, la actina es imprescindible para mantener al complejo centrado (Valderrama et al., 1998). De esta manera el Golgi y el centrosoma se asocian para formar una estructura de anclaje que genera la fuerza motora necesaria para la migración neuronal desde la base del proceso guía.

Otro aspecto observable en la formación de la corteza es la gran acumulación de células, en contacto mutuo. El contacto célula-célula es otro de los mecanismos que utilizan las neuronas nacientes para migrar correctamente. Durante su estadio multipolar, la interacción célula-célula juega un rol muy importante en los movimientos laterales que se suceden. Los niveles de integrinas son esenciales para regular la migración neuronal. Por ejemplo la baja en la expresión de la integrina $\alpha 5$ afecta migración neuronal arrojando a las neuronas corticales en **ZV/SZV**, con formas multipolares aberrantes, pero no afecta la morfología de las células radiales gliales, necesarias para dar soporte a la migración de las neuronas nacientes (Marchetti et al., 2010). Queda en evidencia que la interacción de las células durante el neurodesarrollo, aporta información que genera ajustes continuos de los niveles de expresión de proteínas de adhesión y de receptores de superficie permitiendo coordinar todos los eventos necesarios para que las neuronas se diferencien durante la migración.

8.1 Vías de señalización celular: Señales para el desarrollo neuronal "ex vivo" e "in situ"

Por lo expuesto anteriormente resulta evidente que el crecimiento neurítico está influenciado por señales extracelulares que desencadenan cascadas de señalización, las cuales actúan sobre la síntesis de proteínas, la expresión génica o la localización sub-celular de proteínas. La influencia de factores de crecimiento durante el desarrollo neuronal, particularmente el establecimiento de polaridad neuronal ha sido de gran aporte en los últimos años. En la presente tesis abordaremos dos vías de señalización de gran importancia, la cascada de señalización IGF-1/IGF-1R y en el último tiempo la cascada de señalización TGF- β /TGF- β R como un nuevo factor involucrado en el establecimiento de polaridad neuronal "in situ".

8.1.1 IGF-1R/PI3k

La principal ruta de señalización en el establecimiento de la polaridad neuronal es la vía que integra IGF-1/IGF-1R/PI3k-Akt. **PI3k (fosfatidilinositol-3 kinasa)** regula múltiples funciones biológicas entre las que se incluyen la supervivencia, la expresión génica, el establecimiento de la polaridad celular y la especificación axonal (Barnes and Polleux, 2009; Shi et al., 2003). PI3k regula la vía de señalización de Akt (o PKB; protein kinase B) la cual constituye uno de los principales nodos de señalización neuronal. El silenciamiento y bloqueo específico del receptor de IGF-1 (IGF-1R), previenen la formación del axón (Sosa et al., 2006). La activación de IGF-1R

implica la activación de PI3k. Esta enzima y su principal producto el fosfolípido fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP3), se ubican en el tercio distal del futuro axón en crecimiento, elementos involucrados en el crecimiento neurítico y especificación axonal (Laurino et al., 2005; Menager et al., 2004; Shi et al., 2003). Además la inhibición farmacológica de la PI3k con LY294002 o Wortmaninna previene la formación del axón, mientras que la sobre expresión de subunidad catalítica de PI3k (p110) constitutivamente activa permite la formación de múltiples axones (Shi et al., 2003). También existen evidencias que cultivos de células hipocampales en estadio 2 al ser estimulados con IGF-1 presentan un enriquecimiento del receptor fosforilado de IGF-1R. Este es un evento temprano de polaridad previo a la formación del axón, conservándose esta distribución en estadio 3 cuando se está formando el axón (Sosa et al., 2006).

Muchos autores remarcan el rol de los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) y IGF-1R durante el nuerodesarrollo *"in situ"*. Las cantidades de IGFs durante el desarrollo son abundantes en el líquido cefalorraquídeo (producido en plexo coroideo) y IGF-1R se encuentra expresado en la superficie ventricular donde se ubican los progenitores neurales (Lehtinen et al., 2011), permitiendo a los progenitores neuronales ser expuestos a altos niveles de IGFs desde las zonas apicales del ventrículo. Por lo tanto IGF-1 y su receptor regulan el desarrollo, proliferación y diferenciación de las glías radiales (Joseph D'Ercole and Ye, 2008) (Figura 8). Por lo tanto IGF-1/IGF-1R son reguladores del tamaño del cerebro (Popken et al., 2004). Es interesante remarca que la formación del gradiente de IGF-1 desde la zona ventricular puede ser un factor importante para el establecimiento de polaridad neuronal en las neuronas piramidales de corteza.

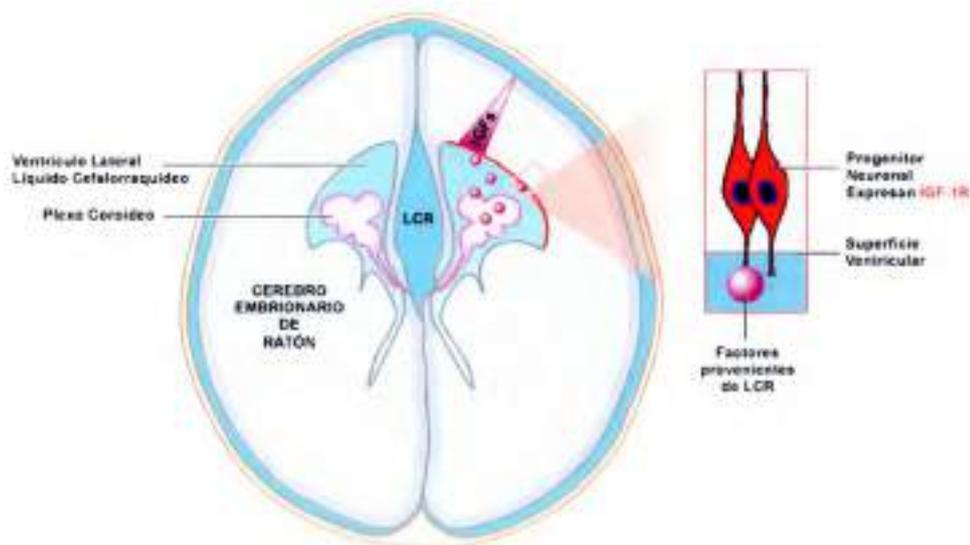


Figura 8. Adaptado de (Lehtinen et al., 2011)

8.1.2 TGF- β /Smads

La familia de factores de crecimiento transformante- β (de sus siglas en inglés "Tranfoming Growth Factor- β " TGF- β ;) constituye el prototipo de factores de crecimiento multifuncionales que regulan contextualmente una gran variedad de procesos celulares, como por ejemplo

especificación celular, migración, proliferación y apoptosis (Massagué and Chen, 2000) tanto durante el desarrollo embrionario como en la edad adulta. Los mecanismos de señalización de la superfamilia TGF- β , se encuadra en un modelo bien aceptado, que involucra complejos receptores de membrana (I y II) los cuales pueden dimerizar formando un tetrámero que se autofosforila (actividad serina-treonina quinasa), proteínas efectoras y reguladoras de la transcripción denominadas Smads (vía de señalización canónica), y otras cascadas de señalización no canónicas independientes de Smads (Zi et al., 2012).

Las vías de señalización canónicas involucran las proteínas Smads, que en base a su función celular se dividen en tres grupos (Heger et al., 2009; Schmierer and Hill, 2007):

- **Las Smads reguladas por receptor (R-Smad)**, son sustrato de fosforilación por los receptores tipo I. Smad2/3 se activan por TGF- β s y Smad1/5/8 son activadas por BMPs.
- **Las Smad mediadora común (Co-Smad)** es la Smad4, actúa como mediador común, a través de la formación de un complejo heterotrimérico con las R-Smads que se traslocan al núcleo para modular la transcripción de genes diana.
- **Las Smads inhibitoras (I-Smad)**, pertenecen a este grupo Smad6 y 7. Tienen una función neutralizadora de la señal de la superfamilia TGF- β . Smad7 inhibe preferentemente la vía de TGF β s, mientras que Smad6 inhibe preferentemente la vía de BMPs (Santibanez et al., 2011).

Entre las vías de señalización no-Smad mejor estudiadas se encuentran MAPKs quinasa activada, TGF- β (TAK-1), Erk, p38-MAPK y c-Jun (JNK); la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina-NFATc; quinasas de crecimiento y supervivencia PI3k/AKT/mTOR; y proteínas G pequeñas tipo Ras, Rho, Rac y Cdc42. La versatilidad de la señalización por proteínas Smad y las interacciones funcionales de los mecanismos de señalización de las proteínas Smad y no-Smad definen a menudo la respuesta celular a TGF- β s y otras proteínas de la familia (Massague, 2012).

Estudios realizados en cultivo primario de neuronas granulares demostraron que la inhibición farmacológica del receptor de TGF- β , así como el silenciamiento de Smad2, reportaron aumentos de la longitud axonal, (Stegmuller et al., 2008). Estos autores relacionan a Smad2 como un regulador negativo de la vía Cdh1-APC/SnoN (de sus siglas en inglés "E3 ubiquitin ligase Cdh1-anaphase-promoting complex"/ Factor Transcripción) la cual está asociada al crecimiento axonal (Konishi et al., 2004), como así también a un rol neuroprotectivo (Tesseur and Wyss-Coray, 2006) y no así en el establecimiento de polaridad neuronal.

En el último tiempo la participación de TGF- β y su receptor han tomado relevancia como nuevos factores neurotróficos "*in situ*". Ambos receptores (TGF- β 1 y 2) se expresan en la zona germinal (ZV) y lamina 6, mientras que la señal de TGF- β 1R es difusa en la ZI de la corteza, la señal TGF- β 2R sigue prevaleciendo. Además la señal de TGF- β 2R aumenta sustancialmente desde estadios embrionarios 14 al 18 (Yi et al., 2010). También se observó que TGF- β se expresa en el sistema nervioso de mamíferos durante el desarrollo (Mecha et al., 2008) y su receptor también se encuentra presente en la corteza en desarrollo (Tomoda et al., 1996). Mientras que "*ex vivo*", la aplicación local de TGF- β en una neurita en estadio 1, promueve la extensión de esa neurita para convertirse en axón (Yi et al., 2010). Además, la depleción de TGF- β 2R "*in situ*" (receptor 2 de TGF- β), promueve el mismo fenotipo de neuronas sin axón, en donde se produce un retardo en la migración radial en la ZI (Yi et al., 2010). Estos autores

indican que la señales axogénicas dependientes de TGF- β son mediadas por la activación de Par6. Curiosamente la actividad de PI3k es necesaria para el reclutamiento polarizado de Par 3 y 6, el cual es fundamental para la polaridad neuronal (Shi et al., 2003).

Indudablemente las vías de señalización de IGF-1/IGF-1R y de TGF- β /TGF- β R juegan un papel muy importante sobre el neurodesarrollo. A pesar de ellos los mecanismos de señalización comienzan a ser caracterizados. Por otro lado cabe preguntarse si ¿Los efectos de estas vías de señalización son preponderantes en distintas etapas del desarrollo? Este tipo de interrogantes son los que se discutirán en la siguiente sección.

9. HIPÓTESIS

El silenciamiento génico de IGF-1R y TGF- β 2R afectarían distintas etapas del neurodesarrollo tanto *“ex vivo”* como *“in situ”*, a través de PI3K. Donde IGF-1R sería necesario en etapas tempranas de la migración (orientación, establecimiento axonal). Mientras que TGF- β 2R sería necesario en etapas avanzadas de la migración (desarrollo del árbol dendrítico y elongación axonal).

10. OBJETIVOS

- La implementación de la técnica de electroporación *“in utero”* como una herramienta de transferencia genética *“in situ”*.
- Examinar la vinculación de estos receptores y sus vías de señalización en la especificación axonal y desarrollo neuronal, trazando un paralelismo entre los modelos de estudio *“ex vivo”* e *“in situ”*.

Específicamente proponemos:

- **Examinar el rol de TGF- β 2 y su receptor en la polaridad neuronal *“ex vivo”*.**
 - Estudiar la presencia de TGF- β en cultivos primarios
 - Estudiar los efectos de la pérdida de función del receptor de TGF- β 2.
- **Estudiar *“in situ”* si los receptores IGF-1 y TGF- β 2 son necesarios para el desarrollo neuronal de la corteza.**
 - Estudiar los efectos de la pérdida de función de los receptores de IGF-1 y TGF- β 2.
 - Estudiar si PI3k es un efector de los receptores de IGF-1 y TGF- β 2.

11. RESULTADOS PARTE I: RESULTADOS "EX VIVO"

11.1 Análisis de la influencia de TGF- β 2 y su receptor en el crecimiento neuronal

11.1.1 Determinación de concentraciones fisiológicas de TGF- β 2 en cultivos primarios

Desde el marco teórico generado en la introducción, podemos establecer que unos de los eventos más significativos para el desarrollo de neuronas piramidales de hipocampo en cultivo es el establecimiento de polaridad neuronal (Banker and Goslin, 1988; Goslin et al., 1988). Los fenómenos que suceden en este espacio temporal definido, permitirán establecer el rol de distintas proteínas para el desarrollo neuronal. Particularmente en nuestro caso estudiar la presencia de factores de crecimiento (TGF- β / TGF- β R) durante esta etapa, permitirá establecer una relación de estos con el desarrollo neuronal. Para ello desarrollamos un conjunto de experimentos, utilizando el cultivo primario de neuronas hipocámpales de embriones a E18 como marco metodológico (ver "Materiales y Métodos").

Uno de los primero interrogantes a analizar es saber si: ¿Las neuronas en cultivo son capaces de secretar niveles endógenos de TGF- β que activen sus propios receptores?, Durante esta etapa también fue de nuestro interés plantear dos escenarios para llevar a cabo estos experimentos. Por un lado un grupo de células fueron cultivadas en condiciones de alta insulina (>1500 nM) y el otro grupo en condiciones de baja insulina (5 nM de Insulina). Es muy interesante detenernos en estos dos contextos. Insulina es una hormona de vital importancia para el manteniendo y sobrevida de las neuronas piramidales en cultivo. Pero el exceso de insulina es capaz de activar los recetores de IGF-1 y así activar las cascadas de señalización que promueven la especificación y crecimiento axonal; enmascarado las funciones de IGF-1, como estimulador del desarrollo. Por otro lado la ausencia total de insulina en el medio afecta la sobrevida de las células en cultivo. Por lo tanto una condición necesaria para realizar este tipo de experimentos es aquella donde la cantidad de insulina en el medio es tal que no permite activar los receptores de IGF-1 pero si sus propios receptores (baja insulina).

Para detectar las concentraciones fisiológicas de TGF- β en cultivos, obtuvimos los sobrenadantes de estos cultivos primarios a 24, 48, y 72h en medios de baja y alta insulina. Los mismos fueron utilizados en un ensayo de Elisa tipo sándwich para los ligandos de TGF- β 1, 2 y 3 (ver "Materiales y Métodos") (Figura 9).

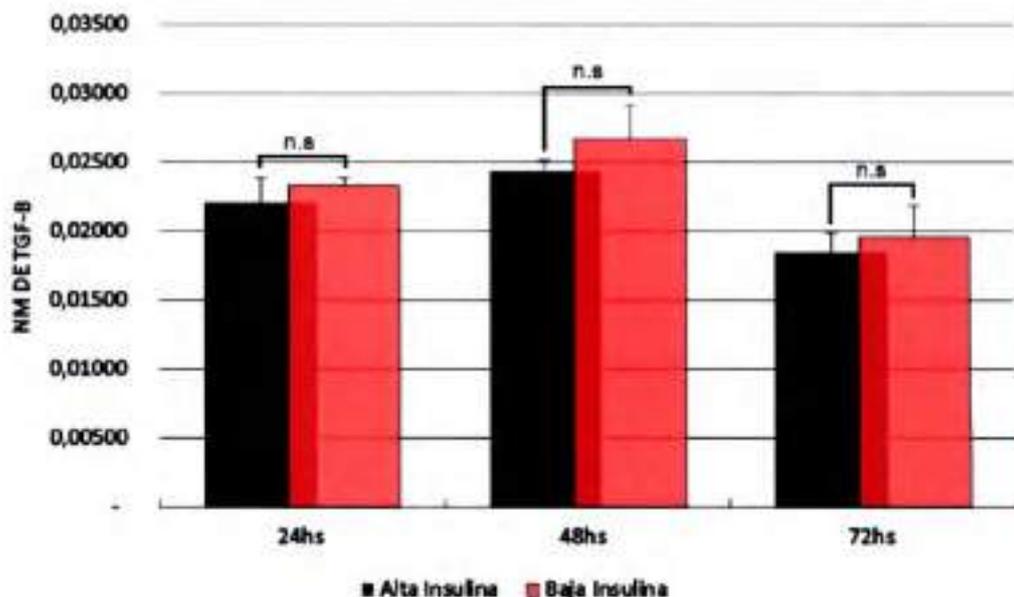


Figura 9: Cuantificación de la concentración de TGF- β s en sobrenadantes de cultivo de neuronas piramidales de hipocampo. Ensayo de Elisa tipo sándwich. Se muestran las concentraciones (+/-SEM), del ligando TGF- β en sobrenadantes de cultivos neuronales a 24, 48 y 72h. Los datos no se observaron diferencias significativas entre los sobrenadantes en alta insulina comparados con los sobrenadantes a baja insulina. $p \leq 0,86$ 24h, $p \leq 0,87$ 48h, $p \leq 0,95$ 72h. n: 3 experimentos independientes. Test estadístico aplicado test t no apareado.

Efectivamente las neuronas son capaces de producir concentraciones pequeñas de TGF- β s (aprox. 0,025 nM). Además el exceso de insulina no genera variaciones en la concentración de este ligando cuando se lo comparó con los medios de baja insulina

Las concentraciones observadas en ambos casos no serían suficiente para activar sus propios receptores los cuales tienen una constante de disociación de 5 nM para TGF- β R

11.1.2 Estudio de la presencia de la cascada canónica de TGF- β sobre Partículas de cono de Crecimiento (GCPs) y cultivo primario

Las condiciones fisiológicas en cultivo primario no representan un escenario completo que nos permita discriminar si la cascada de señalización es efectiva para activar sus propios receptores. Además en condiciones fisiológicas pueden existir otras fuentes de este ligando, como otros tipos de células como por ej las glías. Además se sabe que TGF- β s se expresa durante el desarrollo del sistema nervioso (Kriegstein et al., 2002).

