



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología  
Area de Biología Celular, Facultad de Ciencias  
Universidad de Málaga

**Desarrollo del epéndimo y subepéndimo en modelos  
animales en condiciones normales y en la hidrocefalia  
congénita**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

**Luis Manuel Rodríguez-Pérez**

Directores:

Dr. Antonio J. Jiménez Lara

Dr. Pedro Fernández Llebrez y Del Rey

Málaga 2016



Publicaciones y  
Divulgación Científica

AUTOR: Luis Manuel Rodríguez Pérez

 <http://orcid.org/0000-0003-2820-2176>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



**Dr. D. Antonio Jesús Jiménez Lara**, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

**Dr. D. Pedro Fernández Llebrez y del Rey**, Catedrático del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

INFORMAN:

Que el Licenciado D. Luis Manuel Rodríguez Pérez ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, Titulada “**Desarrollo del epéndimo y subepéndimo en modelos animales en condiciones normales y en la hidrocefalias congénita**”

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente documento en Málaga a 9 de noviembre de 2015.

Fdo.: Antonio J. Jiménez Lara

Fdo.: Pedro Fernández Llebrez y del Rey





**Dr. D. José Becerra Ratia, Catedrático de Biología Celular y Director del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga**

INFORMA:

Que el Licenciado D. Luis Manuel Rodríguez Pérez ha realizado el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, en los laboratorios del Área de Biología Celular del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Málaga a 12 de noviembre de 2015.

**Fdo.: José Becerra Ratia**



## Agradecimientos





Después de mucho tiempo parece que se termina esta etapa. Terminó la Tesis Doctoral. Machado decía que " Se hace camino al andar". Tenía toda la razón. Y precisamente, la Tesis Doctoral no es este mamotreto final que presento sino el camino que he recorrido durante todos estos años.

Obviamente, como ser social involucrado en una actividad tan social como la investigación, no he recorrido este camino solo sino que hubo más gente a mi alrededor. Y estoy completamente seguro que el resultado final de la Tesis no hubiera sido el mismo sin ellos.

No puedo dejar de acordarme del día que di el primer paso. Ese día en el que mis directores de Tesis me acogieron. Sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Me han ayudado en todo lo que he necesitado y han tenido una paciencia conmigo que ni yo mismo he tenido conmigo. Antonio J. Jiménez, Pedro Fernández-Llebregat y José Manuel Fernández-Figares gracias. De verdad. Me disteis la primera oportunidad y espero haberla aprovechado.

A mi alrededor, las personas más cercanas siempre fueron mis compañeros del grupo de investigación. Recuerdo a Patricia, mi amiga y maestra. Ruth, la que me dió el primer empujón, amiga y compañera. Mercedes, Elena, María, Loly, Diana...y más personas con las que compartí el camino de forma más o menos fugaz.

Recuerdo mis compañeros en la sala de becarios a mi alrededor. Todas esas personas que me "molestaban" todos los días con un "Buenos días". Y que encima querían que les respondiera! Vaya desfachatez! Laura, Eli, Raquel, David, Inés, Belén, Silvia y tantos otros...Gracias por compartir vuestro tiempo conmigo.

Vanessa a ti no te meto como compañera. Para mí nunca fuiste de un grupo, lo sabes. Mi compañera de tantas improvisaciones. Y con Julia, la peque, formábamos un grupito envidiable. Cuántos momentos inolvidables pasados juntos. Y cuántos más pasaremos.

Tampoco podría haber podido soñar el haber aterrizado en un mejor sitio que el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Tanto en "celular" como en "fisiología" me he sentido casi como en casa. Y menos mal, porque diría que durante mucho tiempo he pasado más tiempo ahí que en mi casa. Alicia, mi amiga profe, José Becerra, Pepi, Marga, Jesús, Manolo, Antonia, Juan y muchos más. Profesores y catedráticos, pero al mismo tiempo compañeros de departamento que contribuyen a hacer de éste un lugar mucho más agradable. Muchas gracias.

Sé que me dejo personas atrás pero sólo es de nombre. Ya sabéis que mi fuerte nunca fueron los nombres. En cualquier caso vuestra presencia siempre estará ahí.

Finalmente, agradezco a familia. Por apoyarme durante todo este tiempo. Y aunque perdieran la paciencia a veces, al final se ha llegado al destino final.

En fin, nunca se me dió bien agradecer en voz alta. Y ha llegado el momento de pulsar ctrl + P. Toca comenzar a andar de nuevo.

"No todo lo que es oro reluce,  
ni toda la gente errante anda perdida;  
a las raíces profundas no llega la escarcha,  
el viejo vigoroso no se marchita."



# Índice

INTRODUCCIÓN.....	15
1.Organización y regionalización del sistema nervioso central.....	17
1.1.El sistema ventricular y su epitelio. Células neuroepiteliales, glía radial y epéndimo.....	21
1.1.1 El sistema ventricular.....	21
1.1.2 El epitelio ventricular.....	22
1.1.3 Determinación de los progenitores neurales e histogénesis de la corteza.....	28
1.1.4 Determinación celular según la región y el momento del desarrollo.....	32
2.Formación del cuerpo calloso y su agenesia.....	34
2.1.Origen y desarrollo del cuerpo calloso.....	35
2.2. Regulación del desarrollo del cuerpo calloso.....	36
2.3.Los axones pioneros y su función en la guía de los axones callosales.....	37
2.4.Poblaciones celulares de la línea media implicadas en la formación del cuerpo calloso.....	38
3.Los ratones hyh mutantes como modelo para el estudio de la hidrocefalia congénita y defectos en la zona ventricular.....	42
3.1.Papel de la mutación de $\alpha$ -SNAP en los ratones hyh.....	42
3.2.Denudamiento de la zona ventricular.....	45
3.3.Reacciones astrocitarias en la hidrocefalia.....	47
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	49
OBJETIVOS.....	53
MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
1.Animales de experimentación.....	59
1.1.Cruces y datación de los embriones.....	60
2.Procesamiento de muestras para microscopía óptica.....	61
2.1.Obtención de las muestras.....	61
2.2. Fijación de las muestras.....	62
2.2.1 Soluciones fijadoras.....	62
2.2.2 Procedimiento de fijación.....	63
2.2.3 Inclusión y/o encastramiento y corte de las muestras.....	64
2.2.3.1 Inclusión en parafina y corte en el microtomo de parafina.....	64
2.2.3.2 Encastrado en agarosa y corte en el vibratomo.....	65
3.Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de barrido.....	66
4.Técnicas histoquímicas:.....	67
4.1.Hematoxilina-eosina.....	67
4.2.Histoquímica de lectina de tomate.....	68
5.Técnicas inmunohistoquímicas.....	69
5.1 Antígenos estudiados y anticuerpos utilizados.....	69
5.1.1 Técnicas inmunohistoquímicas en tejido.....	73
5.1.1.1 Protocolo general de inmunohistoquímica para muestras en portaobjeto.....	73
5.1.1.2 Protocolo general de inmunohistoquímica para tejido cortado en vibratomo.....	74
5.1.1.3 Listado de anticuerpos con las concentraciones usadas en inmunohistoquímica.....	75
5.1.1.4 Protocolo general para inmunofluorescencia.....	77

5.1.1.5 Método del segundo anticuerpo biotinilado.....	78
5.2.Método del anticuerpo secundario marcado.....	78
5.2.1.1 Particularidades para la inmunodetección de los distintos antígenos.....	78
5.2.1.2 Diluyentes de anticuerpos usados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	79
6.Marcaje anterógrado de axones del cuerpo caloso.....	80
7.Cultivos organotípicos.....	80
8.Retrotranscripción y PCR a tiempo real.....	82
9.Hibridación <i>in situ</i> .....	85
10.Citometría de flujo.....	86
11.Análisis de datos.....	87
12.Gestión de residuos.....	87
RESULTADOS.....	99
1.Desarrollo del epéndimo.....	101
1.1.Tipos de superficies ventriculares presentes en el encéfalo de ratón	101
1.2.Relación de los tipos de superficie con el desarrollo del neuroepitelio	103
1.3.Superficies ventriculares presentes en E12,5.....	105
1.4.Superficies ventriculares presentes en E16,5.....	107
1.5.Superficies ventriculares presentes en P1.....	109
1.6.Superficies ventriculares presentes en P3.....	111
1.7.Superficies ventriculares presentes en P5.....	116
1.8.Superficies ventriculares presentes en P9.....	117
1.9.Superficies ventriculares presentes en P14.....	119
1.10.Superficies ventriculares presentes en P30.....	125
2.Agenesia del cuerpo caloso.....	129
2.1.Estado de las comisuras telencefálicas dorsales de los ratones silvestres y mutantes <i>hyh</i> .....	129
2.2.Neuronas de proyección callosales y sus axones en la formación del cuerpo caloso.....	130
2.3.Señales producidas en la corteza e implicadas en la formación del cuerpo caloso.....	131
2.4.Estado de las poblaciones celulares de la línea media implicadas en el cruce del cuerpo caloso.....	137
2.4.1 Células gliales en el <i>indusium griseum</i> .....	137
2.4.2 Células de la <i>subcallosal sling</i> .....	140
2.4.3 Células de la <i>glial wedge</i> .....	140
2.5.Formación y elongación de los axones pioneros en los ratones <i>hyh</i> . 145	
2.5.1 Relación entre la <i>glial wedge</i> y la glía del <i>indusium griseum</i> en la elongación de los axones pioneros.....	146
3.Características diferenciales de las superficies ventriculares en ratones normales y <i>hyh</i> .....	148
3.1.Marcaje diferencial del epéndimo multiciliado y los astrocitos reactivos periventriculares.....	149
3.2.Densidad astrocitos reactivos en las superficies periventriculares que cubren áreas carentes de epéndimo en ratones <i>hyh</i> .....	149
3.3.Expresión de acuaporina 4 en el epéndimo multiciliado y en los astrocitos reactivos.....	150
3.4.Endosomas tempranos en el epéndimo multiciliado y en los astrocitos	

reactivos periventriculares.....	151
4.Papel de la reacción astrogliol en la etiología de la hidrocefalia congénita en los ratones <i>hyh</i> .....	158
4.1.Cambios morfológicos progresivos en los encéfalos de los ratones <i>hyh</i> hidrocefálicos.....	158
4.2.Niveles de expresión de GFAP en ratones <i>hyh</i> respecto a los normales y con hidrocefalia compensada.....	159
4.3.Niveles de expresión de TGF $\beta$ 1 en ratones <i>hyh</i> respecto a los normales y con hidrocefalia compensada.....	160
4.4.Niveles de expresión de TNF $\alpha$ en ratones <i>hyh</i> respecto a los normales y con hidrocefalia compensada.....	160
4.5.Expresión de TNF $\alpha$ en los astrocitos reactivos de los ratones <i>hyh</i> con hidrocefalia.....	161
4.6.Niveles de expresión del receptor TNF $\alpha$ R1 en ratones <i>hyh</i> respecto a los normales y con hidrocefalia compensada.....	162
4.7.Expresión del receptor TNF $\alpha$ R1 en los astrocitos reactivos en los ratones <i>hyh</i> .....	162
4.8.La microglía en la corteza cerebral de los ratones <i>hyh</i> .....	163
DISCUSIÓN.....	175
1.Desarrollo de las superficies ventriculares en el ratón normal.....	177
2.Un defecto en el desarrollo de la <i>glial wedge</i> se asocia con la agenesia del cuerpo calloso en los ratones <i>hyh</i> con hidrocefalia congénita.....	179
3.Papel de la reacción astrocitaria que reemplaza al epéndimo ausente.....	183
3.1.Los astrocitos reactivos periventriculares forman una nueva capa de células con una organización celular que se asemeja a la del epéndimo	184
3.2.El epéndimo y la capa astrogliol presentan mecanismos activos de endocitosis.....	185
3.3.Papel de la expresión del canal transportador de agua acuaporina 4 en el epéndimo y los astrocitos periventriculares.....	186
3.4.Existen diferentes grados de densidad celular y la estanqueidad en las reacciones astrocitarias periventriculares.....	187
4.Un incremento en los niveles de TNF $\alpha$ pero no de TGF $\beta$ se asocian con la severidad de la hidrocefalia en los ratones <i>hyh</i> hidrocefálicos.....	188
CONCLUSIONES.....	195
SUMMARY.....	203
BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES.....	227
PUBLICACIONES RELACIONADAS.....	259

# INTRODUCCIÓN



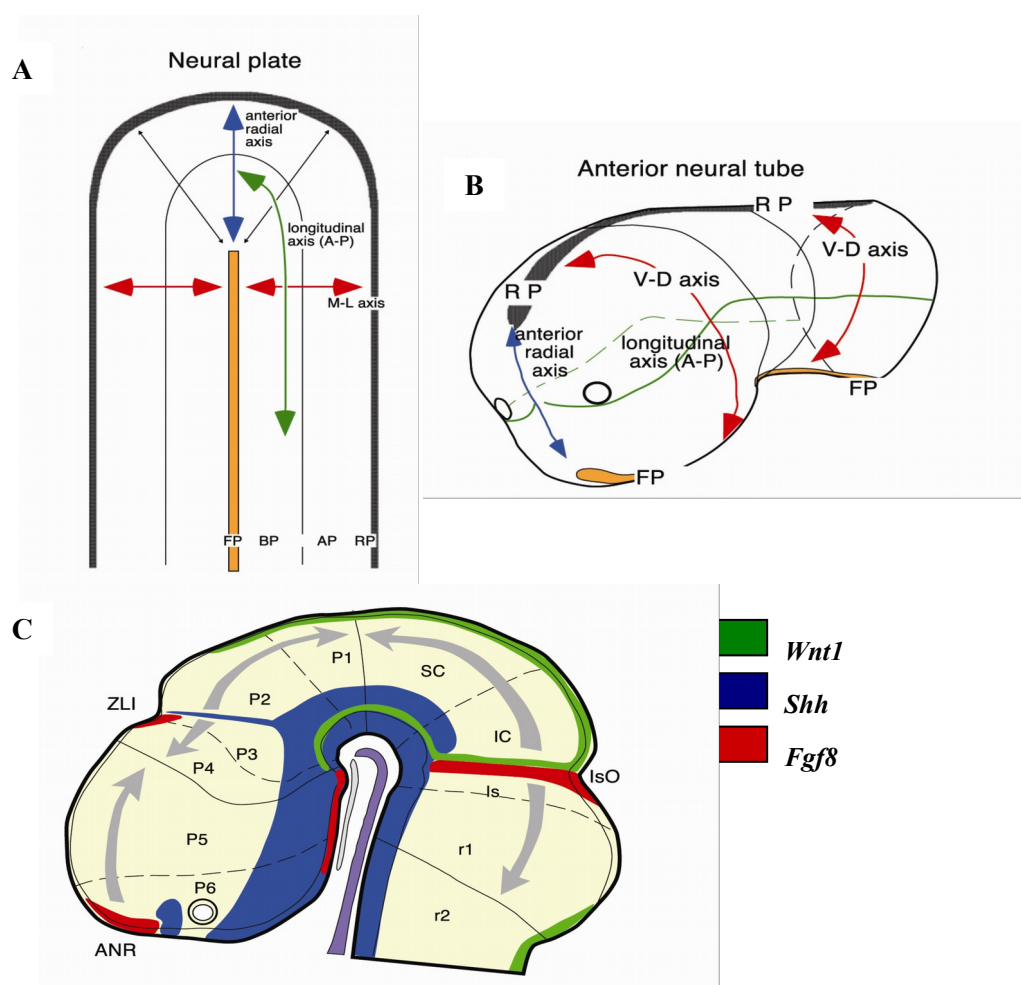


## 1. Organización y regionalización del sistema nervioso central

La organización del sistema nervioso central (SNC) es el resultado de la acción conjunta de diferentes morfógenos que comienzan a actuar desde el estadio de gástrula (Echevarría et al. 2003). En esta etapa, el embrión está regionalizado en tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. En el ectodermo, la placa neural es inducida por la interacción de señales horizontales y verticales que emanan desde el nodo y del ectodermo perineural, así como desde el endodermo ventral y el mesodermo axial (Beddington and Robertson 1999; Stern 2001). Estas estructuras actúan como organizadores primarios y regulan el establecimiento de la polaridad antero-posterior y medio-lateral durante la gastrulación. Tras la inducción neural, durante el proceso de neurulación, los extremos de la placa neural se engrosan y giran hacia arriba para formar las crestas neurales. Éstas progresan a través de la línea media dorsal, se forma el surco dorsal y finalmente el tubo neural. Quedando así establecida la polaridad ventro-dorsal. Esta está determinada por la interacción de los factores ventralizadores tales como Sonic hedgehog (Shh), producido en la notocorda y en la línea media ventral del neuroectodermo (placa del suelo), y señales dorsalizadoras como los miembros de la familia de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) (Roelink et al. 1993; Roelink et al. 1995; Echevarría et al. 2003). En este momento, el tubo neural está dividido simétricamente en cuatro tipos de dominios longitudinales que presentan diferentes patrones de expresión génica y distintas propiedades morfológicas: placa del suelo, placa basal, placa alar y placa del techo, nombrados en orden ventro-dorsal (Figs. 1A, B) (Rubenstein et al. 1994; Shimamura et al. 1995; Shimamura and Rubenstein 1997; Echevarría et al. 2003).

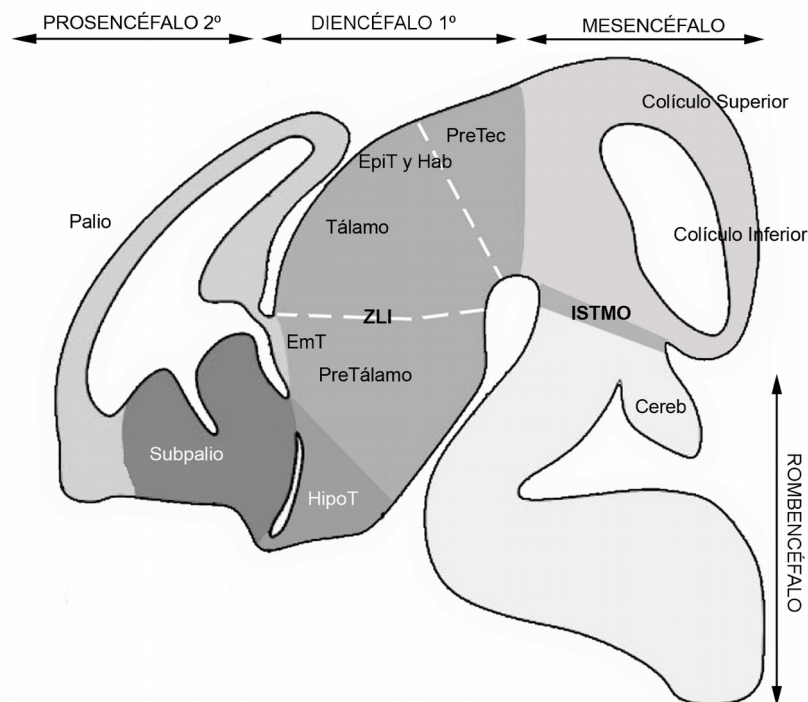
Finalmente, a lo largo del eje antero-posterior, aparecen regiones específicas del neuroepitelio conocidas como organizadores secundarios (Rubenstein et al. 1994; Echevarría et al. 2003). Éstos son: el borde neural anterior, localizado en la parte anterior de la placa neural; la zona limitante intratálámica, situada en la mitad del diencefalo; y el organizador ístmico, localizado en la transición entre

mesencéfalo y rombencéfalo (Figs. 1C, 2) (Puelles and Rubenstein 2003; Echevarría et al. 2003). Los organizadores secundarios redefinen el eje antero-posterior dando lugar a tres dominios principales en el primordio cerebral: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo (Figs. 1C, 2). Adicionalmente, la actividad morfogenética de los organizadores secundarios controla la polaridad y la generación de subregiones dentro de estas regiones principales (Shimamura et al. 1995; Crossley et al. 1996; Martínez 2001; Puelles and Rubenstein 2003).



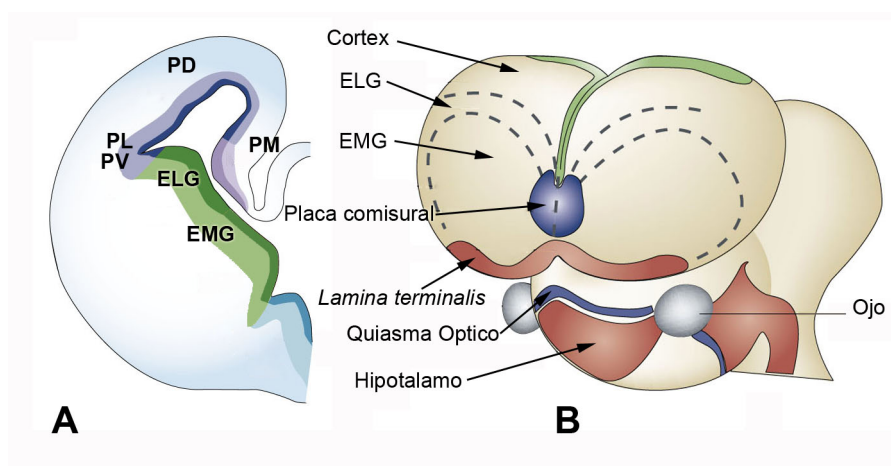
**Figura 1.** Organización del SNC (tomado de Echevarría et al., 2003). **A:** Ilustración de los ejes: longitudinal (A-P) y medio-lateral (M-L) en el estado de placa neural. **B:** Establecimiento de los ejes medio-lateral y ventro-dorsal tras la neurulación. **C:** Representación esquemática de la localización de los organizadores secundarios y la expresión de genes esenciales para la morfogénesis del SNC. **Abreviaturas:** ANR, borde neural anterior; AP, placa alar; BP, placa basal; FP, placa del suelo; IC, colículo inferior; Is, istmo; IsO, organizador ístmico; P1–P6, prosómeros; r1–r2, rombómeros; RP, placa del techo; SC, colículo superior; ZLI, zona limitante intratálámica.

Durante el desarrollo, el prosencéfalo se subdivide en dos subdominios transversales: el diencéfalo primario (prosómeros 1 al 3), localizado caudalmente, y el prosencéfalo secundario (antiguos prosómeros 4 al 6), localizado rostralmente (Fig. 2) (Puelles and Rubenstein 2003). Este último da lugar al telencéfalo y al diencéfalo secundario, incluyendo las vesículas ópticas y el hipotálamo (Fig. 2) (Puelles and Rubenstein 2003; Echevarría et al. 2003). El telencéfalo deriva de las células de la zona marginal rostral de la placa neural, de la región correspondiente a la placa alar (Rubenstein et al. 1998; Whitlock and Westerfield 2000). En todos los vertebrados, el telencéfalo en desarrollo se subdivide en dos regiones: ventral o subpalio y dorsal o palio (Fig. 2 y 3).



**Figura 2.** Regionalización rostro-caudal del *encéfalo*. En el SNC se distinguen tres grandes regiones: el prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. En la región rostral al rombencéfalo se encuentra el organizador ístmico. Rostral a éste se encuentra el mesencéfalo, cuya porción alar (dorsal) se denomina tectum en el que se puede distinguir un colículo superior (rostral) y un colículo inferior (caudal). Rostral al mesencéfalo, el prosencéfalo primario se diferencia en diencéfalo primario y prosencéfalo secundario. A su vez, en el diencéfalo primario se diferencian, en su porción alar, el pretectum (en el prosómero 1 -p1-), el epitálamo y la habénula (p2), el tálamo (p2), la eminencia talámica (p3) y el pretálamo (p3). En el prosencéfalo secundario se distinguen el diencéfalo secundario que incluiría al hipotálamo alar y basal, y el área ectopeduncular. En la zona más rostral, de origen completamente alar, se encuentra el telencéfalo. **Abreviaturas:** Cereb, cerebelo; EmT, eminencia talámica; EpiT, epitálamo; Hab, habénula; HipoT, hipotálamo; p, prosómero; PreTec, pretectum; ZLI, zona limitante intratálamica (Basado y tomado de Puelles and Rubenstein 2003; Echevarría et al. 2003 y Allen Brain Atlas Resources: <http://www.brain-map.org/>).

En mamíferos, el palio genera el córtex cerebral, mientras que el subpalio da lugar al estriado y al globo pálido en los ganglios basales así como a las interneuronas gabaérgicas de la corteza (Wilson and Rubenstein 2000). El palio a su vez se subdivide en palio ventral, lateral, dorsal y palio medial. En el subpalio están presentes las eminencias gangliónicas, medial y la lateral. Esta última se divide en dorsal y ventral (Marín and Rubenstein 2001; Schuurmans and Guillemot 2002) (Fig. 3).



**Figura 3.** Organización del telencéfalo (basado en Marín and Rubenstein, 2001). **A:** Esquema que representa una sección transversal del telencéfalo durante el desarrollo. En él se distinguen la región dorsal o palio (color morado) y la región ventral o subpalio (marcado en color verde). **B:** Esquema representativo de un *encéfalo* durante el desarrollo. **Abreviaturas:** EMG, eminencia medial gangliónica; ELG, eminencia lateral gangliónica; PD, palio dorsal; PM, palio medial; PL, palio lateral; PV, palio ventral.

La organización del SNC se establece en función de gradientes y combinaciones de señales químicas emitidas desde los organizadores primarios y secundarios (Wilson and Rubenstein 2000; Schuurmans and Guillemot 2002). La alteración de estos gradientes ha sido asociada a diferentes malformaciones del SNC así como a diferentes patologías del mismo, entre las que se encuentran algunas asociadas a la hidrocefalia (Fig. 4).

## 1.1. El sistema ventricular y su epitelio. Células neuroepiteliales, glía radial y epéndimo

### 1.1.1 El sistema ventricular

El sistema ventricular de mamíferos consta de una serie de cavidades, denominadas ventrículos, interconectadas por conductos más o menos estrechos. Por estas cavidades y conductos circula el líquido cefalorraquídeo (LCR) en sentido rostro-caudal y sale del sistema ventricular hacia los espacios subaracnoideos donde tiene lugar su reabsorción. El LCR ventricular y el subaracnoideo están en libre comunicación con el fluido intersticial que baña el parénquima neural (Milhorat and Hammock 1971).

ETAPA	EDAD	FASE	FALLO
<b>Inducción dorsal Formación del tubo neural</b>	3-4 semanas	Neurulación, canalización, diferenciación retrogresiva	Anencefalia Cefalocele Malformación de Chiari
<b>Inducción ventral Formación de los segmentos cerebrales y de la cara</b>	5-10 semanas	Estado de tres vesículas y establecimiento de los dos hemisferios	Holoprosencefalia Agenesia del Cuerpo Calloso Síndrome de Dandy Walker Anomalías faciales
<b>Migración e Histogénesis</b>	2-5 meses	Migración hacia el córtex Diferenciación celular	Heterotopías Agiria-pagiria, Poli-microgiria Malformaciones vasculares Teratomas, Facomatosis
<b>Mielinización</b>	5 meses a 3 años	Mielinización de los tractos nerviosos	Retraso en desarrollo Enfermedades desmielinizantes

**Figura 4.** Procesos implicados en el desarrollo del SNC y patologías asociadas a fallos en cada etapa (basado en Wong, 2005).

En la porción más rostral del sistema ventricular de mamíferos están presentes dos ventrículos laterales (VL), dispuestos simétricamente a ambos lados de la línea media, y que comunican con el tercer ventrículo (3V) mediante los agujeros de Monroe. El 3V es una cavidad impar situada por debajo del cuerpo calloso y del fórnix, entre los dos tálamos ópticos, y se comunica con el cuarto ventrículo (4V) a través del acueducto de Silvio o cerebral. El 4V es también una cavidad impar. Tiene forma aplanada de delante a atrás, con un suelo formado por las superficies dorsales de la protuberancia y del bulbo, y un

techo que corresponde al hilio del cerebelo. El IV ventrículo comunica a su vez con los espacios subaracnoideos, comprendidos entre la piamadre y la aracnoides a través de tres pequeñas aberturas, dos agujeros de Luschka y el agujero de Magendie en la línea media. Estos ponen en comunicación al IV ventrículo con un amplio espacio subaracnoideo, denominado cisterna magna. Desde los espacios subaracnoideos, el LCR fluye hacia los senos sagitales donde se drena en la sangre venosa a través de las múltiples vellosidades aracnoideas que allí se encuentran (Davson and Segal 1996). El IV ventrículo también se comunica, en su porción más caudal, con el canal central de la médula espinal. El cual a su vez, en su porción más distal, se dilata y forma lo que se ha denominado como ventrículo terminal o *ampulla cadalis* (Olsson 1958).

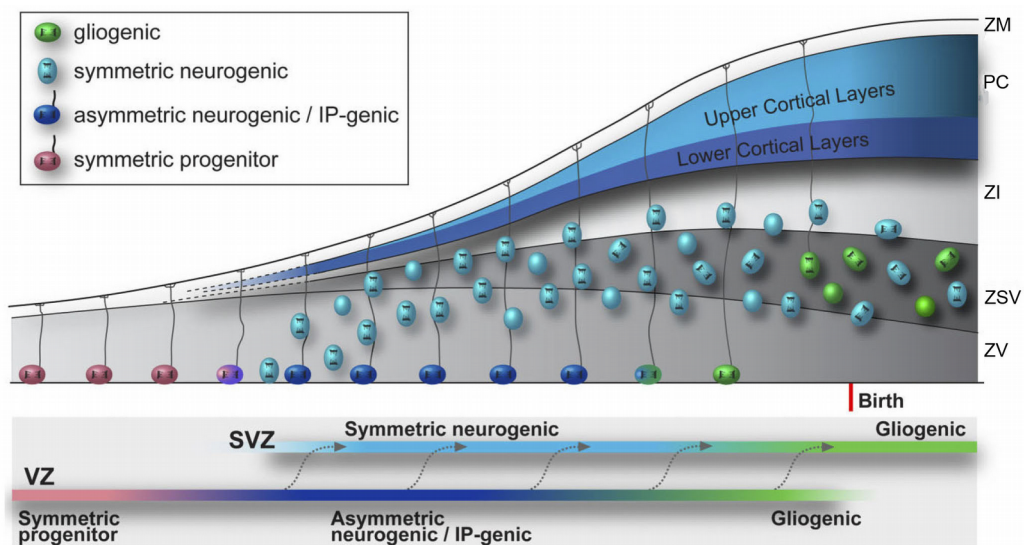
### 1.1.2 El epitelio ventricular

El epitelio ventricular recubre todo el sistema ventricular y está constituido por diferentes tipos celulares que, durante el desarrollo del SNC, van diferenciándose dando lugar unos a otros. Inicialmente, en el tubo neural, el epitelio ventricular es un neuroepitelio germinativo. Posteriormente, el neuroepitelio da lugar a un epitelio constituido por células de la glía radial, que finalmente se transforman en un epéndimo maduro constituido por diferentes tipos celulares (Spassky 2005).

En las primeras fases del desarrollo, el tubo neural está formado por una sola capa de células que constituye el neuroepitelio germinativo. Esta primera capa de células neuroepiteliales se denomina zona ventricular (ZV) y presenta una morfología pseudoestratificada (Hollyday 2001; Sommer and Rao 2002). Las células germinativas neuroepiteliales, por medio de divisiones celulares simétricas originan dos células hijas idénticas que entran nuevamente en el ciclo celular y así sucesivamente hasta crear un número suficiente de células (Fig. 5) (Chenn and McConnell 1995; Noctor et al. 2008).

Una vez que se ha alcanzado un número crítico de células madre neurales, las células neuroepiteliales empiezan a sufrir mitosis asimétricas (Fig. 5) (Chenn

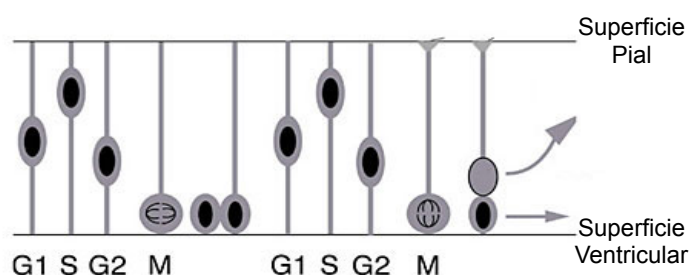
and McConnell 1995; Sommer and Rao 2002; Roegiers and Jan 2004; Noctor et al. 2008). Este tipo de división genera dos células hijas con distinto destino celular: células madre neurales y precursores celulares, que dependiendo del momento del desarrollo serán neuroblastos o glioblastos (Sauvageot and Stiles 2002; Noctor et al. 2008).



**Figura 5.** Esquema que representa la localización y el plano de división de las células progenitoras neuroepiteliales en el telencéfalo dorsal durante el desarrollo cortical en el ratón. Las células de glía radial se dividen con el huso mitótico paralelo a la zona ventricular (VZ) durante el desarrollo cortical. Antes de que comience la neurogénesis la mayoría de las divisiones de las células de glía radial son simétricas, originando dos células iguales, autorrenovadoras (rojo). Al comenzar la neurogénesis las células de glía radial se dividen por divisiones asimétricas, autorrenovadoras (azul oscuro), generando neuronas o progenitores intermedios (IP). Las neuronas hijas de glía radial formarán las capas corticales más bajas (*lower cortical layers*). La mayoría de los IP se dividen simétricamente en la zona subventricular con sus husos mitóticos perpendiculares a la superficie ventricular y producen dos neuronas por cada progenitor, las cuales formarán las capas corticales superiores (*upper cortical layers*). Tras la neurogénesis las células de la glía radial se desplazan de la ZV a la ZSV y producen precursores gliales (verde). **Abreviaturas:** PC, placa cortical; ZI, zona intermedia; ZM, zona marginal; ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular (modificado de Noctor et al. 2008).

Durante estas divisiones, en función de la fase del ciclo celular y sincronizado con éste, el núcleo de estas células cambia de posición en un movimiento denominado migración nuclear intercinética (Yoshikawa 2000; Sommer and Rao 2002; Malatesta et al. 2008; Noctor et al. 2008). Durante la fase M del ciclo celular el núcleo queda generalmente situado en la superficie ventricular y, una vez en interfase, el núcleo se va desplazando basalmente durante la fase G1,

alcanzando su posición más basal durante la fase S. Posteriormente, durante G2, los núcleos migran otra vez hacia la superficie ventricular donde volverán a entrar en fase M (Fig. 6) (Malatesta et al. 2008).



**Figura 6.** Migración nuclear intercinética y ciclo celular. Durante el ciclo celular, el núcleo de las células progenitoras cambia su posición de forma sincrónica con el ciclo celular y sus fases (Basado y tomado de Chenn and McConnell, 1995; y Malatesta et al.,2008).

Las células neuroepiteliales se caracterizan por formar un epitelio pseudoestratificado y mostrar contactos tanto con la superficie ventricular y con la pial. Expresan proteínas como la S100 $\beta$  y vimentina, pero no GFAP. Además, las células están unidas entre sí por uniones estrechas y no presentan cilios apicales (Misson et al. 1988; Malatesta et al. 2008; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

Cuando comienza la neurogénesis, alrededor de E9-E10 en el ratón, las características de las células neuroepiteliales van cambiando de forma progresiva hasta transformarse en células de la glía radial, que terminan tapizando todo el sistema ventricular (Bentivoglio and Mazzarello 1999; Merkle and Alvarez-Buylla 2006; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009)

Según se engrosa la corteza cerebral durante la neurogénesis, la prolongación basal pial de estas células se va alargando radialmente alcanzando la superficie del encéfalo, y desarrollan apicalmente un único cilio corto que está en contacto con el LCR (Fig. 7) (Bentivoglio and Mazzarello 1999; Merkle and Alvarez-Buylla 2006). Al mismo tiempo desaparecen las uniones estrechas de las células neuroepiteliales, apareciendo uniones de tipo desmosoma en banda, a la vez que comienzan a realizar contactos especializados con los vasos sanguíneos en lugar de con la superficie pial, de forma similar a los realizados



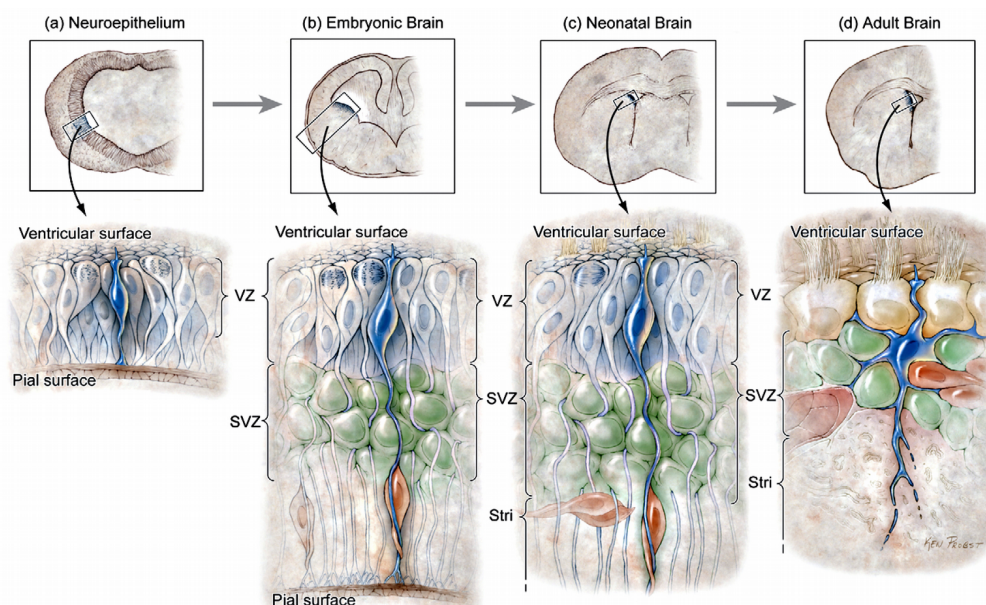
por los pies vasculares de los astrocitos. Éstos cambios morfológicos van acompañados por la adquisición de microtúbulos y filamentos intermedios. De forma gradual, éstas células van cambiando y las células de la glía radial empiezan a expresar moléculas propias de células astrogiales como GLAST, BLBP y tenascina C. Además, expresan gran cantidad de proteínas de filamentos intermedios incluyendo nestina, vimentina, las proteínas reconocidas por los anticuerpos RC1 y RC2 y, en algunas especies GFAP (Hartfuss et al. 2001; Merkle and Alvarez-Buylla 2006; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

Inicialmente, la función principal que se le atribuía a la glía radial era la de actuar como sustrato para la migración de los neuroblastos durante el desarrollo embrionario (Hatten 1999). Sin embargo, hoy en día se ha comprobado que también actúan como verdaderas células madre (Malatesta et al. 2000; Hartfuss et al. 2001; Tramontin et al. 2003; Spassky 2005; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009). Así, las células de la glía radial se dividen produciendo un precursor neuronal o glial y otra célula de glía radial que mantiene su capacidad proliferativa (Hartfuss et al. 2001). Las células gliales radiales tienen capacidad neurogénica y gliogénica mientras dura la histogénesis cortical. Una vez que termina la generación y migración de neuronas, las células de la glía radial solamente son capaces de dar lugar a células gliales (Malatesta et al. 2000).

Cuando la glía radial termina sus ciclos de división, las células retraen su prolongación basal, se hacen multiciliadas, y dan lugar a las células endimarias (Fig. 7) (Reynolds and Weiss 1992; Bentivoglio and Mazzarello 1999; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009). Se ha comprobado que parte de las células de la glía radial se transforman en los astrocitos B1, que actúan como células madre en los nichos de neurogénesis que quedan en el adulto en la zona subventricular (Doetsch et al. 1999).

El epéndimo maduro presenta la particularidad, respecto al resto de los epitelios, de que sus células una vez diferenciadas pierden su capacidad proliferativa y se entiende que no se regeneran (Sarnat 1995). La incapacidad del epéndimo de regenerarse después de un daño o alteración genética, implica que no existe la posibilidad de corregir los daños que se puedan producir en este linaje celular (Sarnat 1995). No obstante, algunos estudios han mostrado que las

células endoteliales son capaces de una muy limitada capacidad regenerativa (Spassky 2005; Luo et al. 2008; Bouab et al. 2011; Bátiz et al. 2011).



**Figura 7.** Células endoteliales durante el desarrollo en el ratón. **A:** En etapas tempranas, el SNC es una estructura tubular compuesta por un epitelio pseudoestratificado formado por células neuroepiteliales que contactan con la superficie pial y con la ventricular. **B:** Conforme avanza el desarrollo, las células neuroepiteliales se van transformando en glía radial que siguen manteniendo el contacto con el ventrículo, proyectando hacia él un cilio primario. Sus prolongaciones basales son usadas por los neuroblastos (color rojo) para migrar. **C:** En el *encéfalo* neonatal, la glía radial genera diversos tipos celulares, incluyendo células endoteliales y astrocitos, algunos de los cuales persisten en el *encéfalo* adulto como células madre. **D:** En la zona que cubre el estriado, hay astrocitos que presentan características de célula madre y a menudo mantienen su prolongación radial tanto con el ventrículo como con la lámina basal de los vasos sanguíneos (tomado de Merkle and Alvarez-Buylla 2006).

El epéndimo está formado por distintos tipos celulares, la mayor parte son células multiciliadas cuya morfología varía de escamosa a cuboidal (Del Bigio, 1995) (Fig. 7). También forman parte del epéndimo, tipos especializados de células endoteliales que se encuentran en los órganos circunventriculares (Del Bigio 1995; Bruni 1998). Este es el caso de los tanicitos de la eminencia media, que poseen algunas características morfológicas similares a la glía radial: una larga prolongación basal radial y uno o ningún cilio apical.

Para la caracterización del epéndimo se utilizan la expresión de los marcadores gliales como son las proteínas S100 $\beta$ , GFAP y vimentina, pero la expresión varía en distintas edades y especies (Sarnat 1992a; Sawamoto et al. 2006).

El epéndimo forma una barrera entre el parénquima neural y el LCR que, por una parte impide que las células inmunocompetentes presentes en el LCR entren en contacto con el parénquima neural, y por otra, permite el tránsito de determinadas moléculas e iones entre el parénquima neural y las cavidades ventriculares a través de los espacios intercelulares (Sarnat 1992b; Davson and Segal 1996). Por tratarse fundamentalmente de un epitelio ciliado y por la abundancia de ácido siálico que tiene sobre su superficie ventricular, éste desempeña un papel esencial en la correcta circulación del LCR, especialmente en los conductos ventriculares estrechos tales como el acueducto de Silvio y el canal central de la medula espinal (Cifuentes et al. 1994; Davson and Segal 1996; Pérez-Fígares et al. 2001). El epéndimo en los animales adultos parece estar relacionado, en general, con funciones de circulación del LCR, de transporte de sustancias e iones entre el LCR y el parénquima nervioso, y de barrera ante sustancias potencialmente peligrosas para el parénquima nervioso que van disueltas en el líquido cefalorraquídeo (Bruni et al. 1985; Bruni 1998; Del Bigio 2010).

El epéndimo también parece estar implicado en la correcta migración de los neuroblastos al bulbo olfatorio en la neurogénesis de adultos (Sawamoto et al. 2006).

Debido a la heterogeneidad de tipos celulares que presenta la superficie ventricular en desarrollo, en este trabajo se nombra de modo general, salvo excepciones puntuales, como epitelio ventricular. Éste, según el estadio y la región observada, se corresponderá con un neuroepitelio, glía radial o con epéndimo.

### **1.1.3 Determinación de los progenitores neurales e histogénesis de la corteza**

Desde el inicio del desarrollo del SNC hasta las etapas finales del desarrollo, tienen lugar toda una serie de procesos que incluyen la proliferación, diferenciación y migración de distintos tipos celulares (Hollyday 2001). La coordinación de todos éstos procesos, tanto en el tiempo como en la región adecuada, es lo que termina dando lugar a la complejidad del SNC maduro. Entre todos los procesos implicados en el desarrollo del SNC, el cambio de proliferación hacia diferenciación resulta ser un paso clave que determinará el tamaño final del SNC (Farkas and Huttner 2008).

En los primeros momentos del desarrollo, las células neuroepiteliales del tubo neural aumentan su número de forma exponencial mediante divisiones mitóticas simétricas proliferadoras (Fig. 5) (Sommer and Rao 2002; Noctor et al. 2008; Farkas and Huttner 2008). Una vez se alcanza un número suficiente de células madre, las divisiones pasan a ser asimétricas diferenciadoras produciendo una célula madre neuroepitelial y un progenitor neural (Chenn and McConnell 1995; Sommer and Rao 2002; Roegiers and Jan 2004; Noctor et al. 2008).

Inicialmente se pensó que la decisión de las células neuroepiteliales de dividirse simétrica o asimétricamente era tomada en función a la orientación del huso mitótico durante la mitosis (Chenn and McConnell 1995; Mione et al. 1997; Frisén and Lendahl 2001; Hollyday 2001). Sin embargo, aunque esos datos se han mostrado válidos en *Drosophila* (Chenn and McConnell 1995; Kosodo et al. 2004), estudios recientes sugieren que en roedores el factor determinante para la división simétrica o asimétrica parece ser dependiente de ciertos componentes en la membrana plasmática apical y del cilio primario de las células neuroepiteliales (Kosodo et al. 2004; Gotz and Huttner 2005; Farkas and Huttner 2008).

La mayoría de las células neuroepiteliales son progenitores bipotentes (Williams and Price 1995), que generan en primer lugar neuroblastos, y células gliales poco después (Fig. 3). Ya en estas etapas tempranas del desarrollo algunos progenitores dan origen exclusivamente a neuroblastos o a células gliales (Williams and Price 1995; McCarthy et al. 2001; Pinto and Götz 2007).

Tal como se ha comentado previamente, a partir de E9-E10 en la corteza del ratón, las células neuroepiteliales van adquiriendo características del linaje astrogliar y se transforman en células de la glía radial (Bentivoglio and Mazzeo 1999; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009). Estas células realizarán divisiones asimétricas diferenciadoras produciendo una célula de la glía radial que actúa como célula madre neural y un neuroblasto que usará la prolongación pial de la glía radial como sustrato para migrar basalmente. Según avanza la neurogénesis, los neuroblastos originados en las divisiones asimétricas migran hacia la corteza cerebral en formación.

Durante las etapas media y final de la neurogénesis, se forma la zona subventricular (ZSV) en contraposición a la zona ventricular (ZV). La ZV abarca la sección del tubo neural en la que los núcleos de las células neuroepiteliales y de la glía radial se mueven durante la migración nuclear intercinética, mientras que la ZSV se dispone basal a la primera y en ella residen una segunda población de células progenitoras (Fig. 7) (Hatten 1999; Marshall et al. 2003; Götz 2003; Merkle and Alvarez-Buylla 2006).

En el ratón, la neurogénesis en la zona subventricular continúa durante la segunda semana postnatal y, aún en el prosencéfalo adulto, persisten bajos niveles de neurogénesis en la ZSV. En humanos, la neurogénesis en esta zona continúa, al menos hasta el segundo año de vida.

En el desarrollo del SNC, podemos distinguir la existencia de dos tipos de progenitores: los progenitores apicales o primarios y los progenitores basales o intermedios (Tabla 1). Los progenitores apicales incluyen a las células neuroepiteliales y a las células de la glía radial, mientras que los segundos incluyen a las células progenitoras que se establecen en la ZSV (Tabla 1). Las principales diferencias entre unos y otros están resumidas en la tabla 1, destacando entre ellas la migración nuclear intercinética y el contacto apical con el líquido cefalorraquídeo a través de un cilio apical (Götz and Huttner 2005; Farkas and Huttner 2008).

Numerosos estudios sugieren que éstas células forman una población heterogénea dividida en distintos sublinajes, alguno de los cuales podrían estar especializados en generar neuronas y otras células gliales, es decir, tienen

distinto potencial diferenciativo (Hartfuss et al. 2001; Noctor et al. 2002; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

Las diferencias en el potencial diferenciativo de los progenitores neurales son dependientes de su fenotipo molecular y, al mismo tiempo, de las diferencias regionales y temporales que presentan éstas células. La heterogeneidad de la glía radial no se da sólo entre las distintas regiones del SCN en desarrollo, sino que también aparece dentro de una misma región cerebral. Esta heterogeneidad regional de las células de la glía radial se produce a nivel molecular de forma que expresan distintos factores de transcripción en función de su localización. Por ejemplo, las células de la glía radial telencefálica expresan el factor de transcripción Pax6 en el palio, mientras que expresan Dlx1/2 en el subpalio (Zaki et al. 2003)(Zaki et al., 2003). La expresión específica de los factores de transcripción por parte de la glía radial es de vital importancia ya que esos mismos factores de transcripción son clave en la regionalización del SNC en desarrollo (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

Distintos estudios sugieren que las decisiones sobre las diferencias en el destino celular están basadas tanto en mecanismos autónomos de las propias células de la glía radial como a mecanismos no-autónomos propios del ambiente (factores de secreción por ejemplo) (Kriegstein and Götz 2003). De esta forma, la glía radial del telencéfalo ventral no genera neuronas cuando se cultiva en un ambiente cortical ni tampoco la glía cortical del córtex o la espina cordal pierden sus propiedades neurogénicas cuando son cultivadas en un ambiente similar al del telencéfalo ventral.

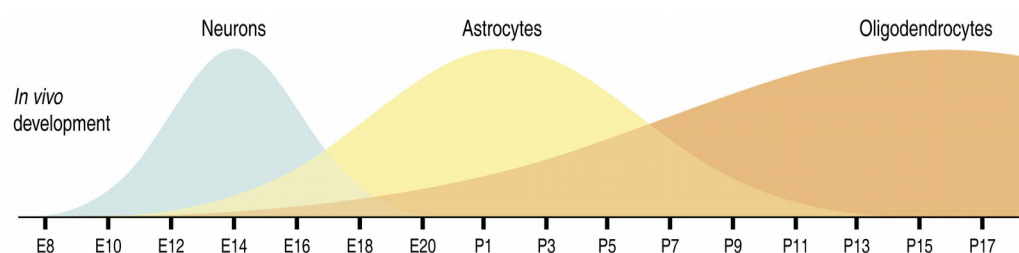
Todos estos datos ponen de manifiesto la importancia de las células de la glía radial como el tipo celular protagonista en en las diferencias específicas de cada región del CNS en desarrollo. Estos progenitores apicales no sólo dirigen la diferenciación celular de manera específica en cada región por la secreción de factores sino que además directamente genera distintos destinos mediante mecanismos autónomos en su papel como precursores celulares (Kriegstein and Götz 2003).

	<b>Progenitores apicales (PrA)</b>	<b>Progenitores basales (PrB)</b>
<b>Marcadores Moleculares</b>	Reguladores transcripcionales: Pax6, Hes5. Proteínas de membrana: prominina-1 (CD133). Marcadores de glía radial: GLAST, BLBP	Reguladores transcripcionales: Tbr2. RNA-no codificante: Svet1
<b>Biología Celular: Interfase</b>		
Morfología típica	Radial	Multipolar
Polaridad apico-basal	Presente	Disminuida
Proceso apical en contacto con el ventrículo	Presente	Retraído
Uniones adherentes	Presentes	Ausentes
Proceso basal en contacto con la lámina basal	Presente	Ausente
Migración nuclear intercinética	Presente (ZV)	Ausente (Sólo laminación)
<b>Biología Celular: Mitosis</b>		
Localización del soma celular	Apical	Basal
Polaridad ápico-basal	Presente	Ausente
Uniones adherentes	Presente	Ausente
Proceso basal en contacto con la lámina basal	Presente	Ausente
Orientación del plano mitótico	Vertical (paralelo al eje apico-basal)	Aleatorio
Avance del surco mitótico	Unidireccional (basal a apical)	Bidireccional
<b>Tipos de división celular</b>		
Simétrica proliferativa	2 PrA (Tis21 -)	2 PrB (Tis21-, Insm1+)
Asimétrica diferenciativa	PrA + PrB o neurona (Tis21+)	Virtualmente ausente
Simétrica diferenciativa	2 PrB o neuronas (Tis21+)	2 neuronas (Tis21+, Insm1+)

**Tabla 1.** Comparación de las características de los progenitores basales y apicales en la neocorteza de roedores durante el desarrollo embrionario. (Basado en Farkas and Huttner, 2008).

La mayoría de los progenitores apicales son bipotentes (Williams and Price 1995), que generan en primer lugar neuroblastos y células gliales poco después (Fig. 3). Ya en etapas tempranas del desarrollo algunos progenitores dan lugar exclusivamente a neuroblastos o a células gliales reflejando la heterogeneidad en el linaje celular (Williams and Price 1995; McCarthy et al. 2001; Pinto and Götz 2007).

En etapas medias y finales del desarrollo (Fig. 8), la neurogénesis y gliogénesis tienen lugar tanto en la ZV como en la ZSV, localizada justo por debajo de ella. En esta etapa, la primera está formada por la glía radial en división que dará lugar a precursores neuronales y gliales. La ZSV está formada por una capa de precursores neuronales y gliales que se dividen a la vez que inician su migración (Hatten 1999; Marshall et al. 2003; Götz 2003). De esta forma se muestra que la heterogeneidad de los progenitores está ligada también a la etapa del desarrollo puesto que su potencialidad cambia en función del tiempo.



**Figura 8.** Producción de distintos tipos celulares por los progenitores neurales durante el desarrollo del sistema nervioso central de rata (Sauvageot y Stiles, 2002)

#### **1.1.4 Determinación celular según la región y el momento del desarrollo.**

Las nuevas neuronas generadas en la zona subventricular migran sobre las prolongaciones de la glía radial (Hatten 1999), y se van acumulando formando nuevas capas neuronales sobre la capa más superficial de la corteza en formación, denominada zona marginal (ZM) (Hatten 1999). Así, a las neuronas de la ZM se les llama capa uno, y todas las demás se van numerando a partir de ella hasta un total de seis capas neuronales. De esta forma, las neuronas más antiguas están en los estratos más internos del *encéfalo* maduro, mientras que las últimas en formarse forman la sexta y más superficial capa de neuronas (Hatten 1999). En las etapas finales de la neurogénesis cortical, la zona subventricular en el prosencéfalo da lugar a neuronas que migran hacia el bulbo olfatorio, células gliales corticales y a las células granulosas del hipocampo en



formación (Hatten 1999). Durante toda la corticogénesis tienen lugar masivos procesos de migración de neuroblastos. La mayor parte de estos movimientos tienen lugar por migración radial utilizando como soporte las prolongaciones basales de las células gliales radiales (Hatten 1999). Estas prolongaciones se extienden radialmente desde la superficie ventricular hasta el límite de la corteza en formación, permitiendo a los neuroblastos alcanzar su posición en una de las seis capas de la corteza cerebral. Una pequeña parte de estos movimientos tienen lugar por mecanismos distintos a la migración radial. Algunas células precursoras y neuroblastos se mueven paralelos a la superficie ventricular en un proceso que se denomina migración tangencial (O'Rourke et al. 1995; Tamamaki et al. 1997; Parnavelas 2000).

Finalizado los procesos de migración y neurogénesis, las células de la zona ventricular se transforman progresivamente en células endimarias. Después del nacimiento, la zona subventricular desaparece progresivamente a lo largo del canal central de la médula espinal y de la mayor parte de las cavidades ventriculares del *encéfalo*, dejando el parénquima nervioso maduro en contacto con el epéndimo. Sin embargo, en la zona rostral de los ventrículos laterales del prosencéfalo de animales jóvenes y adultos se pueden encontrar acumulaciones de células muy similares a las subventriculares.

En animales adultos, la neurogénesis queda restringida a regiones concretas del SNC (Fig. 5C) como son la ZSV de la pared lateral de los ventrículos laterales y el giro dentado del hipocampo (Alvarez-Buylla et al. 2002; Emsley et al. 2005; Bonfanti and Peretto 2007).

## 2. Formación del cuerpo calloso y su agenesis

El cuerpo calloso conecta el hemisferio derecho y el izquierdo. Es el mayor tracto de fibras del SNC. Su principal función es coordinar y transferir información entre los dos hemisferios cerebrales. Numerosos síndromes congénitos en humanos cursan con defectos en su formación. La agenesis del cuerpo calloso es un defecto congénito que ocurre en más de 50 síndromes en humanos y en muchas especies de animales. Su malformación puede deberse a una agénesis parcial o completa. Estudios recientes sugieren que los individuos con agenesis del cuerpo calloso son más susceptibles a problemas neuropsiquiátricos, del desarrollo y del comportamiento, incluyendo retraso mental, problemas de comportamiento, dificultad de aprendizaje, desórdenes del sueño, del lenguaje y de la comunicación, así como déficit de atención, parálisis cerebral y esquizofrenia

En el hombre, la agenesis del cuerpo calloso puede ser debida a causas genéticas o factores ambientales (Paul et al. 2007). Entre las primeras destacan anomalías cromosómicas y mutaciones (Bedeschi et al. 2006). Entre los factores ambientales se sabe que la agenesis callosal puede ser inducida por infecciones, incluyendo las virásicas, tóxicos o por el bloqueo físico de su formación (Paul et al. 2007). Estudios en humanos muestran que el 32% de los casos de agenesis del cuerpo calloso presentan además hidrocefalia congénita (Guillem et al. 2003; Wang et al. 2004), y el 3-5% de los casos con malformaciones del SNC presentan agenesis callosal (Bodensteiner et al. 1994).

La agenesis del cuerpo calloso también ha sido descrita en modelos animales. En ratones, hay numerosos genes cuya mutación produce agenesis de las comisuras telencefálicas dorsales (Bronson and Lane 1990; Livy and Wahlsten 1997; Richards 2002; Shu et al. 2003a; Richards et al. 2004; Smith et al. 2006; Páez et al. 2007). Los ratones mutantes *hyh* presentan, además de hidrocefalia congénita, agenesis del cuerpo calloso y de la comisura hipocampal (Bronson and Lane 1990; Páez et al., 2007). Generalmente se ha considerado, tanto en humanos como en animales de experimentación que presentan hidrocefalia y agenesis del cuerpo calloso, que ésta última se debía a la presión

ejercida por la ventriculomegalia (Bronson and Lane 1990; Del Bigio and Massicotte 2001)

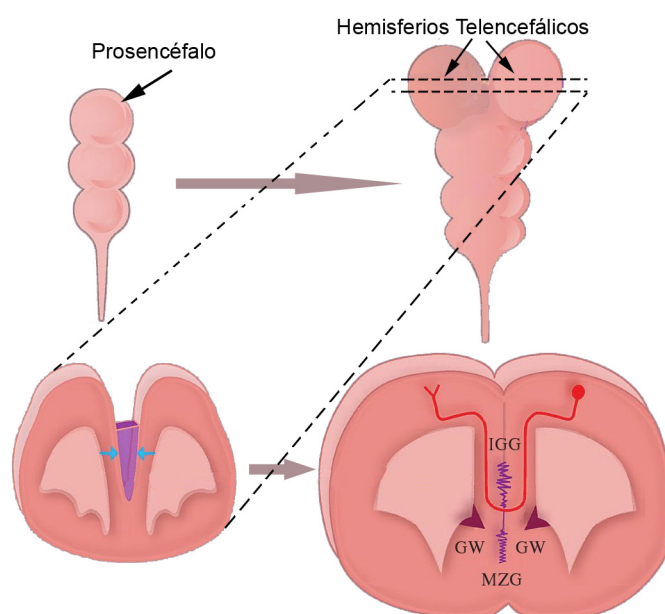
En la agenesia del cuerpo calloso, tanto en humanos como en animales, los axones callosales que no han logrado cruzar se acumulan enmarañados adyacentes a la línea media cortical formando las denominadas fibras de Probst (Babcock 1984; Smith et al. 2006)

## 2.1. Origen y desarrollo del cuerpo calloso

Uno de los eventos clave en la formación del cuerpo calloso es la fusión de las dos vesículas telencefálicas por la línea media. Según Richards et al. (Richards et al. 2004), en ratones esto ocurre aproximadamente en E14-E15. Estos autores proponen que se produce por la acción de moléculas secretadas por las células gliales de esta zona, la *midline zipper glia*, es decir, glía en cremallera de la línea media (Fig. 9). La fusión de la línea media es un paso clave en la formación del cuerpo calloso ya que si no existe un sustrato para que los axones callosales crucen la línea media, éstos no son capaces de crecer y extenderse a través de ella. La línea media a menudo es el sitio donde se forman los quistes interhemisféricos en muchos tipos de hidrocefalias (Barkovich et al. 2001). Cuando los quistes están presentes durante el desarrollo impiden la fusión de los hemisferios telencefálicos y son una causa común de la agenesia del cuerpo calloso (Richards et al. 2004).

Los axones callosales se generan en los ratones en E16,5 en la zona presuntiva del córtex frontal, parietal, temporal y occipital, siendo los emitidos en la presuntiva corteza frontal los primeros en llegar y cruzar la línea media (Ozaki and Wahlsten 1998). La mayor parte de los axones callosales proceden de neuronas de las capas 2/3 y 5 (Shu et al. 2003c). En cada capa cortical, las neuronas envían ventralmente un axón hacia la zona intermedia (Fig. 10, paso 1). Estos son guiados por moléculas de señalización como las semaforinas 3A que actúa como quimiorrepelentes (Lindwall et al. 2007; Piper et al. 2009). Cuando los axones alcanzan la zona intermedia cortical, giran lateralmente y se aproximan a la línea media creciendo a través del córtex cingular (Fig. 10, paso 2). Los axones callosales se acercan a la línea media a través del límite cortico-

septal donde se encuentran con las células de la *glial wedge* y glía del *indusium griseum* (paso 3). Al girar y cruzar la línea media, los axones del cuerpo calloso se encuentran en el hemisferio opuesto con la otra población de células de la *glial wedge* (Shu and Richards 2001). En ese punto, los axones callosales giran ahora en dirección dorsal (paso 4) y entran en el córtex cingular controlateral y, posteriormente, en la neocorteza (paso 5). Finalmente, los axones del cuerpo calloso usan las prolongaciones de la glía radial para crecer dorsalmente hacia la placa cortical donde establecen su conexión final con sus neuronas diana (paso 6) (Norris and Kalil 1991; Richards et al. 2004).

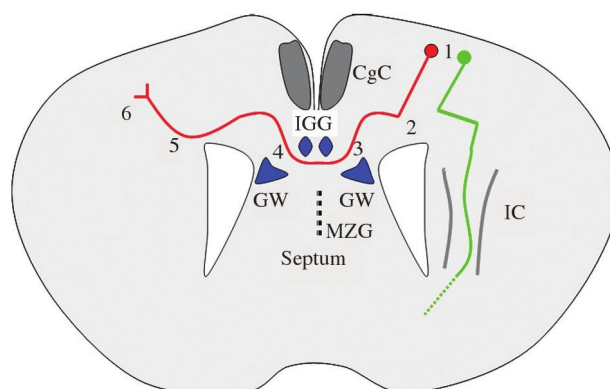


**Figura 9.** Fusión de la línea media telencefálica. **Abreviaturas:** GW, *glial wedge*; IGG, glía del *indusium griseum*; MZG, *midline zipper glia* (modificado de Richards et al. 2004).

## 2.2. Regulación del desarrollo del cuerpo calloso

Los axones usan distintos mecanismos para encontrar su ruta de crecimiento correcta. El extremo del axón en crecimiento, denominado cono de crecimiento, es una estructura especializada capaz de detectar cambios en la concentración de moléculas señalizadoras a su alrededor. Estas moléculas pueden ser quimioattractivas o quimiorrepulsivas, así como permisivas o supresivas (suprimen el crecimiento pero no repelen al axón) (Richards et al. 2004).

Normalmente, los axones tienen que crecer distancias muy largas hasta alcanzar su diana final. Para facilitar su guía, se utilizan dianas intermedias a lo largo de toda la ruta hacia la diana final, convirtiendo la ruta final completa en segmentos cortos más alcanzables. Las dianas intermedias expresan moléculas señalizadoras que guían a los axones hasta un determinado punto y luego los repelen hacia la siguiente diana. Uno de esos puntos en la ruta de los axones callosales es la línea media. Es uno de los puntos críticos en la formación de comisuras interhemisféricas dorsales, debido a que las poblaciones gliales de la línea media secretan las moléculas señalizadoras (Richards 2002; Richards et al. 2004). Un hecho clave para que los axones callosales puedan cruzar la línea media es su expresión del receptor Robo, que interactúa con la molécula Slit secretada por la *glial wedge* y la glía del *indusium griseum* (Shu et al. 2003d). Robo se expresa tanto en los axones pioneros cingulares y callosales neocorticales como en las neuronas de las capas donde se generan (Shu et al. 2003d).



**Figura 10.** Etapas de la proyección de los axones callosales. En rojo está representado un axón callosal en seis etapas de su crecimiento y en verde un axón cortico-talámico. **Abreviaturas:** CgC, córtex cingular; GW, *glial wedge*; IC, cápsula interna; IGG, glía del *indusium griseum*; MZG, *midline zipper glia* (tomado de Richards et al., 2004).

### 2.3. Los axones pioneros y su función en la guía de los axones callosales

Por axones pioneros se entiende a los primeros axones que crecen en una ruta específica y que son usados por el resto de axones para seguir el camino

correcto hacia su destino final. Para detectar las señales que les guían, tienen un cono de crecimiento con gran cantidad de receptores (Koester and O'Leary 1994).

En el caso del cuerpo calloso de ratones, los axones pioneros emitidos desde la corteza cingular se elongan hasta cruzar la línea media en E15,5 (Koester and O'Leary 1994; Rash and Richards 2001). Marcan el camino que tienen que seguir posteriormente los axones neocorticales callosales y que cruzan la línea media un día después en E16,5 (Koester and O'Leary 1994). Se ha demostrado que la ablación de los axones pioneros provoca que los axones callosales no sean capaces de seguir la ruta correcta (Koester and O'Leary 1994).

Además, se sabe que en las regiones telencefálicas más caudales los axones de la comisura hipocampal son utilizados como axones pioneros por los axones callosales. De hecho, la agenesia de la comisura hipocampal y callosal suelen estar ligadas entre sí (Livy and Wahlsten 1997).

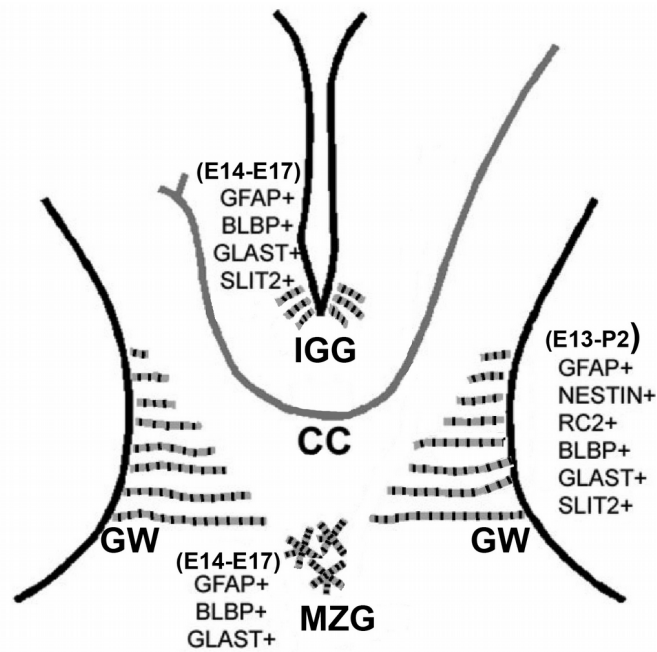
No existen muchos datos sobre la formación de la comisura hipocampal, aunque parece ser que en su formación intervienen las mismas poblaciones gliales de la línea media que actúan en el caso del cuerpo calloso (Livy and Wahlsten 1997). Por esa razón, se suele hablar genéricamente de la agenesia de las comisuras telencefálicas dorsales (Livy and Wahlsten 1997; Smith et al. 2006).

## **2.4. Poblaciones celulares de la línea media implicadas en la formación del cuerpo calloso**

Las poblaciones gliales de la línea media están conservadas a lo largo de la evolución. Las moléculas que se expresan en éstas células y que guían los axones comisurales también están muy conservadas (Lindwall et al. 2007). Se ha demostrado que la alteración de estas poblaciones celulares produce defectos en la formación de las comisuras telencefálicas dorsales (Richards 2002; Richards et al. 2004; Smith et al. 2006; Lindwall et al. 2007).

Shu et al. (Shu et al. 2003c) distinguen tres poblaciones gliales en la línea media telencefálica (Fig. 11): la *glial wedge*, la glía en el *indusium griseum* y la

*midline zipper glia*. También se ha descrito en esta región una población de neuronas migradoras, la *subcallosal sling* (Shu et al. 2003b).



**Figura 11.** Poblaciones gliales de la línea media telencefálica en el ratón  
**Abreviaturas:** CC, axón callosal; GW, *glial wedge*; IGG, glía del *indusium griseum*; MZG, *midline zipper glia*. Al lado de cada población celular se muestran los marcadores que la caracterizan y entre paréntesis las edades en las que son generadas (modificado de Shu et al., 2003c).

La *glial wedge* es una subpoblación de glía radial (Shu and Richards 2001). Se localiza en la ZV del palio medial formando dos estructuras simétricas en forma de cuña a ambos lados de la línea media y justo debajo del cuerpo caloso (Shu and Richards 2001; Shu et al. 2003c) y expresa marcadores de células de la glía radial como RC2, BLBP y GLAST, que preceden a la expresión de GFAP (Shu et al. 2003c; Smith et al. 2006). Sin embargo, existen tres características que distinguen a la *glial wedge* de la glía radial: (i) son las primeras células en la zona rostral del telencéfalo que expresan GFAP (Shu et al. 2003c), (ii) expresan moléculas de guía axonal como Slit-1, necesaria para el cruce de la línea media de los axones callosales (Shu and Richards 2001), y (iii) retraen su terminación pial antes de retraer su terminación ventricular (Shu et al. 2003c). En ratones, las primeras células de la *glial wedge* se generan en E13, que es cuando empiezan a expresar GFAP, aunque la mayoría de ellas lo hacen en E14 y las últimas en

P2 (Shu et al. 2003c) (Fig. 11). Alrededor de P10, la población celular de la *glial wedge* pierde su forma distintiva y desaparece (Shu et al. 2003c).

La glía del *indusium griseum* se dispone directamente por encima del cuerpo calloso y ventral a la fisura interhemisférica (Fig. 11). Se caracteriza por presentar una morfología radial y expresar GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), BLBP (*brain lipid-binding protein*) y GLAST (*glutamate aspartate transporter*), pero sin formar parte de la glía radial ventricular (Shu and Richards 2001). No expresa nestina ni el marcador RC2 y secreta la molécula de guía axonal Slit-1 (Shu and Richards 2001). La mayoría de las células gliales del *indusium griseum* se generan entre E14-15, sólo unas pocas lo hacen en E17 y ninguna en P2 (Shu et al. 2003c) (Fig. 11). Se originan como parte de la glía radial de la ZV del palio medial, pero por translocación somal migran hacia el *indusium griseum* donde se diferencian (Smith et al. 2006). La glía del *indusium griseum* persiste postnatalmente hasta P10 (Shu et al. 2003c). Shu and Richards (Shu and Richards 2001) postulan que por medio de la expresión de Slit-2, la *glial wedge* y la glía del *indusium griseum* formarían una especie de túnel por donde crecerían los axones pioneros callosales a través de la línea media. Por tanto, ambas poblaciones celulares parecen tener un papel crucial en la formación de las comisuras telencefálicas dorsales.

La *midline zipper glía* actúa en la fusión de la línea media y las vesículas telencefálicas (Shu et al. 2003c; Richards et al. 2004). Se dispone por debajo del cuerpo calloso y ventral a la *glial wedge* y se caracteriza por expresar GFAP, BLBP y GLAST (Fig. 11). Las células que la forman se generan en pequeño número entre E14 y E17, reduciéndose también mucho en P10 (Shu et al. 2003c).

La *subcallosal sling* es una población celular que se encuentra también en la línea media telencefálica junto a las anteriores poblaciones gliales citadas. Los axones callosales cruzan la línea media directamente dorsales a la *subcallosal sling* y a las células de la *glial wedge* (Silver et al. 1982; Shu and Richards 2001). Inicialmente fueron descritas como glioblastos unidos entre sí por uniones estrechas (Silver et al. 1982), pero recientemente se ha demostrado que está formada por una cadena continua de neuroblastos (Shu et al. 2003b). Como tales, no expresan marcadores de glía radial como son la BLBP, GFAP, GLAST o



RC2, ni de neuronas diferenciadas como GAP-43, MAP-2 o neurofilamentos. Se caracterizan por expresar marcadores como tubulina  $\beta$  clase III, calretinina o DCC (Shu et al. 2003b).

En el ratón, las células de la *subcallosal sling* se generan y empiezan a migrar desde la ZSV del palio medial del ratón en E15, formando en E17 una estructura en forma de “U” en el límite cortico-septal (Silver et al. 1982; Hankin et al. 1988). Los neuroblastos continúan generándose y migrando hasta P3, y la estructura es visible hasta P10 cuando desaparece (Shu et al. 2003b). No está claro si después de P10 las células de la *subcallosal sling* desaparecen por muerte celular o si continúan migrando hasta las zonas corticales adyacentes (Shu et al. 2003b). Debido a su formación tardía (E17) y a su posición con respecto al cuerpo calloso, se cree que la *subcallosal sling* participa en el cruce de los axones callosales, pero no en el de los axones pioneros (Shu et al. 2003b). En ese sentido, la ablación y posterior recuperación de la *subcallosal sling* en ratones acallosales han demostrado su importancia en la guía axonal (Silver et al. 1982; Silver and Ogawa 1983). También se sabe que los primeros axones callosales cruzan la línea media antes de que se forme la estructura final de la *subcallosal sling*, por tanto parece que no es necesaria para el inicio del cruce axonal (Rash and Richards 2001).

### 3. Los ratones *hyh* mutantes como modelo para el estudio de la hidrocefalia congénita y defectos en la zona ventricular.

Los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral han sido realizados sobre ratones mutantes *hyh* (*hydrocephalus with hop gait*) y controles normales (*wild type, wt*). Los ratones *hyh* han sido utilizados por nuestro grupo de investigación para profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de la hidrocefalia congénita.

En el momento de nacer, los ratones homocigotos mutantes *hyh* presentan comunicación abierta entre todos los ventrículos, ausencia de canal central en la medula espinal, denudamiento ependimario de los ventrículos, estenosis en el acueducto rostral e hidrocefalia de los ventrículos laterales, tercero y de la parte final del acueducto cerebral. Alrededor del quinto día postnatal, la comunicación ente el acueducto caudal y el cuarto ventrículo se encuentra ya sellada y la hidrocefalia pasaba a ser severa (Pérez-Fígares et al. 1998). La primera alteración detectada en los ratones *hyh* como evento clave de su hidrocefalia es la falta de desarrollo de epéndimo, detectable desde E12 en el suelo del cuarto ventrículo. Este defecto se manifiesta siguiendo patrón espacio-temporal bien definido que se extiende ventro-dorsalmente y caudo-rostralmente a partir del suelo del cuarto ventrículo (Jiménez et al. 2001). Dicho patrón se correlaciona con los momentos en los que tienen lugar la diferenciación de las células del epéndimo.

#### 3.1. Papel de la mutación de $\alpha$ -SNAP en los ratones *hyh*

La mutación que presentan los ratones *hyh* corresponde a una mutación puntual en el gen que codifica la proteína  $\alpha$ -SNAP, denominado *napa* y localizado en el cromosoma 7. La mutación provoca una sustitución de una guanina (G) por una adenina (A), la cual genera una sustitución de la metionina en la posición 105 por una isoleucina (M105I) en la proteína  $\alpha$ -SNAP (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Protein*) (Hong et al. 2004; Chae et al.

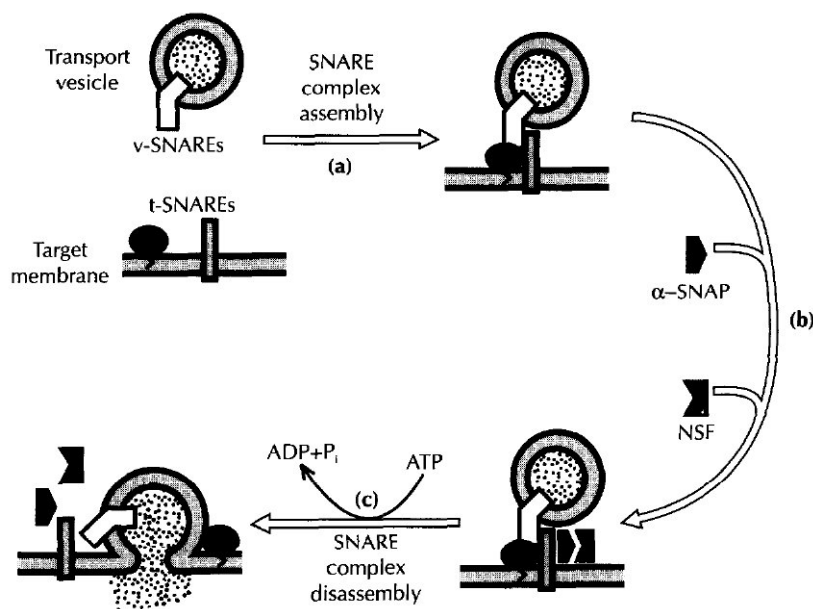
2004). Ésta es una posición altamente conservada a lo largo de la evolución en las distintas especies de mamíferos, de lo que se deduce su importancia.

La proteína  $\alpha$ -SNAP regula la fusión de membranas en el tráfico celular mediado por vesículas. En ella interviene, además de la proteína SNAP, el factor sensible a la N-etilmaleimida (NSF) y el complejo SNARE, formado por la vesícula con la proteína v-SNARE (vesicular SNARE) en su membrana y la proteína t-snare (*targed-SNARE*) localizada en la membrana diana. El factor NSF se une a la proteína  $\alpha$ -SNAP cuando ésta está unida al complejo SNARE, y su actividad ATPasa posibilita la fusión de la vesícula de transporte con la membrana de la diana (Fig. 12) (Bennett 1995). La proteína  $\alpha$ -SNAP desempeña un papel muy importante en el tráfico intercompartimental de proteínas por vesículas de transporte, incluyendo el transporte de proteínas hacia la membrana plasmática (Clary et al. 1990; Stenbeck 1998), por lo que su mutación puede ocasionar problemas en el transporte de proteínas de adhesión y/o proteínas funcionales de la membrana plasmáticas de las células neuroepiteliales y endimarias.

En los ratones *hyh* homocigotos mutantes, la cantidad de proteína  $\alpha$ -SNAP es un 40% menor que en los animales silvestres (Hong et al. 2004). No se descarta que la funcionalidad de la proteína también esté alterada, pero según estudios del espectro de la proteína, la mutación no provoca ningún cambio sustancial en su estructura tridimensional. Chae et al. (Chae et al. 2004) han descrito que la mutación afecta a la estabilidad del ARNm, lo que provocaría la disminución en la cantidad de la proteína.

Existen 3 tipos de proteínas SNAP:  $\alpha$ -SNAP,  $\beta$ -SNAP y  $\gamma$ -SNAP. Las dos primeras presentan una similitud en sus secuencias del 83% y aunque la  $\gamma$ -SNAP tiene menos similitud en su secuencia, sí tiene una estructura espacial similar.  $\alpha$ -SNAP y  $\beta$ -SNAP tienen una alta expresión en el SNC. La primera se expresa tanto en el embrión como en el adulto, y la segunda sólo en adultos.  $\beta$ -SNAP puede desempeñar un papel compensatorio en caso de ausencia de  $\alpha$ -SNAP. Durante la embriogénesis, la  $\alpha$ -SNAP está implicada en la diferenciación y morfogénesis, ya que desempeña un papel muy importante en la determinación de la polaridad celular. Al no expresarse el gen  $\beta$ -SNAP en estadios

embrionarios, no podrá compensar la menor cantidad de  $\alpha$ -SNAP que existe en estos periodos en los ratones mutantes *hyh* (Hong et al. 2004).



**Figura 12.** Esquema que representa el posible papel de la proteína  $\alpha$ -SNAP en el tráfico vesicular (Bennett, 1995).

La proteína  $\alpha$ -SNAP mutada altera la localización de algunas proteínas de superficie como E-cadherinas y  $\beta$ -cateninas en las células neuroepiteliales y en las células madre neuronales (Chae et al. 2004). Además, al alterar la fusión de membranas la mutación afecta a la polaridad celular. Esto tiene unas consecuencias drásticas sobre las células madre en el desarrollo embrionario. (Fig. 14). La alteración de la polaridad celular puede provocar una pérdida de células progenitoras de dos modos distintos: uno por el desprendimiento de las células al alterarse las uniones celulares, y otro, por un fallo en la división celular consistente en la generación de divisiones simétricas de forma temprana, hecho que agotaría las células progenitoras. Chae et al. (Chae et al. 2004) han descrito que en los ratones *hyh* mutantes hay menor cantidad de células progenitoras y precursores tardíos a partir de E16, lo que parece indicar que la más probable es la segunda opción. Probablemente también se producirá el desprendimiento de

las células al alterarse las uniones celulares y esto influya en la pérdida de células progenitoras.

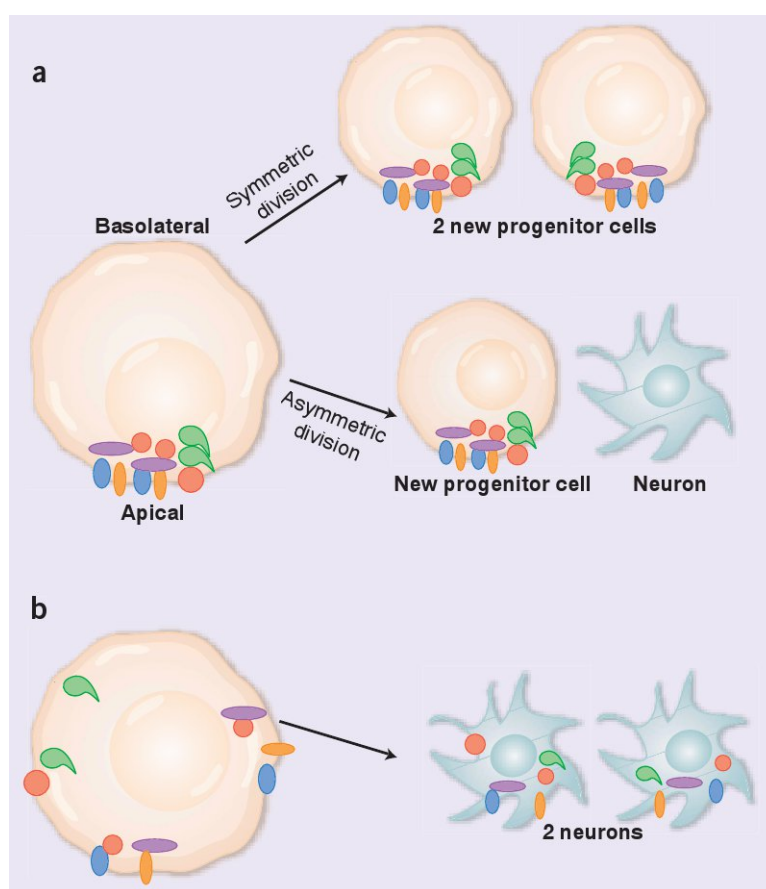
Con lo que se conoce hasta ahora de los efectos de esta mutación, se sigue sin entender la relación entre esta mutación puntual, la hidrocefalia y ciertas alteraciones neuropatológicas que presentan estos ratones mutantes, aunque a algunas ya sí se les está encontrando respuesta.

### 3.2. Denudamiento de la zona ventricular

En los animales *hyh* mutantes se detecta la ausencia o desaparición progresiva del epitelio ventricular, fenómeno al que se ha denominado originalmente denudamiento endimario. Hoy en días, según las investigaciones más recientes, se puede considerar que más que un denudamiento del epéndimo el problema consiste en un defecto en su diferenciación a partir del neuroepitelio. Una alteración en la adhesión de las células neuroepiteliales puede ser una de las causas que subyacen en el ratón *hyh*. Parece ser que los problemas de adhesión en las células neuroepiteliales pueden ocurrir en otros modelos animales como la rata Htx e incluso en casos humanos (Sival et al. 2011; Rodríguez et al. 2012; Guerra et al. 2015). Además, el defecto en el desarrollo del neuroepitelio afectaría también al desarrollo cortical (Sival et al. 2011; Rodríguez et al. 2012; Guerra et al. 2015).

Nuestro grupo ha mostrado que el por entonces denominado denudamiento del epéndimo en los ratones *hyh* precede a la hidrocefalia (Jiménez et al. 2001). Este hecho se ha observado también en otros modelos con hidrocefalia congénita, como las ratas HTx (Miller and McAllister 2007), los ratones Msx-1 (Fernández-Llebrez et al. 2004), en ratas adultas con hidrocefalia adquirida mediante una inyección con neuroaminidasa (Grondona et al. 1996), y en casos humanos con diferentes tipo de hidrocefalia congénitas comunicantes (Dominguez-Pinos et al. 2005; Sival et al. 2011). Al menos en los ratones *hyh*, el denudamiento está implicado en la transformación de la hidrocefalia, que en etapas embrionarias es comunicante y en edades postnatales pasa a ser obstructiva (Pérez-Fígares et al. 2001; Wagner et al. 2003). La afectación del neuroepitelio en los ratones *hyh* sigue los mismos patrones que la diferenciación

espacio-temporal del neuroepitelio hacia epéndimo: caudo-rostral, ventro-dorsal y medio-lateral (Jiménez et al. 2001; Páez et al. 2007). Por otra parte, las superficies ventriculares afectadas por el denudamiento son las mismas para todos los animales hidrocefálicos de la misma edad (Páez et al. 2007). Esto indica que el denudamiento no es un proceso aleatorio sino que por el contrario se trata de un proceso programado, progresivo, conservado y, en consecuencia, predecible. Por tanto debe seguir un programa genético.



**Figura 14.** Esquema que representa como se afecta la polaridad celular en la diferenciación con la mutación  $\alpha$ -SNAP. **a.-** En condiciones no patológicas, las células progenitoras acumulan, en su membrana apical, ciertas proteínas y marcadores celulares necesarios para generar divisiones, en las que se mantiene o multiplica el número de células progenitoras. **b.-** En el ratón *hyh*, estas proteínas no se disponen en la membrana apical, lo cual afecta a la polaridad celular. En estos casos no se producen divisiones autorrenovadoras, sino que las dos células hijas se diferencian originando neuronas y el número de células progenitoras disminuyen precozmente (Bajjalieh, 2004).

La alteración de la ZV empieza a ser detectable en los ratones *hyh* en E12,5 en la placa del suelo del 4V y en la porción más caudal de la superficie ventral del acueducto de Silvio (*Jiménez et al. 2001*). En E15,5 prácticamente toda la superficie ventricular del 4V y la totalidad de la porción caudo-ventral del acueducto de Silvio se afectan (*Jiménez et al. 2001; Páez et al. 2007*). En la porción rostro-ventral del acueducto de Silvio la afectación se detecta en E16,5. En la pared dorsal del acueducto de Silvio no se detecta en la porción caudal hasta E17,5. Durante las dos primeras semanas de vida postnatal, la superficie ventricular carente de epéndimo se extiende caudo-rostralmente, y en la segunda semana de vida postnatal afecta a la totalidad de la porción caudal y a gran parte del acueducto de Silvio medio (*Páez et al. 2007*). El órgano subcomisural y la eminencia media permanecen sin afectarse a lo largo de la vida adulta del animal (*Pérez-Figares et al. 2001*).

Desde E13,5, la superficie afectada en el ratón *hyh* comprende gran parte de las superficies laterales y ventrales del 3V. En E14,5 casi la totalidad de la superficie ventral del 3V está afectada y se extiende a áreas más dorsales. En la primera semana de vida postnatal, el desnudamiento afecta al resto de la superficie ventricular del 3V, excepto a los parches de epéndimo que no se afectan (*Páez et al. 2007*).

En los VL la ZV comienza a detectarse alterada en E14,5, en regiones puntuales de su porción media, y en E17,5 sólo quedan pequeñas regiones con ZV aparentemente normal. Al final de la segunda semana de vida, sólo se detecta un pequeño parche de epéndimo recubriendo el *alveus* de hipocampo (*Páez et al. 2007*).

### 3.3. Reacciones astrocitarias en la hidrocefalia

En las enfermedades neurodegenerativas y donde existe un daño en el tejido nervioso es común que aparezcan reacciones astrocitarias. Tales reacciones se han descrito con capacidad de inhibir la regeneración axónica (*Bovolenta et al. 1992*), pero también se implica en la secreción de factores de crecimiento y tróficos (*Hatten et al. 1991; Eddleston and Mucke 1993; Ridet et al. 1997*;

Renault-Mihara et al. 2008) tales como NGF, IGF y FGFb que promueven la regeneración axónica. Se ha sugerido que las reacciones astrocitarias inicialmente protegen el tejido nervioso y contribuyen a su recuperación funcional (Giaume et al. 2007). Por tanto, si tienen un papel beneficioso o perjudicial es un tema de debate (Sofroniew 2005; McAllister and Miller 2010; Sofroniew and Vinters 2010). En la hidrocefalia las reacciones astrocitarias son comunes (Dominguez-Pinos et al. 2005; Deren et al. 2010; Sival et al. 2011; Olopade et al. 2012) y se inducen con el aumento de la presión intracraneana. Así el drenaje de LCR en la rata Htx con hidrocefalia congénita y en un modelo felino con hidrocefalia inducida, donde se disminuye dicha presión, la previene parcialmente o la reduce (Miller and McAllister 2007; Eskandari et al. 2011).

En los ratones *hyh*, conforme tiene lugar la ausencia de un epéndimo, conduce a la aparición de una reacción astrocitaria en la superficie ventricular que acaba tapizando la superficie ventricular (Páez et al. 2007). Esta reacción también sigue el patrón espacio-temporal de afectación del neuroepitelio, y queda completada antes de que acabe la primera semana de edad (Páez et al. 2007). Tal reacción es diferente a la que tiene lugar en la sustancia blanca periventricular dañada, y por tanto podría tener un papel diferente.



# JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO



Durante el desarrollo del SNC, el interior del tubo neural está recubierto por las células neuroepiteliales, que en su conjunto son las células madre del SNC y por tanto el origen de sus células, tanto gliales como neuronales. Progresivamente, en el neuroepitelio aparecen células de la glía radial, que finalmente se diferencian en las células ependimarias. En la neurogénesis/gliogénesis, determinadas poblaciones de células del neuroepitelio, ubicadas en la línea media telencefálica, también intervienen en la formación del cuerpo calloso. El epéndimo, que recubre las cavidades ventriculares del SNC maduro queda constituyendo una barrera líquido cefalorraquídeo-parénquima nervioso, que regula el transporte iónico y de sustancias, y contribuye en la circulación del líquido cefalorraquídeo.

Cualquier problema en el neuroepitelio puede conducir a una alteración del desarrollo normal del SNC, dando lugar a diversas patologías. Concretamente, el grupo de investigación en el que se desarrolla la presente Tesis Doctoral, ha puesto de manifiesto que un desarrollo anómalo del epéndimo está relacionado con la hidrocefalia congénita en el ratón *hyh* y en casos humanos. Además la ausencia de epéndimo se sustituye con una reacción astrocitaria particular que cubre el parénquima nervioso en contacto con el LCR ventricular. Diversas investigaciones llevadas a cabo por otros grupos han consolidado tales evidencias.

La presente Tesis Doctoral se ha diseñado para responder a las siguientes hipótesis:

1. El programa de diferenciación de la ZV que se afecta en el ratón *hyh* pone de manifiesto que la población celular que la constituye no se desarrolla de forma homogénea.
2. Una afectación selectiva de células del neuroepitelio ubicadas en la línea media telencefálica puede explicar la asociación de anomalías en la formación del cuerpo calloso con la hidrocefalia congénita.
3. Los astrocitos reactivos que cubren las superficies que se han afectado y carecen de epéndimo pueden tener un efecto beneficioso, creando una nueva interfaz entre el LCR ventricular y el parénquima nervioso.



# OBJETIVOS



Los objetivos planteados para este trabajo han sido los siguientes:

1. Estudiar el proceso normal de maduración del epéndimo en el encéfalo de ratones normales y si puede correlacionarse con su afectación selectiva en los ratones *hyh* hidrocefálicos.
2. Estudiar cómo un desarrollo anormal del neuroepitelio en el ratón *hyh* puede implicarse en la agenesia del cuerpo calloso, que tiene lugar comúnmente en la hidrocefalia congénita.
3. Investigar si la reacción astrocitaria que sustituye la ausencia de epéndimo en los ratones *hyh* puede tener un efecto beneficioso y relacionado con la evolución de la hidrocefalia.





# MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. Animales de experimentación

Los experimentos incluidos en esta Tesis Doctoral han sido realizados en ratones pertenecientes a la cepa B6C3Fe-*a/a-hyh*/J (ratones *hyh*, *hydrocephalus with hop gait*) procedentes de *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA).

Los animales se han mantenido en una colonia estable en el Servicio de Estabulación de la Universidad de Málaga. Las condiciones fueron las siguientes: temperatura constante de 22°C, humedad relativa 40% y un ritmo circadiano de luz/oscuridad de 12h. Los ratones se alimentaron *ad libitum* con la dieta Panlab A04.

Las condiciones de estabulación, manejo de los animales, su cuidado y procesamiento durante los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las legislaciones europea y española (DC 86/609/CEE y RD 1201/2005).

Se han utilizado 400 ratones de diferentes edades embrionarias (E11,5 a E18,5) y postnatales (desde P1 a P360) con los genotipos normal o silvestre y mutante *hyh*.

También se han usado animales heterocigotos se utilizaron tanto para el mantenimiento de la colonia como para la obtención de los ejemplares homocigotos recesivos necesarios para realizar los experimentos.

Los ratones de genotipo silvestre se utilizaron en el estudio de la diferenciación y maduración del epéndimo normal.

En las investigaciones conducentes a averiguar las alteraciones del SNC causadas por la mutación en la capa neuroepitelial, se usaron animales hidrocefálicos homocigotos recesivos, prenatales y postnatales, de las edades antes indicadas. Los ejemplares homocigotos silvestres de la misma camada sirvieron como controles de las distintas técnicas y para la comparación de los resultados.

La identificación de los animales de los diferentes genotipos se ha realizado de dos formas distintas. Hasta el año 2006, al no disponer de una técnica de genotipado que permitiera identificar a los distintos tipos de animales, se procedía a inferir el genotipo a partir de su fenotipo macroscópico e histológico.