Las concentraciones observadas no son suficientes para activar sus propios receptores, no es indicativo que estos receptores no estén presentes o que su cascada no se encuentre activa. Por este motivo se decidió evaluar con distintos ensayos bioquímicos si la cascada canónica de señalización TGF- β / TGF- β R/Smad2 se encuentra presente y si la misma puede de ser activada.

En primera instancia realizamos estimulaciones en agudo de partículas de conos de crecimiento, denominadas GCPs (del inglés Growth Cone Particles, ver "Materiales y Métodos"). La técnica de GCPs permite aislar conos de crecimiento, con la maquinaria molecular que se encuentra allí presente

A partir de cerebros totales de embriones de rata de 18 días de gestación, se obtienen los GCP que previamente fueron incubados por 40 min en hielo para reducir su actividad basal. Disminuyendo la actividad metabólicas de las distintas vías de señalización celular. A continuación fueron estimulados con 6 y 10 nM de TGF- β 2 por 5 y 10 min. Luego los GCPs fueron lisados para liberar su contenido e incubado con un anticuerpo específico que reconoce al efector secundario activo (fosforilado) cascada abajo del receptor de TGF- β , llamado pSmad2 (Figura 10).

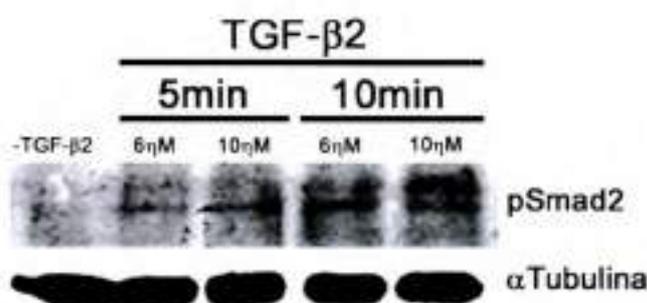


Figura 10: Western blot de estimulaciones en agudo de GCPs con TGF- β 2 exógeno. Nótese el incremento de la expresión de pSmad2, luego de la estimulación con TGF- β 2 tanto a 5min como 10 minutos. Control de carga α Tubulina.

Se observó que la estimulación de GCPs con 6nM tanto como con 10nM de TGF- β 2 promueve la activación de la proteína Smad2 en los dos tiempos de estimulación utilizados. Este resultado indica la presencia TGF- β R en la superficie de la membrana de los GCPs capaces de ser estimulados por TGF- β 2, que en consecuencia desencadenan la activación de la vía de señalización que involucran a la proteína Smad2 activa cascada abajo

El siguiente paso fue evaluar si específicamente esta vía de señalización también se encontraba presente en neuronas piramidales de hipocampo, donde se realizó el siguiente diseño experimental. En este caso las neuronas piramidales de hipocampo fueron cultivadas por 24h, y posteriormente fueron privadas con un medio mínimo por 5h con el objetivo de evitar la activación de cualquier vía de señalización presente. Luego se estimuló en agudo los cultivos con TGF- β . Una de las condiciones experimentales fue simultáneamente estimulada con TGF- β 2 e incubadas con un inhibidor específico del receptor de TGF- β , llamado SB431542 (Caraci et al., 2008) (Figura 11). El uso de inhibidores selectivos, permite evidenciar si la cascada de TGF- β es activada por otros factores además del propio TGF- β . Luego las células fueron levantadas de la placa de cultivo y lisadas con el uso de detergentes específicos para tal fin (ver Materiales y Métodos), posteriormente se analizó los niveles de proteína mediante Western Blot.

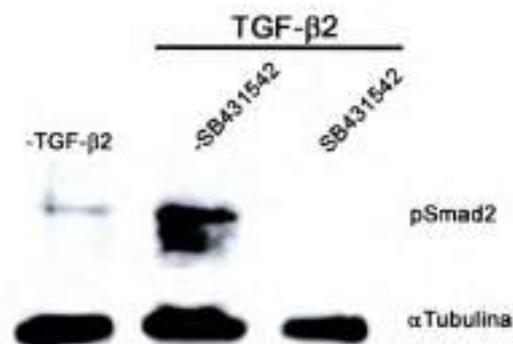


Figura 11: Wester blot de neuronas piramidales de hipocampo que fueron cultivadas por 24h. Nótese el decrecimiento de la expresión del efector activo cascada abajo (pSmad2) con el uso del inhibidor específico para el receptor TGF- β 1 (SB431542). Control de carga α Tubulina

Los resultados son consistentes con los observados para GCPs, donde los cultivos sin estimular poseen una actividad basal demostrada por la presencia de la proteína activa Smad2, mientras que la estimulación con TGF- β 2 aumenta considerablemente los niveles de pSmad, sin embargo en presencia del inhibidor se reduce en gran parte la presencia de pSmad2. Corroborando que efectivamente se logró estimular selectivamente la vía de señalización TGF- β / TGF- β R/Smad2, tanto en GCPs como en cultivo primario.

El siguiente paso fue observar que sucedía al estimular con TGF- β 2 cultivos celulares en medios de baja de insulina. Para ellos realizamos cultivos primarios que se cultivaron por un espacio de 24h y a los cuales se les suministró cada 8h cantidades de 6nM y 10 nM de TGF- β 2 para estimular los cultivos con las mismas concentraciones utilizadas en GCPs y en cultivo primario. Se agregó TGF- β 2 cada 8h para mantener constante la actividad de la vía durante el experimento. Al cabo de 24h los cultivos fueron fijados y cuantificados sus estadios de desarrollo (ver sección "4.1") (Figura 12).

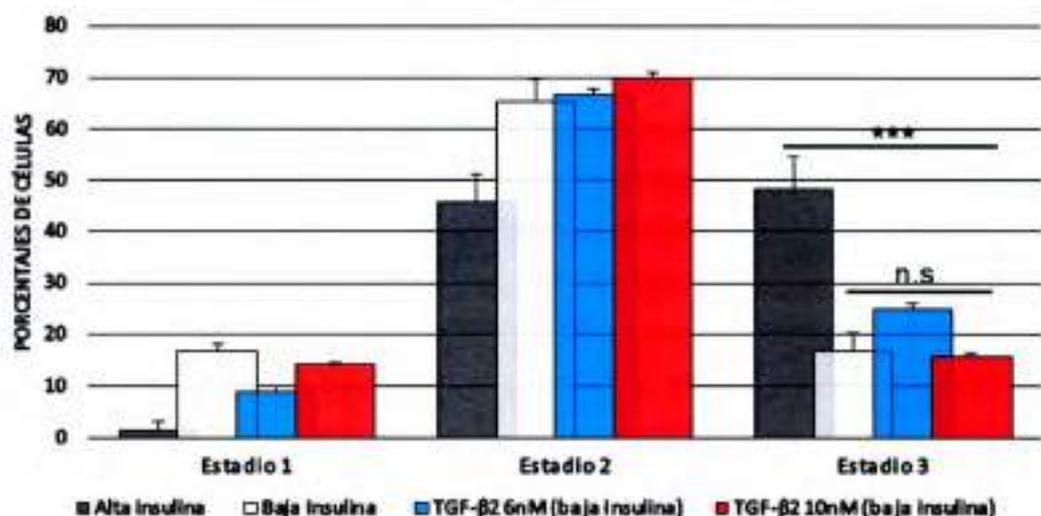


Figura 12: Cuantificación de los estadios de desarrollo neuronal en cultivo primario con el agregado exógeno de TGF- β 2. Se muestran los porcentajes (+/-SD) de neuronas para cada estadio. Cultivo neuronal de 20-24h aprox. Tanto las neuronas tratadas con el shTGF- β 2 como las tratadas con el ssRNA poseen el mismo fenotipo de desarrollo. Donde se observaron diferencias significativas (***) $P \leq 0.0004$ n: 3 experimentos independientes. Test estadístico aplicado ANOVA de una vía aplicando el Post Hoc Turkey's,

En los datos proporcionados por la cuantificación podemos observar que el agregado de TGF- β 2 en las concentraciones evaluadas no promueve a las células a pasar de un estadio 2 a un estadio 3. Aproximadamente el 60% de las células estimuladas con 6nM y 10 nM de TGF- β 2 quedan arrestadas en un estadio 2, de modo significativamente similar a un cultivo de baja insulina. Mientras que en cultivos de alta insulina un 50% consiguen llegar al estadio 3 de desarrollo, donde apenas un 25% de células estimuladas con TGF- β 2 logran llegar a estadios 3. Los datos suministrados en esta sección, sugieren en su conjunto que, la estimulación exógena con TGF- β y posterior activación de la cascada de señalización TGF- β R/pSmad2, no estaría involucrada en los eventos moleculares que permiten a las neurona pasar del estadio 2 a estadio 3.

11.1.3 Estudios sobre el efecto de pérdida de función de TGF- β 2R: Silenciamiento específico mediante shRNA.

El siguiente paso fue estudiar los efectos de la pérdida de función del receptor de TGF- β 2R. Una de las formas de lograr la pérdida de función de una proteína es mediante el silenciamiento génico. Disminuyendo los niveles proteicos y por lo tanto reducir o eliminar su función dentro de una célula. El silenciamiento de la expresión génica del receptor del TGF- β 2 se llevó a cabo utilizando shRNAs (del inglés, small hairpin RNA) insertado en plásmidos dicistrónicos (ver "Materiales y Métodos"). Estos contienen 2 marcos abiertos de lecturas, unos codificante para la proteína fluorescente verde (GFP), utilizada como marcador de células que incorporan el shRNA y el otro marco utilizado para insertar la secuencia que regula la expresión del shRNA. En este caso una secuencia específica para silenciar el receptor de TGF- β 2.

Además del diseño de shRNAs específicos para el silenciamiento de TGF- β 2R, se diseñó una secuencia control llamada secuencia Scrambled (ssRNA), la cual no es complementaria a ningún gen de rata evitando un silenciamiento inespecífico funcionando como un control del silenciamiento—El siguiente paso fue evaluar la capacidad de silenciamiento, para el shRNA diseñado.

La validación se logró a través de método de transfección de DNA por medio de lipofectamina (ver "Materiales y Métodos"), en la línea celular de glioma de cerebro de rata (C6). En este caso las líneas neuronales permite evaluar el silenciamiento de los shRNA, debido a la alta eficiencia de transfección que se logra en estas líneas celulares respecto a la obtenida en cultivos primarios de neuronas hipocámpales. Los bajos niveles de transfección en cultivo impiden detectar las diferencias en la expresión proteica como resultado del silenciamiento génico mediante métodos bioquímicos

La transfección fue realizada con distintas concentraciones de los plásmidos shTGF- β 2R y ssRNA. Posteriormente las células fueron colectadas y procesadas para Wester Blot (ver "Materiales y Métodos"), donde mediante el uso de anticuerpos específicos contra el receptor de TGF- β 2 se evaluaron los niveles endógenos del receptor en las diferentes condiciones (Figura 13A). Se observó que la transfección con 2,5 μ g del shRNA contra los receptores de TGF- β 2 disminuyen los niveles endógenos de dicha proteína mientras que la situación control en la misma concentración de ADN no se observaron cambios en los niveles de TGF- β 2R. Por lo tanto podemos decir que el shTGF- β 2R es efectivo para el silenciamiento de la proteína TGF- β 2R, mientras que el ssRNA no afecta las concentraciones endógenas de la proteína en estudio.

Además de la validación bioquímica realizamos cultivos primarios de neuronas del hipocampo que fueron transfetadas con los plásmidos validados ssRNA o shTGF- β 2R para evaluar el desarrollo de dichas células a través de su morfología. Realizamos inmunofluorescencia con el anticuerpo selectivo para TGF- β 2R (anti-TGF- β 2R) (Figura 13B)

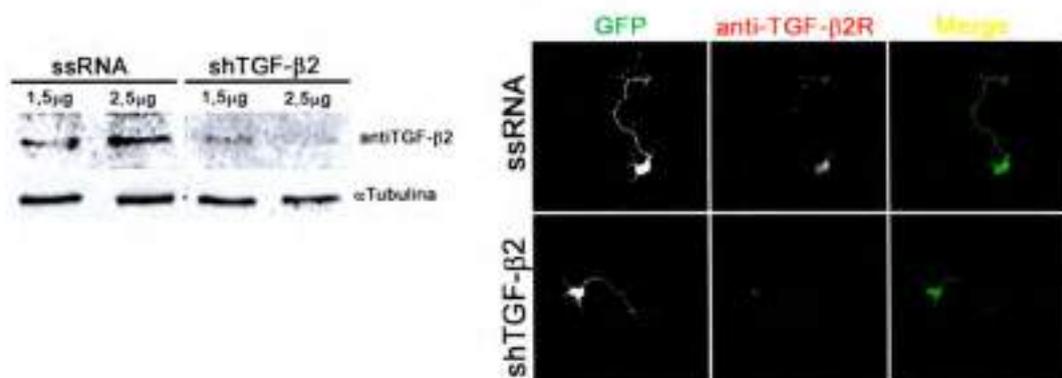


Figura 13: A) Wester blot de células de la línea celular C6 que fueron transfectadas con shTGF- β 2R y cultivadas por 24h post- transfección. Se utilizó una secuencia Scrambled (ssRNA) como control de la transfección. Nótese el decrecimiento de la expresión del receptor de TGF- β 2, luego del silenciamiento con shRNA específico. Control de carga α Tubulina. **B)** Micrografía de células neuronales transfectadas (GFP) con ssRNA y shTGF- β 2 e inmunoteñidas con anticuerpo contra TGF- β 2R. Se puede observar niveles menores de expresión TGF- β 2R cuando se transfecta con shTGF- β 2R, mientras que la expresión de TGF- β 2R no se ve afectada con el uso del Scrambled (ssRNA) como control.

En este experimento se observó que las células transfectadas con shTGF- β 2R presentan morfología de neuronas en estadio 3 de desarrollo. Donde uno de sus procesos posee características morfológicas de axón. Para corroborar la existencia de axones maduros en células silenciadas para TGF- β 2R, se realizaron cultivos que fueron transfectados utilizando la técnica de transfección en suspensión (ver "Materiales y Métodos"). Esta técnica, permitió exponer a las neuronas al ADN a tiempo cero de cultivo, antes de ser sembradas y adheridas al sustrato donde posteriormente se desarrollan. Luego las neuronas fueron cultivadas por 38 h, fijadas y teñidas con anticuerpos específicos contra Tau-1 (marcador axonal) (Figura 14 y 15).

La cuantificación se realizó evaluando los diferentes estadios del desarrollo neuronal "ex vivo", considerando a las células que presentaron marcación Tau-1 positiva como neuronas que se encontraban en estadio 3, mientras que aquellas que no presentaron dicha marca en sus procesos neuríticos se consideraron en el estadio 2 de desarrollo.

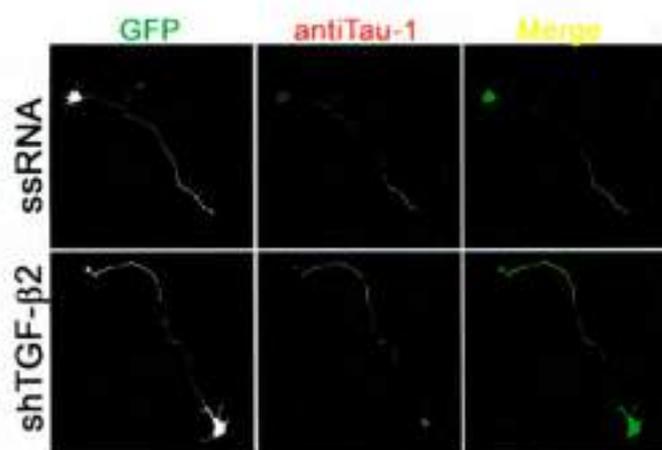


Figura 14: Micrografía de células transfectadas (GFP) con ssRNA y shTGF-β2 e inmunoteñidas con anti Tau-1 (rojo). Cultivo neuronal de 38h. Tanto las células transfectadas con ssRNA o shTGF-β2R, presentan marca para Tau-1, indicando que poseen un axón discernible tanto bioquímica como morfológicamente a 38h.

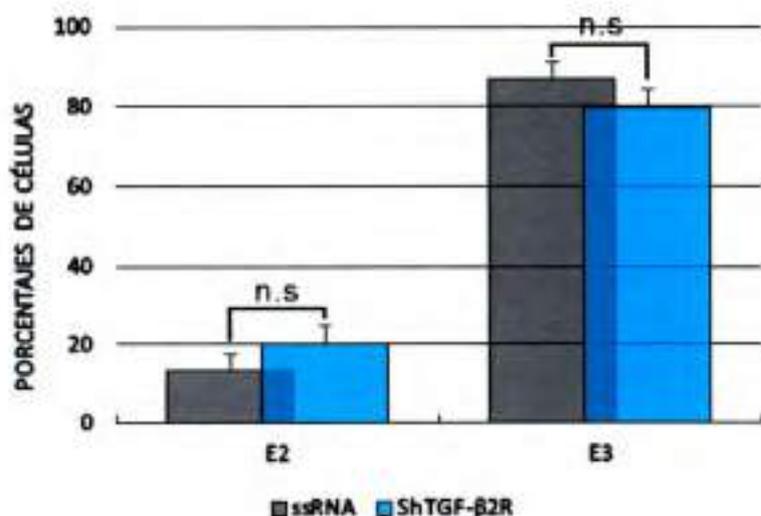


Figura 15: Cuantificación del ensayo de shTGF-β2R vs ssRNA. Se muestran los porcentajes (\pm SD) de neuronas transfectadas con shTGF-β2 o ssRNA respectivamente. Cultivos neuronales de 38h. Tanto las neuronas tratadas con el shTGF-β2R, como las tratadas con el ssRNA poseen el mismo fenotipo de desarrollo. Los datos no fueron estadísticamente significativos entre estadios, $p > 0.105$ (E2) y $p > 0.1025$ (E3). $n = 4$ y 3 experimentos independientes respectivamente. Test estadístico aplicado test t no apareado.

Las neuronas que fueron tratadas con shTGF- β 2R exhibieron marca para el anticuerpo contra Tau-1 indicando la presencia de axones. También podemos indicar que los fenotipos morfológicos fueron similares en neuronas tratadas con ssRNA o con el shTGF- β 2R, indicando que la pérdida del receptor de TGF- β 2 no afectó la capacidad de las neuronas para establecer axones maduros (Tau-1 positivos). El análisis cuantitativo de los datos permitió observar que ambos grupos experimentales (shTGF- β 2R y ssRNA), se observó que el mismo número de neuronas logran llegar al estadio 3 de desarrollo (aproximadamente el 80% de las neuronas) desarrollaron una morfología polarizada, a 38 h de cultivo.

12. DISCUSIÓN PARTE I:

12.1 Objetivo I: Examinar el rol de TGF- β 2 y su receptor en la polaridad neuronal "ex vivo".

Los resultados obtenidos en esta sección tratan de establecer el rol de TGF- β 2 y su receptor como actores relevantes en el establecimiento polaridad neuronal.

Desde una perspectiva general, la cascada de señalización de TGF- β se encuentra en un gran número de tipos celulares, los cuales incluyen linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, células epiteliales, células del páncreas, células de placenta, células tumorales, etc. (Lyons and Moses, 1990). Estas citocinas son reguladores multifuncionales de una gran variedad de procesos celulares, como por ejemplo especificación celular, migración, proliferación, diferenciación y apoptosis durante el desarrollo embrionario, como también en edad adulta (Massagué and Chen, 2000). Aunque pueden tener efectos mitóticos, TGF- β s (TGF- β 1,2,y 3) también puede actuar como potentes inhibidores de la proliferación de células epiteliales y linfocitos (Sporn, 2006).

Como mencionamos anteriormente la activación de los receptores de TGF- β puede iniciar la cascada de señalización de la vía canónica (a través de las proteínas Smads) y no canónica (efectores alternativos que no involucran a las proteínas Smads). La activación de Smads permite la unión con el ADN, el cual actúa como un factor de transcripción que regula la expresión de aproximadamente entre 100-300 genes (Massague et al., 2005). Indicando la gran versatilidad funcional de esta vía.

Por otra parte, centrándonos en la regulación a nivel neuronal por TGF- β s, se conoce por antecedentes previos, que median la regulación de la sobrevivencia neuronal (Kriegstein et al., 2002). Estos autores además indican que los ligandos TGF- β s por sí mismos no son neurotróficos, pero tienen la capacidad de aumentar los efectos neurotróficos de factores de crecimiento como GDNF (del inglés "Glia Derived Neurotrophic Factor").

Por otro lado, la actividad de Smad2 regula negativamente la vía Cdh1-APC/SnoN (de sus siglas en inglés "E3 ubiquitin ligase Cdh1 Anaphase-Promoting Complex"/ Ski-related novel protein N) en neuronas (Stegmuller et al., 2008) durante el crecimiento axonal (Ikeuchi et al., 2009; Lasorella et al., 2006). En este sentido Smad2/3 activos permiten reclutar SnoN para ser degradado por Cdh1-APC. Por lo tanto la inhibición endógena de Smad por silenciamiento estimula la elongación axonal en neuronas granulares (Stegmuller et al., 2008).

Nuestros resultados describen un escenario, donde el silenciamiento de TGF- β 2R "ex vivo" no afecta el establecimiento axonal en neuronas piramidales de hipocampo. Por otro lado, considerando que el silenciamiento génico de los receptores de TGF- β 2 disminuye la activación de la proteína Smad2, podría esperarse un crecimiento axonal considerable, sin embargo no observamos un crecimiento axonal exacerbado en neuronas hipocámpales en cultivo.

Nuestros resultados demostraron que los niveles endógenos del ligando TGF- β nos son suficientes para activar al receptor TGF- β 2, indicando que las neuronas en cultivo no son

capaces de estimularse endógenamente, por otro lado los efectores de la vía de señalización de TGF- β 2 se encuentran presentes en neuronas piramidales de hipocampo cuando son estimuladas exógenamente con este ligando, dado que las neuronas de hipocampo en cultivo fueron capaces de activar al efector secundario Smad2 (pSmad2). En este escenario la estimulación exógena con TGF- β 2 y la consecuente activación de pSmad2 en cultivos primarios en medios condicionados de baja insulina, no presentaron un efecto de estimulación en el crecimiento axonal, la sola estimulación con TGF- β 2 no fue suficiente para el desarrollo de un fenotipo polarizado en neuronas del hipocampo en cultivo.

Una posible explicación a nuestros resultados y considerando además los antecedentes previos (Konishi et al., 2004), Sería que TGF- β y su vía de señalización canónica estarían vinculados con la elongación y no con la especificación axonal, ya que el silenciamiento génico de Smad2 produce axones significativamente más largos y el silenciamiento de los receptores de TGF- β no afecta al establecimiento de la polaridad neuronal. Una diferencia entre la especificación y el crecimiento axonal es que, la especificación axonal sucede cuando una neurita menor, en células morfológicamente simétricas adquiere la capacidad de convertirse en el futuro axón. Mientras que el crecimiento axonal se produce cuando una de las neuritas menores especificada como futuro axón, rompe la simetría celular para dar lugar al futuro axón.

Debemos hacer una salvedad con estos experimentos (Konishi et al., 2004), en ellos los cultivos poseen concentraciones altas de insulina, donde la insulina puede estimular los receptores de IGF-1 en estos experimentos. Por lo tanto es posible la activación de esta vía desencadene los efectos de especificación axonal. En esta tesis como ya mencionamos los cultivos de baja no permiten la activación de la cascada de señalización de IGF-1.

13. RESULTADOS PARTE II:

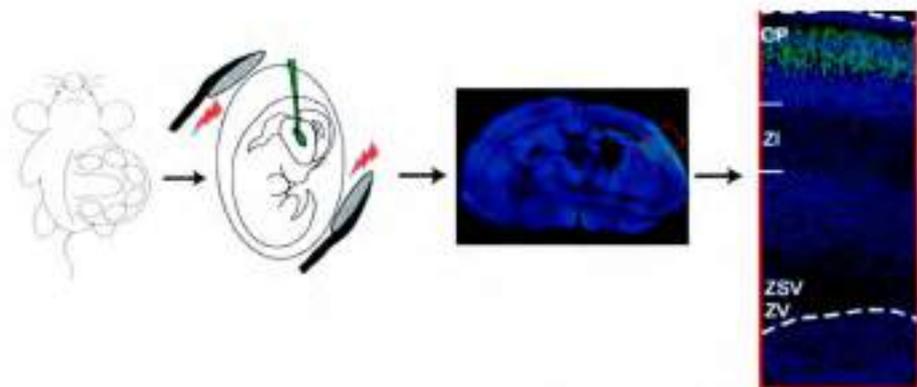
Hasta el momento la mayor parte de los experimentos mostrados fueron realizados utilizando el modelo de cultivo primario. El estudio generado a través del modelo "ex vivo", generó y genera importantes aportes, para el entendimiento del rol de distintos factores de crecimiento, durante el desarrollo neuronal. El crecimiento neuronal en cultivo, es una representación simplificada del complejo contexto para el estudio del sistema nervioso. La importancia de entender el contexto fisiológico en el cual las neuronas se desarrollan, aporta mayor información respecto a los procesos claves para el crecimiento neuronal (orientación y migración, entre otros eventos).

En la presente tesis se utilizó un modelo "in situ" llamado IUE (del inglés "in utero" electroporation, ver "Materiales y Métodos), para profundizar en la función génica en el cerebro.

Uno de los objetivos de esta tesis fue poner a punto además de adquirir todo lo necesario para la implementación rutinaria de esta compleja técnica.

La IUE es un sistema de transferencia genética "in situ" elegido en la actualidad. El ADN es inyectado en el ventrículo lateral de ratones embrionarios, que luego son sometidos a una corriente eléctrica controlada (electroporación), generando la incorporación de ADN específico en neuronas piramidales de corteza. Luego del procedimiento quirúrgico se reintroducen los cuernos uterinos (embriones) en su madre para poder completar su ciclo de desarrollo.

En la corteza se pueden distinguir subcapas que abarcan desde la zona ventricular (ZV), zona subventricular (ZSV), zona intermedia (ZI), y la placa cortical (CP) (ver esquema siguiente). Se han publicado varios trabajos que demuestran transfecciones exitosas en neuronas de la corteza cerebral por electroporación tanto en embriones de ratón como de rata donde la tasa de transfección es alrededor del 97% (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001; Saito and Nakatsuji, 2001; Tabata and Nakajima, 2001). La combinación de IUE con la tecnología del shRNA para producir silenciamiento o transfección de ADN codificante hace posible la realización de experimentos de pérdida y ganancia de función en neuronas piramidales de la corteza cerebral (Bai et al., 2003).



Esquema representativo de la técnica de electroporación *in utero* (IUE). A) Dibujo del animal de experimentación donde se distingue el útero con los embriones. Además en la amplificación del embrión se puede observar la zona del cerebro donde se produce la inyección del ADN y la orientación de la pinza utilizada para disparar el impulso eléctrico. B) Corte coronal de un cerebro embrionario de ratón donde se visualiza en azul los núcleos celulares teñidos en DAPI y en verde (GFP) las neuronas corticales transfectadas. C) Micrografía de corte coronal del cerebro de un ratón electroporado donde se encuentran en azul los núcleos celulares teñidos en DAPI y en verde (GFP) las neuronas corticales transfectadas.

13.1 Efecto del silenciamiento de IGF-1R a distintos tiempos sobre la migración de neuronas piramidales de corteza

Una vez puesta a punto la técnica de IUE, se evaluó la participación IGF-1R y su vía en el desarrollo neuronal *in situ*. La idea principal fue realizar experimentos de pérdida de función del receptor de IGF-1, con el propósito de silenciar la cascada de señalización IGF-1/IGF-1R/PI3k. Para ello se utilizaron shRNA comerciales de la empresa SIGMA ya validados que permitieron (ver Materiales y Métodos) los cuales conocer los niveles exactos del silenciamiento específico para la proteína blanco. Por otro lado los plásmidos adquiridos no eran dicistrónicos como los utilizados *ex vivo*, por lo tanto para marcar las neuronas silenciadas *in situ*, se cotransfectó con un plásmido que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) donde nos aseguramos que el promotor utilizado en dicho vector era adecuado para la técnica IUE (ver Materiales y Métodos). Es interesante remarcar que los niveles de cotransfección para esta técnica son realmente altos, alrededor del 80% (Bai et al., 2003) por lo tanto la mayoría de las células que presentan la marca del GFP tienen una alta posibilidad de haber incorporado el plásmido para el silenciamiento.

En primera instancia, se evaluó el efecto de este silenciamiento sobre la migración neuronal a través del tiempo. Con el fin de establecer una ventana temporal que abarque desde estadios embrionarios hasta post-natales tempranos. Todos los experimentos que fueron diseñados en la presente tesis toman como punto de partida el día 15 del estadio embrionario (E15) (ver "Materiales y Métodos"). Durante los días embrionarios 14 y 15 de un ratón, sucede el pico neurogénico de la población de neuronas piramidales de corteza con proyecciones al cuerpo

calloso (capa II-IV de la corteza). Por lo tanto, nuestro primer interrogante es si ¿IGF-1R está involucrado en el desarrollo de las neuronas corticales "in situ"? Para ello realizamos IUE de ratones a E15, con shIGF-1R y CAG-GFP, que posteriormente continuaron su gestación normal y a los días seleccionados E19, P2 y P4 (también se analizaron los tiempos P6 y P8), se colectaron los cerebros electroporados identificándolos por la presencia de la proteína fluorescente verde (GFP). En este sentido se confeccionó una curva temporal y se evaluaron los perfiles migratorios de neuronas silenciadas para IGF-1R (Figura 16).

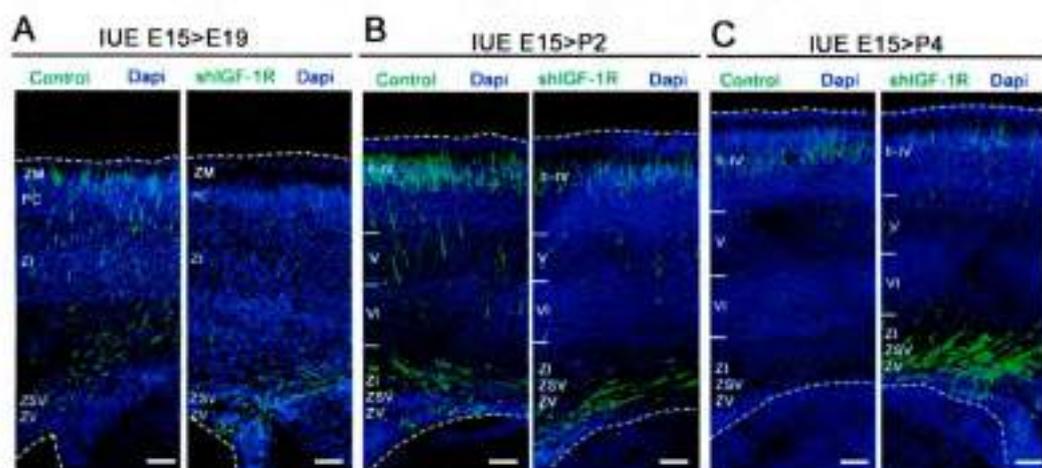


Figura 16: Curva temporal, efectos del silenciamiento del receptor de IGF-1R. Co-electroporación "in utero" al día E15 con CAG-GFP, control y shRNA dirigido contra el receptor de IGF-1 desde estadios E19 (A), P2 (B) y P4 (C). Nótese que el arresto sucede en la ZV/ZSV/ZI desde estadios tempranos, prolongándose en el tiempo a estadios postnatales. Barra de calibración 100µm

En todos los casos descritos se observó que los perfiles migratorios fueron distintos comparados con su respectivo control. En estadios embrionarios E19, se observó un arresto embrionario en la ZV, y un consecuente retado migratorio en neuronas para llegar a la PC, indicando que los efectos del shIGF-1R se manifestó en etapas tempranas del desarrollo (panel derecho A). Debemos tener presente que la corteza está en formación y que la población celular todavía se encuentran en neta migración (panel izquierdo A).

Durante estadio postnatal P2 sigue ocurriendo la neurogénesis con gran actividad, y la formación de la corteza se encuentra más avanzada (panel B izquierda). La población celular de las capas correspondientes (II-IV) sigue aumentando. La migración sigue sucediendo pero en menor escala respecto el estadio embrionario. En contraparte en la población que fue silenciada para IGF-1R, encontramos un escenario donde la migración en zonas intermedias fue reducida o casi nula y las capas corticales presentaron un notorio descenso en su población, manteniendo un porcentaje de células arrestada en zonas germinativas ZV/ZSV/ZI (panel derecho B).

Avanzado en el estadio postnatal P4, se observó que el arresto celular se acentúa (panel derecho C), mientras que en el control las células mayoritariamente abandonaron la zona germinativa (panel izquierdo C). Es interesante remarcar que el mayor fenotipo por el silenciamiento de IGF-1R observado ocurre a P4. Esto puede deberse a que las etapas anteriores persisten procesos de neurogénesis activos.

Se cuantificó los efectos del silenciamiento tanto para estadios embrionarios (E19) y para el estadio postnatal (P4) donde el efecto del silenciamiento es más pronunciado (**Figura 17 A y C**). Los datos del arresto migratorio fueron cuantificados para ambos estadios (**Figura 17 B y D**).

Para comprobar que el silenciamiento es específico sobre el receptor de IGF-1R, realizamos cotrafecciones con shIGF-1R y IGF-1R OPT. IGF-1R OPT es una versión del receptor de IGF-1 que posee mutaciones puntuales sobre codones redundantes. Como resultado obtuvimos una proteína que en su secuencia proteica es idéntica a la proteína endógena. Pero su secuencia de ARNm está modificada al punto que es resistente al silenciamiento generado por shIGF-1R. Este tipo de control es el más recomendado para descartar los efectos inespecíficos de los shRNA (**efectos off-target**). De esta forma podemos determinar que los efectos del silenciamiento fueron específicos sobre el receptor de IGF-1 (**Figura 17C panel izquierdo**).

Podemos observar que en el silenciamiento de IGF-1R una población celular escapa del arresto, permitiendo que las neuronas piramidales migren y ocupen la zona de la corteza que les corresponde. Este fenómeno puede ser debido a que el silenciamiento en sus primeras etapas no es tan efectivo debido a que la expresión del shRNA no es suficiente para lograr el silenciamiento que genere la pérdida de función por lo tanto una población celular puede escapar del control shRNA. El silenciamiento génico con el uso de shRNA permite tener diferentes porcentajes en la disminución de la proteína blanco, con nuestros resultados observamos un gradiente en el silenciamiento, que nos permite ver al menos 3 escenarios posibles. Por un lado, células que logran llegar a las capas II-IV, donde posiblemente exista un silenciamiento parcial a nulo (neuronas que escapan temporalmente al silenciamiento), segundo en las neuronas que se encuentran en la zona intermedia, sobre las cuales podemos asumir que existe un porcentaje de silenciamiento un poco mayor al caso anterior. Finalmente, tercero, se observaron células con mayor arresto en la migración, probablemente debido al silenciamiento génico en su mayor proporción. Por otra parte logramos restablecer el perfil migratorio, cuando las células fueron co-transfectadas con el IGF-1R OPT indicando que el efecto del silenciamiento es específico para este receptor. (**Figura 17C panel central**).