Además de los resultados obtenidos aplicando la herencia mendeliana en los diferentes cruces de animales que se realizaron. En la etapa postnatal, los ratones hidrocefálicos homocigotos recesivos presentaban los siguientes caracteres macroscópicos: macrocefalia, menor talla corporal y alteraciones motoras (*hop gait*) (Bronson and Lane 1990; *Pérez-Figares et al.* 1998; *Jiménez et al.* 2001). Posteriormente, se confirmaba histológicamente el genotipo pues los ratones homocigotos recesivos se caracterizan por la ausencia de epéndimo en amplias superficies ventriculares, la estenosis del acueducto de Silvio y del canal central medular, la ventriculomegalia o por la agenesia del cuerpo caloso que caracterizan a esta cepa de ratones hidrocefálicos (*Pérez-Figares et al.* 1998; *Jiménez et al.* 2001; *Bátiz et al.* 2006; *Páez et al.* 2007). En cuanto a los embriones hidrocefálicos se identificaron en un primer momento por la diferencia en el desarrollo del encéfalo, y posteriormente se comprobaban histológicamente por el cierre del canal central central y la ausencia del neuroepitelio en regiones concretas.

A partir del 2006 se pudo utilizar el método de genotipado de estos ratones desarrollado por nuestro grupo de investigación (*Bátiz et al.* 2009) y que está en proceso de patente (Ref. P200900051). El autor de esta Tesis participó en su desarrollo y puesta a punto.

Desde que se ha podido disponer de la técnica de genotipado se ha utilizado este método de forma sistemática, tanto en el mantenimiento de la colonia como para la selección de los ratones para las distintas investigaciones. Además, el uso de la técnica de genotipado permitió una rápida identificación de los embriones homocigotos mutantes y, por tanto, la realización de los experimentos de cultivos organotípicos incluidos en esta tesis.

## 1.1. Cruces y datación de los embriones

Para la obtención de embriones de distintas edades se colocaron, al anochecer y en una misma jaula tres hembras y un macho, todos heterocigotos. A la mañana siguiente se inspeccionaron las hembras y se observó si

presentaban tapón vaginal. Las hembras que lo tenían fueron separadas y se consideró que estaban preñadas en el estadio E0,5 (*E* de embrionario). Las hembras sin tapón se mantuvieron con el macho en la misma jaula. El proceso se repitió dos mañanas más y las hembras que presentaban el tapón fueron separadas en jaulas independientes cada día. Las hembras en las que no se detectó tapón vaginal después de la tercera noche, se consideró que no estaban preñadas, y por tanto, no se utilizaron en el experimento.

La edad de los embriones fue confirmada usando las tablas y criterios publicados en el *Edinburgh Mouse Atlas Project* (<http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>). Para datar una camada se usaron los ejemplares que *a priori* parecían normales, puesto que los ratones homocigotos para la mutación presentan menor tamaño y un retraso en el desarrollo.

## 2. Procesamiento de muestras para microscopía óptica

### 2.1. Obtención de las muestras

Para la obtención de los encéfalos de embriones se utilizaron hembras preñadas en distintos estadios de gestación, se sacrificaron por dislocamiento cervical y rápidamente se extrajeron los embriones por cesárea.

Los embriones de E11,5 se introdujeron tal cual en el fijador. Los mayores de E12,5 se decapitaron, se les retiró la piel del cráneo y se les hizo una pequeña incisión en la zona anterior del cráneo para permitir la entrada del fijador en el que se sumergieron posteriormente.

Los animales postnatales tempranos (P1-P14) (*P* de postnatal) se sacrificaron por decapitación y el *encéfalo* se extrajo rápidamente para fijarlo por inmersión.

Los animales mayores de 14 días se anestesiaron intraperitonealmente con Doletal (pentobarbital sódico, Vétoquinol, Lure, Francia, 0,2 mg/g peso) y tras un lavado vascular se fijaron por perfusión vascular a través de la aorta.

## 2.2. Fijación de las muestras

### 2.2.1 Soluciones fijadoras

Se han utilizado las siguientes soluciones fijadoras:

- Solución fijadora de Bouin (Anexo 2). Se utilizó para fijar las muestras destinadas a aplicar las técnicas histoquímicas (hematoxilina-eosina y lectina de tomate) e inmunohistoquímicas contra los siguientes antígenos: antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), molécula de adhesión celular neuronal (NCAM), proteína glial fibrilar ácida (GFAP), proteína ligadora de lípidos cerebrales (BLBP), proteína S100 $\beta$ , proteína  $\beta$  tubulina de clase III y vimentina. La muestra fijada con Bouin fue posteriormente incluido en parafina para después seccionarlo, pegarlo sobre portaobjetos y realizar las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas en gota.
- Solución fijadora de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M (PFA 4%) (Anexo 2). Se utilizó para las muestras destinadas a las técnicas inmunohistoquímicas contra los siguientes antígenos: calbindina, nestina, calretinina, molécula de adhesión celular neural polisialada (PSA-NCAM), marcador de glía radial (RC2), proteína tubulina  $\beta$  de clase III y el antígeno de la superficie neuronal (A2B5). Después las muestras se cortaron con un vibratomo y se realizaron técnicas inmunohistoquímicas en flotación. Esta solución fijadora también se utilizó para la fijación del material resultante de los experimentos de cultivos organotípicos y del material utilizado para el marcaje anterógrado con Dil en el estudio de la agenesia del cuerpo calloso y las alteraciones en la migración neuronal en los ratones mutantes *hyh*.
- Solución fijadora de paraformaldehído al 4%, glutaraldehído al 0,25% en tampón fosfato 0,1M (PFA 4% + Glut 0,25%) (Anexo 2). Se utilizó para postfijar el material destinado para las técnicas inmunohistoquímicas

contra calbindina, calretinina, nestina, marcador celular de glía radial (RC2) y el antígeno de la superficie neuronal (A2B5). Las técnicas inmunohistoquímicas contra estos antígenos se realizaron en flotación con tejido cortado en el vibratomo. Con esta postfijación, el material embrionario adquiere mucha más consistencia y resulta menos dañado durante la aplicación de las distintas técnicas inmunohistoquímicas.

### **2.2.2 Procedimiento de fijación**

El modo y el tiempo de fijación variaron dependiendo de la edad y destino del animal:

- Etapa embrionaria (E11,5-P1). Una vez extraídos los embriones, se disecaron para retirar la piel del cráneo y se fijaron por inmersión durante 24 h a temperatura ambiente cuando la solución fijadora era Bouin (Anexo 2), o durante 2 h a temperatura ambiente y agitación, seguido de 24 h a 4°C si el fijador era PFA 4% (Anexo 2). En ambos casos, la fijación fue por inmersión. Los embriones con una edad superior a E12,5 fueron decapitados y la cabeza sumergida en el fijador.
- Etapa postnatal temprana (P1-P14). Los animales se sacrificaron por decapitación, se retiró la piel del cráneo y se extrajo el encéfalo. Se fijaron por inmersión durante 48-72 h a temperatura ambiente, cuando el fijador era Bouin, o 2 h a temperatura ambiente y agitación seguido de 48 h a 4°C si era PFA 4%.
- Animales postnatales de más de 14 días. Se perfundieron a través de la aorta con una solución de lavado consistente en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,3 (Anexo 1) durante unos minutos. Seguidamente, se perfundió la solución fijadora durante 30 min. El bombeo se llevó a cabo con una velocidad constante a través de cánula conectada a una bomba perfusora (Dinko, modelo D-25V). Transcurrida la fijación por perfusión, se extrajo el encéfalo y se postfijó en la misma solución durante 24-48 h a 4°C.

Postfijación de cortes. Las secciones de vibratomo destinadas a la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas que así lo requerían fueron postfijadas durante 20 min en la solución fijadora PFA 4% + Glut 0,25% (Anexo 2). A continuación los cortes fueron lavados con tampón salino.

### **2.2.3 Inclusión y/o encastramiento y corte de las muestras**

El tejido siguió dos tipos de procesamientos distintos para microscopía óptica en función a la técnica a aplicar.

#### **2.2.3.1 Inclusión en parafina y corte en el microtomo de parafina**

Este método de inclusión se utilizó con los *encéfalos* destinados a las técnicas histoquímicas (hematoxilina-eosina y lectina de tomate) e inmunohistoquímicas contra los siguientes antígenos: PCNA, NCAM, GFAP, BLBP, proteína S100 $\beta$ , proteína tubulina  $\beta$  de clase III y vimentina.

Los encéfalos fueron deshidratados en soluciones de etanol de gradación crecientes, a continuación se embebieron en butanol y posteriormente en parafina. Finalmente, se incluyeron en un molde y se dejaron enfriar. Los tiempos de inclusión se adaptaron en función a la edad de los animales.

#### **Protocolo de inclusión en parafina**

	<u>Embriones</u>	<u>Adulto</u>
Lavado en agua destilada	30 min	1 h
Etanol 70°	30 min	1 h
Etanol 80°	30 min	1 h
Etanol 96° I	30 min	1 h
Etanol 96° II	30 min	1 h
Etanol 100° I	30 min	1 h
Etanol 100° II	30 min	1 h



Etanol 100° + Butanol (1:1) <sup>1</sup>	3h	Noche
Butanol I <sup>1</sup>	30 min	1 h
Butanol II <sup>1</sup>	30 min	1 h
Butanol + Parafina (1:1) <sup>1,2</sup>	2h	4-6h
Parafina I <sup>2</sup>	1,5h	3-4h
Parafina II <sup>2</sup>	1,5h	3-4h
Parafina III <sup>2</sup>	Noche	Noche
Confección de los bloques.		

<sup>1</sup> Estos pasos se hacen dentro de la campana extractora.

<sup>2</sup> Estos pasos se hacen en la estufa a 60°C.

Los encéfalos se orientaron en el bloque de parafina transversal o sagitalmente dependiendo del objetivo concreto del estudio. Después fueron cortados en un microtomo de parafina en secciones de 10 µm de grosor. Éstas se numeraron y conservaron en cajas fabricadas para tal efecto. Finalmente, los cortes se montaron en series paralelas en portas tratados con poli-L-Lisina (Anexo 1) y se guardaron hasta su utilización.

### **2.2.3.2 Encastrado en agarosa y corte en el vibratomo**

Este procedimiento se siguió con el tejido destinado a las técnicas inmunohistoquímicas contra calretinina, calbindina, A2B5, RC2 y nestina; así como en la preparación del tejido para los cultivos organotípicos.

Los encéfalos destinados a las técnicas inmunohistoquímicas se encastraron en agarosa al 3% en PBS 0,1M, pH 7,3 (Anexo 1). Los encéfalos destinados a los cultivos organotípicos fueron encastrados en agarosa al 3% disuelta en medio glucosado (Anexo 4). En ambos casos, una vez disuelta la agarosa, se vertió en una placa de Petri donde se esperó a que se atemperara y encastró el encéfalo. La agarosa se dejó enfriar y una vez solidificada, se retallaron los bloques para cortar los encéfalos con orientación coronal. La muestra se colocó en el portabloques del vibratomo y se realizaron cortes de 50 µm de grosor para el tejido destinado a las técnicas inmunohistoquímicas y de 300 µm para el

material destinado a los cultivos organotípicos. Los cortes obtenidos por este método y destinados a las técnicas inmunohistoquímicas se recogieron seriadamente en placas multipocillo con PBS más 0,01%  $\text{NaN}_3$  y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### **3. Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de barrido**

Mediante la microscopía electrónica de barrido se estudió la superficie ventricular de ratones normales y mutantes hidrocefálicos en distintas edades desde E12,5 hasta P60. Los datos obtenidos se utilizaron para estudiar el desarrollo y maduración normal del neuroepitelio y del epéndimo maduro en el ratón. Los animales hidrocefálicos se usaron también para el estudio de las patologías ocasionadas por daños en la capa neuroepitelial.

En el caso de los embriones y animales perinatales de hasta P5, se realizó previamente una disección fina en fresco del SNC para dejar expuesta la superficie ventricular que se iba a estudiar. Posteriormente, las muestras disecadas se fijaron por inmersión en glutaraldehído 4% (Anexo 2) en PB 0,1M.

Los animales de más de cinco días de edad se fijaron por perfusión vascular con el mismo fijador (glutaraldehído 4% en PB 0,1M). Los *encéfalos* se extrajeron y, bajo una lupa, se disecaron pequeños bloques de encéfalo cada uno con una región específica de la superficie ventricular.

Se estudiaron todas las regiones del sistema ventricular a excepción del canal central medular.

Los pequeños bloques se postfijaron en el mismo fijador durante 30 min a temperatura ambiente y con una ligera agitación. Posteriormente, se lavó el tejido en PB 0,1 M, pH 7,3 (Anexo 1), durante 5 min y se deshidrató el material:

Lavado en agua destilada	1 min
Etanol 50°	1 h
Etanol 70°	1 h
Etanol 80°	1 h
Etanol 96°	2x 45 min
Etanol 100°	3x 30 min

Los bloques se conservaron en etanol absoluto y a 4°C hasta que se llevaron a los Servicios Centrales de Investigación (SCI) de la Universidad de Málaga, donde se les realizó el tratamiento de punto crítico. A continuación, las muestras se montaron y orientaron sobre un soporte de metal. Se visualizaron en un microscopio electrónico de barrido (Modelo JEOL JSM-840) y se tomaron imágenes digitales de las muestras con una cámara adaptada al microscopio.

## 4. Técnicas histoquímicas:

### 4.1. Hematoxilina-eosina

Esta tinción se utilizó para estudiar la estructura general del tejido incluido en parafina y montado sobre portas con poli-L-lisina.

#### Componentes:

Hematoxilina de Harris (Panreac, España, Ref: 253949.1611)

Etanol 96° + ácido acético (unas gotas)

Eosina hidroalcohólica (Panreac, España, Ref: 251301.1609)

#### Protocolo:

Desparafinado e hidratación (Anexo 1)	
Lavado en agua destilada	5 min
Tinción con solución de hematoxilina	5 min
Lavado en etanol 96° + ácido acético (unas gotas)	5 min
Lavado en agua corriente	5 min
Lavado en etanol 70°	5 min
Lavado en etanol 96°	5 min
Tinción con eosina hidroalcohólica (1%)	10 min
Deshidratación (Anexo 1) y montaje con DPX	

## 4.2. Histoquímica de lectina de tomate

Las lectinas son proteínas o glucoproteínas de origen no inmune obtenidas generalmente a partir de plantas. Éstas poseen la propiedad de unirse específicamente a determinados hidratos de carbono o a sus formas nitrogenadas. La unión es muy específica aunque no es de carácter inmune.

En esta Tesis Doctoral se ha utilizado la lectina de tomate (*Lycopersicon esculentum*) que tiene afinidad por los oligómeros de N-acetilglucosamina, preferiblemente trímeros y tetrámeros de este azúcar. La lectina usada estaba conjugada a biotina (lectina de tomate biotinilada, *L. esculentum*, Vector, USA, Ref: B-1175), usando estreptavidina marcada con peroxidasa y el revelando la actividad peroxidasa mediante la reacción histoquímica del DAB.

En nuestro caso, hemos usado esta lectina para marcar las células de la microglía presentes en nuestras muestras. La lectina de tomate también reconoce la superficie de los vasos sanguíneos y del epitelio ventricular.

### Protocolo:

Desparafinado e hidratación (Anexo 1) <sup>1</sup>	55 min
Lavado en PBS	2x5 min
Desactivación de la peroxidasa endógena (Anexo 3)	15 min
Lavado en PBS	2x5 min
Incubación en lectina diluida en PBS (5µg/mL) <sup>2</sup>	1 h

Lavado en PBS	3x5 min
Incubación en Estreptavidina <sup>2</sup>	1 h
Lavado en PBS	3x5 min
Revelado histoquímico de la actividad peroxidasa mediante DAB (Anexo 3) <sup>1</sup>	10 min
Deshidratación y aclarado en xileno (Anexo 1) <sup>1</sup>	55 min
Montaje de cortes	

<sup>1</sup> Estos pasos se realizaron bajo campana extractora de gases.

<sup>2</sup> La incubación de los anticuerpos y de la estreptavidina se realizó en gota y en cámara húmeda a una temperatura constante de 20°C.

## 5. Técnicas inmunohistoquímicas

Las distintas técnicas inmunohistoquímicas utilizadas en esta Tesis Doctoral han sido llevadas a cabo sobre series paralelas de secciones del encéfalo de ratones. Cada serie paralela ha sido inmunoteñida con un anticuerpo primario específico. Posteriormente, algunas series paralelas fueron inmunoteñidas con dos anticuerpos primarios mediante doble inmunofluorescencia.

### 5.1. Antígenos estudiados y anticuerpos utilizados

**Calretinina.** Es una proteína ligadora de calcio presente en una subpoblación de interneuronas gabaérgicas existentes en la corteza y en el estriado (Melvin et al., 2003). La localización de este antígeno es nuclear. El anticuerpo empleado para detectar esta proteína ha sido anti-calretinina (Swant, Switzerland, Ref: CG1).

**Proteína glial fibrilar ácida (GFAP).** Es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios de las células gliales. Se expresa en: i) células endimarias, desde reptiles hasta humanos (Bodega et al., 1994; Del Bigio, 1995), si bien en mamíferos la inmunoreactividad en el epéndimo está restringida a la etapa embrionaria (Sarnat, 1995, 1998; Bruni, 1998); ii) células de la glía radial (Shu and Richard, 2003); iii) astrocitos de mamíferos durante

toda la vida del animal (Lukás et al., 1989; Sarnat, 1998). Los astrocitos que forman los tubos gliales de la ruta de migración rostral hacia el bulbo olfatorio, expresan este antígeno de modo intenso (Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1999); y iv) las células madre del SNC de mamíferos adultos (Doetsch et al., 1999). El anticuerpo utilizado para el análisis de este antígeno ha sido anti-GFAP.

**Proteína ligadora de lípidos cerebrales (BLBP).** Es una proteína ligadora de ácidos grasos que se expresa abundantemente en el SNC durante el desarrollo, pero no durante la madurez (Feng et al., 1994; Kurtz et al., 1994). Durante etapas fetales, la BLBP se expresa específicamente en las células de la glía radial, así como en algunos astrocitos y en células migradoras (Kurtz et al., 1994). El anticuerpo utilizado para su detección ha sido anti-BLBP (cedido por la Dra. Götz, Max-Planck-Institute of Neurobiology, Alemania).

**Proteína de adhesión celular neural (NCAM).** Es una glucoproteína de la superficie celular que participa en la mayoría de las interacciones célula-célula o célula-sustrato (Kiss and Rougon, 1997). En la ruta de migración rostral, los neuroblastos migradores generados en la zona subventricular de mamíferos adultos, exhiben en su superficie grandes cantidades de la isoforma polisialada de la NCAM, denominada PSA-NCAM (Doetsch and Alvarez-Buylla., 1996; Doetsch et al., 1997). Para la identificación de este antígeno en el tejido se ha utilizado el anticuerpo 5B8 (DSHB, USA, Ref: 5B8).

**Proteína S100 $\beta$ .** Existen dos formas de la proteína S100 en el SNC: la S100 $\alpha$ , presente en neuronas, y la S100 $\beta$  que se expresa en las células endimarias, astrocitos y oligodendrocitos maduros. Ambas están implicadas en la movilización de calcio y cumplen funciones muy diversas (Zimmer et al., 1995). La proteína S100 $\beta$  se expresa en las células endimarias durante el desarrollo embrionario y persiste en el adulto en la mayoría de las especies de mamíferos (Chouaf et al., 1989; Del Bigio, 1995). En roedores adultos, los astrocitos que forman los tubos gliales de la ruta de migración rostral hacia el bulbo olfatorio, presentan una gran cantidad de proteína S100 $\beta$  (Peretto et al., 1997, 1999). El anticuerpo utilizado para detectar esta proteína ha sido el anti-S100 $\beta$  (Biogenesis, Ref: 8200-0184).

**Tubulina  $\beta$  de clase III.** Es una proteína que forma parte de los componentes de los microtúbulos de las neuronas y aparece durante el último ciclo mitótico o justo tras él (Lee et al., 1990). En vertebrados superiores es sintetizada exclusivamente por neuronas. Aparece en los neuroblastos embrionarios (O'Rourke et al., 1995) y continúa expresándose en las neuronas maduras del SNC adulto. La tubulina  $\beta$  III es muy abundante en las cadenas de neuroblastos migradores en el subepéndimo de roedores adultos (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1997, 1999). Esta proteína es considerada un marcador para precursores neuronales que están todavía en las zonas germinativas. Para su detección se ha utilizado el anticuerpo anti-tubulina  $\beta$  III (Promega, Clon 5G8 purificado).

**Vimentina.** Es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios, y que se coexpresa durante ciertos periodos con la proteína GFAP. Aparece en las células neuroepiteliales indiferenciadas en fase de replicación, especialmente durante la mitosis (Sarnat, 1992), en la glía radial, en los glioblastos, neuroblastos, células endimarias fetales, en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, y en los fibroblastos de las meninges. Las células endimarias maduras que expresan vimentina se han descrito en mamíferos adultos pero no en humanos. En el SNC de mamíferos adultos, la vimentina se expresa en los tanicitos y en los astrocitos reactivos hipertrofiados que se multiplican en caso de daño (Lukás et al., 1989; Yamada et al., 1992). Para la inmunodetección de este antígeno, el anticuerpo que se ha utilizado ha sido el anti-vimentina (Sigma, España, Ref: V4630).

**Gangliósido GT3 y su derivado GQ1:** Son moléculas de superficie que se expresan en precursores gliales (glial restricted precursors, GRP), es decir, en células que se diferenciarán en astrocitos u oligodendrocitos (Dubois et al., 1990). En ratón, estas células aparecen en E12-14 y se diferencian de las células neuroepiteliales por expresar este antígeno (Liu and Rao, 2004). Se ha observado la coexpresión de estos antígenos con GFAP en astrocitos tipo 2, pero no en astrocitos tipo 1 de la zona subventricular (Liu and Rao, 2004). Para la inmunodetección de estos antígenos, el anticuerpo que se ha utilizado ha sido el anti-A2B5 (Chemicon, Ref: MAB312 ).

**Gangliósido RC2:** Es una molécula de superficie específica de glía radial (Misson et al., 1988). Está presente tanto en la diferenciación como en la maduración glial (Hartfuss et al., 2001). En ratón, se expresa desde estadios tempranos del desarrollo embrionario (E9) hasta la segunda semana de vida postnatal (Misson et al., 1988; Tramontin et al., 2003). La pérdida de expresión de RC2 coincide con la aparición de células marcadas con GFAP en la zona subventricular de los ventrículos laterales en ratón (Tramontin et al., 2003). Para la inmunodetección de este antígeno, el anticuerpo que se ha utilizado ha sido el anti-RC2 (DHSB, USA, Ref: RC2).

**Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )** es una citokina multifuncional con dos formas activas una transmembranal y otra soluble. Esta molécula fuerza un amplio rango de efectos pleiotrópicos como respuestas proliferativas a la inflamación, mediación de la respuesta inmune y muerte celular. Así, el TNF $\alpha$  juega un papel crítico en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer. (Jiménez et al., 2014). Hemos usado dos anticuerpos para inmunodetectar el antígeno: anti-TNF $\alpha$  monoclonal desarrollado en rata (Abcam, Cambridge, UK, Ref: ab34717) y otro anticuerpo policlonal desarrollado en conejo (Sigma, San Luis, MO, USA, Ref: T8300). Estos anticuerpos han sido utilizados en el estudio de la reacción inflamatoria asociada a la hidrocefalia que sufren los ratones *hyh* homocigotos recesivos.

**Receptor 1 para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ R1)** La actividad de la forma soluble y transmembranal del TNF $\alpha$  está mediada a través de dos receptores distintos TNF $\alpha$ R1 y TNF $\alpha$ R2. La forma transmembranal del TNF $\alpha$  activa ambos receptores, mientras que la forma soluble funciona mediante la unión al TNF $\alpha$ R1. La activación de este receptor induce la muerte celular.

**Molécula adaptadora y ligadora del calcio ionizado**, del inglés “*ionized calcium binding adapter molecule 1*” (**iba1**). Es una proteína ligadora de actina presente en el citoesqueleto de la microglía, tanto en la activada como en reposo, y en los monocitos activados. Suele asociarse a procesos inflamatorios crónicos (Ahmed et al., 2007). Hemos utilizado los anticuerpos anti-iba1 en el estudio de los procesos neuropatológicos asociados con la mutación que sufren los ratones *hyh*.



**Tubulina  $\beta$  de clase IV.** Es uno de los principales componentes del citoesqueleto celular al formar parte de los microtúbulos. Éstos están formados por heterodímeros de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$ , existiendo cuatro isotipos diferentes de tubulina  $\beta$  ( $\beta$  I a  $\beta$  IV) en las células del *encéfalo*. Hemos usado los anticuerpos anti-tubulina  $\beta$  clase IV en el estudio de la diferenciación del neuroepitelio hacia epéndimo y en los procesos neuropatológicos asociados a la hidrocefalia congénita que sufren los ratones homocigotos recesivos *hyh*.

**Antígeno 1 de los endosomas tempranos (EEA1).** Es una proteína que se encuentra exclusivamente en los endosomas tempranos y tiene un importante papel en el tráfico vesicular de los endosomas siendo requerida para la fusión de endosomas tempranos y tardíos.

**Acuaporina-4.** Es una proteína que forma parte del principal tipo de canal de agua del *encéfalo* de mamíferos. Se expresa en los pies perivascuales de los astrocitos (Frigeri et al., 1995; Nielsen et al., 1997) y en la capa glial limitante que recubre la superficie pial y en la membrana basolateral de las células endimarias (Manley et al., 2004). Para la inmunodetección de este antígeno, el anticuerpo que se ha utilizado ha sido el anti-acuaporina-4.

### 5.1.1 Técnicas inmunohistoquímicas en tejido

#### 5.1.1.1 Protocolo general de inmunohistoquímica para muestras en portaobjeto

Desparafinado e hidratación (Anexo 1) <sup>1</sup>	55 min
Lavado en PBS	2x5 min
Desactivación de la peroxidasa endógena (Anexo 3)	15 min
Lavado en PBS	2x5 min
Digestión con proteinasa k (Anexo 3) <sup>2</sup>	5 min
Lavado en PBS	2x5 min
Intensificación en microondas (Anexo 3) <sup>2</sup>	2x5 min
Lavado en PBS	2x5 min
Preincubación en solución inactivadora de uniones inespecíficas (Anexo 3)	30-60 min
Incubación en anticuerpo primario <sup>3</sup>	Noche

Lavado en PBS	3x5 min
Incubación en anticuerpo secundario <sup>3</sup>	1 h
Lavado en PBS	3x5 min
Incubación en Estreptavidina <sup>3</sup>	1 h
Lavado en PBS	3x5 min
Revelado histoquímico de la actividad peroxidasa mediante DAB (Anexo 3) <sup>1</sup>	10 min
Deshidratación y aclarado en xileno (Anexo 1) <sup>1</sup>	55 min
Montaje de cortes	

<sup>1</sup> Estos pasos se realizaron bajo campana extractora de gases.

<sup>2</sup> Estos pasos se realizaron sólo en la inmunodetección de algunos antígenos.

<sup>3</sup> La incubación de los anticuerpos y de la estreptavidina se realizó en gota y en cámara húmeda a una temperatura constante de 20°C.

Las técnicas inmunohistoquímicas sobre portaobjetos se utilizaron para estudiar la maduración normal del epéndimo del ratón, así como también las alteraciones en los animales hidrocefálicos durante el desarrollo, como son la agenesia del cuerpo calloso y los defectos corticales.

Concretamente, este protocolo fue usado con los anticuerpos contra tubulina  $\beta$  clase III, GFAP, PCNA, S100 $\beta$  y vimentina.

### **5.1.1.2 Protocolo general de inmunohistoquímica para tejido cortado en vibratomo**

Lavado en PBS	3x10 min
Postfijación en 0,25% Glutaraldehído + 4% PFA en PB 0,1M pH 7,3 (Anexo 2)	20 min
Lavado en PBS	3x10 min
Desactivación de la peroxidasa endógena (Anexo 3)	20 min
Lavado en PBS	3x10 min
Incubación en anticuerpo primario	Noche
Lavado en PBS	3x10 min
Incubación en anticuerpo secundario biotinilado	1 h
Lavado en PBS	3x10 min
Incubación con Estreptavidina	1 h
Lavado en PBS	3x10 min

Revelado histoquímico de la actividad peroxidasa mediante DAB-níquel (Anexo 3) <sup>1</sup>	10 min
Lavado en PBS	2x10 min
Montaje de los cortes en porta	
Dejar secar a 37°C	Noche
Deshidratación y aclarado en xileno (Anexo 1) <sup>1</sup>	55 min
Montaje con DPX	

<sup>1</sup> Estos pasos se realizaron bajo una campana extractora

Las técnicas inmunohistoquímicas en muestras cortadas en vibratomo se realizaron con cortes en flotación dentro de placas multipocillo. Los pasos se hicieron en agitación y a una temperatura constante de 20°C. El revelado histoquímico de la actividad peroxidasa se realizó con 3-3' diaminobencidina e intensificado con sulfato amónico de níquel (Anexo 3).

Este protocolo se utilizó con los anticuerpos contra RC2, nestina, A2B5, calbindina, calretinina y NCAM.

### **5.1.1.3 Listado de anticuerpos con las concentraciones usadas en inmunohistoquímica**

#### **Anticuerpos primarios usados**

<b>Anticuerpos 1<sup>os</sup></b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>	<b>Tipo inmunoglobulina</b>
<b>Anti-A2B5</b>	Chemicon, MAB312	1:1000	IgM monoclonal, desarrollada en ratón
<b>Anti-BLBP</b>	Cedido por Dra. M. Gotz Max-Planck Inst.	1:3000	IgG policlonal, desarrollada en conejo
<b>Anti-Calretinina</b>	Swant, Ref: 7699/4	1:3000	IgG policlonal, desarrollada en conejo
<b>Anti-GFAP</b>	Biogenesis, Ref: 4650-0100	1:100	IgG policlonal, desarrollada en conejo
<b>Anti-GFAP</b>	Sigma, Ref: G3893	1:1000	IgG monoclonal, desarrollada en ratón
<b>Anti-Glía Radial</b>	DSHB, Ref: RC2	1:200	IgM monoclonal, desarrollada en ratón

<b>Anti-NCAM</b>	DSHB, Ref. 5B8	Puro	IgG monoclonal, desarrollada en ratón
<b>Anti-Nestina</b>	DSHB, Ref. Rat-401	1:200	IgG monoclonal, desarrollada en ratón
<b>Anti-S100<math>\beta</math></b>	Biogenesis, Ref: 8200-0184	1:2	IgG policlonal, desarrollada en conejo
<b>Anti-Tubulina <math>\beta</math> III</b>	Promega, Ref: Clon 5G8	1:5000	IgG monoclonal, desarrollada en ratón
<b>Anti-Vimentina</b>	Sigma, Ref. V4630	1:500	IgG policlonal, desarrollada en cabra
<b>Anti-TNF<math>\alpha</math></b>	Abcam, Ref: ab34717	1:100	IgG monoclonal, desarrollada en rata
<b>Anti-TNF<math>\alpha</math></b>	Sigma, Ref: T8300	1:200	IgG policlonal, desarrollado en conejo
<b>Anti-TNF<math>\alpha</math>R1</b>	Sigma, Ref: SAB4502988	1:1000	IgG policlonal desarrollada en conejo
<b>Anti-TNF<math>\alpha</math>R1</b>	Santa Cruz Biotechnology, Ref: SC7895	1:2000	IgG policlonal desarrollada en conejo
<b>Anti-Aquaporina 4</b>	Sigma, Ref: A5971	1:400	IgG policlonal desarrollada en conejo
<b>Anti-EEA1</b>	Affinity Bioreagents INC	1:200	IgG policlonal desarrollada en conejo
<b>Anti-Iba1</b>	Wako, Ref: 019-19741	1:500	IgG policlonal desarrollada en conejo
<b>Anti-Tubulina <math>\beta</math> IV</b>	Abcam, Ref: ab16059	1:100	IgG monoclonal desarrollada en ratón
<b>Anti-Tubulina <math>\beta</math> IV</b>	Sigma, Ref: T7941	1:400	IgG monoclonal desarrollada en ratón

### Anticuerpos secundarios no fluorescentes

Anticuerpos 2 <sup>os</sup>	Referencia	Dilución	Origen
Anti-IgG ratón biotinilado	DAKO, Ref: E0464	1:500	Desarrollado en conejo
Anti-IgG conejo biotinilado	DAKO, Ref: E0432	1:500	Desarrollado en cabra
Anti-IgG cabra biotinilado	DAKO, Ref: E0466	1:500	Desarrollado en conejo
Anti-IgM ratón biotinilado	Vector, Ref: BA-2020 BIOT	1:500	Desarrollado en cabra

### Estreptavidina usada en inmunohistoquímica

Estreptavidina	Referencia	Dilución
Extravidina® conjugada a peroxidasa de rábano	Sigma, Ref: E-2806	1:2000

#### 5.1.1.4 Protocolo general para inmunofluorescencia

Las técnicas inmunofluorescentes se utilizaron para marcar distintas poblaciones celulares en los experimentos de cultivos organotípicos en los que se marcó la migración celular con Dil. También se utilizaron estas técnicas para el estudio de la maduración del epéndimo de ratón y en los procesos neuropatológicos asociados a la mutación que presentan los ratones *hyh*.

La presencia de los anticuerpos primarios unidos específicamente a sus antígenos se reveló con distintos anticuerpos secundarios o estreptavidina acoplados a fluorocromos excitables a diferentes longitudes de onda. La visualización de las secciones se realizó en un microscopio láser confocal (Microscopio LEICA, mod. TCS NT).

#### Anticuerpos secundarios y estreptavidina acoplados a un fluorocromo

Anticuerpos 2 <sup>os</sup>	Referencia	Dilución	Origen
Anti-IgG ratón biotinilado	DAKO, Ref: E0464	1:2000	Desarrollado en conejo
Anti-IgG conejo biotinilado	DAKO, Ref: E0432	1:500	Desarrollado en cabra
Anti-IgG cabra biotinilado	DAKO, Ref: E0466	1:500	Desarrollado en conejo
Anti-IgM ratón biotinilado	Vector, Ref: BA-2020 BIOT	1:500	Desarrollado en cabra
Estreptavidina conjugada con fluorocromo			

### 5.1.1.5 Método del segundo anticuerpo biotinilado

Lavado en PBS	3x10 min
Postfijación en 0.25% glutaraldehído + 4% PFA en PB 0,1M pH 7,3 (Anexo 2)	20 min
Lavado en PBS	3x10 min
Desactivación peroxidasa endógena (Anexo 3)	20 min
Lavado en PBS	3x10 min
Incubación en el anticuerpo primario	Noche
Lavado en PBS	3x10 min
Incubación en anticuerpo secundario biotinilado	1 h
Lavado en PBS	3x10 min
Incubación en estreptavidina marcada fluorescente	1 h
Lavado en PBS	3x10 min
Montaje de los cortes en portaobjetos	
Secado a temperatura ambiente	Noche
Montaje de los portas con <i>Dako-mounting medium</i> <sup>®</sup>	

## 5.2. Método del anticuerpo secundario marcado

Lavado en PBS	3x10 min
Postfijación en 0,25% Glutaraldehído + 4% PFA en PB 0,1M pH 7,3 (Anexo 2)	20 min
Lavado en PBS	3x10 min
Desactivación peroxidasa endógena (Anexo 3)	20 min
Lavado en PBS	3x10 min
Incubación en el anticuerpo primario	Noche
Lavado en PBS	3x10 min
Incubación en anticuerpo secundario marcado fluorescente	1 h
Lavado en PBS	3x10 min
Montaje de los cortes en porta	
Secado a temperatura ambiente	
Montaje de los portas con <i>Dako-mounting medium</i> <sup>®</sup>	

### 5.2.1.1 Particularidades para la inmunodetección de los distintos antígenos

Para la detección de algunos antígenos ha sido necesario someter a las muestras de tejido al protocolo que se resumen en la Tabla 1. En el Anexo 3 se detallan cada uno de los métodos utilizados para cada anticuerpo.

Anticuerpos	Portaobjeto	Flotación	DAB	Fluorescencia	Microondas	Proteinasa k
Anti-A2B5	NO	SI	SI	SI	NO	NO
Anti-BLBP	SI	NO	SI	NO	NO	NO
Anti-Calretinina	NO	SI	SI	NO	NO	NO
Anti-GFAP	SI	SI	SI	SI	SI	SI
Anti- Glía Radial	NO	SI	SI	SI	NO	NO
Anti-NCAM	SI	NO	SI	NO	NO	NO
Anti-Nestina	NO	SI	SI	SI	NO	NO
Anti-S100 $\beta$	SI	NO	SI	NO	NO	NO
Anti-Tubulina $\beta$ III	SI	SI	SI	SI	NO	NO
Anti-Vimentina	SI	NO	SI	NO	SI	SI

Tabla 1. Particularidades para la inmunodetección de cada antígeno.

### **5.2.1.2 Diluyentes de anticuerpos usados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

En las técnicas inmunohistoquímicas sobre portaobjetos, los anticuerpos primarios y secundarios fueron diluidos en PBS con 1% de albúmina sérica bovina (Sigma, España, BSA), 0,5% de Tritón Tx-100 (Sigma, España) y un 5% de suero normal de conejo (SNrb; Sigma, España) o un 1% de suero normal de oveja (SNO, obtenido en nuestro laboratorio) dependiendo del animal en que fue desarrollado el segundo anticuerpo. Esta solución es la misma que se usa en la preincubación para bloquear las uniones inespecíficas.

En las técnicas inmunohistoquímicas en flotación, los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en PBS 0,1M pH 7,3 con un 0,1% Tx-100 y 0,1% NaN<sub>3</sub>. Este mismo diluyente se utilizó también en las técnicas inmunofluorescentes.

El diluyente usado para la estreptavidina fue PBS 0,1M pH 7,3 más 0,1% Tx-100.

## 6. Marcaje anterógrado de axones del cuerpo calloso

El objetivo de la técnica fue estudiar la formación del cuerpo calloso durante el desarrollo, en la que intervienen los axones pioneros y callosales en animales. El estudio se realizó en edades embrionarias (E15,5; E16,5 y E17,5) y en edades postnatales tempranas (P1, P2 y P3).

Los encéfalos fueron disecados eliminando la piel y el cráneo y se fijaron por inmersión en PFA 4% (Anexo 2) tal como se ha descrito en los apartados previos. Posteriormente, los *encéfalos* se encastraron y cortaron coronalmente con un vibratomo en secciones de 300  $\mu$ m de grosor. Se depositaron pequeños cristales de Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) (Molecular Probes, USA, Ref: C7000) en la corteza frontal de uno de los hemisferios, para estudiar la presencia y elongación de los axones callosales, y en el córtex cingular, para el estudio de los axones pioneros del cuerpo calloso. Las secciones con el Dil se incubaron en una estufa a 37°C en PFA al 4% en PBS (Anexo 2) durante 3 semanas. Pasado ese tiempo, la difusión del Dil en los tractos axonales se visualizó y fotografió con un fotomicroscopio.

## 7. Cultivos organotípicos

Los cultivos organotípicos se realizaron para estudiar la elongación axonal en la formación del cuerpo calloso y para el estudio de la migración tangencial hacia la corteza de neuronas desde las eminencias gangliónicas. Se analizaron tanto



animales normales como mutantes hidrocefálicos de las siguientes edades: E14,5, E15,5 y E16,5.

Las hembras, preñadas de la edad adecuada para cada estudio, se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se extrajeron los embriones y se depositaron en una placa con medio glucosado frío (Anexo 4). Posteriormente, se pasaron a una placa con medio L15 (Gibco/LifeTechnologies, USA REF: 11415-049) y medio F12 (Gibco/LifeTechnologies, USA, Ref: 12634) (L15 + F12, 1:1) y bajo una lupa se disecaron los encéfalos que fueron depositados en medio L15 + F12 nuevo y frío. Finalmente, los *encéfalos* se encastraron en agarosa de bajo punto de fusión al 3% en medio glucosado (Anexo 4) y se cortaron con un vibratomo en secciones de 300  $\mu$ m.

En condiciones de esterilidad, se colocaron membranas para cultivo (Ref: Millipore PICM ORG 50) en placas multipocillo (2x2) y se les añadió medio DMEM suplementado con F12 al 8% (Gibco/LifeTechnologies, USA, Ref: 12634) y atemperado. Las secciones de tejido fresco se depositaron sobre esas membranas y se incubaron en una estufa de incubación (CO<sub>2</sub> 5,4% a 37°C) durante 2h para que se estabilizaran. Finalizado este periodo, los cortes se pasaron a medio neurobasal (Anexo 4) y, con ayuda de una lupa, se colocaron diminutos cristales de Dil. Para el estudio de la elongación de los axones pioneros del cuerpo caloso, el Dil se colocó en el córtex cingular de uno de los hemisferios cerebrales en E14,5 y E15,5. Para estudiar la migración de los neuroblastos desde la eminencia lateral gangliónica, el Dil se colocó en el neuroepitelio de la eminencia de embriones de E15,5 y E16,5, edades en las que la eminencia gangliónica lateral se denuda en los ratones mutantes *hyh* (observaciones no publicadas).

Finalmente, el tejido se dejó cultivando en una estufa (CO<sub>2</sub> 5,4% a 37°C) durante 48h. Transcurrido ese tiempo, el tejido se fijó en PFA 4% (Anexo 2) y se estudió el material en el microscopio de fluorescencia. El tejido dedicado al estudio de la formación de los axones pioneros fue inmunoteñido con anti-GFAP usando inmunofluorescencia para poner de manifiesto las células de la *glial wedge*, que junto a las células del *indusium griseum* participan en el cruce de los axones pioneros y callosales (Shu and Richards, 2001).

## 8. Retrotranscripción y PCR a tiempo real

Éstas técnicas se utilizaron para investigar los factores implicados en la reacción inflamatoria presente en la hidrocefalia congénita que desarrollan los ratones mutantes *hyh*.

Las muestras se obtuvieron y disecaron en el laboratorio del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga. El procesamiento de las muestras para obtener el ADNc y la realización de la reacción de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Profesor Javier Vitorica de la Facultad de farmacia en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS).

En este conjunto de técnicas, el doctorando participó en la fase de obtención de las muestras, realización la reacción de PCR a tiempo real, recolección y análisis de los resultados obtenidos. El personal del grupo de investigación del Dr. J. Vitorica se encargó de la extracción del ARN, obtención del ADNc y puesta a punto de la reacción de PCR a tiempo real.

**Obtención de muestras.** Bajo condiciones de frío, se disecó en fresco el hemisferio derecho de ratones silvestres y mutantes *hyh*. Inmediatamente después, cada muestras fue congelada en hielo seco y almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las muestras fueron enviadas al laboratorio del Dr. Javier Vitorica.

**Número de muestras estudiadas para cada edad:**

Edad	Silvestre	Mutante
P30	18	13
P90	8	7
P180	2	2

**Aislamiento de ARN y proteínas.** El ARN total fue extraído usando el kit *Reagement Tripure Isolation* (Roche, Basel, suiza) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN contaminante se eliminó mediante la incubación con DNAasa (Sigma), y se confirmó su extracción mediante el análisis de la PCR del total del ARN previo a la transcripción inversa.

La integridad de las muestras de ARN se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa. La cantidad total de ARN purificado se determinó midiendo la absorbancia a 260nm de alícuotas de las muestras precipitadas mediante etanol. La recuperación de ARN fue comparable entre todos los grupos.

**Obtención de ADNc mediante retrotranscripción (RT-PCR).** La reacción de PCR inversa o retrotranscripción se llevó a cabo usando hexámeros aleatorios, 3µg de ARN total de cada una de nuestras muestras, y el kit *Hight-Capacity cDNA Archive* de retrotranscripción (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para la reacción se siguieron las instrucciones del fabricante.

**Reacción a tiempo real de la RT-PCR.** El ADNc específico de cada gen fue amplificado usando sondas Taqman comerciales (20× Assays-on-Demand Gene Expression Assay, Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Las sondas Taqman se usaron en el estudio de los siguientes marcadores: TNFα, TNFαR1 y Oxido nítrico sintasa inducible (iNOS). También se usaron sondas Taqman para el estudio de la expresión de GFAP y el factor de crecimiento transformante β1 (TGF β1) se usaron cebadores específicos .

#### **Marcadores analizados a nivel de ARNm mediante RT-PCR a tiempo real:**

- TNFα** Factor de necrosis tumoral alfa. Es una citoquina proinflamatoria producida principalmente por macrófagos y microglía activados. Activa la vía extrínseca de la apoptosis.
- TNFαR1** Receptor del TNFα. Su activación induce muerte celular.
- TGFβ** Factor de crecimiento transformante beta. Juega un papel protector en las neuropatologías.
- iNOS** Óxido nítrico sintasa inducible. Papel neuroprotector en el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria.
- GFAP** Proteína glial fibrilar acídica que forma los filamentos intermedios de células gliales. Es un marcador de astrocitos.

### Sondas Taqman usadas para la expresión de ARNm mediante RT-PCR a tiempo real:

<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Mm00443258_m1
<b>TNF<math>\alpha</math>R1</b>	Mm00441875_m1
<b>iNOS</b>	Mm00440485_m1
<b>GAPDH</b>	Mm99999915_g1

### Secuencia de cebadores empleados en la PCR a tiempo real:

	UP:	5'-TGGAGCAACATGTGGAAGTC-3'
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	LO:	5'-CAGCAGCCGGTTACCAAG-3'
	UP:	5'-CTCCAACCTCCAGATCCGAG-3'
<b>GFAP</b>	LO:	5'-TCTGACACGGA TTTGGTGTCC-3'

Para la cuantificación y detección a tiempo real, se utilizó un sistema secuenciador y detector *ABI Prism 7000 (Applied Biosystems)*. Para cada ensayo, el primer paso consistió en construir una curva estándar de expresión usando cantidades crecientes de ADNc. En todos los casos, las pendientes de las curvas indicaron las condiciones óptimas para la reacción de PCR (pendientes de 3.2-3.4).

Los niveles de expresión de ARNm de los diferentes genes en los distintos ratones fue determinada usando gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen referencia ("*housekeeper*"). La amplificación de GAPDH se realizó siempre en paralelo al gen a analizar. Además, los resultados obtenidos se normalizaron usando la expresión de GAPDH.

Los resultados obtenidos siempre se expresaron usando el método comparativo Ct (*cycle Threshold*) siguiendo las instrucciones de *Applied Biosystems*. El Ct es el punto en el que la fluorescencia alcanza un umbral a

partir del cual el incremento en la cantidad de ADN amplificado es exponencial. El valor umbral o *threshold* se determinó automáticamente por el software SDS v1.7 o v3.2.

Como condición control, seleccionamos ratones silvestres de 30 días de edad. Consecuentemente, los niveles de expresión de todos los genes probados, para todas las edades y tipos de ratón, fueron referidas a los niveles de expresión detectados en el ratón P30 silvestre.

## 9. Hibridación *in situ*

Se procesaron para hibridación *in situ* embriones de E14,5 a E18,5 y ratones perinatales neonatales de P1 a P7. Se usaron el siguiente número de especímenes de cada edad: **E14,5** (18 *hyh* y 18 *wt*), **E15,5** (18 *hyh* y 18 *wt*), **E16,5** (15 *hyh* y 15 *wt*), **E17,5** (15 *hyh* y 15 *wt*), **E18,5** (15 *hyh* y 15 *wt*), **P1** (15 *hyh* y 15 *wt*), **P4** (12 *hyh* y 12 *wt*), **P7** (12 *hyh* y 12 *wt*).

Los embriones de ratón se fijaron por inmersión o por perfusión vascular en paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M. Posteriormente, se mantuvieron a 4°C hasta su deshidratación en metanol/PBT (PBS, 0,1% Tween-20). Después de la rehidratación, el telencéfalo se disecó y se encastró en una solución de gelatina/albúmina (30% albúmina y 0,5% gelatina en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,3) con 1,25% de glutaraldehído.

Se obtuvieron secciones de 200  $\mu\text{m}$  de grosor usando un vibratomo, se deshidrataron en metanol/PBT y se almacenaron a -20°C.

Se realizó la hibridación *in situ* sobre las secciones de tejido. Las sondas se conjugaron con digoxigenina-UTP (Boehringer, Ingelheim, Alemania) usando el kit de ribosondas *Gemini System II* (Promega, Madison, Wi). Las sondas marcadas se añadieron al tampón de hibridación a una concentración de 1-2 mg/ml. Las secciones se hibridaron a 70°C durante toda la noche. Para detectar las sondas se utilizó un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (1: 2000; 11-093274916, Boehringer). La actividad fosfatasa alcalina se

reveló usando NBT/BCIP como sustrato. En todos los casos, no se observó señal no específica.

Las secciones teñidas se montaron sobre portaobjetos tratados poli-L-lisina.

Se utilizaron las siguientes ribosondas: Tag1 (*transient axonal glycoprotein*), Tbr1 (*T-box, brain, 1*), Tis21 (*TPA-inducible sequences 21*).

Tis21 es un gen anti-proliferativo relacionado con el control de la progresión en el ciclo celular, específicamente en la transición de G1 hacia S. Se expresa específicamente en los precursores neurogénicos pero no en las neuronas postmitóticas durante la neurogénesis embrionaria. Tis21 es una proteína que cambia el estado proliferativo de las células neuroepiteliales a su estado no proliferativo.

## 10. Citometría de flujo

Los hipocampos de ambos hemisferios de ratones silvestres (n = 22) y homocigotos mutantes *hyh* (n = 17) de 30 días de edad fueron disecados rápidamente en condiciones de frío. Mediante pipeteo suave se disgregaron y se convirtieron en una suspensión de células individuales en PBS con 0,1% Triton-x100. Las células se centrifugaron para formar un precipitado y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos.

A continuación de la fijación, 200 ml de la suspensión celular se incubó en un anticuerpo monoclonal contra GFAP (dilución 1:1000) o en anti-iba1 (dilución 1:1000) durante 24 h a 4°C, luego se incubaron en el anticuerpo secundario correspondiente (secundario contra ratón hecho en burro conjugado con Alexa fluor 488, dilución de uso 1:1000) durante 1 h a 4°C. Todos los anticuerpos fueron diluidos en PBS con 0,05% Triton-X100.

Los controles negativos se realizaron usando tubos que contenían muestras pero no anticuerpo primario, incubándolos con o sin anticuerpo secundario. Para cada muestra, se contabilizaron entre 60.000 y 100.000 eventos usando un citómetro de flujo Dako Cytomation MoFlo (dako, glostrup, Denmark). Cada

experimento se repitió al menos dos veces, y los resultados se compararon para la consistencia.

Este método nos permitió estimar el número de cuerpos celulares y la intensidad de la tinción de los cuerpos celulares de la microglía iba1 inmunopositiva en los animales control y en hidrocefálicos bajo diferentes condiciones.

## 11. Análisis de datos

El análisis estadístico y las gráficas se generaron usando los programas KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA, USA) y Microsoft Excell 12.2.4 (Microsoft Corporation). Se consideró una probabilidad inferior a 0.05 basada en la prueba t de *Student* como estadísticamente significativo. Cuando la probabilidad “p” obtenida con el test t de Student fue inferior a 0,05 se consideró no significativa.

## 12. Gestión de residuos

Todos los residuos de riesgo biológico o químico generados durante la realización de esta Tesis fueron almacenados en recipientes adecuados ,según las directrices del Servicio de Prevención de la Universidad de Málaga (SEPRUMA) para su eliminación controlada por empresas especializadas.

## ANEXO 1

### Tampones de uso general

#### Tampón fosfato (PB) 0,2M, pH 7,3

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (x2H <sub>2</sub> O)	28,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g
Agua destilada	4,39g
Tampón fosfato (PB) 0,1M pH 7,3	Hasta 1 l 500 ml
Agua destilada	500 ml

#### Tampón fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,3

	<u>1X</u>	<u>5X</u>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (x2H <sub>2</sub> O)	1,90 g	9,28g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,43g	2,15g
NaCl	7,22g	36,10 g
Agua destilada	Hasta 1 l	Hasta 1 l

Se ajusta el pH a 7,3 y se almacena a 4°C.

#### Tampón TRIS-PBS 0,1 M, pH 7,8

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (x2H <sub>2</sub> O)	1,48g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaCl	0,48g
TRIS (Hidroximetilo-aminometano)	7,00 g
NaN <sub>3</sub>	5,00 g
Agua destilada	0,20 g
	Hasta 1 l

#### Tampón TRIS-HCL-Urea 0,1 M pH 9,5

Tampón TRIS-PBS 0,1M pH 7,8	1 l
-----------------------------	-----



Se le añade un 5% de urea en el momento de usar y se ajusta el pH a 9,5.

#### **Tampón TRIS-Carragenina-Tritón (TCT) 0,1M pH 7,8**

Tampón TRIS-PBS (0,1M pH 7,8)	100,00 ml	
Carragenina	0,70 g	
Tritón X-100	0,50 ml	<b>Poli-L-</b>

#### **Lisinado de portaobjetos**

Los portas limpios y desengrasados se colocan en cestillas y cubetas de plástico que contienen una solución de Poli-L-Lisina disuelta 1:10 en agua desionizada durante 5 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se dejan secar durante 1 h a 60°C o a temperatura ambiente durante 18-24h.

#### **Desparafinado e hidratación de muestras**

Xileno	2x10 min
Alcohol 100°	2x10 min
Alcohol 96°	5 min
Alcohol 70°	5 min
Agua destilada	5 min

#### **Deshidratación y aclarado en xileno de las muestras**

Agua destilada	5 min
Alcohol 70°	5 min
Alcohol 96°	5 min
Alcohol 100°	2x10 min
Xileno	2x10 min

## ANEXO 2

### Soluciones fijadoras

#### Solución fijadora de Bouin

Ácido pícrico en solución acuosa	75ml
Paraformaldehído 35%	25ml
Ácido acético glacial 100%	5ml

La solución de ácido pícrico se realiza a temperatura ambiente con 13g de ácido pícrico por litro de agua destilada, agitando intensamente durante varias horas. Finalmente se filtra la solución.

#### Solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PB 0,1M

Paraformaldehído (PF)	4,00 g
PB 0,2M pH 7,3	50 ml
Agua destilada	Hasta 100 ml

#### Solución fijadora de glutaraldehído al 4% en PB 0,1M

Glutaraldehído 25%	16ml
PB 0,2M pH 7,3	50 ml
Agua destilada	Hasta 100 ml

Se diluye en tampón fosfato hasta obtener glutaraldehído al 4%.

#### Solución fijadora de 0,25% glutaraldehído y paraformaldehído al 4% en PB 0,1M

Paraformaldehído	4,00 g
Glutaraldehído 25%	16,00 ml
PB 0,2M pH 7,3	50,00 ml
Agua destilada	Hasta 100,00 ml

## ANEXO 3

### Soluciones técnicas específicas para los métodos inmunocitoquímicos

#### Solución desactivadora de la peroxidasa endógena

PBS 0,1 M, pH 7,3	217,50 ml
Metanol	25,00 ml
Peróxido de hidrógeno al 30%	7,50 ml

#### Intensificación con microondas

Los cortes destinados al microondas han de estar montados en portaobjetos polilisinados.

Se colocan los portaobjetos en un coplin con tampón TRIS-HCl con urea al 5% (Ver Anexo 1) y se programa el microondas para dos ciclos de 5 min a la potencia máxima de 900W. Después de cada ciclo, se repone el tampón evaporado.

Tras los dos ciclos, el tejido se deja enfriar en el mismo tampón. Finalmente se lava con PBS.

#### Digestión enzimática con Proteinasa K

Se realiza en gota y durante 5 min. La concentración de la Proteinasa K (Sigma, España) fue 5 $\mu$ g/ml en PBS. Esta digestión es más precisa cuando el tejido tiene una fijación insuficiente, como por ejemplo por inmersión, o es sometido a un protocolo de inclusión largo.

#### Intensificación con sulfato amónico de níquel

Se disuelve el sulfato amónico de níquel en PBS (40mg/50 ml de PBS) y se filtra. Con el tampón obtenido, se realiza la histoquímica de la peroxidasa.

### Histoquímica de peroxidasa

Se pesan y disuelven 0,05g de DAB en 50 ml de tampón PBS, TRIS-PBS, o con PBS-níquel (pH 7,3), según el caso específico. Se sumergen los portaobjetos en un *coplin* conteniendo esta disolución. Se añade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta una concentración final del 3% Después de 10 min se lava con abundante agua corriente y se pasa a agua destilada. La reacción histoquímica se realiza en oscuridad.

### Solución bloqueadora de las uniones inespecíficas

Albúmina sérica bovina	1,00 g
Tritón Tx-100	0,50 g
NaN <sub>3</sub>	0,10 g
Suero normal de oveja o de conejo <sup>1</sup>	1 ó 5,00 ml
PBS 0,1M pH 7,3	hasta 100,00 ml

<sup>1</sup> Se añadió suero de conejo o de oveja según el origen del anticuerpo.

## ANEXO 4

### Soluciones y medios para cultivos organotípicos

#### Medio glucosado (pH 7,2)

NaCl	7,257g
KCl	0,373g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,163g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,320 g
CHNaO <sub>3</sub>	2,184g
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,353g
D(+)-Glucosa Anh	1,800 g
H <sub>2</sub> O	Hasta 1 l

#### Solución glucosada

Se diluye la glucosa al 6,5% en H<sub>2</sub>O destilada y se agita bien. No hace falta filtrar ni medir pH.

#### Medio DMEM-F12

Solución DMEM-F12	48,000 ml
Suplemento N <sub>2</sub>	0,500 ml
Solución glucosada al 6,5 % en H <sub>2</sub> O destilada	0,500 ml
Penicilina/estreptomicina	0,500 ml
Glutamina	0,250 ml
Suero fetal bovino inactivado por calor	2,500 ml

Hay que ajustar el pH 7,2 Hay que filtrarlo.

#### Medio neurobasal

Solución neurobasal	48,000 ml
Suplemento B27	1,000 ml
Solución glucosaza al 6,5%	0,500 ml
Penicilina/estreptomicina	0,500 ml
Glutamina	0,250 ml
Suero bovino fetal inactivado por calor	2,500 ml



## ANEXO 5

### LISTADO DE PRODUCTOS Y PRINCIPALES APARATOS UTILIZADOS

#### PRODUCTOS

**Acetato de sodio** (Sigma España, Ref: S-7899)  
**Ácido acético glacial** (Panreac, España, Ref: 141008.1611)  
**Ácido maleico** (Sigma España, Ref: M-0375)  
**Ácido pícrico** (Panreac, España, Ref: 142048)  
**Acroleína** (Fluka Chemica, USA, Ref: 01679)  
**Agar** (Pronadisa, España, Ref: Cat No. 1314)  
**Agarosa** (Gellyphor, Reino Unido, Ref: EMR0101000)  
**Agua Sigma** □ (Sigma España, Ref: W-4502)  
**Ampicilina** (Sigma, España, Ref: A-5354)  
**Azul tripano** (Sigma, España, Ref: T-6146)  
**BCIP** (Sigma, España, Ref: B-6404)  
**Bouin** (Sigma, España, HT-101128)  
**Bloking Kit de Vector** (Vector, USA, Ref: SP-2001)  
**Bromuro de etidio** (Sigma, España, Ref: E-1385)  
**BSA** (albúmina sérica bovina, Sigma, España, Ref: 05477)  
**Carbonato de litio** (Panreac, España, Ref: 141391)  
**CHAPS** (Sigma, España, Ref: C-3023)  
**Carragenina** (Sigma, España, Ref: C-3889)  
**Cl<sub>2</sub>Ca** (Cloruro de calcio, Merck, Germany, Ref: 102392)  
**Cloroformo** (Panreac, España, Ref: 141252.1714)  
**CaCl<sub>2</sub> x2H<sub>2</sub>O** (Cloruro de calcio di-hidratado, Analítica, USA, Ref: C3250)  
**CHNaO<sub>3</sub>** (Sigma, España, Ref: S-5761)  
**Cl<sub>2</sub>Mg** (Cloruro de magnesio, Sigma, España, Ref: M-1028)  
**Columns Quick Spin** (Roche, Germany, Ref: 1274015)  
**DAB** (3,3'-diaminobenzidina, Sigma, España, Ref: D-5637)  
**Digoxigenin-11-uridín-5'-trifosfato** (Roche, Germany, Ref: 1209256)  
**D(+)-Glucosa Anh.** (Sigma, España, Ref: 316555)  
**DMEM-F12** (Gibco/LifeTechnologies, USA, Ref: 12634)  
**DNAsa** (Gibco/LT, Germany, Ref: 10328038)  
**Dil** (Molecular Probes, USA, Ref: C7000)  
**EcoRI** (Fermentas, Germany, Ref: ER0272)  
**EDTA polvo** (Ácido etilen-diamino-tetracético, Sigma, España, Ref: E-5134)

**EDTA líquido** (Ácido etilen-diamino-tetracético, Sigma, España, Ref: E-7889)  
**Entellan** (Merck, Germany, Ref: 1.07961)  
**Etanol** (Merck, Germany, Ref: 108543)  
**Extracto de levadura** (OXOID, United Kingdom, Ref: L21)  
**Fenol** (Gibco/LifeTechnologies, USA, Ref: 15593-031)  
**Formamida desionizada** (Ambion, United Kingdom, Ref: 9342)  
**Formamida** (Oncof, USA, Ref: 54117)  
**Gelatina** (Panreac, España, Ref: 142060)  
**Glicerol** (Calbiochem, España, Ref: 356352)  
**L-Glutamina** (Sigma, España, Ref: G-7513)  
**Glutaraldehido** (Sigma, España, Ref: G-6257)  
**Heparina** (Sigma, España, Ref: H-3393)  
**Inhibidor de RNAsa** (Roche, Germany, Ref: 3335399)  
**KCl** (Probus, España, Ref: 144370)  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** (Sigma, España, Ref: P-9791)  
**Levamisole** (Sigma, España, Ref: L-9756)  
**Metanol** (Merck, Germany, Ref: 822283)  
**MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O** (Sulfato magnésico heptahidratado, Panreac, España, Ref: 141404)  
**NaCl** (Cloruro sódico, Sigma, España, Ref: S-3014)  
**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O** (Fosfato de sodio dihidratado, Sigma, España, Ref: S-3264)  
**NaN<sub>3</sub>** (Azida de sodio, Panreac, España, Ref: 162712)  
**NaOH** (Hidróxido sódico, Sigma, España, Ref: S-0899)  
**NBT** (Gibco/LifeTechnologies, USA, Ref: N-6495)  
**NTMT** (Alkaline Phosphatase Stabilizing Buffer, Sigma, España, Ref: A-4955)  
**Tissue-tek OCT** (Sakura, USA, Ref: 4538)  
**OsO<sub>4</sub>** (Tetraóxido de osmio, Panreac, España, Ref: 132901)  
**Parafina/Histosec** (Merck, Germany, Ref: 1.11609)  
**Paraformaldehído** (Merck, Germany, Ref: 1.04005)  
**PAP-pen** (Abcam, United Kingdom, Ref: ab-2601)  
**Penicilina/Estreptomina** (Gibco/LT, Germany, Ref: B13223)  
**Peróxido de hidrógeno** (Merck, Alemania, Ref: 107298 )  
**PIPES** (Sigma, España, Ref: P-1851)  
**Poli-L-Lisina** (Sigma, España, Ref: 8920)  
**Proteinasa k** (Sigma, España, Ref: P2308)  
**QIAGEN**  $\square$  **Plasmid Midi kit** (QIAGEN, Germany, Ref: 12143)  
**Reactivo Bloqueante** (Roche, Germany, Ref: 1096176)  
**RNAt** (Gibco/LT, Germany, Ref: 15401011)  
**Sacarosa** (Panreac, España, Ref: 131621.1211)  
**Solución Neurobasal** (Gibco/LT, Germany, Ref: 21103-049)



**Fetal Bovine Serum, Heat-Inactivated** (Gibco/LT, USA, Ref: 10082-139)  
**Suero Normal de Conejo** (Sigma, España, Ref: A-9169)  
**Suero Normal de Oveja** (obtenido en nuestro laboratorio)  
**Sulfato amonio de níquel** (Fluka-Chemika, Ref: 09885)  
**Sulfato de cromo y potasio** (Panreac, España, Ref: 141284)  
**Suplemento B27** (Gibco/LT, USA, Ref: 17504-044)  
**Suplemento N2** (Gibco/LifeTechnologies, USA, Ref: 17502-048)  
**Tampón de carga** (Sigma, España, Ref: B-3269)  
**Triptona L42** (OXOID, United Kingdom, Ref: LP0042B)  
**TRIS** (Hydroxymethyl-aminomethan, Sigma, España, Ref: T1378)  
**Tritón X-100** (Sigma, España, Ref: T-8787)  
**Trizma Hydrochloride** (Sigma, España, Ref: T-3253)  
**Tween 20** (Sigma, España, Ref: P-7949)  
**Uretano** (Sigma, España, Ref: U-2500)  
**Xileno** (Panreac, España, Ref: 141769.1611)



# RESULTADOS



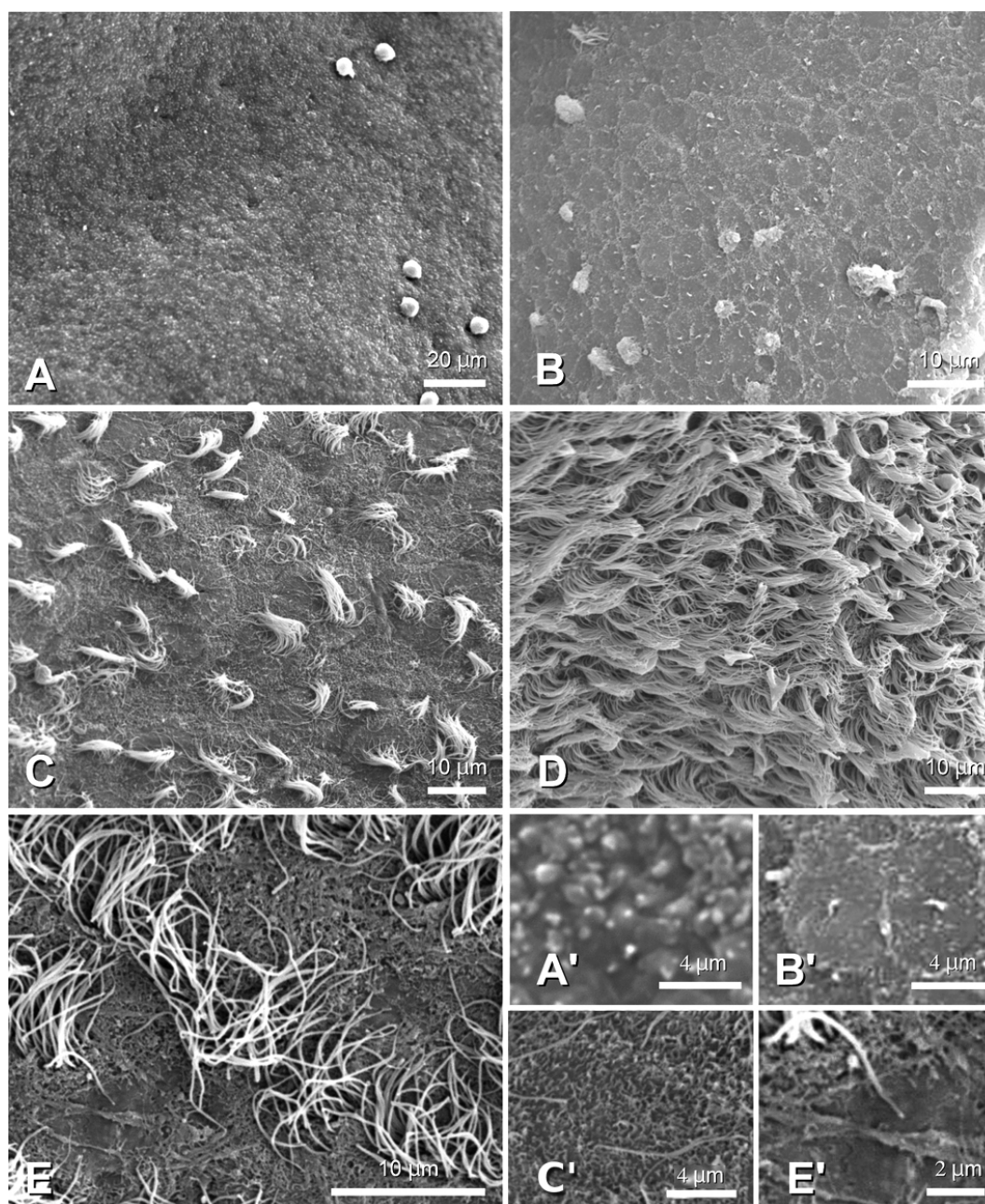
## 1. Desarrollo del epéndimo

Usando microscopía electrónica de barrido (MEB), se han estudiado, clasificado y descrito las superficies ventriculares presentes en el encéfalo de ratones normales de distintas edades. Se han estudiado las siguientes edades: E12,5, E16,5, P1, P3, P5, P9, P14 y P30.

### 1.1. Tipos de superficies ventriculares presentes en el encéfalo de ratón

Observando en su conjunto las distintas superficies ventriculares que aparecen en el encéfalo de los ratones a lo largo del desarrollo, se han agrupado en cuatro tipos principales (Fig. 15):

- Tipo I.- Superficie sin cilios (Fig. 15A, 15A'). La superficie ventricular tiene un aspecto rugoso, sin microvellosidades o diferenciaciones apicales distinguibles. Ocasionalmente, se puede encontrar de forma aislada algún cilio delgado y no muy largo (flecha en Fig. 16A). Suele aparecer en los primeros estadios del desarrollo estudiados (E12,5 y E16,5), correspondiendo posiblemente con la superficie apical de células neuroepiteliales.
- Tipo II.- Superficie uniciliada (Fig. 15B, 15B'). El carácter distintivo de este tipo de pared es la presencia de un único cilio por célula a lo largo de su superficie. Los cilios pueden aparecer de distinta forma: cortos y gruesos o largos y delgados. A su vez, en la superficie ventricular pueden aparecer o no microvellosidades, bien contorneando los límites apicales de las células (Figs. 15A, 15A', 16B) o no. Este tipo de diferenciación apical coincide con la diferenciación de la glía radial (Fig. 17C)



**Figura 15.-** Tipos de superficies ventriculares presentes en el encéfalo de ratón desde E12 a P60. MEB.

**A:** Tipo I: superficie rugosa presente en los primeros estadios estudiados. **B:** Tipo II: superficie ventricular unilociliada. Los cilios pueden ser más o menos largos. Los contornos individuales de las células pueden aparecer delimitados, tal como se observa en la figura 2, o no. **C:** Tipo III: superficie ventricular en la que se observan mezclados en distinta proporción penachos de cilios y cilios únicos de mayor o menor longitud. **D:** Tipo IV: superficie ventricular densamente cubierta por penachos de cilios. **E:** Detalle de superficie ventricular tipo III. **A', B', C', E':** Detalles correspondientes a A, B, C y E respectivamente.

- Tipo III.- Superficie con células uniciliadas y multiciliadas (Fig.s. 15C, 15C', 15E, 51E', 16D, 16E). En este tipo de pared ventricular, la superficie aparece cubierta tanto de células monociliadas o biciliadas como multiciliadas en distinta proporción. Los cilios en las células monociliadas son largos. Al mismo tiempo, la superficie apical de las células puede estar (Fig. 15C') o no (Fig. 15E') cubierta de microvellosidades.
- Tipo IV. Superficie multiciliada (Fig.15D). En este último caso, la superficie ventricular está cubierta completamente por penachos de cilios con mayor o menor densidad. La aparición de una superficie multiciliada se tomará como una característica de células maduras y diferenciadas.

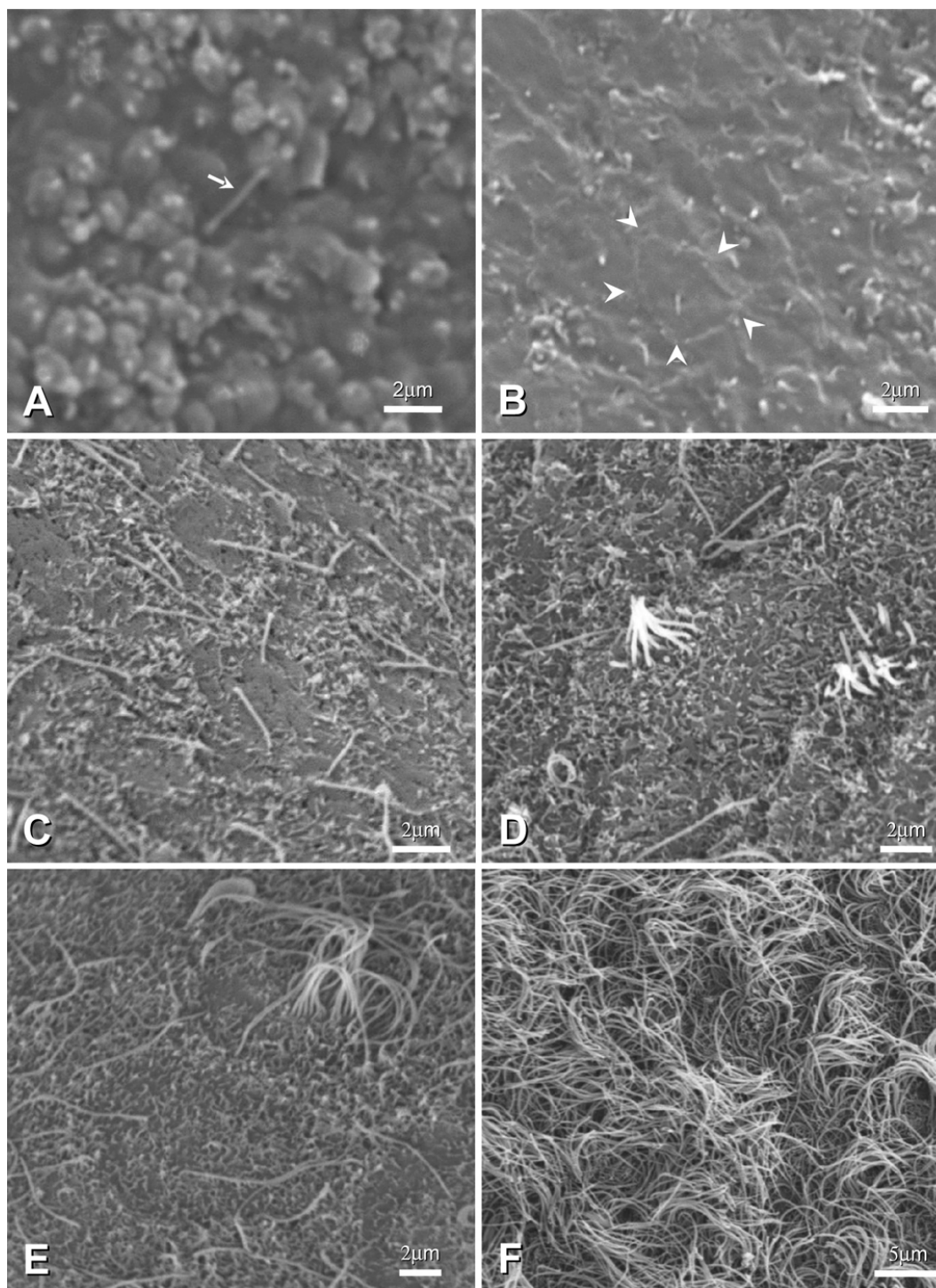
Es importante señalar que en una edad concreta y en una misma región cerebral pueden coexistir distintos tipos de pared. Por ejemplo, en la superficie que recubre la placa basal de el rombencéfalo en E12,5 existe una pared tipo I en la zona correspondiente a la línea media (Fig. 17D) y tipo II en la región lateral adyacente (Fig. 17D).

La tabla 2 muestra un resumen de la localización de los diferentes tipos de superficies ventriculares presentes a lo largo del desarrollo del ratón normal.

## **1.2. Relación de los tipos de superficie con el desarrollo del neuroepitelio**

De la misma forma, cuando se estudia en su conjunto los resultados, se observa una secuencia en la aparición de los cilios a lo largo del desarrollo (Fig. 16).

Partiendo de una superficie de apariencia rugosa y sin diferenciaciones apicales (Fig. 16A), se pasa a una superficie ventricular lisa, en la que observamos un corto cilio en el interior de un área pentagonal o hexagonal contorneada por microvellosidades (Fig. 16B). En una etapa más avanzada del desarrollo, tanto el cilio como las microvellosidades se hacen más largas (Fig. 17C)



**Figura 16.-** Tipos de superficies según estado de maduración del neuroepitelio y presencia de cilios. MEB. Secuencia de micrografías correspondientes a distintos animales, regiones y edades. Las micrografías se han escogido y ordenado para presentar la secuencia observada en la diferenciación de la superficie ventricular a lo largo del desarrollo. **A:** Superficie ventricular irregular desprovista de cilios o microvellosidades. Ocasionalmente se puede encontrar algún cilio aislado (flecha). **B:** Superficie lisa en la que aparece delimitada



el contorno de las células neuroepiteliales. En el centro de ese contorno aparece un cilio de muy corta longitud (inferior a  $1\ \mu\text{m}$ ). **C:** Células delimitadas por microvellosidades y un cilio de aproximadamente  $4-6\ \mu\text{m}$  de longitud. La superficie apical de las células parece lisa. Algunas células podrían ser biciliadas. **D:** Superficie ventricular recubierta por células monociliadas o biciliadas, con microvellosidades. Intercaladas algunas células presentan penachos de cilios cortos (inferior a  $3\ \mu\text{m}$  de longitud) a veces unidos por su extremo distal. **E:** Superficie por células cubiertas completamente por microvellosidades, con 1-2 cilios largos de unas  $8\ \mu\text{m}$  de longitud, y alguna con un penacho de cilios aparentemente completo. También aparecen algunas células con penachos de cilios. **F:** Superficie ventricular recubierta por penachos de cilios libres en su extremo distal. Los cilios parecen seguir todos una misma orientación.

---

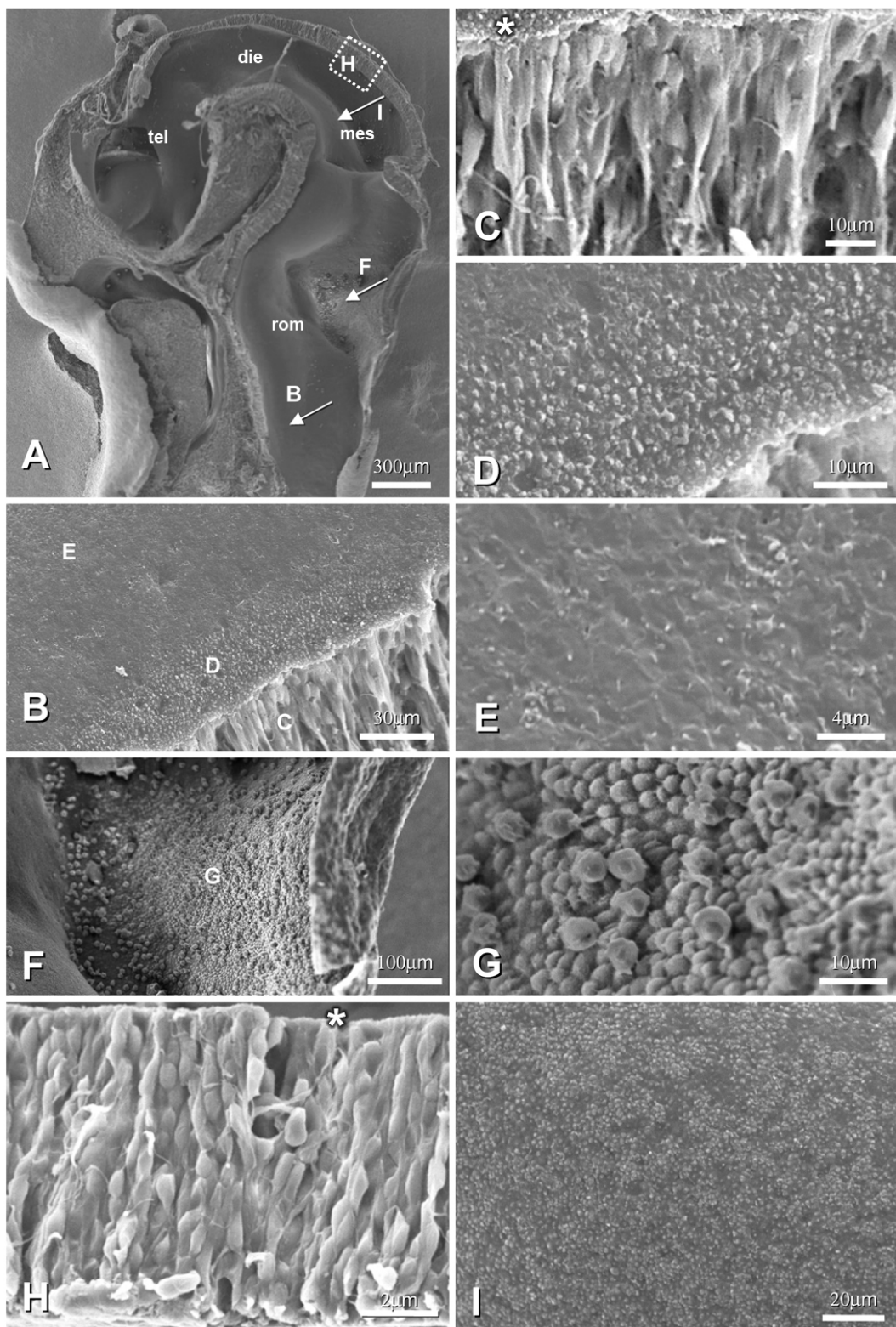
Cuando aparecen los primeros penachos de cilios, éstos suelen aparecer como un grupo de cilios muy cortos en el interior de un área delimitada por microvellosidades (Fig. 16D). Poco a poco, los cilios se van alargando uniéndose apicalmente y al mismo tiempo la superficie apical se llena de microvellosidades (Fig. 16D).

Según van creciendo los cilios, éstos adquieren la apariencia de los presentes en las células multiciliadas (Fig. 17E). Normalmente, las células multiciliadas aparecen poco a poco en grupos hasta finalmente tapizar toda la superficie ventricular de una región concreta (Fig. 16F).

### 1.3. Superficies ventriculares presentes en E12,5

En la primera etapa del desarrollo embrionario estudiada (E12,5), casi toda la superficie ventricular aparece similar (Fig. 17) considerándose de tipo I. Es una superficie más o menos homogénea con ligeros abultamientos (Figs. 15A y 17I) donde se puede ver algún cilio aislado (Fig. 16A).

Sin embargo, aparecen zonas donde la superficie ventricular es ligeramente distinta. En la placa basal rombencefálica (Fig. 17B) se aprecia que la línea media tiene un aspecto rugoso similar al descrito previamente (Fig. 17D), pero la zona lateral adyacente presenta una superficie tipo II. En ella podemos observar un muy corto cilio apical en el centro de una superficie lisa poligonal delimitada por microvellosidades (Fig. 17E). Al mismo nivel rostro-caudal, alejándose de la línea media, la superficie vuelve a ser del tipo I.



**Figura 17.-** Superficies ventriculares presentes en E12,5. MEB.

**A:** Panorámica del encéfalo seccionado a través de la línea media. Se distinguen telencéfalo (tel), diencéfalo (die), mesencéfalo (mes) y rombencéfalo (rom). Las flechas y el área encuadrada señalan las zonas mostradas a mayor detalle en B, F, I y H según la orientación indicada con las flechas adyacentes. **B:** superficie ventricular correspondiente a la línea media y la placa basal adyacente del rombencéfalo. Las letras C, D y E indican la regiones mostradas, respectivamente, en las figuras C, D y E. **C:** Detalle de B. Borde del neuroepitelio a nivel de la línea media en el rombencéfalo. Asterisco: superficie apical del neuroepitelio. **D:** Detalle de B. Superficie ventricular al nivel de la línea media rombencefálica. **E:** Detalle de B. Placa basal rombencefálica. **F:** Superficie ventricular correspondiente a la placa alar rombencefálica. La letra G indica la región ampliada en G. **G:** Detalle de F. **H:** Detalle del neuroepitelio alar mesencefálico en la línea media. **I:** Detalle de la superficie ventricular de la placa basal mesencefálica.

Al seccionar sagitalmente un embrión de E12,5 se puede observar la organización de las células del neuroepitelio. Mientras que las células presentes en la placa basal rombencefálica presentan una morfología radial con largas prolongaciones basales (Fig. 17C), en regiones más rostrales las células se distribuyen formando un neuroepitelio pseudoestratificado (Fig. 17H).

En el prosencéfalo latero-ventral, también se puede encontrar una zona en que la superficie ventricular presenta cilios cortos delimitados por microvellosidades.

Por otro lado, en el rombencéfalo alar, la superficie ventricular presenta un aspecto completamente distinto, con abultamientos mucho mayores y cubierto por microvellosidades (Fig. 17F, G).

#### 1.4. Superficies ventriculares presentes en E16,5.

La superficie ventricular de encéfalos de E16,5 presenta cambios con respecto a los encéfalos de E12,5.

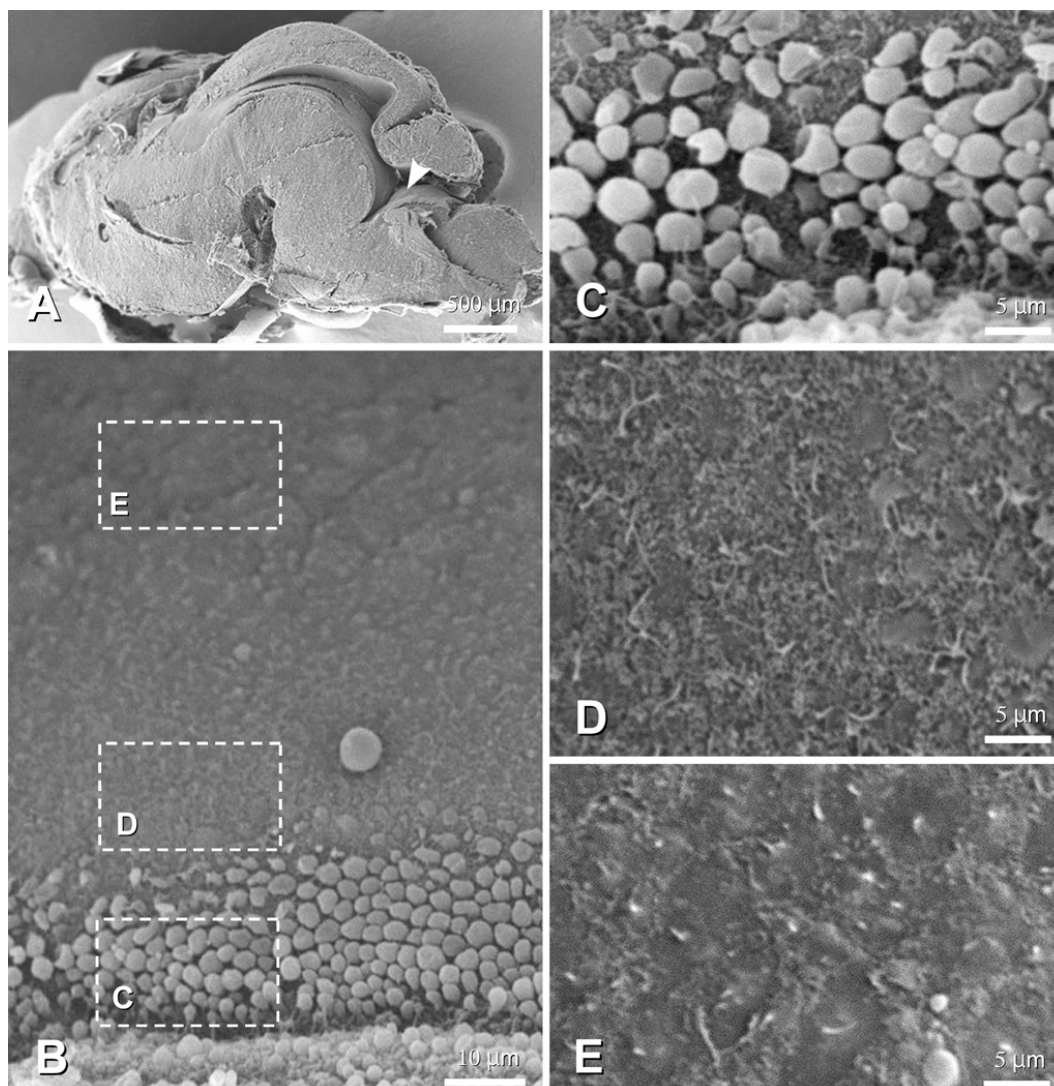
En la placa basal rombencefálica se pueden distinguir tres regiones claramente distintas (Fig. 18B). La superficie ventricular correspondiente a la placa del suelo muestra protuberancias vesiculares esféricas de la membrana plasmática (*blebs* en la literatura). Además, entre esos *blebs* se pueden distinguir microvellosidades y cilios delgados (Fig. 18C). La región lateral adyacente a la placa del suelo aparece cubierta de microvellosidades y cilios delgados (Fig.

18D). La región más lateral de la placa basal rombencefálica presenta una superficie lisa de tipo I en la que se aparecen cilios cortos en el centro de una superficie lisa delimitada por microvellosidades.

Esta diferenciación de la superficie ventricular basal se encuentra también en la placa basal del acueducto cerebral en sus porciones mesencefálica y diencefálica.

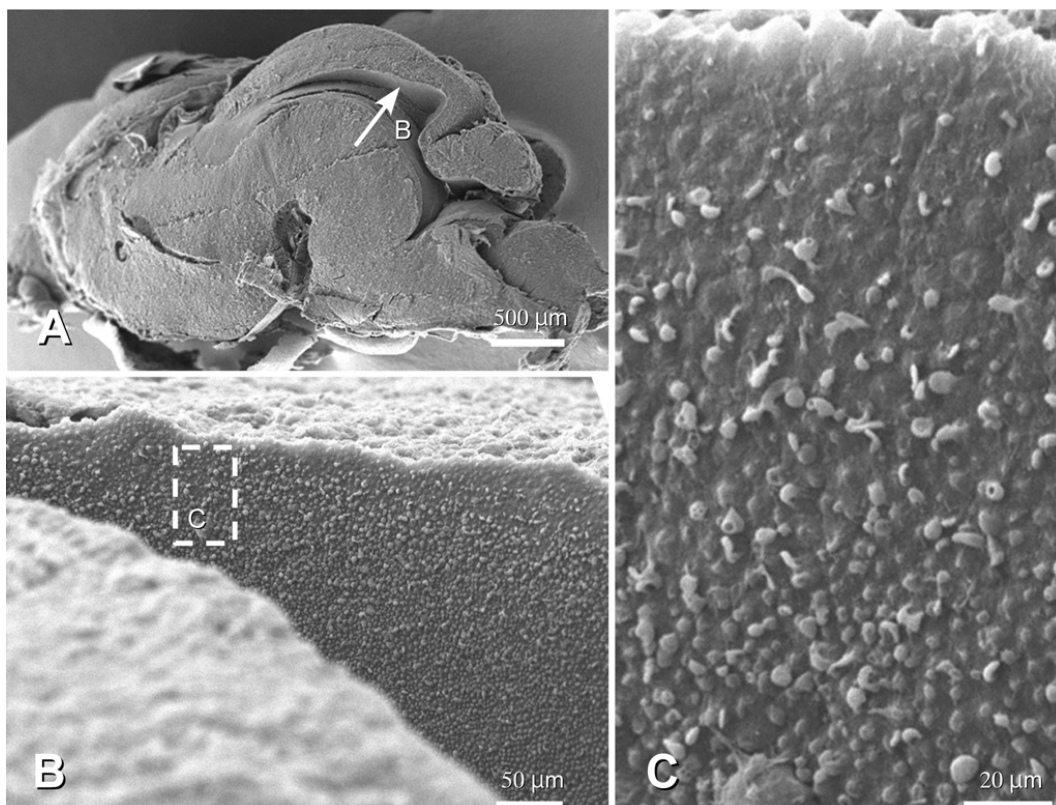
En el techo del 4V la superficie es lisa, con microvellosidades delineando el contorno celular y en su centro un único y corto cilio. El aspecto es muy similar al presentado en la figura E.

Rostral al 4V, en la placa alar mesencefálica (Fig. 19B) aparece una superficie cubierta por pequeñas protuberancias vesiculares (*blebs*) y algunos penachos de cilios cortos unidos apicalmente (Fig. 19C).



**Figura 18.-** Superficie ventricular de la placa basal rombencefálica en E16,5. MEB.

**A:** Encéfalo seccionado a través de la línea media sagital. Cabeza de flecha: zona ampliada en B. **B:** Panorámica de la superficie ventricular del cuarto ventrículo. Área encuadradas: detalles mostrados en C, D y E. **C:** Detalle de B. Superficie con protuberancias vesiculares (blebs) y microvellosidades en la línea media ventral. **D:** Detalle de B. Superficie con microvellosidades y cilios aislados en la superficie ventricular adyacente a la línea media ventral. **E:** Detalle de B. Superficie con cilios muy cortos y gruesos en células delimitadas por microvellosidades.