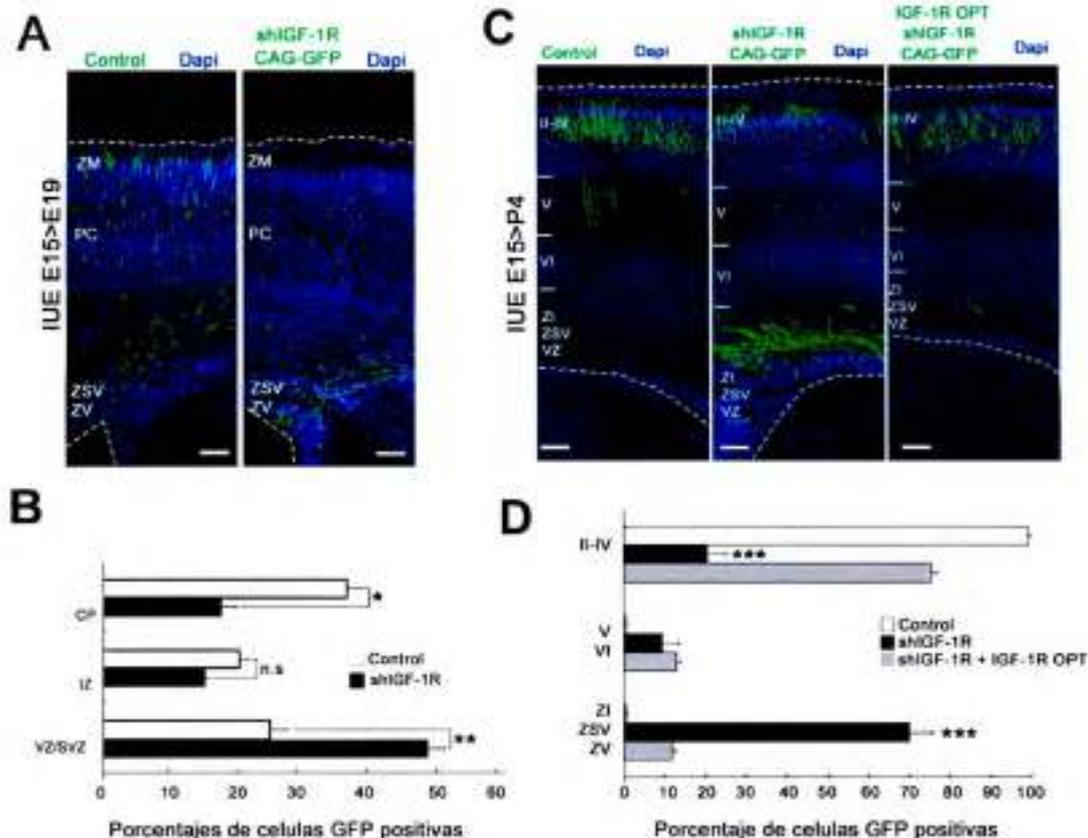


Figura 17: Silenciamiento selectivo del receptor de IGF-1. Co-electroporación "in utero" al día E15 con shRNA dirigido contra el receptor de IGF-1 desde estadios E19 (A) y P4 (C). Cuantificación del perfil de migración para E19. B) El 50% de las neuronas quedan arrestadas en la ZV/ZSV/ZI, mientras que más del 35% de las neuronas control logran establecerse en la PC. Los datos estadísticamente en las distintas capas son VZ (**), $p < 0.0088$, IZ (n.s.), $p < 0.099$ y CP (*), $p < 0.1025$ (CP). n:3 experimentos independientes respectivamente. Test estadístico aplicado test t no apareado. D) El silenciamiento de IGF-1R arresta un 70% de neuronas en la ZV/ZSV/ZI, comparado con aproximadamente un 99% de células control llegan al PC. Nótese que el porcentaje de silenciamiento es restablecido cuando se utiliza IGF-1R OPT en más de un 75% en estadio P4. Barra de calibración 100 μ m. Donde se observaron diferencias significativas (***) $p < 0.0001$ n: 3 experimentos independientes. Test estadístico aplicado ANOVA de una vía aplicando el Post Hoc Turkey's,

13.2 Recuperación del perfil migratorio con la sobreexpresión de PI3k

En la descripción de la sección anterior se observó que el silenciamiento de IGF-1R causa un marcado defecto migratorio, observándose un fenotipo heterotrófico en la VZ/SVZ, extendiéndose desde estadios prenatales hasta estadios postnatales.

Como mencionamos en la introducción la cascada por la cual se desencadenan los eventos de establecimiento de polaridad neuronal, involucra a la enzima PI3k como un efector cascada abajo del receptor de IGF-1 que resulta esencial en el establecimiento de un axón (Laurino et al., 2005). El siguiente paso fue estudiar los efectos del silenciamiento de IGF-1R en presencia de la subunidad catalítica de la PI3k constitutivamente activa (p110CAAX). Por lo tanto ¿La sobreexpresión de esta enzima es suficiente para restablecer el patrón de migración, en neuronas silenciadas para IGF-1R? Para responder este interrogante se realizó co-electroporación con los plásmidos shIGF-1R y p110CAAX. Luego los perfiles migratorios fueron cuantificados para las distintas condiciones mostradas en la (Figura 18 A y B).

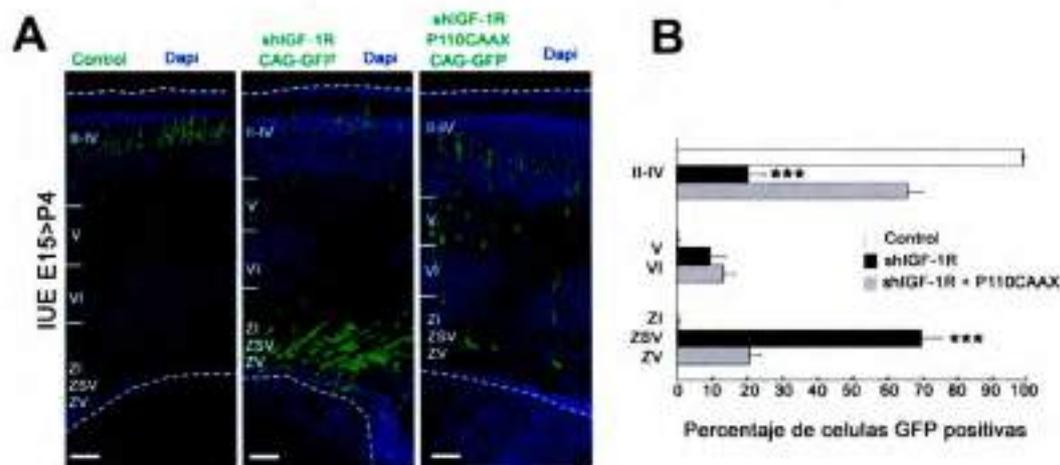


Figura 18: La sobreexpresión de PI3k recupera la migración de neuronas silenciadas. **A)** Co-electroporación *in utero* al día E15 con CAG-GFP, control y shRNA dirigido contra el receptor de IGF-1 a P4. La sobre expresión de P110CAAX es capaz de restablecer la migración neuronal silenciadas en aproximadamente un 50%. Barra de calibración 100µm. **B)** Cuantificación del perfil migratorio: Donde se observaron diferencias significativas (***) $p \leq 0.0001$ n: 3 experimentos independientes. Test estadístico aplicado ANOVA de una vía aplicando el Post Hoc Turkey's,

Estos resultados indican la relevancia del IGF-1R para la migración y consecuente desarrollo neuronal. Ya que la falta del receptor genera un arresto celular en las zonas progenitoras (ZV/ZSV/IZ), probablemente debido a que estas neuronas no lograron migrar desde el momento de su nacimiento, indicando que el receptor de IGF-1 resulta crucial para lograr el correcto perfil migratorio. Además se observó que las neuronas arrestadas se encuentran en fase multipolar, esto indica que el arresto sucede antes de que la neuronas puedan establecer axones (ver sección siguiente).

El restablecimiento de la migración a través de la reactivación de la vía cascada abajo por el uso de P110CAAX en células silenciadas. Establece a PI3k, como un efector cascada abajo del IGF-1R, durante el desarrollo neuronal *in situ*. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos previamente en un sistema de cultivo primario *ex vivo*, por el laboratorio (Laurino et al., 2005; Sosa et al., 2006).

En conclusión los datos mostrados establecen que la vía IGF-1R/PI3k es necesaria para la correcta migración y desarrollo neuronal.

13.3 Efecto del silenciamiento de IGF-1R sobre la morfología y la maduración en neuronas piramidales de corteza.

Como hemos mencionado, un aspecto a tener en cuenta en el modelo "in situ" es que las neuronas nacientes deben migrar mientras se van desarrollando. Este concepto permite decir que si las neuronas se encuentran arrestadas posiblemente su programa de desarrollo se encuentre afectado de igual manera. Por lo tanto la población arrestada en las zonas progenitoras podría ser una consecuencia de la imposibilidad de las neuronas en cambiar de su estado multipolar (estadio 2) a un estadio bipolar (estadio 3).

Para ello se comprobó por observaciones microscópicas, los aspectos morfológicos de neuronas control ubicadas en PC respecto a neuronas shIGF-1R positivas arrestadas en la ZV/ZSV/ZI (Figura 19). El fenotipo de las neuronas control (panel izquierdo), presentó una morfología típica de una neurona normal, donde el proceso guía da lugar al árbol dendrítico en maduración (**cabeza de flecha superior**) y el proceso de arrastre comienza a extenderse y establecerse como el futuro axón (**cabeza de flecha inferior**). Estas características son propias de neuronas bipolares en proceso de maduración a P4. Un escenario distinto fue observado en células silenciadas con el shIGF-1R. Aquí las neuronas básicamente se encontraron formando un aglomerado celular desorganizado en distintas direcciones (fenotipo heterotrópico). Además como se indica en la imagen del panel de la derecha, muchas de estas neuronas poseen múltiples proceso inmaduros (**cabeza de flecha**), representando una morfología multipolar inmadura no propia de estadio P4.

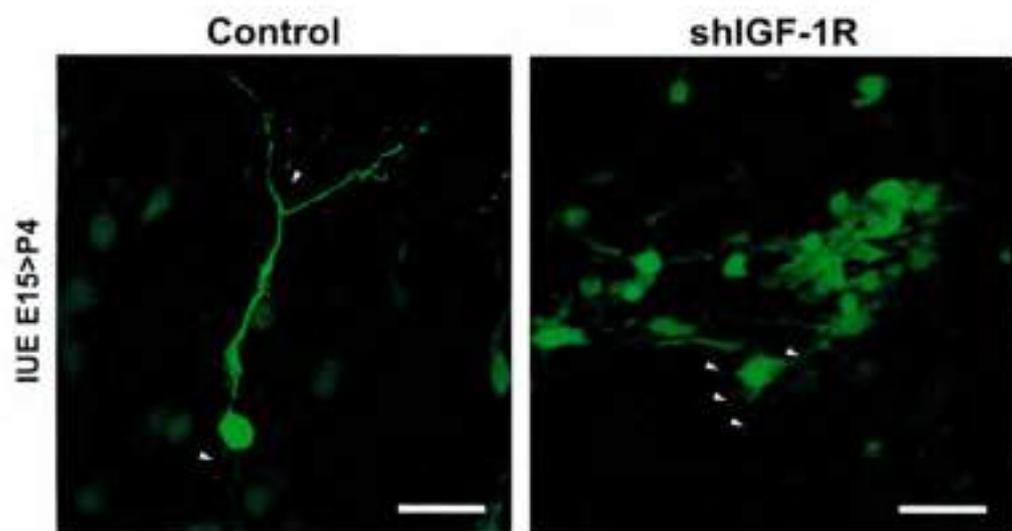


Figura 19: Aspectos morfológicos de neuronas silenciadas para IGF-1R. Fotomicrografías de rodajas de cerebros que muestran la morfología de neuronas control y neuronas silenciadas para IGF-1R. Nótese que en la imagen de neuronas shIGF-1R se observa aglomeraciones de neuronas (fenotipo heterotrópico). Barra de calibración 10µm.

Las neuronas silenciadas para IGF-1R poseen un fenotipo inmaduro característico de la zona donde se encuentran (ZV/ZSV/ZI). En la introducción describimos a la ZV/ZSV como la región de proliferación neuronal, donde abunda el fenotipo multipolar. Pero en este escenario debemos agregar que este estadio multipolar dura aproximadamente 24h. Teniendo en cuenta este concepto, las células tratadas con shIGF-1R mantuvieron un fenotipo multipolar que perdura casi 10 días (teniendo en cuenta los 21 días de gestación para un ratón). Por lo tanto el impedimento en la migración neuronal podría ser consecuencia del arresto morfológico en el estadio multipolar (estado inmaduro de desarrollo).

Para corroborar que las neuronas silenciadas son inmaduras, se realizaron observaciones morfológicas de neuronas inmunoteñidas para ankirina G (ANKG), que permite marcar el segmento inicial del axón. Este es de extrema importancia en la neurona, y la fisiología neuronal depende de su correcta función. En este sitio se genera el impulso nervioso, y además actúa como una barrera que diferencia el dominio somato-dendrítico del dominio axonal, controlando el tráfico de proteínas hacia el axón. Por lo tanto las tinciones de ANKG permitieron evaluar la presencia de axones maduros y funcionales.

Durante el silenciamiento para IGF-1R se obtuvieron tres escenarios. 1) Células que llegan a las capas II-IV (migración normal) 2) células parcialmente arrestadas con capacidad de migración en zonas intermedias (retardo en la migración) y 3) células arrestadas en la zonas ventricular (arresto total). De estos tres escenarios realizamos tinciones para ANKG (Figura 20).

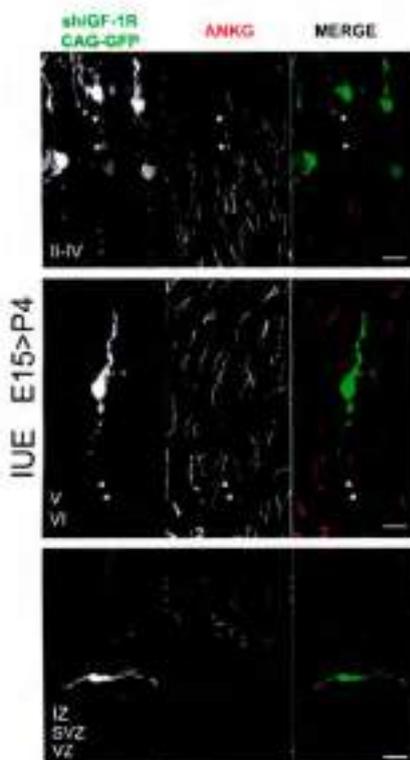


Figura 20: Aspectos morfológicos de neuronas silenciadas para IGF-1R, tinción con ANKG. Fotomicrografías de rodajas de cerebros que muestran la marca de ANK G en neuronas co-electroporadas con CAG-GFP, control y shRNA dirigido contra el receptor de IGF-1 a P4. Nótese que los de los escenarios encontrados para neuronas silenciadas para IGF-1R, las neuronas ubicadas en la ZV/ZSV/ZI no poseen marca para ANK G, además de poseer una orientación horizontal a la dirección de la corteza. Las neuronas que llegaron hasta la ZI se puede observar marca para ANK G (cabeza de flechas). Lo mismo sucede para las neuronas que llegan a las capa II-IV (cabeza de flecha). Barra de calibración 10µm

Los resultados indican que las células, que se ubican en la base del ventrículo (paneles inferiores) fueron notablemente más afectadas ya que no presentan marca para ANKG, evidencia que soporta lo mencionado anteriormente. Estas neuronas no poseen axones, ni una

morfología característica de neuronas maduras. En el caso de las neuronas ubicadas en **ZI**, observamos una leve marca para ANKG (cabeza de flecha, panel medio), en la porción distal del proceso de arrastre, además esta neurona posee una morfología bipolar característica de neuronas en procesos intermedios de desarrollo. Consistente con lo mencionado anteriormente, el proceso de arrastre posee una disminución en su calibre y alargamiento característicos de un axón en desarrollo. En el caso de neuronas que logran llegar a la capas **II-IV**, sus rasgos morfológicos de desarrollo se acentúan mostrando mayor marca para ANKG (cabeza de flecha, panel superior). En consecuencia el silenciamiento de IGF-1R es propio de neuronas inmaduras arrestadas en las primeras etapas de su desarrollo.

Los datos morfológicos, confirman que las neuronas silenciadas para el receptor de IGF-1 poseen una morfología multipolar y además no presentan axones teñidos con ANKG. Por lo tanto IGF-1R tiene una participación preponderante en los mecanismos que permiten a las neuronas pasar del estadio multipolar al bipolar. Además este receptor resulta esencial para el establecimiento de axones característica fundamental para el correcto desarrollo de la corteza cerebral, nuevamente estos resultados concuerdan ampliamente con los obtenidos "ex vivo" en este laboratorio.

13.4 Efecto del silenciamiento de IGF-1R en la maduración y orientación de neuronas piramidales de corteza

Las alteraciones fenotípicas observadas se manifiestan tempranamente durante el desarrollo, y como se indicó los efectos fueron caracterizados por un arresto temporal y espacial dentro las primeras 24h (estadio multipolar). En fase multipolar las neuronas deben censar su entorno polarizado y recibir distintas señales que le indican la orientación correcta para poder iniciar sus etapas de migración. En esta fase de orientación se establece el futuro axón como el proceso de arrastre (**PA**), resultado de vital importancia para el posterior cambio morfológico de multipolar a bipolar. (Namba et al., 2015). Esto quiere decir que las neuronas deben comprender su entorno para poder establecer su programa de desarrollo, por lo tanto podemos preguntarnos si ¿Las neuronas silenciadas para IGF-1R, pierden la capacidad de discriminar su entorno?

Un indicador temprano de orientación en estadios multipolares es el aparato de Golgi. El Golgi como el centrosoma forma una estructura característica que sirve para generar tracción permitiendo el desplazamiento del núcleo neuronal (nucleokinesis) (ver "introducción sección 6.1"). Por lo tanto un evento temprano que indica la orientación neuronal en fase multipolar es el Golgi y el centrosoma en posición hacia la pía. En otras palabras si conocemos la ubicación de estas organelas, es factible determinar cuál es la orientación celular de una neurona con morfología multipolar.

Para determinar la ubicación del Golgi, se utilizó un plásmido que permite expresar a la proteína Galt2-YFP (proteína residente del Golgi) y se observó su ubicación respecto a neuronas marcadas con la proteína fluorescente roja (DsRed) en fase multipolar. Para poder observar la fase multipolar se electroporaron los embriones al día E15 y los cerebros fueron procesados a E17. (Figura 21).

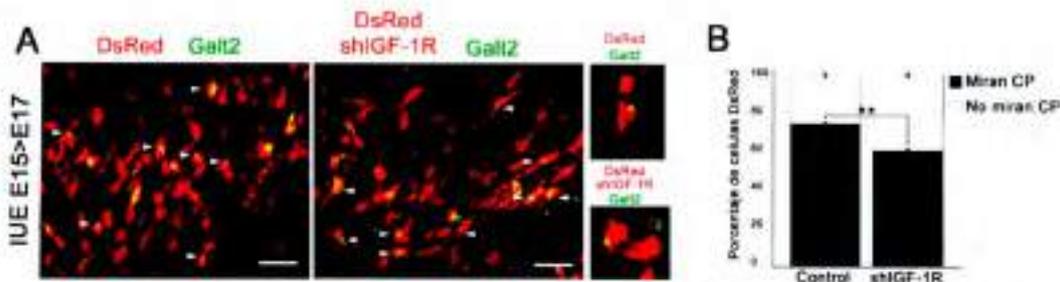


Figura 21: Desorientación en neuronas silenciadas para IGF-1r. Co-electroporación “in utero” al día E15 con DsRed y Galt2 (control) y DsRed, Galt2 y shRNA dirigido contra el receptor de IGF-1 a E17.A) Obsérvese que la distribución del Golgi tanto en control como en células silenciadas (cabezas de flecha). B) Cuantificación Barra de calibración 50µm. Los datos estadísticamente para neuronas que miran a la CP(**) p<0.0016, n:3 experimentos independientes Test estadístico aplicado test t no apareado.

Las neuronas control poseen una población que se encuentran en su mayoría orientadas en dirección a la cara cortical mientras que las células silenciadas para IGF-1R se hallan en un estado de desorientación más pronunciado, estas células no presentan ningún patrón de orientación específico por lo que las neuronas se orientan indistintamente hacia cualquier región de la corteza. Es interesante notar que la diferencias en la orientación entre las dos poblacionales fueron estadísticamente significativas, sin embargo estas discrepancias no fueron pronunciadas. Esto puede deberse a que el fenómeno de orientación celular tiene una fase de movimientos aleatorios previos a la orientación final de la célula, la cual se encuentra dirigida por los factores extracelulares de su entorno.

El segundo evento temprano observable que debe enfrentar una neurona piramidal de corteza luego de orientarse, es cambiar de morfología multipolar a bipolar. Durante las primeras 24h de vida las neuronas se encuentran en su forma multipolar, ubicadas próximas a la MMZ (del inglés “Multipolar Marginal Zone”). En esta región principalmente las neuronas poseen morfología multipolar. Posteriormente deben adoptar una morfología bipolar, la cual le permite interactuar con las fibras de las Glias Radiales para ascender y abandonar la región MMZ para ubicarse en RMZ (del inglés “Radial Marginal Zone”). La mayoría de las neuronas residentes de esta zona poseen morfología bipolar necesaria para migran radialmente, hasta alcanzar los estratos superiores de la corteza y continuar con su programa de desarrollo. Por tal motivo se decidió evaluar si IGF-1R es relevante el cambio fenotípico de multipolar a bipolar, para ellos se comparó las poblaciones control vs shIGF-1R por su estado morfológico teniendo en cuenta la posición en la cual se ubican a las 48h post-electroporación (**Figura 22**).

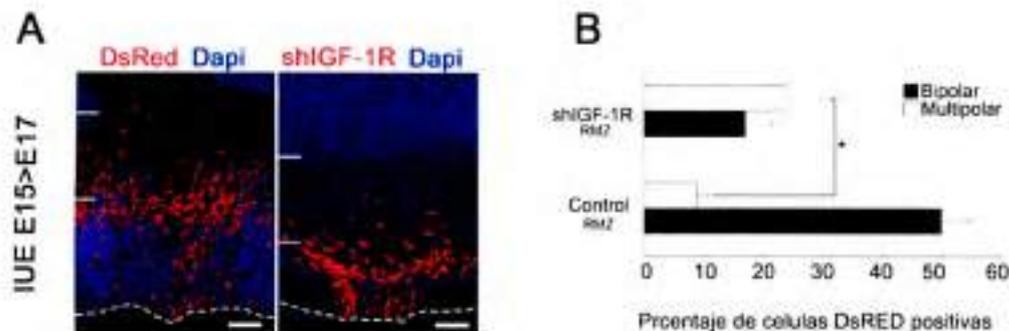


Figura 22: Distribución de neuronas silenciadas para IGF-1R en RMZ. Co-electroporación “in utero” al día E15 con DsRed y shRNA dirigido contra el receptor de IGF-1 a E17. Como se puede observar un mayor número de celulares multipolares fueron observadas en la RMZ en células que no expresan cantidades funcionales del receptor de IGF-1R. Barra de calibración 50µm. Los datos estadísticamente para neuronas multipolares en la RMZ (*) $p < 0,01$, $n: 3$ experimentos independientes Test estadístico aplicado test t no apareado.

Se encontró en el control que las neuronas residentes en RMZ fueron en una gran proporción neuronas bipolares. Mientras que en neuronas shIGF-1R la relación cambia considerablemente. En el escenario de silenciamiento, una población de células multipolares se ubicó en RMZ. En consecuencia las neuronas silenciadas perdieron la capacidad de cambiar morfológicamente a bipolar por lo que su migración es en estado multipolar (ver sección 6.1) en la RMZ. Esto indica que las neuronas silenciadas no pueden establecer contactos con las fibras de las Glias Radiales, siendo un evento necesario para la formación del axón (Xu et al., 2015).

Se observó a mayor magnificación la morfología de neuronas silenciadas que logran ascender a la RMZ con morfología multipolar y se la comparó con neuronas control que logran establecerse en la RMZ. Nótese las diferencias morfológicas en ambas situaciones (Figura 23).

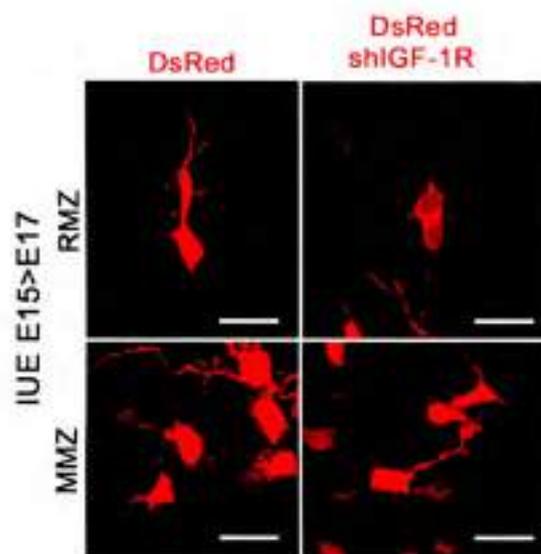


Figura 23: Morfología de neuronas multipolares en RMZ. Co-electroporación “in utero” al día E15 con DsRed y shRNA dirigido contra el receptor de IGF-1 a E17. Nótese la morfología multipolar (panel superior derecho) vs la morfología bipolar de la neurona (panel superior izquierdo). Barra de calibración 10µm

En conjunto los resultados expuestos en esta sección sugieren que IGF-1R y PI3k son esenciales en etapas tempranas (orientación, cambio morfológico de multipolar a bipolar y migración) del desarrollo neuronal. Indicando que esta vía de señalización es necesaria para la especificación axonal.

14. RESULTADOS PARTE III: RESULTADOS "IN SITU" PARA EL SILENCIAMIENTO DEL RECEPTOR DE TGF- β 2.

14.1 Efecto del silenciamiento de TGF- β 2R a distintos tiempos sobre la migración de neuronas piramidales de corteza

En esta sección se evaluó la vía de señalización TGF- β 2R/TGF- β 2 y se estableció su rol en el desarrollo. Para ello, se siguió el mismo esquema experimental de la sección anterior donde se utilizaron diferentes shRNA comerciales para el receptor de TGF- β 2. A partir de los mismos se realizaron IUE co-electroporando los shTGF- β 2R con el plásmido CAG-GFP donde se evaluó el patrón de migración, abarcando desde el estadio embrionario (E19) hasta estadios postnatales (P2 y P4) (Figura 24).

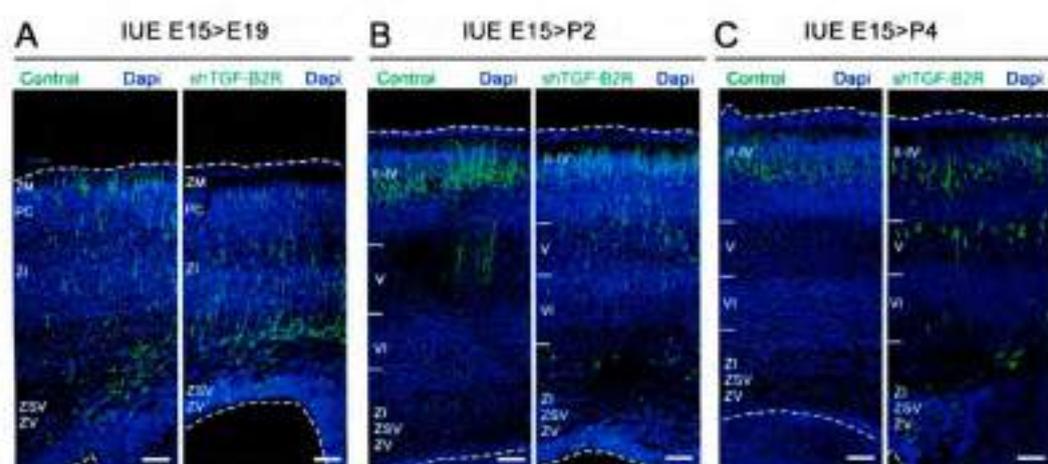


Figura 24: Silenciamiento del receptor de TGF- β 2R. Co-electroporación "in utero" al día E15 con shRNA dirigido contra el receptor de IGF-1 desde estadios E19 (A) y P2 (B) y P4 (C). Barra de calibración 100 μ m.

Los resultados expuestos sobre el silenciamiento de TGF- β 2R permiten indicar en términos generales que los efectos fenotípicos fueron más sutiles y que la población afectada es una pequeña población neuronal. Los efectos a estadios embrionarios parecen ser leves, donde la distribución de células respecto al control es similar, exceptuando un ligero retraso en número de células que llegan al plato cortical. En P2, una pequeña población posee un retraso en su migración, aunque las características de este retraso fueron difusas. Avanzando a P4 la diferencia entre las poblaciones se acentúa, conformando dos poblaciones discretas. Un grupo logra sortear el silenciamiento y consigue llegar a la CP, mientras que el otro grupo queda totalmente definido al final de ZI. Cabe remarcar que la ZI es fácilmente identificada con la utilización de Dapi (marcador nuclear), debido a que esta zona es pobre en somas celulares, la

cual forma una franja más tenue entre la placa cortical y la zona subventricular (ver "introducción sección 5.2"). Es interesante notar que las neuronas que no logran sortear la ZI poseen rasgos de neuronas maduras como así también de neurona inmadura. Indicando que posiblemente estas neuronas se encuentran bloqueadas en una fase intermedia del desarrollo (los aspectos morfológicos se verán más adelante).

14.2 La sobreexpresión de PI3k no rescata el perfil migratorio

Hasta el momento, el silenciamiento selectivo de IGF-1R y TGF- β 2R presenta dos fenotipos marcadamente distintos. A partir de los antecedentes expuestos en la introducción unos de los interrogantes que surgieron fue si ¿PI3k es un efector cascada abajo de la vía de TGF- β ? Numerosos datos bibliográficos señalan que existe una relación entre TGF- β 2 y PI3k (vía no canónica o no-Smad) (Moustakas and Heldin, 2005). Por esta razón se sobreexpresó PI3k en neuronas silenciadas contra TGF- β 2R y observar el perfil migratorio (Figura 25).

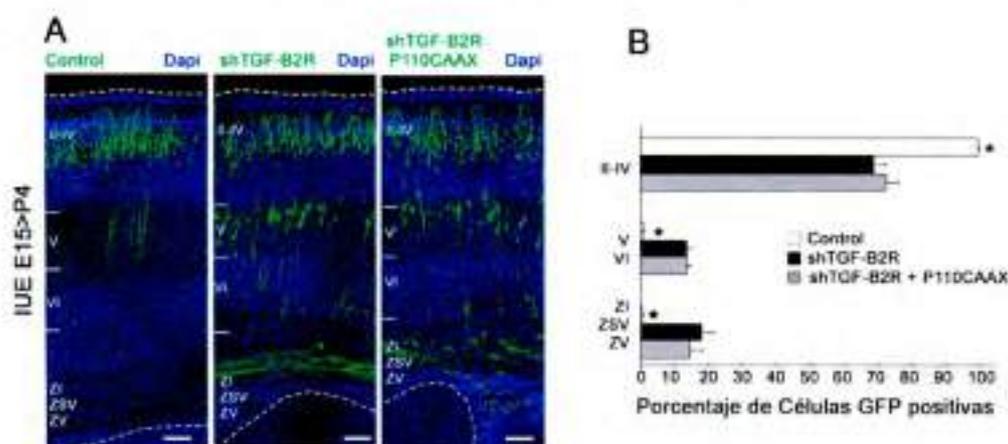


Figura 25: La sobreexpresión de PI3k no recupera la migración de neuronas silenciadas para TGF- β 2R. A) Co-electroporación "in utero" al día E15 con CAG-GFP, control y shRNA dirigido contra el receptor de TGF- β 2 a P4. La sobreexpresión de P110CAAX no es capaz de restablecer la migración neuronal silenciadas observándose un perfil migratorio similar a las neuronas silenciadas. B). Cuantificación del perfil migratorio. Donde se observaron diferencias significativas (***) $p \leq 0.0001$ en CP, (***) $p \leq 0.0007$ en IZ y (*) $p \leq 0.019$ VZ/ZSV n: 3 experimentos independientes. Test estadístico aplicado ANOVA de una vía aplicando el Post Hoc Turkey's, Barra de calibración 100 μ m.

Los datos observados permiten indicar que la presencia de PI3k durante el silenciamiento de TGF- β 2R, no restableció la distribución de células silenciadas. Por el contrario mantiene el fenotipo de arresto en la ZI. Si evaluamos los perfiles migratorios podemos observar que, un 15% de neuronas corticales se encuentran arrestadas cuando son silenciadas con shTGF- β 2R en ZI. Este patrón se repite en neuronas transfectadas con shTGF- β 2R y PI3k al mismo tiempo.

Podemos observar que PI3k no restableció el perfil migratorio como sucedió en los experimentos con shIGF-1R.

Por lo tanto PI3k no es un efector cascada abajo para receptor de TGF- β 2, que esté involucrado en los fenómenos migratorios "in situ". Indicando que PI3k no presenta reacción cruzada con TGF- β 2R en fases avanzadas de la migración. Posiblemente el efecto cascada abajo sea su propio efector canónico pSmad2.

14.3 Efecto del silenciamiento de TGF- β 2R sobre la morfología y la maduración en neuronas piramidales de corteza

Como fue mencionado, el fenotipo observado para el silenciamiento de TGF- β 2R, involucra un arresto en la migración de una pequeña población neuronal en la zona intermedia. La naturaleza del silenciamiento parece afectar estadios posteriores del desarrollo de neuronas piramidales de corteza, si lo comparamos con los efectos del silenciamiento para IGF-1R. En este contexto se evaluó la morfología celular luego de la utilización del shTGF- β 2R (Figura 26).

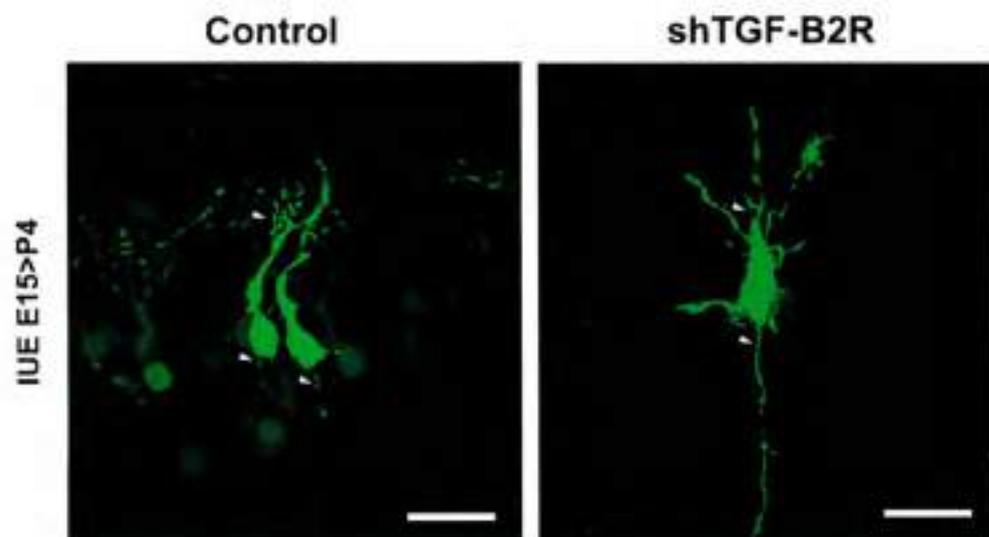


Figura 26: Aspectos morfológicos de neuronas silenciadas para TGF- β 2R. Fotomicrografías de rodajas de cerebros que muestran la morfología de neuronas control y neuronas silenciadas para TGF- β 2R. Nótese que en la imagen de neuronas shTGF- β 2R se observa aglomeraciones de neuronas (fenotipo heterotrópico). Barra de calibración 10 μ m.

Las evidencias de un arresto en la ZI, mostraron que las neuronas afectadas lograron establecer parte de su programa de desarrollo, pero que el mismo no fue concluido. La observación morfológica, mostró que el proceso guía da paso a una arborización dendrítica más acortada a la altura del soma (cabeza de flecha). El soma celular parece tener una morfología más alargada, donde la forma piramidal se encuentra ligeramente distorsionada. Estos rasgos pueden deberse a dos situaciones, por un lado al arresto en su maduración o

simplemente alteraciones morfológicas debida al silenciamiento. Asimismo el proceso de arrastre dio origen a un proceso alargado, con un calibre levemente mayor a los observados en neuronas control. Este proceso alargado posiblemente tenga características de axón en vías de desarrollo. Por este motivo se decidió evaluar, si las neuronas silenciadas para TGF- β 2R presentan marca para ANKG. Determinándose efectivamente que el proceso de arrastre es capaz de originar un axón a partir de neuronas silenciadas para TGF- β 2R en ZI (Figura 27).

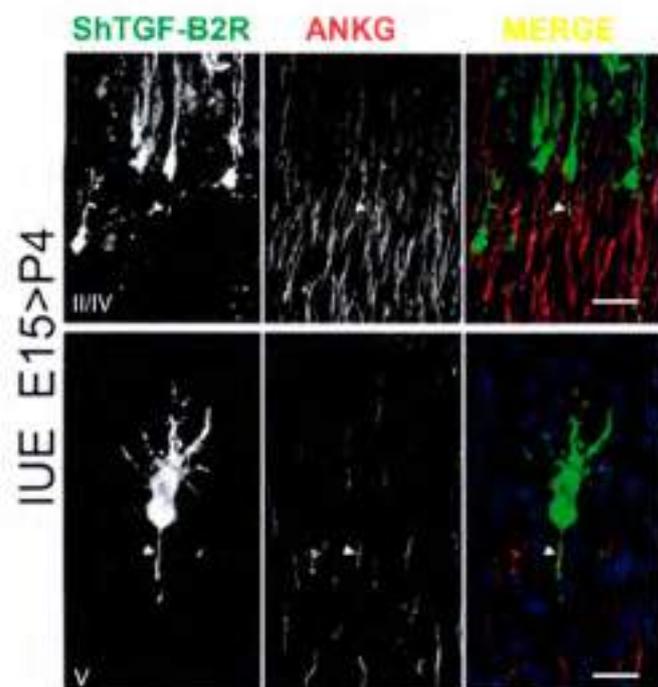


Figura 27: Aspectos morfológicos de neuronas silenciadas para TGF- β 2R, tinción con ANKG. Fotomicrografías de rodajas de cerebros que muestran la marca de ANK G en neuronas co-electroporadas con CAG-GFP y shRNA dirigido contra el receptor de TGF- β 2R a P4. Nótese que las neuronas que llegaron hasta la ZI se puede observar marca para ANK G (cabeza de flechas). Lo mismo sucede para las neuronas que llegan a las capa II-IV (cabeza de flecha). Barra de calibración 10 μ m

En la imagen podemos observar que las neuronas que llegan a las láminas II-IV fueron capaces de desarrollar marcas para ANKG inclusive las células arrestadas en ZI también poseen marca para ANKG. En el apartado dos introducimos los estadios de desarrollo de una neurona piramidal de corteza (ver "Introducción sección 7") queda establecido que en el estadio 5 del desarrollo, las neuronas que llegan a ZI intermedia comienza a establecer el axón el cual inicia su crecimiento desplazándose por el cuerpo calloso para establecer conexiones con el otro hemisferio (neuronas con proyecciones al cuerpo calloso). Durante el programa de desarrollo la arborización dendrítica es posterior al establecimiento del axón, esto podría indicar que el arresto sucede en el momento que la neurona empieza su arborización dendrítica. Por lo tanto al verse afectado este proceso observamos una arborización dendrítica acortada, con ramificaciones al nivel del soma celular.