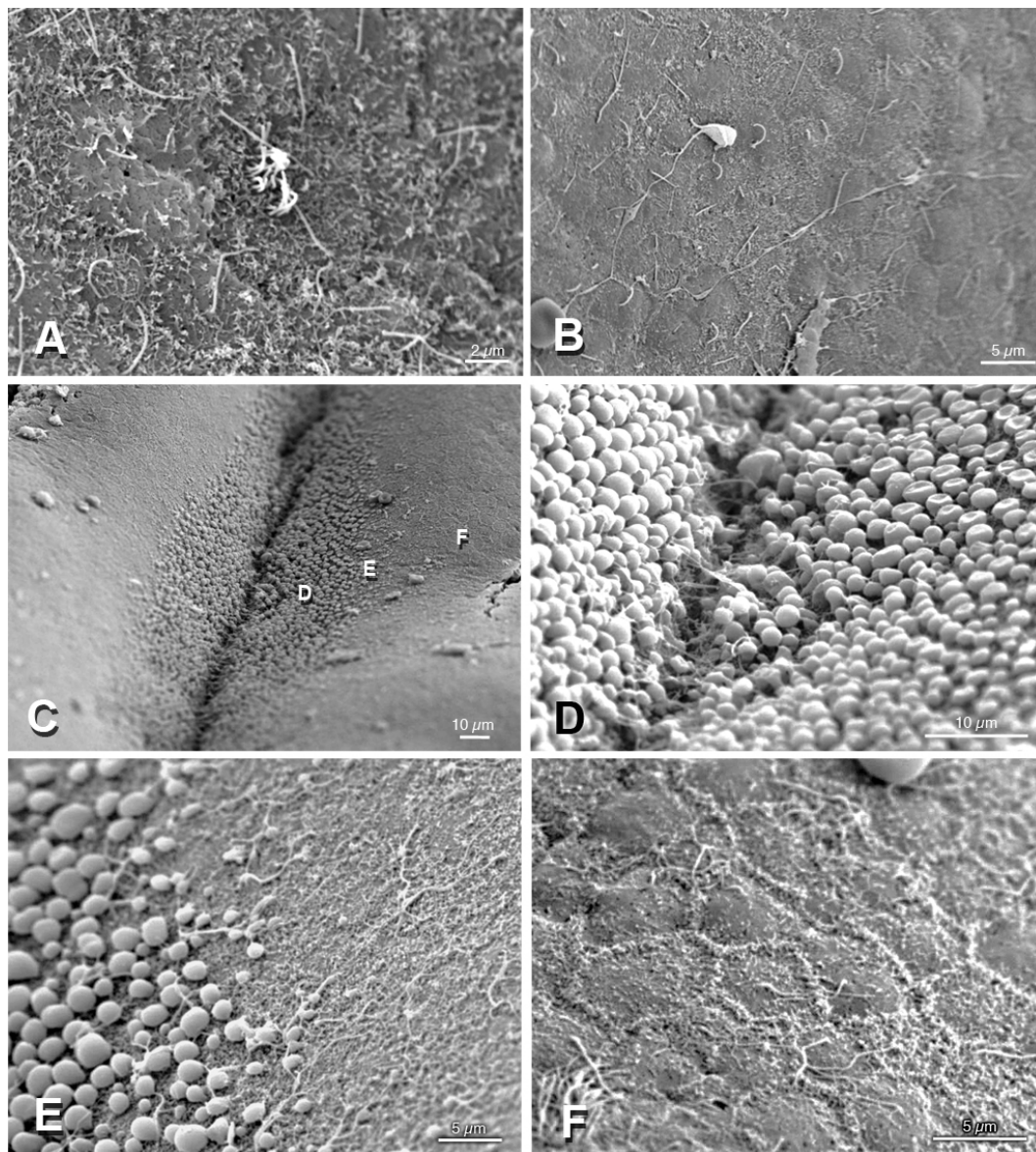
**Figura 19.-** Superficie ventricular de la placa alar mesencefálica en E16,5. MEB.

**A:** Encéfalo seccionado a través de la línea media sagital. Flecha: zona ampliada en B. **B:** Panorámica del techo (placa alar) del colículo superior. **C:** Detalle del área encuadrada en B. Superficie ventricular cubierta por algunas protuberancias vesiculares y algunos penachos de cilios cortos unidos apicalmente.

## 1.5. Superficies ventriculares presentes en P1

En los encéfalos de ratones normales en P1, se observan los primeros penachos claramente multiciliados. Éstos aparecen en las regiones adyacentes a la línea media ventral (Fig. 20A) y dorsal rombencefálica. Las células

multiciliadas presentan una superficie apical cubierta por microvellosidades a diferencia de las células uniciliadas cercanas que presentan una superficie apical con una apariencia lisa o poco rugosa (Fig. 20A). En las zonas laterales de la placa basal y alar rombencefálica la superficie era de tipo II, con células uniciliadas delimitadas por microvellosidades y superficie apical lisa (Fig. 20B).



**Figura 20.-** Superficie ventricular de las placa basal rombencefálica y mesencefálica en P1. MEB.

**A-B:** Superficie ventricular de la placa basal rombencefálica. **A:** Superficie cercana a la línea media ventral. **B:** Zona lateral a la mostrada en A. **C-F:** Placa basal mesencefálica. **C:** Suelo del acueducto medio-caudal. Las letras D, E y F señalan las regiones mostradas, respectivamente, en las figuras D, E y F. **D:** Superficie de la línea media con superficie presentando protuberancias vesiculares. **E:** Superficie adyacente a la línea media. **F:** Superficie lateral a la línea media ventral.

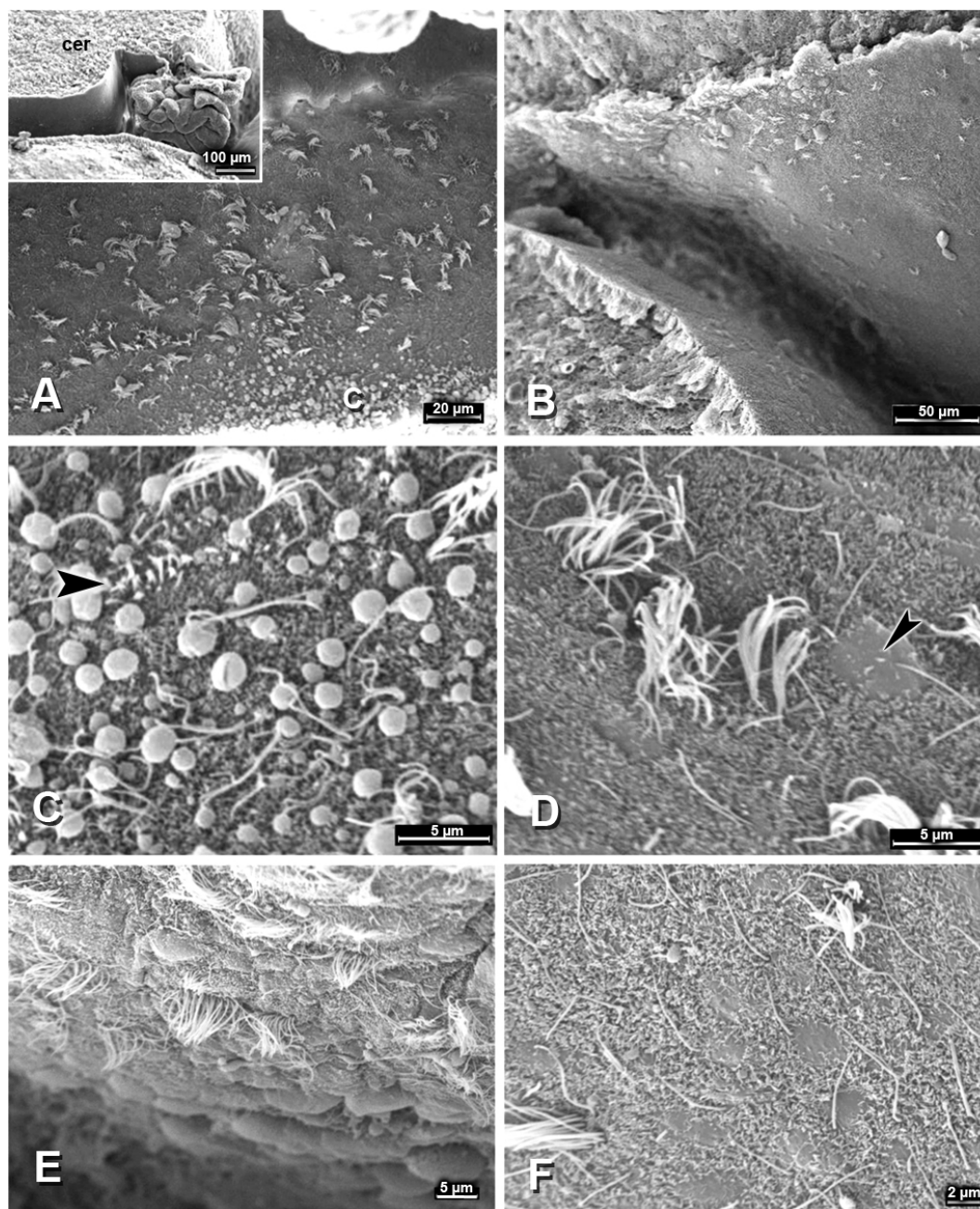
## 1.6. Superficies ventriculares presentes en P3

La superficie del 4V de ratones normales en P3 muestra diferencias zonales según la distancia a la línea media (Fig. 21).

En la superficie ventral de placa basal rombencefálica, (Fig. 21A) la línea media está cubierta por *blebs* y cilios únicos largos (Fig. 21C). Adyacente a la línea media se encuentran algunas células multiciliadas y algún penacho de cilios corto (Fig. 21C, D). En la región lateral, es posible cilios únicos (cabeza de flecha en Fig. 21D) que pueden estar en superficies lisas o con microvellosidades.

En el techo del cuarto ventrículo (Fig. 21B) la superficie es similar a la ventral aunque no se han encontrado *blebs*. También existen penachos de cilios en la región cercana a la línea media (Fig. 21E) y que son más escasos según la distancia de ésta (Fig. 21F).

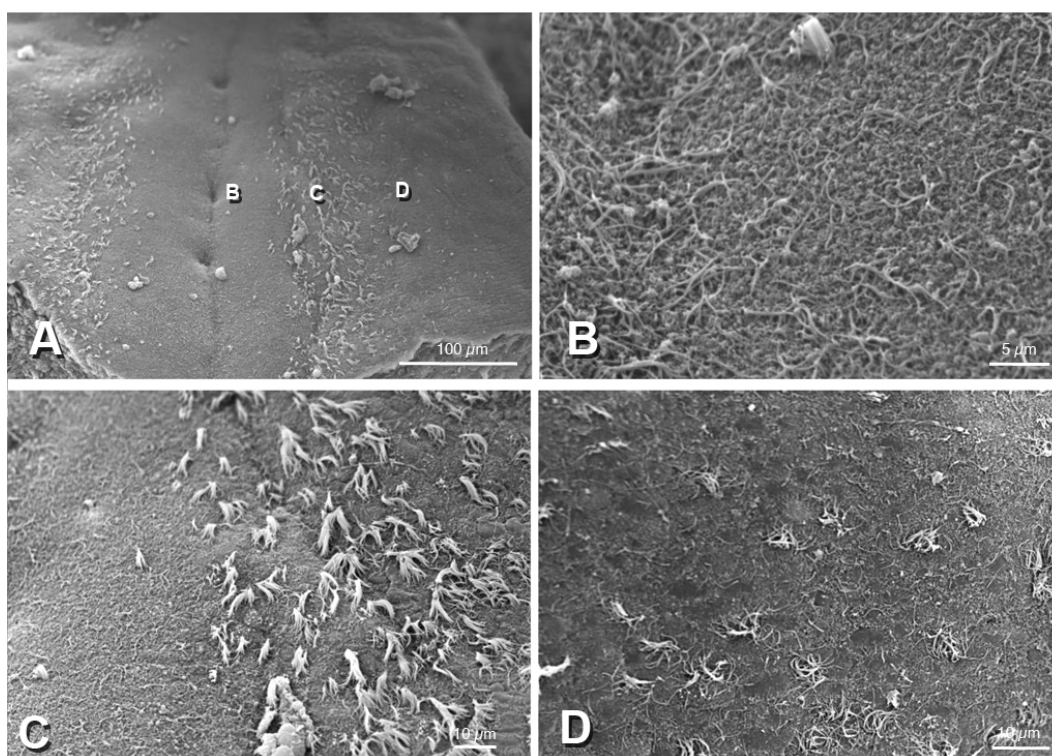
El suelo del acueducto cerebral en P3 (Fig. 22A) presenta una línea media con microvellosidades, pequeñas protuberancias vesiculares y cilios largos que no forman penachos (Fig. 22B). La superficie que corre paralela a la línea media ventral (Fig. 22A, C) está cubierta por penachos de cilios unidos apicalmente mezclados con algunos cilios aislados. En la superficie lateral de suelo del acueducto cerebral, aparecen tanto penachos de cilios como un sólo cilio rodeados por microvellosidades (Fig. 22D). En esta superficie ventro-lateral del acueducto, las superficie apical de las células monociliadas o biciliadas es lisa mientras que donde aparecen penachos de cilios la superficie apical presenta microvellosidades (Fig. 22D).



**Figura 21.-** Superficie ventricular rombencefálica en P3. MEB.

**A:** Suelo del 4V. La letra C señala el detalle mostrado en C. **Inserto:** Techo del 4V. **B:** Techo del acueducto cerebral caudal y 4V. **C:** Superficie ventricular adyacente a la línea media en el suelo del 4V. Cabeza de flecha: penachos de cilios cortos. **D:** Suelo del 4V lateral a la línea media. Cabeza de flecha: superficie de célula con un cilio único. **E y F:** Techo del acueducto cerebral adyacente a la línea media. **Abreviatura:** cer, cerebelo.

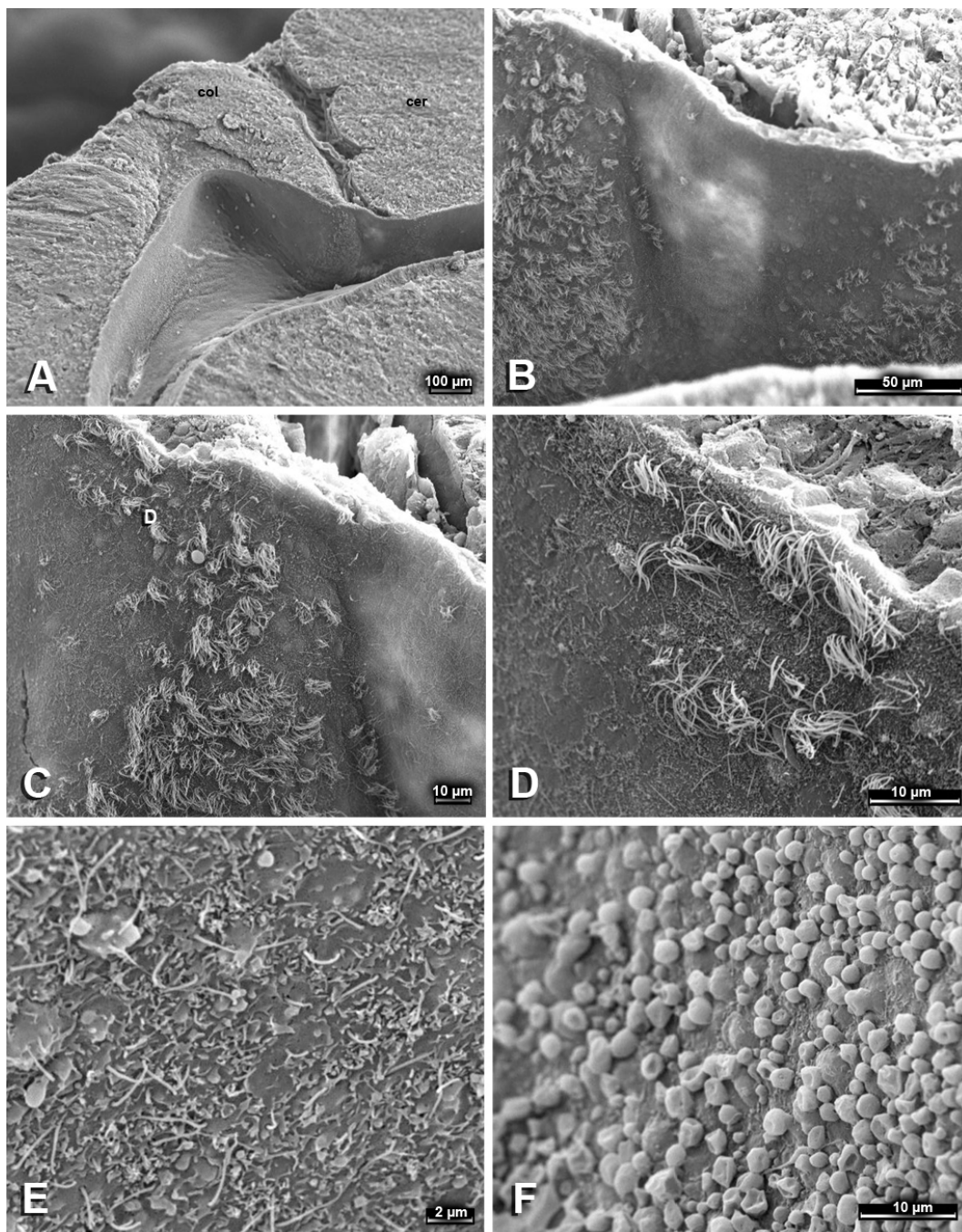




**Figura 22.-** Superficie ventricular mesencefálica en P3. MEB.

**A:** Superficie ventricular del suelo del acueducto cerebral caudal. Las letras B, C y D señalan las regiones mostradas, respectivamente, en B, C y D. **B:** Superficie ventricular en la línea media ventral. **C:** Detalle de la superficie ventricular adyacente a la línea media (en la izquierda de la micrografía). **D:** Superficie ventricular en la región lateral a la línea media.

En la paredes laterales, correspondiendo con la placa alar mesencefálica (acueducto cerebral) aparece una superficie formada tanto por un sólo cilio largo como por penachos de cilios. La superficie ventricular del receso colicular y de la parte caudal del techo del acueducto cerebral (Fig. 23A), presenta dos zonas en forma triangular cubiertas por penachos de cilios largos (Fig. 23B, C) y entre ambas zonas aparecen células uniciliadas con algún penacho multiciliado ocasional (Fig. 23C, D). Tales triángulos de células multiciliados aparecen a ambos lados de una protuberancia ubicada en el límite dorsal entre el mesencéfalo y rombencéfalo, correspondiendo posiblemente a la zona ístmica (Fig. 23B, C).



**Figura 23.-** Superficie ventricular mesencefálica en P3. MEB.

**A:** Acueducto medial y caudal. **B:** Superficie ventricular del techo del acueducto en la transición entre el acueducto cerebral y 4V. **C:** Detalle de la superficie ventricular latero dorsal en el colículo inferior. **D:** Detalle de C. **E:** Superficie ventricular adyacente a la línea media dorsal del colículo superior. **F:** Superficie ventricular de la pared latero-dorsal del colículo superior. **Abreviaturas:** cer, cerebelo; col, colículo inferior.

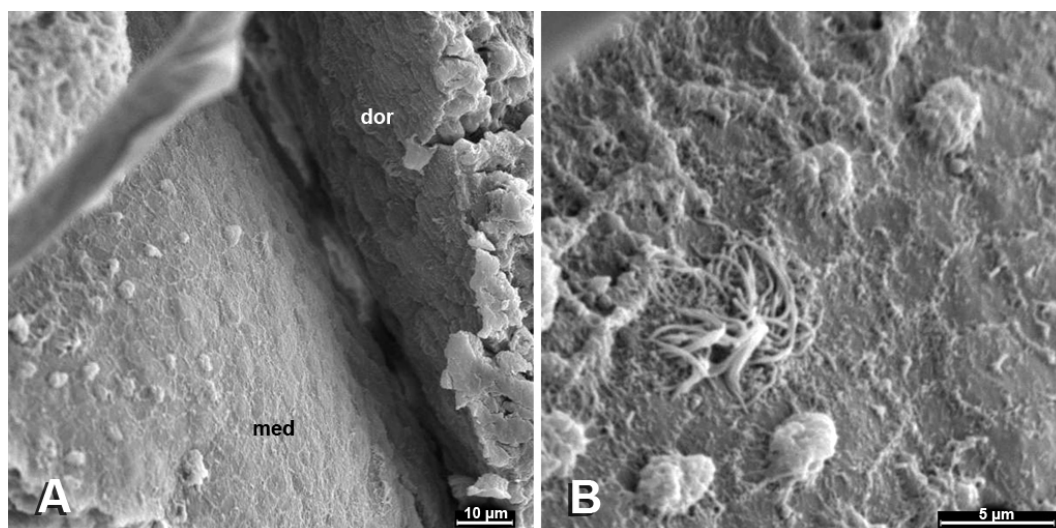
La superficie uniciliada presente en el receso colicular presenta cilios largos, superficie apical lisa y con células contorneadas por microvellosidades (Fig. 23D).

En el receso colicular rostral, la superficie ventricular de la línea media aparece uniciliada y lisa con microvellosidades en los contornos celulares (Fig. 23E), mientras que en la pared dorso-lateral del está cubierta por protuberancias vesiculares y desprovista de cilios (Fig. 23F).

En el acueducto cerebral rostral, tanto en su zona ventral como dorsal, se pueden encontrar algunos penachos de cilios entre una mayoría de cilios aislados largos. En la superficie cercana a la línea media dorsal aparecen *blebs*.

En la región del tercer ventrículo ventral, correspondiente a la superficie diencefálica, se encuentran cilios aislados largos y algún penacho de cilios.

La superficie ventricular telencefálica correspondiente a los VL muestra cilios cortos en una superficie apical lisa y rodeados por microvellosidades (Fig. 24A, B). También aparecen algunos penachos cortos de cilios unidos apicalmente (Fig. 24B). El aspecto de las paredes medial y dorsal del VL parece idéntico. En la pared lateral del VL, la superficie presenta cilios cortos sin microvellosidades y algunos penachos de cilios cortos no unidos apicalmente.



**Figura 24.-** Superficie ventricular telencefálica en P3. MEB.  
**A:** Superficie medial y dorsal del ventrículo lateral izquierdo. **B:** Detalle de la superficie medial del ventrículo lateral. **Abreviaturas:** dor, dorsal; med, medial.

## 1.7. Superficies ventriculares presentes en P5

En P5, la superficie ventricular en el rombencéfalo está cubierta por penachos de cilios densos.

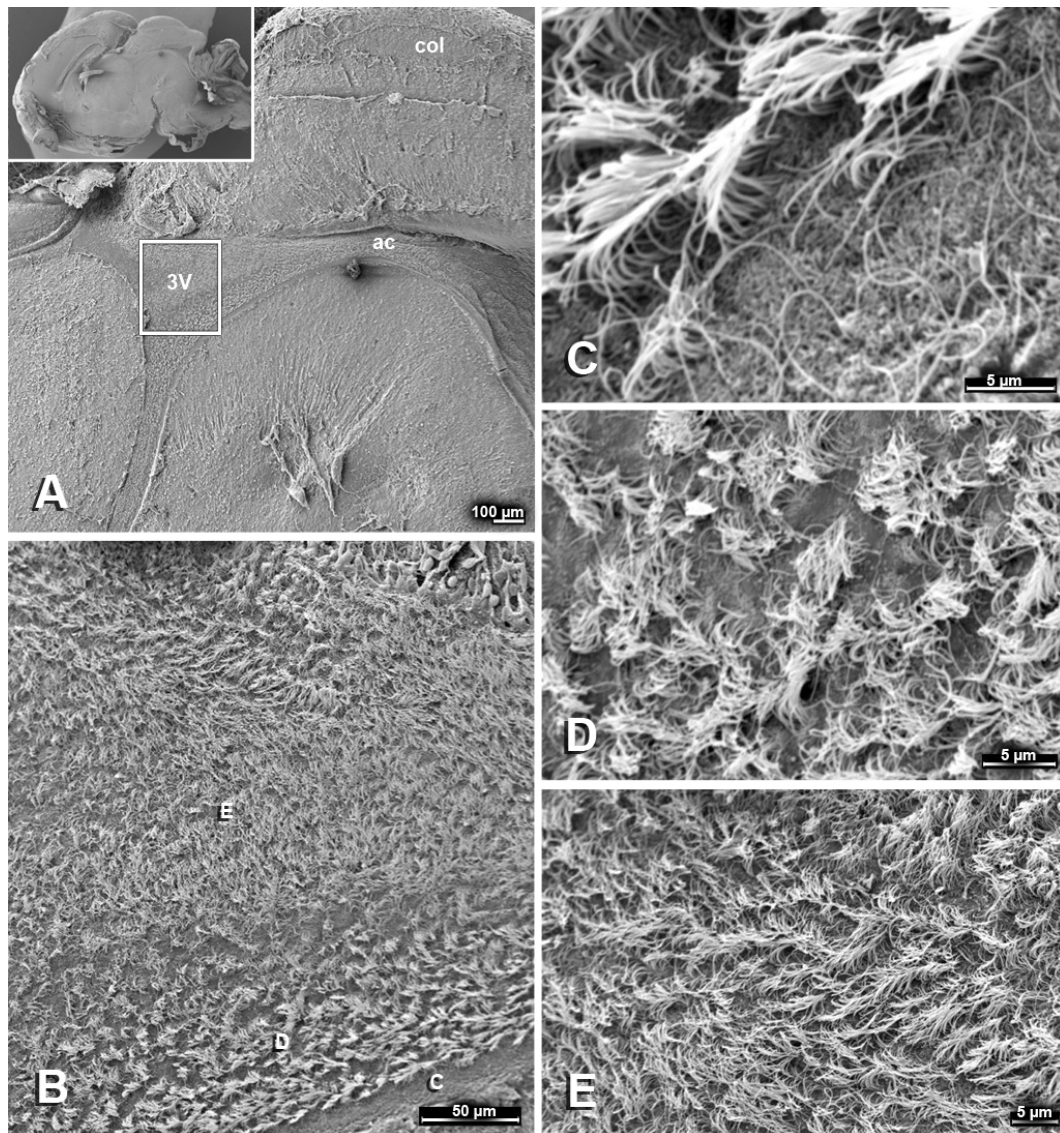
Rostralmente, en el mesencéfalo, el acueducto cerebral también presenta una superficie multiciliada, aunque la línea media del suelo está cubierta por células uniciliadas.

El receso colicular presenta distintos tipos de superficies. Las paredes laterales y dorsales están tapizadas por una superficie formada por penachos de cilios y cilios aislados. Adicionalmente, en la pared dorso-lateral del receso existen abundantes protuberancias vesiculares.

En el diencefalo caudal, el tercer ventrículo (Fig. 25) está tapizado por una superficie multiciliada (Fig. 25B). Se pueden distinguir tres zonas en función a la densidad y orientación de los cilios (Fig. 25D, E). La línea media ventral está compuesta por células monociliadas o biciliadas (Fig. 25B, C).

**Figura 25.-** Superficie ventricular diencefálica caudal en P5. MEB.  
**A:** Sección en la línea media mostrando el sistema ventricular en la región diencefálica y mesencefálica. Inserto: panorámica del encéfalo de P5 seccionado sagitalmente. **B:** Zona de la superficie ventricular diencefálica caudal encuadrada en A. Las letras C, D y E señalan las regiones mostradas, respectivamente, en C, D y E. **C:** Superficie ventricular en la línea media ventral. **D:** Superficie ventricular en la pared latero-ventral del 3V. **E:** Superficie ventricular en la pared latero-dorsal del 3V.

**Abreviaturas:** 3V, tercer ventrículo; ac, acueducto cerebral; col, colículo.

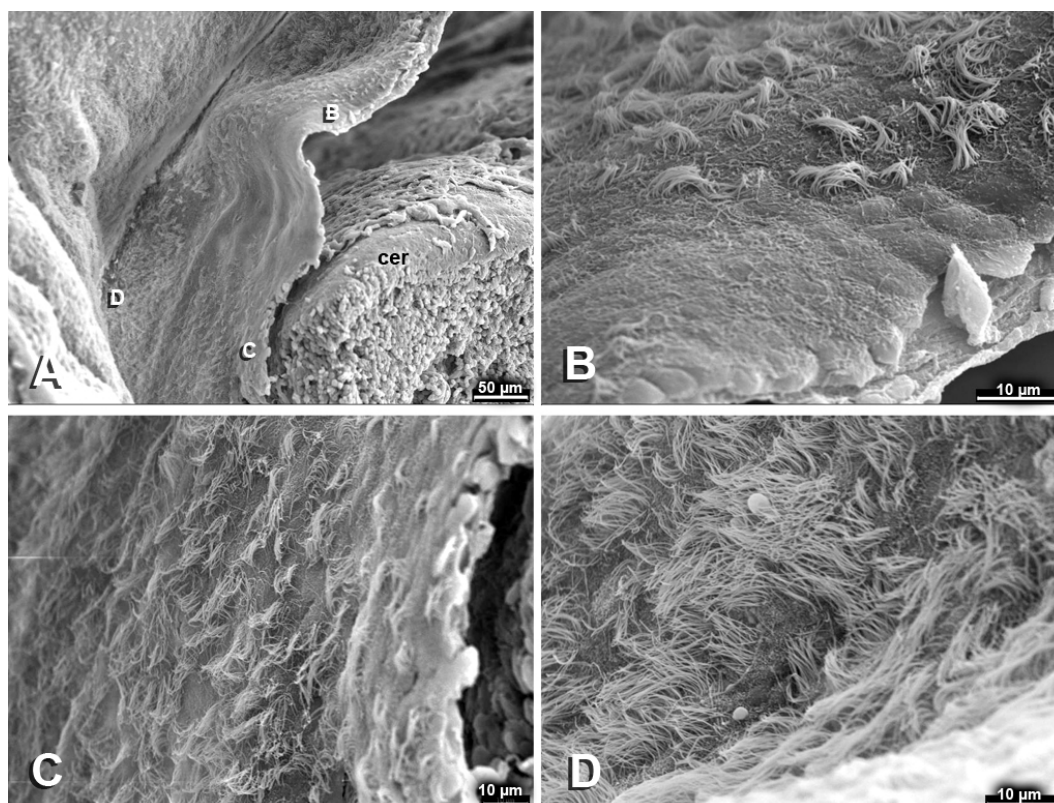


### 1.8. Superficies ventriculares presentes en P9

La superficie ventricular que recubre el cuarto ventrículo dorsal y ventral está formada por penachos de cilios en toda su extensión, excepto en la línea media que presenta una superficie uniciliada. En el techo del cuarto ventrículo rostral, la superficie es tipo III, con penachos de cilios y cilios largos aislados.

En el acueducto cerebral, el suelo presenta una superficie similar a la del 4V,

exceptuando la línea media ventral, en la que aparecen *blebs* mezclados con cilios largos.



**Figura 26.-** Superficie ventricular del techo del mesencéfalo a nivel caudal del acueducto cerebral caudal en P9. MEB.

**A:** Vista de receso colicular y acueducto caudal. Las letras B, C y D señalan los detalles mostrados, respectivamente, en B, C y D. **B:** Superficie ventricular recubierta de células uniciliadas, adyacente a la línea media dorsal. **C:** Superficie ventricular recubierta de células multiciliadas adyacente a la línea media dorsal. **D:** Superficie ventricular recubierta de células multiciliadas en una zona latero-dorsal del receso colicular. **Abreviatura:** cer, cerebelo.

El techo del acueducto cerebral caudal presenta una superficie multiciliada excepto en una región concreta (Fig. 26A, B), cercana a la línea media en la que persiste una superficie uniciliada.

En el receso colicular, la superficie es multiciliada con una mayor densidad de cilios según la distancia a la línea media dorsal (Fig. 26B, C, D).

## 1.9. Superficies ventriculares presentes en P14

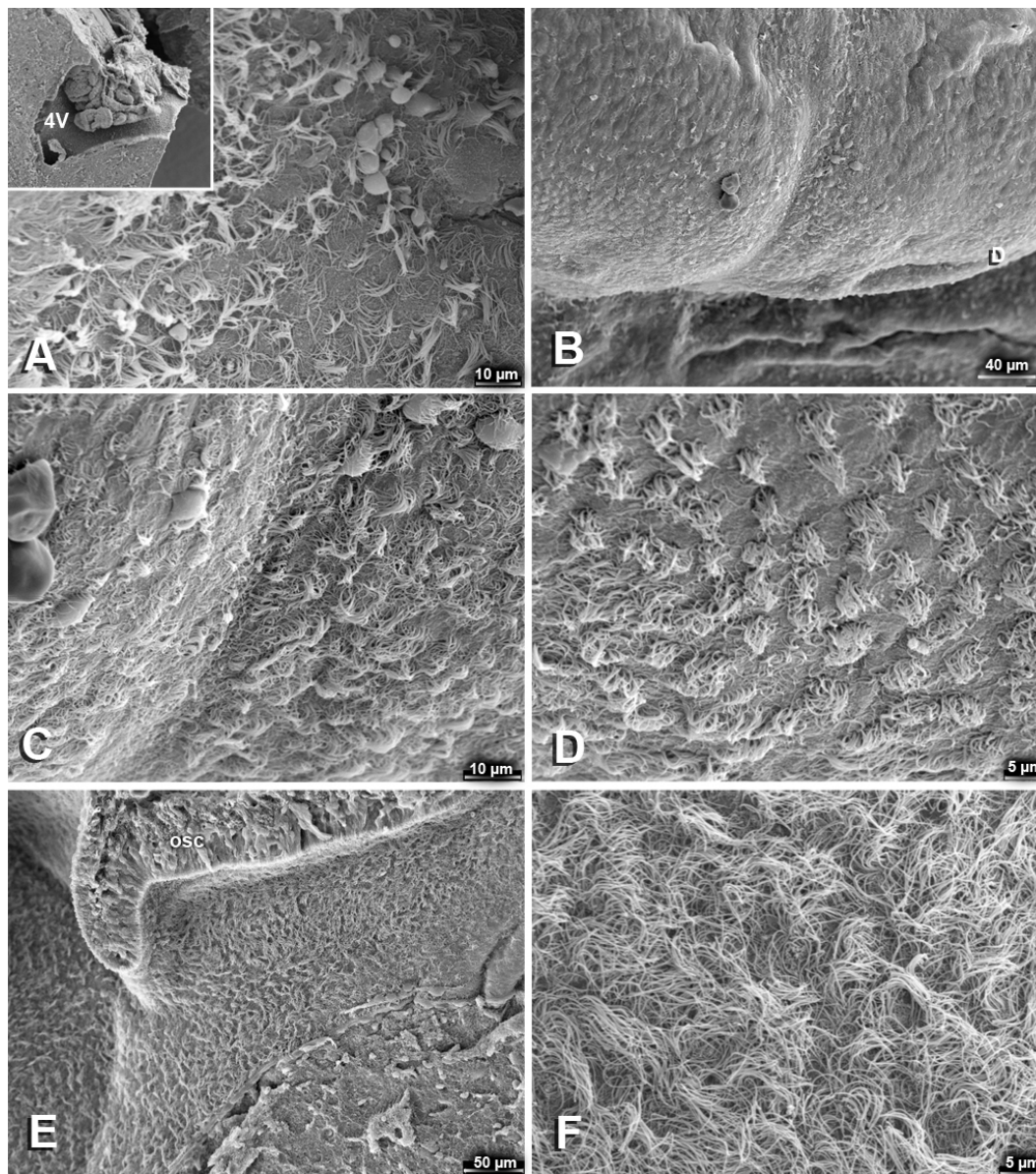
Tapizando el cuarto ventrículo (4V) existe una superficie multiciliada en la que se mezclan células posiblemente uniciliadas (Fig. 27A-D). En el techo del 4V (Fig. 27B). Al mismo tiempo, la línea media está tapizada por células uniciliadas.

El suelo del 4V y del acueducto cerebral caudal (Fig. 28) están cubiertos por penachos de cilios, más densos en la zona adyacente a la línea media ventral (Fig. 28B, D) que en las áreas laterales (Fig. 28B, E). En la línea media ventral aparecen cilios largos aislados y *blebs* (Fig. 28B, C)

En el receso colicular que ocupa el techo del mesencéfalo (Fig. 29A-B), la superficie ventricular está tapizada por penachos densos de cilios tanto en la parte rostral (Fig. 29C) como en la caudal (Fig. 29E).

La superficie que recubre las paredes laterales del acueducto y del tercer ventrículo (3V) está formada por células multiciliadas (Fig. 27E-F).

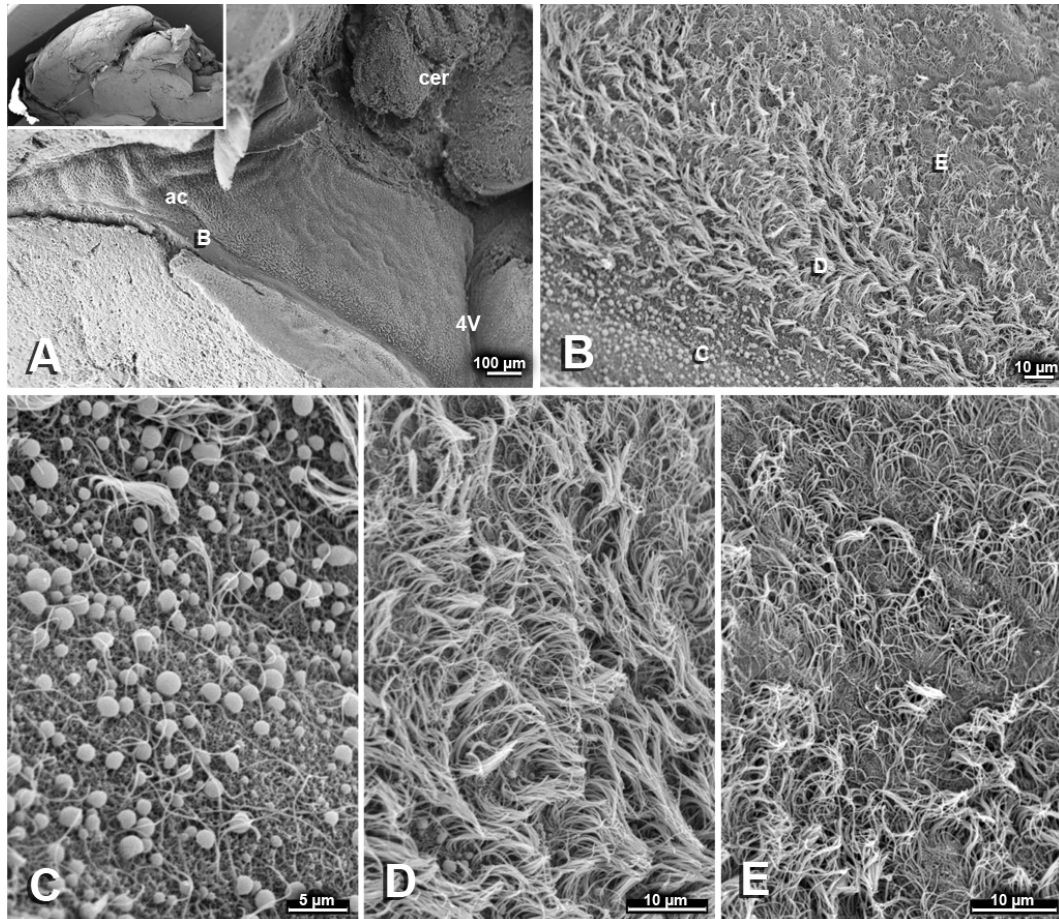
La superficie ventricular del acueducto cerebral caudal presenta una zona donde persisten células con largos cilios únicos (Fig. 29A, D, G) en la que a veces aparece algún penacho multiciliado. Las zonas adyacentes presentan una superficie tapizada por penachos multiciliados (Fig. 29D, F) aunque en menor densidad que en la superficie del receso colicular (Fig. 29C, E).



**Figura 27.-** Superficie ventricular del rombencéfalo (4V) y diencefalo (3V) en P14. MEB.

**A:** Suelo del 4V rostral. Inserto: vista panorámica del 4V seccionado sagitalmente. **B:** Techo del 4V. La letra D señala la región mostrada en la figura D. **C:** Línea media del techo del 4V. Detalle de B. **D:** Detalle de la región lateral del techo del 4V. Detalle de B. **E:** Vista del 3V a la entrada del acueducto (órgano subcomisural). **F:** Superficie del 3V a la entrada del acueducto. **Abreviaturas:** 4V, cuarto ventrículo; osc, órgano subcomisural.

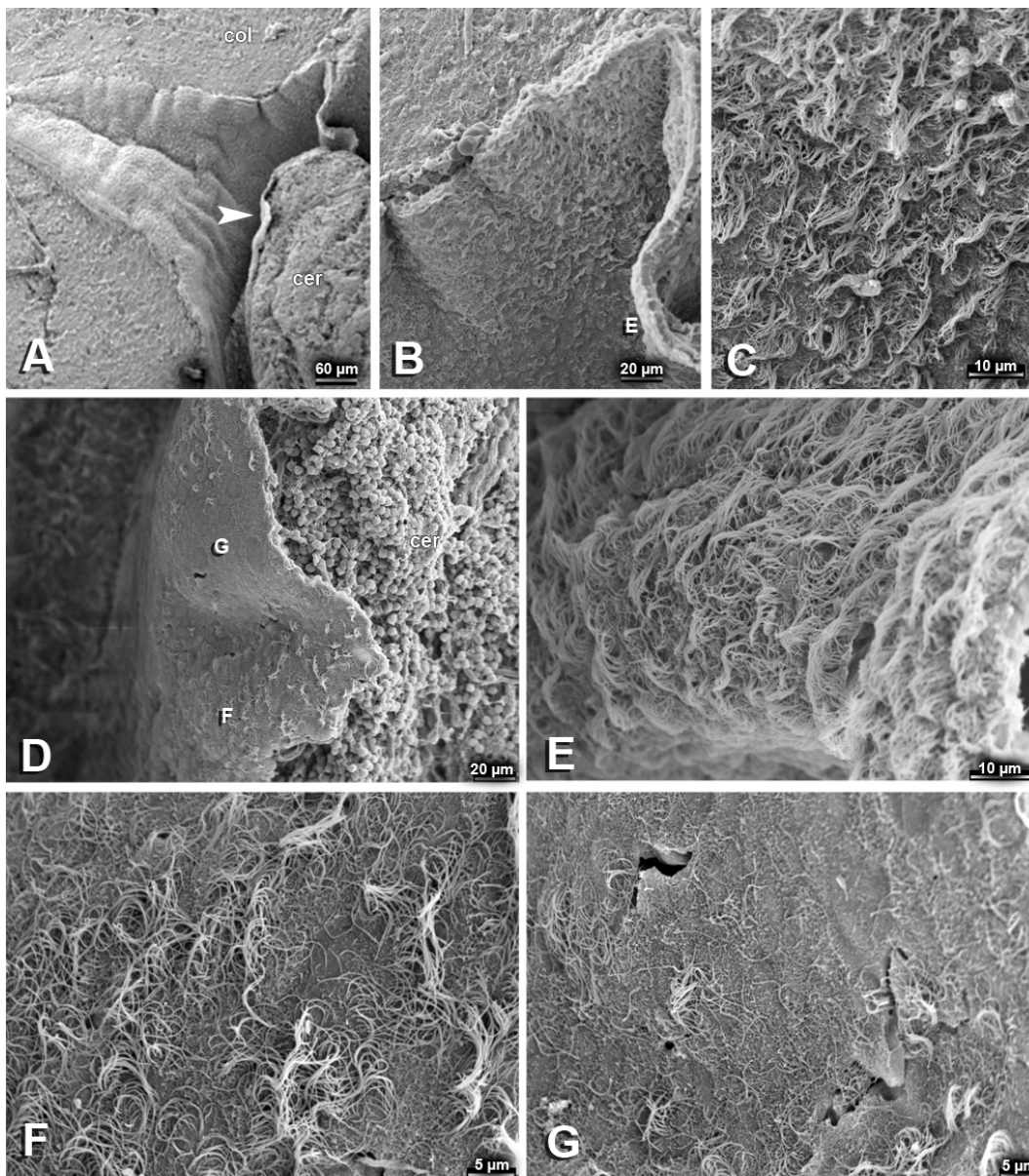




**Figura 28.-** Superficie ventricular del suelo del acueducto cerebral caudal en P14. MEB.

**A:** Superficie ventral del suelo del acueducto cerebral caudal y del cuarto ventrículo. Inserto: panorámica del encéfalo seccionado sagitalmente mostrando el suelo del acueducto y 4V. **B:** Suelo del acueducto en el que se observan las diferencias entre la línea media y las zonas laterales adyacentes. Las letras C, D y E señalan, respectivamente, las regiones mostradas en C, D y E. **C:** Línea media ventral. **D:** Superficie adyacente a la línea media ventral. **E:** Superficie ventro-lateral del acueducto caudal.

**Abreviaturas:** 4V, cuarto ventrículo; ac, acueducto cerebral; cer, cerebelo.

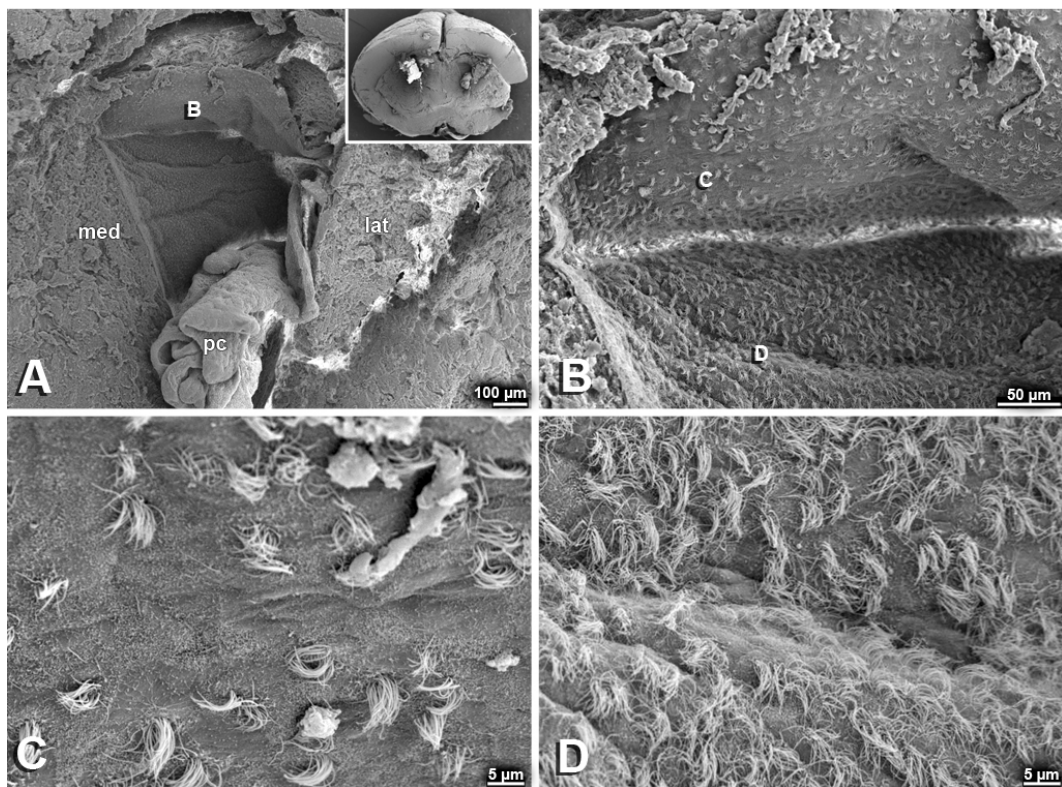


**Figura 29.-** Acueducto cerebral y receso colicular en P14. MEB.

**A:** Vista del acueducto, receso colicular, y la comunicación con el cuarto ventrículo. Cabeza de flecha: zona detallada en D. **B:** Detalle de A mostrando la superficie del receso colicular. La letra E señala la región detallada en la figura E. **C:** Detalle de B en la superficie que recubre rostralmente el receso colicular. **D:** Región señalada en A con cabeza de flecha, correspondiente al techo del acueducto cerebral caudal. Las letras F y G señalan, respectivamente, las regiones detalladas en F y G. **E:** Región detallada de B mostrando la superficie del receso colicular caudal. **F:** Detalle de la región mostrada en D recubierta de células multiciliadas. **G:** Detalle de la región mostrada en D recubierta principalmente por células uniciliadas. **Abreviaturas:** cer, cerebelo; col, colículo.

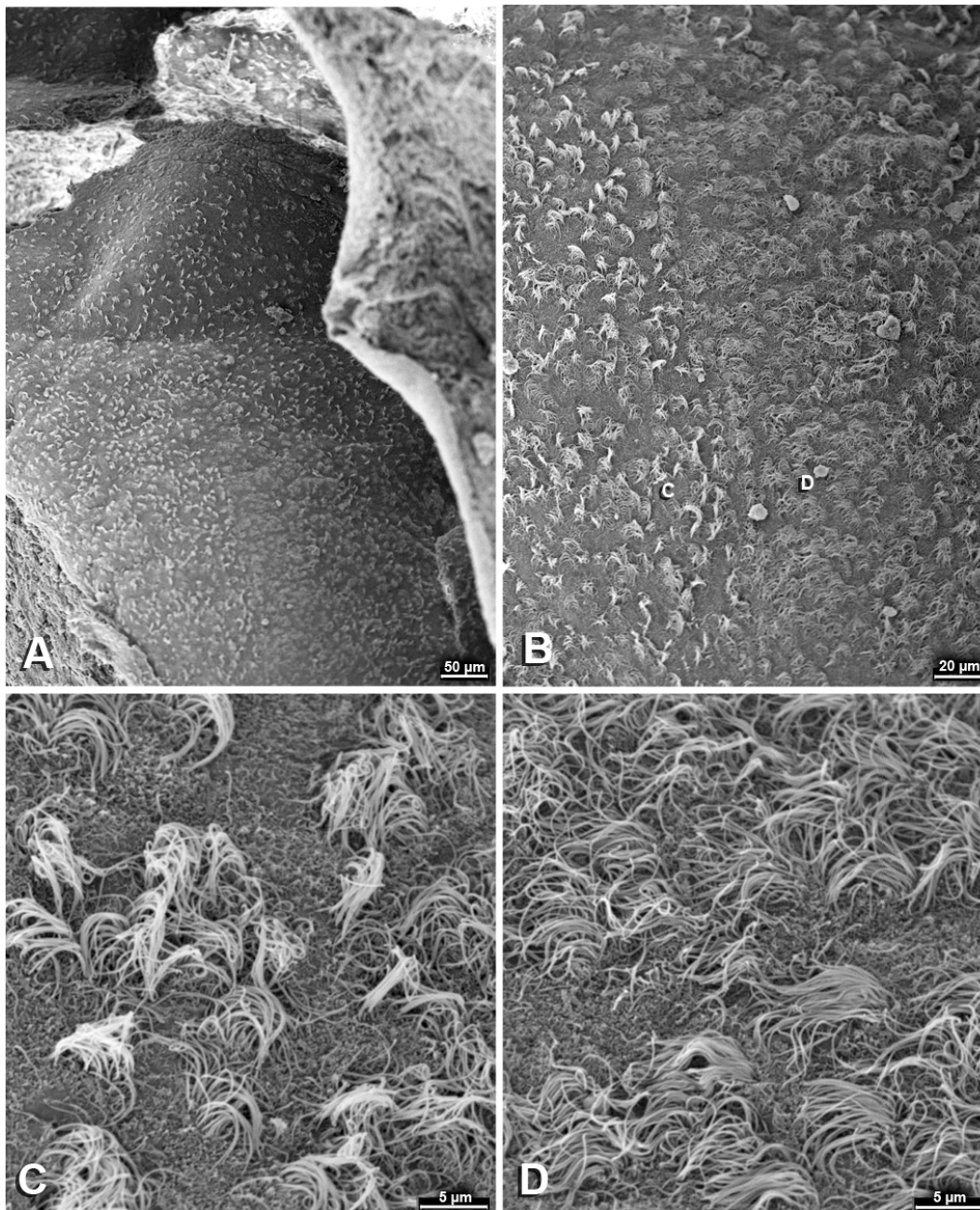
En el telencéfalo de ratones de P14, la superficie ventricular está formada por paredes de tipo III (células uniciliadas y multiciliadas mezcladas en distinta proporción).

La superficie del VL rostral está cubierta por penachos de cilios y células uniciliadas (Fig. 30). La superficie está cubierta de microvellosidades pero los límites celulares no se distinguen claramente (Fig. 30C). La superficie medial del VL (Fig. 30B, D) está cubierta por penachos de cilios y algunos cilios aislados en contraposición a la pared dorsal del VL (Fig. 30B, C) donde se observan células uniciliadas entre las multiciliadas.



**Figura 30.-** Superficie ventricular medial y dorsal del VL en P14. MEB.

**A:** Panorámica del VL derecho. Inserto: encéfalo en P14 seccionado transversalmente para dejar expuesta la superficie ventricular de los VL a nivel rostral. **B:** Paredes dorsal y medial del VL. Las letras C y D señalan, respectivamente, las regiones mostradas en C y D. **C:** Superficie ventricular de la pared dorsal del VL rostral. **D:** Detalle de la superficie ventricular de la pared medial del VL. **Abreviaturas:** med, medial; lat, lateral; pc, plexos coroideos.



**Figura 31.-** Superficie lateral del VL en P14. MEB.

**A:** Panorámica de la superficie ventricular de la pared lateral del VL. **B:** Detalle de A mostrando diferencias en la superficie ventricular. Las letras C, D y E señalan, respectivamente, las regiones mostradas en C y D. **C:** Detalle de B. **D:** Detalle de B.

En la superficie ventricular lateral de los VL en una zona media, la proporción de células multiciliadas es mayor y apenas se distinguen las células uniciliadas (Fig. 31A-D). Además, se observa una regionalización en la pared lateral (Fig. 31A-B) en forma de triángulo.

### 1.10. Superficies ventriculares presentes en P30

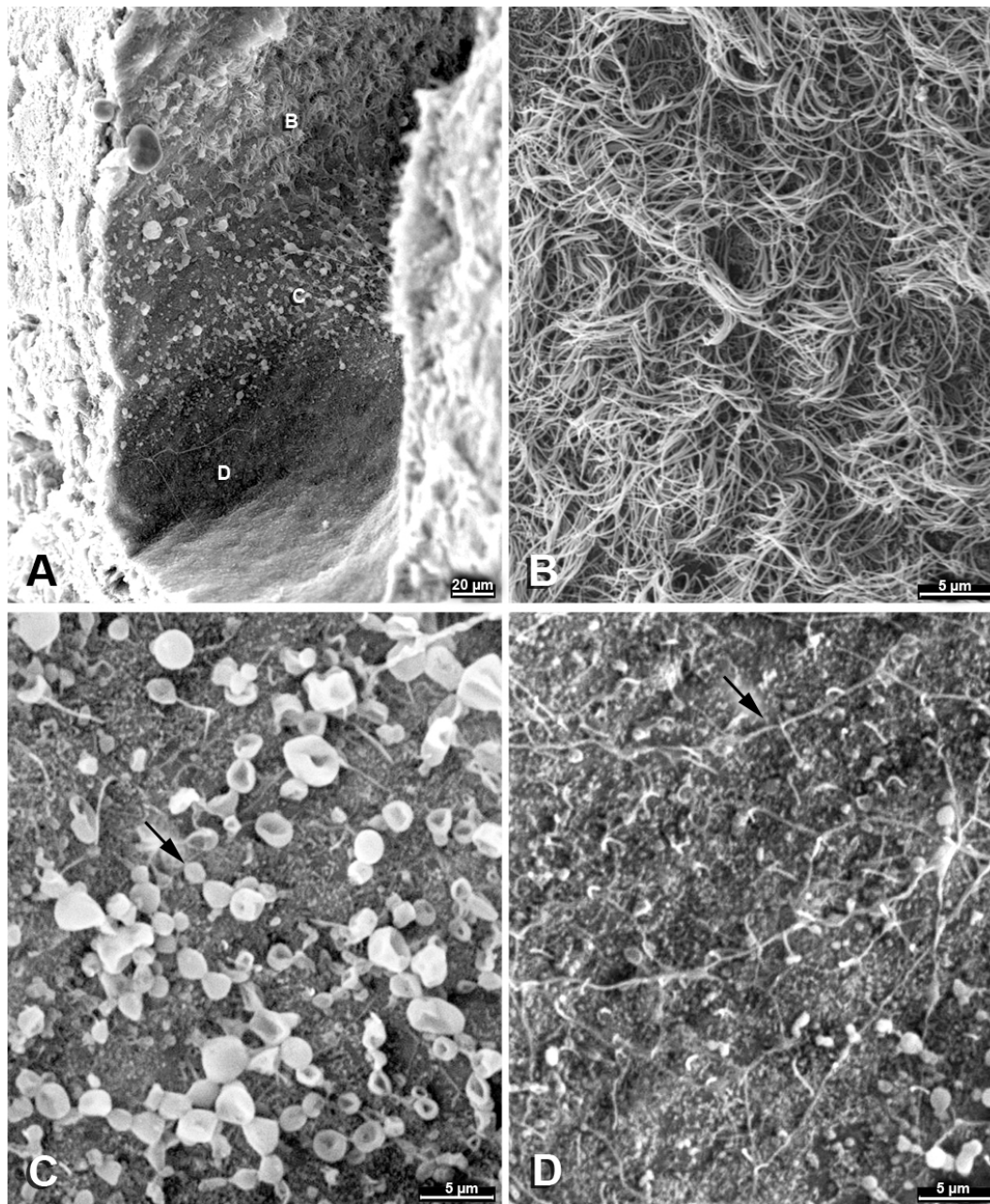
Las superficies ventriculares en P30 son prácticamente en su totalidad del tipo IV (multiciliada). Sin embargo, aparecen zonas que presentan una superficie ventricular distinta.

El suelo del 4V caudal presenta una mezcla de células multiciliadas y uniciliadas (Fig. 15E).

En la línea media ventral del acueducto cerebral y el cuarto ventrículo, la superficie ventricular presenta *blebs* y cilios únicos.

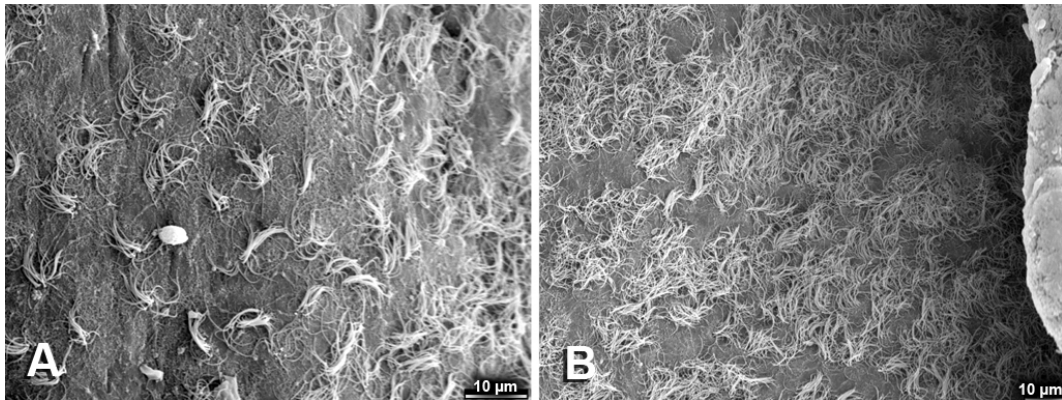
En el tercer ventrículo ventral, la superficie ventricular es multiciliada (Fig. 32A-B). Sin embargo, en las paredes laterales del hipotálamo, la superficie ventricular presenta protuberancias vesiculares (*blebs*) y cilios aislados largos (Fig. 32A, B). La superficie ventricular que recubre la eminencia media está tapizada por cilios cortos únicos y microvellosidades (Fig. 32A, D). También se pueden observar axones supraependimarios en esa región.

Finalmente, la superficie de los VL rostrales (Fig. 32) aparece cubierta de una mezcla de cilios largos únicos y penachos de cilios, ocupando mayor extensión la superficie mono o biciliada en las regiones rostrales (Fig. 33A) que en regiones más caudales (Fig. 33B)



**Figura 32.-** Superficie ventricular de la región ventral del 3V a nivel hipotalámico en P30. MEB.

**A:** Panorámica de una sección frontal del tercer ventrículo ventral al nivel de la eminencia media. Las letras B y D señalan, respectivamente, las regiones mostradas en B y D. **B:** Detalle de A. Superficie ventricular del tercer ventrículo ventral. **C:** Detalle de A. Superficie ventricular de la pared lateral del hipotálamo. Flecha: *bleb*. **D:** Detalle de A. Superficie de la eminencia media. Flecha: axón neuronal supraependimario.



**Figura 33.-** Superficie ventricular del VL en P30. MEB.

**A:** Superficie ventricular dorsal de la región rostral del VL. **B:** Superficie ventricular dorsal del ventrículo lateral a nivel medio.

---

En la tabla 2, se resumen los resultados observados en cuanto a los distintos tipos de superficies encontrados.

Región	E12	E16	P1	P3	P5	P9	P14	P30
<b>Rombencéfalo</b>	1	2	3	3	4	3	3	3
<b>Área ístmica</b>	2	2		3			3	3
<b>Mesencéfalo</b>								
Tectum (Placa alar del mesencéfalo)								
Colículo inferior	1	1	3	3	3	3	3	4
Colículo superior	1	1	3	2	4	3	3	4
Tegmentum mesencefálico (PB mesencefálica)	2	2	3	3	4	3	4	4
<b>Diencefalo primario</b>								
Pretectum (PA p1)	1	1		2	4	4	4	4
Epitálamo y habénula (PA p2)	1	1		2	4		4	4
Tálamo (PA p2)	1	1		2	4		4	4
<b>Zona Limitans Interna (límite p2 y p3)</b>	1	1		3			4	4
Eminencia talámica (PA p3)	1	1		2	4		4	4
Pretálamo (PA p3)	1	1		2	4		4	4
Tegmentum diencefálico (PB p1-p3)	2			3			4	4
<b>Diencefalo secundario y telencéfalo</b>								
Pallium (o corteza)	1	1	0	3			3	3
Subpallium								
Estriado	1	1	0	3			3	3
Pálido	1	1		3			4	4
Área preóptica	1	1						
Área ectopeduncular	1	1						
Hipotálamo alar	1	1						2
Hipotálamo basal	1	1						2

**Tabla 2.-** Tipos de superficies presentes en las cavidades ventriculares desde E12 a P30 en el ratón normal.

p: prosómero; PA: placa alar; PB: placa basal; sd: sin datos; 1: ausencia de cilios; 2: células uniciliadas; 3: células multiciliadas y uniciliadas; 4: células multiciliadas; en blanco: sin datos.



## 2. Agenesia del cuerpo calloso

### 2.1. Estado de las comisuras telencefálicas dorsales de los ratones silvestres y mutantes *hyh*

En el prosencéfalo de los ratones normales (*wt*) recién nacidos (P1) se distinguen, entre los dos hemisferios, el cuerpo calloso, la comisura anterior (Fig. 34A) y la comisura hipocampal (Fig. 34E). Los hidrocefálicos de la misma edad presentan ya al nacer la agenesia de las comisuras telencefálicas dorsales, tanto el cuerpo calloso (Fig. 34B) como la comisura hipocampal (Fig. 34F). Sin embargo tienen una comisura anterior aparentemente normal (Fig. 34B). Los axones que no llegan a cruzar la línea media en los ratones mutantes se acumulan formando una maraña, formando las denominadas fibras de Probst en la zona adyacente a la línea media cortical (Fig. 34B, D). Un dato importante a destacar es que no existe ventriculomegalia en los animales hidrocefálicos en ésta edad de P1, y aún más, los ventrículos laterales parecen más bien colapsados (Fig. 34B) mientras que en los animales no hidrocefálicos aparecen normales (Fig. 34A). Los ratones *hyh* mutantes de P1 presentan un quiste interhemisférico en el lugar donde debiera haberse producido el cruce de la comisura hipocampal y ésta no llega a formarse (Fig. 34F).

Dado que ya al nacer los animales mutantes carecen de comisuras telencefálicas dorsales en la línea media y con el fin de investigar en qué momento se produce la agenesia, se estudió su desarrollo embrionario para averiguar si la agenesia está o no ligada a la ventriculomegalia o a la alteración del epitelio ventricular que sufren estos animales.

En el desarrollo normal del cuerpo calloso, los axones pioneros cingulares cruzan la línea media dorsal telencefálica en E15,5 y guían a los axones callosales que cruzan en E16,5. En ratones silvestres de E17,5 se aprecia el cuerpo calloso bien desarrollado aunque en los embriones mutantes no aparecen axones que hayan cruzado la línea media dorsal (Fig. 35). En los ratones *hyh* de E17,5 los axones se acumulan próximos a la fisura

interhemisférica formando las fibras de Probst (Fig. 35B). A esa edad resulta muy evidente que la agenesia del cuerpo calloso y de la comisura hipocampal no solo no están acompañadas de dilataciones en los ventrículos laterales, sino que incluso éstos parecen estar colapsados (Fig. 35B, D). De la misma forma, tampoco aparece un quiste interhemisférico en la línea media dorsal que pudiera interrumpir la elongación de los axones del cuerpo calloso (Fig. 35B).

Para investigar si la agenesia del cuerpo calloso está producida por un fallo en los axones y/o en las neuronas callosales, se ha procedido a su estudio mediante el anticuerpo anti-NCAM, por marcaje anterógrado con Dil y con hibridación *in situ* para Tag-1 y Tbr-1. Asimismo, también se han estudiado las poblaciones celulares implicadas en el cruce de la línea media telencefálica por el cuerpo calloso.

## 2.2. Neuronas de proyección callosales y sus axones en la formación del cuerpo calloso

En los resultados obtenidos con el anti-NCAM se constata que en los animales *hyh* mutantes, los axones callosales sí se forman y se elongan, pero no cruzan hacia el hemisferio controlateral y generan las fibras de Probst (Fig. 34B, D). La formación de las fibras de Probst ocurre en E16,5, edad en la que los axones callosales de los ratones normales han cruzado la línea media.

En la corteza frontal, se han marcado con Dil las neuronas callosales en animales normales y mutantes en E16,5 (Figs. 36E, F) y en P1 (Figs. 36C, D). Se han elegido estas edades porque corresponden a estadíos en los cuales se está produciendo el cruce de los axones del cuerpo calloso en ratones (E16,5), y el cruce se ha completado (P1). Cuando el cristal de Dil se introduce en la corteza frontal de ratones *wt* en P1, el trazador difunde por los axones de las neuronas callosales marcando los axones del cuerpo calloso (Fig. 36C). Se observan axones marcados en la línea media y en el hemisferio controlateral en la corteza frontal. En los ratones *hyh* mutantes en P1 se aprecia que los axones callosales, si bien se han formado y se elongan hasta la línea media, no la cruzan causando la agenesia (Fig. 36D). Usando la misma técnica en embriones

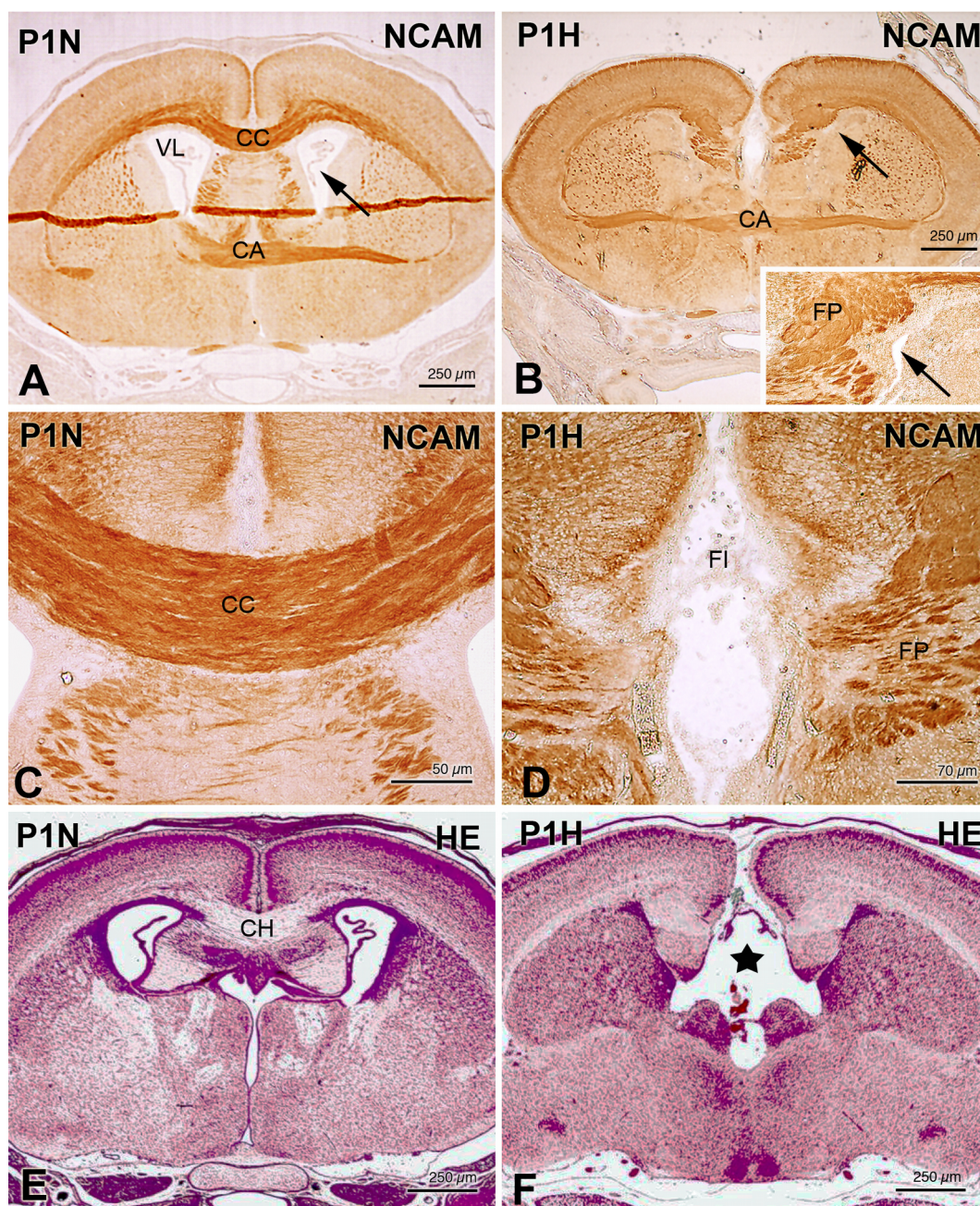
de E16,5 se aprecia que en los ratones silvestres los axones callosales se elongan hacia el hemisferio controlateral a través de la línea media cortical (Fig. 36E), mientras que los axones de los embriones mutantes lo hacen en distintas direcciones erróneas (Fig. 36F).

### 2.3. Señales producidas en la corteza e implicadas en la formación del cuerpo calloso

Las neuronas implicadas en la formación del cuerpo calloso se encuentran localizadas en la neocorteza y expresan los factores de transcripción Tag-1 y Tbr-1. El primero de ellos ayuda a guiar a los axones callosales, y Tbr-1 se expresa en neuronas corticales recién formadas.

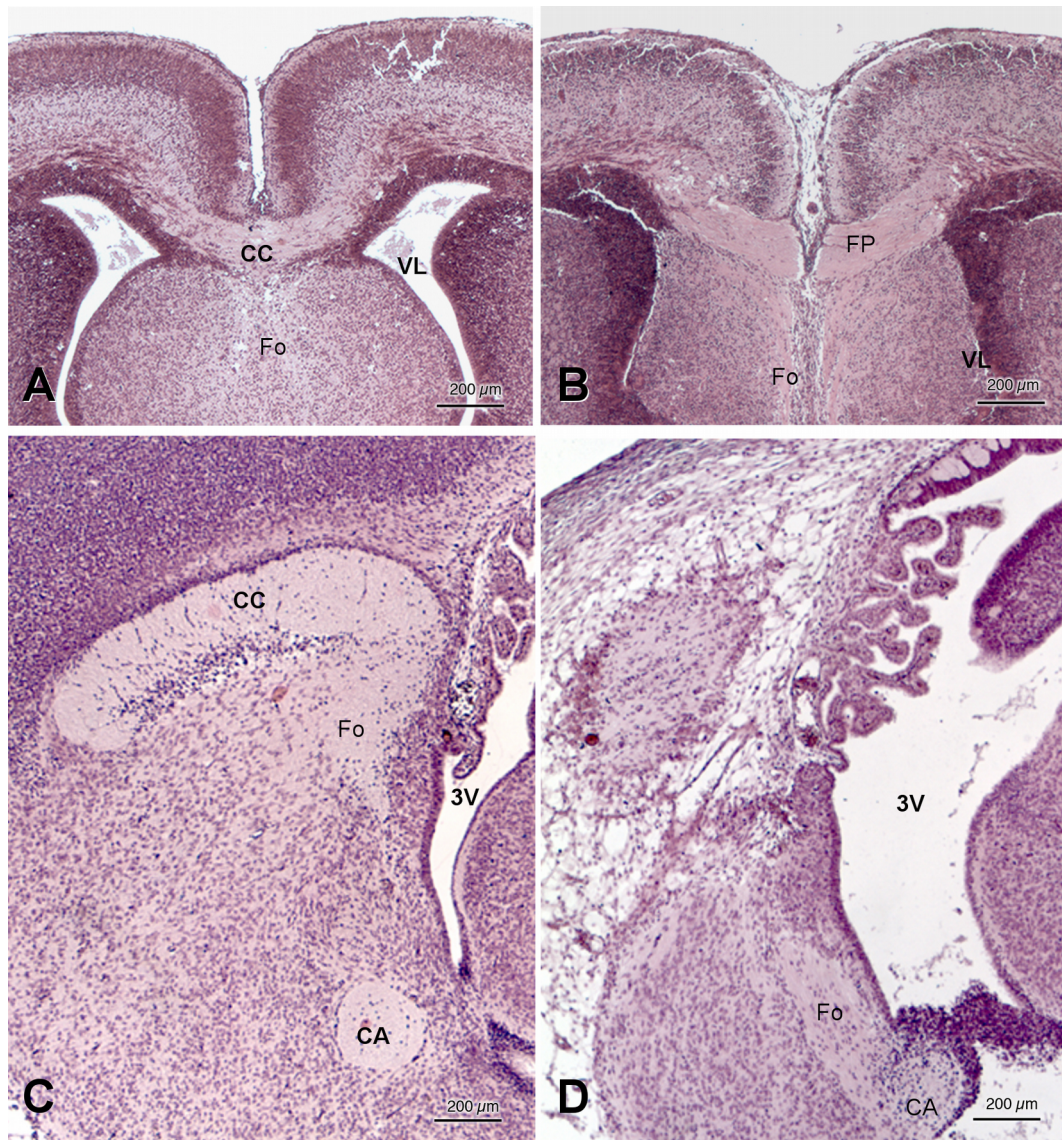
Se ha investigado la expresión de Tag-1 mediante hibridación *in situ* en los embriones *hyh* silvestres y mutantes de la misma camada en E15,5. Mientras que en los embriones normales la expresión se produce en la ZSV y en la placa cortical de la corteza frontal y parietal (Fig. 37), en los mutantes se observa que en la corteza frontal los límites entre capas aparecen difusos y parece haber una mayor expresión de Tag-1 en la ZSV (Fig. 37B). Además, en la corteza cingular se detecta expresión de este gen en la región correspondiente a la *glial wedge* de los embriones normales (Fig. 37C), estando disminuida la expresión en los mutantes (Fig. 37D).

En cuanto a la expresión de Tbr-1 detectada con hibridación *in situ* en embriones *hyh* silvestres en E15,5 se detectan neuronas en la corteza frontal (Fig. 38A, C) y cingular (Fig. 38A, E). En los hermanos mutantes de la misma edad, Tbr1 también se expresa en la corteza frontal (Fig. 38B, D) y cingular (Fig. 38B, F). Sin embargo, en la corteza frontal de los embriones *hyh* mutantes (Fig. 38D) la marca de Tbr-1 es menos intensa que la de los embriones normales (Fig. 38C). En la corteza cingular de los mutantes (Fig. 38F) la expresión de Tbr-1 aparece más intensa y más definida en contraposición a la expresión en los embriones silvestres (Fig. 38E).



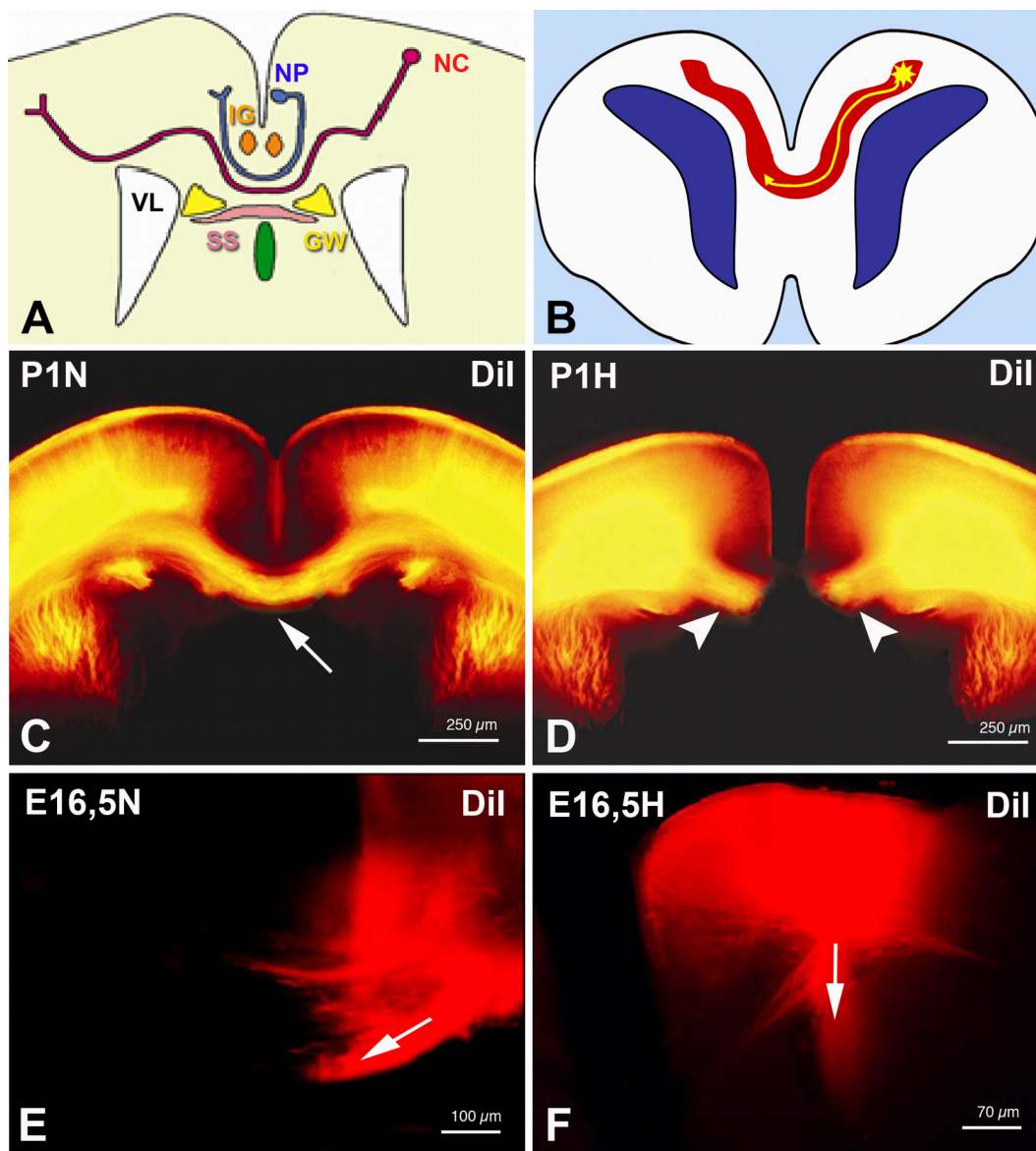
**Figura 34.-** Agenesia de cuerpo calloso y de la comisura hipocámpal en ratones hidrocefálicos en P1.

**A-B:** Secciones transversales de un animal normal (A) y de un hidrocefálico (B), inmunoteñidos con anti-NCAM. En el mutante se observa la agenesia del cuerpo calloso (CC) y las fibras de Probst (FP). Obsérvese que el ventrículo lateral del hidrocefálico (flecha) no sólo no presenta ventriculomegalia sino que está disminuido en tamaño. La comisura anterior (CA) sí se forma en los animales mutantes. **C-D:** Detalle de las imágenes anteriores en la que se observan en el hidrocefálico las FP. **E-F:** Secciones transversales a nivel de la comisura hipocámpal (CH) de un animal normal (E) y otro hidrocefálico (F) teñidas con hematoxilina eosina. Se observa la ausencia de la CH en los animales mutantes y en su lugar aparece un quiste interhemisférico (asterisco). **Abreviaturas:** CA, comisura anterior; CC, cuerpo calloso; CH, comisura hipocámpal; FI, fisura interhemisférica; FP, fibras de Probst; VL, ventrículo lateral.



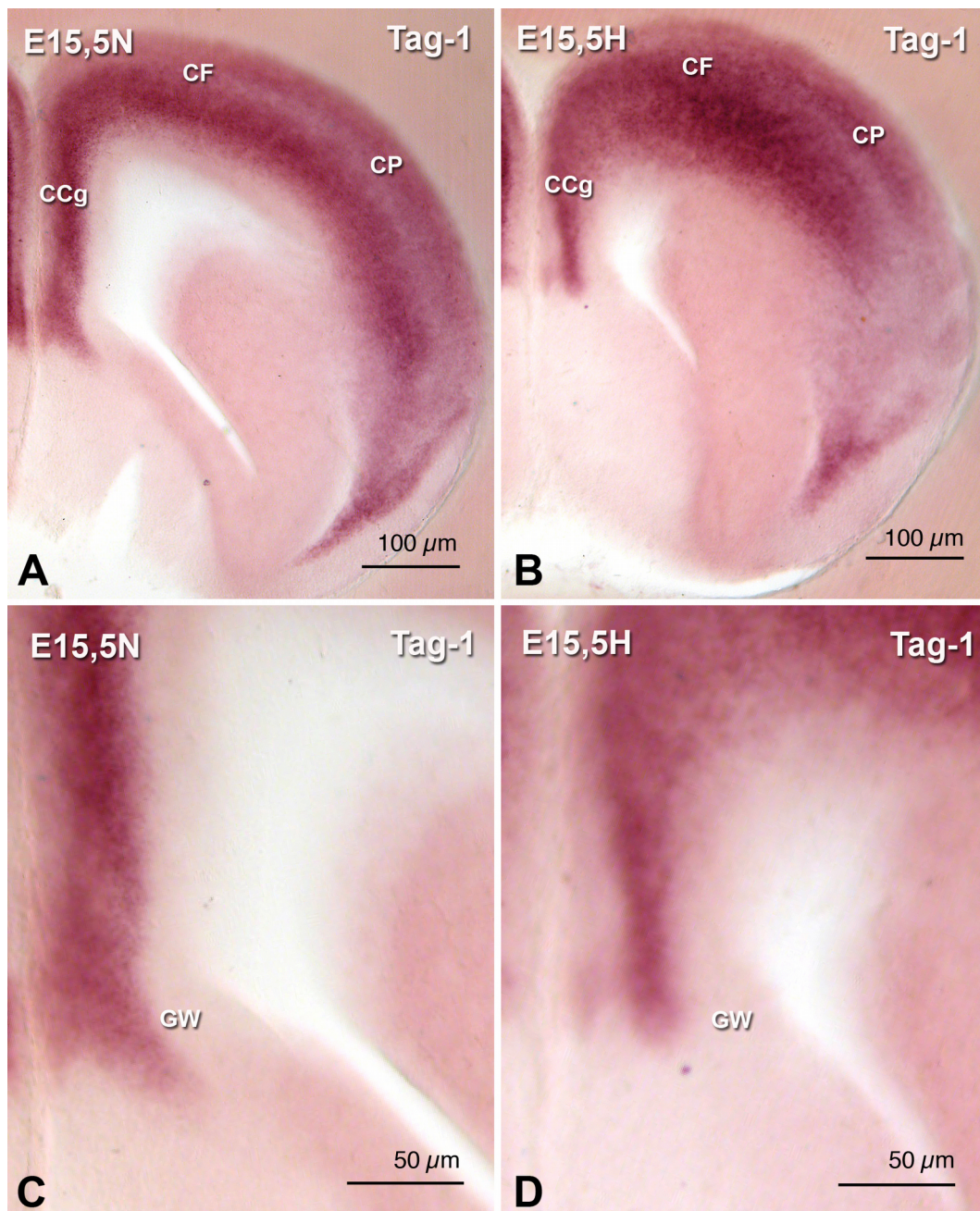
**Figura 35.-** Desarrollo del cuerpo caloso en E17,5.

Secciones coronales (A-B) y sagitales a través de la línea media (C-D) de embriones silvestres (A, C) y mutantes (B,D) de 17 días *post coitum* (dpc) teñidos con hematoxilina-eosina. En los embriones silvestres se puede observar en la línea media dorsal el cruce del cuerpo caloso mientras que en las secciones correspondientes a los embriones mutantes el cuerpo caloso no cruza la línea media. En las secciones transversales correspondientes al embrión mutante se puede observar adyacente a la línea media las fibras de Probst. **Abreviaturas:** CC, cuerpo caloso; VL, ventrículo lateral; Fo, *fornix*; FP, fibras de Probst; CA, comisura anterior; 3V, tercer ventrículo.



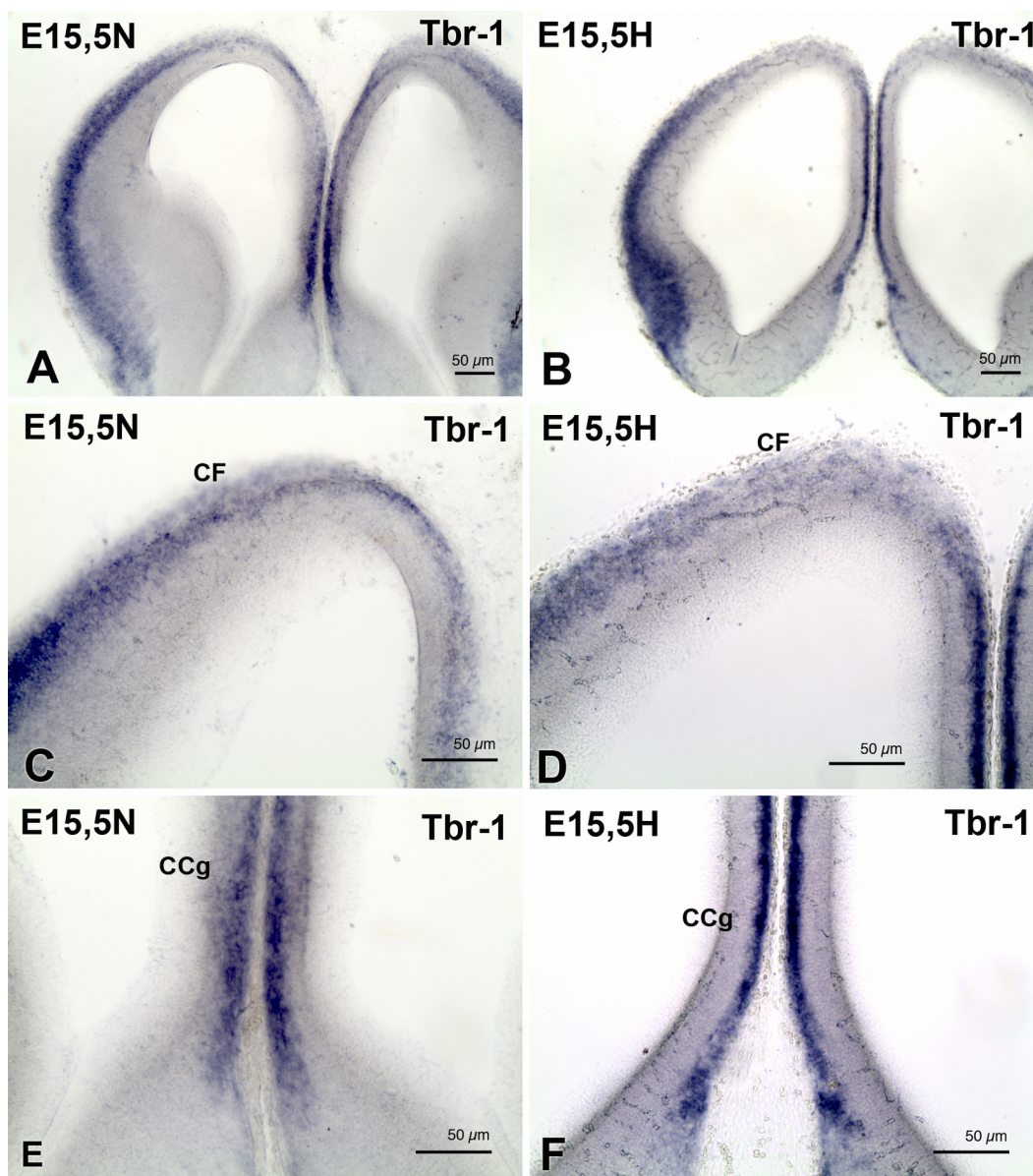
**Figura 36.-** Formación de los axones callosales.

**A:** Esquema de las poblaciones celulares implicadas en el cruce de axones del cuerpo calloso. **B:** Esquema en el que se muestra el experimento para marcar retrógradamente los axones del cuerpo calloso. En rojo están representados los axones callosales y en amarillo el lugar de inyección del Dil y su difusión. **C-D:** Sección transversal de un animal normal (C) y un hidrocefálico (D) de P1, en los que se ha introducido un pequeño cristal de Dil en la corteza frontal. El Dil marca el cruce del cuerpo calloso en el animal normal (C, flecha), mientras que en el hidrocefálico, las fibras callosales no llegan a cruzar (D, cabezas de flechas). **E-F:** Sección transversal de un animal silvestre (E) y otro mutante (F) de E16,5 en los que se colocó un cristal de Dil en la corteza frontal. En el normal, los axones callosales se dirigen hacia la línea media (flecha). En el hidrocefálico los axones se dirigen erróneamente en distintas direcciones, especialmente hacia el ventrículo (flecha). **Abreviaturas:** GW, *glial wedge*; IG, glía del *indusium griseum*; NC, neurona callosal con su axón; NP, neurona pionera con su axón; SS, *subcallosal sling*; VL, ventrículo lateral.



**Figura 37.-** Expresión de TAG-1 en la neocorteza en E15,5.

**A-B:** Secciones transversales de un embrión normal (A) y otro hidrocefálico (B) de E15,5 en los que se ha realizado una hibridación *in situ* para Tag-1. En el hidrocefálico se aprecia que si bien la molécula señalizadora Tag-1 sí está presente en toda la corteza, presenta alteraciones en su expresión respecto al animal control. **C-D:** Detalles de las imágenes anteriores. **Abreviaturas:** CF, córtex frontal; CP, córtex parietal; GW, glial wedge.



**Figura 38.-** Expresión de Tbr-1 en el neocórtex en E15,5.

**A-B:** Secciones transversales de un embrión normal (A) y otro hidrocefálico (B) de E15,5 en los que se ha realizado una hibridación *in situ* para Tbr-1. **C-D:** Tanto en el animal normal como en el hidrocefálico se detectan neuronas que expresan Tbr-1 en la corteza frontal (CF) (C-D) y en la cingular (CCg) (E-F). En la CF (D) de los embriones hidrocefálicos se detectan menos neuronas al contrario de lo que ocurre en la CCg (F) del mutante donde parece ser que las neuronas que expresan Tbr-1 se marcan más intensamente. **C-F:** Detalles de las imágenes anteriores en la zona correspondiente al CCg. **Abreviaturas:** CCg, córtex cingular; CF, córtex frontal.



## 2.4. Estado de las poblaciones celulares de la línea media implicadas en el cruce del cuerpo calloso

Los resultados descritos más arriba muestran que los axones callosales sí se forman pero no cruzan en los ratones *hyh* mutantes. Se han investigado las diferentes poblaciones celulares que intervienen en el cruce de la línea media telencefálica, primero de los axones pioneros (cruzan en E15,5), y más tarde de los axones callosales (cruzan en E16,5), para averiguar si pudieran ser los responsables de la agenesia del cuerpo calloso.

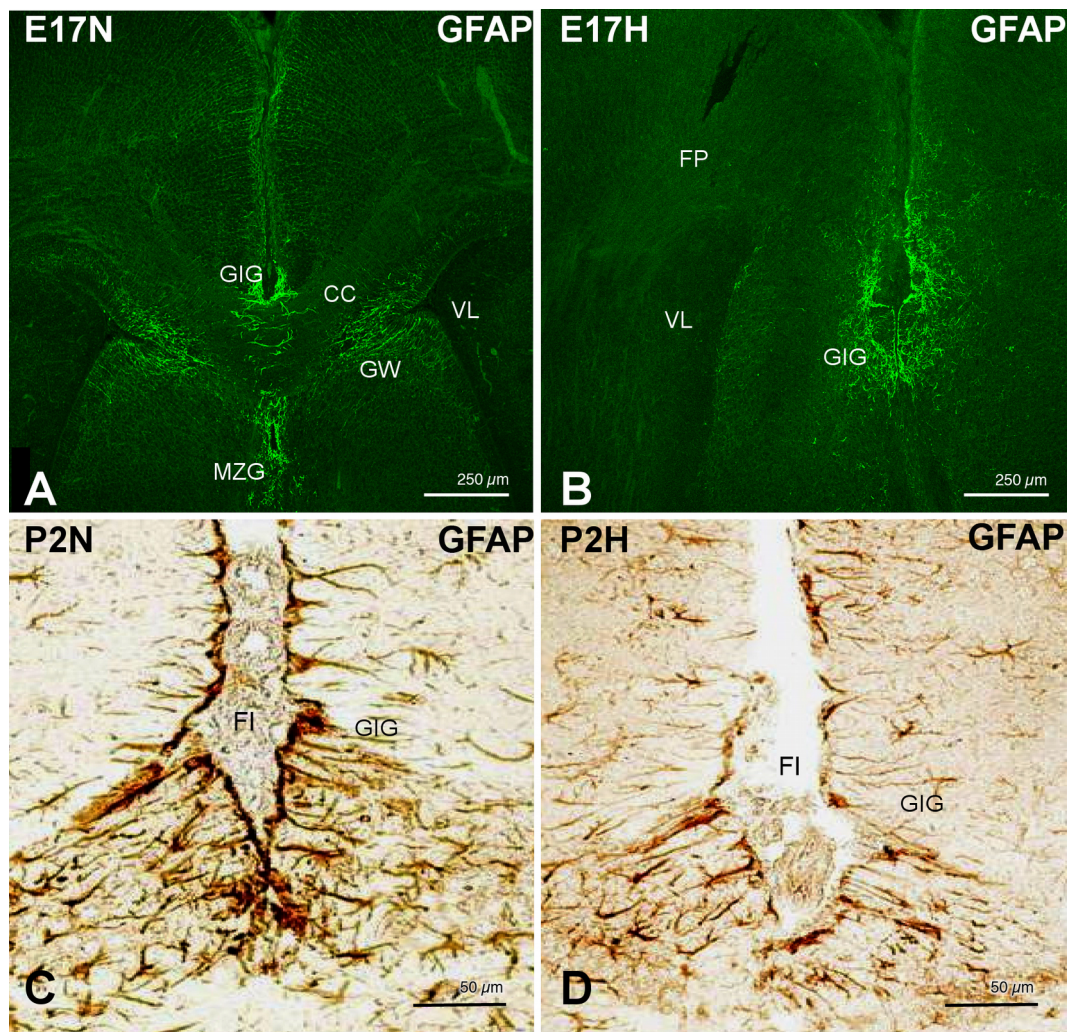
Usando un anticuerpo contra GFAP se inmunomarcaban en los animales silvestres las poblaciones gliales de la línea media telencefálica, la glía en el *indusium griseum*, *glial wedge* y la *midline zipper glia* tal como se observa en la Figura. 39A

### 2.4.1 Células gliales en el *indusium griseum*

La glía en el *indusium griseum* (no existe traducción al castellano) es una población celular que se dispone dorsal al cuerpo calloso en la región del *indusium griseum*, recibiendo de ahí su nombre.

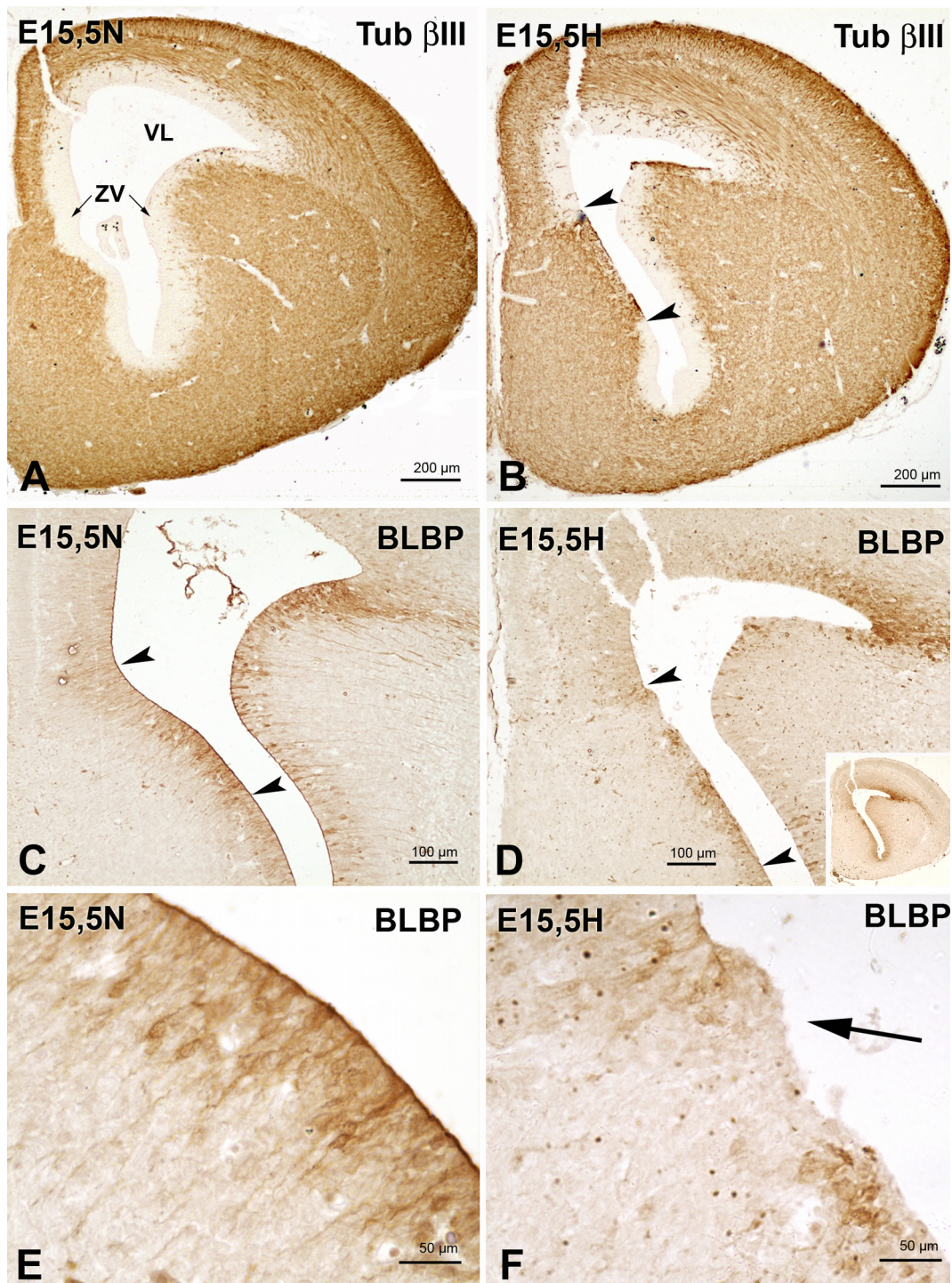
En la etapa embrionaria, nuestros resultados muestran que cuando inmunoteñimos con anti-GFAP, tanto en animales silvestres como hidrocefálicos, aparecen marcadas las prolongaciones radiales de la glía en el *indusium griseum* (Fig. 39A-B).

En etapas postnatales, tanto en animales normales como hidrocefálicos, la glía del *indusium griseum* sigue estando presente. Sin embargo, en los animales hidrocefálicos las células parecen ser menos abundantes y sus prolongaciones más cortas (Fig. 39D) en comparación con la de sus hermanos normales (Fig. 39C).



**Figura 39.-** Poblaciones celulares del cruce de los axones callosales: glía del *indusium griseum*.

Secciones transversales de ratones normales (A, C) y ratones *hyh* mutantes (B, D) inmunoteñidas con un anticuerpo contra GFAP. Las figuras A-B corresponden a embriones de 17 dpc mientras que las figuras C-D son ratones de 2 días postnatales. En los embriones silvestres de E17 aparecen marcadas con anti-GFAP, las distintas poblaciones gliales de la línea media implicadas en el cruce del cuerpo calloso: la glía en el *indusium griseum*, la *glial wedge* y la *midline zipper glia*. Sin embargo, en el embrión mutante *hyh* sólo se distingue la glía en el *indusium griseum*. En ratones de P2 hidrocefálicos observamos que la glía en el *indusium griseum* aparece reducida. **Abreviaturas:** CC, cuerpo calloso; FI, fisura interhemisférica; FP, fibras de I Probst; GIG, glía en el *indusium griseum*, GW, *glial wedge*; MZG, *midline zipper glia*; VL, ventrículo lateral.



**Figura 40.-** Poblaciones celulares responsables del cruce de los axones callosales: *glial wedge* en E15,5.

**A-B:** Secciones transversales de un embrión normal (A) y de un mutante (B), inmunoteñidas con anti tubulina  $\beta$  clase III. Toda la zona ventricular (ZV) del ventrículo lateral (VL) del animal normal, incluyendo la correspondiente a la *glial wedge*, aparece inmuno-negativa para la anti-tubulina. En el animal hidrocefálico, la ZV correspondiente a la *glial wedge* ha desaparecido y en su lugar se observa expresión ectópica del marcador neuronal (área delimitada por cabezas de flecha). **C-D:** Secciones transversales correspondientes al VL de un embrión normal (C) y otro mutante (D) inmunoteñidas contra BLBP. En la pared medial del embrión normal (C), se observan células de la *glial wedge* marcadas con el anticuerpo (zona delimitada por cabezas de flecha). **E-F:** Detalles de las imágenes anteriores de la zona correspondiente a la *glial wedge* del normal (E) y del hidrocefálico (F). En el mutante se observan células ectópicas inmunonegativas en la zona de la *glial wedge* (flecha en F). **Abreviaturas:** VL, ventrículo lateral; Z, zona ventricular.

## 2.4.2 Células de la *subcallosal sling*

El marcaje con anti-calretinina, en secciones del telencéfalo de embriones de E15,5, pone de manifiesto una población neuronal inmunopositiva en el borde córtico-septal del palio medial, tanto en los embriones normales como en los mutantes (Fig. 40A, B). De nuestros datos se desprende que, al menos en E15,5 las células de la *subcallosal sling* no presentan diferencias apreciables en los ratones mutantes (Fig. 40C, D).

## 2.4.3 Células de la *glial wedge*

Las células de la *glial wedge* son la tercera población celular implicada en el cruce del cuerpo caloso. Se ha estudiado desde E14,5 a E17,5 en embriones normales e hidrocefálicos. Se ha investigado la expresión de tubulina  $\beta$  clase III, nestina, BLBP y RC2 en la zona correspondiente a esa población celular.

Al inmunoteñir secciones de telencéfalo de embriones normales de E15,5 con anti-tubulina  $\beta$  clase III se observa que la ZV, en toda la extensión de los ventrículos laterales, aparece inmunonegativa (Fig. 41A). Sin embargo, los hermanos mutantes de la misma camada muestran una alteración muy significativa de la ZV en varias regiones. Se detecta expresión ectópica de tubulina  $\beta$  clase III en somas y fibras inmunomarcadas en la pared medial y en determinadas zonas de los ventrículos laterales, entre ellas la ocupada por la *glial wedge* (Fig. 41B).

En secciones adyacentes inmunoteñidas con anti-BLBP, que reconoce a las

células de la *glial wedge* (Fig. 41C-F), se observa que una de las regiones alteradas de la zona ventricular (ZV) de los embriones hidrocefálicos corresponde a esta subpoblación celular (Fig. 41D, F). En la zona donde se localizan las células de la *glial wedge* en los embriones normales (Fig. 41E), en los mutantes no sólo están ausentes estas células BLBP positivas, sino que además el borde de la ZV es irregular (Fig. 41F).

En la ZV correspondiente a la *glial wedge*, en embriones normales de E15,5, el anticuerpo RC2 reconoce el soma y las prolongaciones radiales de sus células (Fig. 42A). Los somas están intensamente teñidos y presentan una morfología ligeramente alargada. Sus prolongaciones basales se extienden radialmente hasta la pared medial del telencéfalo (Fig. 42A). En los embriones *hyh* mutantes de la misma edad, la inmunotinción con RC2 no reconoce ninguna célula en la región correspondiente a la *glial wedge* (Fig. 42B).

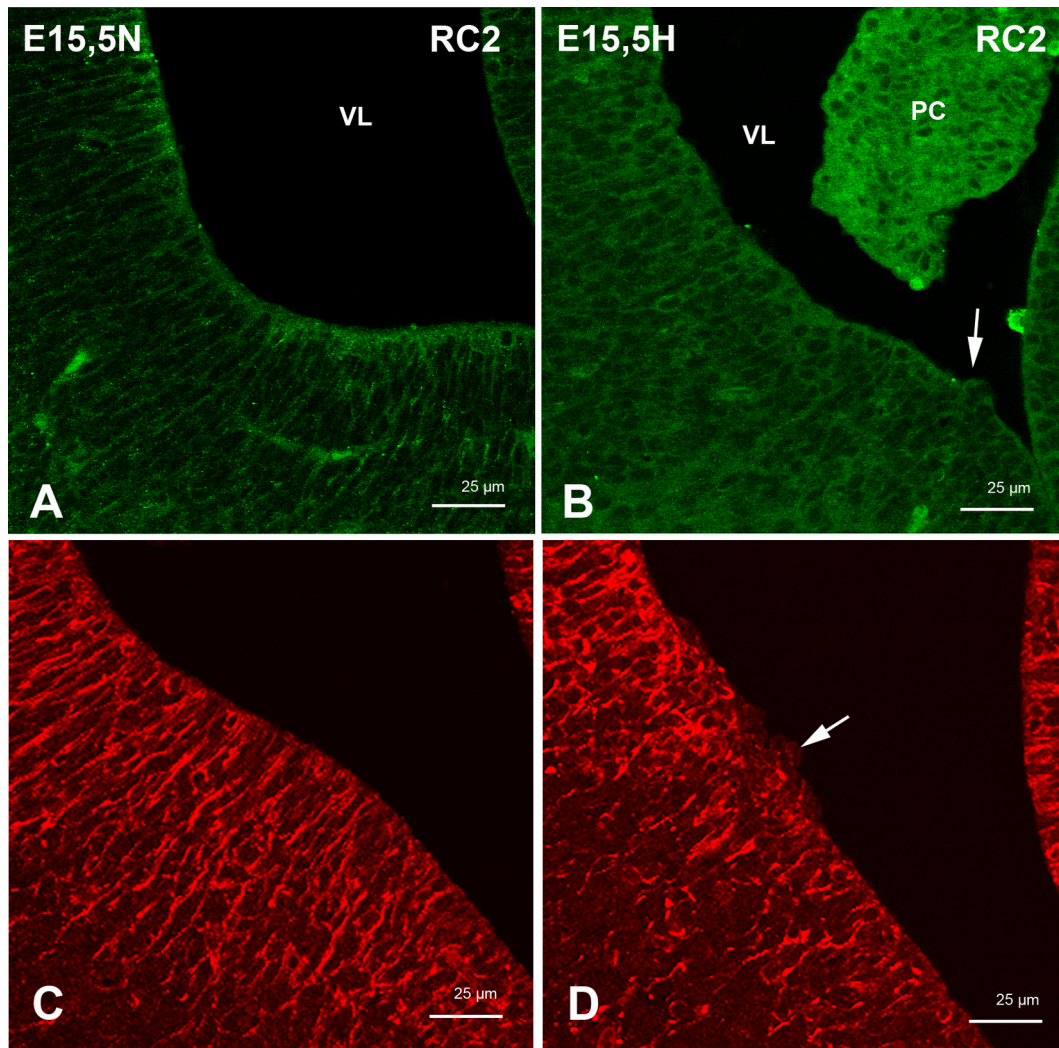
La inmunotinción con anti-nestina pone de manifiesto que las células de la *glial wedge* de embriones normales en E15,5 son inmunopositivas (Fig. 42C). La proteína nestina se expresa principalmente en el soma de estas células y está también presente en sus prolongaciones basales. Los somas inmunopositivos presentan una morfología ligeramente alargada en la mayor parte de los casos, aunque también aparecen algunos somas celulares redondeados (Fig. 42C). Las prolongaciones celulares se extienden hacia la superficie pial medial. En los embriones hidrocefálicos no aparece una ZV que exprese nestina de forma uniforme (Fig. 42D). El borde de la ZV con el ventrículo lateral es irregular y las pocas células de la putativa *glial wedge* que son inmunopositivas, presentan un soma redondeado (Fig. 42D). También aparecen algunas prolongaciones basales que expresan nestina pero, a diferencia de los embriones normales, el recorrido de estas prolongaciones es sinuoso (Fig. 42D). En algunas células se puede comprobar que las prolongaciones basales inmunopositivas para anti-nestina proceden de somas celulares también inmunopositivos.

Usando microscopía confocal en secciones doblemente inmunoteñidas con anti-RC2 y anti-nestina, se puede observar, en embriones normales de E15,5 que la mayor parte de los somas celulares que se encuentran en la línea de la ZV coexpresan ambos marcadores (Fig. 42E), hecho que también ocurre en la

mayoría de las prolongaciones basales. Sin embargo, en los ratones *hyh* mutantes de la misma camada la doble inmunofluorescencia nos muestra que las pocas células que expresan nestina no coexpresan RC2 ni en el soma ni en las prolongaciones basales (Fig. 42F).

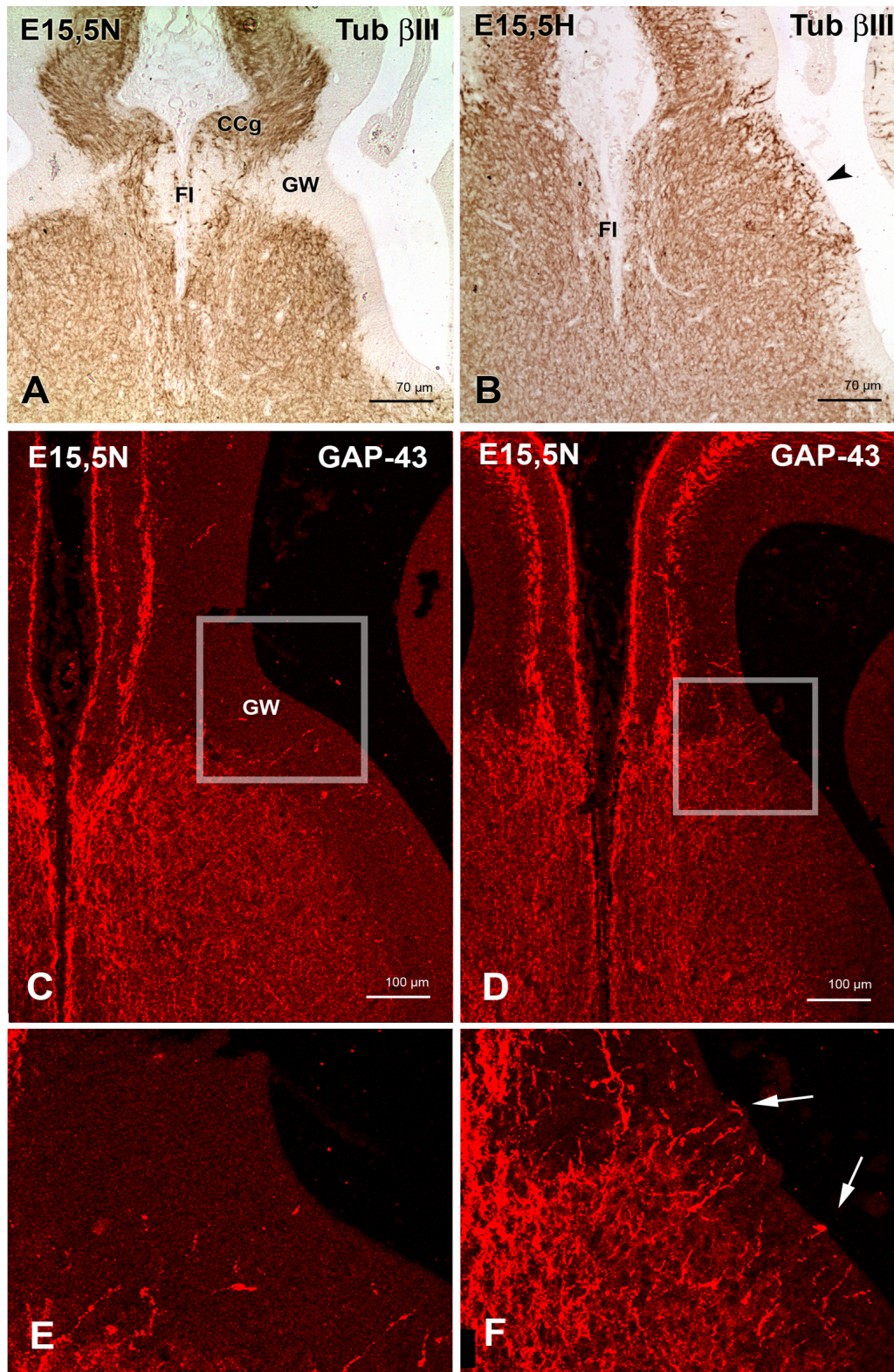
Mediante hematoxilina-eosina, en secciones transversales de embriones de E15,5 silvestres (Fig. 43) y mutantes (Fig. 43B) se pone de manifiesto la alteración de la ZV correspondiente a la *glial wedge* del embrión mutante. En la zona correspondiente al límite córtico-septal del palio medial se puede observar que la ZV es más estrecha en el animal mutante (Fig. 43B). En el animal normal la inmunotinción contra tubulina  $\beta$  clase III muestra que la ZV es inmunonegativa (Fig. 43C) mientras que en el mutante la ZV muestra una expresión de la tubulina ocupando la región donde debería estar la ZV (Fig. 43D). En los embriones mutantes, la inmunotinción contra tubulina pone de manifiesto además la existencia en la ZV de células bipolares orientadas tanto paralelas a la superficie ventricular como perpendiculares a la misma (Fig. 43D).

Usando inmunofluorescencia contra GAP-43, proteína presente en neuronas diferenciadas, se observa en los embriones normales de E15,5 su expresión en sus somas y axones en la vía perforante del *septum*, y en los somas neuronales en la corteza cingular, pero nunca en la ZV ni ZSV (Fig. 43E). Con estos resultados, no se han podido distinguir los axones pioneros del cuerpo calloso de los de la vía perforante del *septum*, pues según la bibliografía ambos coexpresan esta proteína y recorren la misma región en ésta edad. En los embriones mutantes de la misma edad también se observa expresión de GAP-43 en el *septum* y en la corteza cingular, pero a diferencia de los embriones normales, en la ZSV de los ratones *hyh* mutantes, en la región del límite córtico-septal del palio medial, se encuentra una población de neuronas bipolares que expresan esta proteína (Fig. 43F).



**Figura 41.-** Poblaciones celulares responsables del cruce de los axones callosales: *glial wedge* en E15,5.

**A-B:** Secciones transversales correspondientes a la región de la *glial wedge* en el ventrículo lateral (VL) de embriones normales e hidrocefálicos. **A-B:** Inmunomarcaje con el anticuerpo RC2 en un embrión normal y uno mutante. En el normal, las células de la *glial wedge* aparecen marcadas, mientras que en el hidrocefálico no se observa marcaje con RC2 en la zona de la *glial wedge*. **C-D:** Inmunotinción con anti-nestina en un embrión normal y en uno hidrocefálico. La *glial wedge* no aparece marcada en el animal hidrocefálico. La flecha en B y D señala algunas células protuyendo en el VL y la desorganización de la *glial wedge*. **Abreviaturas:** PC, plexos coroides; VL, ventrículo lateral.





**Figura 42.-** Poblaciones celulares responsables del cruce de los axones callosales: *glial wedge* en E15,5. Micrografías correspondientes a la línea media telencefálica de un embrión normal (A, C, E) y otro hidrocefálico (B, D y F). **A-B:** Inmuntinción con anti-tubulina  $\beta$  clase III mostrando expresión ectópica en la ZV correspondiente a la *glial wedge* embrión hidrocefálico (B, cabeza de flecha). **C-D:** Inmunofluorescencia con anti-GAP-43 en la línea media telencefálica. **E-F:** Detalles de región de la *glial wedge* correspondiente a las zonas encuadradas en C y D respectivamente. Se observa expresión de GAP-43 en la ZV de la *glial wedge* del mutante (region delimitada por las flechas en F). **Abreviaturas:** FI, fisura interhemisférica; CCg, corteza cingular; GW, *glial wedge*.

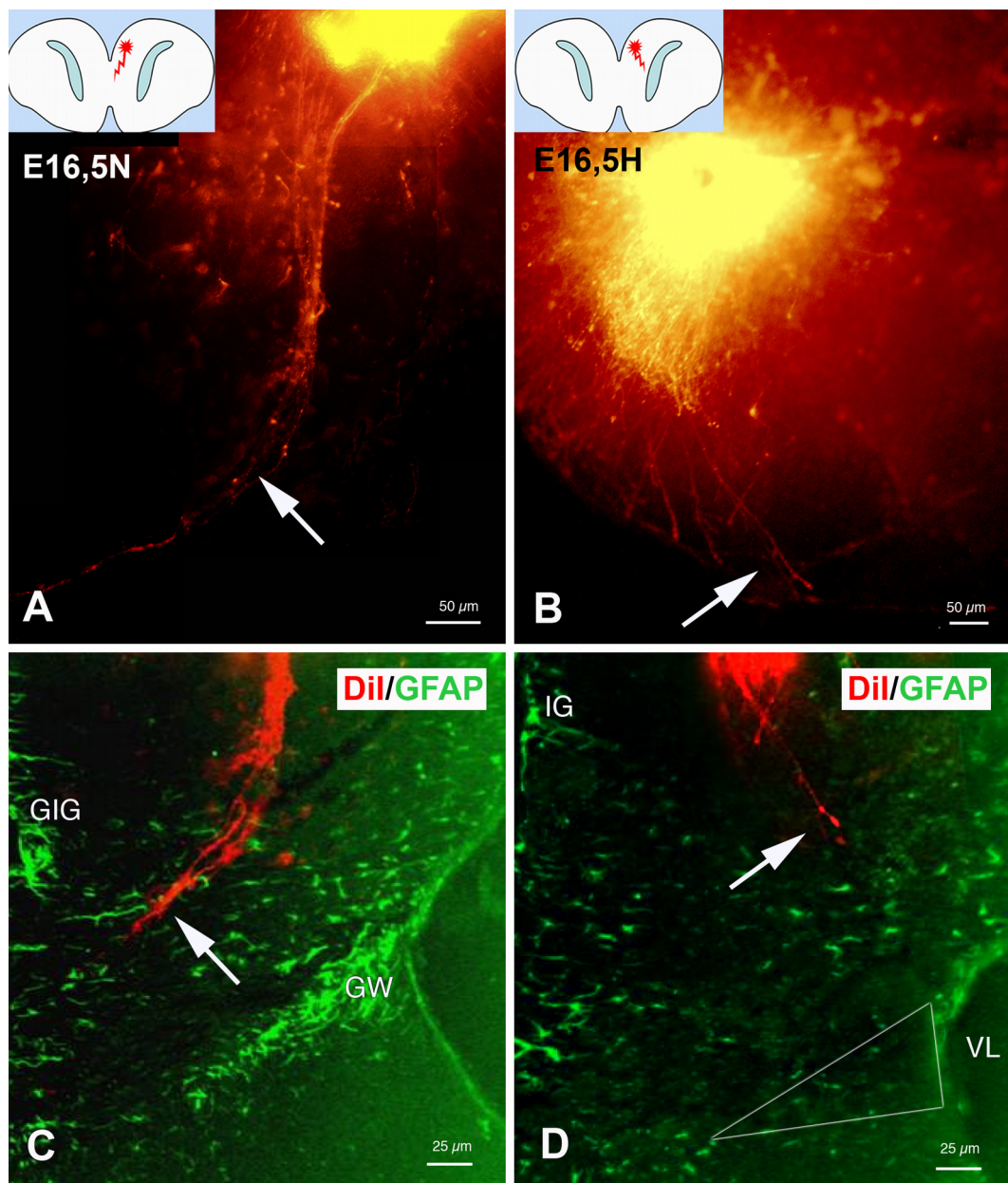
## 2.5. Formación y elongación de los axones pioneros en los ratones *hyh*

Para investigar la elongación de los axones pioneros en embriones normales y en los mutantes, se han utilizado secciones de tejido fresco procedente de embriones de E15,5 mantenidos en cultivo organotípicos *in vitro* durante dos días. Las neuronas que generan los axones pioneros se marcaron inoculando un cristal de Dil en la corteza cingular. El marcaje con Dil se realizó sobre las muestras de tejido fresco el mismo día que se empezó el cultivo organotípico, se mantuvieron *in vitro* durante dos días y, a continuación, se fotografiaron las muestras bajo un fotomicroscopio.

En los embriones normales se observa que durante el tiempo de cultivo se marcan anterógradamente los axones pioneros, los cuales se elongan ventralmente dirigiéndose hacia el hemisferio controlateral (Fig. 44A). Primero tienen un trayecto descendente a través del palio medial, y cuando se acercan al límite córtico-septal giran y se dirigen hacia la línea media (Fig. 44A, C). Sin embargo, los axones generados en los embriones mutantes se elongan desde la corteza cingular en numerosas direcciones (Fig. 44B). Solamente unos pocos axones crecen ventralmente, pero cuando se acercan al límite córtico-septal no giran hacia la línea media, sino que se dirigen hacia la ZV del ventrículo lateral o siguen ventralmente (Fig. 44D).

### **2.5.1 Relación entre la *glial wedge* y la glía del *indusium griseum* en la elongación de los axones pioneros**

En los embriones silvestres del cultivo organotípico se observa que el anticuerpo anti-GFAP marca las células de la *glial wedge* y la glía del *indusium griseum* (Fig. 45A), mientras que en los mutantes se aprecian menos células inmunoteñidas (Fig. 45B). En los mismos cortes de los animales normales, se aprecia que los axones pioneros marcados anterógradamente con Dil en cultivo organotípico, tienen un tramo descendente y giran hacia la línea media cuando pasan entre las células de la *glial wedge* y las del *indusium griseum* (Fig. 45A). Por el contrario, en los ratones mutantes, los axones pioneros si bien sí se elongan, no se dirigen hacia la línea media (Fig. 12B). Además, tal como se ha mencionado anteriormente, en embriones mutantes en E15,5 la ZV en la que se forman las células de la *glial wedge* aparece alterada (Fig. 45D). En el animal no hidrocefálico la ZV aparece totalmente normal (Fig. 45C).



**Figura 43.-** Elongación de los axones pioneros y presencia de la *glial wedge*

Micrografías correspondientes a secciones de cultivo organotípico en las que se aplicó Dil en la zona de las neuronas cingulares en su estadio de E15,5. **A-B:** Secciones de vibratomo mantenidas 24 h in vitro mostrando la ruta de crecimiento de los axones pioneros marcados con Dil (rojo, flecha). **C-D:** Mismas secciones mostradas en A y B fijadas e inmunoteñidas para GFAP (verde) que pone de manifiesto las poblaciones celulares del *indusium griseum* y de la *glial wedge*. Las flechas marcan las diferentes rutas normal en el *wt* (C), que pasa entre la *glial wedge* y el *indusium griseum*, y errónea en el corte del ratón *hyh* (D). En el caso del ratón *hyh*, la zona donde deberían estar las células de la *glial wedge* están delimitadas por un triángulo. **Abreviaturas:** GIG, glía del *indusium griseum*, GW, *glial wedge*; VL, ventrículo lateral.

### 3. Características diferenciales de las superficies ventriculares en ratones normales y *hyh*.

Los defectos en el desarrollo de la zona ventricular tienen consecuencias diferentes en otras regiones a las estudiadas en el desarrollo del cuerpo calloso de los ratones *hyh*. El epéndimo multiciliado deriva del neuroepitelio y como un problema en su programa de desarrollo, la mayor parte de las superficies ventriculares no acaban presentando un epéndimo. En su lugar aparece una reacción astrocitaria particular que lo sustituye, y que ha sido objeto de caracterización en la última parte de esta Tesis Doctoral.

La mayor parte del estudio se llevó a cabo en ratones a partir de los 6 días de edad postnatal (P6). En ese momento, en los ratones mutantes *hyh* se completa la mayor parte del proceso que conduce a la ausencia de epéndimo. En esta edad, además, la reacción astrogliar periventricular aparece desarrollada. Además, en esta edad, los animales evolucionan a una hidrocefalia severa (Fig 44).

A pesar que la carencia de epéndimo en la mayor parte de la superficie ventricular, existen regiones donde aparece el epéndimo. Tales regiones son siempre constantes y se corresponden con los órganos circunventriculares, el techo del tercer ventrículo, el techo de la región media del acueducto cerebral, y pequeñas partes constantes presentes en sitios muy específicos del acueducto y los ventrículos laterales (Fig. 44). Esas regiones se ha podido estudiar para comparar las propiedades del epéndimo que llega a desarrollarse con el de la reacción astrocitarias, en el mismo animal y sección histológica. También se ha comparado con el epéndimo en los animales normales.

Se ha realizado el estudio comparativo principalmente en la superficie de los ventrículos laterales y del cuarto ventrículo. En los ratones *hyh*, en el proceso evolutivo de la hidrocefalia, los ventrículos laterales se expanden enormemente al contrario de lo que pasa en el cuarto ventrículo. Sin embargo, ambas cavidades carecen de epéndimo en la mayor parte de su superficie. No obstante la reacción astrocitaria tiene grados de desarrollo diferenciales incluso en los VL.

### 3.1. Marcaje diferencial del epéndimo multiciliado y los astrocitos reactivos periventriculares

En ratones *wt* adultos, el epéndimo multiciliado forma una sola capa de células que puede reconocerse fácilmente por la expresión de la proteína S100 $\beta$ , tubulina  $\beta$ IV que marca sus cilios, y la proteína de filamentos intermedios vimentina (Fig. 45A, E, F, H). En los endimocitos multiciliados maduros no se detecta la presencia la proteína de filamentos intermedios GFAP (Fig. 45G).

En los ratones *hyh* adultos, la mayor parte de la superficie ventricular carecían de epéndimo (Fig. 45B, D). Sin embargo, existen células endimarias multiciliadas que aparecen como pequeños grupos o parches que se encuentran constantemente en sitios específicos de las paredes ventriculares (Fig. 45B, D). En la mayor parte de las zonas carentes de epéndimo, los astrocitos forman una capa celular que cubre la superficie sin epéndimo. Estas células carecen de cilios (tubulina  $\beta$ IV negativas) y expresan ambas proteínas de filamentos intermedios, GFAP y vimentina (Fig. 45J, K, O, P)

### 3.2. Densidad astrocitos reactivos en las superficies periventriculares que cubren áreas carentes de epéndimo en ratones *hyh*

En ratones *hyh*, la capa de astrocitos que cubre la superficie de los ventrículos cerebrales sin epéndimo mostró diferencias regionales. Los astrocitos forman una capa de células con diferentes grados de expresión y compactación

En la pared latero-medial de los VL que bordean el hipocampo y el cuerpo estriado (Fig. 45), el tercer ventrículo, la pared ventral del acueducto cerebral y el cuarto ventrículo (Fig. 45, Fig. 48), la superficie desnuda está revestida por astrocitos reactivos densamente empaquetados. Sin embargo, en otras áreas

carentes del epéndimo, tales como los de las paredes dorsal y lateral de los ventrículos laterales, los astrocitos reactivos estaban dispuestos como una capa de células sueltas (Fig. 48C-E).

Los distintos grados de densidad celular de astrocitos reactivos presentes en las superficies denudadas de los ratones *hyh* se pueden observar más fácilmente en preparaciones en montaje completo (*whole mount*) inmunoteñidas con anti-GFAP (Fig. 48A-D), correspondientes a distintas regiones ventriculares en las que se realizó un análisis densitométrico (Fig. 48F). Este estudio condujo a identificar tres tipos de barreras o cicatriz glial formada por astrocitos: (1) tipo compacto, que se caracteriza por una capa continua compacta de astrocitos (Figs 45, 47, 48); (2) una capa laxa, con los astrocitos separados por espacios intercelulares amplios (Fig 48); y (3) muy laxa, caracterizada por una capa discontinua de astrocitos (Fig. 48).

### **3.3. Expresión de acuaporina 4 en el epéndimo multiciliado y en los astrocitos reactivos**

En los ratones normales, la acuaporina 4 se detecta preferentemente en los dominios laterobasales de la membrana plasmática de las células endoteliales (Fig. 46). Existe también una expresión de acuaporina 4 en los pies terminales periventriculares de los astrocitos pero no en sus cuerpos celulares.

En contraste, en los ratones *hyh*, se ha detectado la expresión de acuaporina 4 tanto en el cuerpo como en las prolongaciones de los astrocitos reactivos que recubren las superficies ventriculares denudadas (Fig. 46), así como en los pies perivasculares de los astrocitos ubicados en el parénquima nervioso (Fig. 46).

Se llevó a cabo una cuantificación de la densidad óptica de la inmunorreacción para acuaporina 4, y comparada para el epéndimo en comparación con los pies perivasculares astrocitarios y los astrocitos reactivos periventriculares.

El análisis densitométrico mostró que en ratones *hyh*, los astrocitos reactivos

que cubren las superficies desprovistas de epéndimo presentan un pequeño pero significativo aumento en la inmunorreactividad de acuaporina 4 con respecto a la epéndimo de ratones silvestres (Fig. 46).

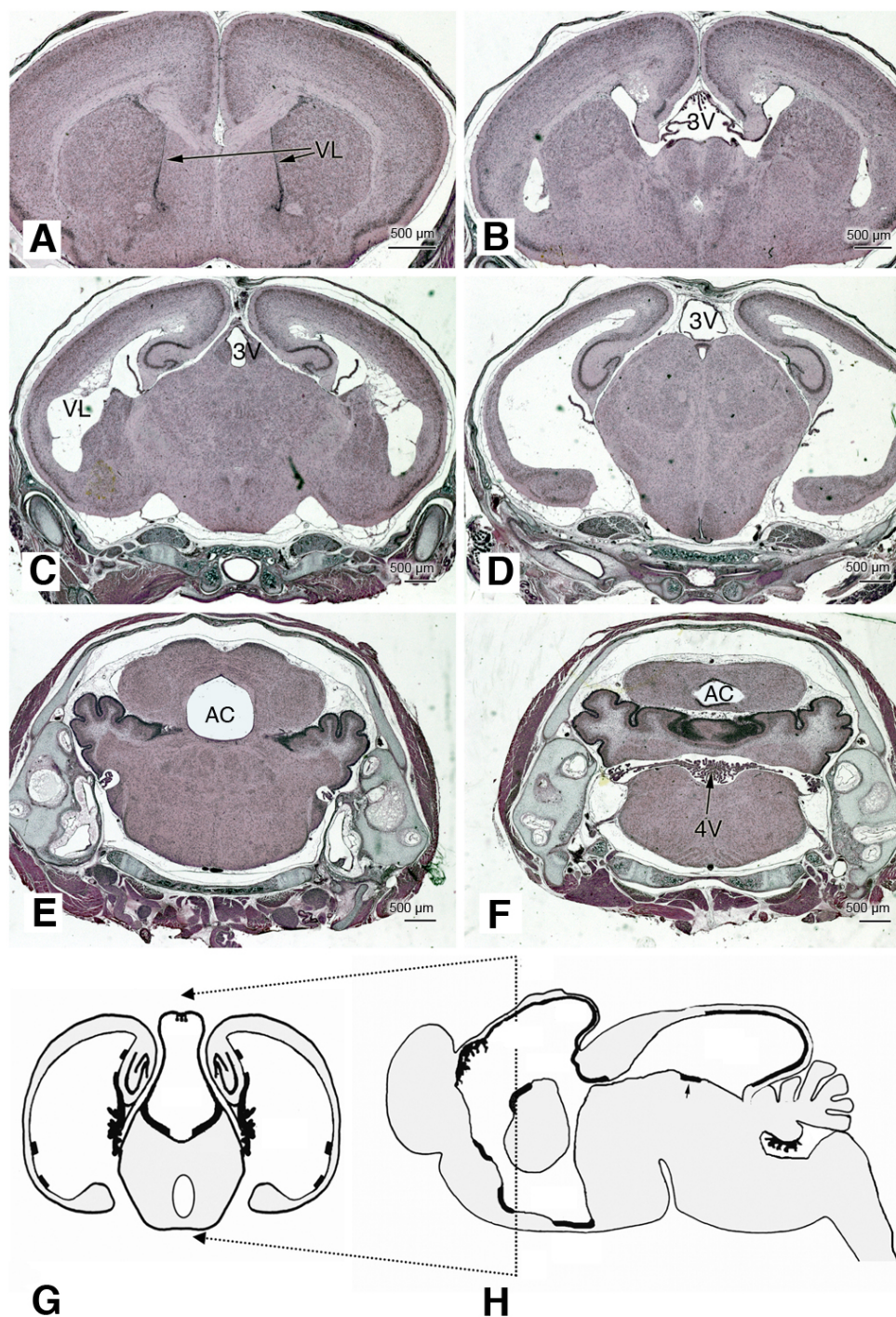
### **3.4. Endosomas tempranos en el epéndimo multiciliado y en los astrocitos reactivos periventriculares**

Se ha estudiado la presencia de endosomas tempranos mediante la inmunodetección del antígeno EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*).

El antígeno EEA1 se ha encontrado en el dominio supranuclear apical de las células endimarias multiciliadas, tanto de ratones *wt* como *hyh* (Fig. 47). La red trans-Golgi también se detectó en la región supranuclear debajo de la capa de los endosomas tempranos (Fig. 47). Ambas detecciones han puesto de manifiesto la polarización apical funcional de las células endimarias multiciliadas.

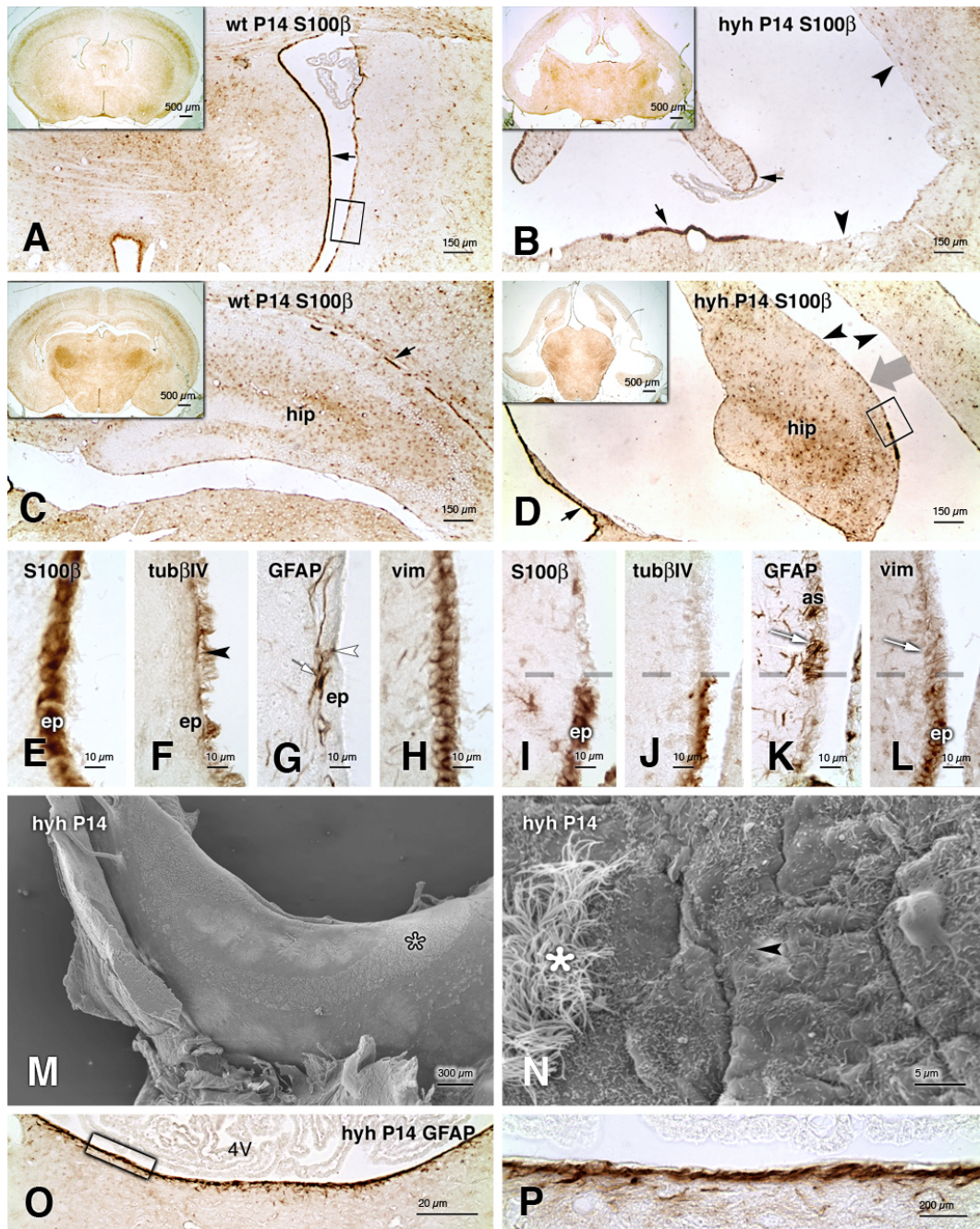
A diferencia de los astrocitos parenquimáticos, los astrocitos reactivos que recubren las áreas sin epéndimo en los ratones *hyh* presentan numerosos endosomas EEA1 inmunopositivos dispersos, tanto por todo el soma como por los sus prolongaciones celulares (Fig. 47). La detección de la red trans-Golgi también puso de manifiesto la carencia de polaridad en ese sentido.

Se ha cuantificado el área de citoplasma ocupado por los endosomas tempranos inmunomarcados en los astrocitos reactivos periventriculares y en el epéndimo. No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al área ocupada por los endosomas tempranos EEA1 inmunopositivos.

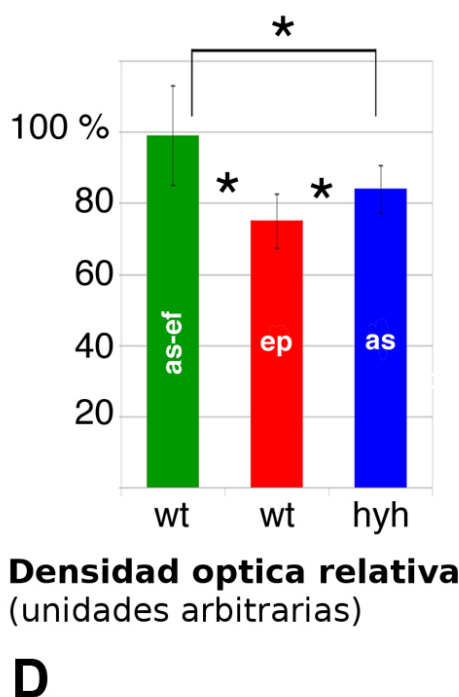
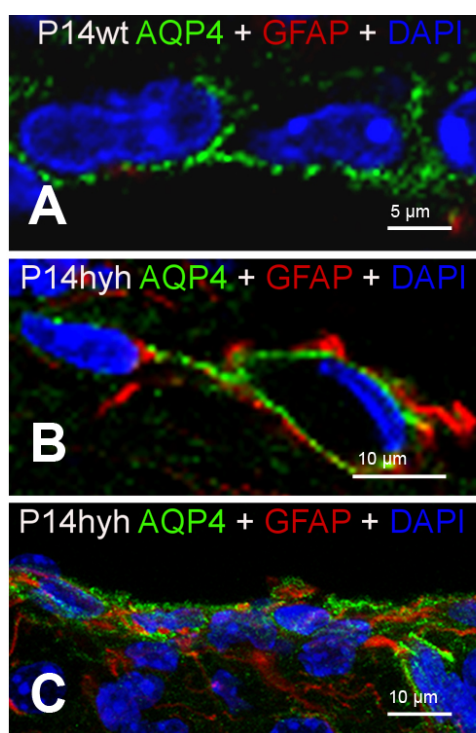


**Figura 44.-** Desarrollo de las dilataciones ventriculares en los ratones *hyh*. **A-F:** Secciones frontales del encéfalo de un ratón *hyh* en P6 teñidas con hematoxilina-eosina., ordenadas a lo largo del eje rostro (A)-caudal (F). **G, H:** Representación esquemática del sistema ventricular de un ratón *hyh* en P14 en vista frontal (F) y sagital (H). Las líneas negras en la superficie ventricular representan las regiones que mantienen epéndimo. **Abreviaturas:** 3V, tercer ventrículo; 4V cuarto ventrículo; AC, acueducto cerebral; VL, ventrículo lateral.



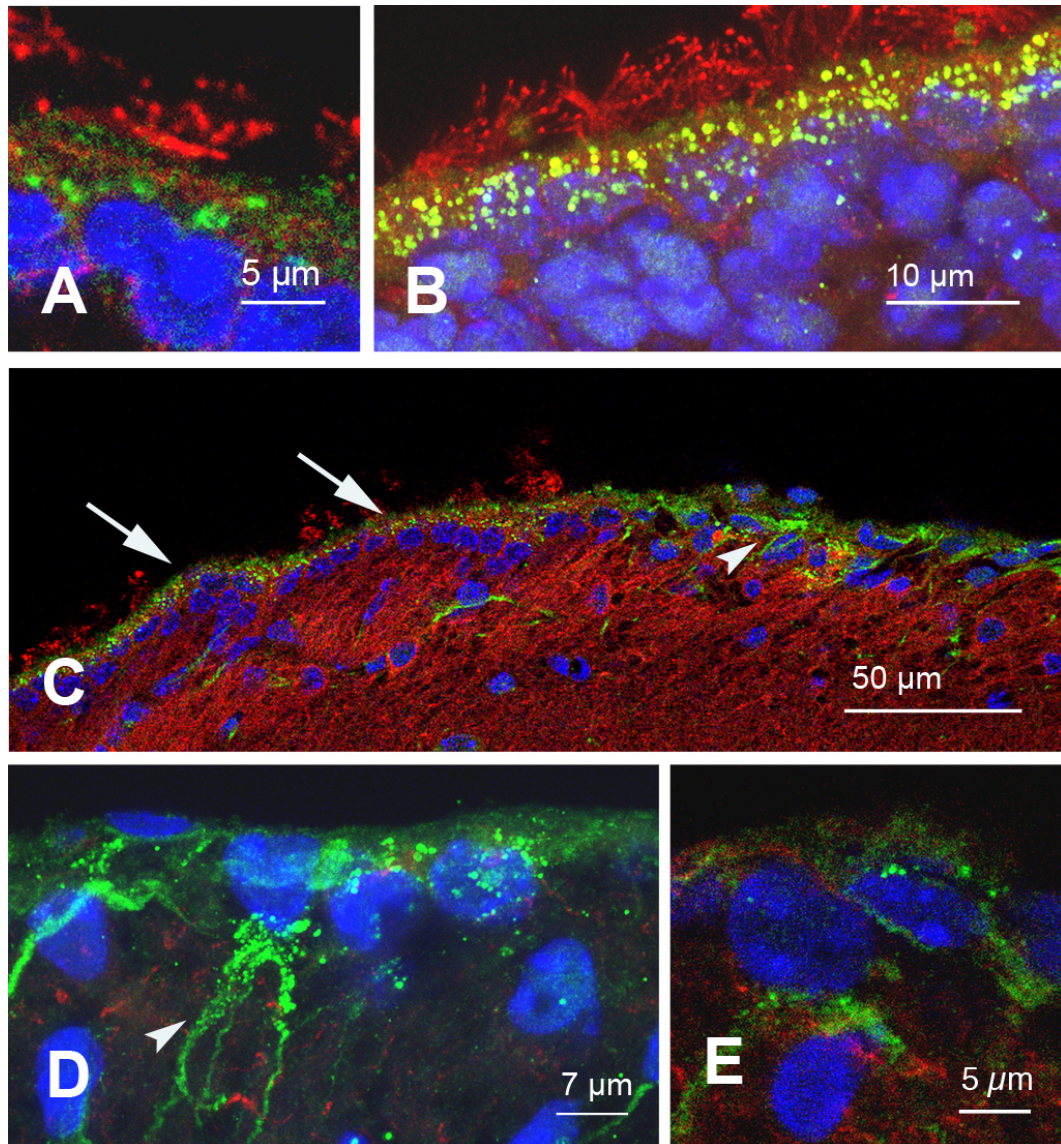


**Figura 45.-** Superficies sin epéndimo y con reacciones astrocitarias periventriculares en ratones *hyh* y normales (*wt*) en P14. **A-D:** Secciones frontales del encéfalo mostrando los VL. Los insertos en A-D muestran vistas panorámicas de los ventrículos. Inmunotinción para la proteína S100 $\beta$  que pone de manifiesto marcaje en el epéndimo que permanece (flechas). Las zonas sin epéndimo se señalan con cabezas de flecha. El recuadro en A corresponde a la región mostrada en detalle con otros marcadores en E-H. La flecha gris en D representa el punto de visión de la superficie mediante MEB en M y N. El cuadro en D muestra la región detallada en I-L, con un parche de epéndimo vecino a la reacción astrocitaria en la superficie del *alveus* del hipocampo. **E-H:** Inmunomarcaje con S100 $\beta$ , tubulina  $\beta$  IV (tub $\beta$ IV, marcaje de cilios endimarios, cabeza de flecha), GFAP (marcaje de astrocitos subependimarios, flecha, y células madres en ZSV, cabeza de flecha) y vimentina. **I-L:** Inmunomarcaje con S100 $\beta$ , tubulina  $\beta$  IV (tub $\beta$ IV, marcaje de cilios endimarios, cabeza de flecha), GFAP (marcaje de astrocitos reactivos periventriculares, flecha) y vimentina (marcaje de astrocitos reactivos periventriculares, flecha y del epéndimo). La línea discontinua delimita la parte superior con reacción astrocitaria y la inferior con epéndimo. **M, N:** MEB de la superficie ventricular que recubre el hipocampo. Un parche de epéndimo ciliado cubre parcialmente la superficie ventricular (asterisco) adyacente a la capa astroglial (cabeza de flecha). **O, P:** Sección frontal del 4V con inmunotinción para GFAP mostrando la reacción astrocitaria periventricular. La región encuadrada en O se muestra en P. **Abreviaturas:** as, astrocitos; ep, epéndimo; hip, hipocampo.

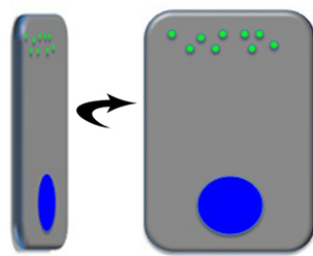


**Figura 46.-** Expresión de acuaporina 4 en el epéndimo y en los astrocitos de ratones *hyh* y normales. **A:** Inmunotinción contra acuaporina 4 (verde) en el epéndimo del ventrículo lateral de un ratón *wt*. Contraste nuclear con DAPI (azul). El canal de agua se localiza principalmente en la membrana plasmática baso-lateral, pero hay también una leve expresión en la membrana apical. **B-C:** Pared latero-medial del VL de un ratón *hyh* inmunoteñido con GFAP (rojo), acuaporina 4 (verde) y contrastado con DAPI (azul). La acuaporina 4 se expresa en los astrocitos periventriculares (C) y en los pies perivasculares de los astrocitos no reactivos. **D:** Densidad optica de la inmunoreacción contra acuaporina 4 en (1) el epéndimo de la pared latero-medial de los VL de ratones *wt* (ep), (2) la capa de astrocitos reactivos que recubre las áreas denudadas de la pared latero-medial de los VL de un ratón *hyh* (as), y (3) en los pies perivasculares de los astrocitos (as-ef) de ratones *wt*.

Se ha representado la media y la desviación estándar de los datos obtenidos de 4 ratones *wt* y otros 4 ratones *hyh* (3-4 secciones por cada ratón, en cuatro áreas vecinas en cada sección). Los datos se expresan como porcentajes relativos obtenidos en cada sección, donde la media de la densidad en los pies astrocitarios en los ratones normales se consideró como el 100%. \* El análisis de correlación mostró diferencias significativas ( $p < 0,001$ , test *t* de Student).



sección de célula endimaria

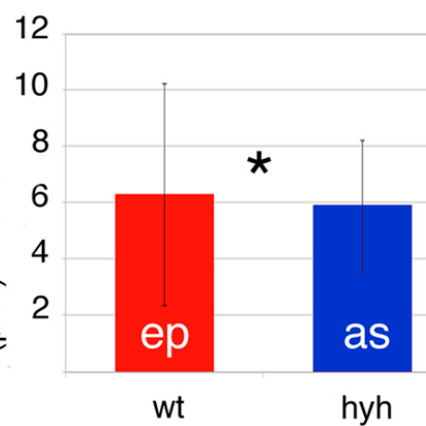


**F**

edosomas tempranos

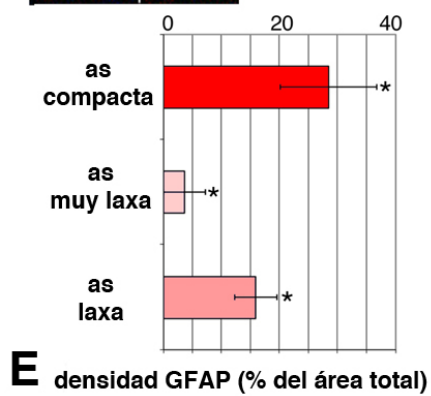
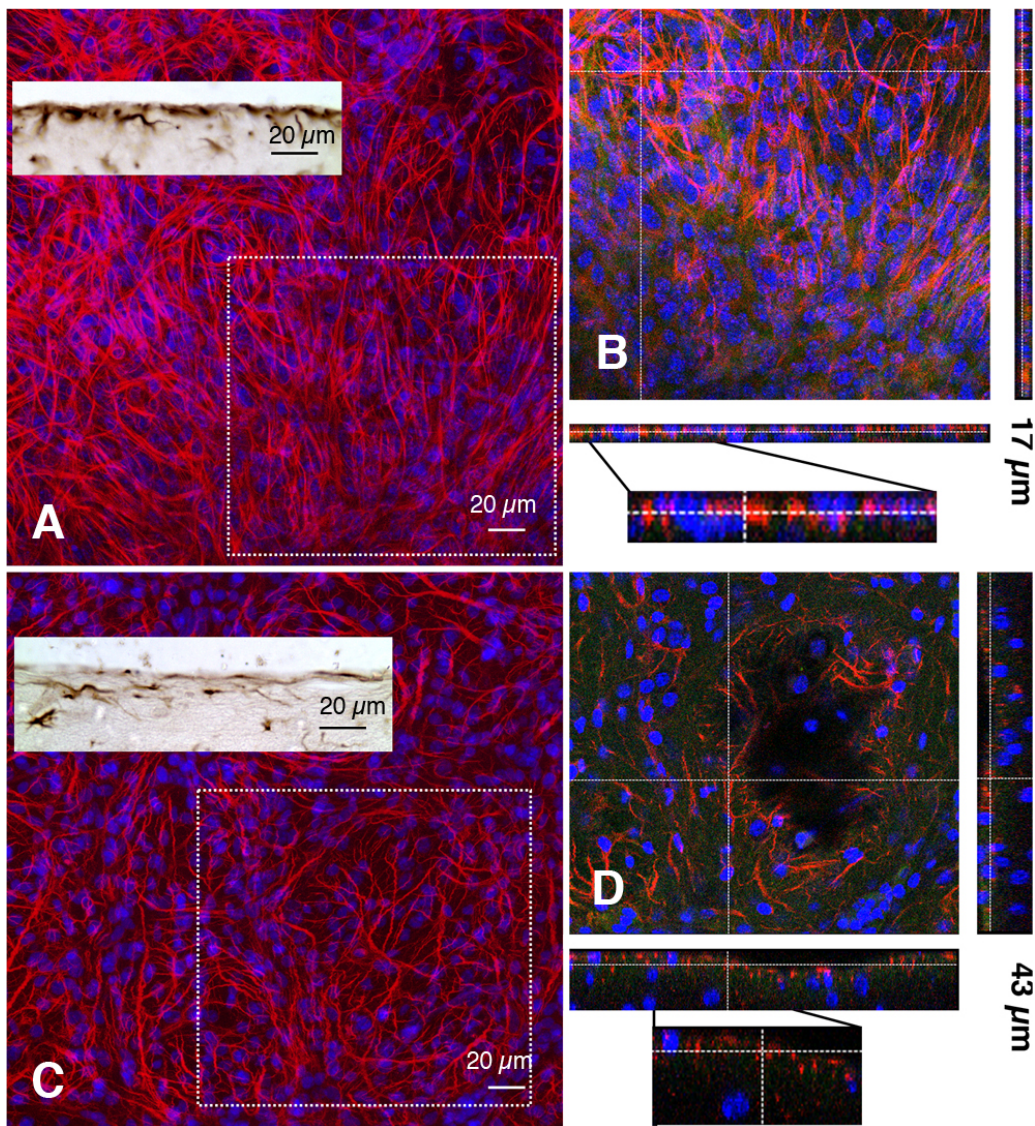


**G** área de endosoma/célula ( $\mu\text{m}^2$ )



**Figura 47.-** Inmunolocalización de endosomas tempranos mediante anti EEA1 y la red trans-Golgi (TGN) del aparato de Golgi en las paredes del VL de ratones *hyh* y normales (*wt*) en P14. Doble marcaje con tubulina  $\beta$  IV (cilios endimarios, rojo). Marcaje nuclear con DAPI (azul) **A-B:** Numerosos endosomas tempranos están presentes en el polo apical de las células endimarias en ratones *wt*. **C y D:** En la superficie del *alveus* del hipocampo de los ratones *hyh*, los endosomas tempranos se detectan en el epéndimo (flecha) y en el cuerpo celular y prolongaciones basales de los astrocitos reactivos periventriculares (cabezas de flecha). **E:** El TGN está presente en el cuerpo celular y prolongaciones basales de los astrocitos reactivos. **F, G:** Representación del área total cuantificado ocupado por los endosomas tempranos inmunoreactivos para EEA1 por célula endimaria de ratón *wt* y por astrocito reactivo de ratón *hyh*, por microscopía confocal sobre secciones congeladas. Los datos representan la media y la desviación estándar obtenidos de secciones correspondientes a 4 ratones *wt* y 4 ratones *hyh* (4 secciones de cada ratón). \* El análisis de la correlación no mostró diferencias significativas ( $p = 0,695$ , test *t* de Student)

**Figura 48.-** Grado de desarrollo de la capa astrogliar en distintas regiones denudadas de los VL de ratones *hyh*. **A-D:** Ratones *hyh* en P20. Montajes completos vistos desde la superficie con inmunofluorescencia contra GFAP (rojo) y tinción nuclear con DAPI (azul). La densidad celular de los astrocitos en la pared latero-medial de los VL (A, B) es mucho mayor que en la pared latero-externa de los VL (C, D). Los insertos en A y B muestra inmunotinciones para GFAP de las áreas correspondientes en secciones frontales. En B y D se muestran planos confocales de 1  $\mu$ m de las áreas encuadradas en A y B mostrando reconstrucciones pseudo-3D (17  $\mu$ m en B, 43  $\mu$ m en D) donde se pone de manifiesto la organización diferencial de los astrocitos. **E:** Cuantificación de la densidad celular de astrocitos (as), usando los montajes completos inmunotefidos, de regiones de los VL de regiones con reacción compacta (pared latero-medial, ver A), laxas (ver C) o muy laxas (pared latero-externa del VL, no mostrada). Los datos representan la media y la desviación estándar del porcentaje del área ocupada por la inumoreactividad GFAP positiva frente al área total. \* El análisis de correlación mostró diferencias significativas ( $p < 0,001$ , test *t* de Student).



## 4. Papel de la reacción astrogliar en la etiología de la hidrocefalia congénita en los ratones *hyh*

### 4.1. Cambios morfológicos progresivos en los encéfalos de los ratones *hyh* hidrocefálicos

Se ha estudiado el papel que puede desempeñar los astrocitos reactivos en la progresión de la hidrocefalia en ratones *hyh*. A pesar de tener el mismo fondo genético los ratones *hyh* muestran diferentes grados de desarrollo y gravedad de la hidrocefalia. Casi todos los ratones *hyh* mueren aproximadamente a los 20-40 días después del nacimiento tras desarrollar una hidrocefalia severa (Bátiz et al. 2006). No obstante, una pequeña población de animales es capaz de desarrollar una forma compensada de la enfermedad compatible con la vida. Se ha llevado a cabo un estudio en ratones *hyh* con las dos formas de evolución de la enfermedad. Se ha usado ratones machos de P30 que presentaban la forma severa de la hidrocefalia, según lo descrito previamente en Bátiz et al. (2006). A esta edad, la mayor parte de los ratones estaban gravemente enfermos y con apariencia de morir en unos pocos días. Por otro lado, se han usado pocos ratones machos que manifestaban síntomas de compensación de la enfermedad, y que fueron capaces de sobrevivir hasta los 90 días de edad (P90), y en algún caso extremadamente raro, hasta los 180 días (P180).

Debido al muy pequeño número de ratones *hyh* supervivientes a P180, los resultados que implicaban a éstos individuos no presentaron significancia estadística, pero sin embargo fueron útiles para confirmar los datos de los ratones *hyh* que sobrevivieron hasta P90.

Los ratones *hyh* de P90 y P180, aunque presentaban los síntomas descritos por Bronson y Lane (Bronson and Lane 1990), exhibían síntomas que no parecían ser críticos. Por ejemplo, éstos ratones no presentaban macrocefalia (de forma consistente a lo descrito en Bátiz et al. (Bátiz et al. 2006). Los escasos

ratones de P180 usados en este estudio se obtuvieron durante un periodo de cuatro años.

En los ratones *hyh* mutantes de entre 4 y 7 días de edad (P4 y P7 respectivamente), la hidrocefalia se detecta progresando a severa (Fig. 49A), momento que corresponde a pocos días después del cierre del acueducto cerebral caudal. En esta edad, la ventriculomegalia afecta ya al VL, afectando a la neocorteza y al hipocampo (Fig. 49E-G).

El examen histológico ha revelado que los ratones con hidrocefalia severa y macrocefalia (ratones *hyh* de P30) exhiben además una gran dilatación del tercer ventrículo dorsal y de la parte caudal de acueducto cerebral. Esta ventriculomegalia era mayor que en los ratones que desarrollaban la forma compensada de la hidrocefalia y no presentaban macrocefalia (ratones de P90 y P180). El análisis histológico de todos los ratones *hyh* también puso de manifiesto que los ratones *hyh* presentaban edema periventricular en el neocórtex, así como degeneración de las fibras de la capsula externa durante la primera semana de vida (Fig. 49F, G; el estado del *wt* se muestra en la figura 49B-D).

#### **4.2. Niveles de expresión de GFAP en ratones *hyh* respecto a los normales y con hidrocefalia compensada**

Se ha estudiado si existe una expresión diferencial de GFAP, así como de factores neuroprotectores y neuroinflamatorios, en la reacción astrocitaria entre ratones *hyh* con las formas grave y compensadas de la hidrocefalia. Para ello se han llevado a cabo cuantificaciones de ARNm para tales factores mediante RT-PCR cuantitativa, así como análisis mediante inmunofluorescencia-inmunohistoquímica en secciones de tejido.

Para estudiar los niveles de ARNm se ha seleccionado tejido procedente del hipocampo maduro en vez de la neocorteza por dos razones principales: (1) debido a las condición edematosa y a la masiva inflamación de la sustancia blanca periventricular que ocurre durante todo el desarrollo neocortical, y (2) el

desarrollo anormal del neocórtex podría aportar datos menos fiables que el hipocampo. En los ratones *hyh*, la reacción astrogial tiene lugar a cubriendo casi toda la superficie ventricular carente de epéndimo, incluyendo el *alveus* del hipocampo (Fig. 50B, comparado con el ratón silvestre en la figura 50A), que aparece a modo de barrera entre el parénquima nervioso y el lumen ventricular.

Los niveles de ARNm de GFAP se han encontrado al menos dos órdenes de magnitud mayores en el hipocampo de ratones *hyh* de P30 (hidrocefalia grave) que los niveles detectados en los ratones normales (Fig. 50C). No obstante caso, no se detectaron diferencias significativas entre los ratones *hyh* de P30 y P90 (hidrocefalia compensada).

#### **4.3. Niveles de expresión de TGF $\beta$ 1 en ratones *hyh* respecto a los normales y con hidrocefalia compensada**

Para investigar si el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (*transforming growth factor*  $\beta$ 1, TGF $\beta$ 1) pudiera estar relacionado con los distintos grados de severidad de la hidrocefalia que presentan los ratones *hyh* se han cuantificado los niveles de su ARNm en los hipocampos de ratones *hyh* y normales.

No se encontraron diferencias significativas entre los ratones silvestres y *hyh*, ni entre los ratones *hyh* con diferentes formas de evolución de la hidrocefalia (P30, P90 y P180). (Fig. 50)

#### **4.4. Niveles de expresión de TNF $\alpha$ en ratones *hyh* respecto a los normales y con hidrocefalia compensada**

Se analizó la relación entre los niveles de expresión de TNF $\alpha$  con la etiología de la hidrocefalia de diferentes gravedades en los ratones *hyh* de la misma forma a la descrita para la expresión de TGF $\beta$ 1.

Al contrario que con TGF $\beta$ 1, se encontró que los niveles de ARNm de TNF $\alpha$  en los ratones *hyh* en P30 eran significativamente diferentes en los ratones *hyh* comparados con los ratones normales. Hubo un aumento de cuatro veces en la



media de los niveles de expresión de ARNm de  $TNF\alpha$  en los ratones *hyh* (Fig. 51A), y en algunos casos, los niveles de expresión fueron hasta 8 veces superiores a los encontrados en los ratones normales. Aunque la media de la expresión de ARNm de  $TNF\alpha$  en los ratones de P90 y P180 fue el doble a la observada en los ratones silvestres, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 51A).

#### 4.5. Expresión de $TNF\alpha$ en los astrocitos reactivos de los ratones *hyh* con hidrocefalia

El patrón de expresión de  $TNF\alpha$  se examinó en la corteza cerebral de ratones normales y *hyh* con diferentes edades. Para ello se llevo a cabo inmunotinción para la citoquina en secciones empleando tres anticuerpos distintos. Todos los anticuerpos mostraron resultados similares. Durante los primeros días de vida postnatal en los ratones silvestres y *hyh*, la inmunorreactividad contra  $TNF\alpha$  se detectó solamente en las meninges y de forma difusa en el parénquima cerebral cercano (Fig. 52A-E). Más tarde, al final de la primera semana postnatal en los ratones *hyh*, según la hidrocefalia comienza a ser más grave, es posible detectar inmunorreactividad difusa contra  $TNF\alpha$  en todo el parénquima cerebral (Fig. 52F-K). De acuerdo con los resultados obtenidos con RT-PCR, la inmunorreactividad contra  $TNF\alpha$  pudo ser detectada claramente con más intensidad en las secciones de los ratones *hyh* de P30 (Fig. 53B, C, F) que en la de los ratones normales a la misma edad (Fig. 53A, E) o que en los ratones *hyh* de P90 (Fig. 53D).

Los astrocitos periventriculares reactivos fueron detectados inmunoreactivos a los diferentes anticuerpos empleados contra  $TNF\alpha$  en los ratones *hyh* a partir de P7. Los astrocitos reactivos inmunomarcados se detectaron en la neocorteza y el *alveus* del hipocampo (Figs. 52F, G y 53I), así como en otras superficies ventriculares con reacción astrocitaria periventricular. Los parches de células endimarias que logran desarrollarse en los ratones *hyh* no mostraron inmunorreactividad contra  $TNF\alpha$  (Fig. 54J). Por el contrario, los cuerpos y las

prolongaciones celulares de los astrocitos no reactivos en el parénquima cerebral no presentaron inmunorreactividad contra los anticuerpos contra  $\text{TNF}\alpha$  (Fig. 53G). Algunas células de la microglía periventricular que era iba1 inmunopositiva en la neocorteza y, raramente, en el hipocampo presentaron inmunorreactividad a los anticuerpos contra  $\text{TNF}\alpha$  (Fig. 53K).

#### **4.6. Niveles de expresión del receptor $\text{TNF}\alpha\text{R1}$ en ratones *hyh* respecto a los normales y con hidrocefalia compensada**

La distribución difusa de la inmunotinción contra  $\text{TNF}\alpha$  en el parénquima cerebral y su ausencia en la microglía, sugiere que este factor podría estar funcionando a través de su receptor  $\text{TNF}\alpha\text{R1}$ . Por esta razón, se cuantificaron los niveles de ARNm  $\text{TNF}\alpha\text{R1}$  en los mismos animales siguiendo el mismo procedimiento de RT-PCR que para el  $\text{TNF}\alpha$ . Se detectó un aumento del doble de media en la expresión de  $\text{TNF}\alpha\text{R1}$  en el hipocampo de los ratones *hyh* comparados con los ratones silvestres a la edad de 30 días (Fig. 52B). Los niveles de ARNm del receptor  $\text{TNF}\alpha\text{R1}$  presentaron la misma tendencia que para el  $\text{TNF}\alpha$  en los ratones *hyh* en P90 y P180, aunque no se detectaron diferencias significativas con los ratones silvestres (comparar con la figura 52A). Además, cuando los niveles del ARNm de  $\text{TNF}\alpha$  y de  $\text{TNF}\alpha\text{R1}$  se compararon en cada ratón individual a P30, P90 y P180, se encontró una alta probabilidad de correlación estadísticamente significativa (0,0004) entre ellos. Así, los animales con los niveles más altos de ARNm de  $\text{TNF}\alpha$  además expresaban niveles más altos del ARNm de  $\text{TNF}\alpha\text{R1}$ .

#### **4.7. Expresión del receptor $\text{TNF}\alpha\text{R1}$ en los astrocitos reactivos en los ratones *hyh***

Del mismo modo que para el  $\text{TNF}\alpha$ , se estudió la expresión de  $\text{TNF}\alpha\text{R1}$  en secciones de encéfalo de ratones *hyh* y normales. Tanto en los ratones silvestres como en los mutantes *hyh*, éstos anticuerpos inmunotifieron los cuerpos

celulares de los astrocitos y sus prolongaciones celulares que contribuyen a la pia madre (Fig. 53A, B), así como los pies perivasculares de los astrocitos cercanos a las meninges (Fig. 53E, F). De forma parecida al  $TNF\alpha$ , y de acuerdo con los resultados obtenidos con RT-PCR, la inmunorreactividad contra  $TNF\alpha R1$  fue más claramente más intensa en las secciones cerebrales procedentes de ratones *hyh* con hidrocefalia severa a P30 que en aquellas procedentes de ratones silvestres (dato no mostrado). En los ratones adultos, el receptor  $TNF\alpha R1$  se encontró ampliamente distribuido por el parénquima cerebral con un patrón punteado. En el hipocampo de los ratones silvestres y *hyh*, la inmunorreactividad contra  $TNF\alpha R1$  se encontró principalmente en las capas ocupadas por las interneuronas y en las dendritas de células piramidales (Fig. 53G) y granulares de las áreas hipocampales CA1, CA2, CA3 y en el giro dentado. Específicamente en los ratones *hyh*, los anticuerpos además reconocieron los astrocitos reactivos que cubrían las superficies ventriculares de la neocorteza (Fig. 53C, D) y el hipocampo (Fig. 53I), así como también los cuerpos celulares de las neuronas neocorticales situadas en el edema presente en la capsula externa (Fig. 53D). Los anticuerpos contra  $TNF\alpha R1$  no reconocieron los parches de células endimarias que se desarrollan en los ratones *hyh* (Fig. 53G, H).

#### 4.8. La microglía en la corteza cerebral de los ratones *hyh*

En el presente estudio, la microglía no se detectó como la fuente principal de la expresión de  $TNF\alpha$  en los hipocampos de los ratones *hyh* con hidrocefalia congénita. Debido a que el  $TNF\alpha$  es una citoquina implicada en respuestas inflamatorias, se examinó la microglía en diferentes etapas en el desarrollo de la hidrocefalia en los ratones *hyh*, por ser también una posible fuente de  $TNF\alpha$ . Mediante la lectina de tomate y el anticuerpo contra Iba1 se puso de manifiesto la presencia de microglía fagocítica/macrófagos en las áreas con edema periventricular, como por ejemplo en la cápsula externa, en ratones *hyh* jóvenes durante la primera semana de edad (Fig. 54A, B). Por contra, la microglía fagocítica fue raramente observada en el hipocampo de animales de esa edad.

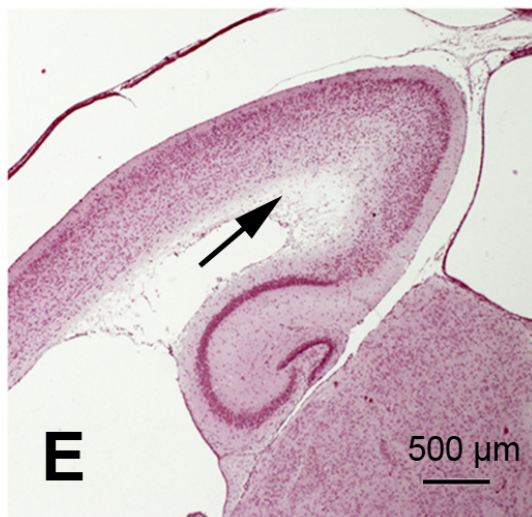
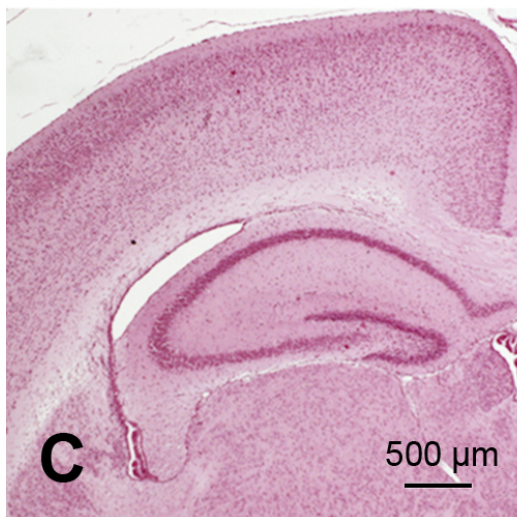
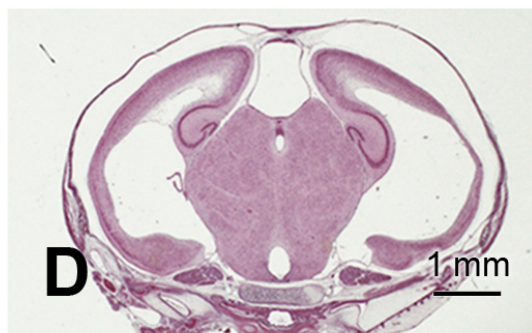
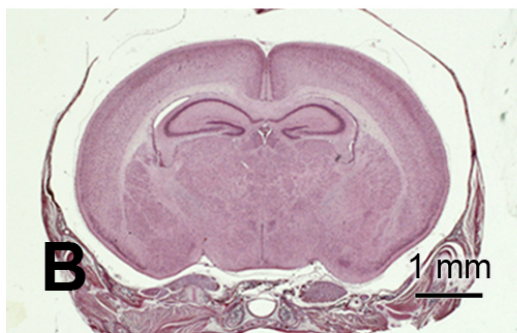
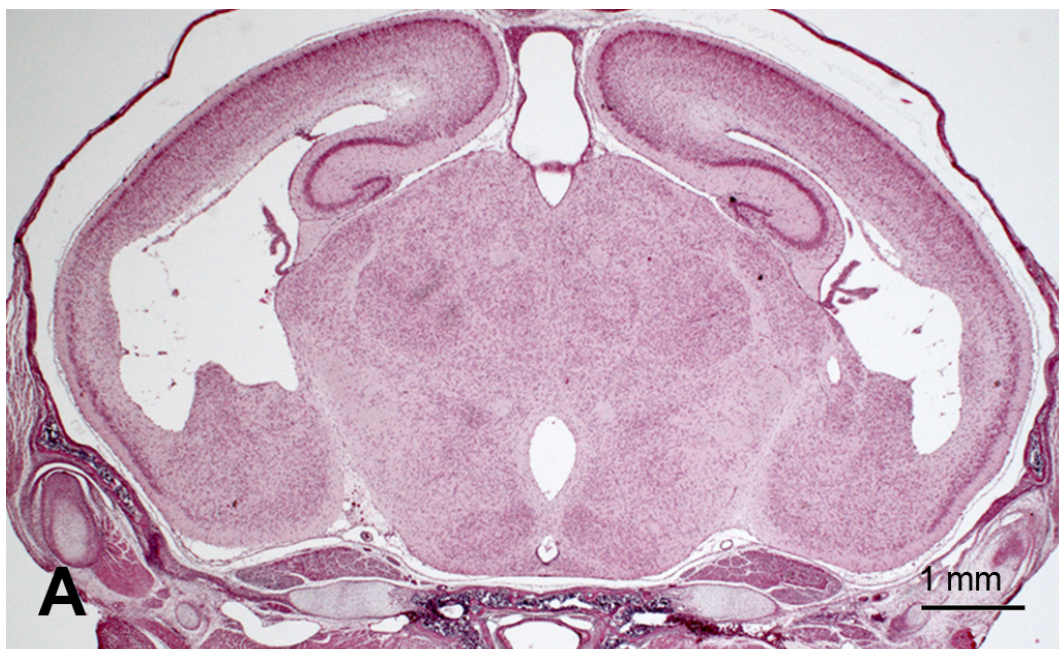
Su presencia también se detectó en pocas ocasiones en todo el parénquima cerebral de ratones adultos. De esta forma, en los hipocampos de los ratones *hyh*, la microglía anti-iba1 inmunopositiva parecía similar a la de los ratones silvestres, mostrando una morfología distinta a la de su etapa fagocítica (Fig. 54C-G). En ocasiones en las regiones periventriculares se pudo distinguir alguna célula de la microglía extendiendo finos procesos celulares pero careciendo de la morfología clásica de microglía activada (Fig. 54H).

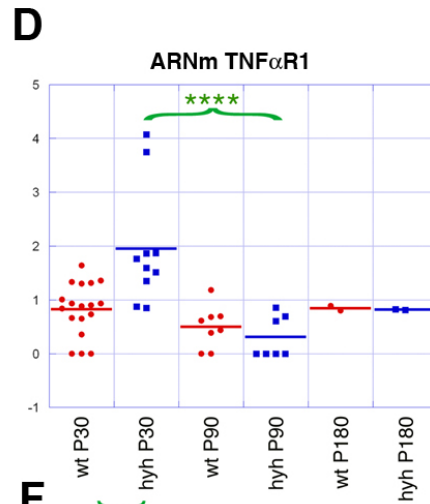
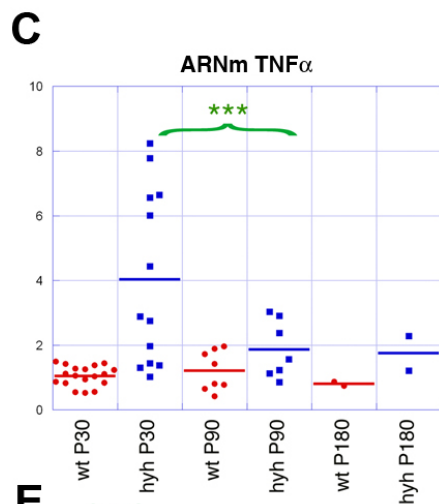
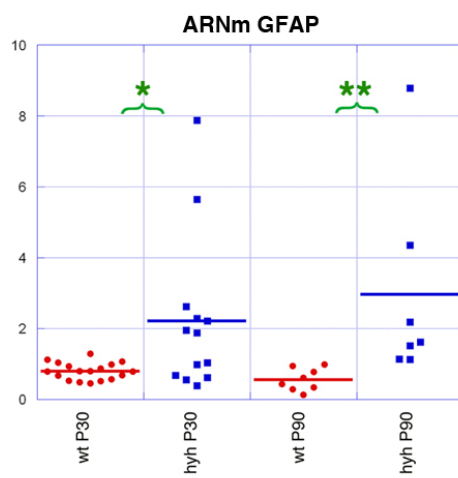
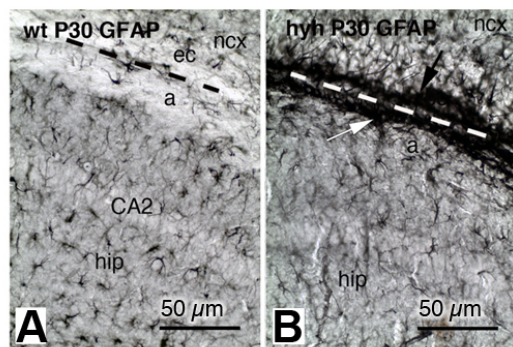
En la cuantificación mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de iNOS en los hipocampos entre ratones silvestres y *hyh*, no se han detectado diferencias significativas (Fig. 54L). Se trata de un factor que puede inducir la activación microglial y por tanto es un indicador de su activación.

Mediante citometría de flujo se detectó que en los ratones *hyh* no existe un mayor número de células iba1 inmunopositivas en los hipocampos (Fig. 54K), no obstante existe una inmunorreactividad significativamente más fuerte a los anticuerpos anti-iba1 (Fig. 54I, J). Este resultado indica que la microglía puede estar afectada de alguna forma.

---

**Figura 49.-** Desarrollo de la hidrocefalia y la ventriculomegalia en ratones normales y *hyh*. Secciones frontales teñidas con hematoxilina-eosina. **A:** Ratón *hyh* en P4. **B-C:** Ratones normal (B) y *hyh* (C) en P7. **D-E.** Detalles de las imágenes mostradas, respectivamente, en B y C. Se muestra el edema periventricular en la región del neocórtex del ratón *hyh* (flecha en E).



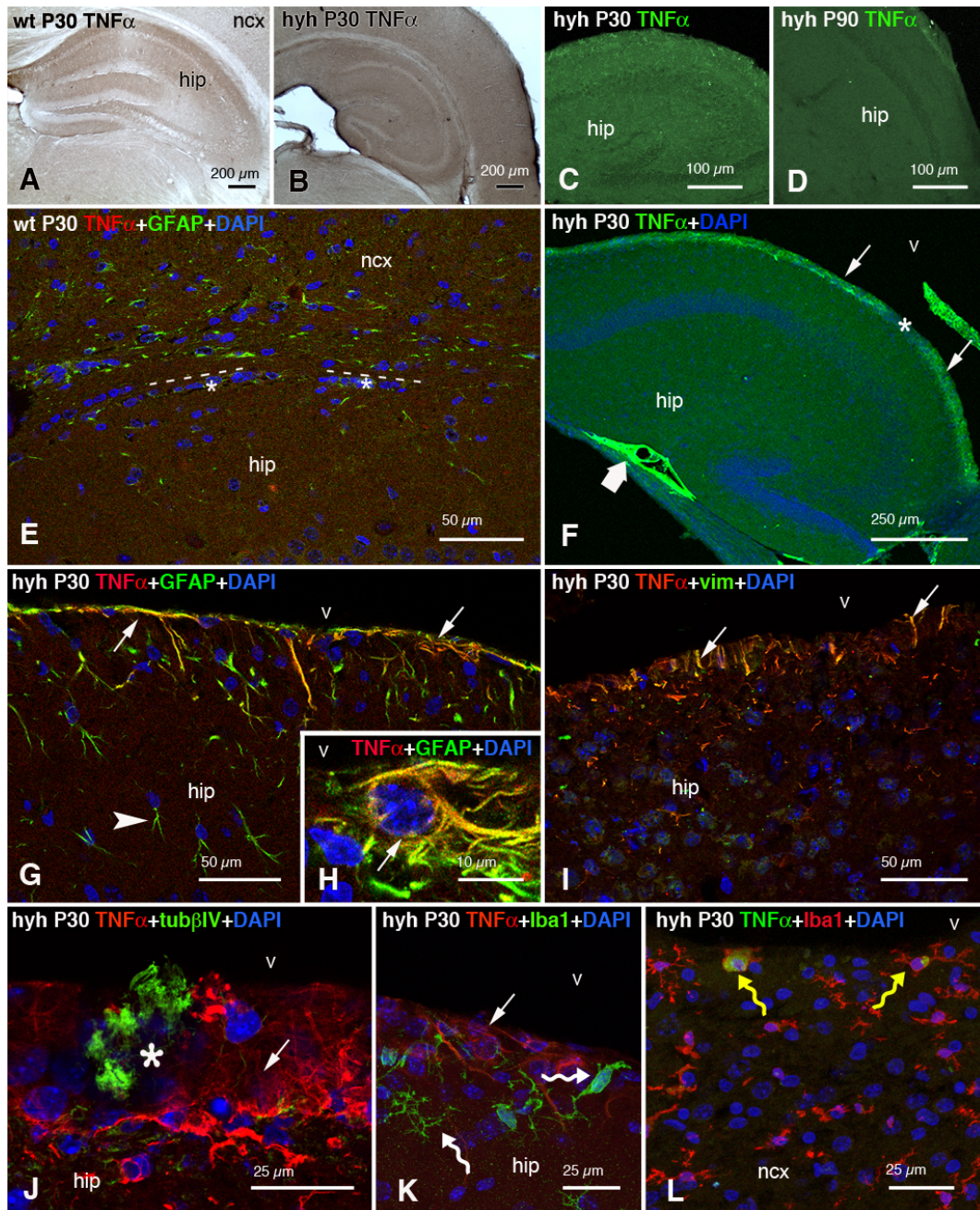


**Figura 50.-** Expresión de GFAP, TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$  y TNF $\alpha$ R1 en el hipocampo de ratones *hyh* y normales (*wt*). **A, B:** Inmunotinción de los astrocitos en el hipocampo de un ratón *wt* (A) y otro *hyh* (B) en P30. Los astrocitos reactivos se detectaron cubriendo la superficie ventricular del hipocampo (flecha blanca en B) y la capsula externa de los ratones *hyh* (flecha negra en B). **C, D:** Niveles de ARNm de GFAP (C) y TGF $\beta$ 1 (D) en el hipocampo de ratones normales (puntos rojos) y *hyh* (puntos azules) en P30, P90 y P180. Las líneas azules y rojas horizontales representan la media. Se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm de GFAP pero no en los niveles de ARNm de TGF $\beta$ 1 mRNA entre ratones *wt* y *hyh* de P30 (\*p < 0,02, \*\*p < 0,06, \*\*\*p < 0,6 ; test *t* de Student). **E, F:** Niveles de ARNm de TNF $\alpha$  (E) y su receptor, TNF $\alpha$ R1 (F), en el hipocampo de ratones *wt* (puntos rojos) y *hyh* (puntos azules) en P30, P90 y P180. Las líneas horizontales azul y roja representan los niveles medios. El análisis de correlación mostró diferencias significativas entre ratones silvestres y *hyh* en P30 y entre ratones *hyh* en P30 y P90 (\*p < 0,002, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,02, \*\*\*\*p < 0,001; test *t* de Student). Por animal *hyh* se encontró una probabilidad de correlación alta (0.004) entre los niveles de TNF $\alpha$  y de TNF $\alpha$ R1.

**Figura 51.-** Expresión de TNF $\alpha$  en la neocorteza y el hipocampo de ratones normales (*wt*) y *hyh* en P4 y P7. Microscopía confocal de secciones inmunoteñidas usando anticuerpos anti-TNF $\alpha$  (verde) y contrastados usando el marcador nuclear DAPI (azul). **A-G, I-K:** Neocorteza (Ncx). **A, C, H:** Hipocampo (hip). La inmunorreactividad se detectó en un patrón difuso en el parénquima cerebral y en las células de las meninges (flechas gruesas; en B, E, I y J). También se detectó expresión de TNF $\alpha$  en los cuerpos celulares de los astrocitos y en sus pies terminales en la glía *limitans* (flecha delgada, en J, doble marcaje con anti-GFAP en rojo), así como en los astrocitos reactivos de la superficie ventricular (flechas delgadas, en F y G). La línea discontinua en A y C marca el espacio de los VL entre el hipocampo y la neocorteza. La inmunorreactividad contra TNF $\alpha$  se detectó en los pies perivasculares de los astrocitos que rodean los vasos sanguíneos cercanos a las meninges (asteriscos en K) y al ventrículo en la neocorteza. **Abreviaturas:** v, lumen del ventrículo lateral.



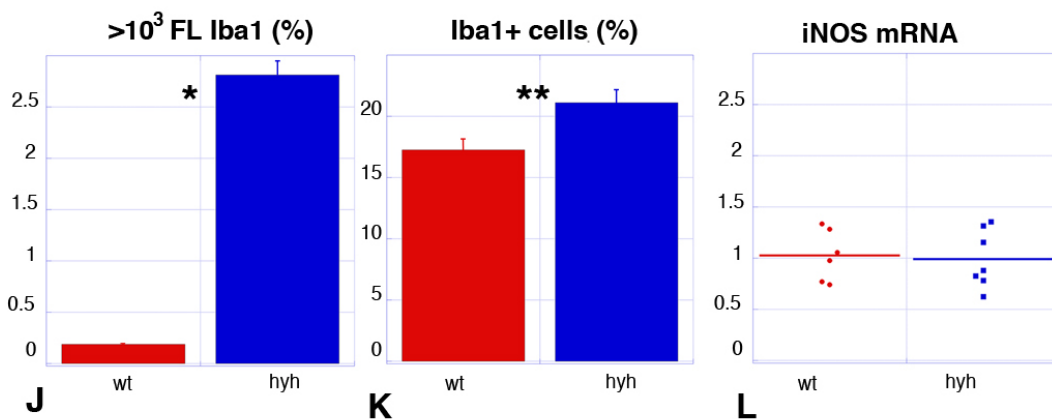
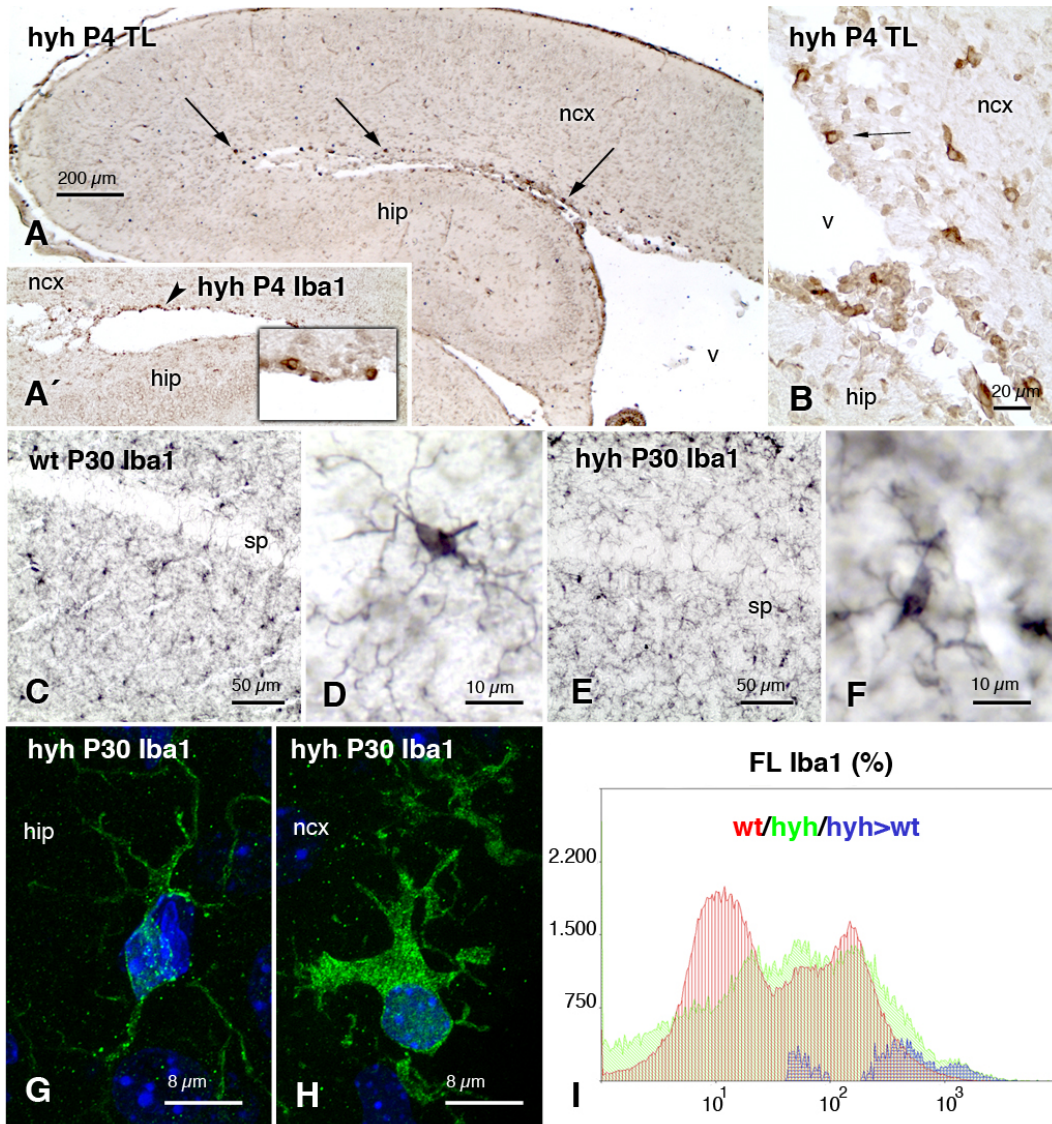




**Figura 52.-** Expresión de TNF $\alpha$  en la neocorteza (ncx, **A, B, E, L**) y el hipocampo (hip; **A-K**) de ratones *wt* (**A, E**) y *hyh* (**B-D, F-I**) de P30 (**B, C, F-L**) y P90 (**D**) con anticuerpos monoclonales de rata (**A, B, E, G-L**) y desarrollados en ratón (**C, D, F**) contra TNF $\alpha$ . **A, B:** Inmunorreactividad vista bajo microscopía óptica. **C, D:** Inmunofluorescencia (verde) en el hipocampo (**C, D**). **E:** Doble inmunofluorescencia en la neocorteza y el hipocampo con anti- TNF $\alpha$  (rojo) y anti-GFAP (verde). La línea discontinua marca el espacio del ventrículo lateral entre la neocorteza y el hipocampo. **F:** Inmunofluorescencia con anti-TNF $\alpha$  (verde) en el hipocampo y contrastado con DAPI (azul). Se detectó una fuerte inmunorreactividad en las meninges (flecha gruesa). La superficie ventricular está cubierta por astrocitos reactivos también fue reconocida por los anticuerpos (flechas) pero las células endoteliales que permanecen fueron inmunonegativas (asterisco). **G-I:** Doble inmunofluorescencia para TNF $\alpha$  (rojo) y, o bien GFAP (verde, en **G** y **H**) o vimentina (vim, marcador de astrocitos reactivos; verde, en **I**) en el hipocampo. Los astrocitos periventriculares reactivos (flechas en **G-I**) son reconocidos (naranja/amarillo) por los anticuerpos contra GFAP/vimentina y TNF $\alpha$ . Los astrocitos no reactivos en el parénquima cerebral (cabeza de flecha, en **G**) no los coexpresaron (verde). **J-L:** Doble inmunofluorescencia contra TNF $\alpha$  (rojo, en **J** y **K**; verde, en **L**) y tubulina  $\beta$ IV (tub $\beta$ IV, marcador de cilios endoteliales; verde, en **J**) o iba1 (marcador de microglía; verde, en **K**; rojo, en **L**) en la pared ventricular del hipocampo (**J, K**) y la neocorteza (**L**). Representa una vista superficial de una sección gruesa mostrando la inmunotinción de los cilios pertenecientes a un pequeño parche de células endoteliales (asterisco) que permanecen. Las células microgliales iba1 inmunopositivas no fueron reconocidas con el anticuerpo anti-TNF $\alpha$  en el hipocampo (flecha blanca curvada, en **K**), pero se encontraron algunas que coexpresaron en la superficie ventricular (flechas curvadas amarillas, en **L**). Los astrocitos reactivos que cubrían la superficie ventricular presentaron inmunorreactividad contra anti-TNF $\alpha$  (flechas, en **J** y **K**). **Abreviaturas:** v: lumen ventricular.