En conjunto los experimentos presentados en esta sección indican que TGF β 2 y su receptor están involucrados en eventos avanzados del desarrollo neuronal. A su vez PI3k no presenta reacción cruzada con TGF- β 2R en fases avanzadas de la migración.

15. DISCUSIÓN PARTE II Y III: RESULTADOS "IN SITU"

15.1 Estudio "in situ" para investigar si los receptores IGF-1 y TGF β 2 son necesarios para el desarrollo neuronal de la corteza

En esta sección haremos mención a los resultados "in situ" obtenidos en esta tesis, profundizando en el rol de la vía IGF-1R/PI3k y TGF- β 2R durante el desarrollo de la corteza.

Sin lugar a dudas el uso de la electroporación "in utero" marca un antecedente sobre los estudios "in situ" a la hora de evaluar diferentes genes en el desarrollo de la corteza cerebral. Posterior al desarrollo de esta metodología, la mejor forma de establecer la funcionalidad de un gen "in situ", era a través de la tecnología de bloqueo de genes (del inglés, *gene knockout*).

Un ejemplo de esta metodología, fue la evaluación de ratones knockout para el factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1). Donde se concluye que la estructura del hipocampo y del cerebelo son normales, luego del tratamiento en la zona trigeminal se puede observar un déficit de motoneuronas (Vicario-Abejón et al., 2004). En este sentido, Insulina puede compensar la falta de IGF-1 activando sus receptores de IGF-1 con la misma eficiencia que su ligando específico.

Trabajos recientes realizaron comparaciones descriptivas en ratones *Igf1^{-/-}* y ratones condicionales *Igf1^{ΔΔ}* en células neuronales, en la cuales concluyen que IGF-1 es un componente fundamental para la migración y transición de células madres neurales a neuronas granulares en hipocampo de ratones adultos (Nieto-Estevez et al., 2016). Otros trabajos postulan que, ratones *Igf1^{r/+}* poseen una disminución en el tamaño de la médula espinal y del cerebro. Curiosamente esta disminución no está asociada a un menor número celular sino a una disminución de la neuropila (fibras neuronales y citoplasma de las células neurogliales), además estos ratones mueren al momento de nacer por fallas respiratorias (Liu et al., 1993). Otros modelos de ratones knockout para el receptor de IGF-1R. Muestran una marcada microcefalia, retardo en el crecimiento, comportamiento anormal y una expectativa de vida reducida (Kappeler et al., 2008).

A nivel periférico IGF-1 es sintetizada en el hígado y a nivel local se produce en pulmón, riñón, cerebro, medula ósea, etc. IGF-1 es un mediador principal de los efectos de la hormona de crecimiento. Por lo tanto es importante destacar que los modelos de animales knockout no permiten un estudio espacio temporal selectivo. Esto dificulta evaluar directamente la implicancia de IGF-1 en el sistema nervioso central. Ddonde los efectos inespecíficos por la falta de este factor deben ser tenidos en cuenta.

La utilización de la metodología "in utero" permite generar silenciamiento espacial y temporalmente restringido, de una manera rápida. En este sentido nosotros observamos que una población neuronal silenciada para IGF-1R se encuentra arrestada en etapas tempranas del desarrollo, ocupando las zonas profundas de la corteza (zonas germinativas), adoptando una morfología multipolar, incapaz de cambiar su morfología a bipolar. Este paso de conversión multipolar a bipolar es necesario para que las neuronas puedan iniciar la locomoción guiada por las fibras de la glía radial (FGR) hacia la corteza (laminae II-IV) (Noctor

et al., 2004). Como hemos mencionado la morfología multipolar es típica de un estadio inmaduro, el cual dura aproximadamente 24h. Durante el estadio multipolar las neuronas nacientes censan su entorno para interpretar las pistas ambientales que dictan sus pasos posteriores de desarrollo. Las señales ambientales provenientes de IGF-1, son necesarias en las etapas tempranas del desarrollo.

El establecimiento de axones es una etapa clave en el desarrollo neuronal, donde la especificación axonal es un proceso clave para que las neuronas multipolares puedan cambiar y adoptar una morfología bipolar (Namba et al., 2015). En consecuencia además de las observaciones morfológicas de neuronas multipolares, se decidió observar mediante inmunohistoquímica la presencia o ausencia de axones maduros con la utilización del anticuerpo ANKG. Nuestros resultados mostraron que las células que no lograron migrar fueron negativas para ANKG corroborando que tampoco pueden establecer axones maduros. Estos resultados fueron acordes a las observaciones "ex vivo" donde las neuronas del hipocampo no polarizan tras el silenciamiento génico de los IGF-1R (Sosa et al., 2006). Por lo tanto en esta tesis se logró demostrar que el receptor de IGF-1 es necesario para la especificación axonal "in situ".

Las similitudes con los datos "ex vivo" permitieron hipotetizar que posiblemente las señales de IGF-1/IGF-1R sean a través del efector secundario PI3k, el cual se ha propuesto como un efector involucrado en la especificación axonal "ex vivo" (Shi et al., 2003). Nuestros resultados indicaron que la sobreexpresión de PI3k en células silenciadas para IGF-1R "in situ" permite restablecer el perfil migratorio y consecuente desarrollo neuronal, indicando que las señales ambientales provenientes de IGF-1 son traducidas a través de IGF-1R vía PI3k. Estas señales son necesarias para que las neuronas puedan desencadenar los cambios morfológicos requeridos para la migración (de multipolar a bipolar) y así poder completar su esquema de desarrollo. Además se conoce "ex vivo" que la activación de PI3k a través de IGF-1, es necesaria para la adición de nueva membrana en el cono de crecimiento axonal favoreciendo el desarrollo del axón (Laurino et al., 2005). Los resultados obtenidos en esta tesis indican que los mecanismos intracelulares, "ex vivo" e "in situ" son similares, donde la supresión de los receptores de IGF-1 afecta en ambos casos el desarrollo neuronal en etapas tempranas del desarrollo, previo a la formación del axón.

Por otro lado evaluamos la orientación celular en las células silenciadas para IGF-1R que presentan una morfología multipolar. La orientación celular "in situ" es un fenómeno que sucede previo a la migración neuronal, evento esencial para lograr la correcta expansión de la corteza cerebral. Como mencionamos el Golgi y el centrosoma se ubican en dirección a la placa cortical durante el estadio multipolar de neuronas corticales (ver "Introducción sección 8"). Siendo el Golgi y el centrosoma indicadores tempranos de orientación de neuronas multipolares (Umeshima et al., 2007). En nuestros experimentos, las neuronas silenciadas para IGF-1R presentaron una desorientación temprana incluso antes de comenzar sus cambios morfológicos y posterior migración. Estos datos sugieren que IGF-1 está regulando la orientación celular, siendo este uno de los acontecimientos tempranos que suceden luego del nacimiento neuronal.

Este evento es esencial en el desarrollo de la corteza cerebral, ya que en un esquema de desarrollo normal las células deben orientarse para lograr migrar, desarrollarse y finalmente ubicarse en las láminas correspondientes de la corteza.

Antecedentes previos afirman que el IGF-1 y IGF-2 se encuentran en abundancia en el líquido cefalorraquídeo (producido en el plexo coroideo), proponiendo un gradiente desde el ventrículo hacia la pía (Lehtinen et al., 2011). Por lo tanto, considerando también los resultados de esta tesis, proponemos que el microambiente generado por IGF-1 es necesario para que las neuronas se posicionen mirando hacia la placa cortical, previo a establecer su morfología bipolar.

Conjuntamente con los datos de orientación, muchas de las células silenciadas para IGF-1R con morfología multipolares son encontradas en la RMZ (del inglés radial marginal zone). En esta zona se encuentran mayoritariamente neuronas con morfología bipolar. Esto indica que las pocas neuronas multipolares que logran salir de las zonas germinativas, lo hacen migrando erráticamente (migración multipolar) sin poder establecer los procesos de guía y de arrastres necesarios para poder migrar y madurar correctamente (Xu et al., 2015). Estas observaciones nos demuestran que IGF-1R está regulando en su conjunto la maduración y migración neuronal.

Los niveles más altos del factor de crecimiento IGF-1 coinciden el pico de neurogénesis (E11-E17), incrementando el número de progenitores neurales (Popken et al., 2004), además los precursores neuronales (GR) son IGF-1R positivos, indicando que pueden ser estimulados por IGF-1 proveniente desde el plexo coroideo (Lehtinen et al., 2011). Otros autores mencionan que IGF-1, puede estimular la diferenciación neuronal de progenitores *in situ*, donde la células neuroepiteliales (CNP) son estimuladas por IGF-1, permitiendo la proliferación de progenitores y la diferenciación neuronal (Joseph D'Ercole and Ye, 2008).

No debemos descartar que el arresto de neuronas piramidales de corteza (estadio multipolar) pueda deberse a defectos en los progenitores neuronales (GR). Teniendo en cuenta que la electroporación sucede sobre células germinativas de la pared del ventrículo, los efectos de silenciamiento pueden afectar a las GR. Debemos tener en cuenta que el silenciamiento en GR no es a tiempo cero como si lo es para las neuronas nacientes electroporadas. Por consiguiente el efecto del silenciamiento puede ser parcial en GR. Además sabemos por nuestros modelos. Que una población celular particular puede escapar al silenciamiento como podemos observar con las poblaciones celulares que logran llegar a la placa cortical. Puede considerarse, que luego de la electroporación, las futuras GR podrían estar afectadas. En ese sentido, se podría observar que sucede con las GR efectuando tinciones con algún marcador como Nestina (marcado de células progenitoras), y marcadores de división celular como 5-BrUrd (5-bromo uridina). Igualmente en nuestro modelo no encontramos una disminución en el número de células respecto al control. Indicando que la neurogénesis no está afectada.

Como se mencionó TGF- β 2 ha tomado un rol preponderante en los últimos años en el desarrollo neuronal *ex vivo* e *in situ*. Donde se menciona que TGF- β y TGF- β 2R son necesarios para especificar el establecimiento axonal durante el desarrollo del cerebro a través de Par6 (vía no canónica) (Yi et al., 2010). Se ha observado que TGF- β se expresa en el sistema nervioso de mamíferos durante el desarrollo (Mecha et al., 2008) y su receptor también se encuentra presente en la corteza en desarrollo (Tomoda et al., 1996).

Siguiendo el mismo esquema experimental *in situ* que se utilizó para IGF-1R, evaluamos la implicancia de TGF- β 2R durante el neurodesarrollo. Nuestras observaciones *in situ* revelaron que una pequeña población es afectada luego de ser silenciadas para el TGF- β 2R. Interesantemente esta pequeña población logra llegar hasta la región superior de la ZI previo a

alcanzar PC. Además estas neuronas logran establecer parte de su programa de desarrollo, pero este se ve interrumpido cuando no logran seguir migrando por la PC. En ese sentido las neuronas arrestadas al final Z1 presentan morfológicamente axones ya definidos (ANK G positivos) y un árbol dendrítico rudimentario.

Contrariamente a nuestros resultados, estudios *in situ* demostraron que neuronas bipolares a E19 que carecen del receptor de TGF- β 2 no poseen axones (Yi et al., 2010). Debemos indicar que a E19 la corteza está en plena formación, donde es muy complejo distinguir axones maduros. Al analizar los resultados mostrados en la **Figura 24 A**, observamos que la mayor parte de las neuronas corticales, se encuentran mayoritariamente en migración y su desarrollo final no se ha alcanzado, por lo que un análisis axonal en este estadio embrionario es muy complejo. Por el contrario, en estadios postnatales, las fibras de las neuronas maduras son fácilmente discernibles (Figura 24 B y C). Resultados previos indican que en fase multipolar, el proceso menor especificado como futuro axón comienza a establecerse como el proceso de arrastre previo a la formación del proceso guía (Namba et al., 2015). Por lo tanto la especificación axonal *in situ* es necesaria para el posterior cambio morfológico de multipolar a bipolar. Además es necesaria la interacción entre las fibras de Glias Radiales con el proceso guía (neuronas bipolares) para la formación axonal (Xu et al., 2015); de este modo, la morfología bipolar es indicativa de la presencia de axones.

Por otro lado nuestros resultados expresando PI3k constitutivamente activa en células silenciadas para TGF- β 2R no lograron restablecer el patrón de migración y de desarrollo como si se observó para IGF-1R. Estos resultados indican que PI3k constitutivamente activa no es capaz de activar ningún efector vinculado en la vía de TGF- β .

Una posible explicación a estas observaciones es que PI3k es activado por otras vías (como por ejemplo IGF-1R). También puede suceder que la vía activada por TGF- β 2R puede ser necesaria en etapas más tardías del desarrollo, migración final en la placa cortical, posible desarrollo del árbol dendrítico y elongación axonal. Estos datos muestran relación con lo observado *ex vivo* donde no vemos efectos de arresto celular de neuronas en estadio 2 cuando se silencia TGF- β 2.

Resulta muy curioso que el efecto del silenciamiento TGF- β 2R sucede en una pequeña población, esto puede ser indicativo de que la población sensible al silenciamiento sea una población específica.

En el último tiempo nuevas técnicas de secuenciamiento de célula única en tejido, ha permitido la identificación de nuevas subpoblaciones neuronales en la corteza, a través de su perfil genético (Pollen et al., 2014). Sería muy interesante conocer la identidad de la población sensible al silenciamiento de TGF- β 2 que observamos en nuestros experimentos.

Indudablemente resta observar que sucedería si se expresa pSmad activo (vía canónica) en células silenciadas para TGF- β 2. Además se podría estudiar estadios postnatales avanzados (P4 en adelante) con el fin de observar efectos tardíos en fibras axonales por la falta de TGF- β 2R.

16. CONCLUSIONES

A partir del silenciamiento génico, se consiguió establecer que IGF-1R a través de PI3k es necesario durante las primeras etapas del desarrollo, promoviendo la orientación celular, la formación de un axón (consecuencia del cambio morfológico de multipolar a bipolar) y la migración de las neuronas a la capa cortical. Todos estos eventos son esenciales en el normal desarrollo de la corteza cerebral.

Estas observaciones se refuerzan con los resultados previos grupo con el modelo "ex vivo", donde el efecto de IGF-1R mediante PI3k es esencial para el establecimiento inicial del axón y el desarrollo neuronal (Laurino et al., 2005; Sosa et al., 2006).

Por otro lado el rol del receptor TGF- β 2 "in situ" se manifiesta en etapas avanzadas del desarrollo neuronal en corteza (desarrollo del árbol dendrítico y elongación axonal), sin la participación de PI3k como un efector de esta vía. En este escenario la especificación axonal ya fue alcanzada.

Estos datos coinciden con las observaciones obtenidas "ex vivo" presentados en esta tesis, donde el receptor de TGF- β 2 no es esencial para el establecimiento axonal.

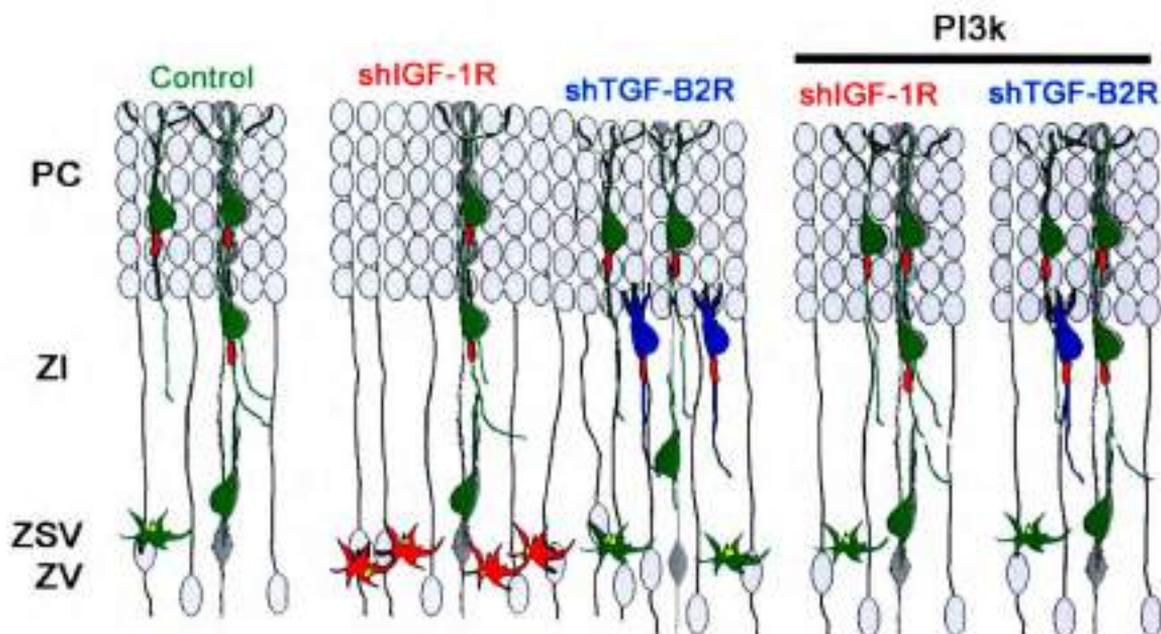
Finalmente podemos concluir que el complejo programa de desarrollo neuronal se desencadena a través de diferentes etapas, donde cada fase esta finamente regulada por distintos receptores y efectores intracelulares. En la presente tesis se logró establecer algunos de los roles específicos para estos receptores durante el neurodesarrollo de las neuronas corticales "in situ", demostrando que IGF-1R regula los eventos tempranos del desarrollo neuronal y que TGF- β 2R es necesario en etapas posteriores del desarrollo cuando las neuronas corticales se encuentran próximas a la corteza.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, hemos logrado establecer la metodología de electroporación "in utero" como una nueva herramienta que nos permitió avanzar en el estudio del desarrollo de una neuronal.