**Figura 53.-** Inmunofluorescencia con anti-TNF $\alpha$ R1 (TNFR1) desarrollado en conejo (verde) en la neocorteza (**A-F**) y el hipocampo (**G-I**) de ratones *hyh* en P30. En alguna sección se muestra en doble inmunofluorescencia contra GFAP (rojo). **A:** Vista panorámica de la neocorteza. El área que contiene las meninges encuadrada se muestra en **B**. **B:** Los astrocitos GFAP positivos (rojo) que anclan la pia madre de las meninges (flecha) expresan el receptor TNF $\alpha$ R1. **C-I:** Los astrocitos reactivos en la superficie ventricular del hipocampo y la corteza expresan el receptor (flechas blancas, en **C, D, H** y **I**; colocalización con GFAP, naranja/amarillo, en **C**). En **C', C'', C'''** se muestran detalles del área encuadrada en **C** con canales conjuntos y separados para las correspondientes inmunorreactividades contra GFAP y TNF $\alpha$ R1. Las flechas amarillas en **D** señalan la inmunorreactividad contra TNF $\alpha$ R1 en las neuronas neocorticales. El área de la neocorteza mostrada en **D** desarrolla una reacción astrogliosa muy laxa. **E, F:** Sección de 1  $\mu$ m de grosor obtenida mediante el microscopio láser confocal de los vasos sanguíneos cercanos a las meninges. Las prolongaciones de los astrocitos y sus pies terminales periventriculares (GFAP en rojo; cabezas de flecha; asterisco, lumen del vaso) además muestran inmunorreactividad a anti-TNF $\alpha$ R1 (verde). **G, I:** Superficie ventricular del hipocampo mostrando un parche de epéndimo que permanece cercana a la reacción astrogliosa periventricular. El inserto en **G** representa un detalle del *stratum pyramidale* (sp) mostrada en un plano confocal de 1  $\mu$ m de grosor. El área encuadrada en **G** con células endoteliales se muestra en **H** como un plano confocal de 1  $\mu$ m. La flecha en **H** muestra colocalización de TNF $\alpha$ R1 en una prolongación celular de un astrocito. **Abreviaturas:** as, astrocitos reactivos; en,





**Figura 54.-** Microglía en el hipocampo (hip) y la neocorteza (ncx) de ratones *wt* y *hyh*. **A, B:** Histoquímica de lectina de tomate (TL) en un ratón *hyh* de P4. Las células macrofágicas están marcadas (flechas) en el área periventricular edematosa de la neocorteza. **A'**: Sección adyacentes a la mostrada en A inmunoteñida usando el anticuerpo anti-iba1 además mostraron la presencia de células macrofágicas en la neocorteza. Las células mostradas con una cabeza de flecha están mostrada en detalle en el inserto. **C-F:** Inmunotinción con anti-iba1 de la microglía en el hipocampo de un ratón *wt* (C, D) y ratones *hyh* (E, F) en P30. **G, H:** Inmunotinción para Iba1 de las células microgliales en el hipocampo (G) y la neocorteza (H) de un ratón *hyh* en P30. Células microgliales con la morfología mostrada en H se encontraron en la región periventricular de la neocorteza pero raramente en el hipocampo. **I-K:** Análisis con citometría de flujo de las células Iba1 inmunopositivas en el hipocampo de ratones *wt* y *hyh* en P30 (ratones por condición). **I:** Representación del número de eventos (eje Y) e intensidad de inmunofluorescencia para Iba1 (FL, unidades arbitrarias; eje X) de muestras de la corteza un ratón normal (*wt*) (rojo) y un ratón *hyh* (verde). El área en azul representa la diferencia en el número de eventos inmunopositivos entre el ratón *hyh* y el *wt*. **J:** Porcentaje de eventos respecto a los eventos totales con alta intensidad de inmunofluorescencia para Iba1 ( $>10^3$  unidades arbitrarias) en ratones *wt* y *hyh*. \*  $p < 0,0001$ ; test *t* de Student. **K:** Número de eventos Iba1 positivos cuantificados en el hipocampo de ratones *wt* y *hyh*. \*\*  $p = 0,7$ ; test *t* de Student. **I:** Niveles de ARNm de iNOS en el hipocampo de ratones *wt* (puntos rojos) y *hyh* (azul) en P30. Las líneas transversales roja y azul representan los niveles medios.  $p = 0,9$ ; test *t* de Student. Abreviaturas: ncx, neocorteza; hip, hipocampo; sp, *stratum pyramidale*; v, lumen del ventrículo lateral.



# DISCUSIÓN





## 1. Desarrollo de las superficies ventriculares en el ratón normal

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral usando un análisis de las superficies ventriculares con MEB han puesto de manifiesto que la maduración del neuroepitelio sigue en general el patrón caudo-rostral y ventro-dorsal descrito en el ratón por Bruni (1985; 1988) y en humanos por Sarnat (1992; 1995).

Básicamente se ha observado que el neuroepitelio presenta una superficie carente de cilios y rugosa. En cambio, la aparición de las células de la glía radial dentro del neuroepitelio se manifiesta por el desarrollo de un cilio único y corto. Finalmente, la mayor parte del epéndimo resultante de la diferenciación terminal de las células de la glía radial (Tramontin et al. 2003; Spassky et al. 2005) tiene una superficie multiciliada.

Atendiendo al aspecto de las superficies, se ha podido observar que dentro de una placa basal o alar, existe además un gradiente en la diferenciación del neuroepitelio desde la línea media hacia las regiones laterales. Este tipo de evidencia en la maduración del neuroepitelio puede explicar el patrón que sigue la afectación de su desarrollo en los ratones *hyh* hidrocefálicos (Jiménez et al. 2001). Las edades y regiones en las que en el ratón *hyh* tiene lugar el desprendimiento de las células neuroepiteliales, se corresponden con un momento en el que aún no existe epéndimo multiciliado. Por ejemplo, en el ratón *hyh* el neuroepitelio se desprende en la región adyacente a la placa del suelo en el cuarto ventrículo en E12 (Jiménez et al. 2001; Bátiz et al. 2009). En esa edad, la superficie del 4V se corresponde a la de un neuroepitelio con algunas células de glía radial. El epéndimo multiciliado en el 4V aparece en P1 (resultados de la presente Tesis Doctoral). Por tanto, el concepto de denudamiento ependimario en relación con la hidrocefalia no tendría sentido. En esa línea, los últimos artículos que describen una alteración de la ZV en relación con la hidrocefalia, lo definen más bien con una desestructuración (*disruption*) de la ZV ocupada por las células madre (Rodríguez et al. 2012; Guerra et al. 2015). El hecho de que lo

que se desprenda sean células madre neurales y no endimocitos maduros postmitóticos (Spassky et al. 2005) puede tener sus consecuencias en la neurogénesis (Rodríguez et al. 2012; Guerra et al. 2015).

La apariencia que muestran las superficies que son más inmaduras (con presencia de células uniciliadas) están de acuerdo con una actividad propia del neuroepitelio o de la glía radial. Así por ejemplo, todavía se observan en el techo caudal del acueducto hasta P14. Estos datos están de acuerdo con la actividad de endimogénesis que se da en el ratón en esta región descrita por Bátiz et al. (2011). Precisamente esa capacidad ha permitido explicar la capacidad de expansión que tiene ese ventrículo en los ratones hidrocefálicos *hyh* (Pérez-Fígares et al. 1998; Bátiz et al. 2011).

Dentro de algunas superficies ventriculares se han podido distinguir regiones con aspecto más inmaduro, con cilios únicos, que se mantienen en el desarrollo por más tiempo. Estas regiones pueden tener un significado funcional. Por ejemplo, una de las regiones localizada en la pared dorsal que limita el acueducto caudal con el cuarto ventrículo podría corresponderse con la región organizadora ístmica (ver Fig. 23). El organizador del istmo representa el segmento más anterior del rombencéfalo con actividad morfogenética, enviando señales diferenciadoras en dirección rostral y caudal (Echevarría et al. 2003).

En las paredes de los ventrículos laterales son frecuentes las células uniciliadas que posiblemente se corresponden con las células madre de la ZSV (Merkle and Alvarez-Buylla 2006). Se ha podido observar que son especialmente abundantes, incluso en los ratones más maduros, en la porción rostral de los VL, incluyendo la pared medial. Esta evidencia estaría de acuerdo con los límites de la superficie ocupadas por la ZSV neurogénica descrita por Alvarez-Buylla et al. (2008).

La superficie de la línea media ventricular, ocupada por la placa del suelo, presenta *blebs* de una forma consistente, donde permanecen por lo menos hasta las dos semanas de edad. La placa del suelo es un centro importante de señalización que controla la diferenciación regional ventral y en la guía axonal

(Strähle et al. 2004). En ratas, se mostraron con microscopía electrónica de barrido, que las células en esa región tienen un aspecto glandular y presentan protuberancias apicales que pueden corresponderse con los *blebs* observados (Rodríguez et al. 1996; del Brío et al. 2001). En explantes de la placa del suelo de la vaca *in vitro*, se ha demostrado que producen SCO-spondin, una molécula que también secreta la glándula endimaria órgano subcomisural (Guiñazú et al. 2002). La parte apical en contacto con el ventrículo del órgano subcomisural también presenta estructuras a modo de *blebs*, aunque no lisas (Rodríguez et al. 1998). También han podido ser observadas en la presente Tesis (resultados no mostrados). El receso colicular, en el techo del acueducto, muestra la presencia de *blebs* que también han sido puestos de manifiesto en fetos de cabra y oveja (Rajtová and Kacmárik 1998). El receso colicular ha sido descrito como un órgano circunventricular con características secretoras (Stumpf et al. 1977).

## **2. Un defecto en el desarrollo de la *glial wedge* se asocia con la agenesia del cuerpo caloso en los ratones *hyh* con hidrocefalia congénita**

En la presente Tesis Doctoral, se ha investigado el papel que el desarrollo anómalo del neuroepitelio puede implicar la asociación de la agenesia del cuerpo caloso y la hidrocefalia. Tal y como se ha visto en los resultados, la diferenciación de la superficie ventricular en los ratones normales no es homogénea, ni tampoco lo son las poblaciones celulares que la integran a lo largo del desarrollo. La superficie de la *glial wedge* puede considerarse una de esas poblaciones donde aparece antes la glía radial y que puede verse afectada en el programa de desarrollo que afecta al neuroepitelio en los ratones *hyh*.

Los ratones *hyh* presentan una hidrocefalia congénita con un quiste interhemisférico, y la agenesia del cuerpo caloso no puede interpretarse por tanto como una consecuencia malformativa debida al quiste o a la ventriculomegalia. El desarrollo del cuerpo caloso tiene lugar en edades donde

todavía no existe el quiste interhemisférico y los VL están colapsados. De hecho, la ventriculomegalia en los VL tienen lugar en etapas postantales. Los resultados obtenidos indican que el desarrollo de la *glial wedge* explica la agenesia del cuerpo calloso en los ratones *hyh* y no la ventriculomegalia ni un defecto en la fusión de la línea media telencefálica.

Los ratones *hyh* se caracterizan porque el desarrollo de su neuroepitelio se altera siguiendo patrones muy precisos, tanto en el espacio como en el tiempo (Jiménez et al. 2001; Wagner et al. 2003; Páez et al. 2007). Los resultados en la presente Tesis Doctoral, donde se describen los patrones de superficie ventricular, muestran una heterogeneidad en el desarrollo y en las poblaciones que integran el neuroepitelio mayor de la esperada. En ella puede radicar el patrón diferencial constante de afectación en dentro de un mismo ventrículo en el ratón *hyh*. Por ello, era plausible la hipótesis de que una alteración específica en alguna de las poblaciones celulares del neuroepitelio en la línea media telencefálica explique la asociación entre ambas patologías, hidrocefalia y agenesia del cuerpo calloso.

El ratón *hyh* constituye un modelo animal que presenta una hidrocefalia congénita con un quiste interhemisférico (Bronson and Lane 1990; Pérez-Fígares et al. 1998). No obstante, la agenesia del cuerpo calloso no se debe a la presencia de un quiste interhemisférico o la ventriculomegalia, como podría suponerse al igual que en casos de hidrocefalia humana. Ello se explica porque el desarrollo del cuerpo calloso se produce en etapas cuando el quiste interhemisférico no estaba todavía presente y los ventrículos laterales se no están dilatados, sino colapsados (Páez et al. 2007). La ventriculomegalia en los ventrículos laterales se produce a edades postnatales en el ratón *hyh* (ver Figs. 34 y 44).

Las células gliales radiales constituyen una población celular heterogénea situada en el neuroepitelio que soporta la migración celular durante el desarrollo cerebral (Pinto and Götz 2007). Las células de la *glial wedge* se consideran parte de andamio celular de glia radial de la corteza cerebral, expresando marcadores tales como el antígeno reconocido por el anticuerpo RC2, BLBP y el transportador de glutamato GLAST. En la presente Tesis Doctoral, se ha

encontrado que esta subpoblación de células gliales radiales está específicamente afectada por el programa defectuoso intrínseco al desarrollo del neuroepitelio en el ratón *hyh*. Este programa sigue un patrón temporo-espacial de acuerdo con la diferenciación celular en la zona neuroepitelio/ventricular (Jiménez et al. 2001). Las células de la *glial wedge* se diferencian antes que el neuroepitelio vecino, y expresan GFAP previamente a otras regiones del telencéfalo dorsal (Shu et al. 2003c). Las células de la *glial wedge* aparecen alteradas durante el programa de la diferenciación celular en un momento diferente al de las áreas vecinas en el neuroepitelio. En el ratón *hyh* en E15,5, la organización de la *glial wedge* se interrumpe y estas células no muestran la morfología radial. Más tarde, en edades postnatales, las células en las que derivarían aparecen ausentes, lo cual muestra que no se desarrollan.

En el ratón *hyh*, existe una mutación en el gen *Napa* que codifica alfa-SNAP, la proteína de fijación al factor soluble sensible a la N-etil-maleimida (NSF) (Chae et al. 2004; Hong et al. 2004). El mecanismo exacto por el cual esta mutación provoca desarrollo defectuoso del neuroepitelio no se conoce. Una posible explicación implica problemas en la localización de uniones celulares en el neuroepitelio, que pueden subyacer en la etiología de la hidrocefalia (Rodríguez et al. 2012; Guerra et al. 2015). Es plausible que estos problemas también están implicados en la desorganización de la zona ventricular en la *glial wedge* en el ratón *hyh* antes de las áreas vecinas.

En contraste con las células de la *glial wedge*, las células gliales en el *indusium griseum* son astrocitos que no están ubicados en el neuroepitelio en la zona ventricular. En su lugar, se colocan debajo de la membrana pial medial. Las células gliales en el *indusium griseum* se originan en una etapa de desarrollo posterior con respecto a la *glial wedge*, por la translocación de células gliales radiales (Shu et al. 2003c). En los resultados se ha encontrado que las células gliales del *indusium griseum* se desarrollan en el ratón *hyh*.

En los resultados, se ha detectado la presencia de neuronas neocorticales en ratones *wt* y *hyh* que expresan el factor de transcripción Tbr1, el cual está implicado en su diferenciación (Bulfone et al. 1995; Hevner et al. 2001). Estas neuronas proyectan los axones pioneros en la proyección del cuerpo caloso

(Koester and O'Leary 1994). En los ratones, tanto en *wt* y *hyh*, estas neuronas también expresan la molécula Tag1. Tag1 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se implica en la migración y fasciculación de los axones durante el desarrollo (Karagogeos 2003). Tag1 modula la respuesta a las moléculas que se difunden para la guía axonal (Law and Kirby 2008). Influye en el comportamiento del cono de crecimiento durante la búsqueda de rutas (Wolman et al. 2008), y está presente en las fibras que forman el cuerpo calloso (Fujimori et al. 2000; Savvaki et al. 2008). Sin embargo, en cortes organotípicos *in vitro* de ratón *hyh*, la aplicación experimental del trazador Dil marcando los axones pioneros los axones ha mostrado que no eran capaces de cruzar la línea media. Por el contrario, se volvieron en la dirección equivocada hacia el ventrículo lateral ipsilateral. De acuerdo con estos resultados, la inmunotinción de axones pioneros utilizando anti-GAP43 en secciones del SNC fijadas en el ratón *hyh* revela la existencia de axones dirigidos incorrectamente hacia el ventrículo ipsilateral.

Todas estas evidencias sugieren la existencia de problemas de orientación para esos axones. Tanto las células de la *glial wedge* como las células gliales en el *indusium griseum* se conocen por ser fuentes de moléculas quimiorrepelentes como Slit-1 (Shu et al. 2003c). Al parecer, crean un carril para guiar los axones para cruzar la línea media. La presencia del efecto quimiorrepelente de las células gliales del *indusium griseum* y su ausencia de la cuña de la glía podría explicar la dirección defectuosa tomada por los axones pioneros.

En humanos, la agenesia del cuerpo calloso es una característica anatómica presente en varias enfermedades (Raybaud 2010). De hecho, se asocia con más de 50 diferentes síndromes congénitos humanos que pueden presentar diferentes etiologías (Ren et al. 2006). Hay un número de genes afectados en humanos y síndromes caracterizados genéticamente que están asociados con la agenesia cuerpo calloso (Raybaud 2010; Richards et al. 2004). Algunos de ellos también muestran hidrocefalia. Por lo tanto, es plausible que, al menos en algunos casos, las moléculas o mecanismos implicados en la formación del cuerpo calloso también están involucrados en la hidrocefalia. Por ejemplo, la alteración o mutación de genes *NFIA* y *NFIB*, que son esenciales para la glía en

la línea media involucrada en el desarrollo del cuerpo calloso, causan agenesia del cuerpo calloso y defectos en la comisura del hipocampo, así como la hidrocefalia en la misma etapa de desarrollo (Shu et al. 2003a; Das Neves et al. 1999; Steele-Perkins et al. 2005)).

Barkovich et al. (2001) han descrito una clasificación de casos humanos con agenesia del cuerpo calloso y quistes interhemisféricos. Estos autores han propuesto el ratón *hyh* como un modelo para estudiar el desarrollo de quistes tipo 1. El ratón *hyh* presenta una hidrocefalia comunicante moderada durante el desarrollo en el momento de la formación del cuerpo calloso (Jiménez et al. 2001). Más tarde, desarrolla un quiste interhemisférica cubierto con el epéndimo que forma el 3V dorsa (Pérez-Fígares et al. 1998). Los presentes resultados muestran que ventriculomegalia y el quiste del tercer ventrículo se forman cuando la parte principal del cuerpo calloso ya debe estar desarrollado. De hecho, los síntomas de agravamiento hidrocefalia tienen lugar durante la primera semana después del parto, cuando la hidrocefalia en el ratón *hyh* se convierte en obstructiva (Wagner et al. 2003; Bátiz et al 2006). Por lo tanto, la ausencia de la formación del cuerpo calloso puede ser considerado malformativa en lugar de una malformación debido al desarrollo de un quiste interhemisférico o de ventriculomegalia.

Mediante los resultados obtenidos en el ratón y en otros modelos animales, se puede proponer que, en algunos síndromes humanos, un problema en el desarrollo de las poblaciones de células de la zona ventricular puede ser la base de la coexistencia de hidrocefalia y agenesia del cuerpo calloso.

### **3. Papel de la reacción astrocitaria que reemplaza al epéndimo ausente**

En los ratones hidrocefálicos *hyh*, hay un programa de que afecta el desarrollo del neuroepitelio/epéndimo, que comienza temprano en la vida fetal y

que termina a finales de la primera semana después del parto. El epéndimo faltante se sustituye por una capa de astrocitos que forman una nueva interfaz entre el LCR y el parénquima cerebral (Páez et al. 2007). Este fenómeno también se ha descrito en los fetos hidrocefálicos humanos (Dominguez-Pinos et al. 2005). En la presente Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto que la reacción presenta diferentes grados de desarrollo. Además, los astrocitos expresan aquaporina 4 y muestran propiedades celulares que sugieren una actividad endocítica al igual que el epéndimo. Por tanto pueden desempeñar un papel en la interfaz LCR-parénquima nervioso. Finalmente, los astrocitos reactivos se implican en la producción de la citoquina  $TNF\alpha$  y expresan su receptor  $TNF\alpha R1$ , cuyos niveles parecen estar relacionados con la gravedad de la evolución de la hidrocefalia.

El presente estudio, llevado a cabo en ratones *hyh* y casos humanos, ha revelado que la nueva capa superficial de astrocitos comparte algunas características fenotípicas y funcionales con el epéndimo, lo que sugiere que una reacción de astrocitos puede representar un intento de restablecer algunas funciones perdidas en la interfaz *encéfalo* parénquima-CSF.

### **3.1. Los astrocitos reactivos periventriculares forman una nueva capa de células con una organización celular que se asemeja a la del epéndimo**

Los astrocitos reactivos periventriculares forman una nueva capa de células con una organización celular que se asemeja a la del epéndimo. Los resultados de la presente Tesis Doctoral junto con otros obtenidos por el grupo que han sido recientemente publicados (Roales-Buján et al. 2012), han mostrado tales astrocitos reactivos expresan al igual que el epéndimo: a) la proteína de filamentos intermedios vimentina; b) la proteína de secreción S100b; carece de uniones estrechas y por tanto no forman una barrera impermeable en sus espacios extracelulares; c) se acoplan mediante uniones de tipo *gap* que



contienen conexina 43; d) proyectan numerosas microvellosidades al ventrículo; y f) se unen mediante numerosas interdigitaciones laterales, que dan lugar a un espacio intercelular devanado.

La existencia de uniones comunicantes entre las células endimarias ha sido ampliamente demostrada (Brightman and Palay 1963; Jarvis and Andrew 1988; Bouille et al. 1991; Gabrion et al. 1998), y se cree que desempeñan un papel en la sincronización del batido de sus cilios (Rodríguez et al. 2010; Sival et al. 2011). Su importancia funcional en la capa de astrocitos reactivos es desconocida; pudiendo estar asociadas con actividades eléctricas y metabólicas, la determinación del fenotipo de células, o la liquidación de moléculas citotóxicas y la difusión de los factores neuroprotectores que tiene lugar en las lesiones del SNC, la isquemia y la hipoxia (Lin et al. 1998; Rouach et al. 2002; Sofroniew 2005; Nakase et al. 2006; Talhouk et al. 2008; Jäderstad et al. 2010). Cualquiera que sea el significado funcional de las uniones comunicantes que conectan los astrocitos que cubren la superficie ventricular desnuda, se puede sugerir que estas células están acopladas para desempeñar una función de barrera CSF-parénquima nervioso implicada en el transporte de agua y solutos.

### **3.2. El epéndimo y la capa astrogial presentan mecanismos activos de endocitosis.**

Las células endimarias incorporan proteínas del LCR a través de la vía de pinocitosis-lisosoma. El epéndimo multiciliado de ratones *wt* y el epéndimo que permanece en los ratones hidrocefálicos *hyh* expresan caveolina-1 (Roales-Buján et al. 2012), lo cual está de acuerdo con la expresión del antígeno EEA1, un marcador de endosomas tempranos descrita en la presente Tesis Doctoral.

Los endosomas tempranos son compartimentos celulares dinámicos que están implicadas en la endocitosis y los mecanismos de clasificación celular (Weisz and Rodríguez-Boulan 2009; Jovic et al. 2010). La caveolina-1 es una

proteína que está presente en las caveolas, que son estructuras que desempeñan un papel en la endocitosis y transcitosis (Frank et al. 2003; Gosens et al. 2008). Aunque la mayor carga del transporte en las caveolas es fluida, ciertos compuestos entran en las caveolas a través de receptores específicos (Tuma and Hubbard 2003).

La presencia de caveolas en el epéndimo está de acuerdo con la capacidad conocida de células endimarias para incorporar moléculas trazadoras presentes en el LCR (Brightman 1965; Brightman 1968). En los astrocitos reactivos, las caveolas pueden desempeñar un papel similar, lo cual estaría de acuerdo con la existencia de endocitosis y de mecanismos de clasificación vesicular (Weisz and Rodríguez-Boulan 2009; Jovic et al. 2010), que también se han probado experimentalmente mediante la inyección de HRP en el LCR de ratones *hyh* vivos (Roales-Buján et al. 2012). A diferencia del epéndimo, la distribución no polarizada de caveolas y de los endosomas, descrita en la presente Tesis Doctoral, en los astrocitos reactivos indica que pueden incorporar sustancias fluidas y no sólo desde el ventrículo sino también desde el fluido del parénquima nervioso.

### **3.3. Papel de la expresión del canal transportador de agua acuaporina 4 en el epéndimo y los astrocitos periventriculares**

La acuaporina 4 es un canal de agua con marcada prevalencia en áreas periventriculares (Venero et al. 2001). En las células endimarias se encuentra en los dominios latero-basales (presente Tesis Doctoral) y, con menos presencia, en el dominio apical (presente Tesis Doctoral). En los astrocitos del parénquima nervioso, estos canales se encuentran principalmente en los pies terminales perivasculares [(Rash and Richards 2001), presente Tesis Doctoral]. Por el contrario, astrocitos reactivos que recubren las superficies sin epéndimo en los ratones *hyh* y en los fetos humanos (Roales-Buján et al. 2012) sobreexpresan acuaporina 4, y esta proteína se encuentra en todo el cuerpo celular en sus prolongaciones celulares. Se ha propuesto que la acuaporina 4 en los astrocitos

reactivos permite la entrada de agua hacia astrocitos en las etapas iniciales de la formación de edema (Nase et al. 2008), para restablecer el equilibrio osmótico (Venero et al. 2001). En el caso de la hidrocefalia esta función tendría bastante sentido sobre todo a nivel de los edemas periventriculares.

La reacción periventricular presente en los ratones *hyh*, y que también tiene lugar en fetos humanos (Dominguez-Pinos et al. 2005), podría representar un intento de restablecer el equilibrio entre los fluidos ventriculares y del parénquima, o para ayudar a transportar el LCR de los ventrículos a los capilares del parénquima nervioso. Se ha propuesto que en el epéndimo, la acuaporina 4 puede desempeñar un papel protector en la hidrocefalia, al permitir la reabsorción transependimaria de LCR hacia en los capilares del parénquima nervioso (Skjolding et al. 2010). Por lo tanto, parece que la acuaporina 4 puede tener un papel relevante en la hidrocefalia y podría ser una diana terapéutica útil (Mao et al. 2006; Shen et al. 2006; revisado por: Owler et al. 2010; Skjolding et al. 2010; Paul et al. 2011).

### **3.4. Existen diferentes grados de densidad celular y la estanqueidad en las reacciones astrocitarias periventriculares**

Una pregunta que surge a partir de los resultados obtenidos en cuanto al grado de la reacción periventricular es el tipo de señales que mediarían estas respuestas diferentes. En los ratones *hyh*, la desaparición del neuroepitelio/epéndimo se lleva a cabo en etapas prenatales, antes de que la dilatación de los ventrículos sea acusada (Jiménez et al. 2001)]. Por lo tanto, la presión intraventricular o la existencia de ventrículos expansión no pueden ser considerados como responsables de la ausencia de epéndimo en estos ratones. Del mismo modo, la reacción astrocitos periventriculare aparece poco después de la afectación del neuroepitelio, cuando la astrogliogenesis se lleva a cabo, pero en una etapa en que la ventriculomegalia está empezando a desarrollarse. Además, la capa de astrocitos más densa es la que recubre el suelo del cuarto ventrículo, una cavidad que apenas presenta dilatación.

El mecanismo subyacente a la formación de la capa de astrocitos que reemplaza el epéndimo perdido no se conoce. Puede ser la ausencia real de la epéndimo o la exposición directa de la neuropilo al LCR. También es posible un efecto mecánico de la expansión de los ventrículos involucrados. Se puede plantear si existen diferentes consecuencias fisiopatológicas de las regiones del SNC protegidos por una nueva y compacta capa de astrocitos. Estas son preguntas abiertas para futuras investigaciones.

#### **4. Un incremento en los niveles de TNF $\alpha$ pero no de TGF $\beta$ se asocian con la severidad de la hidrocefalia en los ratones *hyh* hidrocefálicos.**

En la presente tesis Doctoral, se ha detectado que el nivel de expresión de ARNm de TNF $\alpha$  era significativamente mayor en los animales *hyh* con hidrocefalia severa en comparación con los ratones normales controles y, curiosamente, incluso en comparación con los ratones *hyh* que mostraban una forma compensada de la enfermedad (ratones en P90 y P180).

Los resultados obtenidos utilizando anticuerpos contra TNF $\alpha$  en inmunotinción secciones de *encéfalo* coincidieron han mostrado una evidencia cualitativa que cuadra con con la expresión de ARNm para la citoquina.

Se han detectados dos formas de inmunorreactividad utilizando anticuerpos diferentes de anti-TNF $\alpha$ : a) marcando los astrocitos reactivos que sustituyen el epéndimo ausente en la mayoría de las superficies ventriculares; y b) en un patrón difuso ampliamente distribuido por todo el parénquima nervioso. Esta última forma de inmunorreactividad sugiere la existencia de una forma soluble de TNF $\alpha$  con un efecto de espectro amplio. En consonancia, los niveles de ARNm para el receptor TNF $\alpha$ R1, que es el receptor principal para la forma soluble de TNF $\alpha$ , en cada ratón *hyh* individual, se correspondía estrechamente con los niveles de ARNm para TNF $\alpha$ .

Los niveles de mRNA de TNF $\alpha$  en diferentes ratones de P30 con hidrocefalia severa muestran un alto grado de variación, desde similares al control a un aumento de ocho veces. Sin embargo, ni los controles ni los ratones *hyh* con la hidrocefalia compensada (P90 y P180) presentaron esa variabilidad. Según Bátiz et al. (2006), la mitad de los ratones en P30 muestran macrocefalia, proporción que es sólo un 6% en los que sobreviven 90 días. La reversión de la macrocefalia nunca ha sido descrita en los ratones *hyh*. En el presente estudio, solamente los ratones jóvenes que carecen de macrocefalia han sido capaces de sobrevivir y pasar a desarrollar una hidrocefalia de tipo compensada.

La frecuencia de macrocefalia descrita por Bátiz et al. (2006) y la presión más alta del líquido cefalorraquídeo (LCR) en los ratones P30 podría explicar las amplias variaciones en la expresión de TNF $\alpha$ , que estaban ausentes de todos los ratones examinados de P90 en adelante.

Los presentes resultados en ratones *hyh* indican que la citoquina TNF $\alpha$  está asociada con la fisiopatología de la hidrocefalia congénita, probablemente actuando a través del receptor TNF $\alpha$ R1. EL TNF $\alpha$  puede estar relacionado con la gravedad de la enfermedad de alguna manera.

Los resultados obtenidos concuerdan bien con los documentados en otros modelos animales. En un modelo experimental de la hidrocefalia obstructiva, que implica la inyección intracisternal de caolina en ratas recién nacidas, la expresión del receptor TNF $\alpha$ R1 en la corteza parietal está regulada positivamente y se asocia con respuestas inflamatorias (Deren et al. 2010). En la rata HTx, modelo animal que desarrolla hidrocefalia también congénita, existe una mayor expresión de ligandos relacionados con el TNF $\alpha$ , lo que indica un papel para el TNF en las respuestas inflamatorias, probablemente a través de reacciones microgliales y astrocitales (Miller et al. 2006). En la neocorteza y el hipocampo de modelos animales con hidrocefalia se han descrito la existencia de respuestas inflamatorias (Balasubramaniam and Del Bigio 2002; Xu et al. 2012) y diferentes reacciones neurodegenerativas, incluyendo reacciones gliales (Deren et al. 2010; Xu et al. 2012), la muerte neuronal y alteraciones metabólicas [(Del Bigio and Bruni 1991; Ding et al. 2001a; Ding et al. 2001b; Klinge et al.

2002; Egawa et al. 2002; Kawamata et al. 2003; Del Bigio et al. 2003; Shim et al. 2003; Kondziella et al. 2009), condiciones de hipoxia (Socci et al. 1999; Dombrowski et al. 2008) y el estrés oxidativo (Socci et al. 1999). También se han encontrado estas respuestas en la hidrocefalia fetal-neonatal humana (Sival et al. 2008; Castejón 2010)(Botchkina et al. 1997; Maddahi et al. 2011; Watters and O'Connor 2011). Se ha descrito que la expresión del  $TNF\alpha$  se induce después de lesiones isquémicas en el tejido nervioso, incluyendo el hipocampo, y se ha correlacionado con la muerte celular. En ratas con hidrocefalia inducida con caolina, también se han descrito condiciones isquémicas en la corteza cerebral, incluyendo el hipocampo (Del bigio 2000). Las condiciones de isquemia probablemente también están presente en el hipocampo de los ratones *hyh*, debido a la alta presión intraventricular, y por lo tanto, la inducción de un aumento de la expresión de  $TNF\alpha$  sería plausible.

Hemos observado que existe una macrocefalia más pronunciada en los ratones *hyh* en P30 (hidrocefalia severa) que en P90 (hidrocefalia compensada) (Jiménez et al. 2013), lo que sugiere que la presión intraventricular puede ser mayor en ratones a P30 o durante el desarrollo, y que la presión podría inducir una deformación craneal más pronunciada.

El receptor  $TNF\alpha R1$  se ha asociado principalmente con la muerte celular y las vías proinflamatorias programadas que se producen durante la lesión cerebral (Bradley 2008). En la presente Tesis Doctoral se ha encontrado que el receptor se encuentra ampliamente distribuido en el parénquima cerebral y en neuronas neocorticales. La expresión del  $TNF\alpha R1$  periventricular sugiere un papel probable para el  $TNF\alpha$  en la degeneración de estas neuronas periventriculares.

La microglia y los astrocitos reactivos son dos poblaciones de células que participan en procesos neurodegenerativos e inflamatorias. La producción del  $TNF\alpha$  en ratas HTx con hidrocefalia congénita ha sido relacionada con una respuesta microglial que varía con la edad y la gravedad de la hidrocefalia (Mangano et al. 1998), y parece estar asociada con una mayor presión intraventricular (Miller and McAllister 2007). En el caso del ratón *hyh*, la microglia

en estado ameboide sólo está presentes en la sustancia blanca neocortical durante la primera semana de vida (Páez et al. 2007), presente Tesis Doctoral), que es un período de tiempo durante el cual la sustancia blanca periventricular muestra la degeneración masiva de mielina (Páez et al. 2007). Estas células no pueden ser detectadas posteriormente (Páez et al. 2007), presente Tesis Doctoral). Los resultados obtenidos, relativos a la morfología microglial y la expresión iNOS, indican que la microglia probablemente no se activa en el ratón *hyh* maduro. Aunque no se ha detectado en el ratón *hyh* un mayor número de cuerpos de células microgliales, algunos parecen expresar mayores niveles de Iba1, una proteína de macrófago/microglial específica de unión a calcio, involucrada en el movimiento celular dependiente de la GTPasa Rac y en la fagocitosis (Ohsawa et al. 2000). Los resultados obtenidos indican que la microglía no es la fuente principal de TNF $\alpha$  ni parece estar activada en los ratones *hyh* maduros. No obstante, la microglía podrían estar alerta o sutilmente activada en los ratones *hyh*.

En el presente estudio se ha encontrado que los astrocitos reactivos periventriculares expresan tanto TNF $\alpha$  como el receptor TNF $\alpha$ R1. Diversos estudios han que los astrocitos son capaces de producir TNF $\alpha$  y TNF $\alpha$ R1 in vitro, para inducir la producción autocrina del factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) (Kuno et al. 2006). Ha sido descrito que la lesión o isquemia en el sistema nervioso central (CNS) de ratas puede conducir a una regulación al alza del receptor p75 (TNF $\alpha$ FR2) para NGF en astrocitos, lo que probablemente controla la proliferación de astrocitos y, por tanto, restringe la respuesta astrocítica adecuada (Oderfeld-Nowak et al. 2003; Cragolini et al. 2012).

Varios experimentos *in vitro* han demostrado la promoción y regulación de NGF por TNF $\alpha$  (Selmaj et al. 1990; Faber-Elman et al. 1995; Aït-Ikhlef et al. 1999). Se ha sugerido que un defecto en la producción de GDNF por los astrocitos media en la muerte celular neuronal en condiciones isquémicas (Yamagata et al. 2002; Yamagata 2012). Como otro posible efecto, la producción de TNF $\alpha$  en astrocitos podría mediar la permeabilidad del endotelio de la barrera

hematoencefálica. De hecho,  $TNF\alpha$  ha sido implicado en la apertura de las uniones estrechas epiteliales bajo diferentes condiciones patológicas e inflamatorias (Didier et al. 2003; Minagar and Alexander 2003; Ye et al. 2006; Kimura et al. 2008; Landoni et al. 2012; Shen 2012). La presencia del receptor  $TNF\alpha R2$  ha sido descrita en las células endoteliales (Maddahi et al. 2011), en las que podría regular la permeabilidad vascular. Dentro de los resultados de la presente Tesis Doctoral se ha detectado, en los ratones *hyh*, la presencia de  $TNF\alpha$  y de su receptor  $TNF\alpha R1$  en los pies terminales periventriculares de los astrocitos y en las meninges. Esto sugiere que  $TNF\alpha$  también podría realizar algunas funciones desconocidas, incluyendo un papel en la permeabilidad vascular o un efecto en la barrera hematoencefálica.

Los estudios previos sobre el papel de  $TNF\alpha$  en diferentes formas de hidrocefalia humana son limitados y además contradictorios. Tarkowski et al. (Tarkowski et al. 2003) ha descrito altos niveles de  $TNF\alpha$  en el LCR de pacientes adultos con hidrocefalia normotensiva con diferentes causas, sugiriendo que  $TNF$  podría ser un posible marcador biológico de la enfermedad. Sin embargo, Leinonen et al. (Leinonen et al. 2011) ha detectado que los bajos niveles de  $TNF\alpha$  en el LCR de casos de hidrocefalia idiopáticos normotensiva en pacientes de edad avanzada no son significativamente diferentes.

El  $TGF\beta 1$  es un factor que ha sido descrito que desempeñaría un papel en la patogénesis de la hidrocefalia comunicante y en la posthemorrágica [(Kitazawa and Tada 1994; Galbreath et al. 1995; Wyss-Coray et al. 1995; Kanaji et al. 1997; Whitelaw et al. 1999; Flood et al. 2001; Heep et al. 2004; Cherian et al. 2004; Douglas et al. 2009). El  $TGF\beta 1$  tiene un efecto fibrogénico que alrededor de los vasos sanguíneos, en la *glia limitans*, y en el espacio subaracnoideo, altera la absorción de LCR y el drenaje de fluido intersticial perivascular (Johanson et al. 1999). El  $TGF\beta 1$  controla las reacciones gliales mediante la inhibición de la proliferación microglial y astrogial (Lindholm et al. 1992; Vergeli et al. 1995; Jones et al. 1998; Makwana et al. 2007). El  $TGF\beta 1$  ha sido implicado en la regulación de la expresión de GFAP en astrocitos reactivos presentes en las enfermedades neurodegenerativas y en lesiones experimentales (Logan et al.



1994; Krohn et al. 1999; Sousa et al. 2004; Romão et al. 2008). En presente tesis Doctoral se ha detectado un incremento de la expresión de GFAP tanto en las formas severas y compensadas de hidrocefalia en ratones *hyh*. Sin embargo, los niveles de TGF $\beta$ 1 en ratones *hyh* no fueron significativamente diferentes en comparación con los ratones control, ni tampoco lo fueron entre las diferentes formas de la enfermedad (grave y compensada). Se puede sugerir que TGF $\beta$ 1 probablemente no desempeñe un papel clave en el desarrollo tardío de la hidrocefalia congénita en los ratones *hyh*. Sin embargo, a pesar de los resultados obtenidos anteriormente, no deberían ser descartados ciertos efectos sobre la generación de la respuesta astrocítica durante las etapas iniciales de la enfermedad. Por lo tanto, existe la posibilidad, no estudiada, de que los niveles de TGF $\beta$ 1 aumenten durante las primeras etapas de la hidrocefalia y después disminuyan.

En conclusión, tanto TNF $\alpha$  como su receptor TNF $\alpha$ R1 se están sobreexpresados en los ratones *hyh* con la forma grave de la hidrocefalia. Por lo tanto pueden estar asociados con la patogénesis de la enfermedad o su progresión. Los resultados también sugieren que TNF $\alpha$  puede ser considerado como un posible biomarcador de pronóstico de la enfermedad. Comprender la función de TNF $\alpha$  en la hidrocefalia potencialmente podría facilitar el desarrollo de tratamientos de la enfermedad.



# CONCLUSIONES



1. La desestructuración de la zona ventricular en los ratones *hyh* tiene lugar en momentos en los cuales todavía no se ha diferenciado el epéndimo multiciliado. Este hecho puede explicar la afectación diferencial del epéndimo en distintos momentos del desarrollo.
2. Un defecto específico en la diferenciación de la población celular de la *glial wedge* puede explicar la agenesia del cuerpo caloso, que comúnmente se asocia a la hidrocefalia congénita.
3. El epéndimo ausente en los ratones *hyh* hidrocefálicos es reemplazado por reacciones astrocitarias de diferentes grados según la superficie ventricular afectada. Tales astrocitos muestran características similares a las células endimarias, con una mayor expresión del canal acuoso acuaporina 4 aunque de una forma no polarizada.
4. En los ratones *hyh* con la hidrocefalia desarrollada, los astrocitos reactivos periventriculares, y no la microglía, producen  $TNF\alpha$  y expresan su receptor  $TNF\alpha R1$ . Existen unos altos niveles de  $TNF\alpha$  y  $TNF\alpha R1$  relacionados con la gravedad de la hidrocefalia en los ratones *hyh*. El  $TNF\alpha$  puede estar implicado en la regulación de la reacción astrocitaria.



# CONCLUSIONS





1. The disruption of the ventricular zone in the *hyh* mouse takes place before the differentiation of the multiciliated ependyma. This fact can explain the differential affectation of the cells of the ependyma in different moments during the development.
2. A defect in the development of the neuroepithelium at the glial wedge can explain the agenesis of corpus callosum in the *hyh* mouse, which is commonly associated with congenital hydrocephalus.
3. The absence of ependyma in the hydrocephalic *hyh* mice is replaced by periventricular astrocyte reactions arranged with different degrees of tightness. In the same way as the ependyma, the periventricular reactive astrocytes express aquaporin 4. However, these astrocytes present a higher expression of aquaporin 4 that is arranged in a non-polarized pattern.
4. In the *hyh* mouse, the periventricular reactive astrocytes express  $\text{TNF}\alpha$  and its receptor  $\text{TNF}\alpha\text{R1}$ . The levels of the cytokine and the receptor are higher in mice according to the severity of hydrocephalus.  $\text{TNF}\alpha$  can be playing a role in the regulation of the astrocyte reaction.



## SUMMARY





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Department of Cell Biology, Genetics, and Physiology

Faculty of Sciences

University of Malaga, Málaga, Spain

**PhD Thesis**

**Title: Development of the ependyma and subependyma in normal animals and with congenital hydrocephalus**

**Author (PhD Student): Luis Manuel Rodríguez-Pérez**

PhD Supervisors:

Antonio J *Jiménez*

Pedro Fernández-Llebrez

Malaga, Spain 2016



## LITERATURE OUTLINE

### 1. The ventricular system, the neuroepithelium the radial glial and the ependyma

The ependyma constitute a ciliated epithelium that derives from the neuroepithelium during development and is located at the interface between the brain parenchyma and ventricles in the central nervous system (CNS). After neurulation, the neural plate forms the neural tube, which undergoes stereotypical constrictions by bending and expanding to form the embryonic vesicles, and becomes the forebrain, midbrain, and hindbrain. Therefore, the original cavity of the neural tube forms the embryonic ventricles (Lowery and Sive 2009), constituting a series of connected cavities lying deep in the brain that are filled with *encéfalo*spinal fluid (CSF). Later during development, the forebrain ventricle suffers massive expansion and splitting to form the lateral ventricles and third ventricle. In the midbrain, the ventricle remains as a narrow aqueduct connecting the third and fourth ventricles, with the latter located in the hindbrain. The neuroepithelium and ependyma constitute barriers lining a ventricular lumen in the developing and mature CNS, respectively, and perform important functions related to the development, morphogenesis, and physiology of the brain. During CNS development, two germinal zones that generate nearly all of the cells of the CNS; a pseudostratified neuroepithelium forms a ventricular zone and contains apical progenitor cells, and a subventricular zone forms that contains basal progenitors cells. Radial glial cells originate in the neuroepithelium; these cells are neural multipotent stem cells that also guide migrating neurons (Chanas-Sacre et al 2000; Rakic 2003), thus determining the neuronal fate and position in the developing brain (Hebert and Fishell 2008). Therefore, the neuroepithelium performs neurogenesis at the brain-*encéfalo*spinal fluid interface (Lehtinen and Walsh 2011).

Radial glial cells display an apical-basal polarization, and they stretch from the luminal surface to the basement membrane at the pial surface (Fig. 1A). They are joined with tight junctions apically (zonula occludens) and with adherens (zonula adherens) junctions and gap junctions in their lateral plasma membrane domains (Gotz and Huttner 2005; Lehtinen and Walsh 2011). The existence of an apical-basal polarity in the progenitors in the ventricular zone suggests that they receive extrinsic growth factor from the CSF, likely via their sensory apical primary cilium (Lehtinen and Walsh 2011).

In addition to the role of the neuroepithelium derived from the presence of stem cells in several regions, the cells become specialized in secreting molecules and morphogens that govern CNS development (Sarnat 1992). Thus, the dorsal and ventral lines of the roof and floor plates contain specialized epithelial cells that act as organizers guiding neuronal development, providing morphogens and signals, such as netrin-1, slit, sonic hedgehog, and members of the TGF $\beta$  superfamily (Shirasaki et al 1996; Sanchez-Camacho et al 2005; Mastik et al 2010; Yu et al 2013). The ultrastructural analysis of the midbrain floor plate has revealed the presence of secretory cell machinery most likely involved in the secretion of molecules toward the ventricle CSF; the functions of these molecules remain unclear (Del Brío et al 2000, 2001; Richter et al 2001).

Finally, during development, a subpopulation of radial glial cells produces the ependymal cells, which will become differentiated cells that are unable to proliferate under normal conditions (Spassky et al 2005). In mice and humans, the differentiation process of the ependymal cells follows a precise temporospatial pattern throughout the ventricular system, which has been extensively reported and reviewed by Bruni et al. (1985), Bruni (1998), and Sarnat (1992, 1998). The homeobox gene *Six3* controls the late maturation of the ependyma during late development, which suppresses radial glial cell properties (Lavado and Oliver 2011).

Mature ependymal cells are polygonal cells, cuboidal to the columnar depending on the ventricle location, which display polarized structural and functional organizations. At the basal pole, ependymal cells present basal lamina labyrinths that are remnants of basal lamina from embryonic capillaries (Leonhart 1980). Apically, their luminal pole is in contact with the ventricular CSF, and the cells display microvilli and an average of 16 motile cilia (9+2 axoneme) per cell with a length of approximately 13  $\mu$ m (Brightman and Palay 1963, Dempsey and Nielsen 1976).

In the ependymal cells, the beating of cilia is important for propelling CSF, and thus, the cilia must display an orientation that is tightly coupled to the anterior-posterior

neuroaxis (Marshall and Kintner 2008). CSF accumulation and hydrocephalus occur when the flow is disturbed. This orientation is defined by an ependymal planar polarity, which is acquired during development in a multi-step process involving two independent mechanisms of the movement of the cilia basal bodies: translational and rotational (Mirzadeh et al 2006; Kishimoto and Sawamoto 2012). Planar polarity during development is also important for the closure of the spinal neural tube (Wallingford 2006). Thus, the consequences of failure in planar polarity include neural tube defects, including spina bifida and hydrocephalus. In the radial glial cells, the precursors of ependymal cells, primary cilia appear to play a key role in the development of planar polarity. Basal body translational position movement occurring in radial glial progenitors depends on the primary cilium, thus orchestrating the planar architecture of radial glial cells and translating it to their progeny of ependymal cells (Mirzadeh et al. 2006). The movements of the basal bodies occur in connection with microtubules, actin, non-muscle myosin II, and cytokeratin and most likely also in relation with apical junctions (Hirota et al. 2010; Wallingford 2010). For rotational movement, an independent signaling pathway is involved that includes Dishevelled2, Vangl2, Celsr2 and Celsr3, which are required for ependymal motile cilia to establish the polarized fluid flow (Guirao et al 2010; Tissir et al 2010; Wallingford 2010; Kishimoto and Sawamoto 2012). Additionally, the passive flow of the CSF plays a refining role in the rotational orientation of the basal bodies during ependymal differentiation (Mitchell et al 2007; Kishimoto and Sawamoto 2012), which are locked when the ependyma matures (Guirao et al 2010).

## **2. Development of corpus callosum: role of neuroepithelial cells and association with hydrocephalus**

The corpus callosum is the largest connective structure in the brain. Agenesis of the corpus callosum is present in at least 1:4,000 live births (Guillem et al. 2003; Wang et al. 2004). Approximately 3-5% of neurodevelopmental disorders exhibit agenesis of the corpus callosum (Jeret et al. 1985; Bodensteiner et al. 1994) In humans, agenesis can be caused by genetic and environmental factors (Paul et al. 2007). Genetic factors include chromosomal abnormalities and recognizable genetic syndromes (Jeret et al. 1987; Ren et al. 2006). Environmental factors include infections by viruses, toxic metabolic conditions, and blockage of axon growth (Paul et al. 2007). Agenesis of the corpus callosum occurs in several human congenital syndromes (Jeret et al. 1987; Ren et al. 2006). In CRASH and Dandy-Walker syndromes, agenesis of the corpus callosum coexists with hydrocephalus (D'Addario et al. 2005; Sasaki-Adams et al. 2008). In a clinicopathological study, 32% of cases with agenesis of the corpus callosum also presented hydrocephalus Paul et al. 2007).

Early in development of the corpus callosum, which occurs in the mouse at E15.5 (E, embryonic day), neurons located in the cingulate cortex project pioneering axons towards the contralateral cortex (Koester and O'Leary 1994; Rash and Richards 2001). These axons delineate a pathway used by neocortical axons to form the corpus callosum (Rash and Richards 2001). Thus, from E16, these pioneering axons guide subsequent callosal axons from the neocortex to cross the midline. In human embryos, the pioneer axons cross at weeks 12-13 (Rakic and Yakovlev 1968), and the corpus callosum is formed between weeks 14-21 (Malinger and Zakut 1993; Kier and Truwit 1996; Kier and Truwit 1997; Achiron and Achiron 2001; Ren et al. 2006).

The development of the corpus callosum requires a correct midline patterning, formation of telencephalic hemispheres, birth and specification of commissural neurons, and axon guidance across the midline towards their final target in the contralateral hemisphere (Paul et al. 2007). Midline cell populations play key roles in the formation of the corpus callosum. These populations include the midline zipper glia, the glial wedge, the indusium griseum glia, and the subcallosal sling (Lindwall et al. 2007). These cells have been described in human (Lent et al. 2005; Ren et al. 2006) and mouse (Silver et al. 1982; Silver and Ogawa 1983; Shu and Richards 2001) embryos, located rostral to the lamina terminalis in the midline in continuity with the dorsal interhemispheric fissure (Silver et al. 1993). The subcallosal sling and the midline zipper glia are most likely the equivalent of the massa commissuralis at the tenth week of gestation in human development (Rakic and Yakovlev 1968; Barkovich and Norman 1988), which becomes the bed for the commissural axons of the corpus callosum.

The glial wedge and the indusium griseum glial cells are located ventral and dorsal to the corpus callosum, respectively (Shu and Richards 2001). In the mouse, the glial wedge cells begin to be formed at E13. They can be detected from E14, and appear to be developed at E15, just before the projection of the callosal pioneering axons. In



humans, the glial wedge cells are detected by week 14 (Ren et al. 2006). The glial wedge cell bodies are located in the ventricular zone of the lateral ventricles, at the corticoseptal boundary, and send long radial-glial-like processes towards the brain midline. The glial wedge cells and the indusium griseum glial cells are guidepost cells that act as sources of guidance cues that prevent axons from leaving the tract and entering adjacent structures (Lindwall et al. 2007). The glial wedge and the indusium griseum glial cells produce molecules such as the chemorepellants. Thus, these cells generate a lane that is used by axons to cross the midline to form the corpus callosum. When the glial wedge cells are experimentally excised, the corpus callosum is not formed (Shu and Richards 2001).

### 3. The *hyh* mouse model of hydrocephalus and the development of the ependyma

Hydrocephalus has been considered a CNS condition consisting of a net accumulation of intraventricular or extraventricular CSF independent of hydrostatic or barometric pressure (Raimondy 1994). The increase in CSF volume causes an enlargement of the ventricular cavities, i.e., ventriculomegaly (McKechnie et al 2012). The hydrocephalus origin can be congenital or acquired (Zhang 2006).

In the *hyh* mutant mouse, a defect in the vesicular traffic mediated by  $\square$ SNAP (Chae et al 2004, Hong et al 2004) explains the alteration of the fate of molecules that are present in adherens junctions (Rodríguez et al 2012). The defect in the formation of adherens junctions during the differentiation of the ependyma triggers the disruption of the neuroepithelium, which has been shown to be associated with a mild ventriculomegaly and communicant hydrocephalus (Jiménez et al 2001, Paéz et al 2009, Bátiz et al 2009). In the *hyh* mouse, later in development, the obstruction of the narrow aqueduct due to the absence of neuroepithelium/ependyma leads to a severe non-communicant hydrocephalus (Wagner et al 2003). The brain parenchyma astrocytes mediate the fusion of the ventricle walls devoid of the ependymal barrier.

Currently, there is a growing body of evidence regarding the involvement of cell junctions during ependymal development in the triggering and the evolution of hydrocephalus, which has recently been reviewed by Rodríguez et al. (2012). This evidence includes results from animal models and studies in humans. A consequence of the alteration in cell junctions is the disruption of the natural barriers between the CSF and brain with developing or mature parenchyma, which leads to developmental and physiological abnormalities associated with hydrocephalus. A consequence of the alteration in cell junctions is the disruption of the natural barriers between the CSF and brain with developing or mature parenchyma, which leads to developmental and physiological abnormalities associated with hydrocephalus.

### 4. Role of the astrocyte reactions associated with hydrocephalus

During development, the appearance of hydrocephalus and ventriculomegaly in animal models and humans is associated with important damages in the cortical myelin, which triggers astroglial and microglial reactions (Del Bigio 1993, Del Bigio et al 1994, Takei et al 1987, Mangano et al 1998, Domínguez-Pinos et al 2006, Lopez et al 2009, Páez et al 2009, Sival et al 2011, Deren et al 2012; Olopade et al 2012).

Astroglial reactions triggered by brain injuries are characterized by the hypertrophy and hyperplasia of astroglial cells. Astrocyte reactions have been reported to inhibit axonal regeneration (Botchkina et al. 1997) but have also been associated with the secretion of growth factors and trophic molecules (Bradley 2008; Bronson and Lane 1990; Cabal-Hierro and Lazo 2012; Castejon 2010) that promote axonal re-growth (Castejon 2010). It has been suggested that the astrocyte reaction initially protects brain tissue and contributes to its functional recovery (Cherian et al. 2004). Therefore, the beneficial and detrimental functional consequences of such astroglial reactions are under debate (Chertoff et al. 2011; Cragnolini et al. 2012; Cui et al. 2011). The astrocyte reaction that occurs in the brain of hydrocephalic animals has been thought to be a harmful phenomenon, leading some authors to test the effects of anti-inflammatory drugs in rats that have been made hydrocephalic postnatally (Del Bigio and Bruni 1991; Del Bigio 2000). Foetal-onset hydrocephalus in the mutant *hyh* mice and in human

foetuses is associated with defects in the neuroepithelium/ependyma (Del bigio 2000; Flood et al; 2001; Dombrowski et al. 2008). Such defects result in the loss of the neuroepithelium/ependyma and in a subsequent astroglial reaction that leads to a new cell layer lining the denuded ventricular surface (Didier et al. 2003; Dombrowski et al; 2003; Ghosh 2012). The functional significance of the new brain parenchyma/CSF interphase formed by reactive astrocytes is not known, and has been studied in the present Doctoral Thesis.

In the nervous tissue, tumour necrosis factor alpha ( $TNF\alpha$ ) has been reported to be produced by microglia, astrocytes, neurons and infiltrating immune cells (Deng et al. 2010; Hofman et al. 1989; McCoy and Tansen 2008; Medana et al. 1997; Park and Bowers 2010; Rathnasamy et al. 2011; Rossi and Volterra 2009), where it activates astrocytic and microglial reactions (Selmaj et al. 1990; Tseng et al. 1999).  $TNF\alpha$  is a multifunctional cytokine that exerts a wide range of pleiotropic effects, such as proliferative responses to inflammation, mediation in immune responses and cell death (MacEwan 2002). Thus,  $TNF\alpha$  plays a critical role in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases (Brradley 2008; Horiuchi et al. 2001), including multiple sclerosis (Ghosh 2012; Hofman et al. 1989; McGuire et al. 2012), Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease (Fillit et al. 1991; Montgomery and Bowers 2012; Morales et al. 2010).  $TNF\alpha$  presents two active forms: one is a transmembrane signalling molecule with yuxtacrine action (Pérez et al. 1990) and the other is a soluble cytokine (MacEwan 2002). The soluble form is derived from the proteolytic cleavage of the transmembrane form (Kriegler et al. 1988). The activities of the two forms of  $TNF\alpha$  are mediated through two different receptors:  $TNF\alpha R1$  (p55) and  $TNF\alpha R2$  (p75). Whereas the transmembrane form of  $TNF\alpha$  activates both  $TNF\alpha R1$  and  $TNF\alpha R2$ , the soluble form of  $TNF\alpha$  largely acts through binding  $TNF\alpha R1$  (Cabal-Hierro and Lazo 2012; Grell et al. 1995). The soluble form of  $TNF\alpha$  can present a proinflammatory or cytotoxic effect, inducing cell death through two different signalling pathways mediated by the  $TNF\alpha R1$  receptor (MacEwan 2002; Tracey et al. 2008). However,  $TNF\alpha$  can present a dual role and can be either neurotoxic or neuroprotective in a concentration-dependent manner (Chertoff et al. 2011). These dual roles have also been linked with the activated receptor types (Fischer et al. 2011).

Another factor, transforming growth factor-beta 1 ( $TGF\beta 1$ ), has been described as playing a role in the pathogenesis of posthaemorrhagic and communicant hydrocephalus (Cherian et al. 2011; Douglas et al. 2008; Flood et al. 2001; Whitelaw et al. 1999).  $TGF\beta 1$  plays a protective role in neuropathologies (Makwana et al. 2007). It has been reported to be able to promote axonal regeneration in the hippocampus in vitro (Abe et al. 1996), and it protects the hippocampal neurons after global cerebral ischemia (Henrich-Noack et al. 1996), where has been reported to be secreted by microglia (Lehmann et al. 1995; 1998).

### AIMS OF THE STUDY

1. The first objective is to describe the development of the ventricle surfaces in normal mice. This description can help to understand the reason of the differential affectation of the ependyma during hydrocephalus.
2. The second objective is to find, in the *hyh* mouse model of congenital hydrocephalus, a relationship between the agenesis of corpus callosum and the alteration in the program of development in the neuroepithelium.
3. The third objective is study the role of the periventricular astrocyte reaction that takes place covering ventricle surfaces that lack of ependyma. In particular in the study has been studied the role of the reaction as a new interphase between the ventricle CSF and the brain parenchyma and the production of  $TNF\alpha$ .

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Mutant *hyh* mice (hydrocephalus with hop gait, B6C3Fe-a/a-*hyh*/J strain) and their control littermate wild-type (*wt*) mice were used. Mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and were bred in the Animal Experimentation Service of the University of Malaga. Housing, handling, care and processing of animals was carried out according to European and Spanish laws (DC 86/609/CEE and RD 1201/2005) and following the regulations approved by the council of the American Physiological Society. Gestational day 0.5 (E0.5) was designated when the presence of a vaginal plug was evident in a pregnant female. Pregnant dams at gestational days between E15.5 to E18.5 were sacrificed by cervical dislocation and the embryos were removed by laparotomy. Animals at postnatal ages were sacrificed using anaesthesia with Dolethal (sodium pentobarbital; Vétoquinol, Lure, France; intraperitoneal administration, 0.2 mg/g bodyweight). For RT-PCR analyses, mice were sacrificed using cervical dislocation.

All animals used in this work were genotyped as described in Bátiz et al. (2009) The double homozygous mice for the mutated  $\alpha$ -SNAP protein (*snap(-/-)*) were assigned as *hyh* mice, and normal mice (*snap(+/+)*) were assigned as wild type (*wt*). Heterozygous mice for  $\alpha$ -SNAP were used only to obtain homozygous *hyh* embryos.

### *Scanning electron microscopy*

Brain from embryos and neonate mice were dissected out. Cold 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer was injected into the cavities during 2 min. The blocks of tissue containing different ventricular regions were postfixed in the same fixative overnight at 4°C. After dehydration and critical point drying, the blocks of tissues were coated with gold and visualized under a scanning electron microscope using a secondary electron detector.

### *Immunocytochemistry and immunofluorescence*

*wt* and *hyh* mice at postnatal ages were transcardially perfused with either 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, or Bouin's fixative. Embryos were fixed immersed in the paraformaldehyde solution. Fixed brains were removed and postfixed in the same solution for 24 h (paraformaldehyde, at 4°C) or 48-72 h (Bouin, at room temperature). Paraformaldehyde-fixed brains were cryoprotected in 30% sucrose to obtain frozen sections (40  $\mu$ m thick) that were later immunostained with a free-floating section-staining protocol. Bouin-fixed brains were embedded in paraffin, and 10- $\mu$ m-thick serial sections were obtained.

Paraffin sections were hydrated and incubated in the first antibodies. Appropriate secondary biotinylated antibodies and ExtrAvidin conjugated with peroxidase (Sigma) were subsequently used. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) was used as an electron donor. Antibodies were diluted in 0.01 M phosphate saline buffer, pH 7.4, containing Triton-X100, bovine albumin, and normal sera. Incubations were performed at 22°C for 18 h for the primary antibodies and for 1 h for the secondary antibodies and ExtrAvidin. Some of the sections were stained with haematoxylin-eosin.

Hydrated paraffin sections, vibratome sections and frozen sections were incubated in the first antibodies followed by the appropriate secondary antibodies: donkey anti-goat IgG, goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 488, 568, 568, or 594 (1:2000 dilution; Molecular Probes, Carlsbad, CA) and goat anti-chicken IgY (ab6569, Abcam).

Antibodies were diluted in 0.01 M phosphate buffer saline, pH 7.4, containing bovine serum albumin, normal sera, and 0.05% Triton-X100.

Sections processed for immunofluorescence, mounted in Vectashield (Dako, Glostrup, Denmark) and studied under an epifluorescence Zeiss microscope and Leica

TCS NT and Leica SP5 II confocal microscopes. Serial 1  $\mu$ m thick planes and projections in Z-axis were obtained with confocal laser microscopy and processed with ImageJ software (NIH, USA). DAPI (Molecular Probes) nuclear staining (DAPI) was used in some sections for confocal and fluorescence microscopy.

**Primary antibodies were used against:**

<b>Primary antibody</b>	<b>Reference</b>	<b>Concentration</b>	<b>Inmunoglobulin</b>
<b>Anti-A2B5</b>	Chemicon, MAB312	1:1000	Mouse monoclonal IgM
<b>Anti-BLBP</b>	Cedido por Dra. M. Gotz Max-Planck Inst.	1:3000	Rabbit policlonal IgG
<b>Anti-Calbindina D-28K</b>	Swant, Ref: CB38	1:3000	Rabbit policlonal IgG
<b>Anti-Calretinina</b>	Swant, Ref: 7699/4	1:3000	Rabbit policlonal IgG
<b>Anti-GFAP</b>	Biogenesis, Ref: 4650-0100	1:100	Rabbit policlonal IgG
<b>Anti-GFAP</b>	Sigma, Ref: G3893	1:1000	Mouse monoclonal IgM
<b>Anti-Glía Radial</b>	DSHB, Ref: RC2	1:200	Mouse monoclonal IgM
<b>Anti-NCAM</b>	DSHB, Ref. 5B8	Pure	Mouse monoclonal IgM
<b>Anti-Nestina</b>	DSHB, Ref. Rat-401	1:200	Mouse monoclonal IgM
<b>Anti-PCNA</b>	Oncogene, Clon PC10 Ref: NA03	1:400	Mouse monoclonal IgM
<b>Anti-S100<math>\beta</math></b>	Biogenesis, Ref: 8200-0184	1:2	Rabbit policlonal IgG
<b>Anti-Tubulina <math>\beta</math> III</b>	Promega, Ref: Clon 5G8	1:5000	Mouse monoclonal IgM
<b>Anti-Vimentina</b>	Sigma, Ref. V4630	1:500	Goat policlonal IgG
<b>Anti-TNF<math>\alpha</math></b>	Abcam, Ref: ab34717	1:100	Rat monoclonal IgG
<b>Anti-TNF<math>\alpha</math></b>	Sigma, Ref: T8300	1:200	Rabbit policlonal IgG
<b>Anti-TNF<math>\alpha</math>R1</b>	Sigma, Ref: SAB4502988	1:1000	Rabbit policlonal IgG
<b>Anti-TNF<math>\alpha</math>R1</b>	Santa Cruz Biotechnology, Ref: SC7895	1:2000	Rabbit policlonal IgG
<b>Anti-Aquaporina 4</b>	Sigma, Ref: A5971	1:400	Rabbit policlonal IgG
<b>Anti-EEA1</b>	Affinity Bioreagents INC	1:200	Rabbit policlonal IgG
<b>Anti-Iba1</b>	Wako, Ref: 019-19741	1:500	Rabbit policlonal IgG
<b>Anti-Tubulina <math>\beta</math> IV</b>	Abcam, Ref: ab16059	1:100	Mouse monoclonal IgG
<b>Anti-Tubulina <math>\beta</math> IV</b>	Sigma, Ref: T7941	1:400	Mouse monoclonal IgG

After incubations in the primary antibody, appropriate fluorescent secondary antibodies were used.

Adjacent sections from the series were processed for double immunofluorescence. This allowed the same brain regions to be analysed with a series of antibodies.

#### *Lectin binding*

*Lycopersicon esculentum* lectin (tomato lectin, TL; affinity = *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylgalactosamine) was used. Sections were incubated with biotinylated TL (Vector, Burlingame, CA), 5 µg/ml in phosphate buffered saline, pH 7.3, for 1 h, at 37°C. Incubation in ExtraAvidin (1:2000) was for 30 min at 20°C. Histochemical detection was performed using DAB.

#### *In situ hybridization*

Embryos at E14.5 to E18.5 and newborns at 1 to 7 days of postnatal age (P1 to P7) were processed for non-radioactive *in situ* hybridization using digoxigenin labeled riboprobes. Sampling was as follows: E14.5, 18 *hyh* and 18 *wt*; E15.5, 18 *hyh* and 18 *wt*; E16.5, 15 *hyh* and 15 *wt*; E17.5, 15 *hyh* and 15 *wt*; E18.5, 15 *hyh* and 15 *wt*; P1, 15 *hyh* and 15 *wt*; P4, 12 *hyh* and 12 *wt*; P7, 12 *hyh* and 12 *wt*. Mouse embryos were fixed by immersion or vascular perfusion with 4% buffered paraformaldehyde. Then, they were kept at 4°C until dehydration in methanol/PBT (PBS, 0.1% Tween-20). After rehydration, the telencephalon was dissected out and immersed into a gelatin/albumin solution (30% albumin and 0.5% gelatin in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3) containing 1.25% glutaraldehyde. Vibratome sections (200 µm thickness) were obtained, dehydrated in methanol/PBT, and kept at -20°C overnight. Single *in situ* hybridization was performed for whole-mount preparations. Probes were labeled with digoxigenin-UTP (Boehringer, Ingelheim, Germany) using the Riboprobe Gemini System II Kit (Promega, Madison, WI). Labeled probes were added to the hybridization buffer at a concentration 1-2 mg/ml. Sections were hybridized at 70°C overnight. An anti-digoxigenin-alkaline phosphatase-coupled antibody was used to detect the probes (1:2,000; 11-093274916, Boehringer). Alkaline phosphatase activity was revealed using NBT/BCIP as a substratum. In all cases, nonspecific signal was not observed with the sense probes. Stained sections were flat-mounted on poly-L-Lysine-treated slides with 80% glycerol in PBT. Riboprobes for Tag1 (transient axonal glycoprotein), Tbr1 (T-box, brain, 1), and Tis21 (TPA-inducible sequences 21). Tis21 is an anti-proliferative gene involved in the control of cell cycle progression, specifically in the G1 to S transition, and is specifically expressed in neurogenic precursor cells but not in postmitotic neurons during embryonic neurogenesis. Tis21 protein switches neuroepithelial cells to their non-proliferative stage.

#### *Dil-tracing of callosal axons in fixed brains*

Embryos were obtained as described above from E14.5 to E18.5: E14.5, 2 *hyh* and 2 *wt*; E15.5, 4 *hyh* and 3 *wt*; E16.5, 4 *hyh* and 3 *wt*; E17.5, 4, *hyh* and 3 *wt*; E18.5, 2 *hyh* and 2 *wt*; and fixed in 4% buffered paraformaldehyde. Very small crystals of Dil (1,1-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; D-3911, Molecular probes) were carefully inserted into the frontal cortex of partially dissected fixed embryos. Then, brains were immersed in fresh 4% buffered paraformaldehyde and incubated at 37°C for 3 weeks. Finally, consecutive frontal sections (300 µm thick) were sliced with a vibratome and stored at 4°C. Dil-tracing was observed under epifluorescence.

#### *Dil-tracing of the pioneering axons in organotypic culture of brain slices*

Brains of embryos at E14.5 (9 *wt* and 9 *hyh*) and E15.5 (9 *wt* and 12 *hyh*) were dissected out while immersed in ice-cold L15/F12 medium, pH 7.3 (50% Leibovitz's L15 medium, Life Technologies, Carlsbad, CA; 50% F12 nutrient mixture, Life Technologies).

Then, brains were immersed in 3% low-melting agarose (Gellyphor, Euroclone, Sizzano, Italy) to obtain frontal 300  $\mu\text{m}$  thick slices with a vibratome. Sections were collected in ice-cold L15/F12 medium and transferred onto filter inserts (31.5  $\mu\text{m}$  diameter, 0.4  $\mu\text{m}$  pore size; Merck Millipore, Billerica, MA), in dishes containing 1 ml of sterile filtered medium with serum (DMEM containing 8% F12 nutrient, 1% N-2 supplement, 15% glucose, 1% penicillin-streptomycin, 0.5% L-glutamine, and 5% heat inactivated fetal calf serum). After 1 h in a sterile incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), the medium was substituted for neurobasal medium, pH 7.3 (Life Technologies), containing 2% B27 supplement (Life Technologies), 15% glucose, 1% penicillin-streptomycin (Sigma), 0.5% L-glutamine (Sigma), and 2.5% heat inactivated fetal calf serum (Life Technologies). Immediately after this step, a very small crystal of Dil was placed into the cingulate cortex of the brain slices, and they were incubated in sterile conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) for 48 h. Finally, slices were fixed in 4% buffered paraformaldehyde at 4°C for 24 h. Some fixed slices were processed for immunofluorescence using the anti-GFAP antibody.

#### *Data analysis*

The following analyses were carried out for immunofluorescence. 1) The relative optic density of aquaporin 4 immunoreaction in ependymal cells and astrocytes compared to that of the perivascular end feet of astrocytes. 2) The total area occupied in frozen sections by the early endosomal compartment (EEA-1 immunoreactive) per ependymal cell or astrocyte. For each section, the sum of the area of all endosomes was calculated in the latero-medial ventricle wall of *wt* and *hyh* mice and divided by the number of astrocytes or ependymal cells covering such surfaces. These analyses (1 and 2) were performed in frozen sections of the brain of 4 *wt* and 4 *hyh* mice at P20, processed for double immunofluorescence for aquaporin 4/GFAP or EEA1/GFAP, both with DAPI counterstaining. 3) The cell density of the astrocyte network at specific sites of the abnormal ventricles was estimated using whole mounts of ventricular walls of 4 *hyh* P20 mice processed for immunofluorescence for GFAP. 4) The degree of penetration of intraventricularly injected HRP into the brain parenchyma, at specific sites of the ventricular cavities was estimated in paraffin sections of the brain of 4 *hyh* P8 mice immunostained using anti-HRP. All analyses (1-4) were made using micrographs from laser scanning microscopy and light microscopy using the software Visilog 6 (Noesis, Rolles, France). Statistical analyses were performed using SigmaStat (Systat Software, San Jose, CA) and KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA).

In all procedures, statistical analyses were performed using KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA, USA) and Microsoft Excel 12.2.4 (Microsoft Corporation). A  $p < 0.05$  according to Student's *t* test was considered statistically significant.

#### *Retrotranscription and real-time PCR*

The hippocampi of the right hemisphere of *wt* (P30,  $n = 18$ ; P90,  $n = 8$ ; P180,  $n = 2$ ) and *hyh* (P30,  $n = 13$ ; P90,  $n = 7$ ; P180,  $n = 2$ ) mice were quickly removed under cold conditions, frozen in dry ice, and stored at -84°C. Total RNA was extracted using the Tripure Isolation Reagent (Roche, Basel, Switzerland). Contaminating DNA was removed by incubation with DNAase (Sigma, St Louis, MO, USA), and DNA removal was confirmed by the PCR analysis of total RNA prior to reverse transcription. The integrity of the RNA samples was assessed by agarose gel electrophoresis. The yield of total RNA was determined by measuring the absorbance at 260 nm of ethanol-precipitated aliquots of the samples. The recovery of RNA was comparable among all groups. The protein pellets, obtained using the Tripure Isolation Reagent, were re-suspended in 4% SDS and 8 M urea in 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, and rotated overnight at room temperature.

Retro-transcription was performed using random hexamers, 3  $\mu\text{g}$  of total RNA as the template and the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. For real time RT-PCR, each specific gene product was amplified using commercial Taqman probes (20x Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix: GAPDH, Ref. Mm99999915\_g1; TNF $\alpha$ , Ref. Mm00443258\_m1; TNF $\beta$ R1, Ref. Mm00441875\_m1; and iNOS, Ref. Mm00440485\_m1), following the instructions provided by the manufacturer (Applied Biosystems), and specific primers (TGF $\beta$ 1: UP 5'TGGAGCAACATGTGGAAGCTC3', LO 5

'CAGCAGCCGGTTACCAAG3'; and GFAP: UP 5'CTCCAACCTCCAGATCCGAG3', LO 5' TCTGACACGGATTTGGTGTCC3'). For real-time detection and quantification, an ABI Prism 7000 sequence detector was used (Applied Biosystems). For each assay, a standard curve was first constructed, using increasing amounts of cDNA. In all cases, the slopes of the curves indicated optimal PCR conditions (slopes of 3.2–3.4). The cDNA levels of the different mice were determined using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeper gene. The amplification of the housekeeper gene was performed in parallel with the gene to be analysed. The results were normalised against GAPDH expression. The results were always expressed using the comparative Ct method, following the instructions received from Applied Biosystems. As a control condition, we selected the P30 *wt* mouse. Consequently, the expression levels of all tested genes, for all ages and mice types, were referenced against the expression levels observed in the P30 *wt* mouse.

#### *Flow cytometry*

The hippocampi from both hemispheres of *wt* (n= 22) and *hyh* (n= 17) mice at P30 were quickly removed under cold conditions and converted into single cell suspensions in PBS containing 0.1% Triton-X100, using a micropipette. The cells were pelleted after centrifugation and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes. Following fixation, 200  $\mu$ L of the cell suspensions was incubated with mouse anti-GFAP (1:1,000 dilution) or anti-Iba1 (1:1,000 dilution) for 24 h at 4°C and then incubated with donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:1,000 dilution) for 1 h at 4°C. All antibodies were diluted in PBS containing 0.05% Triton-X100. Researchers were blinded by using unlabelled tubes containing samples with or without secondary antibodies. Between 60,000 and 100,000 events were counted for each sample, using a Dako Cytomation MoFlo cell sorter (Dako, Glostrup, Denmark). Each experiment was repeated at least twice, and the results were compared for consistency.



## RESULTS AND DISCUSSION

### Development of the ventricle surfaces

The development of the ventricle surface of normal mice has been studied between E12 to P30 under scanning electron microscopy. Three different types of surface has been distinguished:

-Type I. This surface lacks of cilia and microvilli but is rough. Sometimes present a one short cilium. This surface appears present in the early stages of development (E12-E16), and probably corresponds to neuroepithelial cells.

-Type II. This surface present one short and thick cilium. The surface is smooth, but present microvilli in the cell borders. This surface probably corresponds to radial glial cells.

-Type III. In this surface multiciliated and monociliated/biciliated cells are present. In the later case, cilia are long and the surface can also present microvilli.

-Type IV. In this surface multiciliated cells are only present, corresponding to mature ependyma.

In the floor plate of the fourth ventricle appeared the first ciliated cells

The results obtained in this Doctoral Thesis using an analysis of the ventricular surfaces SEM have revealed that maturation neuroepithelium generally follows the rostral and caudal to dorsal-ventral pattern described in mouse Bruni (1985; 1988) and human Sarnat (1992; 1995).

Basically it was observed that the neuroepithelium a surface devoid of cilia and rough. However, the advent of radial glia cells within the neuroepithelium is manifested by the development of a single short cilium. Finally, most of the ependyma resulting from terminal differentiation of cells of radial glia (Tramontin et al. 2003; Spassky et al. 2005) has a surface multiciliated. Considering the aspect of the surfaces, it has been observed that within a basal wing or plate, there is also a gradient in the differentiation of the neuroepithelium from the midline to the lateral regions. This type of evidence in the maturation of neuroepithelium can explain the pattern followed by its misdevelopment in the hydrocephalic *hyh* mice (Jiménez et al. 2001). The ages and areas where the detachment of neuroepithelial cells occurs, correspond to a moment when there is not still exist multiciliated ependyma. For example, in the *hyh* mice, detachment of neuroepithelium appears in the region adjacent to the floor plate in the fourth ventricle at E12 (Jiménez et al. 2001; Bátiz et al. 2009). At this stage, the surface of the 4V is formed by neuroepithelium and radial glial cells. The multiciliated ependyma appears in the 4V at P1 (results in this Thesis). Therefore, the concept of denuding ependyma regarding hydrocephalus would be meaningless. In this line, recent articles describing impaired ZV regarding hydrocephalus, define a disruption of ZV occupied by stem cells (Rodríguez et al. 2012; Guerra et al. 2015).

The appearance showing the surfaces that are immature (with presence of unciliated cells) agree with an activity of neuroepithelium or radial glia. For example, still they observed in the roof of the pipeline flow to P14. These data are consistent with ependimogénesis activity that occurs in this region in the mouse described by Bátiz et al. (2011). Precisely this ability has allowed explain the expandability that has that ventricle in hydrocephalic mice *hyh* (Pérez-Fígares et al 1998; 2011 Bátiz et al. 2011). For example, still they observed in the roof of caudal aqueduct until to P14. These data are consistent with ependimogenesis activity that occurs in this region in the *hyh* mouse described by Bátiz et al. (2011). Precisely, this ability has allowed explain the expandability that has that ventricle in the hydrocephalic *hyh* mice (Pérez-Fígares et al 1998; Bátiz et al. 2011).

In some ventricular surfaces it has been possible to distinguish regions with immature appearance with only cilia, which are kept in developing longer. These regions may have functional significance. For example, one region located dorsal between the

caudal aqueduct and fourth ventricle may correspond to the organizing isthmic region (see Fig. 23 in results). The isthmic organizer is the anterior segment of the hindbrain with morphogenetic activity, sending differentiating signal to rostral and caudal regions (Echevarria et al. 2003).

On the walls of the lateral ventricles are common unciliated cells that may correspond to SVZ stem cells (Merkle and Alvarez-Buylla, 2006). It has been observed that are specially plentiful, even in mature mice in the rostral portion of the VL, including the medial wall. This evidence would agree with the boundaries of the surface occupied by the neurogenic SVZ described by Alvarez-Buylla et al. (2008).

The surface of the ventricular midline, the floor plate, present blebs where remain until at least two weeks old age. The floor plate is an important signaling center that controls the ventral regional differentiation and axon guidance (Sträle et al. 2004). In rats is shown with scanning electron microscopy that the cells in that region have a glandular appearance with apical protrusions that may correspond to the observed blebs (Rodríguez et al. 1996; Del Brío et al. 2001). In *in vitro* conditions, cow explants from floor plate it has been shown to produce SCO-Spondin, a molecule that also secretes the ependymal gland, the subcomisural organ (Guiñazú et al. 2002). The collicular recess, on the roof of caudal cerebral aqueduct has also shown the presence of blebs which has also been described in sheep and goat fetuses (Rajtová and Kacmárik 1998). The collicular recess has been described as a circumventricular organ with secretory characteristics (Stumps et al. 1977).

### **Agenesis of corpus callosum**

#### *Failing in the development of the corpus callosum in the *hyh* mouse with mild hydrocephalus*

In the *hyh* mouse, at the stages between E15.5 and E16.5, in which the corpus callosum develops, hydrocephalus was still mild and in particular the lateral ventricles were not enlarged or even they were collapsed, and a cyst of the third ventricle between the telencephalic hemispheres was not still perceptible. In the *wt* mice, the corpus callosum was detectable at E16.5, and appeared well developed at E17.5. In contrast, whereas the anterior commissure was present in the *hyh* mouse at these stages, the corpus callosum and the hippocampal commissure were absent. At postnatal ages, the fibers that in *hyh* mouse should form the corpus callosum were observed constituting Probst's bundles, or located in the midline white matter. Tracing of the callosal fibers with Dil in fixed tissue of *hyh* embryos at E17.7 proved the absence of contralateral hemispheric connections, and therefore the agenesis of the corpus callosum. In these *hyh* embryos, most of the Dil-labeled fibers were found in the ipsilateral hemisphere directed ventrally towards the lateral ventricle.

#### *Presence of the projecting neurons in the cingular and frontal cortices of the *hyh* mouse*

Probes for *tbr1* mRNA labeled neurons in the neocortex of *wt* and *hyh* mice at E14.5, stage in which they should project pioneering axons. In addition, probes for *tag1* mRNA hybridized in the cortical neurons of both *wt* and *hyh* mice at E15.5.

#### *Selective affectation of the glial wedge development in the *hyh* mouse*

In the first postnatal days, when development of the corpus callosum is concluded, the glial cells of the indusium griseum still remain detectable in the *wt* and *hyh* mice. These glial cells appeared GFAP+, expressing *tis21*, and displaying radial long basal processes.

The subcallosal sling cells were detected expressing of calretinin. In *wt* and *hyh* mice they were detected constituting a row of cells bordering dorsally the *septum*.

In the *wt* mouse at E15.5, RC2 antibody and antibodies against GFAP, nestin, and BLBP labeled the glial wedge cells, which were found displaying a radial arrangement and long basal cell processes. Later during development of the corpus callosum and at postnatal ages, multipolar radial cells at the glial wedge derived to GFAP+ astrocytes. In the *hyh* mouse at E15.5, it was noticeable that particularly the area of the glial wedge is specifically disrupted, but not the neighboring ventricular zone at the lateral ventricle. The pancadherin antibody, which labels the N-cadherin cell adhesion molecule, pointed out the disruption of the junctions between the glial wedge cells. Nestin labeling also revealed a disruption in the radial organization of the glial wedge cells of the *hyh* mouse at E15.5. The disruption of the epithelial organization of the glial wedge allowed the abnormal presence of tubulin  $\beta$ III+ cell processes occupying the ventricular zone. In the *wt* mouse at E15.5, *tis21* can be detected in the specialized cells of the glial wedge, in the same way as the neighbor neuroepithelium. The selective disorganization of the glial wedge was also perceived with the labeling of *tis21* riboprobes.

#### *Failing in the interhemispheric midline crossing of the pioneering axons in the *hyh* mouse*

The pioneering callosal axons were labeled with anti GAP43, allowing their detection arising from the cingulated cortex of *wt* and *hyh* mice at E15.5. In the *hyh* mouse, instead of directing towards the interhemispheric midline, several of the callosal

pioneering axons were abnormally found turning towards the disrupted glial wedge. Application of Dil into the cingular cortex of brain slices from *wt* and *hyh* mice, obtained at E14.5 and E15.5 and maintained under organotypic culture conditions, allowed the labeling of the growing pioneering callosal axons. In *wt* brain slices, after twenty-four or 48 hours in vitro, those tagged axons were detected crossing the midline. In contrast, in brain slices from *hyh* mice, although those tagged axons were found elongating, at the level of the corticoseptal boundary they were detected turning towards the ipsilateral lateral ventricle, thus failing to cross the midline.

In the present investigation that has been carried out in the *hyh* mutant mouse model presenting congenital hydrocephalus with an interhemispheric cyst, the agenesis of corpus callosum cannot be interpreted as a malformative consequence due to the presence of an interhemispheric cyst or ventriculomegaly. The development of the corpus callosum was found taking place at stages when the interhemispheric cyst was not still present and the lateral ventricles were collapsed. In fact, ventriculomegaly at the lateral ventricles occurred at postnatal ages in the *hyh* mouse. However, alterations in the glial wedge cells development in the neuroepithelium can explain the cause of the corpus callosum agenesis.

The radial glial cells constitute a heterogeneous cell population located in the neuroepithelium that supports cell migration during the brain development. In the present study, this subpopulation of radial glial cells was found specifically affected by an intrinsic defective program of development of the neuroepithelium, which has been previously described in the *hyh* mouse. That program follows a temporo-spatial pattern according to the cell differentiation in the neuroepithelium/ventricular zone (Jiménez et al 2001). The cells of the glial wedge differentiate earlier than the neighbor neuroepithelium, and express GFAP prior to other regions of the dorsal telencephalo. The glial wedge cell can be supposed altered during the program of cell differentiation in the neuroepithelium at difference of the neighbor areas. In the *hyh* at E15.5 glial wedge organization was been found disrupted and its cells did not display radial morphology, and later in the development at postnatal ages they were absent.

At difference to the glial wedge cells, the indusium griseum glial cells are astrocytes that are not located in the neuroepithelium in the ventricular zone. Here, we have found that at difference to the glial wedge, the indusium griseum glial cells are developed in the *hyh* mouse.

In the *hyh* mouse, when the growth of callosal pioneering axons was experimentally tagged applying Dil in organotypic culture of brain slices, the traced axons were not able to cross the midline after 24 hours. In contrast, they displayed a wrong direction turning towards the ipsilateral lateral ventricle. Accordingly, immunostaining of pioneering axons using anti-GAP43 in fixed brain sections revealed the existence of such wrong direction in the *hyh* mouse. This body of evidence suggests the existence of guiding problems for such axons. Both, the glial wedge cells and the indusium griseum glial cells are known sources the chemorepellant molecules such as slit. Thus, it is supposed that they create a lane for guiding the axons to cross the midline. The presence of the repellent effect from the glial cells of the indusium griseum and its absence from the glial wedge could explain the defective direction taken by the pioneering axons.

In human, the agenesis of the corpus callosum is an anatomical feature present in several diseases. Some of them also exhibit hydrocephalus. Therefore, it is plausible that in some cases molecules or mechanisms failing in the corpus callosum formation are also involved in hydrocephalus. For instance, the disruption or mutation of *Nfia* and *Nfib* genes, which are essentials for the midline glia involved in the development of the corpus callosum, causes its agenesis, defects in the hippocampal commissure, and hydrocephalus at the same stage of development.

The *hyh* mouse presents a moderate communicating hydrocephalus during the development at the moment of the formation of the corpus callosum. Later, the *hyh* mouse develops an interhemispheric cyst covered with ependyma from the dorsal third ventricle (Pérez-Fígares et al 1998.) The present results show that ventriculomegaly and third ventricle cyst are formed when the main part of the corpus callosum should be already developed. In fact, such symptoms of hydrocephalus aggravation take place during the first postnatal week, when hydrocephalus in the *hyh* mouse became non-communicating (Wagner et al. 2003; Páez et al. 2007). Therefore, the absence of formation of the corpus callosum can be considered malformative instead of a malformation due to the development of an interhemispheric cyst or ventriculomegaly.

The present study represents a basis to propose that, in some human syndromes, a common problem in the development of the ventricular zone cell populations can underlie the coexistence of hydrocephalus with the agenesis of the corpus callosum.

## Role of the periventricular astrocyte reaction in the evolution of hydrocephalus

### *The differences in the evolutionary forms of hydrocephalus in the *hyh* mouse*

In *hyh* mutant mice at 4 days of age (P4), shortly after the closure of the caudal cerebral aqueduct, hydrocephalus was found to become severe. In most of the mutant *hyh* mice, the pathology causing their deaths occurred approximately 30-40 days after birth, and these results are in agreement with those described by Bátiz et al. (2006). Hydrocephalus and ventriculomegaly in the lateral ventricles was found affecting the neocortex and hippocampus. The neocortex presented a periventricular oedema associated with the degeneration of the commissural fibres of the external capsule during the first week of life. A periventricular astrocyte reaction was found covering the ventricle surfaces lacking an ependyma in the main part of the ventricular system, including the hippocampus. The mice used for the present study at P30 presented the severe form of the disease, which displayed a marked macrocephaly, as described by Bátiz et al. (2006). They appeared to be seriously ill, and they were perceived as being susceptible to death within days. In contrast, the *hyh* mice that were able to survive to 90 (P90) and 180 (P180) days of postnatal age, while displaying the symptoms described by Bronson and Lane (1990) presented conditions that were not apparently critical, in correspondence with the evidence described by Bátiz et al. (2006). These mice were considered to be presenting a compensated form of hydrocephalus.

### *The absence of significant differences in the levels of TGF $\beta$ 1 mRNA in *hyh* mice with different evolutionary forms of hydrocephalus*

To examine whether TGF $\beta$ 1 could be related to the evolution of hydrocephalus in the *hyh* mice, the mRNA levels of this factor were quantified. No significant differences in the mRNA levels were found in the hippocampus between *hyh* and *wt* mice at any age (P30, P90 and P180) examined.

TGF $\beta$ 1 has been described as playing a role in the pathogenesis of posthaemorrhagic and communicant hydrocephalus (Jiménez et al. 2014). This factor has a fibrogenic effect that leads to scar formation around blood vessels, in the glia limitans, and in the subarachnoid space, thus contributing to the impairment of CSF absorption and to the perivascular drainage of interstitial fluid, reducing cerebral compliance (Johanson et al. 1999). TGF $\beta$ 1 controls glial reactions, inhibiting microglial and astroglial proliferation (Jones et al. 1998; Lindholm et al. 1992; Makwana et al. 2007; Vergeli et al. 1995). TGF $\beta$ 1 has been implied in the regulation of the expression of GFAP in the reactive astrocytes present in neurodegenerative brain diseases and experimental injuries (Krohn et al. 1999; Logan et al. 1994; Romao et al. 2008; Sousa et al. 2004). An upregulation of GFAP has been detected in the present study in both the severe and compensated forms of hydrocephalus in the *hyh* mouse. However, TGF $\beta$ 1 levels in the mutant mice were not significantly different when compared with those in *wt* mice and were also not significantly different between the severe and compensated disease forms. Thus, it can be suggested that TGF $\beta$  likely does not play a key role in the evolution of congenital hydrocephalus in the *hyh* mouse. Nevertheless, the effects cited above for TGF $\beta$ 1 cannot be discounted during the initial stages of the formation of the astrocyte reaction in the origin of the disease.

### *The presence of periventricular astrocytic reactions in the *hyh* mouse*

In normal mice, the multiciliated ependyma forms a single cell layer that was readily recognized by the expression of the S100 $\beta$  protein, tubulin  $\beta$ IV and the intermediate filament protein vimentin. Ciliated ependyma did not express GFAP. In mature *hyh* mice, most of the ventricular surface lacked ependyma due to its disruption during development. Nevertheless, multiciliated ependymal cells that resisted denudation remained in situ as small patches located consistently at specific sites of the ventricular walls. The brains of the *hyh* mice displayed an astrocytic reaction covering the ventricle surfaces of most of the ventricular system, including the alveus side of the hippocampus. In the areas lacking ependyma, astrocytes formed a glial layer that covered the denuded ventricular surface. These cells lacked cilia and expressed the intermediate filament proteins GFAP and vimentin. The levels of GFAP mRNA in the hippocampus of *hyh* mice at P30 and P90 were quantified and were found to be at least

two-fold greater than the levels observed in the *wt* mice. However, there were no significant differences found between *hyh* mice at P30 and P90.

*The expression of TNF $\beta$  and its receptor TNF $\beta$ R1 in reactive astrocytes in the hyh mouse*

The expression pattern of TNF $\beta$  was studied by immunolabelling frozen sections of the mouse brain cortex with three different antibodies. All of the antibodies revealed similar results. During the first days of postnatal life in both *wt* and *hyh* mice, TNF $\beta$  immunoreaction was only detected in the meninges and in the neighbouring brain parenchyma. Later, at the end of the first postnatal week of the *hyh* mice, the stage during which hydrocephalus was becoming severe, it was also possible to detect a diffuse immunoreaction in the brain parenchyma, in astrocyte perivascular endfeet, and in cells covering the ventricle surfaces. In mature mice, in agreement with the results obtained from real-time PCR, the presence of a diffuse immunoreaction to the TNF $\beta$  antibodies could be perceived more strongly in the sections of the *hyh* mice at P30 than in those of *wt* mice at P30 or in those of *hyh* mice at P90.

In the hydrocephalic mice, starting from the first week of life, TNF $\beta$ + cells were detected covering the ventricle surfaces of the neocortex and the alveus of the hippocampus. GFAP and vimentin antibodies, the former an astrocyte marker and the latter an intermediate filament protein present in reactive astrocytes, displayed colabelling with the different TNF $\beta$  antibodies in these cells. Therefore, TNF $\beta$  was present in the reactive astrocytes that cover the ventricle surfaces denuded of the ependyma of the neocortex and hippocampus. Similar evidence was also found for other ventricular surfaces in addition to the lateral ventricles. TNF $\beta$ -GFAP colabelling, by contrast, was not detected in the cell bodies and main cell processes of the non-reactive astrocytes located inside the brain parenchyma. In the hippocampus, microglial cells lacked TNF $\beta$  immunolabelling. In contrast to the hippocampus, on the ventricle surface of the neocortex, in addition to reactive astrocytes, some Iba1+ microglial cells were colabelled with TNF $\alpha$  antibodies. The patches of ependymal cells that resisted the process of denudation did not display TNF $\beta$  immunoreaction.

The expression of TNF $\beta$ R1 in the brain parenchyma was also studied in frozen sections with different antibodies. In the *wt* and *hyh* mice at the earlier postnatal stages, these antibodies immunolabelled the cell bodies of astrocytes, astrocyte cell processes that contribute to the pia matter, and the astrocyte perivascular endfeet. Similar to TNF $\beta$ , and in agreement with the real-time PCR results, TNF $\beta$ R1 antibodies displayed a stronger immunoreactivity in brain sections of *hyh* mice with severe hydrocephalus at P30 than in those from *wt* mice. In the mature mice, TNF $\beta$ R1 was found to be widely distributed throughout the brain parenchyma. In the hippocampus of *wt* and *hyh* mice, the reaction was primarily present in the layers occupied by interneurons and in the dendrites of the pyramidal and granular cells of the hippocampal CA1, CA2, CA3 layers and the dentate gyrus. Thus, labelling could be observed in the strata oriens, the strata radiatum, the molecular strata and the hilus of *wt* and *hyh* mice. In the case of *hyh* mice, the antibodies also labelled the reactive astrocytes covering the ventricle surfaces of the neocortex and hippocampus as well as the cell bodies of neocortical neurons located near the oedema at the external capsule.

*The existence of significant differences between the levels of mRNA for TNF $\beta$  and its receptor TNF $\beta$ R1 in hyh mice with different evolutionary forms of hydrocephalus*

It was found that the levels of TNF $\beta$  mRNA at P30 presented significant differences in the *hyh* mice when compared with the levels observed in the *wt* mice. There was a four-fold increase in the mean level of TNF $\beta$  mRNA in the *hyh* mice, and in some cases, the levels were up to eight-fold greater than those found in *wt* mice. Although the mean TNF $\alpha$  mRNA levels in the *hyh* mice at P90 and P180 were found to be double those observed in *wt* mice, these differences were not significant.

The diffuse distribution of TNF $\beta$  immunolabelling in the brain parenchyma and its absence in the microglial cells suggested that this factor could act through its TNF $\beta$ R1 receptor. For this reason, the levels of TNF $\beta$ R1 mRNA were quantified in the same

animals, following the same real-time PCR procedures as described for TNF $\beta$ . A two-fold increased mean expression for this receptor was found in the hippocampus of *hyh* mice at P30 when compared to *wt* mice. The TNF $\beta$ R1 mRNA levels displayed the same tendency as TNF $\alpha$  in the *hyh* mice at P90 and P180, with no significant differences compared with the *wt* mice. Furthermore, when the levels of TNF $\beta$  and TNF $\beta$ R1 mRNA were compared for each individual mouse at P30, P90 and P180, a significant high correlation probability (0.004) was found between them.

In the present investigation, a significantly higher expression level of TNF $\beta$  mRNA in the *hyh* animals with severe hydrocephalus was found when compared with the *wt* mice and, interestingly, even when compared with the *hyh* mice displaying a compensated form of the disease. The qualitative observations obtained using TNF $\beta$  antibodies to immunostain brain sections agree well with the mRNA expression data. Two forms of immunoreactivity were detected using different antibodies: the labelling of individual cells, including reactive astrocytes, and a diffuse pattern of labelling that was widely distributed throughout the brain parenchyma. The latter form of immunoreactivity suggests the existence of a soluble form of TNF $\beta$  with a wide effect. Accordingly, the levels of TNF $\beta$ R1 mRNA, which is the primary receptor for the soluble form of TNF $\beta$ , were revealed to be in tight correspondence with the levels of TNF $\beta$  in each individual animal. These results in *hyh* mice indicate that TNF $\beta$  may play a role in the pathophysiology of congenital hydrocephalus, likely through TNF $\beta$ R1, and may be related to the evolution of the disease in some way.

Several neurodegenerative events have been observed in the neocortex and hippocampus of animal models with hydrocephalus, such as glial reactions (Xu et al. 2012), neuronal death and metabolic alterations (Del Bigio et al. 2003; Ding et al. 2001; Egawa et al. 2002; Kawamata et al. 2003; Klinge et al. 2002; Shim et al. 2003), hypoxic conditions (Dombrowski et al. 2008; Klinge et al. 2002), oxidative stress (Socci et al. 1999) and the presence of cytokines that are implied in inflammatory reactions (Xu et al. 2012). Some of these events and the presence of inflammatory cytokines have also been found to be involved in human foetal-neonatal hydrocephalus (Sival et al. 2008). The overexpression of TNF $\alpha$ , which was observed in the severe form of hydrocephalus in the present study, is thought to play a role in these inflammatory and neurodegenerative responses.

TNF $\alpha$  expression has been reported to be induced after ischemic insults to brain tissue and the hippocampus and has been correlated with cell death (Watters and Oconnor 2011). In rats with hydrocephalus induced with kaolin, ischemic conditions were reported in the brain cortex, including the hippocampus (Klinge et al. 2002). These conditions would likely also be present in the hippocampus of *hyh* mice due to a high intraventricular pressure, and therefore, there would be a plausible gating for TNF $\alpha$  upregulation. Our observation of a more pronounced macrocephaly in the *hyh* mice at P30 (severe hydrocephalus) than at P90 (compensated hydrocephalus) suggests that intraventricular pressure may be higher in mice at P30 or during their development and that pressure could induce a more pronounced cranial deformation. Nevertheless, in both conditions, ventriculomegaly is present with the supposed existence of high CSF pressures.

TNF $\alpha$ R1 has been primarily associated with programmed cell death and pro-inflammatory pathways that occur during brain injury [7]. We have also found that the receptor is upregulated in the *hyh* mice with a severe disease and is widely distributed in the brain parenchyma; the presence of the receptor in periventricular neocortical neurons suggests a likely role for TNF $\alpha$  in the degeneration of these neurons.

Reactive microglia and astrocytes are two cell populations implied in neurodegenerative and inflammatory processes and in the production of TNF $\alpha$ . With respect to microglia, amoeboid microglia are only present in the neocortical white matter during the first week of life in the *hyh* mouse (Páez et al. 2007; present results), which is a period of time during which the periventricular white matter displays the massive degeneration of myelin (Páez et al. 2007). These cells cannot be found later (Páez et al. 2007; present results). Our present results concerning the microglial morphology and iNOS data indicate that microglial cells would likely not be activated in the mature *hyh* mouse. Nevertheless, we detected a slightly higher number of microglial cells, some of which express greater levels of Iba1, which is a macrophage/microglial-specific calcium-binding protein involved in Rac GTPase-dependent ruffling and phagocytosis (Ohsawa et al. 2000). These findings suggest that microglia could be alert or subtly activated.



With respect to the reactive astrocytes, we have found that they express both  $TNF\alpha$  and the  $TNF\alpha R1$  receptor. The role of reactive astrocytes in hydrocephalus, as with other neurodegenerative diseases, can be considered controversial, and it likely depends on a delicate balance between beneficial and harmful actions. On the beneficial side is the fact that periventricular astrocytes have been found to emulate some functions of the absent ependyma (Roales-Bujan et al. 2012). However, in the case of  $TNF\alpha$  production, differential effects can be considered. On the harmful side are the effects caused by hypoxic conditions and implicated in cell death. The production of  $TNF\alpha$  by astrocytes has been suggested to play an inhibitory role in neurite outgrowth and in oligodendrocyte death (Liberto et al. 2004; Neumann et al. 2002). On the beneficial side is evidence that astrocytes can produce  $TNF\alpha$  and  $TNF\alpha R1$  in vitro to induce the autocrine production of nerve growth factor (NGF) and glial line-derived neurotrophic factor (GDNF) [49]. It has been observed that injury or ischemia in the CNS of rats can lead to an upregulation of the p75 receptor for NGF in astrocytes, which likely controls astrocyte proliferation and, therefore, restricts the proper reaction (Oderfeld-Nowak et al. 2003). In vitro experiments have demonstrated the promotion and regulation of NGF by  $TNF\alpha$  (Cui et al. 2011; Selmaj et al. 1990). A defect in GDNF production by astrocytes has been suggested to mediate neuronal cell death in ischemic conditions (Yamagata et al. 2002; 2012). As another possible effect, the production of  $TNF\alpha$  in astrocytes could mediate the permeability of the endothelium at the brain blood barrier. In fact,  $TNF\alpha$  has been implied in the opening of the epithelial tight junctions in different pathologic and inflammatory conditions (Kimura et al, 2008; Minagar and Alexander 2003; Shen 2012; Ye et al. 2005). The presence of the  $TNF\alpha R2$  receptor has been reported in endothelial cells (Maddahi et al. 2011), where it could play a role in the regulation of vascular permeability. We have detected the presence of  $TNF\alpha$  and its  $TNF\alpha R1$  receptor in the perivascular endfeet of non-reactive astrocytes and in the meninges of the *hyh* mice, suggesting that  $TNF\alpha$  could also have some unknown functions, including a role in vascular permeability or an effect on the blood-brain barrier.

#### *Density of the periventricular astrocyte reaction*

In *hyh* mice, the astrocyte layer covering the denuded brain ventricles showed regional differences. Astrocytes formed a cell layer with varying degrees of tightness that ranged from loose to compact. In the latero-medial wall of the lateral ventricles lining the hippocampus and striatum, the third ventricle, the ventral wall of the cerebral aqueduct and the fourth ventricle the denuded surface was lined by densely packed astrocytes. In other denuded areas, such as those of the dorsal and external walls of the lateral ventricles, reactive astrocytes were arranged as a loose or very loose cell layer. This became more evident in whole mount preparations of the different ventricular regions immunostained for GFAP and used for a densitometric analysis.

Different and distinct regions of the denuded ventricular walls trigger different astrocyte reactions that lead to glial layers with different degrees of cell density and tightness. The signals mediating these different responses are unknown. In *hyh* mice, ependymal denudation takes place at prenatal stages previous to a detectable hydrocephalus (Del Bigio 2003). Therefore, intraventricular pressure or expanding ventricles cannot be considered responsible for the absence of ependyma in these mice. Similarly, the periventricular astrocyte reaction appears shortly after denudation, when astrogliogenesis takes place but at stages when ventriculomegaly is starting to develop. Furthermore, the most robust astrocyte layer is that lining the denuded floor of the fourth ventricle, a cavity displaying a no dilatation. The mechanism underlying the formation of the astrocyte layer replacing the lost ependyma is not known: the actual absence of the ependyma; the direct exposal of the neuropile to the CSF; or a mechanical effect of the expanding ventricles involved. Another question is the physiopathological consequence for the brain regions protected by a new and compact layer of astrocytes and those close to a ventricular wall lined by a loose a highly permeable layer of astrocytes.

*Aquaporin 4 expression in multiciliated ependyma and astrocytes covering the ventricular walls of wt and hyh mice*

In *wt* mice, the water channel protein aquaporin 4 was detected in the latero-basal cell domains, and less intensively in the apical domain, of ependymal cells and in the perivascular end feet of astrocytes. Aquaporin 4 was not detected in the cell bodies of astrocytes. By contrast, in the *hyh* mouse, aquaporin 4 was found throughout the cell body and processes of astrocytes covering ependyma-denuded areas, as well as in the perivascular end feet of parenchymal astrocytes. Densitometric analysis showed that in *hyh* mice the reactive astrocytes covering ependyma-denuded surfaces presented a small but significant increase of immunoreactive aquaporin 4 with respect to the ependyma of *wt* mice.

Aquaporin 4 is a water channel with marked prevalence in periventricular areas. Aquaporin 4 is present in astrocyte perivascular endfeet, in the glia limitans at the border with the subarachnoid CSF, in periventricular astrocytes, and in the ependyma (Nielsen et al 1997). Aquaporin 4 is regulated by reversible protein phosphorylation and protein-protein interactions (Gunnarson et al 2004; Yukutake and Yasui 2010) and is likely to play a key role in the transduction or amplification of signals involved in the osmosensory feedback control of systemic salts and water balance (Yol 2007). Aquaporin 4 regulates water flow through the brain parenchyma-ventricle CSF interface and at the blood brain barrier (Amiry-Moghaddam and Ottersen 2003). In the case of the astrocytes perivascular and pial endfeet, water flow outward along with K<sup>+</sup> passing through Kir4.1 potassium channels may occur (Yool 2007). Similar to other epithelia, in multiciliated ependymal cells, aquaporin 4 is located in the basolateral plasma membranes (Nielsen et al 1997, Rash et al 1998, Roales-Buján et al 2012), and this location results in a directed water flow. The multiciliated ependyma is also most likely involved in maintaining the ependymocyte structural and functional integrity and also in the arrangement of the connexin43-containing gap junctions (Fahn et al 2005, Feng et al 2009, Li et al 2009). Aquaporin 4 appears to play a key role in the presence of edemas and CSF accumulations occurring in hydrocephalus and constitutes a promising therapeutic target (Papadopoulos et al 2002, Verkman et al 2006). In rats with induced hydrocephalus, aquaporin 4 facilitates the clearance of CSF into the parenchymal vasculature (Bloch et al 2006).

Reactive astrocytes lining the denuded ependyma in hydrocephalic *hyh* mice overexpress aquaporin 4, and the protein is found throughout the cell body and processes. The presence of aquaporin 4 in parenchymal reactive astrocytes has been proposed to be involved in the water entry to astrocytes in initial stages of oedema formation to re-establish the osmotic equilibrium. The periventricular reaction found in the present report could represent an attempt to re-establish the equilibrium between ventricular and parenchymal fluids, or to help CSF transport from ventricle to brain capillaries. Ependymal aquaporin 4 has been proposed to play a protective role in hydrocephalus by allowing transependymal re-absorption of CSF into brain capillaries. The presence of aquaporin 4 in the apical plasma membrane of ependymocytes supports this possibility. It appears that aquaporin 4 may be a molecule with a relevant role in hydrocephalus and a good therapeutic target.

*Endocytic-related organules in multiciliated ependyma and in the astrocyte layer lining the ependyma-denuded regions of hyh mice*

Early endosomes, immunodetected by the presence of the EEA1 antigen, were present in the apical juxtannuclear domain of multiciliated ependymal cells of *wt* and *hyh* mice. The trans-Golgi network was detected in the supranuclear region below the layer of early endosomes.

At variance with parenchymal astrocytes, the astrocytes covering the ependyma-denuded areas of *hyh* mice displayed numerous EEA1-positive endosomes scattered throughout the cell body and processes. In these astrocytes, the cytoplasm area occupied by early endosomes was not significantly different from than in ependymal cells of *wt* mice; the trans-Golgi network was located in a cytoplasmic region that was close to the ventricle and along the processes.

Early endosomes are a dynamic cell compartment involved in endocytosis and sorting mechanisms. At variance with the ependyma, the non-polarized distribution of endosomes in reactive astrocytes indicates that they can incorporate fluid and substances not only from the ventricle but also from the parenchymal fluid.

# BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES



- Aït-Ikhlef A, Hantaz-Ambroise D, Jacque C, et al. (1999) Astrocyte proliferation induced by wobbler astrocyte conditioned medium is blocked by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-1beta (IL-1beta) neutralizing antibodies in vitro. *Cell Mol Biol* 5:393–400.
- Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT. (2008) The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 73:357-65. doi: 10.1101/sqb.2008.73.019.
- Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* 57:751–758.
- Babcock DS (1984) The normal, absent, and abnormal corpus callosum: sonographic findings. *Radiology* 151:449–453. doi: 10.1148/radiology.151.2.6709917
- Bajjalieh S (2004) Trafficking in cell fate. *Nat Genet* 36:216–217. doi: 10.1038/ng0304-216
- Balasubramaniam J, Del Bigio MR (2002) Analysis of age-dependant alteration in the brain gene expression profile following induction of hydrocephalus in rats. *Exp Neurol* 173:105–113. doi: 10.1006/exnr.2001.7831
- Barkovich AJ, Simon EM, Walsh CA (2001) Callosal agenesis with cyst: a better understanding and new classification. *Neurology* 56:220–227.
- Bátiz LF, Jiménez AJ, Guerra M, et al. (2011) New ependymal cells are born postnatally in two discrete regions of the mouse brain and support ventricular enlargement in hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 121:721–735. doi: 10.1007/s00401-011-0799-x

- Bátiz LF, Páez P, Jiménez AJ, et al. (2006) Heterogeneous expression of hydrocephalic phenotype in the *hyh* mice carrying a point mutation in alpha-SNAP. *Neurobiol Dis* 23:152–168. doi: 10.1016/j.nbd.2006.02.009
- Bátiz LF, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez LM, et al. (2009) A simple PCR-based genotyping method for M105I mutation of alpha-SNAP enhances the study of early pathological changes in *hyh* phenotype. *Mol Cell Probes* 23:281–290. doi: 10.1016/j.mcp.2009.07.002
- Beddington RS, Robertson EJ (1999) Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96:195–209.
- Bedeschi MF, Bonaglia MC, Grasso R, et al. (2006) Agenesis of the corpus callosum: clinical and genetic study in 63 young patients. *Pediatr Neurol* 34:186–193. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2005.08.008
- Bennett MK (1995) SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting. *Curr Opin Cell Biol* 7:581–586.
- Bentivoglio M, Mazzarello P (1999) The history of radial glia. *Brain Res Bull* 49:305–315.
- Bodensteiner J, Schaefer GB, Breeding L, Cowan L (1994) Hypoplasia of the corpus callosum: a study of 445 consecutive MRI scans. *J Child Neurol* 9:47–49.
- Bonfanti L, Peretto P (2007) Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Prog Neurobiol* 83:24–36. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.11.002
- Botchkina GI, Meistrell ME, Botchkina IL, Tracey KJ (1997) Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med* 3:765–781.

- Bouab M, Paliouras GN, Aumont A, et al. (2011) Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* 173:135–149. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.032
- Bouille C, Mesnil M, Barriere H, Gabrion J (1991) Gap junctional intercellular communication between cultured ependymal cells, revealed by lucifer yellow CH transfer and freeze-fracture. *Glia* 4:25–36. doi: 10.1002/glia.440040104
- Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M (1992) CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog Brain Res* 94:367–379.
- Bradley JR (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214:149–160. doi: 10.1002/path.2287
- Brightman MW (1965) The distribution within the brain of ferritin injected into *encéfalo*spinal fluid compartments. I. Ependymal distribution. *J Cell Biol* 26:99–123.
- Brightman MW (1968) The intracerebral movement of proteins injected into blood and *encéfalo*spinal fluid of mice. *Prog Brain Res* 29:19–40. doi: 10.1016/S0079-6123(08)64147-3
- Brightman MW and Palay SL (1963) The fine structure of ependyma in the brain of the rat. *J Cell Biol* 19:415–439.
- Bronson RT, Lane PW (1990) Hydrocephalus with hop gait (*hyh*): a new mutation on chromosome 7 in the mouse. *Dev Brain Res* 54:131–136.
- Bruni JE (1998) Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech* 41:2–13. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<2::AID-JEMT2>3.0.CO;2-Z

- Bruni JE, Del Bigio MR, Clattenburg RE (1985) Ependyma: normal and pathological. A review of the literature. *Brain Res* 356:1–19.
- Bulfone A, Smiga SM, Shimamura K, Peterson A, Puellas L, Rubenstein JL. (1995) T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron* 15(1):63-78.
- Castejón OJ (2010) Submicroscopic pathology of human and experimental hydrocephalic cerebral cortex. *Folia Neuropathol* 48:159–174.
- Chae TH, Kim S, Marz KE, et al. (2004) The *hyh* mutation uncovers roles for alpha Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet* 36:264–270. doi: 10.1038/ng1302
- Chenn A, McConnell SK (1995) Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82:631–641.
- Cherian S, Thoresen M, Silver IA, et al. (2004) Transforming growth factor-betas in a rat model of neonatal posthaemorrhagic hydrocephalus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30:585–600. doi: 10.1111/j.1365-2990.2004.00588.x
- Cifuentes M, Rodríguez S, Pérez J, et al. (1994) Decreased *encéfalo*spinal fluid flow through the central canal of the spinal cord of rats immunologically deprived of Reissner's fibre. *Exp Brain Res* 98:431–440.
- Clary DO, Griff IC, Rothman JE (1990) SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61:709–721.



- Cragolini AB, Volosin M, Huang Y, Friedman WJ (2012) Nerve growth factor induces cell cycle arrest of astrocytes. *Dev Neurobiol* 72:766–776. doi: 10.1002/dneu.20981
- Crossley PH, Martinez S, Martin GR (1996) Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380:66–68. doi: 10.1038/380066a0
- Davson H, Segal MB (1996) *Physiology of the CSF and blood-brain barriers*. CRC Press, Boca Raton.
- das Neves L, Duchala CS, Tolentino-Silva F, et al. (1999) Disruption of the murine nuclear factor I-A gene (Nfia) results in perinatal lethality, hydrocephalus, and agenesis of the corpus callosum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11946–11951.
- Del Bigio MR (2010) Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:55–73. doi: 10.1007/s00401-009-0624-y
- Del Bigio MR (1995) The ependyma: a protective barrier between brain and *encéfalo*spinal fluid. *Glia* 14:1–13. doi: 10.1002/glia.440140102
- Del Bigio MR (2000) Calcium-mediated proteolytic damage in white matter of hydrocephalic rats? *J Neuropathol Exp Neurol* 59:946–954.
- Del Bigio MR, Bruni JE (1991) Silicone oil-induced hydrocephalus in the rabbit. *Childs Nerv Syst* 7:79–84.
- Del Bigio MR, Massicotte EM (2001) Protective effect of nimodipine on behavior and white matter of rats with hydrocephalus. *J Neurosurg* 94:788–794. doi: 10.3171/jns.2001.94.5.0788
- Del Bigio MR, Wilson MJ, Enno T (2003) Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. *Ann Neurol* 53:337–346. doi: 10.1002/ana.10453

- del Brio MA, Riera P, Peruzzo B, Rodríguez EM. (2001) Hindbrain floor plate of the rat: ultrastructural changes occurring during development. *Microsc Res Tech* 52(5):615-26.
- Deren KE, Packer M, Forsyth J, et al. (2010) Reactive astrocytosis, microgliosis and inflammation in rats with neonatal hydrocephalus. *Exp Neurol* 226:110–119. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.08.010
- Didier N, Romero IA, Créminon C, et al. (2003) Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem* 86:246–254.
- Ding Y, McAllister JP, Yao B, et al. (2001a) Neuron tolerance during hydrocephalus. *Neuroscience* 106:659–667.
- Ding Y, McAllister JP, Yao B, et al. (2001b) Axonal damage associated with enlargement of ventricles during hydrocephalus: a silver impregnation study. *Neurol Res* 23:581–587. doi: 10.1179/016164101101199045
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, et al. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703–716.
- Dombrowski SM, Deshpande A, Dingwall C, et al. (2008) Chronic hydrocephalus-induced hypoxia: increased expression of VEGFR-2+ and blood vessel density in hippocampus. *Neuroscience* 152:346–359. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.11.049
- Dominguez-Pinos MD, Páez P, Jiménez A-J, et al. (2005) Ependymal denudation and alterations of the subventricular

zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:595–604.

Douglas MR, Daniel M, Lagord C, et al. (2009) High CSF transforming growth factor beta levels after subarachnoid haemorrhage: association with chronic communicating hydrocephalus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:545–550. doi: 10.1136/jnnp.2008.155671

Echevarría D, Vieira C, Gimeno L, Martínez S (2003) Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res Rev* 43:179–191.

Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54:15–36.

Egawa T, Mishima K, Egashira N, et al. (2002) Impairment of spatial memory in kaolin-induced hydrocephalic rats is associated with changes in the hippocampal cholinergic and noradrenergic contents. *Behav Brain Res* 129:31–39.

Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD (2005) Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 75:321–341. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.04.002

Eskandari R, Harris CA, McAllister JP (2011) Reactive astrocytosis in feline neonatal hydrocephalus: acute, chronic, and shunt-induced changes. *Childs Nerv Syst* 27:2067–2076. doi: 10.1007/s00381-011-1552-4

Faber-Elman A, Lavie V, Schwartz I, et al. (1995) Vitronectin overrides a negative effect of TNF-alpha on astrocyte migration. *FASEB J* 9:1605–1613.

Farkas LM, Huttner WB (2008) The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr Opin Cell Biol* 20:707–715. doi: 10.1016/j.ceb.2008.09.008

Fernández-Llebrez P, Grondona JM, Pérez J, et al. (2004) Msx1-deficient mice fail to form prosomere 1 derivatives, subcommissural organ, and posterior commissure and develop hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:574–586.

Flood C, Akinwunmi J, Lagord C, et al. (2001) Transforming growth factor-beta1 in the *encéfalo*spinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage: titers derived from exogenous and endogenous sources. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:157–162. doi: 10.1097/00004647-200102000-00007

Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP (2003) Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1161–1168. doi: 10.1161/01.ATV.0000070546.16946.3A

Frisén J, Lendahl U (2001) Oh no, Notch again! *BioEssays* 23:3–7. doi: 10.1002/1521-1878(200101)23:1<3::AID-BIES1001>3.0.CO;2-F

Fujimori KE, Takeuchi K, Yazaki T, et al. (2000) Expression of L1 and TAG-1 in the corticospinal, callosal, and hippocampal commissural neurons in the developing rat telencephalon as revealed by retrograde and in situ hybridization double labeling. *J Comp Neurol* 417:275–288.

Gabrion JB, Herbuté S, Bouillé C, et al. (1998) Ependymal and choroidal cells in culture: characterization and functional differentiation. *Microsc Res Tech* 41:124–157. doi: 10.1002/

(SICI)1097-0029(19980415)41:2<124::AID-JEMT3>3.0.CO;2-U

Galbreath E, Kim SJ, Park K, et al. (1995) Overexpression of TGF-beta 1 in the central nervous system of transgenic mice results in hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:339–349.

Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, et al. (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ* 14:1324–1335. doi: 10.1038/sj.cdd.4402144

Gosens R, Mutawe M, Martin S, et al. (2008) Caveolae and caveolins in the respiratory system. *Curr Mol Med* 8:741–753.

Götz M (2003) Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist* 9:379–397.

Gotz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777–788. doi: 10.1038/nrm1739

Grondona JM, Pérez-Martín M, Cifuentes M, et al. (1996) Ependymal denudation, aqueductal obliteration and hydrocephalus after a single injection of neuraminidase into the lateral ventricle of adult rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:999–1008.

Guerra MM, Henzi R, Ortloff A, et al. (2015) Cell Junction Pathology of Neural Stem Cells Is Associated With Ventricular Zone Disruption, Hydrocephalus, and Abnormal Neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 74:653–671. doi: 10.1097/NEN.000000000000203

Guillem P, Fabre B, Cans C, et al. (2003) Trends in elective terminations of pregnancy between 1989 and 2000 in a

- French county (the Isère). *Prenat Diagn* 23:877–883. doi: 10.1002/pd.711
- Hankin MH, Schneider BF, Silver J (1988) Death of the subcallosal glial sling is correlated with formation of the cavum septi pellucidi. *J Comp Neurol* 272:191–202. doi: 10.1002/cne.902720204
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Götz M (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 229:15–30. doi: 10.1006/dbio.2000.9962
- Hatten ME (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22:511–539. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.511
- Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA (1991) Astroglia in CNS injury. *Glia* 4:233–243. doi: 10.1002/glia.440040215
- Heep A, Stoffel-Wagner B, Bartmann P, et al. (2004) Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 are highly expressed in the *encéfalo*spinal fluid of premature infants with posthemorrhagic hydrocephalus. *Pediatr Res* 56:768–774. doi: 10.1203/01.PDR.0000141524.32142.53
- Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL. (2001) *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29(2):353–66.
- Hollyday M (2001) Neurogenesis in the vertebrate neural tube. *Int J Dev Neurosci* 9:161–173.
- Hong H-K, Chakravarti A, Takahashi JS (2004) The gene for soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein alpha is mutated in hydrocephaly with hop gait (*hyh*) mice. *Proc Natl*

Acad Sci U S A 101:1748–1753. doi:  
10.1073/pnas.0308268100

Jäderstad J, Brismar H, Herlenius E (2010) Hypoxic preconditioning increases gap-junctional graft and host communication. *Neuroreport* 21:1126–1132. doi: 10.1097/WNR.0b013e328340a77b

Jarvis CR, Andrew RD (1988) Correlated electrophysiology and morphology of the ependyma in rat hypothalamus. *J Neurosci* 8:3691–3702.

Jiménez A-J, Rodríguez-Pérez L-M, Domínguez-Pinos M-D, et al. (2013) Increased levels of TNF $\alpha$  but not TGB $\beta$ 1 are associated with the severity of congenital hydrocephalus in the *hyh* mouse: TNF $\alpha$  in the aetiology of congenital hydrocephalus. *Neuropathol Appl Neurobiol* n/a–n/a. doi: 10.1111/nan.12115

*Jiménez AJ, Tomé M, Páez P, et al. (2001) A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. J Neuropathol Exp Neurol* 60:1105–1119.

Johanson CE, Szmydynger-Chodobska J, Chodobski A, et al. (1999) Altered formation and bulk absorption of *encéfalo*spinal fluid in FGF-2-induced hydrocephalus. *Am J Physiol* 277:R263–271.

Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G (1998) Transforming growth factor beta's 1, 2 and 3 inhibit proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer. *Brain Res* 795:301–306.

Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol* 25:99–112.

- Kanaji M, Tada T, Kobayashi S (1997) A murine model of communicating hydrocephalus: Role of TGF-beta1. *J Clin Neurosci* 4:51–56.
- Karagogeos D (2003) Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Front Biosci* 8:s1304–1320.
- Kawamata T, Katayama Y, Tsuji N, Nishimoto H (2003) Metabolic derangements in interstitial brain edema with preserved blood flow: selective vulnerability of the hippocampal CA3 region in rat hydrocephalus. *Acta Neurochir Suppl* 86:545–547.
- Kimura K, Teranishi S, Fukuda K, et al. (2008) Delayed disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells induced by tumor necrosis factor-alpha in a manner dependent on NF-kappaB. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:565–571. doi: 10.1167/iovs.07-0419
- Kitazawa K, Tada T (1994) Elevation of transforming growth factor-beta 1 level in *encéfalo*spinal fluid of patients with communicating hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 5:1400–1404.
- Klinge P, Mühlendyck A, Lee S, et al. (2002) Temporal and regional profile of neuronal and glial cellular injury after induction of kaolin hydrocephalus. *Acta Neurochir Suppl* 81:275–277.
- Koester SE, O'Leary DD (1994) Axons of early generated neurons in cingulate cortex pioneer the corpus callosum. *J Neurosci* 4:6608–6620.
- Kondziella D, Eyjolfsson EM, Saether O, et al. (2009) Gray matter metabolism in acute and chronic hydrocephalus. *Neuroscience* 159:570–577. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.008



- Kosodo Y, Röper K, Haubensak W, et al. (2004) Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J* 23:2314–2324. doi: 10.1038/sj.emboj.7600223
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149–184. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600
- Kriegstein AR, Götz M (2003) Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43:37–43. doi: 10.1002/glia.10250
- Krohn K, Rozovsky I, Wals P, et al. (1999) Glial fibrillary acidic protein transcription responses to transforming growth factor-beta1 and interleukin-1beta are mediated by a nuclear factor-1-like site in the near-upstream promoter. *J Neurochem* 72:1353–1361.
- Kuno R, Yoshida Y, Nitta A, et al. (2006) The role of TNF-alpha and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes. *Brain Res* 1116:12–18. doi: 10.1016/j.brainres.2006.07.120
- Landoni VI, Schierloh P, de Campos Nebel M, et al. (2012) Shiga toxin 1 induces on lipopolysaccharide-treated astrocytes the release of tumor necrosis factor-alpha that alter brain-like endothelium integrity. *PLoS Pathog* 8:e1002632. doi: 10.1371/journal.ppat.1002632
- Law CO, Kirby RJ, Aghamohammadzadeh S, Furley AJW (2008) The neural adhesion molecule TAG-1 modulates responses of sensory axons to diffusible guidance signals. *Development* 135:2361–2371. doi: 10.1242/dev.009019

- Leinonen V, Menon LG, Carroll RS, et al. (2011) *encéfalo*spinal fluid biomarkers in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Int J Alzheimers Dis* 2011:312526. doi: 10.4061/2011/312526
- Lindholm D, Castrén E, Kiefer R, et al. (1992) Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 117:395–400.
- Lindwall C, Fothergill T, Richards LJ (2007) Commissure formation in the mammalian forebrain. *Curr Opin Neurobiol* 17:3–14. doi: 10.1016/j.conb.2007.01.008
- Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, et al. (1998) Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci* 1:494–500. doi: 10.1038/2210
- Livy DJ, Wahlsten D (1997) Retarded formation of the hippocampal commissure in embryos from mouse strains lacking a corpus callosum. *Hippocampus* 7:2–14. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:1<2::AID-HIPO2>3.0.CO;2-R
- Logan A, Berry M, Gonzalez AM, et al. (1994) Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 6:355–363.
- Luo J, Shook BA, Daniels SB, Conover JC (2008) Subventricular zone-mediated ependyma repair in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 28:3804–3813. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0224-08.2008
- Maddahi A, Kruse LS, Chen Q-W, Edvinsson L (2011) The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  receptors in cerebral arteries following cerebral ischemia in rat. *J Neuroinflammation* 8:107. doi: 10.1186/1742-2094-8-107

- Makwana M, Jones LL, Cuthill D, et al. (2007) Endogenous transforming growth factor beta 1 suppresses inflammation and promotes survival in adult CNS. *J Neurosci* 27:11201–11213. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2255-07.2007
- Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F (2008) Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res* 331:165–178. doi: 10.1007/s00441-007-0481-8
- Malatesta P, Hartfuss E, Götz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127:5253–5263.
- Mangano FT, McAllister JP, Jones HC, et al. (1998) The microglial response to progressive hydrocephalus in a model of inherited aqueductal stenosis. *Neurol Res* 20:697–704.
- Mao X, Enno TL, Del Bigio MR (2006) Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus. *Eur J Neurosci* 23:2929–2936. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04829.x
- Marín O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2:780–790. doi: 10.1038/35097509
- Marshall CAG, Suzuki SO, Goldman JE (2003) Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: who are they, where did they come from, and where are they going? *Glia* 43:52–61. doi: 10.1002/glia.10213
- Martínez S (2001) The isthmic organizer and brain regionalization. *Int J Dev Biol* 45:367–371.
- McAllister JP, Miller JM (2010) Minocycline inhibits glial proliferation in the H-Tx rat model of congenital hydrocephalus. *encéfalo/spinal Fluid Res* 7:7. doi: 10.1186/1743-8454-7-7

- McCarthy M, Turnbull DH, Walsh CA, Fishell G (2001) Telencephalic neural progenitors appear to be restricted to regional and glial fates before the onset of neurogenesis. *J Neurosci* 1:6772–6781.
- Merkle FT, Alvarez-Buylla A (2006) Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol* 18:704–709. doi: 10.1016/j.ceb.2006.09.008
- Milhorat TH, Hammock MK (1971) Isotope ventriculography. Interpretation of ventricular size and configuration in hydrocephalus. *Arch Neurol* 25:1–8.
- Miller JM, Kumar R, McAllister JP, Krause GS (2006) Gene expression analysis of the development of congenital hydrocephalus in the H-Tx rat. *Brain Res* 1075:36–47. doi: 10.1016/j.brainres.2005.12.094
- Miller JM, McAllister JP 2nd (2007) Reduction of astrogliosis and microgliosis by *encéfalo*spinal fluid shunting in experimental hydrocephalus. *encéfalo*spinal Fluid Res 4:5. doi: 10.1186/1743-8454-4-5
- Minagar A, Alexander JS (2003) Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 9:540–549.
- Mione MC, Cavanagh JF, Harris B, Parnavelas JG (1997) Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17:2018–2029.
- Misson JP, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS (1988) Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Dev Brain Res* 44:95–108.

- Nakase T, Yoshida Y, Nagata K (2006) Enhanced connexin 43 immunoreactivity in penumbral areas in the human brain following ischemia. *Glia* 54:369–375. doi: 10.1002/glia.20399
- Nase G, Helm PJ, Enger R, Ottersen OP (2008) Water entry into astrocytes during brain edema formation. *Glia* 56:895–902. doi: 10.1002/glia.20664
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, et al. (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22:3161–3173. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2002-02.2002
- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Kriegstein AR (2008) Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol* 508:28–44. doi: 10.1002/cne.21669
- Norris CR, Kalil K (1991) Guidance of callosal axons by radial glia in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 11:3481–3492.
- Oderfeld-Nowak B, Orzyłowska-Sliwińska O, Sołtys Z, et al. (2003) Concomitant up-regulation of astroglial high and low affinity nerve growth factor receptors in the CA1 hippocampal area following global transient cerebral ischemia in rat. *Neuroscience* 120:31–40.
- Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, et al. (2000) Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 113 ( Pt 17):3073–3084.
- Olopade FE, Shokunbi MT, Sirén A-L (2012) The relationship between ventricular dilatation, neuropathological and neurobehavioural changes in hydrocephalic rats. *Fluids Barriers CNS* 9:19. doi: 10.1186/2045-8118-9-19

- Olsson SE (1958) The dynamic factor in spinal cord compression; a study on dogs with special reference to cervical disc protrusions. *J Neurosurg* 15:308–321. doi: 10.3171/jns.1958.15.3.0308
- O'Rourke NA, Sullivan DP, Kaznowski CE, et al. (1995) Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development* 121:2165–2176.
- Owler BK, Pitham T, Wang D (2010) Aquaporins: relevance to *encéfalo*spinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *encéfalo*spinal Fluid Res 7:15. doi: 10.1186/1743-8454-7-15
- Ozaki HS, Wahlsten D (1998) Timing and origin of the first cortical axons to project through the corpus callosum and the subsequent emergence of callosal projection cells in mouse. *J Comp Neurol* 400:197–206.
- Páez P, Bátiz L-F, Roales-Buján R, et al. (2007) Patterned neuropathologic events occurring in *hyh* congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:1082–1092. doi: 10.1097/nen.0b013e31815c1952
- Parnavelas JG (2000) The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci* 23:126–131.
- Paul LK, Brown WS, Adolphs R, et al. (2007) Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci* 8:287–299. doi: 10.1038/nrn2107
- Paul L, Madan M, Rammling M, et al. (2011) Expression of aquaporin 1 and 4 in a congenital hydrocephalus rat model. *Neurosurgery* 68:462–473. doi: 10.1227/NEU.0b013e3182011860

- Pérez-Fígares JM, Jiménez AJ, Pérez-Martín M, et al. (1998) Spontaneous congenital hydrocephalus in the mutant mouse *hyh*. Changes in the ventricular system and the subcommissural organ. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:188–202.
- Pérez-Fígares JM, Jiménez AJ, Rodríguez EM (2001) Subcommissural organ, *encéfalo*spinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc Res Tech* 52:591–607. doi: 10.1002/1097-0029(20010301)52:5<591::AID-JEMT1043>3.0.CO;2-7
- Pinto L, Götz M (2007) Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol* 83:2–23. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.02.010
- Piper M, Moldrich RX, Lindwall C, et al. (2009) Multiple non-cell-autonomous defects underlie neocortical callosal dysgenesis in *Nfib*-deficient mice. *Neural Develop* 4:43. doi: 10.1186/1749-8104-4-43
- Puelles L, Rubenstein JLR (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26:469–476. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00234-0
- Rajtová V1, Kacmárik J.(1998) Fetal ependyma in sheep and goat. A scanning electron microscopy study. *Anat Histol Embryol* 27(2):131-4.
- Rash BG, Richards LJ (2001) A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum. *J Comp Neurol* 434:147–157.
- Raybaud C (2010) The corpus callosum, the other great forebrain commissures, and the *septum pellucidum*: anatomy,

development, and malformation. *Neuroradiology* 52:447–477. doi: 10.1007/s00234-010-0696-3

Ren T, Anderson A, Shen W-B, et al. (2006) Imaging, anatomical, and molecular analysis of callosal formation in the developing human fetal brain. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288:191–204. doi: 10.1002/ar.a.20282

Renault-Mihara F, Okada S, Shibata S, et al. (2008) Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1649–1653. doi: 10.1016/j.biocel.2008.03.009

Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707–1710.

Richards LJ (2002) Axonal pathfinding mechanisms at the cortical midline and in the development of the corpus callosum. *Braz J Med Biol Res* 35:1431–1439.

Richards LJ, Plachez C, Ren T (2004) Mechanisms regulating the development of the corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin Genet* 66:276–289. doi: 10.1111/j.1399-0004.2004.00354.x

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570–577.

Roales-Buján R, Páez P, Guerra M, et al. (2012) Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 124:531–546. doi: 10.1007/s00401-012-0992-6

Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M (2010) The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and



the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the *encéfalo*spinal fluid. *Peptides* 31:757–776. doi: 10.1016/j.peptides.2010.01.003

Rodríguez EM, Guerra MM, Vío K, et al. (2012) A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. *Biol Res* 45:231–241. doi: 10.4067/S0716-97602012000300005

Rodríguez EM, Rodríguez S, Hein S. (1998) The subcommissural organ. *Microsc Res Tech* 41(2):98-123

Roegiers F, Jan YN (2004) Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol* 16:195–205. doi: 10.1016/j.ceb.2004.02.010

Roelink H, Porter JA, Chiang C, et al. (1995) Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81:445–455.

Roelink H, Wang J, Black DM, et al. (1993) Molecular cloning and chromosomal localization to 17q21 of the human WNT3 gene. *Genomics* 17:790–792. doi: 10.1006/geno.1993.1412

Romão LF, Sousa V de O, Neto VM, Gomes FCA (2008) Glutamate activates GFAP gene promoter from cultured astrocytes through TGF-beta1 pathways. *J Neurochem* 106:746–756. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05428.x

Rouach N, Avignone E, Mème W, et al. (2002) Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94:457–475.

Rubenstein JL, Martinez S, Shimamura K, Puellas L (1994) The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* 266:578–580.

- Rubenstein JL, Shimamura K, Martinez S, Puellas L (1998) Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci* 21:445–477. doi: 10.1146/annurev.neuro.21.1.445
- Sarnat HB (1995) Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:1–15.
- Sarnat HB (1992a) Regional differentiation of the human fetal ependyma: immunocytochemical markers. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:58–75.
- Sarnat HB (1992b) Role of human fetal ependyma. *Pediatr Neurol* 8:163–178.
- Sauvageot CM, Stiles CD (2002) Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 12:244–249.
- Savvaki M, Panagiotaropoulos T, Stamatakis A, et al. (2008) Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes. *Mol Cell Neurosci* 39:478–490. doi: 10.1016/j.mcn.2008.07.025
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Pérez O, et al. (2006) New neurons follow the flow of *encéfalo*spinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629–632. doi: 10.1126/science.1119133
- Schuermans C, Guillemot F (2002) Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* 12:26–34.
- Selmaj KW, Farooq M, Norton wt, et al. (1990) Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol* 144:129–135.

- Shen L (2012) Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann N Y Acad Sci* 1258:9–18. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06613.x
- Shen XQ, Miyajima M, Ogino I, Arai H (2006) Expression of the water-channel protein aquaporin 4 in the H-Tx rat: possible compensatory role in spontaneously arrested hydrocephalus. *J Neurosurg* 105:459–464. doi: 10.3171/ped.2006.105.6.459
- Shimamura K, Hartigan DJ, Martinez S, et al. (1995) Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121:3923–3933.
- Shimamura K, Rubenstein JL (1997) Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124:2709–2718.
- Shim I, Ha Y, Chung JY, et al. (2003) Association of learning and memory impairments with changes in the septohippocampal cholinergic system in rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Neurosurgery* 53:416–425; discussion 425.
- Shu T, Butz KG, Plachez C, et al. (2003a) Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in *Nfia* knock-out mice. *J Neurosci* 23:203–212.
- Shu T, Li Y, Keller A, Richards LJ (2003b) The glial sling is a migratory population of developing neurons. *Development* 130:2929–2937.
- Shu T, Puche AC, Richards LJ (2003c) Development of midline glial populations at the corticoseptal boundary. *J Neurobiol* 57:81–94. doi: 10.1002/neu.10252
- Shu T, Richards LJ (2001) Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum. *J Neurosci* 21:2749–2758.

- Shu T, Sundaresan V, McCarthy MM, Richards LJ (2003d) Slit2 guides both precrossing and postcrossing callosal axons at the midline in vivo. *J Neurosci* 23:8176–8184.
- Silver J, Lorenz SE, Wahlsten D, Coughlin J (1982) Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways. *J Comp Neurol* 210:10–29. doi: 10.1002/cne.902100103
- Silver J, Ogawa MY (1983) Postnatally induced formation of the corpus callosum in acallosal mice on glia-coated cellulose bridges. *Science* 220:1067–1069.
- Sival DA, Felderhoff-Müser U, Schmitz T, et al. (2008) Neonatal high pressure hydrocephalus is associated with elevation of pro-inflammatory cytokines IL-18 and IFN $\gamma$  in *encéfalo*spinal fluid. *encéfalo*spinal Fluid Res 5:21. doi: 10.1186/1743-8454-5-21
- Sival DA, Guerra M, den Dunnen WFA, et al. (2011) Neuroependymal Denudation is in Progress in Full-term Human Foetal Spina Bifida Aperta: Ependymal Disruption in Human Spina Bifida. *Brain Pathol* 21:163–179. doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00432.x
- Skjolding AD, Rowland IJ, Søgaaard LV, et al. (2010) Hydrocephalus induces dynamic spatiotemporal regulation of aquaporin-4 expression in the rat brain. *encéfalo*spinal Fluid Res 7:20. doi: 10.1186/1743-8454-7-20
- Smith KM, Ohkubo Y, Maragnoli ME, et al. (2006) Midline radial glia translocation and corpus callosum formation require FGF signaling. *Nat Neurosci* 9:787–797. doi: 10.1038/nn1705

- Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC, et al. (1999) Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. *Exp Neurol* 155:109–117. doi: 10.1006/exnr.1998.6969
- Sofroniew MV (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neurosci Rev* 11:400–407. doi: 10.1177/1073858405278321
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7–35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8
- Sommer L, Rao M (2002) Neural stem cells and regulation of cell number. *Prog Neurobiol* 66:1–18.
- Sousa V de O, Romão L, Neto VM, Gomes FCA (2004) Glial fibrillary acidic protein gene promoter is differently modulated by transforming growth factor-beta 1 in astrocytes from distinct brain regions. *Eur J Neurosci* 19:1721–1730. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03249.x
- Spassky N (2005) Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *J Neurosci* 25:10–18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1108-04.2005
- Steele-Perkins G, Plachez C, Butz KG, et al. (2005) The transcription factor gene *Nfib* is essential for both lung maturation and brain development. *Mol Cell Biol* 25:685–698. doi: 10.1128/MCB.25.2.685-698.2005
- Stenbeck G (1998) Soluble NSF-attachment proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 30:573–577.
- Stern CD (2001) Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nat Rev Neurosci* 2:92–98. doi: 10.1038/35053563

- Strähle U, Lam CS, Ertzer R, Rastegar S. (2004) Vertebrate floor-plate specification: variations on common themes. *Trends Genet* 20(3):155-62.
- Stumpf WE, Hellreich MA, Aumüller G, Lamb JC 4th, Sar M. (1977) The collicular recess organ: evidence for structural and secretory specialization of the ventricular lining in the collicular recess. *Cell Tissue Res.* 184(1):29-44.
- Talhouk RS, Zeinieh MP, Mikati MA, El-Sabban ME (2008) Gap junctional intercellular communication in hypoxia-ischemia-induced neuronal injury. *Prog Neurobiol* 84:57–76. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.10.001
- Tamamaki N, Fujimori KE, Takauji R (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17:8313–8323.
- Tarkowski E, Tullberg M, Fredman P, Wikkelsö C (2003) Normal pressure hydrocephalus triggers intrathecal production of TNF-alpha. *Neurobiol Aging* 24:707–714.
- Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* 3:580–587.
- Tuma PL, Hubbard AL (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* 83:871–932. doi: 10.1152/physrev.00001.2003
- Venero JL, Vizuete ML, Machado A, Cano J (2001) Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 63:321–336.
- Vergeli M, mazzanti B, Ballerini C, et al. (1995) Transforming growth factor-beta 1 inhibits the proliferation of rat astrocytes

- induced by serum and growth factors. *J Neurosci Res* 40:127–133. doi: 10.1002/jnr.490400114
- Wagner C, *Bátiz* LF, Rodríguez S, et al. (2003) Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of *hyh* mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1019–1040.
- Wang LW, Huang CC, Yeh TF (2004) Major brain lesions detected on sonographic screening of apparently normal term neonates. *Neuroradiology* 46:368–373. doi: 10.1007/s00234-003-1160-4
- Watters O, O'Connor JJ (2011) A role for tumor necrosis factor- $\alpha$  in ischemia and ischemic preconditioning. *J Neuroinflammation* 8:87. doi: 10.1186/1742-2094-8-87
- Weisz OA, *Rodríguez-Boulan* E (2009) Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci* 122:4253–4266. doi: 10.1242/jcs.032615
- Whitelaw A, Christie S, Pople I (1999) Transforming growth factor-beta1: a possible signal molecule for posthemorrhagic hydrocephalus? *Pediatr Res* 46:576–580. doi: 10.1203/00006450-199911000-00014
- Whitlock KE, Westerfield M (2000) The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development* 27:3645–3653.
- Williams BP, Price J (1995) Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex. *Neuron* 14:1181–1188.
- Wilson SW, Rubenstein JL (2000) Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* 28:641–651.

- Wolman MA, Sittaramane VK, Essner JJ, et al. (2008) Transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1) and laminin-alpha1 regulate dynamic growth cone behaviors and initial axon direction in vivo. *Neural Develop* 3:6. doi: 10.1186/1749-8104-3-6
- Wyss-Coray T, Feng L, Masliah E, et al. (1995) Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1. *Am J Pathol* 147:53–67.
- Xu H, Zhang SL, Tan GW, et al. (2012) Reactive gliosis and neuroinflammation in rats with communicating hydrocephalus. *Neuroscience* 218:317–325. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.004
- Yamagata K (2012) Pathological alterations of astrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats under ischemic conditions. *Neurochem Int* 60:91–98. doi: 10.1016/j.neuint.2011.11.002
- Yamagata K, Tagami M, Ikeda K, et al. (2002) Differential regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression during hypoxia and reoxygenation in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Glia* 37:1–7.
- Ye D, Ma I, Ma TY (2006) Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G496–504. doi: 10.1152/ajpgi.00318.2005
- Yoshikawa K (2000) Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci Res* 37:1–14.



Zaki PA, Quinn JC, Price DJ (2003) Mouse models of telencephalic development. *Curr Opin Genet Dev* 13:423–437.



# RESULTADOS PUBLICADOS



Roales-Buján R, Páez P, Guerra M, Rodríguez S, Vío K, Ho-Plagaro A, García-Bonilla M, Rodríguez-Pérez LM, Domínguez-Pinos MD, Rodríguez EM, Pérez-Fígares JM, Jiménez AJ. (2012) Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus.. *Acta Neuropathol.* 124(4):531-46. doi: 10.1007/s00401-012-0992-6.



# Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus

Ruth Roales-Buján · Patricia Páez · Montserrat Guerra · Sara Rodríguez · Karin Vío · Ailec Ho-Plagaro · María García-Bonilla · Luis-Manuel Rodríguez-Pérez · María-Dolores Domínguez-Pinos · Esteban-Martín Rodríguez · José-Manuel Pérez-Fígares · Antonio-Jesús Jiménez

Received: 25 January 2012 / Revised: 25 April 2012 / Accepted: 27 April 2012 / Published online: 11 May 2012  
© The Author(s) 2012. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** Hydrocephalic *hyh* mutant mice undergo a programmed loss of the neuroepithelium/ependyma followed by a reaction of periventricular astrocytes, which form a new cell layer covering the denuded ventricular surface. We present a comparative morphological and functional study of the newly formed layer of astrocytes and the multiciliated ependyma of *hyh* mice. Transmission electron microscopy, immunocytochemistry for junction proteins (N-cadherin, connexin 43) and proteins involved in permeability (aquaporin 4) and endocytosis (caveolin-1, EEA1) were used. Horseradish peroxidase (HRP) and lanthanum nitrate were used to trace the intracellular and paracellular transport routes. The astrocyte layer shares several cytological features with the normal multiciliated ependyma, such as numerous microvilli projected into the ventricle, extensive cell–cell interdigitations and connexin 43-based gap junctions, suggesting that these astrocytes are

coupled to play an unknown function as a cell layer. The ependyma and the astrocyte layers also share transport properties: (1) high expression of aquaporin 4, caveolin-1 and the endosome marker EEA1; (2) internalization into endocytic vesicles and early endosomes of HRP injected into the ventricle; (3) and a similar paracellular route of molecules moving between CSF, the subependymal neuropile and the pericapillary space, as shown by lanthanum nitrate and HRP. A parallel analysis performed in human hydrocephalic fetuses indicated that a similar phenomenon would occur in humans. We suggest that in foetal-onset hydrocephalus, the astrocyte assembly at the denuded ventricular walls functions as a CSF–brain barrier involved in water and solute transport, thus contributing to re-establish lost functions at the brain parenchyma–CSF interphase.

**Keywords** Cerebrospinal fluid · Congenital hydrocephalus · Ependyma disruption · Astrocyte reaction · Barrier properties · Permeability · Transport · *hyh* mice · Human

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00401-012-0992-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Roales-Buján · P. Páez · A. Ho-Plagaro · M. García-Bonilla · L.-M. Rodríguez-Pérez · M.-D. Domínguez-Pinos · J.-M. Pérez-Fígares · A.-J. Jiménez (✉)  
Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología,  
Universidad de Málaga, Campus Universitario de Teatinos, 29071  
Málaga, Spain  
e-mail: ajjimenez@uma.es

M. Guerra · S. Rodríguez · K. Vío · E.-M. Rodríguez  
Instituto de Anatomía, Histología y Patología, Facultad de  
Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

## Introduction

Congenital hydrocephalus is a developmental brain disorder. In the humans, its incidence is approximately 1–3 in every 1,000 live births. Dilatation of the brain ventricles and elevation of intraventricular pressure in rats with congenital or acquired hydrocephalus have harmful effects on the parenchyma and lead to oedema, oxidative stress [57], proteolytic damages in the white matter [15], cell death and reactive changes in glial cells [17]. Some of these alterations have also been reported in human chronic hydrocephalus [16]. Under these abnormal brain

conditions, some mechanisms can be triggered to partially re-establish brain homeostasis [31].

Astroglial reactions triggered by brain injuries are characterized by the hypertrophy and hyperplasia of astroglial cells. Astrocyte reactions have been reported to inhibit axonal regeneration [7], but have also been associated with the secretion of growth factors and trophic molecules [19, 24, 47, 49] such as NGF, IGF-I and bFGF that promote axonal re-growth [47]. It has been suggested that the astrocyte reaction initially protects the brain tissue and contributes to its functional recovery [22]. Therefore, the beneficial and detrimental functional consequences of these astroglial reactions are under debate [36, 58, 59]. The astrocyte reaction that occurs in the brain of hydrocephalic animals has been thought to be a harmful phenomenon, leading some authors to test the effects of anti-inflammatory drugs in rats that have been made hydrocephalic postnatally [35, 36].

There is a large body of evidence indicating that the neuroepithelium/ependyma lining the ventricular walls of the developing brain plays a key role in the onset and evolution of congenital hydrocephalus [1–3, 18, 26, 52, 55, 61, 65]. There are several ependymal cell lineages lining distinct regions of the ventricular walls. In the cerebral aqueduct of hydrocephalic *hyh* mice, different types of ependymal cells have been reported [65]. Some of these types disrupt, some remain unaffected and other ones proliferate [4, 65]. Recently, different types of ependymal cells have been described in the cerebral aqueduct of human foetuses [55]. Ependymal specializations also occur in other regions of the ventricular system [50]. Most of the different ependymal populations are multiciliated. Their cilia beat in a synchronized manner and thus contribute to the flow of the cerebrospinal fluid (CSF) [43, 68, 69]. Other functions have also been assigned to the multiciliated ependyma, including the regulation of the interaction between the ventricular CSF and the brain extracellular fluid, the clearance of metabolic substances and neurotransmitters and the mediation of adhesion of inflammatory cells [14, 65]. We have previously reported that foetal-onset hydrocephalus in mutant *hyh* mice and in human foetuses is associated with defects in the neuroepithelium/ependyma [18, 30, 43]. Such defects result in the loss of the neuroepithelium/ependyma and in a subsequent astroglial reaction that leads to the development of a new cell layer lining the denuded ventricular surface [18, 41, 65]. The functional significance of the new brain parenchyma/CSF interphase formed by reactive astrocytes is not known.

The present study has been designed to help elucidate the role of the periventricular astroglial reaction in congenital hydrocephalus. The study was performed on *hyh* (hydrocephalus with *hop gait*) [11] mutant mice, in which the onset and evolution of hydrocephalus resemble that of

human congenital hydrocephalus. Two phases have been recognized in the development of congenital hydrocephalus in the *hyh* mutant mouse. During embryonic life, the neuroependyma disruption of the ventral fourth ventricle and cerebral aqueduct is followed by a moderate communicating hydrocephalus. During the first postnatal week, the dorsal wall of the cerebral aqueduct becomes disrupted triggering aqueduct obliteration and the onset of a severe hydrocephalus [65]. The investigation was carried out at the postnatal stages when hydrocephalus is severe and astrogliongenesis and astrocyte reaction are completed [41]. The study also analysed the astrocyte reaction occurring in the denuded ventricular walls of human hydrocephalic foetuses.

## Materials and methods

### Animals

Mutant *hyh* mice (hydrocephalus with *hop gait*, B6C3Fe-*a/a-hyh/J* strain) and their control littermate wild-type (wt) mice were used [11]. The *hyh* mouse carries a point mutation in the *Napa* gene that encodes  $\alpha$ -Snap [13, 25], a protein involved in membrane fusion events. Mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred into two colonies, one at the Animal Experimentation Service of the University of Malaga and the other at the Medical School of the Austral University of Chile, Valdivia, Chile. The housing, handling, care and processing of the animals were conducted in accordance with the European and Spanish laws (DC 86/609/CEE and RD 1201/2005) and following the regulations approved by the council of the American Physiological Society. Wt and mutant *hyh* mice were identified by clinical inspection and genotyping [5]. The animals were anesthetized with intraperitoneally administered Dolethal (sodium pentobarbital; Vétoquinol, Lure, France; 0.2 mg/g bodyweight) and killed at the postnatal (P) ages detailed in Table 1.

### Human foetuses

Paraffin sections of brains from 8 foetuses presenting communicating hydrocephalus and 15 control foetuses were used (for further information concerning this material see [18]).

### Immunocytochemistry

Wt and *hyh* mice were transcardially perfused with Bouin fixative. The brain was dissected out and further fixed by immersion in Bouin fixative for 2 days. Serial paraffin sections were obtained and adjacent sections were



**Table 1** Number of animals by age and genotype used in each experiment

Experiment	Immunocytochemistry	Immunofluorescence	HRP tracing (light microscopy)	HRP tracing (electron microscopy)	Lanthanum tracing	Scanning electron microscopy
Animal postnatal age in days (number/genotype)	10, 14, 20, 30 (4 wt and 4 hyh each age)	6 (6 wt, 6 hyh), 14 (6 wt, 6 hyh), 20 (7 wt, 7 hyh), 30 (3 wt, 3 hyh)	3, 8, 14, 30 (2 wt and 4 hyh each age)	3 (2 each condition), 30 (2 wt, 4 hyh)	3 (3 wt, 5 hyh), 6 (3 wt, 5 hyh), 10 (3 wt, 5 hyh), 20 (5 wt, 5 hyh), 30 (3 wt, 5 hyh)	14 (6 hyh), 20 (10 hyh)

**Table 2** Primary antibodies used

Antibody (reference)	Source	Type	Dilution	Molecule/structure labelling
Aquaporin 4 (A5971)	Sigma	Rabbit polyclonal	1:400	Water channel protein
Caveolin-1 (N-20)	Santa Cruz Biotechnology, INC, San Diego, CA, USA	Rabbit polyclonal	1:200	Caveolae
Connexin 43	<sup>a</sup>	Rabbit polyclonal	1:750	Gap junctions
EEA1 (PA1-063)	Affinity Bioreagents INC, Gonden, CO, USA	Rabbit polyclonal	1:200	Early endosome antigen 1
GFAP (4650)	Biogenesis, Oxford, UK	Rabbit polyclonal	1:250	GFAP intermediate filaments
GFAP (4674)	Abcam, Cambridge, UK	Mouse monoclonal	1:1,000	GFAP intermediate filaments
GLUT1	<sup>b</sup>	Rabbit polyclonal	1:1,000	Glucose transporter 1
HRP	<sup>c</sup>	Rabbit polyclonal	1:1,000	Injected HRP
N-Cadherin (sc-8939)	Santa Cruz Biotechnology	Rabbit polyclonal	1:50	N-Cadherin (adherens junctions)
S100 $\beta$ (ab52642)	Abcam	Rabbit polyclonal	1:200	S100 $\beta$
TGN46 (ab16059)	Abcam	Rabbit polyclonal	1:500	Trans-Golgi network
Tubulin $\beta$ IV (T7941)	Sigma	Mouse monoclonal	1:400	Ependymal cilia
Tubulin $\beta$ IV (ab11315)	Abcam	Mouse monoclonal	1:100	Ependymal cilia
Vimentin (V4630)	Sigma, St Louis, MO, USA	Goat polyclonal	1:500	Vimentin intermediate filaments

<sup>a</sup> Kindly provided by JC Sáez, Catholic University of Chile

<sup>b</sup> Kindly provided by CI Ribas, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY, USA

<sup>c</sup> Developed at the Department of Cell Biology, Genetics and Physiology, University of Malaga, Spain

incubated with a series of primary antibodies (Table 2). For further details, see Supplementary data.

#### Single and double immunofluorescence and confocal microscopy

Wt and hyh mice (Table 1) were transcardially perfused with Bouin fixative or 4 % paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Bouin-fixed brains from P6 (6 days of age) and P30 mice were used to obtain paraffin sections that were hydrated and immunostained. Paraformaldehyde-fixed brains from P14 and P20 mice were used to obtain frozen sections that were immunostained with a free-floating section-staining protocol. In four P20 mice, the ventricular walls of the lateral ventricles were dissected out to obtain whole mounts for

immunostaining. After incubation in the primary antibody (Table 2), appropriate fluorescent secondary antibodies were used.

Adjacent sections from the series obtained from the brain of P6, P20 and P30 wt and hyh mice, and whole mounts from the lateral ventricles of P14 and P20 hyh mice were processed for double immunofluorescence. This procedure allowed the same brain regions to be analysed with a series of antibodies. For further details, see the Supplementary data.

#### Intracerebroventricular injections of horseradish peroxidase

Wt and hyh mice (Table 1) were anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (Sigma, 0.8  $\mu$ g/g body weight). Wt and

hyh mice were subperfused into the left lateral ventricle for 5 min with 1  $\mu$ l (P3), 1.5  $\mu$ l (P8), 2  $\mu$ l (P14) and 2.5  $\mu$ l (P30) of 3 % horseradish peroxidase (HRP) type IV (Sigma) in 0.9 % sodium chloride. The coordinates for injection in wt and hyh mice at different ages were previously calculated using injections with trypan blue. After the infusion, the needle remained at the injection site for an additional 15 min. The brains were processed to trace HRP at the light microscope. The brains were dissected out, fixed by immersion with Bouin fixative for 72 h, embedded in paraffin and serially sectioned. The sections were processed for the immunoperoxidase method using an anti-HRP antibody raised in rabbit in our laboratory. Adjacent sections were immunostained for GFAP.

To trace HRP with the electron microscope, wt and hyh mice at P3 and P30 (Table 1) were injected with the tracer into the left lateral ventricle, as described above. Five minutes after the injection, the animals were transcardially perfused with phosphate buffer containing 2 % paraformaldehyde and 2.5 % glutaraldehyde. Vibratome sections, 50- $\mu$ m thick, were obtained and processed for the histochemical detection of HRP using DAB as the electron donor. The sections were postfixated in 1 % osmium tetroxide (Merck, Darmstadt, Germany) and flat embedded in Araldite 502. Ultrathin sections (60-nm thickness) were stained with lead citrate and studied under an electron microscope.

#### Lanthanum nitrate tracing at the electron microscope

To demonstrate the presence or absence of tight junctions in the ependymal and astrocyte barriers, lanthanum nitrate was used as a tracer under electron microscope [39, 48]. Wt and hyh mice (Table 1) were anesthetized and transcardially perfused with 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, and the brains were dissected out and immersed in fresh fixative for 1 h. After fixation, 2 % lanthanum nitrate in cacodylate buffer, pH 7.8, was delivered over 2 min into one of the lateral ventricles, the cerebral aqueduct or the fourth ventricle. The brains were further fixed in fresh fixative for 24 h at 4 °C. The walls of the cerebral aqueduct, the lateral, third and fourth ventricles, and the choroid plexus were dissected out and postfixated in 1 % osmium tetroxide in cacodylate buffer for 1 h at 4 °C. The tissue blocks were dehydrated and embedded in Araldite 502 (EMS, Hatfield, PA, USA). Ultrathin sections (60-nm thickness) were slightly stained with uranyl acetate and studied under an electron microscope (Philips CM100). The blood–brain barrier at the choroid plexus and the endothelial cells of the brain capillaries (presence of tight junctions) were used as controls.

#### Scanning electron microscopy

Killed hyh mice (Table 1) were used. Cold 2.5 % glutaraldehyde in phosphate buffer was injected into a lateral ventricle for 2 min. The brains were further fixed by immersion in the same fixative for 2 h at room temperature. Several areas of the ventricular cavities were dissected out and processed as previously described [30].

#### Data analysis

Morphometric, densitometric and image analyses were carried out to quantify several parameters. (1) The relative optic density of aquaporin 4 immunoreaction in ependymal cells, astrocyte cell bodies and perivascular endfeet of astrocytes was estimated. (2) The total area occupied by the early endosomal compartment (EEA-1 immunoreactivity) in ependymal cells or astrocytes was quantified. (3) The cell density of GFAP+ astrocytes at specific sites of the abnormal ventricles was estimated using whole mounts of ventricular walls of four hyh P20 mice processed for immunofluorescence for GFAP. (4) The degree of penetration of intraventricularly injected HRP into the brain parenchyma was estimated in sections immunostained using anti-HRP. See Supplementary data for a description of the procedures.

#### Results

In the description that follows, the morphological phenotype and the barrier properties of the multiciliated ependyma of wt mice will be compared with those of the multiciliated ependyma of hyh mice resisting denudation [41] and, of particular interest for the present study, with those of the astrocyte layer covering the denuded ventricular regions of the hyh mice. Most of this study were carried out at stages from P6 on, when the denudation process and the astrocyte reaction are completed [41] and a severe progressive hydrocephalus develops (Supplementary Fig. 1). After P6, most of the ventricular surface, with the exception of some specific sites, underwent denudation (Supplementary Fig. 2). The denudation sites resisting denudation are the circumventricular organs, the roof of the third ventricle, the roof of the middle region of the cerebral aqueduct and small patches consistently present at very specific sites of the aqueduct and lateral ventricles (Supplementary Fig. 2). All denuded areas presented periventricular astrocyte reactions. However, the description of the results will principally circumscribe to events occurring in the fourth and lateral ventricles. In hyh mice, the lateral ventricles are enormously expanded, whereas the fourth ventricle is not. However, both cavities undergo

ependymal denudation and astrocyte reaction, indicating that such processes are associated with the genetic defect of these mice and not with the ventriculomegaly or increased intraventricular pressure. Therefore, it seemed relevant to compare the properties of the astrocytes lining the denuded areas in the fourth and lateral ventricles.

#### Cytoskeletal proteins in multiciliated ependyma and astrocytes covering the ventricular walls of wt and hyh mice

In mature wt mice, the multiciliated ependyma formed a single cell layer that was readily recognized by the expression of the S100 $\beta$  protein (Fig. 1a, e), tubulin  $\beta$ IV (Fig. 1f) and the intermediate filament protein vimentin (Fig. 1h). The ciliated ependyma did not express GFAP (Fig. 1g).

In mature hyh mice, most of the ventricular surface lacked ependyma due to its disruption during development (Fig. 1b, d) [29, 41]. Nevertheless, multiciliated ependymal cells that resisted denudation remained in situ as small patches that were consistently located at specific sites of the ventricular walls (Fig. 1b, d) [29, 41, 65]. In the areas lacking ependyma, astrocytes formed a glial layer that covered the denuded ventricular surface. These cells lacked cilia (Fig. 1j) and expressed the intermediate filament proteins GFAP (Fig. 1k, o, p) and vimentin (Fig. 1l).

#### Junction proteins in multiciliated ependyma and astrocytes lining the ventricular walls of wt and hyh mice

The junction protein N-cadherin was present at the lateral plasma membrane forming a continuous belt around the apical cell pole of the multiciliated ependymal cells of wt and hyh mice (Fig. 2d). However, the layer of reactive astrocytes covering the denuded areas did not express N-cadherin (Fig. 2e).

The multiciliated ependymal cells of wt and hyh mice express connexin 43. This junction protein appeared as supranuclear granules and slender patches (possibly connexons) at the lateral plasma membrane (Fig. 2a, b). In the reactive astrocytes layer, connexin 43 appeared as granules throughout the cytoplasm (Fig. 2c). The older astrocyte layer of P30 mice apparently expressed more connexin 43 than did the P6 mice.

#### Molecules implicated in transport mechanisms in multiciliated ependyma and astrocytes covering the ventricular walls of wt and hyh mice

In wt mice, the water channel protein aquaporin 4 was detected in the latero-basal cell domains, and less

intensively in the apical domain, of the ependymal cells (Fig. 3a) and in the perivascular endfeet of the astrocytes. Aquaporin 4 was not detected in the cell bodies of the astrocytes. In contrast, in the hyh mouse, aquaporin 4 was found throughout the cell body and in the processes of the astrocytes covering the ependymal-denuded areas (Fig. 3c; Supplementary Fig. 3), as well as in the perivascular endfeet of the parenchymal astrocytes (Fig. 3b). Densitometric analysis showed that in hyh mice, the reactive astrocytes covering the ependyma-denuded surfaces presented a small but significant increase in immunoreactive aquaporin 4 with respect to the ependyma of wt mice (Fig. 3d).

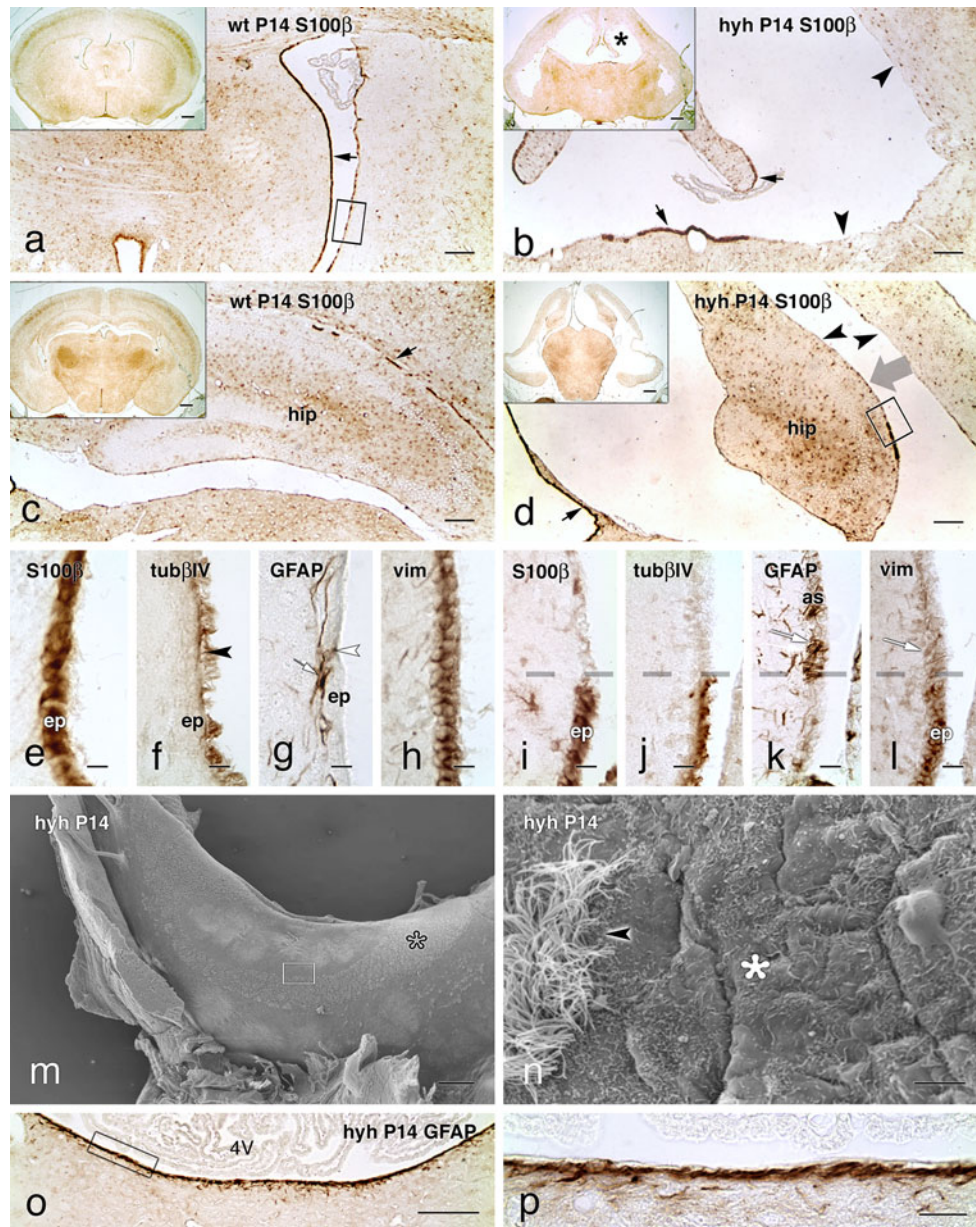
The lateral ventricles of human hydrocephalic foetuses displayed large areas of ependymal denudation that clearly contrasted with those still lined by ciliated ependymal cells (cf. [18]; Fig. 3e–g). The denuded areas were covered by a layer of astrocyte cell bodies and processes (Fig. 3g). In the ependyma, aquaporin 4 outlined the cell profile (Fig. 3h). In the astrocytes, the water channel was present in the cell body and the processes (Fig. 3i, j).

The glucose transporter GLUT1 was weakly expressed in the multiciliated ependyma lining the fourth ventricle of P6 wt mice (Fig. 3k). It was not detectable in the ependyma of P30 wt mice or in the astrocytes covering the ependyma-denuded areas (Fig. 3l). In contrast, the immunoreaction was strong in the endothelial cells of wt and hyh mice (Fig. 3k, l).

The protein caveolin-1 labelled caveolae in a dotted pattern at the plasma membrane and cytoplasm of the multiciliated ependyma of mice (Fig. 3m, n) and of human foetuses (Fig. 3q). Caveolin-1 was detected throughout the cell body and the processes of astrocytes covering the ependyma-denuded areas in hyh mice (Fig. 3o, p) and in human hydrocephalic foetuses (Fig. 3r). This finding is in contrast with the poor or absent immunoreaction found in parenchymal astrocytes.

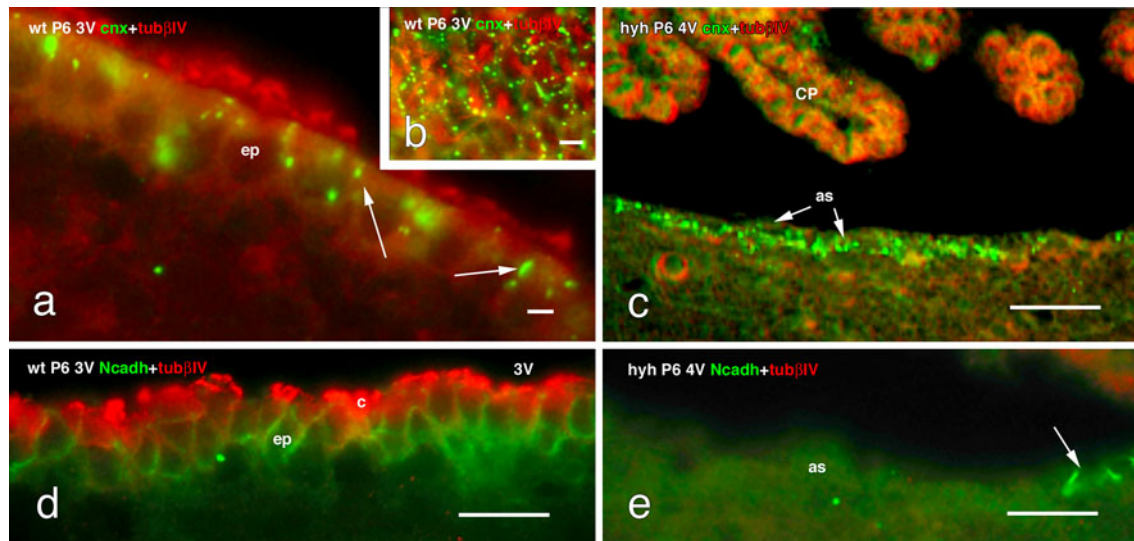
#### Endocytosis in multiciliated ependyma and in the astrocyte layer lining the ependyma-denuded regions of hyh mice

Early endosomes, immunodetected by the presence of the EEA1 antigen, were present in the apical juxtannuclear domain of the multiciliated ependymal cells of wt and hyh mice (Fig. 4a, d). The trans-Golgi network was detected in the supranuclear region below the layer of the early endosomes (Fig. 4b). HRP administered in vivo into the lateral ventricle of wt and hyh mice was traced with the electron microscope. In both the normal ependyma of wt mice and the denudation-resistant ependyma of hyh mice, HRP was visualized within small endocytic vesicles and in large irregular compartments that corresponded to early endosomes (Fig. 4c; Supplementary Fig. 4).



**Fig. 1** Expression of S100 $\beta$  and cytoskeleton proteins in the ependymal cells and astrocytes covering the ventricular surface of wt and hyh mice at P14. Frontal sections of the telencephalon and fourth ventricle (4V) of wt (**a, c, e–h**) and hyh (**b, d, i–l, o, p**) mice immunostained for S100 $\beta$  protein, tubulin  $\beta$ IV (tub $\beta$ IV), GFAP and vimentin (vim). **a–d** The ependyma (*ep*) contains S100 $\beta$  protein (*black arrows*). In the hyh mice, the lateral ventricles are enlarged (*black asterisk*) and most of their surface is devoid of ependyma (*black arrowheads*). The *thick grey arrow* in **d** indicates the direction at which the area framed is shown under the scanning microscope as shown below in this panel. **e–h** Adjacent sections of an area similar to that framed in **a**. Tub $\beta$ IV is present in ependymal cilia (*black arrowhead* in **f**). In the wt mouse, GFAP $^{+}$  astrocytes (*as*) lying in the subependymal (*white arrow*; in **g**) and ependymal (*white arrowhead*;

in **g**) region are observed. **i–l** Adjacent sections of an area similar to that framed in **d** bordering the hippocampus. The *broken line* in **i–l** denotes the border between an ependymal patch resisting denudation (*bottom*) and the astrocyte layer covering the denuded surface (*top*). Reactive astrocytes are GFAP $^{+}$  and vim $^{+}$  (*white arrows*; in **k, l**). **m, n** Scanning electron microscopy of the hippocampus surface overlooking the lateral ventricle (for orientation, see *thick arrow* in **d**). A patch of ciliated ependyma partially covers the ventricle surface (*open asterisk*; in **m**). **n** A detailed view of the framed area in **m**, showing the border between the ependyma (*arrowhead*) and the astrocyte layer (*asterisk*). The area in the fourth ventricle in **o** is shown in **p**. A robust layer of GFAP $^{+}$  astrocytes lines the floor of the denuded ventricle. *Scale bars a–d* 150  $\mu$ m, **e–l** 10  $\mu$ m, **m** 300  $\mu$ m, **n** 5  $\mu$ m, **o** 20  $\mu$ m, **p** 200  $\mu$ m; *insets in a–d* 500  $\mu$ m



**Fig. 2** Expression of junction proteins in the cell lining the floor of the fourth ventricle of wt and hyh mice at P6. **a–c** Double immunofluorescence for tubulin  $\beta$ IV (*tub $\beta$ IV*, red) and connexin 43 (*cnx*, green). **a** The multiciliated ependyma (*ep*) in wt mice present *cnx*+ spots localized preferentially at the apical cell pole of ependymal cells (*arrows*). **b** Tangential section through the apical cell poles of the ependyma showing the distribution of *cnx* as *dots* in the lateral plasma membrane. **c** The astrocyte layer (*as*) lining the

denuded ventricle in the hyh mouse expresses *cnx* (*arrow*) but not *tub $\beta$ IV*. **d, e** Double immunofluorescence for *tub $\beta$ IV* (red) and N-cadherin (*Ncadh*, green). **d** The ependyma in wt mice shows the belt-like distribution of *Ncadh*. **e** The astrocytes lining the denuded ventricles do not express *Ncadh*. *Arrow* points to a few ependymal cells remaining in situ and expressing *Ncadh*. 3V third ventricle, 4V fourth ventricle, *c* cilia, CP choroid plexus. Scale bars **a** 6  $\mu$ m, **b** 8  $\mu$ m, **c** 40  $\mu$ m, **d** 12  $\mu$ m, **e** 12  $\mu$ m

At variance with the parenchymal astrocytes, the astrocytes covering the ependyma-denuded areas of hyh mice displayed numerous EEA1-positive endosomes scattered throughout the cell body and processes (Fig. 4d, f). In these astrocytes, the cytoplasm area occupied by the early endosomes was not significantly different from that of the ependymal cells of wt mice (Fig. 4e); the trans-Golgi network was located in a cytoplasmic region that was close to the ventricle (Supplementary Fig. 5) and along the processes (Fig. 4g). HRP administered in vivo to hyh mice was incorporated into small endocytic vesicles and early endosomes of astrocytes covering denuded areas (Fig. 4j, k; Supplementary Fig. 4).

The ependyma of the lateral ventricles of human hydrocephalic foetuses displayed a strong EEA1 immunoreactivity in the supranuclear cytoplasm (Fig. 4h). The cell body and processes of the astrocytes lining the adjacent denuded areas were strongly reactive with anti-EEA1 (Fig. 4i).

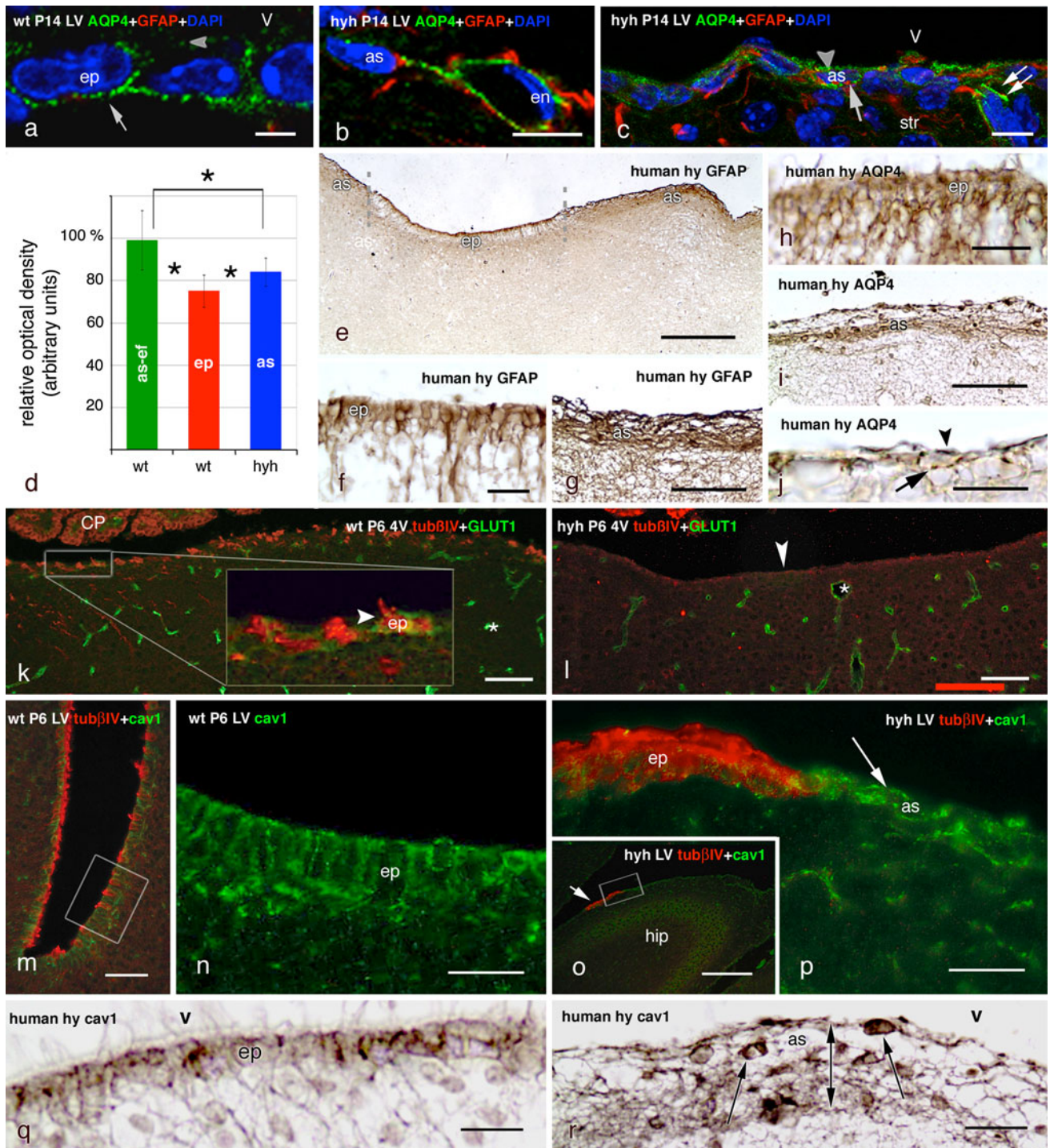
Paracellular routes of transport in ependyma of wt mice and astrocytes covering ependyma-denuded areas in hyh mice

On electron microscope, the lateral plasma membranes of neighbouring ependymal cells were found to be extensively

interdigitated (Fig. 5a; Supplementary Fig. 4) and joined together by adherents and gap junctions; tight junctions were missing. Lanthanum applied to the ventricular surface penetrated through the labyrinth of extracellular spaces, filled the intercellular space of the underlying neuropile and labelled the basement membrane of the capillaries and the intercellular space of the endothelium up to the tight junctions joining the endothelial cells (Supplementary Fig. 5). Lanthanum tracing further supported the absence of tight junctions at the multiciliated ependymal lining.

Electron microscope analysis revealed that astrocytes projected into the ventricle numerous, irregularly shaped, microvilli; cilia were missing (Figs. 1m, n, 5b). These cells displayed numerous sheet-like processes that interdigitated extensively with those of adjacent cells, forming a dense subventricular network of astrocyte processes (Fig. 5b; see Supplementary Fig. 5) that was readily visualized with GFAP immunocytochemistry (Fig. 1k, p). The surface astrocytes were joined together by gap junctions (Fig. 5b) and lacked zonula adherens and tight junctions (Fig. 5b; Supplementary Figs. 4 and 5).

In hyh mice, the astrocyte layer covering the denuded brain ventricles showed regional differences. The astrocytes formed a cell layer with varying degrees of tightness that ranged from loose to compact. In the latero-medial wall of the lateral ventricles lining the hippocampus and



striatum (Figs. 1k, 6a, b, g), the third ventricle, the ventral wall of the cerebral aqueduct and the fourth ventricle (Fig. 1o, p), the denuded surface was lined by densely packed astrocytes. In other denuded areas, such as those of the dorsal and external walls of the lateral ventricles, reactive astrocytes were arranged as a loose cell layer (Fig. 6c–e). The different degrees of cell density of the

astrocyte assembled at the denuded areas became most evident in whole mount preparations of different ventricular regions immunostained for GFAP (Fig. 6a–d) and used for a densitometric analysis (Fig. 6f). This study led to identify three types of astrocyte arrangements: (1) compact, characterized by a continuous layer of tightly packed astrocytes (Figs. 1o, p, 2c, 4b, 6a, b); (2) loose, recognized

**Fig. 3** Expression of aquaporin 4, the glucose transporter 1 (GLUT1) and caveolin-1 in the ependyma of wt mice and in the astrocyte layer that covers the ependymal-denuded surface in hyh mice and a human hydrocephalic foetus. **a** Immunolabelling for aquaporin 4 (*AQP4*, green) in the ependyma (*ep*) of the lateral ventricle (*LV*) of a wt mouse; DAPI counterstaining (blue). The water channel is mainly located in the baso-lateral plasma membrane domain (arrow), but there is also a weak reaction at the apical domain (arrowhead). **b, c** Latero-medial wall of a hyh mouse with double immunofluorescence for GFAP (red), AQP4 (green) and DAPI counterstaining (blue). AQP4 immunoreaction is present in a perivascular astrocyte (*as*) and its endfeet surrounding endothelial (*en*) cells (**b**). Reactive astrocytes present AQP4 at the apical (arrowhead) and basal (arrow) cytoplasm and in their cell processes (double arrow) (**c**). **d** Optical density of the immunoreaction for AQP4 was recorded at (1) the ependyma (*ep*) of the latero-medial wall of the lateral ventricles of wt mice; (2) the cell layer of reactive astrocytes lining denuded areas of the latero-medial wall of the lateral ventricles of hyh mice (*as*); (3) the perivascular endfeet of the astrocytes (*as-ef*) of wt mice. Data represent the mean and standard deviation from four wt and four hyh mice (3–4 sections each mouse; four neighbour areas from each section). Data are expressed as relative percentage of the values obtained in each section where the mean of *as-ef* in wt mice was considered to be 100%. \*Correlation analysis showed significant differences ( $p < 0.001$ , Student's *t* test). **e–j** Lateral ventricle of a 40-week-old human hydrocephalic foetus. Immunostaining for GFAP (**e–g**) and AQP4 (**h–j**). **e** Low power view showing ependyma not yet disrupted (*ep*) and denuded areas lined by a layer of GFAP+ astrocytes (*as*). These two regions are shown at higher magnification in **f** and **g**. The ependyma (**h**) and the astrocyte layer (**i, j**) express AQP4. **k, l** Fourth ventricle (*4V*) with double immunofluorescence for tubulin  $\beta$ IV (*tub $\beta$ IV*, red) and GLUT1 (green). Endothelial cells (asterisks) are reactive to GLUT1. **k** The inset shows a weak reaction for GLUT1 in the ependyma lining the floor of the fourth ventricle of a P6 wt mouse. **l** The astrocyte layer lining the denuded floor of the fourth ventricle of hyh mice does not express GLUT1. **m** Lateral ventricle of a wt P6 mouse. Double immunofluorescence for tubulin  $\beta$ IV (red) and caveolin-1 (*cav1*, green). The framed area is shown in **n** using only the *cav1* channel. **n** Detailed view of area framed in **m**, showing the strong expression of *cav1* in the multiciliated ependyma of the lateral ventricle. **o** Wall of the lateral ventricle close to the hippocampus (*hip*) of a P6 hyh mouse. Double immunofluorescence for tubulin  $\beta$ IV (red) and *cav1* (green). The walls are denuded with the exception of a tubulin+ resistant ependymal patch (arrow). The area framed is shown in **p**. **p** Astrocytes lining the denuded areas of the lateral ventricle strongly express *cav1* (arrow). The patch of ependyma is strongly labelled for tubulin  $\beta$ IV (red), whereas the astrocyte layer is not. **q, r** Lateral ventricle of a 40-week-old hydrocephalic human foetus. Section adjacent to that shown in **f** and **g**, immunostained for *cav1*. The cell body of ependymal cells contains immunoreactive granules (**q**). The cell body (arrows) and processes of the astrocytes forming the thick cell layer lining denuded areas (double-ended arrow) are immunoreactive (**r**). *CP* choroid plexus, *V* ventricle lumen. Scale bars **a** 5  $\mu$ m, **b, c** 10  $\mu$ m, **e** 200  $\mu$ m, **f, h, j** 20  $\mu$ m, **g** 50  $\mu$ m, **i** 50  $\mu$ m, **k, o** 100  $\mu$ m, **l** 80  $\mu$ m, **m** 40  $\mu$ m, **n, p** 20  $\mu$ m

by a continuous layer of astrocytes separated by wide intercellular spaces (Fig. 6c–e); (3) very loose, characterized by a discontinuous layer of astrocytes (Fig. 6c, inset).