Se logró aportar nueva información y relevante sobre el rol de los receptores de IGF-1 y TGF- β 2 en distintas etapas del desarrollo neuronal.

Contrastando estos resultados con investigaciones "ex vivo", se pudo establecer un paralelismo entre estos dos modelos. Aportando una mirada global a los eventos que suceden durante el neurodesarrollo.

MIGRACION RADIAL



Esquema: Implicancia de los receptores de IGF-1 y TGFβ2R durante el neurodesarrollo de la corteza.

17. MATERIALES Y MÉTODOS

17.1 Cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata

Para los cultivos de neuronas piramidales de hipocampo, se utilizan embriones de rata de 18 días de vida intrauterina. Las ratas preñadas fueron anestesiadas con CO₂ y se les practicó una cesárea. Los embriones fueron inmediatamente decapitados en campana de flujo laminar. Se extrajeron los cerebros y se los colocó en cápsulas de Petri conteniendo solución estéril de Hank (HEPES 10 mM, NaCl 4 g, KCl 200 mg, Glucosa 500 mg, KH₂PO₄ 30 mg, NA₂HPO₄ 23,7 mg, H₂Ocsp 500 ml, pH= 7.4) a 4°C. Los hipocampos se extrajeron mediante microcirugía bajo lupa estereoscópica Carl Zeiss y se incubaron en solución de tripsina al 0,25% p/v a 37°C durante 18 minutos para digerir la matriz de adhesión intercelular. Luego fueron lavados 3 veces durante 5 minutos cada vez con solución de Hank a 4°C y colocados en tubo plástico estéril de 15 ml conteniendo entre 3 a 1 ml medio de cultivo DMEM/HS10% (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Gibco®) a 37°C, dependiendo del número de hipocampos extraídos. En los casos en los que las células fueron destinadas a experimentos de transfección en suspensión el medio de cultivo antes mencionado, fue reemplazado por medio de transfección OPTIMEM® (Gibco). Los hipocampos fueron disociados utilizando pipetas Pasteur de vidrio de diámetros decrecientes hasta lograr una suspensión homogénea. Las células disociadas fueron sembradas sobre discos de vidrio-cubreobjetos previamente cubiertos con poli-L-lisina (1mg/ml en buffer borato pH: 8; el exceso de poli-L-lisina es eliminado con 4-5 lavados de agua milliQ) con una densidad aproximada de unas 5000 células/cm² y mantenidas en medio de cultivo DMEM/HS10%. Las células fueron cultivadas durante 1-2 horas en estufa a 37°C, CO₂ al 5% y humedad constante, lo que les permite asociarse a los cubreobjetos con poli-L-lisina. Una vez adheridas las neuronas, el medio DMEM/HS10% fue sustituido por un medio definido comprendido por la mezcla N2-Neurobasal (suplementos B27 2%v/v y N2 1%v/v, piruvato 0.1mM, glutamina 0,2mM y albumina 0,1%p/v. disueltos en medio definido Neurobasal – Gibco® –). Para permitir la supervivencia y el crecimiento neuronal, este medio de cultivo contiene niveles altos de insulina, suficiente para estimular los receptores de insulina como así también los receptores de IGF-1.

En algunos experimentos (donde se especifica) las células se incuban con un medio condicionado, el cual consiste en una mezcla N2-Neurobasal con bajo contenido de insulina (5nM); ésta se encuentra en cantidad suficiente para permitir la sobrevida celular pero no para promover la activación de receptores de IGF-1. Esta condición es la que se define como baja insulina.

17.2 Animales

En la mayor parte de los experimentos se utilizaron ratones C57BL6/J. La colonia de producción se mantuvo en condiciones y respetando el sistema de exocriado. Todos los animales estuvieron sujetos a ciclos de luz-oscuridad en periodos de 12h, a 23°C con libre disponibilidad de alimento y agua. Fueron manipulados sólo por personal entrenado. En todo momento se buscó mantener los animales en condiciones que minimicen los padecimientos derivados de la investigación.

17.3 Inmunofluorescencia

Las neuronas crecidas en cultivo primario, son sometidas a 3 lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con la solución salina de buffer fosfato (PBS, que contiene: NaCl 4,25 gr; Na_2HPO_4 , 6,4 gr; NaH_2PO_4 1.01 gr; H_2O csp 500 mL). Posteriormente son fijados. El método de fijación es explicado a continuación:

17.3.1 Fijación con PFA

Las células en cultivo fueron fijadas con una solución de paraformaldehído-sucrosa al 4% (p/v) durante 20 min a temperatura ambiente, lavadas 3 veces por 5 minutos cada vez con PBS 1X, subsecuentemente las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.2% v/v en PBS 1X durante 6 minutos y lavadas nuevamente.

Los discos de vidrio con las células adheridas fueron trasladados a cámara húmeda donde se los cubrió con una solución bloqueante (Suero de caballo al 5% y Tritón X-100 al 0,05% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente con el fin de cubrir epitopes inespecíficos presentes en la muestra. Posteriormente las células fueron incubadas con el/los anticuerpo/s primario/s durante 1 a 3 horas a temperatura ambiente o 12 horas a 4°C y lavadas con PBS (3 veces por 5 minutos). Luego fueron teñidos usando anticuerpos secundarios fluorescentes durante 1 hora a temperatura ambiente y lavados con PBS (3 veces por 5 minutos). Para el montaje de los cubreobjetos se utilizó FluorSave (Calbiochem).

17.4 Anticuerpos Irios

ANKG: Monoclonal de ratón, NeuroMab (clon N106/36) IF: 1/1000.

pSmad: (pS467): Policlonal de conejo, Abcam ab(53100) IF:1/100; WB:1/300.

TGF β 2R: (humano): Policlonal de cabra, RyD sistema, reacción cruzada con rata y ratón IF: 100; WB: 1/200.

Tau-1: Monoclonal de ratón, Millipore (clon PC1C6), IF: 1/400

α -Tubulina: Monoclonal de ratón (clon DMA1), Thermo Scientific (Cat. MA1-25052) WB: 1/2000.

Tubulina β III: Policlonal de conejo Sigma (Cat. T2200) IF: 1/2000; WB: 1/4000.

17.5 Anticuerpos 2rios

IgG de conejo	Alexa Fluor 488 (fluorescente verde)	Policlinal de conejo	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A21441)
IgG de ratón	Alexa Fluor 488 (fluorescente verde)	Policlinal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A11001)
IgG de conejo	Alexa Fluor 546 (fluorescente rojo)	Policlinal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A11035)
IgG de ratón	Alexa Fluor 568 (fluorescente rojo)	Policlinal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A11031)
IgG de conejo	Alexa Fluor 633 (fluorescente azul)	Policlinal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A21080)
IgG de rata	Alexa Fluor 633 (fluorescente azul)	Policlinal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A21094)
IgG de ratón	Alexa Fluor 633 (fluorescente azul)	Policlinal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A21052)
IgG de conejo	Odyssey Bdyo CW 800 (infrarrojo)	Policlinal de cabra	WB: 1/15000	LI-COR (Cat. 926-32210)
IgG de ratón	Odyssey Bdyo CW 800 (infrarrojo)	Policlinal de cabra	WB: 1/15000	LI-COR (Cat. 926-32210)

17.6 Microscopia

Para el registro de las imágenes confocales se utilizó un microscopio confocal espectral FluoView® FV1000 con objetivo (AN 1.42) y 100x (AN 1.4).

Para el registro de las imágenes confocales de tejido cerebral se utilizó un microscopio confocal FluoView® FV1200 con platina motorizada con objetivos 20x (AN 1.42) y (AN 1.42)

Las fotografías fueron procesadas utilizando el programa Adobe Photoshop CS. Para las cuantificaciones de las mismas se utilizaron el software ImageJ según se indique.

17.7 Transfección

17.7.1 Transfección convencional

Este protocolo cuenta para células en cultivo adheridas al sustrato (líneas o cultivo primario). Se utilizaron placas de plástico de 35 mm con alta densidad de células (~60-75%).

Se preparó la solución de transfección mezclando 250 μ l de medio de transfección OPTIMEM® a 37 °C con 5 μ l del agente Lipofectamina® 2000 (Invitrogen), incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente, y agregando posteriormente 50 μ l de OPTIMEM® a 37 °C con una cantidad de DNA determinada según el experimento (entre 1,5 a 4 μ g). Se incubó la solución resultante durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 700 μ l de OPTIMEM® a 37 °C y posteriormente se procedió a reemplazar con este medio de transfección el medio definido en el que se encontraban creciendo las células. El proceso de transfección tuvo una duración de entre 60 a 90 minutos. Posteriormente se reemplazó el medio transfectante por medio de cultivo a 37 °C y se permitió la expresión de las diferentes construcciones por un lapso de 12-40 horas dependiendo del experimento.

17.7.2 Transfección en suspensión

Este protocolo fue utilizado para células aún no adheridas al sustrato, posterior a la obtención de neuronas disociadas.

Se preparó la solución de transfección mezclando 50 μ l de medio de transfección OPTIMEM® a 37 °C con 1,2 μ l de Lipofectamina® 2000 (incubados durante 10 minutos) y agregando posteriormente 30 μ l de OPTIMEM® a 37 °C con una cantidad de DNA determinada según el experimento (entre 0,4 a 1,2 μ g). Se incubó la solución resultante durante 20-30 minutos a temperatura ambiente.

Por otro lado, se determinó en cámara de Neubauer la cantidad de células presentes en la suspensión celular. Se agregó el equivalente a 50000-70000 células (~15-20 μ l) al complejo OPTIMEM®/Lipofectamina®/DNA y posteriormente se depositó esta mezcla sobre los vidrios tratados con poli-L-lisina, formando una gota sobre los mismos. Se permitió que la reacción de transfección tuviera lugar durante 60 a 90 minutos, luego que las células se adhirieron al sustrato se retiró la gota de complejo transfectante y se reemplazó con medio definido N2-neurobasal. Una vez finalizada la transfección (tiempo cero de cultivo primario) se permitió la expresión de las diferentes construcciones por un lapso de 12-40 horas.

17.8 Electroporación "in utero"

La técnica de electroporación "in utero" consiste en realizar una operación abdominal llamada laparotomía hembras de la cepa C57BL6/J preñas con ratones de 15 días de vida intrauterina. Previo a la operación se preparan los plásmidos que se van a utilizar en una mezcla que contiene CAG-GFP a 1 μ g/ μ l y shARN específicos para cada experimento (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO) ambos junto a 0.5 μ l del colorante tripan blue para poder ver la solución durante el procedimiento.

La mezcla de plásmidos mas el colorante son cargados en una aguja realizada específicamente para este propósito a partir de capilares (world Precision Instruments Inc) en un puller (Sutter P-97), siguiendo las siguientes especificaciones calor 240, fuerza de 30 y velocidad 40, se obtienen las agujas, para el procedimiento.

Se anestesia a las hembras gestantes a día E15 con isoflurano vaporizado, se desinfecta la zona abdominal con etanol 70% y alcohol yodado y se rasura la zona uterina. Se realiza un pequeño corte a nivel epitelial y muscular, de un tamaño suficiente para extraer los cuernos uterinos y los embriones con facilidad. Una vez en el exterior es importante que los embriones se humedezcan en todo momento con solución salina (NaCl 09%) suplementado con penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO). El ADN se inyecta en el ventrículo lateral usando una pipeta controlada por boca (mouth controlled pipette), bajo luz de fibra óptica (este tipo de iluminación evita que se sobrecaliente el área y que además se seque menos). Los animales correctamente inyectados son visualizados por el colorante que permite ver el ventrículo cargado con la mezcla de ADN. El siguiente paso es ubicar electrodos sobre la cabeza del embrión y se procede a electroporar los embriones, esto permite que el ADN sea incorporado en las células gracias a la carga negativa del ADN, que migra hacia el ánodo en el campo eléctrico aplicado. El pulso eléctrico producido es de voltaje, 40; duración del pulso, 50ms; pulsos, 5; espacio entre pulsos, 950ms un electroporador realizado en la UNC. Al terminar la cirugía se reintroducen los cuernos uterinos en el abdomen, se cose la capa

muscular y la capa epitelial con sutura reabsorbible (Saito and Nakatsuji, 2001; Tabata and Nakajima, 2001).

17.9 Perfusión y fijación de tejidos

Histológicamente los cerebros de los ratones se fijaron por perfusión con PAF al 4% en PBS a P2, P4, P6 y P8. Se anestesia al ratón con ketamina (anestésico) y xilacina (relajante muscular), 1ml de cada en 8ml de PBS, y se hace una incisión para dejar el corazón al descubierto. Se inyecta la solución de PAF en el ventrículo izquierdo, hasta que la solución circule por todo el sistema vascular. Una vez fijado se extrae el cerebro y se mantiene en PAF O.N. Después se cambian los cerebros a una solución de sacarosa al 30% y se mantienen hasta que se estabilizan, entre 24 y 48h dependiendo del tamaño del cerebro. Por último, los cerebros se congelan en O.C.T (un alcohol viscoso con polivinil y polienglicol). (Sakura, Torrance, CA) para su posterior procesado histológico.

17.10 Técnicas histológicas

Se hicieron cortes coronales de cerebros de ratones en flotante a 50µm utilizando el criostato Leica CM1900 (Wetzlar, Alemania) y se eligieron aquellos con mayor fluorescencia para su tinción. Se incuban los cortes en 95% de PBST 0.5%, 5% FBS y el anticuerpo primario 1:500 a 4°C O.N. Tras tres lavados con PBS 1X durante 10 minutos, se incubaron las muestras en una dilución de 98% de PBST 0.5%, 2% FBS y el anticuerpo secundario 1:1000 a T.A. durante 1h y en oscuridad. Se lava con PBS y se tiñen los núcleos con TO-PRO (Invitrogen, Grand Island, NY) 1:200. Finalmente, tras un último lavado en PBS, se montan en un portaobjetos con Aqua Poly-Mount (Polysciences, Inc., Warrington, PA). Los núcleos fueron teñidos con DAPI 1:200.

Los cortes del experimento para la tinción con ANKG se hicieron cortes coronales, de 50µm y adheridos a portaobjetos cargados positivamente (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se lavan 10 minutos en PBS 1X y se hierven 1 minuto a 110°C en tampón citrato pH6 10mM. Se lavan con PBS y se incuban O.N. a 4°C en anticuerpo primario de la misma forma descrita anteriormente. Tras lavados de 10 minutos con PBS se incuban con el anticuerpo secundario durante 1h a T.A y oscuridad. Tras este paso se lava con PBS, se tiñen los núcleos con y se montan con cubreobjetos

17.11 Biología Molecular: Preparación de construcciones

17.11.1 Obtención y construcción de los vectores para expresión de shRNAs

Para generar los diferentes shRNAs utilizados en para el silenciamiento en cultivo primario de neuronas hipocampales se utilizó un vector comercial denominado pSuperNeo+GFP (Oligoengine). Éste fue digerido con las enzimas de restricción BglII y HindIII (Promega). El plásmido en esta configuración abierta fue utilizado para insertar diferentes secuencias de oligonucleótidos. Éstos fueron previamente diseñados en base a algoritmos y programas específicos y sintetizados comercialmente (GBT Oligos). Es importante destacar que cada oligonucleótido consta de una secuencia complementaria (no mostrada) diseñada de tal manera que al hibridar ambas se formen extremos que empalman con los sitios de restricción BglII y HindIII del vector abierto. Dicha hibridación entre pares de secuencias complementarias se logra mediante gradientes de temperatura que pueden programarse en una PCR. Para la ligación entre vector y oligonucleótido hibridado se utilizó T4 ADN ligasa. Una vez que la ligación fue exitosa se procedió al chequeo de los clones mediante enzimas de restricción y, posteriormente, por secuenciación de los mismos. Subrayado en cada oligonucleótido se indican las secuencias a las que se dirige el ARN antisentido.

shTGF β 2R (oligo1):

5' GATCCCCGAGGGAAGAACGACAAGAA TTCAAGAGA TTCTGTGCTTCTCTCCTTTTAA3'

shTGF β 2R (oligo2):

5' GATCCCCGACCTGTTGTTGGTCATTA TTCAAGAGATA ATGACCAACAACAGGTCTTTTAA3'

Scrambled:

5' GATCCCC ATTGGTCGTATTAGTTCCG TTCAAGAGA CGGAAC TAATACGACCAATTTTAA3'

Por otro lado para los experimentos "in situ" se adquirieron shRNAs comerciales de la empresa SIGMA, donde la eficiencia en el silenciamiento fue evaluada por parte de la misma.

Subrayado en cada oligonucleótido se indican las secuencias a las que se dirige el ARN antisentido.

shTGF- β 2R 8 (1)

Identidad del clon: NM_009371.2-1857s21c1 (TRCN0000294529)

Secuencia: CCGGCCAGATCGTGTGTGAGACTTTCTCGAGAAAGTCTCACACAGATCTGGTTTTTG

Nivel de silenciamiento: 0.98 en Línea Celular: Hepa 1-6

shTGF- β 2R 8 (2)

Identidad del clon: NM_009371.2-1197s21c1 (TRCN0000294600)

Secuencia: CCGGGAAGGACATCTTCTCCGATATCTCGAGATATCGGAGAAGATGTCCTTCTTTTTG

Nivel de silenciamiento: 0.99 en Línea Celular: Hepa 1-6

shIGF-1R (1)

Identidad del clon: NM_010513.1-3300s1c1 (TRCN0000023490)

Secuencia: CCGGGCAGAATAATCTAGTCCTCATCTCGAGATGAGGACTAGATTATTCTGCTTTTT

Nivel de silenciamiento: 0.59 en Línea Celular: 3T3-L1

shIGF-1R (2)

Identidad del clon: NM_010513.1-3656s1c1 (TRCN0000023493)

Secuencia: CCGGCCAACGAGCAAGTTCTTCGTTCTCGAGAACGAAGAACTTGCTCGTTGGTTTTT

17.12 Obtención de construcciones para expresión y recuperación de Fenotipo

La construcción que codifica para la versión del receptor de IGF-1 resistente al silenciamiento (IGF-1R OPT) fue realizada por la empresa GeneScrip. Mientras que los plásmidos que codifican las proteínas fluorescente verde (CAG-GFP) y la proteína fluorescente roja (DsRed) fueron gentilmente por el grupo de investigación de la Dra. Marta Nieto. Al igual que la proteína P110CAAX.