The barrier property, in terms of paracellular permeability, for these different types of astrocyte arrangements located at distinct regions of the ventricular system was

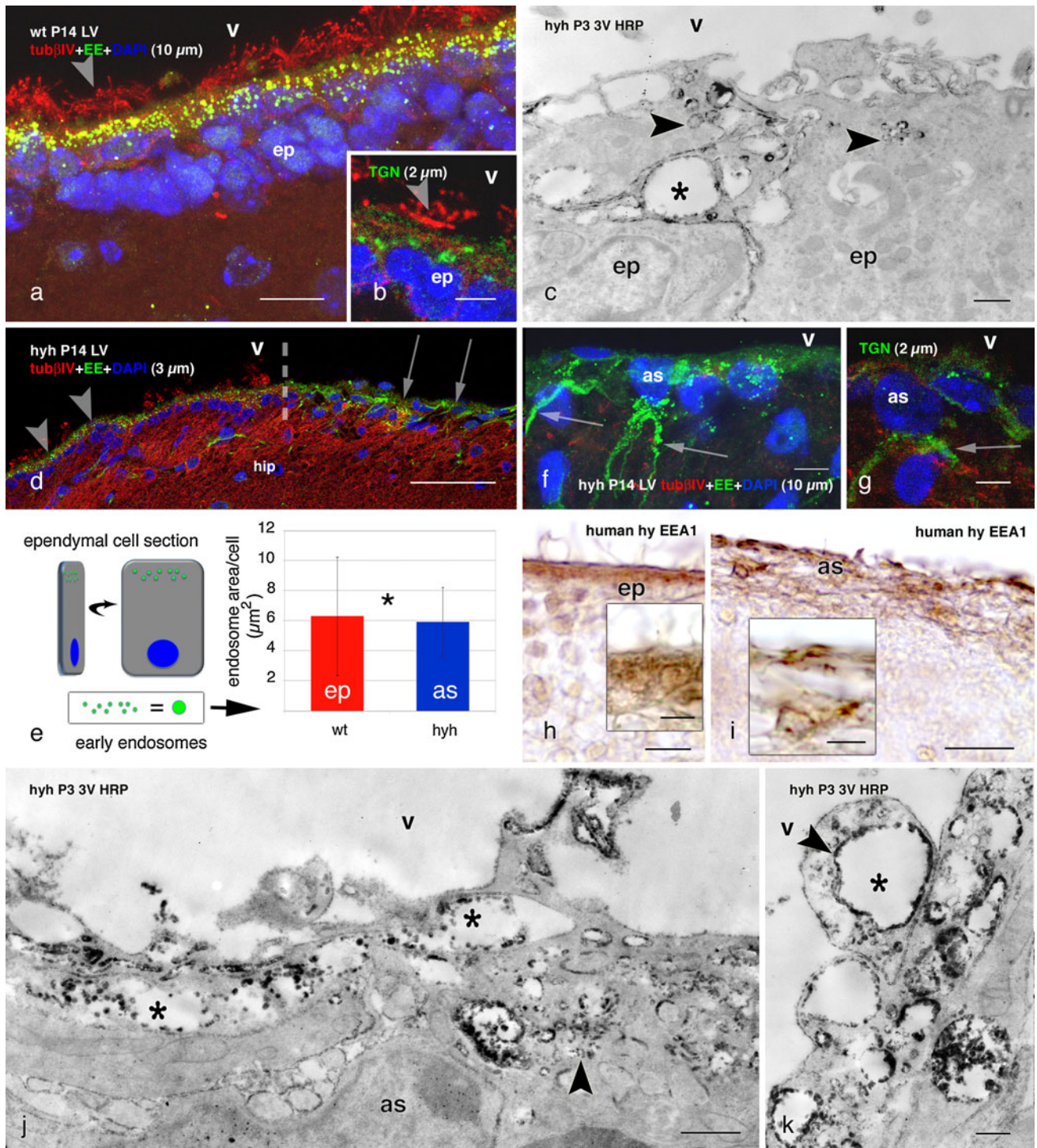
tested by in vivo administration of HRP. Five minutes after HRP injection into a lateral ventricle of hyh mice, the tracer was incorporated by the dense astrocytic layer and penetrated about 20  $\mu$ m into the underlying neuropile, resembling the barrier property of the neighbouring patch of multiciliated ependyma (Fig. 6h–l). In the areas that displayed loosely arranged astrocytes, HRP penetrated about 90  $\mu$ m into the brain parenchyma (Fig. 6g, h), indicating a rather free movement of HRP at this level.

## Discussion

In hyh hydrocephalic mice, there is a programme of neuroepithelium/ependyma denudation starting early in foetal life and ending by the end of the first postnatal week; the missing ependyma is replaced by a layer of astrocytes forming a new interface between the CSF and the brain parenchyma [29, 41, 65]. This phenomenon has also been described in human hydrocephalic fetuses [18, 53, 55]. The present study, carried out in hyh mice and human cases, has revealed that the new surface layer of astrocytes shares some phenotypic and functional features with the ependyma [summarized in Table 3], suggesting that such a unique astrocyte reaction may represent an attempt to re-establish some lost functions at the brain parenchyma–CSF interface.

The astrocytes covering the denuded ventricular walls of hydrocephalic hyh mice form a new cell layer with a cell organization that resembles the ependyma

The astrocytes found at the denuded ventricular walls form a new cell layer that in several aspects resembles the ependyma; i.e. it expresses vimentin, lacks tight junctions, displays connexin 43-based gap junctions, projects numerous microvilli to the ventricle and displays numerous lateral interdigitations that result in a winding intercellular space (Fig. 7). The existence of gap junctions between ependymal cells has been widely demonstrated [6, 8, 9, 21, 28], and they are believed to play a role in the synchronization of cilia beating [50, 55]. Their functional significance in the astrocyte layer is unknown; they could be associated with electrical and metabolic activities, the determination of cell phenotype [45], or the clearance of cytotoxic molecules and the spreading of neuroprotective factors that takes place in brain injuries, ischaemia and hypoxia [27, 33, 37, 51, 58, 60]. Whatever the functional significance of the gap junctions connecting the astrocytes covering the denuded ventricular surface, it may be suggested that these cells are coupled to play a function as a CSF–brain barrier involved in water and solute transport (Fig. 7).



The ependyma and the astrocyte cell layer present active endocytic mechanisms

Ependymal cells incorporate CSF proteins into the pinocytotic-lysosome pathway [14]. The multiciliated ependyma of wt mice and the denudation-resistant ependyma of hyh

mice express caveolin-1, which is in agreement with the expression of EEA1 antigen, a reliable marker of early endosomes, in these cells (present report). Early endosomes are dynamic cell compartments that are involved in endocytosis and sorting mechanisms [32, 67]. Caveolin-1 is a protein that is present in caveolae, structures that play a



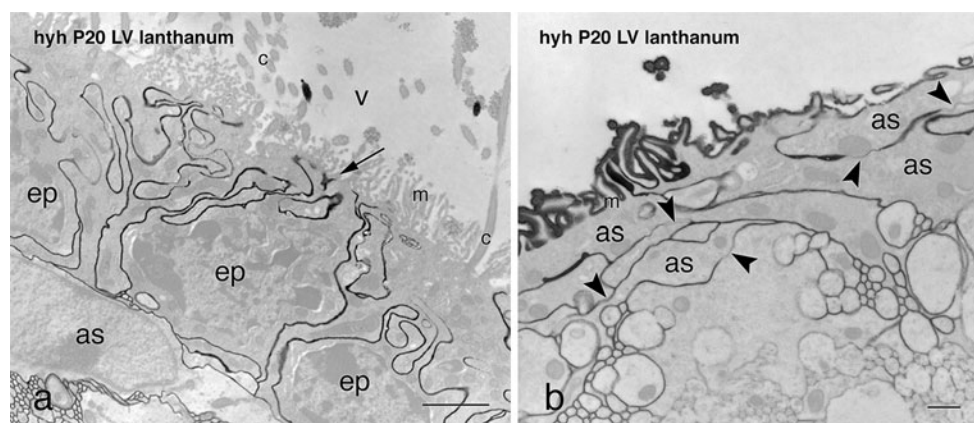
**Fig. 4** Endocytosis of HRP injected in vivo into the lateral ventricle of wt and hyh mice, and location of endocytic vesicles, early endosomes and the Golgi apparatus. Lateral ventricle of wt (**a, b**) and hyh (**d, f, g**) mice, at P14. Confocal laser microscopy of immunolabelling for the EEA1 antigen of early endosomes (EE, green in **a, d, f**), the trans-Golgi network (TGN, green in **b, g**) and tubulin  $\beta$ IV (tub $\beta$ IV, red). DAPI nuclear staining (blue). Z-projections comprising confocal planes for different thicknesses (between brackets). Numerous EE are present in the apical pole (arrowheads in **a, d**) of the ependymal cells (ep) in wt and hyh mice. The broken line in **d** shows the border between a patch of intact ependyma (arrowheads) and the astrocyte layer covering an ependyma-denuded surface (arrows) in the hippocampus (hip). The TGN in ependymal cells is located juxtannuclear (arrowhead in **b**). In the astrocytes (as) covering the ependyma-denuded surface of hyh mice (arrows in **d**), abundant EE and TGN are present in the cell bodies and processes (arrows in **f** and **g**). **e** Total area occupied by EEA1-reactive EE per ependymal cell of wt mice and per reactive astrocyte (as) of hyh mice in confocal laser cuts of frozen sections (explanation on the left side of the figure). Data represent the mean and standard deviation obtained from sections corresponding to four wt and four hyh mice (4 sections each mouse). \*Correlation analysis did not show a significant difference ( $p = 0.695$ , Student's  $t$  test). **c, j, k** Ultrastructural detection in the third ventricle (3V) wall of HRP injected into a lateral ventricle at P3 in wt mice (**c**) and hyh mice (**h, i**). In the apical pole of ependymal cells and in astrocytes, HRP is located within endocytic vesicles (arrowheads) and large EE (asterisks). **h, i** Lateral ventricle of a 40-week-old human hydrocephalic foetus. Section adjacent to that shown in Fig. 3f, g, immunostained for EEA1. The cell body of ependymal cells (ep) contains immunoreactive granules (**h**). The cell body and processes of the astrocytes forming the thick cells layer lining denuded areas are immunoreactive (**i**). LV lateral ventricle, str striatum, V ventricle lumen. Scale bars **a** 10  $\mu$ m, **b, g** 5  $\mu$ m, **c, j** 400 nm, **d** 50  $\mu$ m, **f** 7  $\mu$ m, **h, i** 20  $\mu$ m; Insets in **h, i** 10  $\mu$ m, **k** 200 nm

role in endocytosis and transcytosis [20, 23]; caveolin is also present in both the ependyma [44, 50, present report] and the reactive astrocytes [present study]. Although most

cargo that is endocytosed via caveolae is fluid, certain compounds enter into caveolae via specific receptors [62]. The presence of caveolae in the ependyma is in agreement with the known capacity of ependymal cells to incorporate tracer molecules present in the CSF [8, 10]. In the reactive astrocytes, caveolae can play a similar role, which is in agreement with the existence of endocytosis and sorting mechanisms [32, 67], which have also been experimentally tested in the present study by injecting HRP into the CSF of living mice. At variance with the ependyma, the non-polarized distribution of caveolae and endosomes in the reactive astrocytes indicate that they can incorporate fluid and substances not only from the ventricle but also from the parenchymal fluid (Fig. 7).

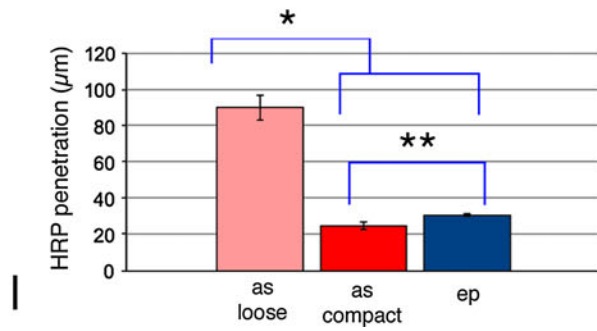
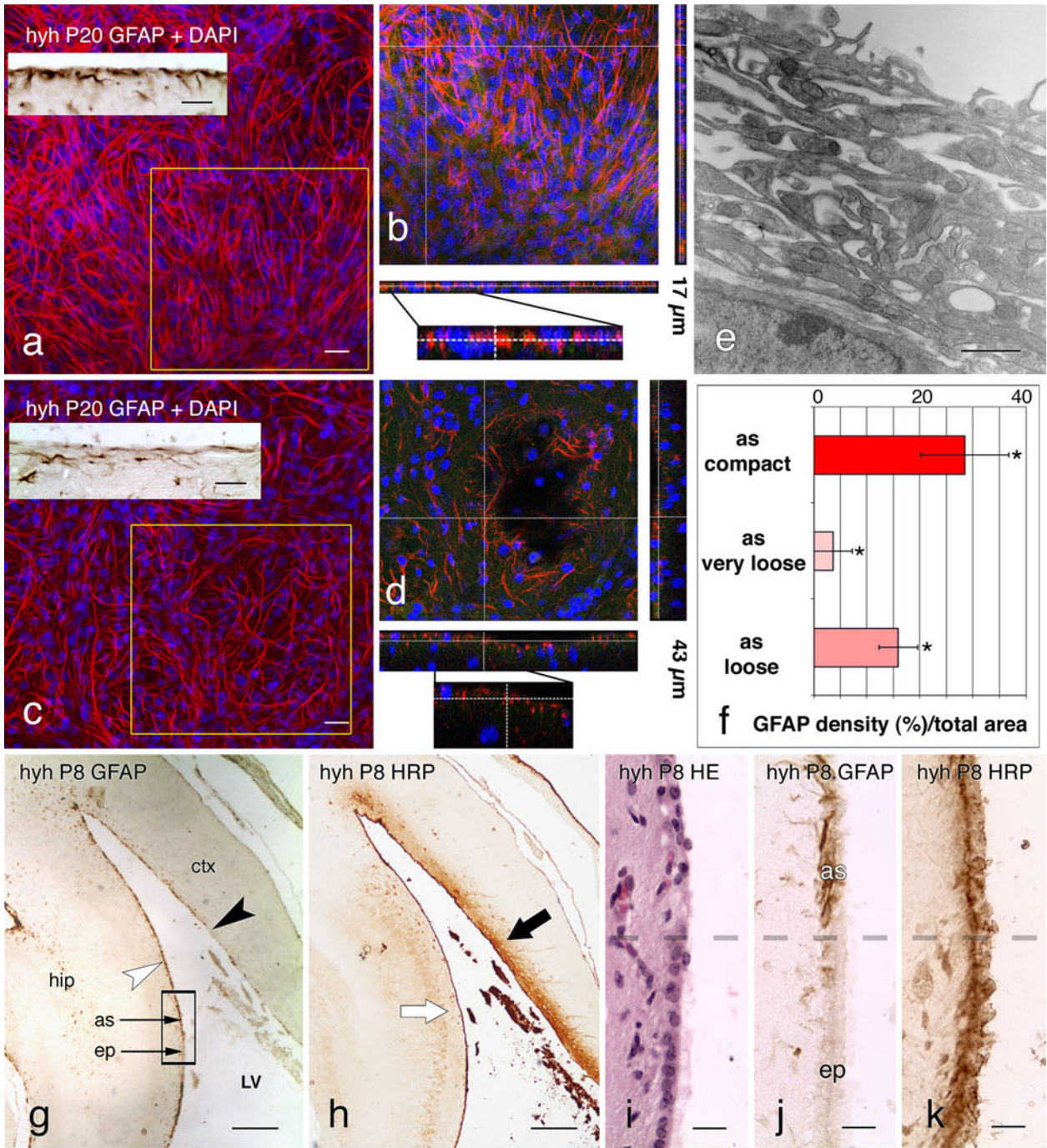
**Role of the expression of the water channel protein aquaporin 4 in the ependyma and in the new astrocyte cell barrier**

Aquaporin 4 is a water channel with marked prevalence in periventricular areas [63]. In the ependymal cells, it is located in the latero-basal domains [46, present report] and, less extensively, in the apical domain (present report). In parenchymal astrocytes, it is mostly found in the vascular endfeet [46, present report]. At variance, reactive astrocytes lining the denuded ependyma in hydrocephalic mice and human foetuses overexpress aquaporin 4, and this protein is found throughout the cell body and processes (Fig. 7). The presence of aquaporin 4 in parenchymal reactive astrocytes has been proposed to be involved in the water entry to astrocytes in initial stages of oedema formation [38] to re-establish the osmotic equilibrium [64]. The periventricular reaction found in the present report,



**Fig. 5** Ultrastructural detection of lanthanum nitrate applied into the lateral ventricle of a P20 hyh mouse. **a** Lanthanum penetrates from the ventricular lumen (V, arrow) towards the brain parenchyma through the winding extracellular spaces of the denudation-resistant, ciliated ependyma (ep). **b** In the astrocytic layer (as) lining the

denuded ventricular surface of a hyh mouse, the tracer penetrates through the extracellular spaces and bypasses the gap junctions joining the astrocytes (arrowheads). **c** cilia, LV lateral ventricle, **m** microvilli. Scale bars **a** 2  $\mu$ m, **b** 500 nm



**Fig. 6** Tightness and permeability of the layer of astrocytes lining different denuded regions of the lateral ventricle of hyh mice. **a–d** Hyh mice at P20. Surface views obtained from whole mount preparations of ventricular walls processed for GFAP (red) immunofluorescence and DAPI nuclear staining. The astrocyte cell density in the latero-medial wall of the lateral ventricle (**a, b**) is much higher than that of the latero-external wall of the lateral ventricle (**c, d**; for orientation, see **g**). **b, d** 1  $\mu\text{m}$  confocal planes of the areas framed in **a** and **b** displaying pseudo 3D reconstructions (17  $\mu\text{m}$  in **b**, 43  $\mu\text{m}$  in **d**) bring out the differential arrangement of the astrocytes. *Insets* in **a, c** immunocytochemistry for GFAP in sections of similar areas. **e** Ultrastructure of the latero-external wall of a lateral ventricle of a hyh mouse at P20 showing the loose organization of astrocytes. **f** Measurement of astrocyte (*as*) cell densities using whole mount preparations of regions of the lateral ventricle displaying compact (latero-medial wall, see **a**), loose (see **c**) or very loose (latero-external walls) arrangements of astrocytes. Data represent mean and standard deviation of the percentage of the area occupied by the GFAP-immunoreactive profiles with respect to the total area. Data were collected from four hyh mice, four with whole mounts/mouse/each location. \*Correlation analysis showed significant differences between the three types of astrocyte organization ( $p < 0.001$ , Student's *t* test). **g** Frontal section through the telencephalon of a hyh mouse at P8 immunostained for GFAP. The latero-medial wall of the lateral ventricle is covered by an astrocytic layer (*as*; white arrowhead) and a few patches of ependyma (*ep*). The area framed is shown in **i–k**. The latero-external wall of the lateral ventricle contains a discontinuous astrocytic layer and scattered ependymal cells (black arrowhead). **h** Adjacent section to that shown in **g**, immunostained using anti-HRP to visualize the HRP injected in vivo into a lateral ventricle. In the latero-medial wall of the ventricle, the tracer is incorporated equally by the layer of astrocytes and the patch of ependyma (white arrow). In the latero-external wall of the ventricle, HRP penetrates deeply into the brain parenchyma (black arrow). **i–k** Adjacent serial sections through an area similar to that framed in **g**, including a patch of ependyma lying close to a denuded area lined by an astrocytic layer. The broken line points to the border between both areas. Haematoxylin–eosin staining (**i**), anti-GFAP (**j**) and anti-HRP (**k**) immunolabelling. The astrocyte layer and the ependymal patch incorporate HRP following a similar pattern. **l** Measurement of the penetration of intraventricularly injected HRP into the brain parenchyma at three different regions of the lateral ventricles: with ependyma (**j, k**), compact layer of reactive astrocyte (white arrow/arrowhead in **g, h**) and loose layer of astrocytes (black arrow/arrowhead in **g, h**). Data represent mean and standard deviations from four hyh P8 mice (4 measurements in 3–4 sections from each mouse). \*The correlation analysis showed a significant difference between the degree of penetration of HRP through the loose astrocyte layer and that of the other two regions ( $p < 0.001$ , Student's *t* test). \*\*There was not a significant difference between the data from the penetration through the astrocyte compact organization and the ependyma in the hippocampus of hyh mice ( $p = 1.119$ , Student's *t* test). *ctx* cerebral cortex, *hip* hippocampus, *LV* lateral ventricle. Scale bars **a, c insets** in **a** and **c** 20  $\mu\text{m}$ , **e** 1  $\mu\text{m}$ , **g, h** 200  $\mu\text{m}$ , **i–k** 20  $\mu\text{m}$

both in mice and humans, could represent an attempt to re-establish the equilibrium between the ventricular and parenchymal fluids, or to help CSF transport from ventricles to brain capillaries (Fig. 7). Ependymal aquaporin 4 has been proposed to play a protective role in hydrocephalus by allowing for the transependymal re-absorption of

CSF into brain capillaries [56]. The presence of aquaporin 4 in the apical plasma membrane of ependymal cells supports this possibility. It appears that aquaporin 4 may have a relevant role in hydrocephalus and be a useful therapeutic target [34, 54; reviewed by 40, 42, 56].

The astrocyte layer and the ependyma present similar paracellular routes of transport

The multiciliated ependyma is an epithelial-like layer interposed between the CSF and the brain parenchyma. Although it does not behave like a tight barrier [8, 9], it seems to regulate the transport of ions, small molecules and water [12, 66]. Tight junctions are absent or poorly developed in the mature multiciliated ependyma [8, 12]. Lanthanum nitrate injected into the ventricle of wt and hyh mice further proves that the extracellular spaces of both, the ependyma and astrocyte cell layer, are not sealed (Fig. 7). Furthermore, the ependymal and glial barriers responded similarly to the in vivo intraventricular injection of HRP; the tracer moved through the intercellular space of both barriers and penetrated only a few micrometres into the underlying neuropile, suggesting that both barriers somehow limited the amount of HRP moving from the CSF to the brain parenchyma. This possibility is supported by the finding that HRP penetrated deeply into the brain parenchyma in the regions of the ventricular walls with a poorly developed astrocyte cell layer.

Different and distinct regions of the denuded ventricular walls trigger different astrocyte reactions that lead to glial layers with different degrees of cell density and tightness. What are the signals mediating these different responses? In hyh mice, ependymal denudation takes place at prenatal stages prior to detectable hydrocephalus [30]. Therefore, intraventricular pressure or expanding ventricles cannot be considered to be responsible for the absence of ependyma in these mice. Similarly, the periventricular astrocyte reaction appears shortly after denudation, when astrogliogenesis takes place but at a stage when ventriculomegaly is just starting to develop. Furthermore, the most robust astrocyte layer is that lining the denuded floor of the fourth ventricle, a cavity displaying no dilatation. The mechanism underlying the formation of the astrocyte layer replacing the lost ependyma is not known. Is the actual absence of the ependyma, or the direct exposure of the neuropile to the CSF, or a mechanical effect of the expanding ventricles involved? Are there different physiopathological consequences for brain regions protected by a new and compact layer of astrocytes and those close to a ventricular wall lined by a loose and highly permeable layer of astrocytes? These are open questions for future investigations.

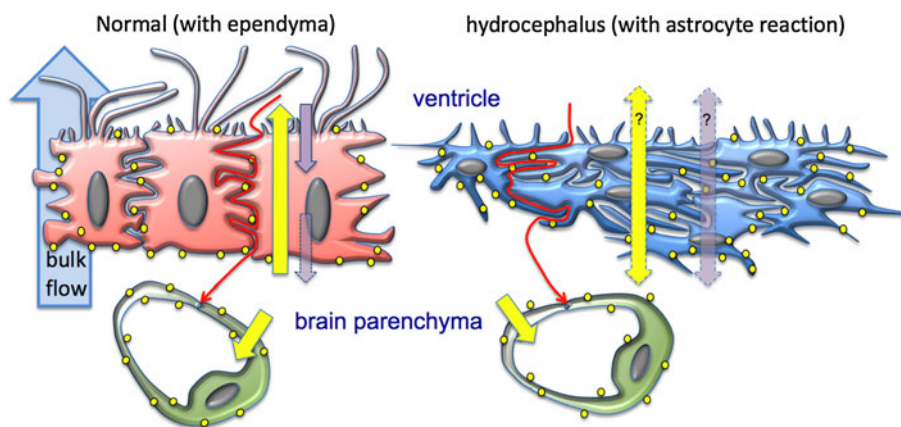
**Table 3** Summary of results displaying the presence (+) or absence (–) of the structural and functional markers in the hyh mouse

	Cytoskeleton	Gap junctions (connexin 43)	Adherens junctions (N-cadherin)	Microvilli	Glucose transport (GLUT1)	Water transport (aquaporin 4)	Endocytosis/transcytosis (caveolae containing caveolin 1)	Endocytosis/transcytosis (endosomes containing EEA1 antigen)	Endocytosis/transcytosis (HRP uptake)	Absence of tight junctions/paracellular permeability (lanthanum tracing)
Ependyma	(GFAP) <sup>a</sup> Vimentin	+	+	+	± <sup>b</sup>	+	+	+	+	+
Cell layer of reactive astrocytes	GFAP, vimentin	+	–	+	–	+	+	+	+	+

Findings in bold have been also obtained in human foetuses

<sup>a</sup> At variance with mouse ependyma, the ependyma of human foetus is reactive with anti-GFAP

<sup>b</sup> GLUT1 is only present in immature ependymal cells



**Fig. 7** Schematic representation of the transcellular and paracellular transport mechanisms that would operate at the ependyma and the layer of reactive astrocytes. In the ependymal cells of wt mice (*left*), most of the aquaporin 4 (*yellow dots*) is located at the basolateral domains (some is found at the apical domain), suggesting that the ependyma transports water from the brain parenchyma (*bottom*) towards the ventricular CSF (*upper*) (*yellow arrow* across the ependyma). There are pinocytotic processes and transcytosis directed in the opposite direction through this barrier (*purple arrow*). In hyh mouse (*right*), a layer of reactive astrocytes cover the ependyma-

denuded surfaces. These cells express aquaporin 4 throughout the cell body and processes (*yellow dots*) and could be involved in water transport from or to the CSF (*double-headed yellow arrow*). The pinocytotic processes in the astrocytes could also operate in both directions (*double head purple arrows*). In addition, as in the normal situation, parenchymal astrocytes together with the endothelial cells would be involved in an aquaporin 4-mediated transport towards the brain capillaries. Both barriers would transport molecules from the CSF to the brain parenchyma through a paracellular route (*winding red arrows*)

**Acknowledgments** The authors wish to thank Dr. Conrad Johanson for critical reading of the manuscript and David Navas, Gregorio Martín, Adolfo Martínez and Manuela Vega from the University of Malaga (Spain), Raquel Ruiz from CESUR (Malaga, Spain) and Genaro Alvia from Austral University of Chile for their valuable technical support. Supported by Grants PS09/0376 from Instituto de Salud Carlos III (Spain) and PCI2006-A/-0669 from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) to AJJ, and 1070241 and 1111018 from Fondecyt (Chile) to EMR.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

## References

1. Abouhamed M, Grobe K, San IV et al (2009) Myosin IXa regulates epithelial differentiation and its deficiency results in hydrocephalus. *Mol Biol Cell* 20:5074–5085
2. Baas D, Meinzel A, Benadiba C et al (2006) A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells. *Eur J Neurosci* 24:1020–1030
3. Banizs B, Pike MM, Millican CL et al (2005) Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development* 132:5329–5339
4. Bátis LF, Jiménez A, Guerra M et al (2011) New ependymal cells are originated postnatally in discrete regions of the mouse brain

- and support ventricular enlargement in hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 121:721–735
5. Bátiz LF, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez LM et al (2009) A simple PCR-based genotyping method for M105I mutation of alpha-SNAP enhances the study of early pathological changes in hyh phenotype. *Mol Cell Probes* 23:281–290
  6. Bouillé C, Mesnil M, Barriere H, Gabrion J (1991) Gap junctional intercellular communication between cultured ependymal cells, revealed by lucifer yellow CH transfer and freeze-fracture. *Glia* 4:25–36
  7. Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M (1992) CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog Brain Res* 94:367–379
  8. Brightman MW (1965) The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. I. Ependymal distribution. *J Cell Biol* 26:99–123
  9. Brightman MW (1965) The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. II. Parenchymal distribution. *Am J Anat* 117:193–220
  10. Brightman MW (1968) The intracerebral movement of proteins injected into blood and cerebrospinal fluid of mice. *Prog Brain Res* 29:19–40
  11. Bronson RT, Lane PW (1990) Hydrocephalus with hop gait (hyh): a new mutation on chromosome 7 in the mouse. *Dev Brain Res* 54:131–136
  12. Bruni JE (1998) Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech* 41:2–13
  13. Chae TH, Kim S, Marz KE et al (2004) The hyh mutation uncovers roles for alpha Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet* 36:264–270
  14. Del Bigio MR (1995) Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:405–406
  15. Del Bigio MR (2000) Calcium-mediated proteolytic damage in white matter of hydrocephalic rats? *J Neuropathol Exp Neurol* 59:946–954
  16. Del Bigio MR, Wilson MJ, Enno T (2003) Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. *Ann Neurol* 53:337–346
  17. Del Bigio MR, Zhang YW (1998) Cell death, axonal damage, and cell birth in the immature rat brain following induction of hydrocephalus. *Exp Neurol* 154:157–169
  18. Domínguez-Pinos MD, Páez P, Jiménez AJ et al (2005) Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:595–604
  19. Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes: implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54:15–36
  20. Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP (2003) Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1161–1168
  21. Gabrion JB, Herbuté S, Bouillé C et al (1998) Ependymal and choroidal cells in culture: characterization and functional differentiation. *Microsc Res Tech* 41:124–157
  22. Giaume C, Kirchhoff F, Matute C et al (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ* 14:1324–1335
  23. Gosens R, Mutawe M, Martin S et al (2008) Caveolae and caveolins in the respiratory system. *Curr Mol Med* 8:741–753
  24. Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML et al (1991) Astroglia in CNS injury. *Glia* 4:233–243
  25. Hong HK, Chakravarti A, Takahashi JS (2004) The gene for soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein alpha is mutated in hydrocephaly with hop gait (hyh) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(6):1748–1753
  26. Ibañez-Tallon I, Pagenstecher A, Fliegau M et al (2004) Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum Mol Genet* 13:2133–2141
  27. Jäderstad J, Brismar H, Herlenius E (2010) Hypoxic preconditioning increases gap-junctional graft and host communication. *NeuroReport* 21:1126–1132
  28. Jarvis CR, Andrew RD (1988) Correlated electrophysiology and morphology of the ependyma in rat hypothalamus. *J Neurosci* 8:3691–3702
  29. Jiménez AJ, García-Verdugo JM, González CA et al (2009) Disruption of the neurogenic niche in the subventricular zone of postnatal hydrocephalic hyh mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:1006–1020
  30. Jiménez AJ, Tomé M, Páez P et al (2001) A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1105–1119
  31. Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM et al (2008) Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* 5:10
  32. Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol* 25:99–112
  33. Lin JH, Weigel H, Cotrina ML et al (1998) Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci* 1:494–500
  34. Mao X, Enno TL, Del Bigio MR (2006) Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus. *Eur J Neurosci* 23:2929–2936
  35. McAllister JP, Miller JM (2010) Minocycline inhibits glial proliferation in the H-Tx rat model of congenital hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 7:7
  36. Miller JM, McAllister JP (2007) Reduction of astrogliosis and microgliosis by cerebrospinal fluid shunting in experimental hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 4:5
  37. Nakase T, Yoshida Y, Nagata K (2006) Enhanced connexin 43 immunoreactivity in penumbral areas in the human brain following ischemia. *Glia* 54:369–375
  38. Nase G, Helm PJ, Enger R, Ottersen OP (2008) Water entry into astrocytes during brain edema formation. *Glia* 56:895–902
  39. Nilsson H, Dragomir A, Ahlander A et al (2006) A modified technique for the impregnation of lanthanum tracer to study the integrity of tight junctions on cells grown on a permeable substrate. *Microsc Res Tech* 69:776–783
  40. Owlser BK, Pitham T, Wang D (2010) Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 7:15
  41. Páez P, Bátiz LF, Roales-Buján R et al (2007) Patterned neuropathologic events occurring in hyh congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:1082–1092
  42. Paul L, Madan M, Rammling M et al (2011) Expression of aquaporin 1 and 4 in congenital hydrocephalus rat model. *Neurosurgery* 68:462–473
  43. Pérez-Figares JM, Jiménez AJ, Rodríguez EM et al (2001) Sub-commissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc Res Tech* 52:591–607
  44. Peruzzo B, Pastor FE, Blázquez JL et al (2004) Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat. *Cell Tissue Res* 317:147–164
  45. Ransom BR, Ye ZC (2005) Gap junctions and hemichannels. In: Kettenmann H, Ransom BR (eds) *Neuroglia*. Oxford University Press, New York, pp 177–189
  46. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS et al (1998) Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11981–11986
  47. Renault-Mihara F, Okada S, Shibata S et al (2008) Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes migration. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1649–1653

48. Revel JP, Karnovsky MJ (1967) Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 33:C7–C12
49. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A et al (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570–577
50. Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M (2010) The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 31:757–776
51. Rouach N, Avignone E, Mème W et al (2002) Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94:457–475
52. Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T et al (2002) RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15194–15199
53. Sarnat HB (1995) Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:1–15
54. Shen XQ, Miyajima M, Ogino I et al (2006) Expression of the water-channel protein aquaporin 4 in the H-Tx rat: possible compensatory role in spontaneously arrested hydrocephalus. *J Neurosurg* 105:459–464
55. Sival DA, Guerra M, den Dunnen WF et al (2011) Neuroependymal denudation is in progress in full-term human foetal spina bifida aperta. *Brain Pathol* 21:163–179
56. Skjolding AD, Rowland IJ, Sjøgaard LV et al (2010) Hydrocephalus induces dynamic spatiotemporal regulation of aquaporin-4 expression in the rat brain. *Cerebrospinal Fluid Res* 7:20
57. Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC et al (1999) Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. *Exp Neurol* 155:109–117
58. Sofroniew MV (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 11:400–407
59. Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7–35
60. Talhouk RS, Zeinieh MP, Mikati MA, El-Sabban ME (2008) Gap junctional intercellular communication in hypoxia–ischemia-induced neuronal injury. *Prog Neurobiol* 84:57–76
61. Tissir F, Qu Y, Montcouquiol M et al (2010) Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat Neurosci* 13:700–707
62. Tuma PL, Hubbard AL (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* 83:871–932
63. Venero JL, Vizuete ML, Machado A, Cano J (2001) Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 63:321–336
64. Vizuete ML, Venero JL, Vargas C et al (1999) Differential upregulation of aquaporin-4 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema. *Neurobiol Dis* 6:245–258
65. Wagner C, Batiz LF, Rodríguez S et al (2003) Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1019–1040
66. Wang HW, Amin MS, El-Shahat E et al (2010) Effects of central sodium on epithelial sodium channels in rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R222–R233
67. Weisz OA, Rodriguez-Boulan E (2009) Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci* 122:4253–4266
68. Worthington WC Jr, Cathcart RS (1963) Ependymal cilia: distribution and activity in the adult human brain. *Science* 139:221–222
69. Yamadori T, Nara K (1979) The directions of ciliary beat on the wall of the lateral ventricle and the currents of the cerebrospinal fluid in the brain ventricles. *Scan Electron Microsc* 3:335–340

Jiménez AJ, Rodríguez-Pérez LM, Domínguez-Pinos MD, Gómez-Roldán MC, García-Bonilla M, Ho-Plagaro A, Roales-Buján R, Jiménez S, Roquero-Mañueco MC, Martínez-León MI, García-Martín ML, Cifuentes M, Ros B, Arráez MÁ, Vitorica J, Gutiérrez A, Pérez-Fígares JM. (2014) Increased levels of tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) but not transforming growth factor-beta 1 (TGF $\beta$ 1) are associated with the severity of congenital hydrocephalus in the hyh mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 40(7):911-32. doi: 10.1111/nan.12115.





# Increased levels of tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) but not transforming growth factor-beta 1 (TGF $\beta$ 1) are associated with the severity of congenital hydrocephalus in the hyh mouse

A.-J. Jiménez\*, L.-M. Rodríguez-Pérez\*, M.-D. Domínguez-Pinos\*, M.-C. Gómez-Roldán\*, M. García-Bonilla\*, A. Ho-Plagaro\*, R. Roales-Buján\*, S. Jiménez†‡, M.-C. Roquero-Mañueco\*, M.-I. Martínez-León§, M.-L. García-Martín¶, M. Cifuentes\*, B. Ros\*\*, M.-Á. Arráez\*\*, J. Vitorica†‡, A. Gutiérrez\*‡ and J.-M. Pérez-Fígares\*

\*Department of Cell Biology, Genetics, and Physiology, Faculty of Sciences, University of Malaga, Malaga,

†Department of Biochemistry and Cell Biology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Sevilla, ‡Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, §Neurodiagnostic Section, Department of Paediatric Radiology, University Regional Hospital Carlos Haya, Malaga, ¶Nanoimaging Unit, Bionand, Malaga, and \*\*Paediatric Neurosurgery Section, Department of Neurosurgery, University Regional Hospital Carlos Haya, Malaga, Spain

A.-J. Jiménez, L.-M. Rodríguez-Pérez, M.-D. Domínguez-Pinos, M.-C. Gómez-Roldán, M. García-Bonilla, A. Ho-Plagaro, R. Roales-Buján, S. Jiménez, M.-C. Roquero-Mañueco, M.-I. Martínez-León, M.-L. García-Martín, M. Cifuentes, B. Ros, M.-Á. Arráez, J. Vitorica, A. Gutiérrez and J.-M. Pérez-Fígares (2014) *Neuropathology and Applied Neurobiology* 40, 911–932

## Increased levels of tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) but not transforming growth factor-beta 1 (TGF $\beta$ 1) are associated with the severity of congenital hydrocephalus in the hyh mouse

**Aims:** Here, we tested the hypothesis that glial responses via the production of cytokines such as transforming growth factor-beta 1 (TGF $\beta$ 1) and tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), which play important roles in neurodegenerative diseases, are correlated with the severity of congenital hydrocephalus in the hyh mouse model. We also searched for evidence of this association in human cases of primary hydrocephalus. **Methods:** Hyh mice, which exhibit either severe or compensated long-lasting forms of hydrocephalus, were examined and compared with wild-type mice. TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$  and TNF $\alpha$ R1 mRNA levels were quantified using real-time PCR. TNF $\alpha$  and TNF $\alpha$ R1 were immunolocalized in the brain tissues of hyh mice and four hydrocephalic human foetuses relative to astroglial and microglial reactions. **Results:** The TGF $\beta$ 1 mRNA levels were not significantly different between hyh

mice exhibiting severe or compensated hydrocephalus and normal mice. In contrast, severely hydrocephalic mice exhibited four- and two-fold increases in the mean levels of TNF $\alpha$  and TNF $\alpha$ R1, respectively, compared with normal mice. In the hyh mouse, TNF $\alpha$  and TNF $\alpha$ R1 immunoreactivity was preferentially detected in astrocytes that form a particular periventricular reaction characteristic of hydrocephalus. However, these proteins were rarely detected in microglia, which did not appear to be activated. TNF $\alpha$  immunoreactivity was also detected in the glial reaction in the small group of human foetuses exhibiting hydrocephalus that were examined. **Conclusions:** In the hyh mouse model of congenital hydrocephalus, TNF $\alpha$  and TNF $\alpha$ R1 appear to be associated with the severity of the disease, probably mediating the astrocyte reaction, neurodegenerative processes and ischaemia.

Keywords: biomarkers, congenital hydrocephalus, microglia, reactive astrocyte, TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$

Correspondence: Antonio-J Jiménez, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos, Universidad de Málaga, E-29071-Málaga, Spain. Tel: +34 952 133 343; Fax: +34 952 132 000; E-mail: ajjimenez@uma.es

© 2013 British Neuropathological Society

911

## Introduction

Tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) is a multifunctional cytokine that exerts a wide range of pleiotropic effects, such as proliferative responses to inflammation, mediation of immune responses and cell death [1]. Thus, TNF $\alpha$  plays a critical role in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases [2,3], including multiple sclerosis [4–6], Parkinson's disease and Alzheimer's disease [7–9]. TNF $\alpha$  has two active forms: one is a transmembrane signalling molecule with juxtacrine action [10] and the other is a soluble cytokine [1]. The soluble form is derived from the proteolytic cleavage of the transmembrane form [11]. The activities of the two forms of TNF $\alpha$  are mediated through two different receptors: TNF $\alpha$ R1 (p55) and TNF $\alpha$ R2 (p75). Whereas the transmembrane form of TNF $\alpha$  activates both TNF $\alpha$ R1 and TNF $\alpha$ R2, the soluble form of TNF $\alpha$  primarily functions via binding to TNF $\alpha$ R1 [12,13]. The soluble form of TNF $\alpha$  can induce a pro-inflammatory or cytotoxic effect, inducing cell death through two different signalling pathways mediated by the TNF $\alpha$ R1 receptor [1,14]. However, TNF $\alpha$  can perform dual roles and can be either neurotoxic or neuroprotective in a concentration-dependent manner [15]. These dual roles have also been linked with the activated receptor types [16]. In neural tissue, TNF $\alpha$  is produced by microglia, astrocytes, neurones and infiltrating immune cells [5,17–23], where it activates astrocytic and microglial responses [24,25].

Transforming growth factor-beta 1 (TGF $\beta$ 1) plays a protective role in neuropathologies [26]. It has been reported to be able to promote axonal regeneration in the hippocampus *in vitro* [27], and it protects hippocampal neurones after global cerebral ischaemia [28], where TGF $\beta$ 1 has been reported to be secreted by microglia [29,30].

The *hyh* mutant (hydrocephalus with hop gait) [31] mouse is an animal model that exhibits congenital hydrocephalus and develops neuropathological events [32,33], which has made this model valuable for the study of the disease. One of the advantages of this model is that it enables the design of clinical studies in populations of animals with an identical genetic background [34] because the mutation displays a 100% penetrance [35]. Bátiz *et al.* [34] have reported the existence of different forms of the evolution of hydrocephalus in *hyh* mice. Although most *hyh* mice die within a month after developing a severe form of hydrocephalus, 30% of *hyh* mice

develop a long lasting and compensated form of the disease and are able to survive longer.

Here, we have investigated the possible relationship between expression of two different cytokines with pro-inflammatory and neuroprotective properties, TNF $\alpha$  and TGF $\beta$ 1, and congenital hydrocephalus. *Hyh* mice with both the severe and long-lasting evolutionary forms of congenital hydrocephalus, as well as human foetuses, were examined in the present investigation. The information obtained could provide insight into the pathophysiology and prognosis of hydrocephalus and could facilitate the development of novel pharmacological therapeutic strategies for the disease.

## Materials and methods

### Animals

Mutant *hyh* mice (hydrocephalus with hop gait, B6C3Fe-a/a-*hyh*/J strain) and their control littermate wild-type (wt) mice were used. Mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and were bred in the Animal Experimentation Service of the University of Malaga. The housing, handling, care and processing of the animals were conducted in accordance with European and Spanish laws (DC 86/609/CEE and RD 1201/2005) and followed the regulations approved by the Council of the American Physiological Society. Wt and mutant *hyh* male mice were used and identified by clinical inspection and genotyping [35]. Animals at 4, 7, 30, 90 and 180 (P4–P180) days of age were sacrificed, using cervical dislocation for RT-PCR (P30, P90 and P180 mice) or anaesthetization with Doletal (sodium pentobarbital; Vétoquinol, Lure, France; intraperitoneal administration, 0.2 mg/g bodyweight) for immunocytochemistry/immunofluorescence processing (P4, P7, P30 and P90 mice). For magnetic resonance (MR) studies, P7, P30 and P90 mice were anaesthetized with 1–2% isoflurane in oxygen at 1 l/min.

### Human foetuses

Paraffin sections (5–10  $\mu$ m thick) of brains necropsies were obtained from four foetuses that exhibited primary hydrocephalus associated with cerebral malformation ( $n = 1$ ; 30 weeks of gestation), non-immune hydrops foetalis (Noonan) ( $n = 1$ ; 36 weeks of gestation), Potter IIB

syndrome and associated hydrocephalus ( $n = 1$ ; 40 weeks of gestation) or Dandy-Walker syndrome ( $n = 1$ ; 40 weeks of gestation). Necropsy specimens from three other foetuses without any neuropathological indications were chosen as controls and included one case each of Potter syndrome without neuropathologies ( $n = 1$ ; 21 weeks of gestation), placental abruption ( $n = 1$ ; 29 weeks of gestation) and anoxia ( $n = 1$ ; 33 weeks of gestation). Foetuses were obtained between 1991 and the present date by induced abortion with a clinical prescription and according to national laws and regulations. The brains of the foetuses were originally obtained for diagnostic purposes with parental consent at the Carlos Haya Hospital (Malaga, Spain) and were fixed in 5% formalin. The medical ethics committee approved their use and study in accordance with Spanish legislation (Data Protection Act, BOE 298, 15/1999; Biomedical Research Act, BOE 159, 14/2007; Regulation of the Use of Samples of Human Origin for Biomedical Research Act, BOE 290, RD1716/2011).

### MR imaging

The MR imaging experiments were performed using a 9.4T Biospec 94/20 USR (Bruker, Billerica, MA, USA) small animal system equipped with 440 mT/m gradients. Body temperature and respiratory frequency were monitored in the anaesthetized animals throughout the experiment. The protocol consisted of a high-resolution T2-weighted RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) sequence with fat suppression, 3D FISP (Fast Imaging with Steady Precession) and volumetric T1-weighted multi-slice-multi-echo sequence with water and fat suppression. Sequence parameters were set as follows. T2-weighted: TR = 2.5 s; effective TE = 32 ms; echo train length = 6; 4 averages; matrix size =  $512 \times 512$ ; FOV =  $20 \times 20$  mm<sup>2</sup>; slice thickness = 0.75 mm. 3D FISP: TR = 8 ms, TE = 4 ms, matrix size =  $256 \times 256 \times 128$ ; resolution =  $78 \mu\text{m} \times 78 \mu\text{m} \times 156 \mu\text{m}$ . T1-weighted: TR = 500 ms; TE: 6.6 ms; matrix size =  $256 \times 256$ ; FOV =  $20 \times 20$  mm<sup>2</sup>. One wt mouse at P7, four wt mice at P30, one hyh mouse at P7, six hyh mice at P30 and six hyh mice at P90 were examined using these protocols. Some of the animals were injected with 5  $\mu\text{l}$  (wt mice) or 10  $\mu\text{l}$  (hyh mice) of 0.25 mmol/ml Gadovist (Bayer, Leverkusen, Germany) as a contrast agent at a rate of 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  into the lateral

ventricle (wt mice) or dorsal third ventricle (hyh mice). After the injection, the needle was maintained in the injection site for 2 min, and volumetric T1 images were obtained 10 and 20 min later.

### Immunocytochemistry and immunofluorescence

Wt and hyh mice at P4, P7, P30 and P90 (for each condition:  $n = 8-12$  at P4, P7 and P30, and  $n = 5$  at P90) were transcidentally perfused with either 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, or Bouin's fixative. Fixed brains were removed and post-fixed in the same solution for 24 h (paraformaldehyde, at 4°C) or 48–72 h (Bouin, at room temperature). Paraformaldehyde-fixed brains were cryoprotected in 30% sucrose to obtain frozen sections (40  $\mu\text{m}$  thick) that were later immunostained with a free-floating section-staining protocol. Bouin-fixed brains were embedded in paraffin, and 10- $\mu\text{m}$ -thick serial sections were obtained. Some of the paraffin sections were stained with haematoxylin-eosin. Primary antibodies were used against: TNF $\alpha$  (Abcam, Cambridge, UK, ab34719, rat monoclonal, 1:100 dilution; Abcam, ab1793, mouse monoclonal, 1:100 dilution; Sigma, St Louis, MO, USA, T8300, rabbit polyclonal antibody, 1:200 dilution); TNF $\alpha$ R1 (Sigma, SAB4502988, rabbit polyclonal, 1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA, USA, SC7895, rabbit polyclonal, 1:2000 dilution); GFAP (Sigma, G3893, mouse monoclonal, 1:1000 dilution); Iba1 (Wako, Chuo-ku, Osaka, Japan, 019-19741, rabbit polyclonal, 1:500 dilution), a marker of resting and activated microglia; vimentin (Sigma, V4630; goat polyclonal, 1:500 dilution); and tubulin  $\beta$ IV (Sigma, T7941, mouse monoclonal, 1:400 dilution).

For light microscopy of mouse and human paraffin sections, labelling with primary antibodies was visualized using appropriate secondary biotinylated antibodies, followed by ExtrAvidin-peroxidase (Sigma, 1:2000 dilution) using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) as the electron donor. Ammonium nickel sulphate was added to intensify the DAB reaction, which changed from brown to a dark blue colour. In the paraffin sections, heat-induced antigen retrieval was performed in 50 mM citrate buffer at pH 6.0 prior to immunolabelling.

For immunofluorescence in mouse frozen sections and human paraffin sections, Alexa Fluor 488 and 568 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA, 1:2000 dilution) conjugated secondary antibodies were used. Sections

intended for immunofluorescence were mounted in Vectashield (Dako, Glostrup, Denmark). Nuclear counterstaining was obtained using DAPI. In some sections, double immunostaining was performed, combining two primary antibodies. Serial 1- $\mu\text{m}$ -thick planes and projections in the Z-axis were imaged using a Leica SP5 II (Leica, Wetzlar, Germany) confocal microscope, and the images were processed using ImageJ software (NIH, USA). Micrographs for analysis were obtained under identical conditions.

For all immunostaining, antibodies were diluted in a 0.01 M phosphate saline buffer (PBS), pH 7.4, containing Triton-X100, bovine albumin and appropriate normal sera. Primary antibody incubations were performed at 22°C for 18 h or for 72 h at 4°C, and secondary antibody and ExtrAvidin incubations were performed for 1 h at room temperature. For negative controls, the omission of primary antibodies was used. Immunolabelling was always performed simultaneously and under identical conditions on sections corresponding to both wt mice and hyh mice of different disease severities. Experiments were repeated at least twice by different researchers, and the results were compared for their consistency.

### Tomato lectin histochemistry

Tomato lectin was used as a microglia marker, and strong staining identifies amoeboid microglial cells [36]. Paraffin sections were incubated with 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  biotinylated tomato lectin (*Lycopersicon esculentum*; Vector, Burlingame, CA, USA) in PBS for 1 h at 37°C. The sections were then processed using ExtrAvidin and DAB, as for immunocytochemistry.

### Retrotranscription and real-time PCR

The hippocampi of the right hemisphere of wt (P30,  $n = 18$ ; P90,  $n = 8$ ; P180,  $n = 2$ ) and hyh (P30,  $n = 13$ ; P90,  $n = 7$ ; P180,  $n = 2$ ) mice were quickly removed under cold conditions, frozen in dry ice and stored at  $-84^\circ\text{C}$ . Total RNA was extracted using the Tripure Isolation Reagent (Roche, Basel, Switzerland). Contaminating DNA was removed via incubation with DNAase (Sigma), and DNA removal was confirmed by the PCR analysis of total RNA prior to reverse transcription. The integrity of the RNA samples was assessed by agarose gel electrophoresis. The yield of total RNA was determined by measuring the absorbance at 260 nm of ethanol-precipitated aliquots of

the samples. The recovery of RNA was comparable between all groups. The protein pellets, obtained using the Tripure Isolation Reagent, were resuspended in 4% SDS and 8 M urea in 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, and rotated overnight at room temperature.

Retrotranscription was performed using random hexamers, 3  $\mu\text{g}$  of total RNA as the template and the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. For real-time RT-PCR, each specific gene product was amplified using commercial Taqman probes [20 $\times$  Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix: GAPDH, Ref. Mm99999915\_g1; TNF $\alpha$ , Ref. Mm00443258\_m1; TNF $\alpha$ R1, Ref. Mm00441875\_m1; and inducible nitric oxide synthase (iNOS), Ref. Mm00440485\_m1], following the instructions provided by the manufacturer (Applied Biosystems), and specific primers (TGF $\beta$ 1: UP 5'TGGAGCAACATGTGGAACCTC3', LO 5'CAGCAGCCGGTTACCAAG3'; and GFAP: UP 5'CTCCAACCTCCAGATCCGAG3', LO 5'TCTGACACGGA TTTGGTGTCC3'). For real-time detection and quantification, an ABI Prism 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems) was used. For each assay, a standard curve was first constructed, using increasing amounts of cDNA. In all cases, the slopes of the curves indicated optimal PCR conditions (slopes of 3.2–3.4). The mRNA levels of the different mice were determined using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeper gene. Amplification of the housekeeper gene was performed in parallel with the gene to be analysed. The results were normalized to GAPDH expression. The results were always expressed using the comparative Ct method, following the instructions from Applied Biosystems. As a control condition, we selected the P30 wt mouse. Consequently, the expression levels of all tested genes, for all ages and types of mice, were referenced against the expression levels detected in the P30 wt mouse.

### Flow cytometry

The hippocampi from both hemispheres of wt ( $n = 22$ ) and hyh ( $n = 17$ ) mice at P30 were quickly removed under cold conditions and converted into single-cell suspensions in PBS containing 0.1% Triton-X100 using a micropipette. The cells were pelleted after centrifugation and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. Following fixation, 200  $\mu\text{l}$  of the cell suspension was incu-

bated with mouse anti-GEAP (1:1000 dilution) or anti-Iba1 (1:1000 dilution) for 24 h at 4°C and then incubated with donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:1000 dilution) for 1 h at 4°C. All antibodies were diluted in PBS containing 0.05% Triton-X100. Researchers were blinded by using unlabelled tubes containing samples with or without secondary antibodies. Between 60 000 and 100 000 events were counted for each sample using a Dako Cytomation MoFlo cell sorter (Dako, Glostrup, Denmark). Each experiment was repeated at least twice, and the results were compared for consistency. This method allowed us to estimate the number of cell bodies and intensity of Iba1 microglial cell body immunolabelling in controls and under different hydrocephalic conditions.

### Data analyses

Statistical analyses and graphics were generated using KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA, USA) and Microsoft Excel 12.2.4 (Microsoft Corporation). A  $P < 0.05$  based on Student's  $t$ -test was considered statistically significant. When  $F$  probability from Student's  $t$ -test was  $< 0.05$  variance was considered to be unequal.

## Results

### Progressive morphological changes in hydrocephalic hyh mice brains

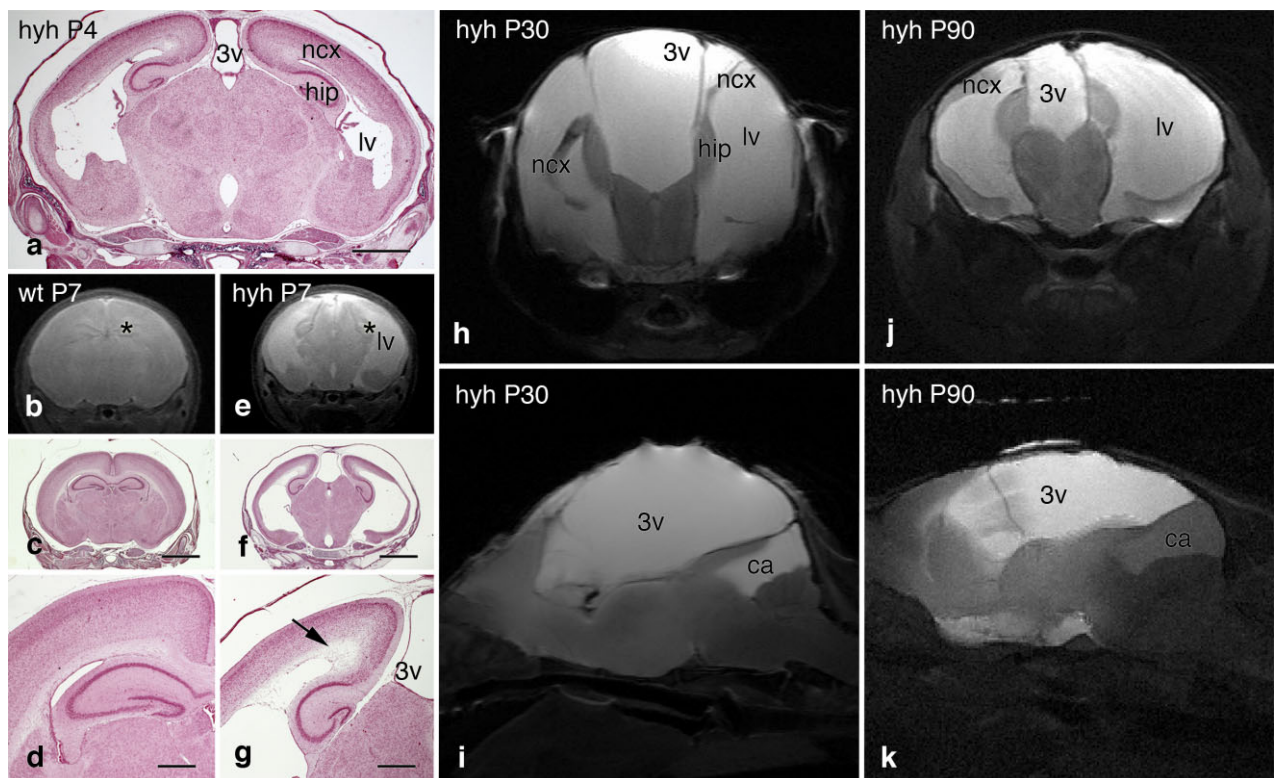
In almost all the mutant hyh mice, the pathology causing their deaths occurred approximately 20–40 days after birth, which is consistent with the results described by Bátiz *et al.* [34]. The mice used for the present study at P30 exhibited the severe form of the disease according to Bátiz *et al.* [34]. At that stage, most animals appeared to be seriously ill, and they were perceived as being susceptible to death within days. In contrast, a few male hyh mice were able to survive to 90 days (P90) and, in extremely rare cases, 180 days (P180) post-partum. Thus, while the very small numbers of hyh mice surviving to P180 caused the results involving these mice to lack statistical significance, they were nevertheless useful for confirming and strengthening the data from the hyh mice surviving to P90. The P90 and P180 mice, while displaying the symptoms described by Bronson and Lane [31], exhibited symptoms that did not appear to be critical, and these mice lacked macrocephaly, consistent with

the evidence described by Bátiz *et al.* [34]. The P90 and rare P180 mice used in this study were collected over a 4-year period and were considered to exhibit a compensated form of hydrocephalus.

In hyh mutant mice between 4 (P4) and 7 (P7) days of age, shortly after closure of the caudal cerebral aqueduct [37], hydrocephalus was found to become severe (Figure 1a), affecting the neocortex and hippocampus (Figure 1e–g). MR imaging (Figure 1h–k) was performed on a small number of mice to confirm the histological results. It was found that macrocephaly was more pronounced in most of the mice that exhibited the severe form of hydrocephalus (P30 mice in the present study). Histological and MR examinations revealed that the mice with severe hydrocephalus and macrocephaly (P30 hyh mice) exhibited a larger dilatation of the dorsal third ventricle and of the caudal cerebral aqueduct than mice that developed the long-lasting form of hydrocephalus lacking macrocephaly (P90 and P180 mice). Histological analysis of all hyh revealed periventricular oedema in the neocortex, as well as degeneration of the fibres of the external capsule, during the first week of life (Figure 1f,g; wt condition is shown in Figure 1b–d).

### The presence of periventricular astrocytic reactions in the hyh mouse

A characteristic periventricular astrocyte reaction, described previously [33,38,39], was detected covering the ventricle surfaces lacking an ependyma in the bulk of the ventricular system, including the alveus of the hippocampus (Figure 2b; compared with the wt mouse in Figure 2a). These cells appeared to be strongly GEAP immunoreactive (Figure 2b) and were also vimentin positive (not shown), strongly suggesting that the cells were mature reactive astrocytes, in accordance with previously published results [33]. The levels of GEAP mRNA in the hippocampus of hyh mice at P30 and P90 were quantified and were found to be at least two-fold greater than the levels detected in wt mice (Figure 2c). However, there were no significant differences detected between hyh mice at P30 and P90. The mature hippocampus was selected for mRNA quantification instead of the neocortex for two main reasons. First, the use of hippocampal tissue avoided any possible residual effects of the dramatic oedematous conditions and massive inflammation of the periventricular white matter that occurred during neocortical development [33]. Second, the improper



**Figure 1.** The development of hydrocephalus and ventricle enlargement in hyh mice. (a) A frontal section of a hyh mouse at P4 exhibiting mild enlargement of the lateral ventricles. (b, e) Frontal MR images at the level of the hippocampus (asterisks) of wt and hyh mice at P7. (c, d, f, g) Frontal sections stained with haematoxylin-eosin corresponding to the same wt (c, d) and hyh (f, g) mice at similar levels to those shown in b and e. d and g are detailed images of c and f respectively. The arrow in g indicates the oedematous periventricular region in the neocortex. (h–k) Frontal (h, j) and sagittal (i, k) images from hyh mice at P30 (h, i) and P90 (j, k). h and j are T2 MR images. i and k are T1 MR images at the midline level after the intraventricular injection of a contrast agent. Abbreviations: 3v, third ventricle; ca, dilated caudal cerebral aqueduct; hip, hippocampus; lv, lateral ventricle; ncx, neocortex. Scale bars: a, c, f, 1 mm; d, g, 500  $\mu$ m.

development of the neocortex [33] could provide less reliable results than the hippocampus.

#### hyh mice with different severities of hydrocephalus did not exhibit significant differences in TGF $\beta$ 1 mRNA expression

To examine whether TGF $\beta$ 1 could be related to the different magnitudes of hydrocephalus in the hyh mice, the mRNA levels of TGF $\beta$ 1 in the hippocampus were quantified. No significant differences in the levels of TGF $\beta$ 1 in the hippocampus were detected between hyh and wt mice at any age (P30, P90 and P180) examined (Figure 2d).

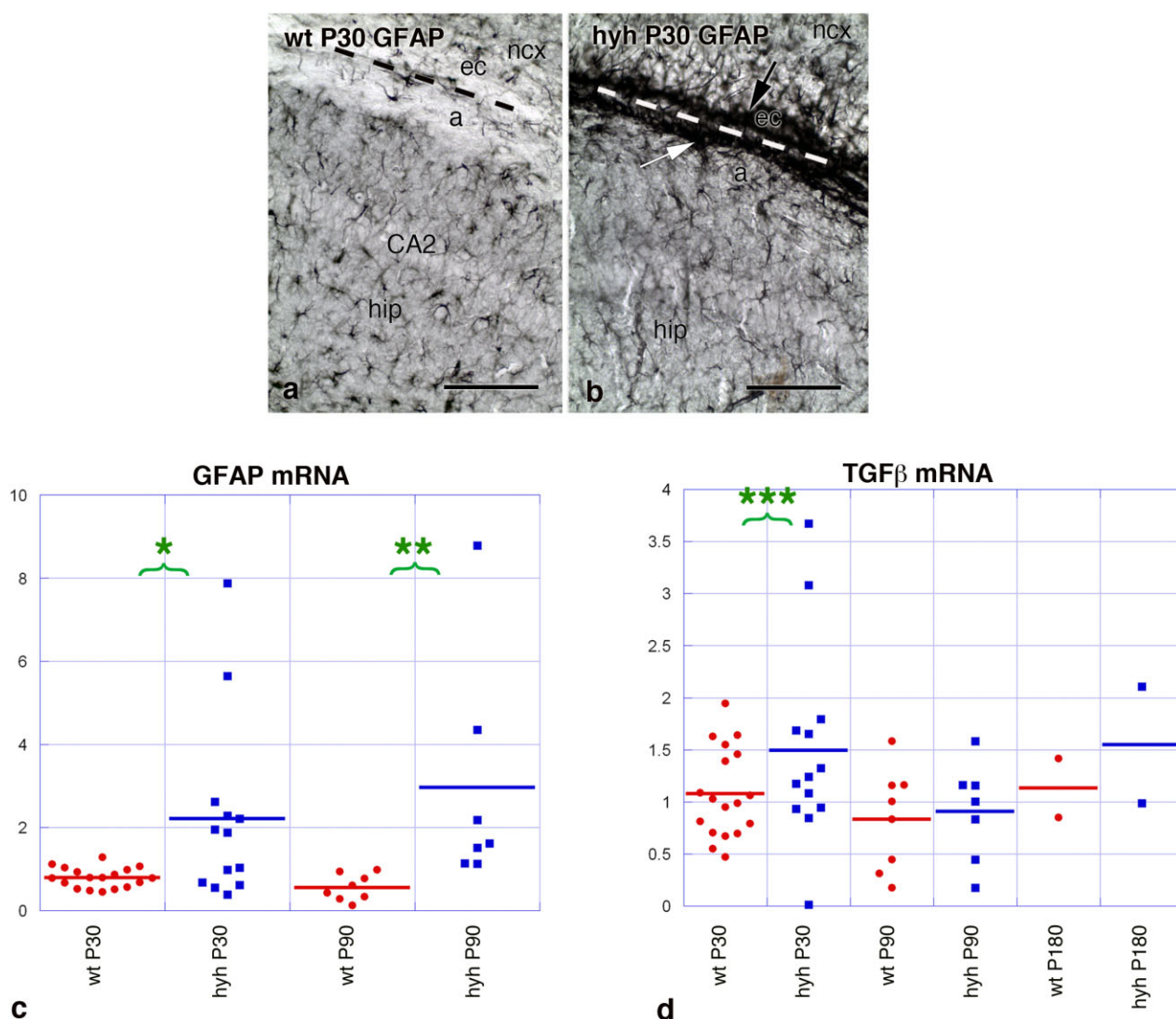
#### Significant differences in the levels of TNF $\alpha$ mRNA expression between hyh mice with different severities of hydrocephalus

Examination of the association of TNF $\alpha$  expression levels with the aetiology of hydrocephalus of different severities

in the hyh mice was performed as described for TGF $\beta$ 1. In contrast to TGF $\beta$ 1, we found that the levels of TNF $\alpha$  mRNA at P30 were significantly different in hyh mice compared with the levels of TNF $\alpha$  mRNA detected in wt mice. There was a four-fold increase in the mean level of TNF $\alpha$  mRNA in hyh mice (Figure 3a), and in some cases, the expression levels were up to eight-fold greater than those found in wt mice. Although the mean TNF $\alpha$  mRNA expression levels in hyh mice at P90 and P180 were found to be two-fold greater than those observed in wt mice, the difference was not significant (Figure 3a).

#### The expression of TNF $\alpha$ in reactive astrocytes in the hyh mouse and in human foetuses with hydrocephalus

The expression pattern of TNF $\alpha$  was examined by immunolabelling frozen sections of the mouse brain-cortex with three different antibodies. All of the



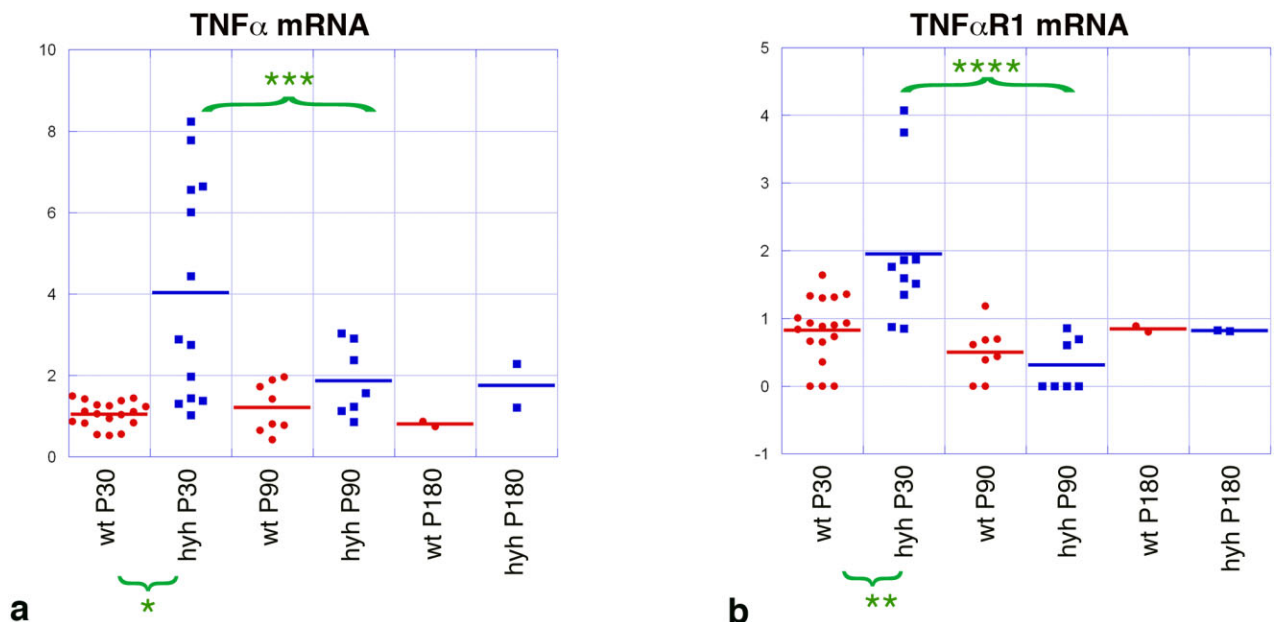
**Figure 2.** The expression of GFAP and TGF $\beta$ 1 in the cerebral cortex of hyh and wt mice. (a, b) Immunolabelling with nickel intensification of astrocytes against GFAP in the hippocampus (hip) of a wt (a) and a hyh (b) mouse at P30. Strongly immunoreactive astrocytes are detected covering the ventricle surfaces of the hippocampus (white arrow, in b) and the external capsule below the neocortex (ncx; black arrow, in b) of the hyh mouse. The broken lines in a and b denote the lateral ventricle space between the neocortex and the hippocampus. (c, d) GFAP (c) and TGF $\beta$ 1 (d) mRNA levels in the hippocampus of wt (red dots) and hyh mice (blue dots) at P30, P90 and P180. The red and blue transversal lines represent the mean levels. Significant differences were detected in the levels of GFAP mRNA between wt and hyh mice (\* $P$  < 0.02, Student's  $t$ -test, unpaired data with unequal variance,  $F$  probability < 0.003; \*\* $P$  < 0.02, Student's  $t$ -test, unpaired data with unequal variance,  $F$  probability < 0.0001) but not in the levels of TGF $\beta$ 1 mRNA between wt and hyh mice at P30 (\*\*\* $P$  < 0.6, Student's  $t$ -test, unpaired data with equal variance,  $F$  probability < 0.5). Abbreviations: a, alveus; CA2; pyramidal cells of Cornu Ammonis area 2; ec, external capsule. Scale bars: a, b, 50  $\mu$ m.

antibodies revealed similar results. During the first days of postnatal life in wt and hyh mice, TNF $\alpha$  immunoreactivity was only detected in the meninges and in a diffuse form in the neighbouring brain parenchyma (Figure 4a–e). Later, at the end of the first postnatal week in hyh mice, as hydrocephalus became severe, it was also possible to detect diffuse TNF $\alpha$  immunoreactivity throughout the brain parenchyma (Figure 4f–k). In agreement with the results obtained from real-time PCR, the diffuse TNF $\alpha$  immunoreactivity could be detected more strongly in the sections from hyh mice at P30 (Figure 5b,c,f) than from wt mice at P30 (Figure 5a,e) or hyh mice at P90 (Figure 5d).

Periventricular reactive astrocytes were found to be immunoreactive to the different TNF $\alpha$  antibodies in hyh mice from P7 onwards. TNF $\alpha$  immunolabelling was detected in the reactive astrocytes in the neocortex and the

alveus of the hippocampus (Figures 4f,g and 5f–i), as well as other ventricle surfaces (not shown). The patches of ependymal cells that resisted the process of denudation did not display TNF $\alpha$  immunoreactivity (Figure 5j). TNF $\alpha$  immunoreactivity was not detected in the cell bodies or the primary cell processes of the nonreactive astrocytes located inside the brain parenchyma (Figure 5g). Some Iba1+ periventricular microglia on the ventricle surface of the neocortex (Figure 5l) and, unusually, in the hippocampus displayed immunoreactivity to TNF $\alpha$  antibodies (Figure 5k).

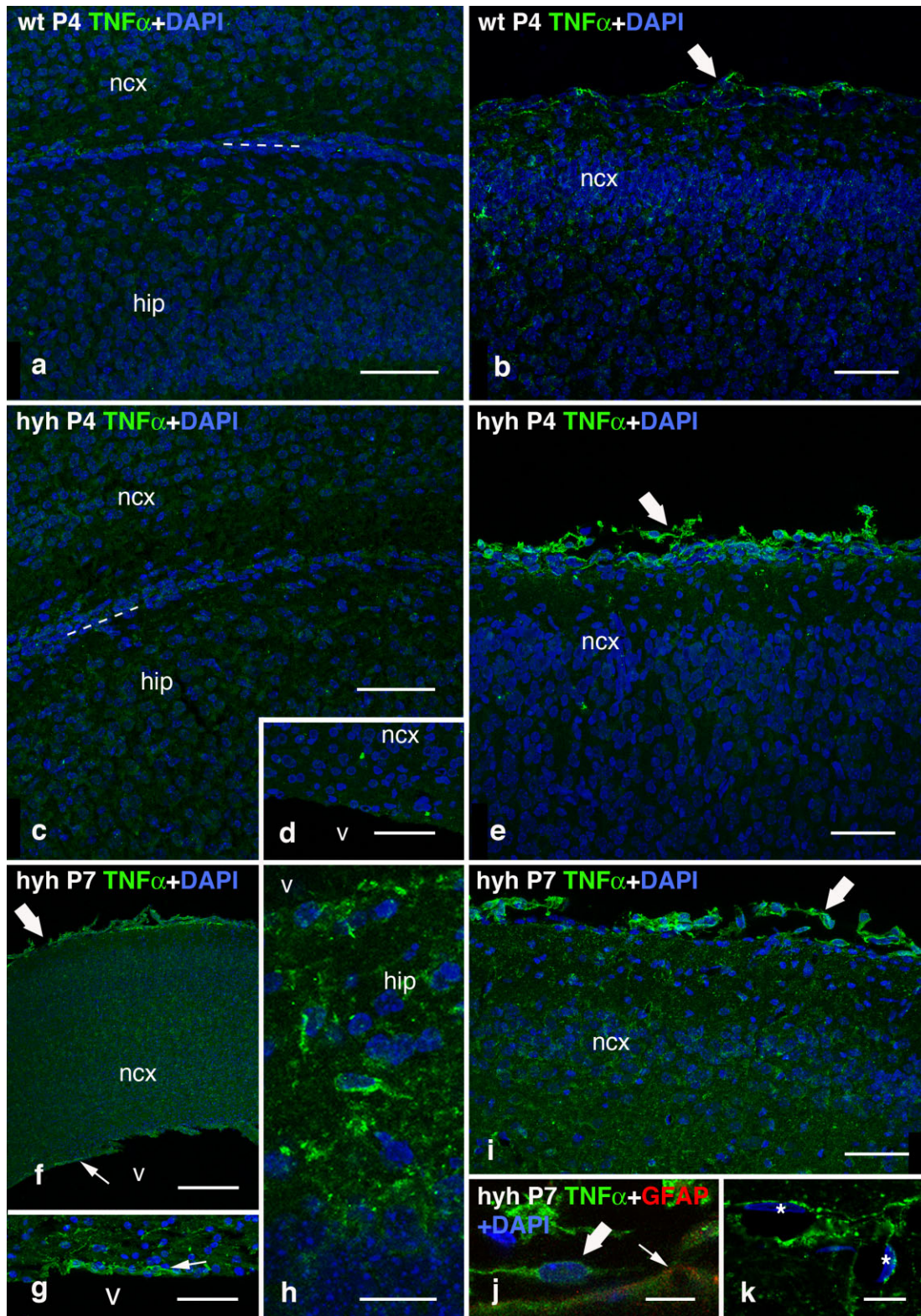
Periventricular reactive astrocytes immunolabelled with anti-TNF $\alpha$  were not detected in the human control cases (Figure 6a). In neocortical sections of human foetuses with primary hydrocephalus, anti-TNF $\alpha$ -labelled reactive astrocytes in the periventricular region covered

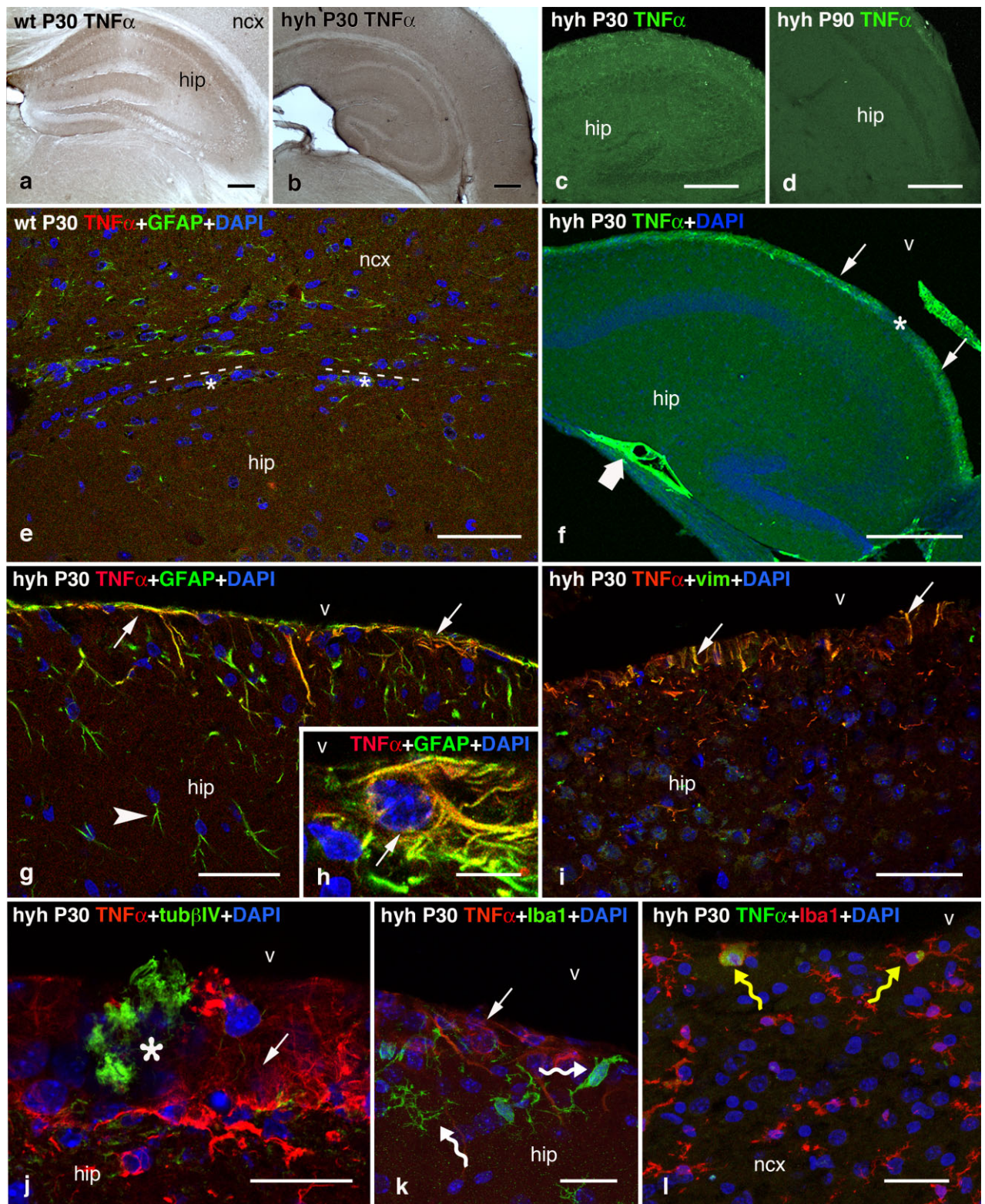


**Figure 3.** mRNA levels of TNF $\alpha$  (a) and its receptor, TNF $\alpha$ R1 (b), in the hippocampus of wt (red dots) and hyh (blue dots) mice at P30, P90 and P180. The red and blue transversal lines represent the mean levels. Correlation analyses revealed significant differences between wt and hyh mice at P30 and between hyh mice at P30 and P90 (\* $P < 0.002$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.02$ , \*\*\*\* $P < 0.001$ ; Student's *t*-test, unpaired data with unequal variance, \* $F$  probability  $< 0.0001$ , \*\* $F$  probability  $< 0.004$ , \*\*\* $F$  probability  $< 0.02$ , \*\*\*\* $F$  probability  $< 0.02$ ). The correlation probability was high (0.004) for the levels of TNF $\alpha$  and TNF $\alpha$ R1 in each animal.

**Figure 4.** (a–k) TNF $\alpha$  expression in the neocortex (ncx; a–g, i–k) and hippocampus (hip; a, c, h) of wt (a, b) and hyh mutant mice (c–k) at P4 (a–e) and P7 (f–k). Confocal microscopy of sections immunostained using rabbit anti-TNF $\alpha$  antibodies (TNF $\alpha$ , green) and counterstained using the nuclear marker DAPI (blue). Immunoreactivity was detected in a diffuse pattern in the brain parenchyma and in the cells of the meninges (thick arrows; in b, e, f, i, j). TNF $\alpha$  labelling was also detected in astrocyte cell bodies and their endfeet in the glial limitans (thin arrow, in j; colabelling with GFAP in red) as well as in reactive astrocytes in the ventricular surface (thin arrows, in f and g). The broken line in a and c denotes the lateral ventricle space between the neocortex and the hippocampus. TNF $\alpha$  immunoreactivity was detected in the astrocyte perivascular endfeet surrounding blood vessels near the meninges (asterisks, in k) and the ventricle in the neocortex. Abbreviations: v, lateral ventricle lumen. Scale bars: a–e, g, i, 50  $\mu$ m; f, 250  $\mu$ m; h, 25  $\mu$ m; j, 10  $\mu$ m; k, 7.5  $\mu$ m.







**Figure 5.** TNF $\alpha$  expression in the neocortex (ncx; **a, b, e, l**) and hippocampus (hip; **a–k**) of wt (**a, e**) and hyh (**b–d, f–i**) mutant mice at P30 (**b, c, f–l**) and P90 (**d**) with rat (**a, b, e, g–l**) and mouse (**c, d, f**) monoclonal antibodies against TNF $\alpha$ . (**a, b**) Immunoreactivity viewed under light microscopy. (**c, d**) Immunofluorescence (green) in the hippocampus. (**e**) Double immunofluorescence in neocortex and hippocampus with anti-TNF $\alpha$  (red) and anti-GEAP (green). The broken line denotes the lateral ventricle space between the neocortex and the hippocampus. (**f**) Immunofluorescence with anti-TNF $\alpha$  (green) in the hippocampus with DAPI (blue) counterstaining. Strong immunoreactivity was detected in the meninges (thick arrow). The ventricle surface covered by reactive astrocytes was also immunolabelled (arrows), but an ependymal patch was immunonegative (asterisk). (**g–i**) Double immunofluorescence against TNF $\alpha$  (red) and either GEAP (green, in **g** and **h**) or vimentin (vim; reactive astrocyte marker; green, in **i**) in the hippocampus. Reactive periventricular astrocytes (arrows, in **g–i**) are colabelled (orange/yellow) with both TNF $\alpha$  and GEAP or vimentin antibodies. Nonreactive astrocytes in the brain parenchyma (arrowhead, in **g**) were not colabelled (reaction in green). (**j–l**) Double immunofluorescence against TNF $\alpha$  (red, in **j** and **k**; green, in **l**) and tubulin- $\beta$ IV (tub $\beta$ IV, ependymal cilia marker; green, in **j**) or Iba1 (microglia marker; green, in **k**; red, in **l**) in the ventricle walls of the hippocampus (**j, k**) and neocortex (**l**). **j** represents a surface view from the ventricle of a thick frozen section displaying immunolabelling of cilia belonging to a small patch containing ependymal cells (asterisk) that resisted denudation. Microglial Iba1+ cells were not labelled with the TNF $\alpha$  antibody in the hippocampus (curved white arrows, in **k**), but some were found to be colabelled in the neocortical ventricle surface (curved yellow arrows, in **l**). The reactive astrocytes covering the ventricle surfaces displayed anti-TNF $\alpha$  immunoreactivity (arrows, in **j** and **k**). Abbreviations: hip, hippocampus; ncx, neocortex; v, ventricle lumen. Scale bars: **a, b**, 200  $\mu$ m; **c, d**, 100  $\mu$ m; **e, g, i**, 50  $\mu$ m; **f**, 250  $\mu$ m; **h**, 10  $\mu$ m; **j, k, l**, 25  $\mu$ m.

the denuded ependymal surfaces and the neighbouring brain parenchyma (Figure 6c–g). These cells were identified as astrocytes and microglia colabelled with GFAP and Iba1 (Figure 6h–k). In the Dandy-Walker case, which lacked ependymal denudation in the fourth ventricle, parenchymal astrocytes were also found to be immunopositive for TNF $\alpha$  (Figure 6b).

### Significant differences in the levels of TNF $\alpha$ R1 mRNA expression between hyh and wt mice

The diffuse distribution of TNF $\alpha$  immunolabelling in the brain parenchyma and its absence from microglia suggested that this factor could be functioning via the TNF $\alpha$ R1 receptor. For this reason, the levels of TNF $\alpha$ R1 mRNA were quantified in the same animals following the same real-time PCR procedures as described for TNF $\alpha$ . A two-fold increased in the mean expression of TNF $\alpha$ R1 was detected in the hippocampus of hyh mice at P30 (Figure 3b) compared with wt mice. The TNF $\alpha$ R1 mRNA levels displayed the same trend as TNF $\alpha$  in the hyh mice at P90 and P180, although there no significant difference was detected compared with the wt mice (compare with Figure 3a). Furthermore, when the levels of TNF $\alpha$  mRNA and TNF $\alpha$ R1 mRNA were compared between each individual mouse at P30, P90 and P180, a significant high correlation probability (0.004) was found between them. Thus, the animals with higher TNF $\alpha$  mRNA levels also expressed higher levels of TNF $\alpha$ R1 mRNA.

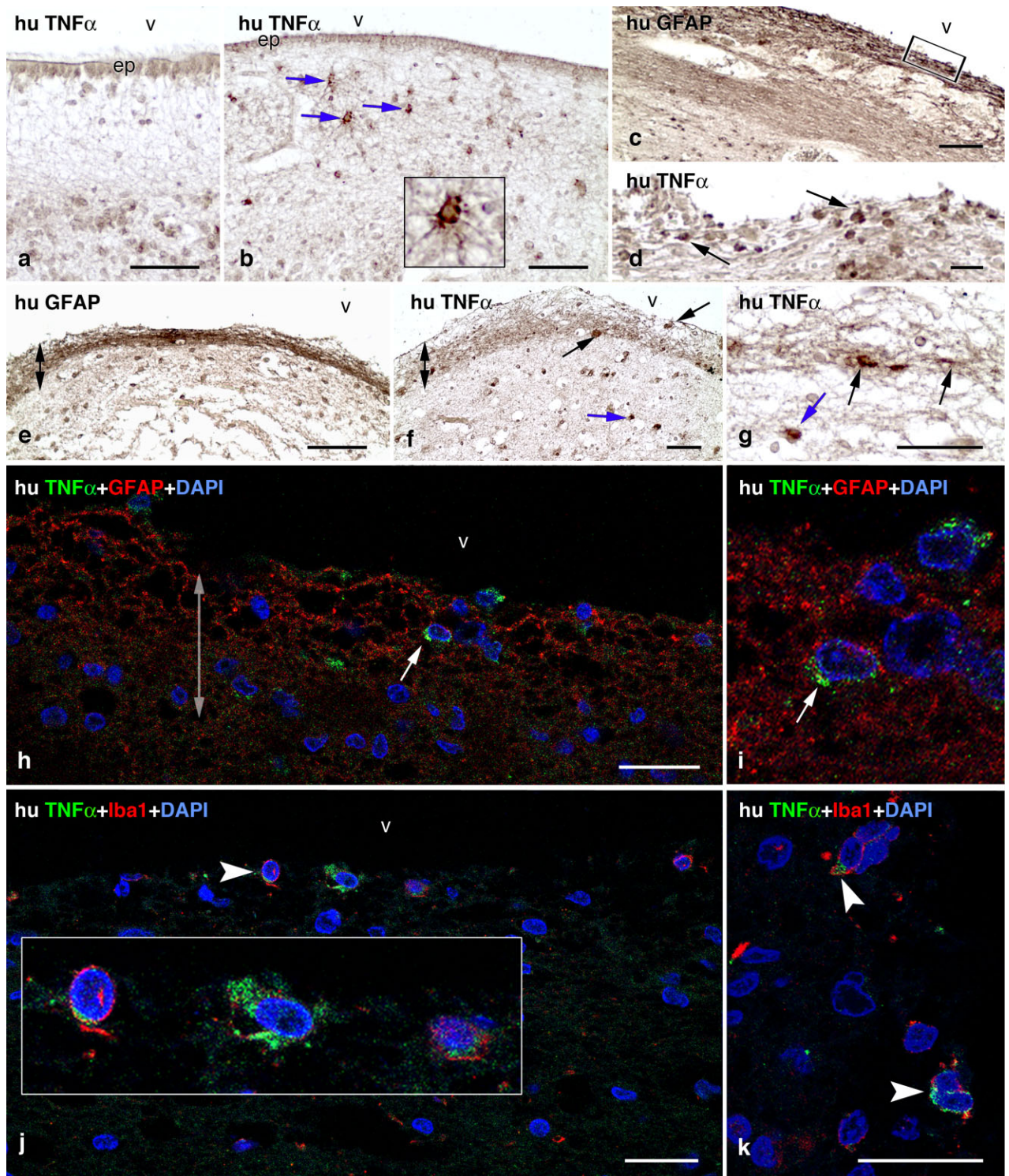
### TNF $\alpha$ R1 receptor expression in reactive astrocytes in hyh mice

The expression of TNF $\alpha$ R1 in the brain parenchyma was also studied in frozen sections with different antibodies. In

the wt and hyh mice these antibodies immunolabelled the cell bodies of astrocytes and their cell processes that contribute to the pia mater (Figure 7a,b), as well as the astrocyte perivascular endfeet near the meninges (Figure 7e,f). Similar to TNF $\alpha$ , and in agreement with the real-time PCR results, TNF $\alpha$ R1 immunoreactivity was stronger in the brain sections from hyh mice with severe hydrocephalus at P30 than in those from wt mice (not shown). In mature mice, TNF $\alpha$ R1 was found to be widely distributed throughout the brain parenchyma in a punctate pattern. In the hippocampus of wt and hyh mice, TNF $\alpha$ R1 immunoreactivity was primarily present in the layers occupied by interneurons and in the dendrites of the pyramidal (Figure 7g) and granular cells of the hippocampal CA1, CA2, CA3 areas and the dentate gyrus. Specifically in hyh mice, the antibodies also labelled the reactive astrocytes covering the ventricle surfaces of the neocortex (Figure 7c,d) and hippocampus (Figure 7i), as well as the cell bodies of neocortical neurons located in the oedema at the external capsule (Figure 7d). The TNF $\alpha$ R1 antibodies did not label the patches of ependymal cells that resisted denudation in hyh mice (Figure 7g,h).

### Microglia in the brain cortex of hyh mice

In the present study, microglia were not detected as a primary source of TNF $\alpha$  expression in the hippocampus of hyh mice with congenital hydrocephalus. Because TNF $\alpha$  is a cytokine implicated in inflammatory responses, microglia at different stages of the development of hydrocephalus in hyh mice were examined. Phagocytic microglia/macrophages were only detected based on staining with tomato lectin and the Iba1 antibody at the



**Figure 6.** TNF $\alpha$  immunolabelling in the lateral (a, c–k) and fourth (b) ventricle walls of human foetuses (hu), including one control case with placental abruption at 29 weeks of gestation (a) and cases with primary forms of congenital hydrocephalus (b–k). Double-ended arrows denote the thickness of the astroglial periventricular reaction in denuded ependymal surfaces. (b) A Dandy-Walker case at 40 weeks of gestation displaying TNF $\alpha$  immunopositive astrocytes near the ventricular wall covered with ependyma. Insert shows magnified immunolabelling of a parenchymal astrocyte. (c, d) GFAP (c) and TNF $\alpha$  (d) immunostaining of a hydrocephalic foetus with cerebral polymalformation at 33 weeks of gestation. A consecutive section of the area framed in c is shown in magnification in d. TNF $\alpha$  immunoreactive cells were present among the reactive astrocytes (arrows). (e–k) Immunostaining against GFAP (e; h, i, reaction in red), Iba1 (j, k, reaction in red) and TNF $\alpha$  (f, g; h–k, reaction in green) in consecutive sections from a foetus with Potter syndrome type IIb and hydrocephalus at 40 weeks gestation. Cells were labelled with the TNF $\alpha$  antibody in the area of the astrocyte reaction at the ventricular surface (black arrows; in f and g). Other astrocytes deeper in the brain parenchyma were also labelled (blue arrows; in f and g). Some GFAP-positive reactive astrocytes (white arrows, in h and i) and Iba1-positive microglia (arrowheads, in j and k) also displayed TNF $\alpha$  immunoreactivity as shown in a 1- $\mu$ m confocal microscopy plane. Magnifications of the immunolabelled cells in h and j are shown in i and the Insert in j respectively. Scale bars: a, b, e, 50  $\mu$ m; c, 100  $\mu$ m; d, 25  $\mu$ m; f–k, 25  $\mu$ m.