17.13 Purificación de GCPs

Las partículas de conos de crecimiento aislados o GCPs (del inglés *Growth Cone Particles*) fueron obtenidos a partir del homogenato de cerebros de embriones de rata de 18 de vida intrauterina, en una solución de sucrosa 0,32 M, $MgCl_2$ 3mM y Hepes 1mM conteniendo inhibidores de proteasas y de fosfatasas (Aprotinina 2 g/ml, Leupeptina 2 g/ml, Pepstatina 1 g/ml, PMSF 100 g/ml y Ortovanadato 2 g/ml). El homogenato se centrifugó a baja velocidad (15 minutos a 3500 rpm. en rotor SA-600) y el sobrenadante LSS (del inglés *Low Speed Supernatant*) fue sometido a una ultra centrifugación isopícnica en un gradiente discontinuo de sucrosa con densidades de 0,32 M (aportada por el LSS) 0,83 M, 1M, y 2,66 M a una velocidad de 50.000 rpm. durante 40 minutos con el rotor vertical VTi50 (Beckman). Se tomó la fracción ubicada en la interface LSS-0,83 M (fracción que contiene un enriquecimiento en partículas de conos de crecimiento aislados o GCPs, designada fracción "A"). Los restantes elementos del LSS fueron separados en dos fracciones ubicadas en las interfaces 0,83-1 M ("B") y 1 M-2,66 M ("C").

Si se centrifuga la fracción "A" a 16.000 rpm por 1h, (en rotor TYPE60, Beckman) a 4°C, utilizando además, un colchón de sucrosa 2,66 M. Se obtiene una interface altamente enriquecida en conos de crecimiento aislados, que pueden ser o no, diluidos en buffer isotónico y ser utilizados en las determinaciones pertinentes.

17.14 Electroforesis y Western Blot

Para realizar electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS se utilizó el sistema descrito por Laemli (1970). La composición del gel separador fue de 10% al 15% de poliacrilamida según el peso molecular de la proteína a resolver. Para un gel al 10% la

composición fue: poliacrilamida 10% (p/v), bis-acrilamida (N,N-metilen-bis-acrilamida) 0,27% (p/v), TEMED (N,N,N,N,tetra-metilendiamina) 0,025% (v/v), persulfato de amonio 0,09% (p/v), Tris-HCl 0,375 M pH: 8,8, y SDS 0,1% (p/v).

La composición del gel concentrador fue: poli-acrilamida 3% (p/v), bis-acrilamida (N,N-metilen-bis-acrilamida) 0,08% (p/v), TEMED (N,N,N,N,tetra-metilendiamina) 0,1% (v/v), persulfato de amonio 0,15% (p/v), Tris-HCl 0,125 M pH:6,8, y SDS 0,1% (p/v). A las muestras analizadas se les adicionó inhibidores de proteasas y de fosfatasa (aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, PMSF 100 µg/ml y ortovanadato 2 µg/ml). Cuando las muestras procedían del raspado, con buffer RIPA, de células crecidas en cultivo estas se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm, en centrifuga refrigerada. Se tomó la fracción ubicada en el sobrenadante y se le agregó buffer de muestra "Sample Buffer" (glicerol 3% (v/v), 2-mercaptoetanol 1,6% (v/v), SDS 1% (p/v), Tris-HCl 0,0625 M pH: 6,8). Luego las muestras se calentaron a 100°C durante 3 minutos. El buffer de la corrida electroforética consistió en Tris 0,0025 M – Glicina 0,2 M pH: 8,3, conteniendo SDS 0,1% (p/v). La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente, a 8V/cm hasta que las proteínas se concentraron en el gel separador y luego el voltaje se incrementó a 12V/cm hasta que el frente de la corrida llegó al final del gel. Para la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (p-polyvinilidene difluoride) se utilizó el método húmedo, manteniéndose constante una intensidad de corriente de 270 mA, durante 1:30 horas en buffer Tris-Glicina (Tris 0,0025 M, Glicina 0,2 M pH: 8,3, con 0,1% (p/v) de SDS) conteniendo 20% de metanol. Las membranas se colorearon con Ponceau S 0,2%(p/v) en ácido acético al 1% (v/v) y luego lavadas con ácido acético al 1% (v/v) para corroborar si la corrida y la transferencia se realizaron correctamente. Luego de lavar el Ponceau con agua, las membranas fueron bloqueadas durante una hora en TTBS (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, 0,05% (v/v) de Tween 20) conteniendo 5% de leche descremada, albúmina sérica bovina (BSA) o albúmina sérica humana (HSA), según la calidad y procedencia del anticuerpo a utilizar. Los blots se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en PBS conteniendo Tween 20 al 0,05% durante 3 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C en cámara fría. Luego de ser lavados en agitación durante 10 minutos con PBS conteniendo Tween al 0,05%, fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. Tras los 3 lavados del anticuerpo secundario con PBS conteniendo Tween 20 al 0,05% los blots fueron revelados usando un equipo de detección para quimioluminiscencia (ECL, Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL).

17.15 Cuantificaciones

Las cuantificaciones para determinar el perfil de migración en cortes coronales se realizó con el programa Image J.

18. ABREVIATURAS

E: día embrionario o gestacional

FGR: Fibra de Glia radial

GR: Glia Radial

IGF-1: Factor de Crecimiento Similar a Insulina Tipo 1 (del inglés "Insulin like Growth Factor type 1")

IGF-1R: Receptor del factor de Crecimiento Similar a Insulina tipo 1

IUE: electroporación in utero (del Inglés, "*In Utero Electroporation*")

PA: proceso de arrastre.

PI: Progenitor intermedio.

PC: placa cortical

PG: proceso guía.

TGF- β 2: Factor de crecimiento transformante beta 2 (del inglés "Transforming Growth Factor Beta 2")

TGF- β 2R: Receptor del Factor de crecimiento transformante beta 2

ZM: zona marginal.

ZI: zona intermedia.

ZSV: zona sub-ventricular.

ZV: zona ventricular.

19. BIBLIOGRAFÍA

- Arimura, N., and K. Kaibuchi. 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 8:194-205.
- Ayala, R., T. Shu, and L.H. Tsai. 2007. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell.* 128:29-43.
- Bai, J., R.L. Ramos, J.B. Ackman, A.M. Thomas, R.V. Lee, and J.J. LoTurco. 2003. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci.* 6:1277-1283.
- Banker, G., and K. Goslin. 1988. Developments in neuronal cell culture. *Nature.* 336:185-186.
- Barnes, A.P., and F. Polleux. 2009. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci.* 32:347-381.
- Bartlett, W.P., and G.A. Banker. 1984. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J Neurosci.* 4:1954-1965.
- Bayer, S.A., J. Altman, R.J. Russo, X.F. Dai, and J.A. Simmons. 1991. Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J Comp Neurol.* 307:499-516.
- Bellion, A., J.P. Baudoin, C. Alvarez, M. Bornens, and C. Metin. 2005. Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci.* 25:5691-5699.
- Brownhill, K., L. Wood, and V. Allan. 2009. Molecular motors and the Golgi complex: staying put and moving through. *Semin Cell Dev Biol.* 20:784-792.
- Caraci, F., G. Battaglia, C. Busceti, F. Biagioni, F. Mastroiacovo, P. Bosco, F. Drago, F. Nicoletti,

M.A. Sortino, and A. Copani. 2008. TGF-beta 1 protects against Abeta-neurotoxicity via the phosphatidylinositol-3-kinase pathway. *Neurobiol Dis.* 30:234-242.

Cole, N.B., N. Sciaky, A. Marotta, J. Song, and J. Lippincott-Schwartz. 1996. Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell.* 7:631-650.

Craig, A.M., and G. Banker. 1994. Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci.* 17:267-310.

Dotti, C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 8:1454-1468.

Fukuchi-Shimogori, T., and E.A. Grove. 2001. Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science.* 294:1071-1074.

Geraldo, S., and P.R. Gordon-Weeks. 2009. Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J Cell Sci.* 122:3595-3604.

Goslin, K., D.J. Schreyer, J.H. Skene, and G. Banker. 1988. Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature.* 336:672-674.

Greig, L.C., M.B. Woodworth, M.J. Galazo, H. Padmanabhan, and J.D. Macklis. 2013. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci.* 14:755-769.

Gupta, A., L.H. Tsai, and A. Wynshaw-Boris. 2002. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet.* 3:342-355.

Hansen, D.V., J.H. Lui, P.R. Parker, and A.R. Kriegstein. 2010. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature.* 464:554-561.

- Heger, J., S.C. Peters, H.M. Piper, and G. Euler. 2009. SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes. *J Cell Physiol.* 220:515-523.
- Ikeuchi, Y., J. Stegmuller, S. Netherton, M.A. Huynh, M. Masu, D. Frank, S. Bonni, and A. Bonni. 2009. A SnoN-Ccd1 pathway promotes axonal morphogenesis in the mammalian brain. *J Neurosci.* 29:4312-4321.
- Jareb, M., and G. Banker. 1997. Inhibition of axonal growth by brefeldin A in hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 17:8955-8963.
- Joseph D'Ercole, A., and P. Ye. 2008. Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development. *Endocrinology.* 149:5958-5962.
- Kappeler, L., C.D.M. Filho, J. Dupont, P. Leneuve, P. Cervera, L. Périn, C. Loudes, A. Blaise, R. Klein, J. Epelbaum, Y.L. Bouc, and M. Holzenberger. 2008. Brain IGF-1 Receptors Control Mammalian Growth and Lifespan through a Neuroendocrine Mechanism. *PLoS Biol.* 6:e254.
- Konishi, Y., J. Stegmuller, T. Matsuda, S. Bonni, and A. Bonni. 2004. Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain. *Science.* 303:1026-1030.
- Kornack, D.R., and P. Rakic. 1995. Radial and horizontal deployment of clonally related cells in the primate neocortex: relationship to distinct mitotic lineages. *Neuron.* 15:311-321.
- Kosik, K.S., and A. Caceres. 1991. Tau protein and the establishment of an axonal morphology. *J Cell Sci Suppl.* 15:69-74.
- Kriegelstein, K., J. Strelau, A. Schober, A. Sullivan, and K. Unsicker. 2002. TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol Paris.* 96:25-30.

- Kriegstein, A.R., and S.C. Noctor. 2004. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27:392-399.
- Lasorella, A., J. Stegmuller, D. Guardavaccaro, G. Liu, M.S. Carro, G. Rothschild, L. de la Torre-Ubieta, M. Pagano, A. Bonni, and A. Iavarone. 2006. Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature.* 442:471-474.
- Laurino, L., X.X. Wang, B.A. de la Houssaye, L. Sosa, S. Dupraz, A. Caceres, K.H. Pfenninger, and S. Quiroga. 2005. PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J Cell Sci.* 118:3653-3662.
- Lehtinen, M.K., M.W. Zappaterra, X. Chen, Y.J. Yang, A.D. Hill, M. Lun, T. Maynard, D. Gonzalez, S. Kim, P. Ye, A.J. D'Ercole, E.T. Wong, A.S. LaMantia, and C.A. Walsh. 2011. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron.* 69:893-905.
- Liu, J.P., J. Baker, A.S. Perkins, E.J. Robertson, and A. Efstratiadis. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 75:59-72.
- Lyons, R.M., and H.L. Moses. 1990. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem.* 187:467-473.
- Marchetti, G., S. Escuin, A. van der Flier, A. De Arcangelis, R.O. Hynes, and E. Georges-Labouesse. 2010. Integrin alpha5beta1 is necessary for regulation of radial migration of cortical neurons during mouse brain development. *Eur J Neurosci.* 31:399-409.
- Massague, J. 2012. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:616-630.

- Massagué, J., and Y.-G. Chen. 2000. Controlling TGF- β signaling. *Genes & Development*. 14:627-644.
- Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 19:2783-2810.
- Mecha, M., M.A. Rabadan, A. Pena-Melian, M. Valencia, T. Mondejar, and M.J. Blanco. 2008. Expression of TGF-betas in the embryonic nervous system: analysis of interbalance between isoforms. *Dev Dyn*. 237:1709-1717.
- Menager, C., N. Arimura, Y. Fukata, and K. Kaibuchi. 2004. PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *Journal of neurochemistry*. 89:109-118.
- Miller, P.M., A.W. Folkmann, A.R. Maia, N. Efimova, A. Efimov, and I. Kaverina. 2009. Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol*. 11:1069-1080.
- Miyata, T., A. Kawaguchi, H. Okano, and M. Ogawa. 2001. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron*. 31:727-741.
- Molyneaux, B.J., P. Arlotta, J.R. Menezes, and J.D. Macklis. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 8:427-437.
- Moustakas, A., and C.H. Heldin. 2005. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci*. 118:3573-3584.
- Namba, T., Y. Funahashi, S. Nakamuta, C. Xu, T. Takano, and K. Kaibuchi. 2015. Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity. *Physiol Rev*. 95:995-1024.
- Nieto-Estevez, V., C.O. Oueslati-Morales, L. Li, J. Pickel, A.V. Morales, and C. Vicario-Abejon. 2016. Brain Insulin-Like Growth Factor-I Directs the Transition from Stem Cells to Mature Neurons During Postnatal/Adult Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells*. 34:2194-2209.

- Nieto, M., E.S. Monuki, H. Tang, J. Imitola, N. Haubst, S.J. Khoury, J. Cunningham, M. Gotz, and C.A. Walsh. 2004. Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 479:168-180.
- Noctor, S.C., V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic, and A.R. Kriegstein. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7:136-144.
- Paridaen, J.T., and W.B. Huttner. 2014. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* 15:351-364.
- Pelvig, D.P., H. Pakkenberg, A.K. Stark, and B. Pakkenberg. 2008. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging.* 29:1754-1762.
- Pollen, A.A., T.J. Nowakowski, J. Shuga, X. Wang, A.A. Leyrat, J.H. Lui, N. Li, L. Szpankowski, B. Fowler, P. Chen, N. Ramalingam, G. Sun, M. Thu, M. Norris, R. Lebofsky, D. Toppani, D.W. Kemp, 2nd, M. Wong, B. Clerkson, B.N. Jones, S. Wu, L. Knutsson, B. Alvarado, J. Wang, L.S. Weaver, A.P. May, R.C. Jones, M.A. Unger, A.R. Kriegstein, and J.A. West. 2014. Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nat Biotechnol.* 32:1053-1058.
- Popken, G.J., R.D. Hodge, P. Ye, J. Zhang, W. Ng, J.R. O'Kusky, and A.J. D'Ercole. 2004. In vivo effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on prenatal and early postnatal development of the central nervous system. *Eur J Neurosci.* 19:2056-2068.
- Rakic, P. 1971. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.* 33:471-476.

- Saito, T. 2006. In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system. *Nat. Protocols*. 1:1552-1558.
- Saito, T., and N. Nakatsuji. 2001. Efficient Gene Transfer into the Embryonic Mouse Brain Using in Vivo Electroporation. *Developmental Biology*. 240:237-246.
- Santibanez, J.F., M. Quintanilla, and C. Bernabeu. 2011. TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 121:233-251.
- Schmierer, B., and C.S. Hill. 2007. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:970-982.
- Segal, M. 1983. Rat hippocampal neurons in culture: responses to electrical and chemical stimuli. *J Neurophysiol*. 50:1249-1264.
- Shi, S.H., L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2003. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell*. 112:63-75.
- Sosa, L., S. Dupraz, L. Laurino, F. Bollati, M. Bisbal, A. Caceres, K.H. Pfenninger, and S. Quiroga. 2006. IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat Neurosci*. 9:993-995.
- Sporn, M.B. 2006. The early history of TGF-beta, and a brief glimpse of its future. *Cytokine Growth Factor Rev*. 17:3-7.
- Stegmuller, J., M.A. Huynh, Z. Yuan, Y. Konishi, and A. Bonni. 2008. TGFbeta-Smad2 signaling regulates the Cdh1-APC/SnoN pathway of axonal morphogenesis. *J Neurosci*. 28:1961-1969.
- Tabata, H., and K. Nakajima. 2001. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal

migration in the developing cortex. *Neuroscience*. 103:865-872.

Tesseur, I., and T. Wyss-Coray. 2006. A role for TGF-beta signaling in neurodegeneration: evidence from genetically engineered models. *Curr Alzheimer Res*. 3:505-513.

Tomoda, T., T. Shirasawa, Y.-i. Yahagi, K. Ishii, H. Takagi, Y. Furiya, K.-i. Arai, H. Mori, and M.-a. Muramatsu. 1996. Transforming Growth Factor-[beta] Is a Survival Factor for Neonate Cortical Neurons: Coincident Expression of Type I Receptors in Developing Cerebral Cortices. *Developmental Biology*. 179:79-90.

Umeshima, H., T. Hirano, and M. Kengaku. 2007. Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:16182-16187.

Valderrama, F., T. Babia, I. Ayala, J.W. Kok, J. Renau-Piqueras, and G. Egea. 1998. Actin microfilaments are essential for the cytological positioning and morphology of the Golgi complex. *Eur J Cell Biol*. 76:9-17.

Vallee, R.B., G.E. Seale, and J.W. Tsai. 2009. Emerging roles for myosin II and cytoplasmic dynein in migrating neurons and growth cones. *Trends Cell Biol*. 19:347-355.

Vicario-Abejón, C., C. Fernández-Moreno, J.G. Pichel, and F. de Pablo. 2004. Mice lacking IGF-I and LIF have motoneuron deficits in brain stem nuclei. *NeuroReport*. 15:2769-2772.

Xu, C., Y. Funahashi, T. Watanabe, T. Takano, S. Nakamuta, T. Namba, and K. Kaibuchi. 2015. Radial Glial Cell-Neuron Interaction Directs Axon Formation at the Opposite Side of the Neuron from the Contact Site. *J Neurosci*. 35:14517-14532.

- Yi, J.J., A.P. Barnes, R. Hand, F. Polleux, and M.D. Ehlers. 2010. TGF-beta signaling specifies axons during brain development. *Cell*. 142:144-157.
- Zi, Z., D.A. Chapnick, and X. Liu. 2012. Dynamics of TGF-beta/Smad signaling. *FEBS Lett*. 586:1921-1928.