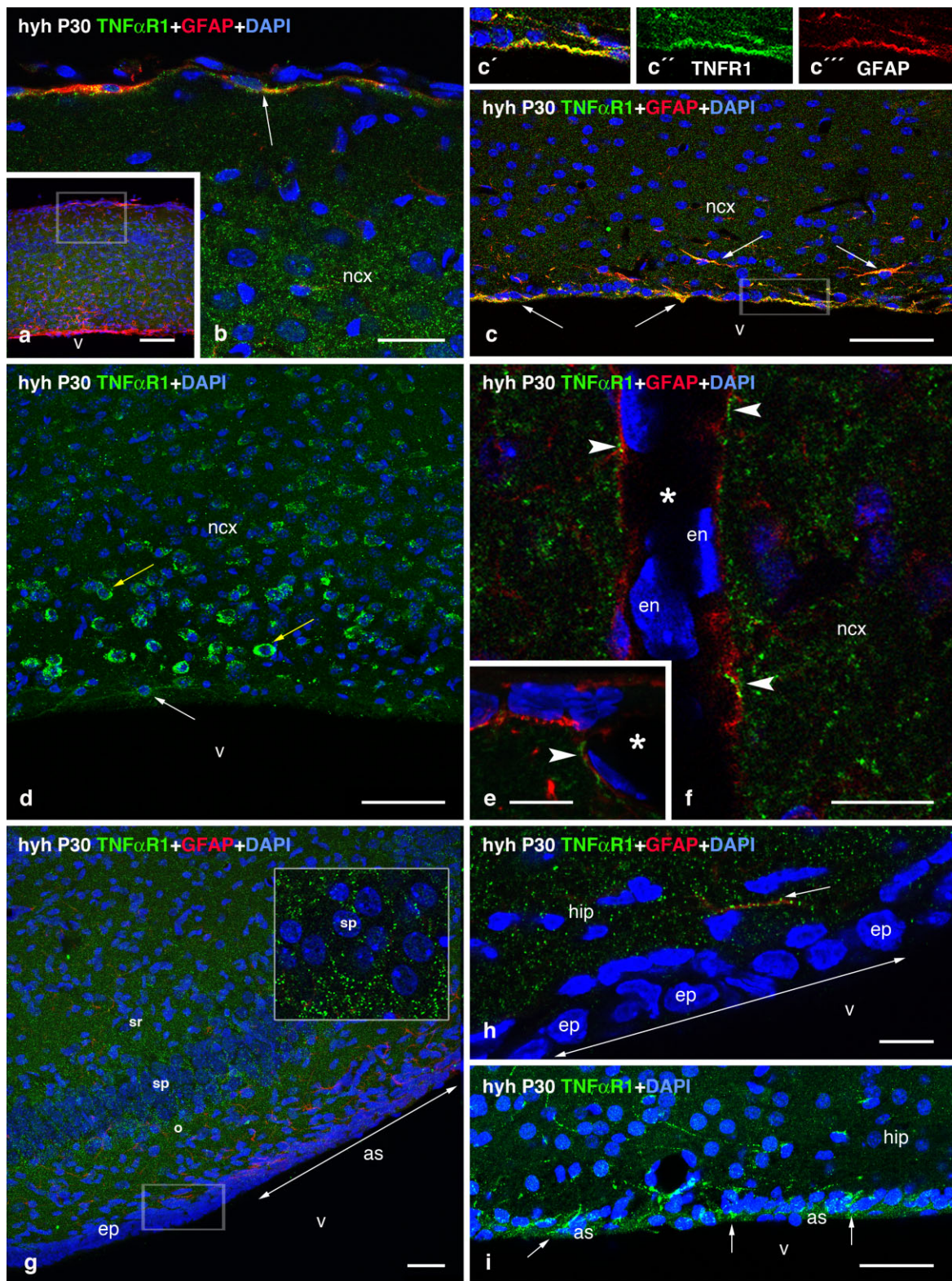
early stages of hydrocephalus in *hyh* mice in the areas with periventricular oedema, such as the external capsule (Figure 8a,b). In contrast, phagocytic microglia were scarce in the hippocampus at this age and were not detectable in any part of the brain parenchyma in mature mice. Thus, in the hippocampus of *hyh* mice, Iba1+ microglia appeared similar to *wt* mice, displaying a morphology that did not resemble their phagocytic stage (Figure 8c–g). Only in the periventricular oedemas covering the alveus of the hippocampus and in the periventricular external capsule in the neocortex of *hyh* mice was it possible to detect the presence of any microglia extending thicker cell processes but lacking their classical activated morphology (Figure 8h). There were no significant differences in the mRNA levels of iNOS, a factor that can induce microglial activation, in the hippocampus between *wt* and *hyh* mice (Figure 8i), which is a factor that can be related to the activation of microglia. Nevertheless, some differences between the microglial populations of *wt* and *hyh* mice were revealed, indicating that microglia may be affected in some way. In *hyh* mice, there were not significantly higher numbers of Iba1+ cells in the hippocampus (Figure 8k), but some cells displayed a significantly stronger immunoreactivity to Iba1 antibodies (Figure 8i,j).

## Discussion

In the present investigation, a significantly higher expression level of TNF $\alpha$  mRNA in the *hyh* animals with severe hydrocephalus was detected compared with *wt* mice and, interestingly, even compared with *hyh* mice exhibiting a compensated form of the disease. The qualitative observations obtained using TNF $\alpha$  antibodies to immunostain brain sections agreed well with the mRNA expression data. Two forms of immunoreactivity were detected using different TNF $\alpha$  antibodies: the labelling of individual cells,

including reactive astrocytes that replace the absent ependyma on most of the ventricular surfaces, and a diffuse pattern of labelling that was widely distributed throughout the brain parenchyma. The latter form of immunoreactivity suggests the existence of a soluble form of TNF $\alpha$  with a wide effect. Accordingly, the levels of TNF $\alpha$ R1 mRNA, which is the primary receptor for the soluble form of TNF $\alpha$ , were found to tightly correspond with the levels of TNF $\alpha$  in each individual animal. Results from P30 mice with severe hydrocephalus displayed a high degree of variance, ranging from TNF $\alpha$  mRNA levels similar to the control to eight-fold increases. However, neither the controls nor the older *hyh* mice exhibited such variance. According to Bátiz *et al.* [34], half of the P30 mice show macrocephaly, declining to only 6% after 90 days. Macrocephaly reversion was never observed in *hyh* mice. Only young mice lacking macrocephaly were able to survive and go on to develop compensated hydrocephalus. The frequency of marked macrocephaly and higher cerebrospinal fluid (CSF) pressure in P30 mice could explain the wide variations in TNF $\alpha$  expression, which were absent from all mice examined from P90 onwards.

The present results in *hyh* mice indicate that TNF $\alpha$  is associated with the pathophysiology of congenital hydrocephalus, likely through TNF $\alpha$ R1, and that TNF $\alpha$  may be related to the severity of the disease in some manner. Our results agree well with evidence obtained from other animal models. In an experimental model of obstructive hydrocephalus, involving intracisternal injection of kaolin in newborn rats, TNF $\alpha$ R1 receptor expression in the parietal cortex is upregulated and is associated with inflammatory responses [40]. In the H-Tx rat model, which develops congenital hydrocephalus, there is higher expression of ligands related to TNF $\alpha$ , indicating a role for TNF $\alpha$  in inflammatory responses, likely through microglial and astroglial reactions [41]. Such a function of



**Figure 7.** Immunofluorescence with a rabbit anti-TNF $\alpha$ R1 antibody (reaction in green) in the neocortex (a–f) and the hippocampus (g–i) of hyh (a–i) mice at P30. **a** Panoramic view of the neocortex. The area containing the meninges framed in **a** is shown in **b**. The GFAP+ astrocytes (reaction in red) that anchor the pia mater of the meninges (arrow, in **b**) expressed TNF $\alpha$ R1. Reactive astrocytes on the ventricle surface of the hippocampus and neocortex expressed the receptor (white arrows, in **c**, **d**, **h** and **i**; colabelled with GFAP, orange/yellow, in **c**). (**c'**) Magnification of the area containing reactive astrocytes framed in **b**. (**c''**, **c'''**). Separate channels corresponding to GFAP and TNF $\alpha$ R1 immunoreactivity. (**d**) Yellow arrows denote neocortical neurones immunoreactive against TNF $\alpha$ R1. The area of the neocortex in **d** displays a poorly developed periventricular astroglial reaction (see reference [38]) (**e**, **f**) Blood vessels near the meninges in 1- $\mu$ m-thick confocal planes. The processes of astrocytes and their perivascular endfeet (GFAP reaction in red; arrowheads; asterisk, vessel lumen) also displayed immunoreactivity to anti-TNF $\alpha$ R1 (reaction in green). (**g**, **h**) The ventricle surface of the hippocampus containing an ependymal patch neighbouring the periventricular astrocyte reaction. Insert in **g** represents a magnification of the stratum pyramidale as a 1- $\mu$ m confocal section. The ependyma-containing area framed in **g** is shown in **h** as a 1- $\mu$ m confocal plane. Abbreviations: as, reactive astrocyte; en, endothelial cell; ep, ependyma; hip, hippocampus; ncx, neocortex; o, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum. v, lateral ventricle lumen. Scale bars: **a**, **d**, **g**, **i**, 50  $\mu$ m; **b**, **c**, 25  $\mu$ m. **e**, **f**, **h** 7.5  $\mu$ m.

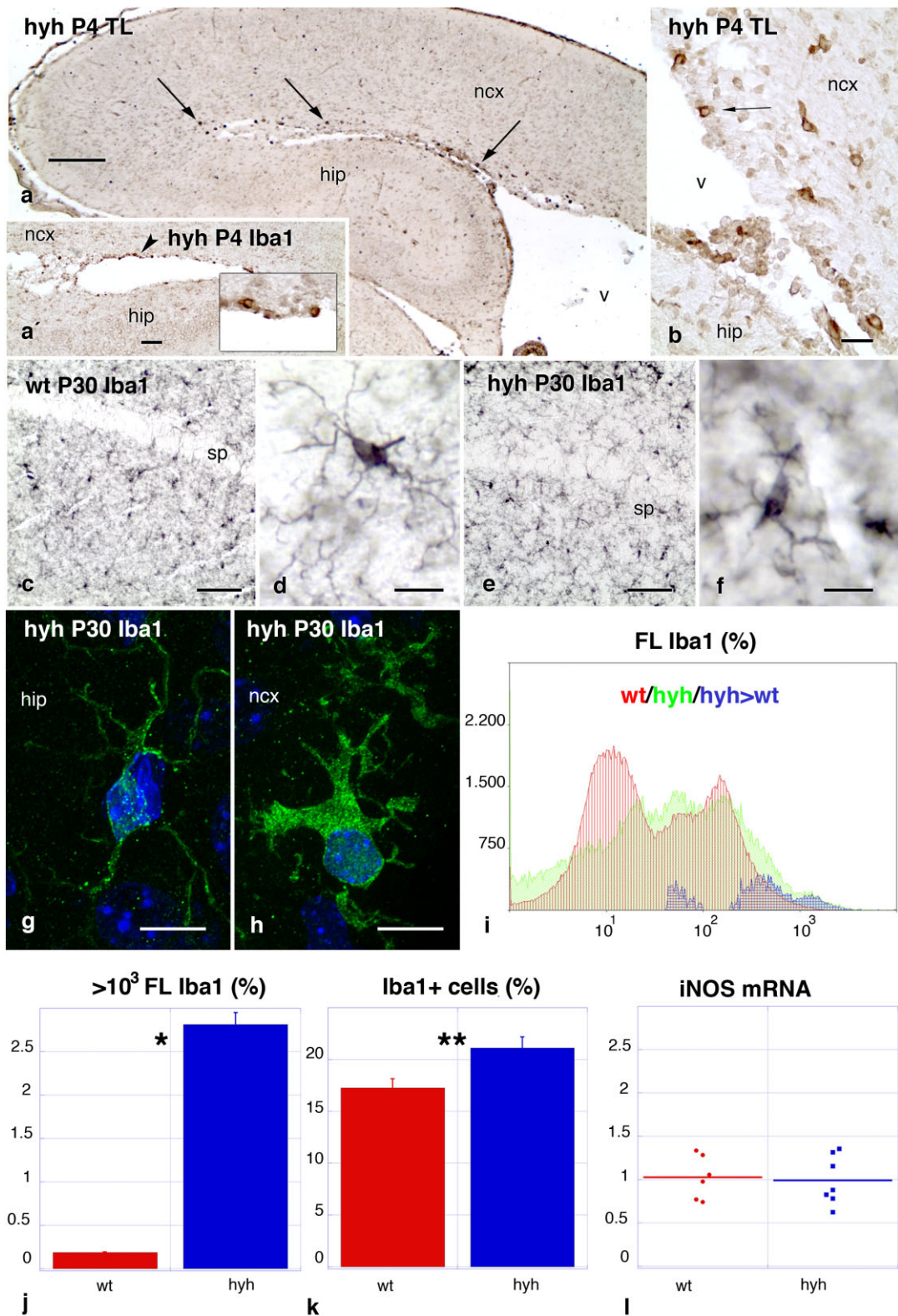
TNF $\alpha$  has also been revealed after the experimental therapeutic administration of Infliximab or mesenchymal stem cells in hydrocephalic animal models [42,43].

Inflammatory responses [44,45] and different neurodegenerative reactions have been described in the neocortex and hippocampus of animal models with hydrocephalus, including glial reactions [40,44], neuronal death and metabolic alterations [46–54], hypoxic conditions [55,56] and oxidative stress [56]. These responses have also been found to be involved in human foetal-neonatal hydrocephalus [57,58]. TNF $\alpha$  expression has been reported to be induced after ischaemic insults in brain tissue, including the hippocampus, and has been correlated with cell death [59–61]. In rats with hydrocephalus induced with kaolin, ischaemic conditions were reported in the brain cortex, including the hippocampus [62,63]. Ischaemic conditions would likely also be present in the hippocampus of hyh mice due to a high intraventricular pressure, and therefore, induction of TNF $\alpha$  upregulation would be plausible. Our observation of a more pronounced macrocephaly in the hyh mice at P30 (severe hydrocephalus) than at P90 (compensated hydrocephalus) suggests that intraventricular pressure may be higher in mice at P30 or during development and that pressure could induce a more pronounced cranial deformation. TNF $\alpha$ R1 has been primarily associated with programmed cell death and pro-inflammatory pathways that occur during brain injury [2]. We have also found that the receptor is widely distributed in the brain parenchyma; the presence of TNF $\alpha$ R1 in periventricular neocortical neurones suggests a likely role for TNF $\alpha$  in the degeneration of these neurones.

Reactive microglia and astrocytes are two cell populations involved in neurodegenerative and inflammatory processes and the production of TNF $\alpha$ . The H-Tx rat with congenital hydrocephalus exhibits a microglial response

that varies with age and hydrocephalus severity [64] and appears to be associated with higher CSF pressures [65]. In the case of the hyh mouse, amoeboid stage microglia are only present in neocortical white matter during the first week of life ([33], present results), which is a period of time during which the periventricular white matter displays massive degeneration of myelin [33]. These cells cannot be detected later ([33], present results). Our present results concerning the microglial morphology and iNOS expression indicate that microglia would likely not be activated in mature hyh mouse. Although we did not detect a higher number of microglial cell bodies, some microglia expressed higher levels of Iba1, a macrophage/microglial-specific calcium-binding protein involved in Rac GTPase-dependent ruffling and phagocytosis [66]. Thus, these findings suggest that microglia could be alert or subtly activated in mature hyh mice.

In hyh mice with hydrocephalus, there is a particular periventricular astrocyte reaction that replaces the absence of ependyma in most of the ventricular system [33,38,39]. In the present study we found that astrocytes in those regions express both TNF $\alpha$  and the TNF $\alpha$ R1. Astrocytes have been shown to be able to produce TNF $\alpha$  and TNF $\alpha$ R1 *in vitro* to induce the autocrine production of nerve growth factor (NGF) and glial line-derived neurotrophic factor (GDNF) [67]. It has been found that injury or ischaemia in the central nervous system (CNS) of rats can lead to upregulation of the p75 receptor (TNF $\alpha$ FR2) for NGF in astrocytes, which likely controls astrocyte proliferation and, therefore, restricts the proper astrocyte response [68,69]. *In vitro* experiments have demonstrated the promotion and regulation of NGF by TNF $\alpha$  [24,70–72]. A defect in GDNF production by astrocytes has been suggested to mediate neuronal cell death in ischaemic conditions [73,74]. As another





**Figure 8.** Stage of microglia in the hippocampus (hip) and neocortex (ncx) of wt and hyh mice. (a, b) Tomato lectin (TL) histochemistry in a hyh mouse at P4. Macrophagic cells are labelled (arrows, in a and b) in the periventricular oedematous area of the neocortex. (a') Adjacent section to that shown in a immunolabelled using the Iba1 antibody that also displaying the presence of macrophagic cells in the neocortex. The cells denoted with an arrowhead are magnified in the insert. (c–f) Iba1 immunolabelling of microglia in the hippocampus of wt (c, d) and hyh mice (e, f) at P30 using nickel intensification. (g, h) Iba1 immunolabelling of microglial cells in the hippocampus (g) and neocortex (h) of a hyh mouse at P30. Microglia with the morphology shown in h were found in the periventricular region of the neocortex but rarely in the hippocampus. (i–k) Flow cytometry analysis of Iba1 immunopositive cells in the hippocampus of wt and hyh mice at P30 ( $n = 8$  mice per condition). (i) Representation of the number of events (Y axis) and Iba1 immunofluorescence intensity (FL, arbitrary units; X axis) for a wt mouse (red) and a hyh mouse (green). The area in blue represents the difference in the numbers of immunopositive events between the hyh mouse and the wt mouse. (j) Percentages of counts/total events with high iba1 immunofluorescence intensity ( $>10^3$  arbitrary units) in wt and hyh mice (\* $P < 0.0001$ ; Student's  $t$ -test, unpaired data with unequal variance,  $F$  probability  $< 0.0005$ ; bars represent SEM). (k) Number of Iba1+ events counted in the hippocampus of wt and hyh mice (\*\* $P = 0.7$ ; Student's  $t$ -test, unpaired data with equal variance,  $F$  probability  $< 0.5$ ; bars represent SEM). (l) mRNA levels of iNOS in the hippocampus of wt (red dots) and hyh (blue dots) mice at P30. The red and blue transversal lines represent the mean levels. Correlation analyses revealed that the differences were not significant between wt and hyh mice ( $P = 0.9$ ; Student's  $t$ -test, unpaired data with equal variance,  $F$  probability  $< 0.8$ ). Abbreviations: sp, stratum pyramidale; v, lateral ventricle lumen. Scale bars: a, 200  $\mu\text{m}$ ; a', c, d, 50  $\mu\text{m}$ ; b, 20  $\mu\text{m}$ ; d, f, 10  $\mu\text{m}$ ; g, h, 8  $\mu\text{m}$ .

possible effect, the production of TNF $\alpha$  in astrocytes could mediate the permeability of the endothelium of the brain blood barrier. In fact, TNF $\alpha$  has been implicated in the opening of epithelial tight junctions under different pathological and inflammatory conditions [75–80]. The presence of the TNF $\alpha$ R2 receptor has been reported in endothelial cells [60], where it could play a role in the regulation of vascular permeability. We detected the presence of TNF $\alpha$  and its TNF $\alpha$ R1 receptor in the perivascular endfeet of nonreactive astrocytes and in the meninges of the hyh mice, suggesting that TNF $\alpha$  could also perform some unknown functions, including a role in vascular permeability or an effect on the blood-brain barrier.

In the present investigation, we detected TNF $\alpha$  in periventricular reactive astrocytes and microglia in necropsies of a small number of human foetuses with different forms of primary hydrocephalus. Thus, it could be suggested that TNF $\alpha$  is also associated with human primary hydrocephalus via glial reactions. In contrast to hyh mice, the number of TNF $\alpha$ -expressing astrocytes appeared to be low. This could be due to the difficulty in achieving satisfactory fixation of human tissue. Previous reports regarding the role of TNF $\alpha$  in different forms of human hydrocephalus are limited and contradictory. Moreover, those studies examined a different form of hydrocephalus than those examined in the present investigation. For example, Tarkowski *et al.* [81] described high levels of TNF $\alpha$  in their study carried out in adult patients exhibiting normal pressure hydrocephalus with different causes, and they suggested that TNF $\alpha$  could be a possible biomarker of the disease. However, Leinonen *et al.* [82] reported low levels of TNF $\alpha$  in idiopathic cases of normal pressure hydrocephalus in elderly patients.

TGF $\beta$ 1 has been described as playing a role in the pathogenesis of posthaemorrhagic and communicant hydrocephalus [83–91]. TGF $\beta$ 1 has a fibrogenic effect that induces scar formation around blood vessels, in the glia limitans, and in the subarachnoid space, thus contributing to the impairment of CSF absorption and to the perivascular drainage of interstitial fluid, reducing cerebral compliance [92]. TGF $\beta$ 1 controls glial reactions by inhibiting microglial and astroglial proliferation [26,93–95]. TGF $\beta$ 1 has been implicated in the regulation of GFAP expression in reactive astrocytes present in neurodegenerative diseases and experimental injuries [96–99]. Upregulation of GFAP has been detected in the present study in both the severe and compensated forms of hydrocephalus in hyh mice. However, TGF $\beta$ 1 levels in hyh mice were not significantly different compared with those in wt mice and were also not significantly different between the severe and compensated disease forms. Thus, it can be suggested that TGF $\beta$  likely does not play a key role in the late development of congenital hydrocephalus in hyh mice. Nevertheless, despite the results stated above, the effects of TGF $\beta$ 1 on the generation of the astrocytic response cannot be discounted during the initial stages of the disease. Thus, it is possible that the levels of TGF $\beta$ 1 increased during the early stages of hydrocephalus, after which they could decrease.

In conclusion, TNF $\alpha$  and TNF $\alpha$ R1 were found to be upregulated in hyh mice with the severe form of hydrocephalus and may therefore be associated with disease pathogenesis or progression. Our findings also suggest that TNF $\alpha$  may be considered as a possible biomarker for disease prognosis. Understanding the role that TNF $\alpha$  plays in hydrocephalus could potentially facilitate the development of novel disease treatments.

## Acknowledgements

The authors wish to thank David Navas from the University of Malaga (Spain) for his valuable technical support and the staff of the Animal Experimentation Service of the University of Malaga for their support during the experiments. The present work was supported by the grants PS09/0376 and PI12/0631 to A-JJ; SERAM to M-IM-L; PI12/01431 to AG; and PI12/01437 to JV.

## Author contributions

A-JJ, J-MP-F and AG prepared the manuscript; A-JJ, BR, M-AA, AG, JV and J-MP-F designed the experiments and analysed the results; A-JJ, M-DD-P, MC, M-IM-L, M-LG-M performed MR experiments; A-JJ, LMRP, RRB, SJ, AG and JV performed real-time PCR experiments; A-JJ, L-MR-P and M-CG-R performed flow cytometry analyses; A-JJ, L-MR-P, M-DD-P, M-CG-R, MG-B, AH-P, M-CR-M performed immunocytochemical experiments.

## References

- MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 2002; **14**: 477–92
- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008; **214**: 149–60
- Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2001; **49**: 1215–28
- Ghosh S. Biologic therapies: lessons from multiple sclerosis. *Dig Dis* 2012; **30**: 383–6
- Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1989; **170**: 607–12
- McGuire C, Beyaert R, van Loo G. Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination. *Trends Neurosci* 2012; **34**: 619–28
- Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1991; **129**: 318–20
- Montgomery SL, Bowers WJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; **7**: 42–59
- Morales I, Farías G, Maccioni RB. Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation* 2010; **17**: 202–4
- Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 1990; **63**: 251–8
- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A Novel Form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; **53**: 45–53
- Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 2012; **24**: 1297–305
- Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Claus M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995; **83**: 793–802
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008; **117**: 244–79
- Chertoff M, Di Paolo N, Schoeneberg A, Depino A, Ferrari C, Wurst W, Pfizenmaier K, Eisel U, Pitossi F. Neuroprotective and neurodegenerative effects of the chronic expression of tumor necrosis factor in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice. *Exp Neurol* 2011; **227**: 237–51
- Fischer R, Maier O, Siegemund M, Wajant H, Scheurich P, Pfizenmaier K. A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death. *PLoS ONE* 2011; **6**: e27621
- Deng YY, Lu J, Ling EA, Kaur C. Microglia-derived macrophage colony stimulating factor promotes generation of proinflammatory cytokines by astrocytes in the periventricular white matter in the hypoxic neonatal brain. *Brain Pathol* 2010; **20**: 909–25
- McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 2008; **5**: 45
- Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol* 1997; **150**: 1473–86
- Park KM, Bowers WJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal* 2010; **22**: 977–83
- Rathnasamy G, Ling EA, Kaur C. Iron and iron regulatory proteins in amoeboid microglial cells are linked to oligodendrocyte death in hypoxic neonatal rat periventricular white matter through production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen/nitrogen species. *J Neurosci* 2011; **31**: 17982–95
- Rossi D, Volterra A. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull* 2009; **80**: 224–32

- 23 Wang MJ, Huang HJ, Chen WF, Chang HF, Kuo JS. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inactivation inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  production in microglia by modulating nuclear factor  $\kappa$ B and MLK3/JNK signaling cascades. *J Neuroinflammation* 2010; **7**: 99
- 24 Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990; **144**: 129–35
- 25 Tzeng SF, Kahn M, Liva S, De Vellis J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulation of the Id gene family in astrocytes and microglia during CNS inflammatory injury. *Glia* 1999; **26**: 139–52
- 26 Makwana M, Jones LL, Cuthill D, Heuer H, Bohatschek M, Hristova M, Friedrichsen S, Ormsby I, Bueringer D, Koppius A, Bauer K, Doetschman T, Raivich G. Endogenous transforming growth factor  $\beta$ 1 suppresses inflammation and promotes survival in adult CNS. *J Neurosci* 2007; **27**: 11201–13
- 27 Abe K, Chu PJ, Ishihara A, Saito H. Transforming growth factor- $\beta$  1 promotes re-elongation of injured axons of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 1996; **723**: 206–9
- 28 Henrich-Noack P, Prehn JH, Kriegstein J. TGF- $\beta$ 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms. *Stroke* 1996; **27**: 1609–14
- 29 Lehrmann E, Kiefer R, Finsen B, Diemer NH, Zimmer J, Hartung HP. Cytokines in cerebral ischemia: expression of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta 1) mRNA in the postischemic adult rat hippocampus. *Exp Neurol* 1995; **131**: 114–23
- 30 Lehrmann E, Kiefer R, Christensen T, Toyka KV, Zimmer J, Diemer NH, Hartung HP, Finsen B. Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor- $\beta$ 1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia* 1998; **24**: 437–48
- 31 Bronson RT, Lane PW. Hydrocephalus with hop gait (hyh): a new mutation on chromosome 7 in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 1990; **54**: 131–6
- 32 Jiménez AJ, Tomé M, Páez P, Wagner C, Rodríguez S, Fernández-Llebrez P, Rodríguez EM, Pérez-Fígares JM. A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; **60**: 1105–19
- 33 Páez P, Bátiz LF, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez LM, Rodríguez S, Jiménez AJ, Rodríguez EM, Pérez-Fígares JM. Patterned neuropathologic events occurring in hyh congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; **66**: 1082–92
- 34 Bátiz LF, Páez P, Jiménez AJ, Rodríguez S, Wagner C, Pérez-Fígares JM, Rodríguez EM. Heterogeneous expression of hydrocephalic phenotype in the hyh mice carrying a point mutation in alpha-SNAP. *Neurobiol Dis* 2006; **1**: 152–68
- 35 Bátiz LF, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez LM, Matas IM, Páez P, Roque M, Jiménez AJ, Ramos C, Pérez-Fígares JM. A simple PCR-based genotyping method for M105I mutation of alpha-SNAP enhances the study of early pathological changes in hyh phenotype. *Mol Cell Probes* 2009; **23**: 281–90
- 36 Acarin L, Vela JM, González B, Castellano B. Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem* 1994; **42**: 1033–41
- 37 Wagner C, Bátiz LF, Rodríguez S, Jiménez AJ, Páez P, Tomé M, Pérez-Fígares JM, Rodríguez EM. Mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; **62**: 1019–40
- 38 Roales-Buján R, Páez P, Guerra M, Rodríguez S, Vío K, Ho-Plagaro A, García-Bonilla M, Rodríguez-Pérez LM, Domínguez-Pinos MD, Rodríguez EM, Pérez-Fígares JM, Jiménez AJ. Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 2012; **124**: 531–46
- 39 Jiménez AJ, García-Verdugo JM, González CA, Bátiz LF, Rodríguez-Pérez LM, Páez P, Soriano-Navarro M, Roales-Buján R, Rivera P, Rodríguez S, Rodríguez EM, Pérez-Fígares JM. Disruption of the neurogenic niche in the subventricular zone of postnatal hydrocephalic hyh mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; **68**: 1006–20
- 40 Deren KE, Packer M, Forsyth J, Milash B, Abdullah OM, Hsu EW, McAllister JP 2nd. Reactive astrocytosis, microgliosis and inflammation in rats with neonatal hydrocephalus. *Exp Neurol* 2010; **226**: 110–19
- 41 Miller JM, Kumar R, McAllister JP 2nd, Krause GS. Gene expression analysis of the development of congenital hydrocephalus in the H-Tx rat. *Brain Res* 2006; **1075**: 36–47
- 42 Kurt G, Cemil B, Borcek AO, Borcek P, Akyrek N, Sepici A, Ceviker N. Infliximab administration reduces neuronal apoptosis on the optic pathways in a rabbit hydrocephalus model: a preliminary report. *Br J Neurosurg* 2010; **24**: 275–9
- 43 Ahn SY, Chang YS, Sung DK, Sung SI, Yoo HS, Lee JH, Oh WI, Park WS. Mesenchymal stem cells prevent hydrocephalus after severe intraventricular hemorrhage. *Stroke* 2013; **44**: 497–504
- 44 Xu H, Zhang SL, Tan GW, Zhu HW, Huang CQ, Zhang FF, Wang ZX. Reactive gliosis and neuroinflammation in rats with communicating hydrocephalus. *Neuroscience* 2012; **218**: 317–25
- 45 Balasubramaniam J, Del Bigio MR. Analysis of age-dependant alteration in the brain gene expression profile following induction of hydrocephalus in rats. *Exp Neurol* 2002; **173**: 105–13

- 46 Del Bigio MR, Bruni JE. Silicone oil-induced hydrocephalus in the rabbit. *Childs Nerv Syst* 1991; **2**: 79–84
- 47 Del Bigio MR, Wilson MJ, Enno T. Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. *Ann Neurol* 2003; **53**: 337–46
- 48 Ding Y, McAllister JP 2nd, Yao B, Yan N, Canady AI. Axonal damage associated with enlargement of ventricles during hydrocephalus: a silver impregnation study. *Neurol Res* 2001; **23**: 581–7
- 49 Ding Y, McAllister JP 2nd, Yao B, Yan N, Canady AI. Neuron tolerance during hydrocephalus. *Neuroscience* 2001; **106**: 659–67
- 50 Egawa T, Mishima K, Egashira N, Fukuzawa M, Abe K, Yae T, Iwasaki K, Fujiwara M. Impairment of spatial memory in kaolin-induced hydrocephalic rats is associated with changes in the hippocampal cholinergic and noradrenergic contents. *Behav Brain Res* 2002; **129**: 31–9
- 51 Kawamata T, Katayama Y, Tsuji N, Nishimoto H. Metabolic derangements in interstitial brain edema with preserved blood flow: selective vulnerability of the hippocampal CA3 region in rat hydrocephalus. *Acta Neurochir Suppl* 2003; **86**: 545–7
- 52 Klinge P, Mühlendyck A, Lee S, Lüdemann W, Groos S, Samii M, Brinker T. Temporal and regional profile of neuronal and glial cellular injury after induction of kaolin hydrocephalus. *Acta Neurochir Suppl* 2002; **81**: 275–7
- 53 Kondziella D, Eyjolfsson EM, Saether O, Sonnewald U, Risa O. Gray matter metabolism in acute and chronic hydrocephalus. *Neuroscience* 2009; **159**: 570–7
- 54 Shim I, Ha Y, Chung JY, Lee HJ, Yang KH, Chang JW. Association of learning and memory impairments with changes in the septohippocampal cholinergic system in rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Neurosurgery* 2003; **53**: 416–25
- 55 Dombrowski SM, Deshpande A, Dingwall C, Leichter A, Leibson Z, Luciano MG. Chronic hydrocephalus-induced hypoxia: increased expression of VEGFR-2+ and blood vessel density in hippocampus. *Neuroscience* 2008; **152**: 346–59
- 56 Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC, Pattisapu JV, Arendash GW. Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. *Exp Neurol* 1999; **155**: 109–17
- 57 Castejón OJ. Submicroscopic pathology of human and experimental hydrocephalic cerebral cortex. *Folia Neuropathol* 2010; **48**: 159–74
- 58 Sival DA, Felderhoff-Müser U, Schmitz T, Hoving EW, Schaller C, Heep A. Neonatal high pressure hydrocephalus is associated with elevation of pro-inflammatory cytokines IL-18 and IFN $\gamma$  in cerebrospinal fluid. *Cerebrospinal Fluid Res* 2008; **5**: 21
- 59 Botchkina GI, Meistrell ME 3rd, Botchkina IL, Tracey KJ. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med* 1997; **11**: 765–81
- 60 Maddahi A, Kruse LS, Chen QW, Edvinsson L. The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  receptors in cerebral arteries following cerebral ischemia in rat. *J Neuroinflammation* 2011; **8**: 107
- 61 Watters O, O'Connor JJ. A role for tumor necrosis factor- $\alpha$  in ischemia and ischemic preconditioning. *J Neuroinflammation* 2011; **8**: 87
- 62 Del Bigio MR. Calcium-mediated proteolytic damage in white matter of hydrocephalic rats? *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; **59**: 946–54
- 63 Klinge PM, Samii A, Mühlendyck A, Visnyei K, Meyer GJ, Walter GF, Silverberg GD, Brinker T. Cerebral hypoperfusion and delayed hippocampal response after induction of adult kaolin hydrocephalus. *Stroke* 2003; **34**: 193–9
- 64 Mangano FT, McAllister JP 2nd, Jones HC, Johnson MJ, Kriebel RM. The microglial response to progressive hydrocephalus in a model of inherited aqueductal stenosis. *Neurol Res* 1998; **20**: 697–704
- 65 Miller JM, McAllister JP 2nd. Reduction of astrogliosis and microgliosis by cerebrospinal fluid shunting in experimental hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 2007; **4**: 5
- 66 Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 2000; **113**: 3073–84
- 67 Kuno R, Yoshida Y, Nitta A, Nabeshima T, Wang J, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. The role of TNF- $\alpha$  and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes. *Brain Res* 2006; **1116**: 12–18
- 68 Cragolini AB, Volosin M, Huang Y, Friedman WJ. Nerve growth factor induces cell cycle arrest of astrocytes. *Dev Neurobiol* 2012; **72**: 766–76
- 69 Oderfeld-Nowak B, Orzyłowska-Sliwińska O, Soltys Z, Zaremba M, Januszewski S, Janeczko K, Mossakowski M. Concomitant up-regulation of astroglial high and low affinity nerve growth factor receptors in the CA1 hippocampal area following global transient cerebral ischemia in rat. *Neuroscience* 2003; **120**: 31–40
- 70 Ait-Ikhlef A, Hantaz-Ambroise D, Jacque C, Belkadi L, Rieger F. Astrocyte proliferation induced by wobbler astrocyte conditioned medium is blocked by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) neutralizing antibodies in vitro. *Cell Mol Biol* 1999; **4**: 393–400
- 71 Cui M, Huang Y, Tian C, Zhao Y, Zheng J. FOXO3 inhibits TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ -induced astrocyte proliferation: implication for reactive astrogliosis. *Glia* 2011; **59**: 641–54
- 72 Faber-Elman A, Lavie V, Schwartz I, Shaltiel S, Schwartz M. Vitronectin overrides a negative effect of TNF- $\alpha$  on astrocyte migration. *FASEB J* 1995; **9**: 1605–13

- 73 Yamagata K, Tagami M, Ikeda K, Tsumagari S, Yamori Y, Nara Y. Differential regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression during hypoxia and reoxygenation in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Glia* 2002; **37**: 1–7
- 74 Yamagata K. Pathological alterations of astrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats under ischemic conditions. *Neurochem Int* 2012; **60**: 91–8
- 75 Didier N, Romero IA, Créminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. Secretion of interleukin-1 $\beta$  by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor- $\alpha$  effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem* 2003; **86**: 246–54
- 76 Kimura K, Teranishi S, Fukuda K, Kawamoto K, Nishida T. Delayed disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in a manner dependent on NF- $\kappa$ B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**: 565–71
- 77 Landoni VI, Schierloh P, de Campos Nebel M, Fernández GC, Calatayud C, Laponi MJ, Isturiz MA. Shiga toxin 1 induces on lipopolysaccharide-treated astrocytes the release of tumor necrosis factor-alpha that alter brain-like endothelium integrity. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1002632
- 78 Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2003; **9**: 540–9
- 79 Shen L. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann NY Acad Sci* 2012; **1258**: 9–18
- 80 Ye D, Ma I, Ma TY. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- $\alpha$  modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**: G496–504
- 81 Tarkowski E, Tullberg M, Fredman P, Wikkelsö C. Normal pressure hydrocephalus triggers intrathecal production of TNF-alpha. *Neurobiol Aging* 2003; **24**: 707–14
- 82 Leinonen V, Menon LG, Carroll RS, Dello Iacono D, Grevet J, Jääskeläinen JE, Black PM. Cerebrospinal fluid biomarkers in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Int J Alzheimers Dis* 2011; **2011**: 312526
- 83 Cherian S, Thoresen M, Silver IA, Whitelaw A, Love S. Transforming growth factor-betas in a rat model of neonatal posthaemorrhagic hydrocephalus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004; **30**: 585–600
- 84 Douglas MR, Daniel M, Lagord C, Akinwunmi J, Jackowski A, Cooper C, Berry M, Logan A. High CSF transforming growth factor  $\beta$  levels after subarachnoid haemorrhage: association with chronic communicating hydrocephalus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; **80**: 545–51
- 85 Flood C, Akinwunmi J, Lagord C, Daniel M, Berry M, Jackowski A, Logan A. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in the cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage: titers derived from exogenous and endogenous sources. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 157–62
- 86 Galbreath E, Kim SJ, Park K, Brenner M, Messing A. Overexpression of TGF- $\beta$ 1 in the central nervous system of transgenic mice results in hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; **54**: 339–49
- 87 Heep A, Stoffel-Wagner B, Bartmann P, Benseler S, Schaller C, Groneck P, Obladen M, Felderhoff-Mueser U. Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- $\beta$ 1 are highly expressed in cerebrospinal fluid of premature infants with posthemorrhagic hydrocephalus. *Pediatr Res* 2004; **56**: 768–74
- 88 Kanaji M, Tada T, Kobayashi S. A murine model of communicating hydrocephalus: role of TGF- $\beta$ 1. *J Clin Neurosci* 1997; **4**: 51–6
- 89 Kitazawa K, Tada T. Elevation of transforming growth factor-beta 1 level in cerebrospinal fluid of patients with communicating hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 1994; **25**: 1400–4
- 90 Whitelaw A, Christie S, Pople I. Transforming growth factor- $\beta$ 1: a possible signal molecule for posthemorrhagic hydrocephalus? *Pediatr Res* 1999; **46**: 576–80
- 91 Wyss-Coray T, Feng L, Masliah E, Ruppe MD, Lee HS, Toggas SM, Rockenstein EM, Mucke L. Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor- $\beta$ 1. *Am J Pathol* 1995; **147**: 53–67
- 92 Johanson CE, Szmydynger-Chodobska J, Chodobski A, Baird A, McMillan P, Stopa EG. Altered formation and bulk absorption of cerebrospinal fluid in FGF-2-induced hydrocephalus. *Am J Physiol* 1999; **277**: R263–71
- 93 Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G. Transforming growth factor beta's 1, 2 and 3 inhibit proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer. *Brain Res* 1998; **795**: 301–6
- 94 Lindholm D, Castrén E, Kiefer R, Zafra F, Thoenen H. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 1992; **117**: 395–400
- 95 Vergeli M, Mazzanti B, Ballerini C, Gran B, Amaducci L, Massacesi L. Transforming growth factor-beta 1 inhibits the proliferation of rat astrocytes induced by serum and growth factors. *J Neurosci Res* 1995; **40**: 127–33
- 96 Krohn K, Rozovsky I, Wals P, Teter B, Anderson CP, Finch CE. Glial fibrillary acidic protein transcription responses to transforming growth factor- $\beta$ 1 and interleukin-1 $\beta$  are mediated by a nuclear factor-1-like site in the near-upstream promoter. *J Neurochem* 1999; **72**: 1353–61
- 97 Logan A, Berry M, Gonzalez AM, Frautschy SA, Sporn MB, Baird A. Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 1994; **6**: 355–63

- 98 Romão LF, Sousa V de O, Neto VM, Gomes FC. Glutamate activates GFAP gene promoter from cultured astrocytes through TGF- $\beta$ 1 pathways. *J Neurochem* 2008; **106**: 746–56
- 99 Sousa V de O, Romao L, Neto VM, Gomes FC. Glial fibrillary acidic protein gene promoter is differently modulated by transforming growth factor-beta 1 in astrocytes from

distinct brain regions. *Eur J Neurosci* 2004; **19**: 1721–30

*Received 17 July 2013*

*Accepted after revision 20 December 2013*

*Published online Article Accepted on 26 December 2013*

Luis-Manuel Rodríguez-Pérez, MSc, Patricia Páez, PhD, Isabel de Diego, PhD, Anibal Smith, MD, PhD, Ruth Roales-Buján, PhD, José-Manuel Pérez-Fígares, PhD, Antonio-J Jiménez, PhD (En segunda revisión) A defect in the development of the glial wedge is associated with agenesis of the corpus callosum in the hyh mouse with congenital hydrocephalus. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology





# Journal of Neuropathology and Experimental Neurology

## A defect in the development of the glial wedge is associated with agenesis of the corpus callosum in the hyh mouse with congenital hydrocephalus

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	A defect in the development of the glial wedge is associated with agenesis of the corpus callosum in the hyh mouse with congenital hydrocephalus
<b>Article Type:</b>	Original Study
<b>Keywords:</b>	hydrocephalus; corpus callosum; glial wedge; indusium griseum glial cells; neuroepithelium; development; hyh mouse
<b>Corresponding Author:</b>	Antonio J Jiménez, Ph.D. Universidad de Málaga Malaga, Malaga SPAIN
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidad de Málaga
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Luis M Rodríguez-Pérez, MSc
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Luis M Rodríguez-Pérez, MSc Patricia Páez, PhD Isabel de Diego, PhD Anibal Smith, MD, PhD Ruth Roales-Buján, PhD José-Manuel Pérez-Fígares, PhD Antonio J Jiménez, Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p>Agenesis of the corpus callosum in association with hydrocephalus was investigated in the hyh mouse model of congenital hydrocephalus. In this mouse, a defective program in the development of the neuroepithelium selectively affects glial wedge cells, one of the midline cell populations that guide the crossing of callosal axons. The consequence of this defect was studied in organotypic slice cultures from normal and hyh mice embryos. In slices from normal mice, the pioneering callosal axons arising from neurons in the cingulate cortex were traced across the interhemispheric midline. However, in the slices from hyh mice, these axons followed the wrong direction towards the ipsilateral lateral ventricle. Agenesis of the corpus callosum in the hydrocephalic hyh mouse is a malformative defect, which cannot be explained as a consequence of ventriculomegaly. Therefore, the abnormal development of the ventricular zone, which appears to be inherent to the etiology of some forms of congenital hydrocephalus, can explain the origin of agenesis of the corpus callosum.</p>



Antonio J Jiménez  
Department of Cell Biology, Genetics,  
and Physiology  
Faculty of Sciences  
University of Malaga  
Campus de Teatinos  
29071 Malaga, Spain  
E-mail: [ajjimenez@uma.es](mailto:ajjimenez@uma.es)  
Telephone: +34 952133343  
August 25th, 2014

Journal of Neuropathology and Experimental Neurology

Dear Editor

We are enclosing the ms entitled “**A defect in the development of the glial wedge is associated with agenesis of the corpus callosum in the hyh mouse with congenital hydrocephalus**”, by Luis M. Rodríguez-Pérez, Patricia Páez, Isabel de Diego, Anibal Smith, Ruth Roales-Buján, José Manuel Pérez-Figares, and Antonio J. Jiménez, to be considered for publication in Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.

The following is the contribution made by the authors:

AJJ, JMP-F, LMR-P, PP. Design of the experiments and prepared the ms.  
LMR-P, PP, AJJ. Immunocytochemistry, immunofluorescence, confocal microscopy, and DiI tracing in fixed tissue.  
LMR-P, PP, RRB. DiI tracing in organotypic culture.  
RRB. Genotyping.  
IdD, AS, PP, LMR-P. *In situ* hybridization.

I state that all the authors have seen and approved the ms and that housing, handling, care, and processing of the animals were carried out in accordance with the European and Spanish laws, and following the regulations approved by the Council of the American Physiological Society.

Hoping you will find the present ms suitable for publication in Journal of Neuropathology and Experimental Neurology,

I remain cordially yours,

Antonio J Jiménez, PhD  
Associate Professor

**A defect in the development of the glial wedge is associated with agenesis of the corpus callosum in the hyh mouse with congenital hydrocephalus**

Luis-Manuel Rodríguez-Pérez, MSc, Patricia Páez, PhD, Isabel de Diego, PhD, Anibal Smith, MD, PhD, Ruth Roales-Buján, PhD, José-Manuel Pérez-Fígares, PhD, Antonio-J Jiménez, PhD

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología (L-MR-P, PP, RR-B, J-MP-F, A-JJ), and Departamento de Anatomía y Medicina Legal (IdD, AS); Universidad de Málaga, Andalucía Tech, Malaga, Spain

*Running title:* Corpus callosum agenesis in the hyh mouse

*Corresponding author:* Antonio-J Jiménez. E-mail: [ajjimenez@uma.es](mailto:ajjimenez@uma.es). Telephone: +34 952 133 343; Fax +34 952 131 937. Address: Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología; Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos, Universidad de Málaga, Andalucía Tech; E-29071-Malaga, Spain

*Key words:* hydrocephalus, corpus callosum, glial wedge, indusium griseum glial cells, neuroepithelium, development, hyh mouse

Supported by grant PI12/0631 from *Instituto de Salud Carlos III* (Spain) to AJJ

**Abstract**

Agenesis of the corpus callosum in association with hydrocephalus was investigated in the *hyh* mouse model of congenital hydrocephalus. In this mouse, a defective program in the development of the neuroepithelium selectively affects glial wedge cells, one of the midline cell populations that guide the crossing of callosal axons. The consequence of this defect was studied in organotypic slice cultures from normal and *hyh* mice embryos. In slices from normal mice, the pioneering callosal axons arising from neurons in the cingulate cortex were traced across the interhemispheric midline. However, in the slices from *hyh* mice, these axons followed the wrong direction towards the ipsilateral lateral ventricle. Agenesis of the corpus callosum in the hydrocephalic *hyh* mouse is a malformative defect, which cannot be explained as a consequence of ventriculomegaly. Therefore, the abnormal development of the ventricular zone, which appears to be inherent to the etiology of some forms of congenital hydrocephalus, can explain the origin of agenesis of the corpus callosum.

## Introduction

The corpus callosum is the largest connective structure in the brain. Agenesis of the corpus callosum is present in at least 1:4,000 live births (1,2). Approximately 3-5% of neurodevelopmental disorders exhibit agenesis of the corpus callosum (3,4). In humans, agenesis can be caused by genetic and environmental factors (5). Genetic factors include chromosomal abnormalities and recognizable genetic syndromes (6).

Environmental factors include infections by viruses, toxic metabolic conditions, and blockage of axon growth (5). Agenesis of the corpus callosum occurs in several human congenital syndromes (7,8). In CRASH and Dandy-Walker syndromes, agenesis of the corpus callosum coexists with hydrocephalus (9,10). In a clinicopathological study, 32% of cases with agenesis of the corpus callosum also presented hydrocephalus (7).

Early in development of the corpus callosum, which occurs in the mouse at E15.5 (E, embryonic day), neurons located in the cingulate cortex project pioneering axons towards the contralateral cortex (11,12). These axons delineate a pathway used by neocortical axons to form the corpus callosum (12). Thus, from E16, these pioneering axons guide subsequent callosal axons from the neocortex to cross the midline. In human embryos, the pioneer axons cross at weeks 12-13 (13), and the corpus callosum is formed between weeks 14-21 (8,14-17).

The development of the corpus callosum requires a correct midline patterning, formation of telencephalic hemispheres, birth and specification of commissural neurons, and axon guidance across the midline towards their final target in the contralateral hemisphere (5). Midline cell populations play key roles in the formation of the corpus callosum. These populations include the midline zipper glia, the glial wedge, the indusium griseum glia, and the subcallosal sling (18) (Fig. 1A). These cells have been described in human (8,19) and mouse (20-22) embryos, located rostral to the lamina terminalis in the midline in continuity with the dorsal interhemispheric fissure (23). The subcallosal sling and the midline zipper glia are most likely the equivalent of the massa commissuralis at the tenth week of gestation in human development (13,24), which becomes the bed for the commissural axons of the corpus callosum.

The glial wedge and the indusium griseum glial cells are located ventral and dorsal to the corpus callosum, respectively (22). In the mouse, the glial wedge cells begin to be

formed at E13 (25). They can be detected from E14 (23), and appear to be developed at E15 (22), just before the projection of the callosal pioneering axons. In humans, the glial wedge cells are detected by week 14 (8). The glial wedge cell bodies are located in the ventricular zone of the lateral ventricles, at the corticoseptal boundary, and send long radial-glia-like processes towards the brain midline. The glial wedge cells and the indusium griseum glial cells are guidepost cells that act as sources of guidance cues that prevent axons from leaving the tract and entering adjacent structures (18). The glial wedge and the indusium griseum glial cells produce molecules such as the chemorepellants Slit-2 (8,18–22,26–30), Wnt5a (31), and Draxin (32). Thus, these cells generate a lane that is used by axons to cross the midline to form the corpus callosum (8,19–21,26–29). When the glial wedge cells are experimentally excised, the corpus callosum is not formed (22).

The *hyh* mutant mouse (*hydrocephalus with hop gait*) (33) exhibits agenesis of the corpus callosum (34,35) and develops hydrocephalus with an interhemispheric cyst (33,36). The origin of hydrocephalus in the *hyh* mouse has been associated with defects taking place during the development of the ventricular zone (34,35,37,38). The aim of the present study was to investigate, using the *hyh* animal model, the mechanisms that underlie the etiology of congenital hydrocephalus and agenesis of the corpus callosum. We found that, at the moment of the corpus callosum development, the glial wedge cells in the *hyh* mouse were selectively affected by the defective developmental program of the ventricular zone. The pioneering callosal axons arose from neocortical neurons in the *hyh* mouse, but failed to enter the crossing lane that should be delimited by the glial wedge and the indusium griseum glial cells.

## Materials and methods

### *Animals*

*Hyh* mutant mice (B6C3Fe-a/a-*hyh*/J) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and bred into a colony at the University of Malaga, Spain. Housing, handling, care and processing of animals was carried out according to European and

Spanish laws (DC 86/609/CEE and RD 1201/2005) and following the regulations approved by the council of the American Physiological Society. Gestational day 0.5 (E0.5) was designated when the presence of a vaginal plug was evident in a pregnant female. Pregnant dams at gestational days between E15.5 to E18.5 were sacrificed by cervical dislocation and the embryos were removed by laparotomy. All animals used in this work were genotyped as described in Bátiz et al (35). Mice homozygous for the mutated  $\alpha$ -SNAP protein (*Snap*<sup>-/-</sup>) were termed hyh mice, and normal mice (*Snap*<sup>+/+</sup>) termed wild type (wt). Heterozygous mice for  $\alpha$ -SNAP were used only to obtain homozygous hyh embryos.

### *Immunocytochemistry and immunofluorescence*

Brains of hyh and wt fetuses (E15.5 to E18.5), and brains of hyh and wt mice at 1 to 4 postnatal days (P1 to P4) were processed for hematoxylin-eosin staining, immunocytochemistry, and immunofluorescence using frontal and sagittal sections. Sampling was as follows: E14.5, 10 hyh and 13 wt; E15.5, 10 hyh and 10 wt; E16.5, 10 hyh and 10 wt; E17.5, 8 hyh and 8 wt; E18.5, 8 hyh and 8 wt; P1, 8 hyh and 8 wt; P2, 8 hyh and 8 wt; P3, 8 hyh and 8 wt; and P4, 19 hyh and 14 wt. Whenever possible, mice belonging to the same litter were processed simultaneously for comparing hyh and wt mice at the same age.

Embryos and postnatal mice were decapitated. The brains were dissected out and fixed for two to four days in Bouin fixative solution or 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Bouin-fixed brains were embedded in paraffin and sections (10  $\mu$ m thick) were obtained. Paraformaldehyde-fixed brains were sliced with a vibratome (50  $\mu$ m thick sections).

Paraffin and vibratome sections were processed for immunocytochemistry/immunofluorescence using the following primary antibodies: (i) rabbit anti-GFAP (1:100 dilution, Biogenesis, Poole, UK); (ii) mouse anti-NCAM (undiluted, 5B8 clone, Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB, Iowa city, IA); (iii) mouse anti-radial glial cell marker (1:200 dilution; clone RC2, DSHB); (iv) mouse anti-nestin (1:200 dilution, clone Rat-401, DSHB); (v) rabbit anti-nestin (1:4,000 dilution, ab5968 Abcam, Cambridge, UK); (vi) rabbit anti-calretinin (1:3,000 dilution,

7699/4, Swant Antibodies, Bellizona, Switzerland); (vii) rabbit anti-BLBP (1:3,000 dilution, generously donated by Dr. N. Heintz); (viii) rabbit anti-pancadherin (N-cadherin labeling; 1:500 dilution, C3678, Sigma, St Louis, MO). For immunofluorescence, appropriate AlexaFluor (Molecular Probes, Carlsbad, CA) or biotin-labeled secondary antibodies (Dako, Glostrup, Denmark) were used. Biotin-labeled secondary antibodies were detected using ExtrAvidin-peroxidase (Sigma). Histochemistry for peroxidase was developed using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) as electron donor. Ammonium nickel sulfate was added to intensify the DAB reaction in some sections. The antibodies against calretinin and RC2 were used only in vibratome-sliced sections. In the paraffin sections, heat-induced antigen retrieval was performed in 50 mM citrate buffer at pH 6.0 prior to immunolabelling. Omission of the primary antibody was used as a control for the immunoreaction.

#### *In situ hybridization*

Embryos at E14.5 to E18.5 and newborns at 1 to 7 days of postnatal age (P1 to P7) were processed for non-radioactive in situ hybridization using digoxigenin labeled riboprobes. Sampling was as follows: E14.5, 18 hyh and 18 wt; E15.5, 18 hyh and 18 wt; E16.5, 15 hyh and 15 wt; E17.5, 15 hyh and 15 wt; E18.5, 15 hyh and 15 wt; P1, 15 hyh and 15 wt; P4, 12 hyh and 12 wt; P7, 12 hyh and 12 wt. Mouse embryos were fixed by immersion or vascular perfusion with 4% buffered paraformaldehyde. Then, they were kept at 4°C until dehydration in methanol/PBT (PBS, 0.1% Tween-20). After rehydration, the telencephalon was dissected out and immersed into a gelatin/albumin solution (30% albumin and 0.5% gelatin in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3) containing 1.25% glutaraldehyde. Vibratome sections (200 µm thickness) were obtained, dehydrated in methanol/PBT, and kept at -20°C overnight. Single in situ hybridization was performed as described for whole-mount preparations (39). Probes were labeled with digoxigenin-UTP (Boehringer, Ingelheim, Germany) using the Riboprobe Gemini System II Kit (Promega, Madison, WI). Labeled probes were added to the hybridization buffer at a concentration 1-2 mg/ml. Sections were hybridized at 70°C overnight. An anti-digoxigenin-alkaline phosphatase-coupled antibody was used to detect the probes (1:2,000; 11-093274916, Boehringer). Alkaline phosphatase activity was revealed using



NBT/BCIP as a substratum. In all cases, nonspecific signal was not observed with the sense probes. Stained sections were flat-mounted on poly-L-Lysine-treated slides with 80% glycerol in PBT. Riboprobes for Tag1 (transient axonal glycoprotein), Tbr1 (T-box, brain, 1), and Tis21 (TPA-inducible sequences 21) were produced as described by Denaxa et al (40) and Bulfone et al (41), respectively. Tis21 is an anti-proliferative gene involved in the control of cell cycle progression, specifically in the G1 to S transition, and is specifically expressed in neurogenic precursor cells but not in postmitotic neurons during embryonic neurogenesis. Tis21 protein switches neuroepithelial cells to their non-proliferative stage (42). Sections were photographed under light microscopy and in 1  $\mu\text{m}$  thick planes using confocal microscopy as described by Jékely and Arendt (43).

#### *DiI-tracing of callosal axons in fixed brains*

Embryos were obtained as described above from E14.5 to E18.5: E14.5, 2 hyh and 2 wt; E15.5, 4 hyh and 3 wt; E16.5, 4 hyh and 3 wt; E17.5, 4, hyh and 3 wt; E18.5, 2 hyh and 2 wt; and fixed in 4% buffered paraformaldehyde. Very small crystals of DiI (1,1-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; D-3911, Molecular probes) were carefully inserted into the frontal cortex of partially dissected fixed embryos. Then, brains were immersed in fresh 4% buffered paraformaldehyde and incubated at 37°C for 3 weeks. Finally, consecutive frontal sections (300  $\mu\text{m}$  thick) were sliced with a vibratome and stored at 4°C. DiI-tracing was observed under epifluorescence.

#### *DiI-tracing of the pioneering axons in organotypic culture of brain slices*

Brains of embryos at E14.5 (9 wt and 9 hyh) and E15.5 (9 wt and 12 hyh) were dissected out while immersed in ice-cold L15/F12 medium, pH 7.3 (50% Leibovitz's L15 medium, Life Technologies, Carlsbad, CA; 50% F12 nutrient mixture, Life Technologies). Then, brains were immersed in 3% low-melting agarose (Gellyphor, Euroclone, Sizzano, Italy) to obtain frontal 300  $\mu\text{m}$  thick slices with a vibratome. Sections were collected in ice-cold L15/F12 medium and transferred onto filter inserts

(31.5  $\mu\text{m}$  diameter, 0.4  $\mu\text{m}$  pore size; Merck Millipore, Billerica, MA), in dishes containing 1 ml of sterile filtered medium with serum (DMEM containing 8% F12 nutrient, 1% N-2 supplement, 15% glucose, 1% penicillin- streptomycin, 0.5% L-glutamine, and 5% heat inactivated fetal calf serum). After 1 h in a sterile incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), the medium was substituted for neurobasal medium, pH 7.3 (Life Technologies), containing 2% B27 supplement (Life Technologies), 15% glucose, 1% penicillin-streptomycin (Sigma), 0.5% L-glutamine (Sigma), and 2.5% heat inactivated fetal calf serum (Life Technologies). Immediately after this step, a very small crystal of DiI was placed into the cingulate cortex of the brain slices, and they were incubated in sterile conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) for 48 h. Finally, slices were fixed in 4% buffered paraformaldehyde at 4°C for 24 h. Some fixed slices were processed for immunofluorescence using the anti-GFAP antibody.

## Results

### *Failed development of the corpus callosum in the hyh mouse with mild hydrocephalus*

In the hyh mouse, between E15.5 and E16.5 when the corpus callosum develops, hydrocephalus was mild. The lateral ventricles were not enlarged or collapsed, and a cyst in the third ventricle between the telencephalic hemispheres was not perceptible (Fig. 2F-J; compare with a wt mouse in Fig. 2A-E). In wt mice, the corpus callosum was detectable at E16.5 (Fig. 2K, L), and appeared well developed at E17.5 (Fig. 2O, P). In contrast, while the anterior commissure was present in the hyh mouse at these stages, the corpus callosum and the hippocampal commissure were absent (Fig. 2M, N, Q, R). At postnatal ages in hyh mouse, the fibers that should form the corpus callosum were observed in Probst's bundles (Fig. 2V), or located in the midline white matter (Fig. 2V-Y; compare with a wt mouse in Fig. 2Z). Tracing the callosal fibers with DiI (Fig. 2S) in fixed tissue of hyh embryos at E17.5 showed the absence of contralateral hemispheric connections, and therefore agenesis of the corpus callosum. In these hyh embryos, most of the DiI-labeled fibers were found in the ipsilateral hemisphere

directed ventrally towards the lateral ventricle (Fig. 2U; compare with the wt in Fig. 2T).

#### *Presence of projecting neurons in the cingulate and frontal cortices of the hyh mouse*

We then labeled neurons expressing Tbr1 mRNA in the neocortex of wt and hyh mice at E14.5 (Fig. 3B; compare with a normal mouse in Fig. 3A), a stage at which these neurons should project pioneering axons. The probes for Tag1 mRNA hybridized to cortical neurons in both wt and hyh mice at E15.5 (Fig. 3C, D).

#### *Selective disruption of glial wedge development in the hyh mouse*

On the first postnatal days, when development of the corpus callosum has concluded, the glial cells of the indusium griseum still remain detectable in wt and hyh mice (Fig. 4A, B). These glial cells appeared GFAP+, expressing Tis21 (Fig. 4F, G), and displaying radial long basal processes (Fig. A, B, inserts).

The subcallosal sling cells were detected expressing calretinin, as described by Shu et al (44). In wt and hyh mice, the subcallosal sling cells were detected as a row of cells dorsally bordering the septum (Fig. 4D, E).

In the wt mouse at E15.5, the RC2 antibody and antibodies against GFAP, nestin, and BLBP labeled the glial wedge cells, which display a radial arrangement and long basal cell processes (Fig. 5E, F, I). Later, during development of the corpus callosum and at postnatal ages, radial cells in the glial wedge developed into GFAP+ astrocytes (Figs. 4A, 6D). In the hyh mouse at E15.5, the area of the glial wedge was specifically disrupted, but not the neighboring ventricular zone at the lateral ventricle (Fig. 5B, C; compare with the wt littermate in Fig. 5A). The pancadherin antibody, which labels the N-cadherin cell adhesion molecule, revealed the disruption of the junctions between glial wedge cells (Fig. 5D). Nestin labeling also revealed a disruption in the radial organization of the glial wedge cells in the hyh mouse at E15.5 (Fig. 5G, H, J; compare with the wt in Fig. 5E, F, I). The disruption of the epithelial organization of the glial wedge allowed the abnormal presence of tubulin  $\beta$ III+ cell processes in the ventricular

zone (Fig. 5O, P; compare with the wt in Fig. 5M, N). In the wt mouse at E15.5, Tis21 was detected in the specialized cells of the glial wedge, similar to the neighboring neuroepithelium (Fig. 5Q, R). The selective disorganization of the glial wedge was also shown with the labeling of Tis21 riboprobes (Figs. 4G and 5S, T; compare with a wt in Figs. 4F and 5Q, R).

#### *Failure of interhemispheric midline crossing of pioneering axons in the hyh mouse*

The pioneering callosal axons were labeled with anti GAP43, allowing their detection. Axons arose from the cingulate cortex of wt and hyh mice at E15.5 (Fig. 6A-D). In the hyh mouse, instead of directing towards the interhemispheric midline, several of the callosal pioneering axons were abnormally found turning towards the disrupted glial wedge (Fig. 6C, D; compare with the wt situation in Fig. 6A, B). Application of DiI into the cingulate cortex of brain slices from wt and hyh mice, obtained at E14.5 and E15.5 and maintained under organotypic culture conditions (Fig. 6E), allowed the labeling of the growing pioneering callosal axons. In wt brain slices, after 24 or 48 hours *in vitro*, those tagged axons were detected crossing the midline (Fig. 6F). In contrast, in brain slices from hyh mice, although these tagged axons were found elongating, at the level of the corticoseptal boundary they turned towards the ipsilateral lateral ventricle, thus failing to cross the midline (Fig. 6G).

## **Discussion**

In the present investigation, we studied the hyh mutant mouse model, which presents with congenital hydrocephalus with an interhemispheric cyst. We conclude that agenesis of the corpus callosum is not due to the presence of an interhemispheric cyst or ventriculomegaly. Instead, the development of the corpus callosum occurs at stages when the interhemispheric cyst was not still present and the lateral ventricles were collapsed. In fact, ventriculomegaly in the lateral ventricles occurs at postnatal ages in

the *hyh* mouse. However, alterations in glial wedge cell development in the neuroepithelium can explain the corpus callosum agenesis.

The radial glial cells constitute a heterogeneous cell population located in the neuroepithelium that supports cell migration during brain development (45,46). The glial wedge cells are considered part of the radial glial cell scaffold of the cerebral cortex, expressing markers such as the antigen recognized by the RC2 antibody, BLBP and the GLAST glutamate transporter (25). In the present study, this subpopulation of radial glial cells was found specifically affected by an intrinsic defective program of development of the neuroepithelium, which has been previously described in the *hyh* mouse (34,35,37,38). This program follows a temporo-spatial pattern according to the cell differentiation in the neuroepithelium/ventricular zone (37). The cells of the glial wedge differentiate earlier than the neighboring neuroepithelium, and express GFAP prior to other regions of the dorsal telencephalon (22,25). The glial wedge cells can be altered during the program of cell differentiation in the neuroepithelium differently from the neighboring areas. In the *hyh* mouse at E15.5, glial wedge organization is disrupted and these cells do not display radial morphology. Later, at postnatal ages, glial wedge cells are absent. In the *hyh* mouse, the *Napa* gene that encodes the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein alpha (alpha-SNAP) is mutated (47,48). The exact mechanism by which this mutation causes defective development of the neuroepithelium is not known. A possible explanation involves problems in the location of cell junctions (47,49). It is plausible that such problems are also implied in the disorganization of the ventricular zone in the glial wedge in the *hyh* mouse before the neighboring areas.

In contrast to the glial wedge cells, the indusium griseum glial cells are astrocytes that are not located in the neuroepithelium in the ventricular zone. Instead, they are placed underneath the medial pial membrane. Indusium griseum glial cells originate at a later developmental stage with respect to the glial wedge (25), from the translocation of radial glial cells (18,50). Here, we found that the indusium griseum glial cells are developed in the *hyh* mouse.

In the present study, we detected the presence of neocortical neurons in *wt* and *hyh* mice expressing the *Tbr1* transcription factor, which is implied in their differentiation (41,51). These neurons project pioneering axons into the callosal projection (11). In

both wt and hyh mice, these neurons also express the Tag1 molecule. Tag1 is a member of the immunoglobulin superfamily that plays a role in axon outgrowth, migration and fasciculation during development (52). Tag1 modulates the response to diffusible guidance molecules (53), influencing growth cone behavior during axon pathfinding (54), and is present in the fibers forming the corpus callosum (55,56). However, in the hyh mouse, when the growth of callosal pioneering axons was experimentally tagged by applying DiI in organotypic slice culture, the traced axons were not able to cross the midline after 24 hours. In contrast, they turned in the wrong direction towards the ipsilateral lateral ventricle. Accordingly, immunostaining of pioneering axons using anti-GAP43 in fixed brain sections revealed the existence of incorrectly directed axons in the hyh mouse. This body of evidence suggests the existence of guidance problems for such axons. Both glial wedge cells and indusium griseum glial cells are known sources of chemorepellant molecules such as Slit-2 (28). Thus, they create a lane for guiding axons to cross the midline (28). The presence of the repellent effect from glial cells of the indusium griseum and its absence from the glial wedge could explain the defective direction taken by the pioneering axons (Fig. 6H).

In humans, agenesis of the corpus callosum is an anatomical feature present in several diseases (57). In fact, it is associated with over 50 different congenital human syndromes (8) that can present different etiologies. There are a number of genes and genetically uncharacterized human syndromes that are associated with corpus callosum agenesis (57,58). Some of them also exhibit hydrocephalus. Therefore, it is plausible that in some cases, molecules or mechanisms involved in corpus callosum formation are also involved in hydrocephalus. For instance, the disruption or mutation of *Nfia* and *Nfib* genes, which are essential for the midline glia involved in the development of the corpus callosum, causes callosal agenesis, defects in the hippocampal commissure, and hydrocephalus at the same stage of development (44,59,60).

Barkovich et al. (61) have described a classification of human cases with callosal agenesis and interhemispheric cysts. These authors proposed the hyh mouse as a model for studying the development of Type 1 cysts. The hyh mouse presents a moderate communicating hydrocephalus during development (37) at the moment of the formation of the corpus callosum. Later, the hyh mouse develops an interhemispheric cyst covered with the ependyma that forms the dorsal third ventricle (36). The present results show that ventriculomegaly and third ventricle cysts are formed when the main part of the

corpus callosum should already be developed. In fact, the symptoms of hydrocephalus aggravation take place during the first postnatal week, when hydrocephalus in the hyh mouse becomes non-communicating (38,62). Therefore, the absence of formation of the corpus callosum can be considered malformative instead of a malformation due to the development of an interhemispheric cyst or ventriculomegaly.

We propose that, in some human syndromes, a problem in the development of ventricular zone cell populations may underlie the coexistence of hydrocephalus and agenesis of the corpus callosum.

## References

1. Guillem P, Fabre B, Cans C, et al. Trends in elective terminations of pregnancy between 1989 and 2000 in a French county (the Isère). *Prenat Diagn* 2003;23:877-83
2. Wang LW, Huang CC, Yeh TF. Major brain lesions detected on sonographic screening of apparently normal term neonates. *Neuroradiology* 2004;46:368-73
3. Bodensteiner J, Schaefer GB, Breeding L, Cowan L. Hypoplasia of the corpus callosum: a study of 445 consecutive MRI scans. *J Child Neurol* 1994;9:47-9
4. Jeret JS, Serur D, Wisniewski K, Fisch C. Frequency of agenesis of the corpus callosum in the developmentally disabled population as determined by computerized tomography. *Pediatr Neurosci* 1985-1986;12:101-3
5. Paul LK, Brown WS, Adolphs R, et al. Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:287-99
6. Bedeschi MF, Bonaglia MC, Grasso R, et al. Agenesis of the corpus callosum: clinical and genetic study in 63 young patients. *Pediatr Neurol* 2006;34:186-93
7. Jeret JS, Serur D, Wisniewski KE, Lubin RA. Clinicopathological findings associated with agenesis of the corpus callosum. *Brain Dev* 1987;9:255-64
8. Ren T, Anderson A, Shen W-B, et al. Imaging, anatomical, and molecular analysis of callosal formation in the developing human fetal brain. *Anat Rec* 2006;288:191-204
9. Sasaki-Adams D, Elbabaa SK, Jewells V, et al. The Dandy-Walker variant: a case series of 24 pediatric patients and evaluation of associated anomalies, incidence of hydrocephalus, and developmental outcomes. *J Neurosurg Pediatr* 2008;2:194-9
10. D'Addario V, Pinto V, Di Cagno L, Pintucci A. The midsagittal view of the fetal brain: a useful landmark in recognizing the cause of fetal cerebral ventriculomegaly. *J Perinat Med* 2005;33:423-7
11. Koester SE, O'Leary DD. Axons of early generated neurons in cingulate cortex pioneer the corpus callosum. *J Neurosci* 1994;14:6608-20
12. Rash BG, Richards LJ. A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum. *J Comp Neurol* 2001;434:147-57
13. Rakic P, Yakovlev PI. Development of the corpus callosum and cavum septi in man. *J Comp Neurol* 1968;132:45-72
14. Malinger G, Zakut H. The corpus callosum: normal fetal development as shown by transvaginal sonography. *AJR Am J Roentgenol* 1993;161:1041-3
15. Kier EL, Truwit CL. The normal and abnormal genu of the corpus callosum: an evolutionary, embryologic, anatomic, and MR analysis. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996;17:1631-41
16. Kier EL, Truwit CL. The lamina rostralis: modification of concepts concerning the anatomy, embryology, and MR appearance of the rostrum of the corpus callosum. *AJNR Am J Neuroradiol* 1997;18:715-22
17. Achiron R, Achiron A. Development of the human fetal corpus callosum: a high-resolution, cross-sectional sonographic study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;18:343-7
18. Lindvall C, Fothergill T, Richards LJ. Commissure formation in the mammalian forebrain. *Curr Opin Neurobiol* 2007;17:3-14
19. Lent R, Uziel D, Baudrimont M, Fallet C. Cellular and molecular tunnels surrounding the forebrain commissures of human fetuses. *J Comp Neurol* 2005;483:375-82
20. Silver J, Lorenz SE, Wahlsten D, Coughlin J. Axonal guidance during



development of the great cerebral commissures: descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways. *J Comp Neurol* 1982;210:10-29

21. Silver J, Ogawa MY. Postnatally induced formation of the corpus callosum in acallosal mice on glia-coated cellulose bridges. *Science* 1983;220:1067-9
22. Shu T, Richards LJ. Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum. *J Neurosci* 2001;21:2749-58
23. Silver J, Edwards MA, Levitt P. Immunocytochemical demonstration of early appearing astroglial structures that form boundaries and pathways along axon tracts in the fetal brain. *J Comp Neurol* 1993;328:415-36
24. Barkovich AJ, Norman D. Anomalies of the corpus callosum: correlation with further anomalies of the brain. *AJR Am J Roentgenol* 1988;151:171-9
25. Shu T, Puche AC, Richards LJ. Development of midline glial populations at the corticoseptal boundary. *J Neurobiol* 2003;57:81-94
26. Booth GE, Kinrade EF, Hidalgo A. Glia maintain follower neuron survival during *Drosophila* CNS development. *Development* 2000;127:237-44
27. Hidalgo A, Booth GE. Glia dictate pioneer axon trajectories in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* 2000;127:393-402
28. Shu T, Sundaresan V, McCarthy MM, Richards LJ. Slit2 guides both precrossing and postcrossing callosal axons at the midline in vivo. *J Neurosci* 2003;23:8176-84
29. Barresi MJF, Hutson LD, Chien C-B, Karlstrom RO. Hedgehog regulated Slit expression determines commissure and glial cell position in the zebrafish forebrain. *Development* 2005;132:3643-56
30. Unni DK, Piper M, Moldrich RX, et al. Multiple Slits regulate the development of midline glial populations and the corpus callosum. *Development* 2012;365:36-4
31. Keeble TR, Halford MM, Seaman C, et al. The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J Neurosci* 2006;26:5840-8
32. Islam SM, Shinmyo Y, Okafuji T, Su Y, Naser IB, Ahmed G, et al. Draxin, a repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. *Science* 2009;323:388-93
33. Bronson RT, Lane PW. Hydrocephalus with hop gait (hyh): a new mutation on chromosome 7 in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 1990;54:131-6
34. Paez P, Bátiz L-F, Roales-Buján R, et al. Patterned neuropathologic events occurring in hyh congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:1082-92
35. Batiz LF, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez LM, et al. A simple PCR-based genotyping method for M105I mutation of alpha-SNAP enhances the study of early pathological changes in hyh phenotype. *Mol Cell Probes* 2009;23:281-90
36. Perez-Figares JM, Jiménez AJ, Pérez-Martín M, et al. Spontaneous congenital hydrocephalus in the mutant mouse hyh. Changes in the ventricular system and the subcommissural organ. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:188-202
37. Jimenez AJ, Tomé M, Páez P, et al. A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:1105-19
38. Wagner C, Batiz LF, Rodríguez S, et al. Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:1019-40
39. Wilkinson DG. *In situ hybridization: a practical approach*. Oxford; New York: IRL Press at Oxford University Press 1992

40. Denaxa M, Chan CH, Schachner M, et al. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 2001;128:4635-44
41. Bulfone A, Smiga SM, Shimamura K, et al. T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron* 1995;15:63-78
42. Iacopetti P, Michelini M, Stuckmann I, et al. Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4639-44
43. Jékely G, Arendt D. Cellular resolution expression profiling using confocal detection of NBT/BCIP precipitate by reflection microscopy. *BioTechniques* 2007;42:751-5
44. Shu T, Butz KG, Plachez C, et al. Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in Nfia knock-out mice. *J Neurosci* 2003;23:203-12
45. Rakic P. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex* 2003;13:541-9
46. Pinto L, Götz M. Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol* 2007;83:2-23
47. Chae TH, Kim S, Marz KE, et al. The hyh mutation uncovers roles for alpha Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet* 2004;36:264-70
48. Hong H-K, Chakravarti A, Takahashi JS. The gene for soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein alpha is mutated in hydrocephaly with hop gait (hyh) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:1748-53
49. Rodriguez EM, Guerra MM, Vío K, et al. A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. *Biol Res* 2012;45:231-41
50. Smith KM, Ohkubo Y, Maragnoli ME, et al. Midline radial glia translocation and corpus callosum formation require FGF signaling. *Nat Neurosci* 2006;9:787-97
51. Hevner RF, Shi L, Justice N, et al. Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 2001;29:353-66
52. Karagozeos D. Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Front Biosci* 2003;8:s1304-1320
53. Law CO, Kirby RJ, Aghamohammadzadeh S, Furley AJW. The neural adhesion molecule TAG-1 modulates responses of sensory axons to diffusible guidance signals. *Development* 2008;135:2361-71
54. Wolman MA, Sittaramane VK, Essner JJ, et al. Transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1) and laminin-alpha1 regulate dynamic growth cone behaviors and initial axon direction in vivo. *Neural Develop* 2008;3:6
55. Fujimori KE, Takeuchi K, Yazaki T, et al. Expression of L1 and TAG-1 in the corticospinal, callosal, and hippocampal commissural neurons in the developing rat telencephalon as revealed by retrograde and in situ hybridization double labeling. *J Comp Neurol* 2000;417:275-88
56. Savvaki M, Panagiotaropoulos T, Stamatakis A, et al. Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes. *Mol Cell Neurosci* 2008;39:478-90
57. Raybaud C. The corpus callosum, the other great forebrain commissures, and the septum pellucidum: anatomy, development, and malformation. *Neuroradiology* 2010;52:447-77
58. Richards LJ, Plachez C, Ren T. Mechanisms regulating the development of the

- corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin Genet* 2004;66:276-89
59. Das Neves L, Duchala CS, Tolentino-Silva F, et al. Disruption of the murine nuclear factor I-A gene (Nfia) results in perinatal lethality, hydrocephalus, and agenesis of the corpus callosum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11946-51
60. Steele-Perkins G, Plachez C, Butz KG, et al. The transcription factor gene Nfib is essential for both lung maturation and brain development. *Mol Cell Biol* 2005;25:685-98
61. Barkovich AJ, Simon EM, Walsh CA. Callosal agenesis with cyst: a better understanding and new classification. *Neurology* 2001;56:220-7
62. Bátiz LF, Páez P, Jiménez AJ, et al. Heterogeneous expression of hydrocephalic phenotype in the hyh mice carrying a point mutation in alpha-SNAP. *Neurobiol Dis* 2006;23:152-68

## Figure legends

**Figure 1.** Midline cell populations implicated in the development of the corpus callosum. The pioneering callosal axons (*blue*) arise from the cingulate cortex and cross the midline under the guidance of glial cells of the indusium griseum and the glial wedge. These axons establish a pathway followed by the axons departing from the neocortex (*red*) and that will constitute the corpus callosum.

**Figure 2.** The corpus callosum in wt and hyh mice. **A-R.** Hematoxylin-eosin staining of frontal sections (**A-K, M, O, Q**) in the rostral to caudal direction and midsagittal sections of the telencephalon (**L, N, P, R**), from wt (**A-E, K, L, O, P**) and hyh (**F-J, M, N, Q, R**) mice at E15.5 (**A-J**), E16.5 (**K-N**), and E17.5 (**O-R**). The anterior commissure (AC, in **I**) is developed in the hyh mouse at E15.5 and an interhemispheric cyst is not yet formed (*asterisks*, in **G** and **H**). **S-U** Application of the DiI tracer in the neocortex of fixed brains from wt and hyh mice at E17.5. The DiI crystal was placed in the location indicated in **S**. In the wt mouse, callosal fibers are detected crossing the midline (*asterisk*, in **T**) and therefore forming the corpus callosum. These fibers are found directed towards the ipsilateral lateral ventricle in the hyh mouse (*arrow*, in **U**), where the corpus callosum was absent. **V** Frontal section from a hyh mouse at P3 immunostained for NCAM showing labeling of Probst bundles (*PB*) and the absence of the corpus callosum. Some callosal fibers are directed towards the midline without crossing it (*arrowhead*). **X** Sagittal section of the telencephalon from a hyh mouse at P4 showing the callosal fibers in the midline not crossing (delimited by *arrowheads*). The *broken line* shows the level of the frontal section shown in **Y**. *Asterisk* in **X**, cavum of the septum pellucidum. **Y** Frontal section of the telencephalon from a hyh mouse at P2 with tubulin  $\beta$ III (*Tub- $\beta$ III*) immunostaining showing the presence of positive fibers in the ipsilateral white matter (delimited with *arrowheads*), which failed to cross the midline. *Insert* in **Y** corresponds to a detail of an adjacent section with GFAP immunostaining. **Z** Equivalent level to that shown in **Y** but corresponding to a wt mouse at P2 with tubulin  $\beta$ III immunostaining. The bundle of fibers in the white matter is absent. *Abbreviations:* 3V, third ventricle; AC, anterior commissure; CC, corpus callosum; FX, fornix; HIC, hippocampal commissure; LV, lateral ventricle. Scale bars: A-J, K, M, O-R, V, X, 200  $\mu$ m; L, N, T, U, Y, insert in Y, Z, 100  $\mu$ m.

**Figure 3.** The presence of cortical neurons implicated in corpus callosum formation in wt (**A, C**) and hyh (**B, D**) mice at E14.5 (**A, B**) and E15.5 (**C, D**). In situ hybridization with mRNA probes in frontal sections. **A, B** The *Tbr1* probe labeled neurons in the cingulate cortex in wt and hyh mice (*arrowheads*). **C, D** Projecting neurons in the neocortex were labeled with the *Tag1*-probe in wt and hyh mice. Scale bars: A-D, 50  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4.** Midline cell populations implicated in corpus callosum development. **A-C** Frontal sections of the telencephalon from wt (**A**) and hyh (**B, C**) mice at P2 with GFAP immunostaining (**A, B**) and hematoxylin-eosin staining (*HE*, **C**). **B** and **C** are adjacent sections. The indusium griseum glial cells (*IG*, in **A** and **B**) are present in both wt and hyh mice, but the glial wedge derived cells are absent in the hyh mouse (*open arrows*, compare **A** and **B**). Midline zipper glia appears poorly developed in the hyh mouse (*black arrows*, compare **A** and **B**). In the hyh mouse, there are Probst's bundles (*PB*, in **B** and **C**) and abnormal fibers in the midline (*asterisks*, in **B** and **C**). *Inserts* in **A** and **B** show details of the indusium griseum glial cells displaying GFAP immunostaining in the wt and hyh mice at P2. **D, E** Frontal sections from wt (**D**) and hyh (**E**) mice at E15.5 with calretinin immunostaining. *Arrows* point to the neurons of the subcallosal sling. **F, G** *Tis21* mRNA labeling of the indusium griseum glial cells (*IG*) and the glial wedge (*open arrows*) in frontal sections from wt (**F**) and hyh (**G**) mice at E15.5. Scale bars: A, B, 200  $\mu\text{m}$ ; *Inserts* in A and B, 50  $\mu\text{m}$ ; C-G, 100  $\mu\text{m}$ .

**Figure 5.** Glial wedge of wt and hyh mice at E15.5. **A-C** Frontal sections of the telencephalon from wt (**A**) and hyh (**B-D**) mice with hematoxylin-eosin staining (*HE*; **A-C**) and N-cadherin immunostaining (**D**). *Insert* in **A** corresponds to a detail of the glial wedge framed in **A**. **C** and **D** are details of the area framed in **B** showing the border of the disruption of the glial wedge (*arrowheads*). The antibody against N-cadherin labels the adherent junctions at the apical pole of the neuroepithelial cells. **E-J** Nestin immunofluorescence in frontal sections from wt (**E, F, I**) and hyh (**G, H, J**) mice. The micrographs show the plane thicknesses corresponding to 10  $\mu\text{m}$ , in **E-H**, and 1  $\mu\text{m}$ , in **I** and **J**. The *frames* in **E** and **G** delimitate the glial wedge, which is shown in detail in **F** and **H** for wt and hyh mice, respectively. The organization of nestin positive cells in the glial wedge of the hyh mouse is disrupted (*arrows*, in **H** and **J**). **K, L** BLBP

immunostaining with hematoxylin counterstaining of the glial wedge (*arrows*) in wt (**K**) and *hyh* (**L**) mice. The glial wedge (*arrows*) organization is disrupted in the *hyh* mouse. **M-P** Tubulin  $\beta$ III (*Tub- $\beta$ III*) immunostaining in frontal sections from wt (**M, N**) and *hyh* (**O, P**) mice. The areas containing the glial wedge that are framed in **M** and **O** are shown in detail in **N** and **P**, respectively. The ventricular zone (*VZ, double-end arrow*, in **N** and **P**) in the *hyh* mouse is disrupted and occupied by tubulin  $\beta$ III+ cell processes. **Q-T** Tis21 mRNA expression in the neuroepithelium of wt (**Q, R**) and *hyh* (**S, T**) mice. *Arrowheads* in **Q** and **S** point to the glial wedge, which is detailed in **R** and **T** under confocal microscopy, overlapping the TMB/BCIP reaction (in *red*) in a 1  $\mu$ m thick plane with the background of the whole section plane (in *green*). Scale bars: A, B, E, G, M, O, 200  $\mu$ m; insert in A, F, H, 50  $\mu$ m; C, D, I, J, R, T, 15  $\mu$ m; K, L, N, P, Q, S, 30  $\mu$ m.

**Figure 6.** Routes of the pioneering callosal axons during the development of the corpus callosum in wt and *hyh* mice. **A-D** Immunolabeling of the pioneering axons with GAP43 in frontal sections from wt (**A, B**) and *hyh* (**C, D**) mice at E15.5. **B** and **D** are details of the areas containing the glial wedge that are framed in **A** and **C**, respectively. The route of the pioneering callosal axons in the *hyh* mouse turned into the ipsilateral lateral ventricle, as showed in the area framed in **C**. **B** and **D** show colabeling with anti-*nestin* (*green reaction*). *Arrowheads* in **A** and **B** point to the route of the callosal pioneering axons. *Arrows* in **D** point to the pioneering axons near the ventricle surface in the *hyh* mouse. **E-G** DiI experiments in organotypic slices culture from wt and *hyh* mice. **E** Light microscopy of a brain slice from a wt mouse at E15.5 indicating the point of DiI crystal application into the cingulate cortex. The routes followed in living tissue *in vitro* by the DiI tagged axons are shown with *red lines*, and indicated with single and double asterisks for the slices from wt and *hyh* mice, respectively. **F, G** Brain slices from wt (**F**) and *hyh* (**G**) mice obtained at E15.5, after 24 hours of DiI application (thus corresponding to E16.5), showing labeling of callosal pioneering axons (in *red; arrows*). After finishing the experiment *in vitro*, the indusium griseum (*IG*) and glial wedge (*GW*) cells were immunolabeled for GFAP (*green reaction*). The lane between the glial wedge and the indusium griseum glial cells can be observed. Note the absence of glial wedge cells (*triangle*) in the *hyh* mouse slice. **H** Possible explanation for the difference in the routes of pioneering axons followed in the wt and *hyh* mice based on alterations in the glial wedge and the secretion of chemorepellent molecules.

Abbreviations: LV, lateral ventricle. Scale bars: A, C, E, 100  $\mu\text{m}$ ; B, D, 50  $\mu\text{m}$ ; F, G, 25  $\mu\text{m}$ .

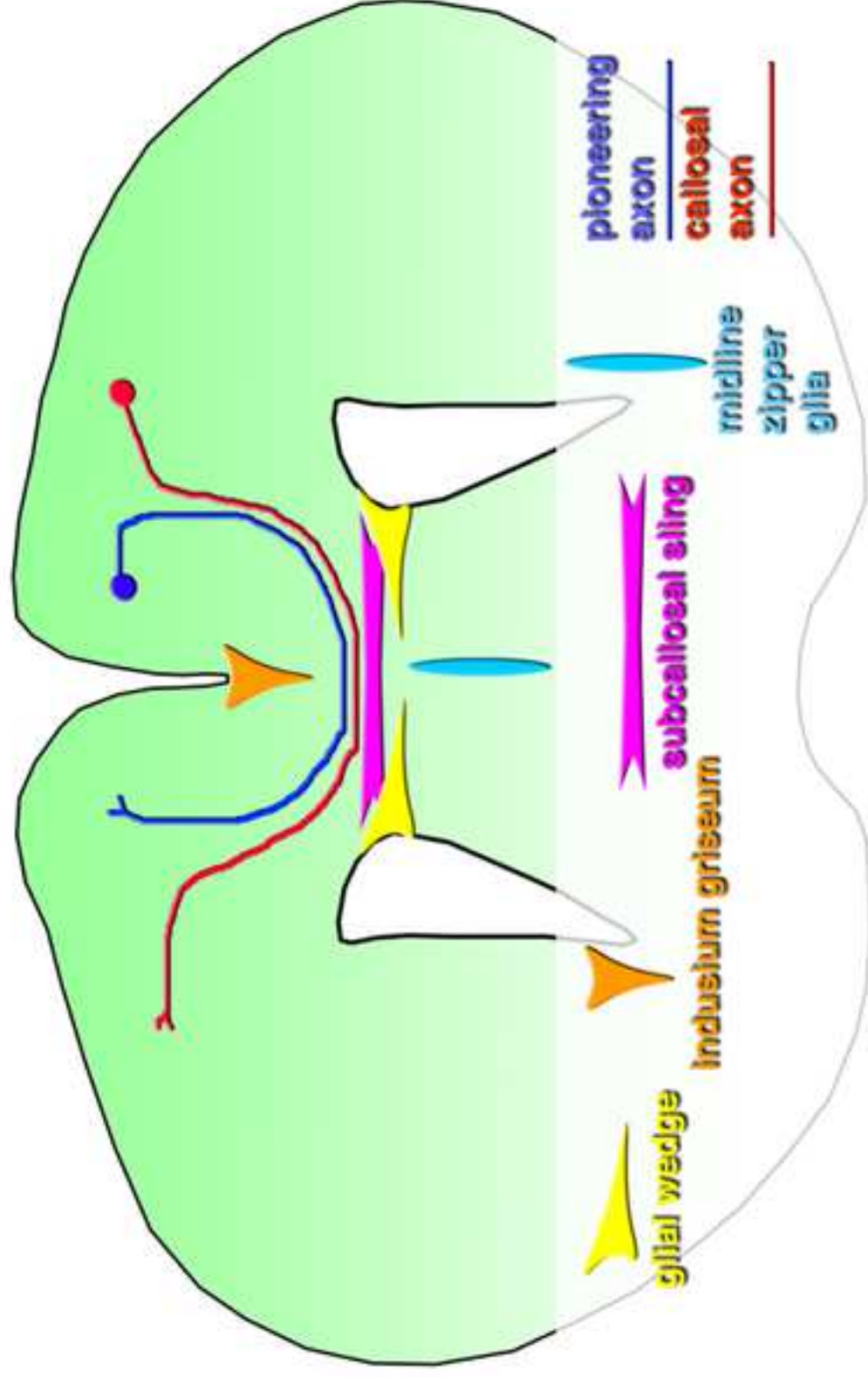


FIGURE 1. Rodríguez-Pérez et al 2014



Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

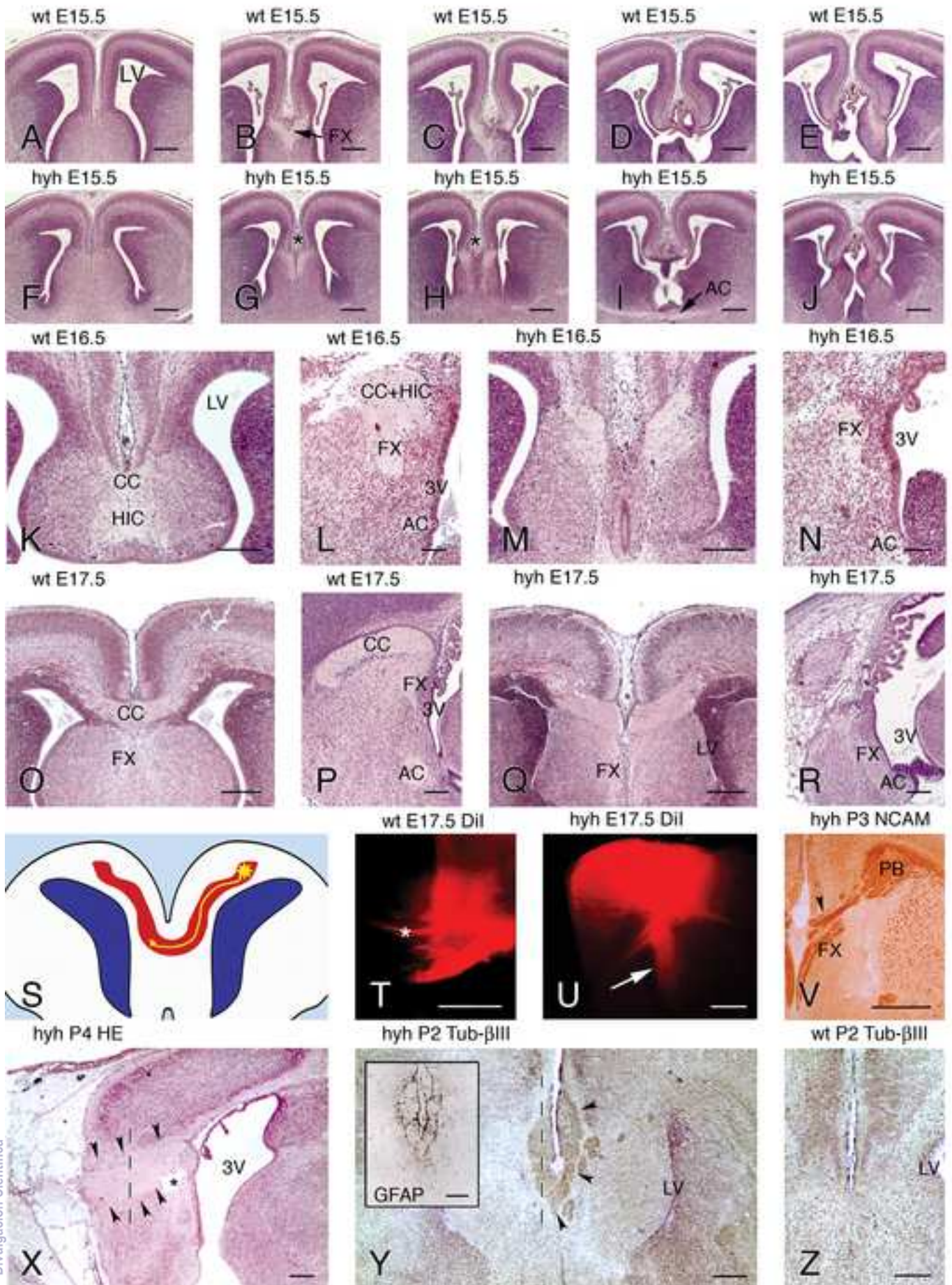


FIGURE 2. Rodríguez-Pérez et al 2014

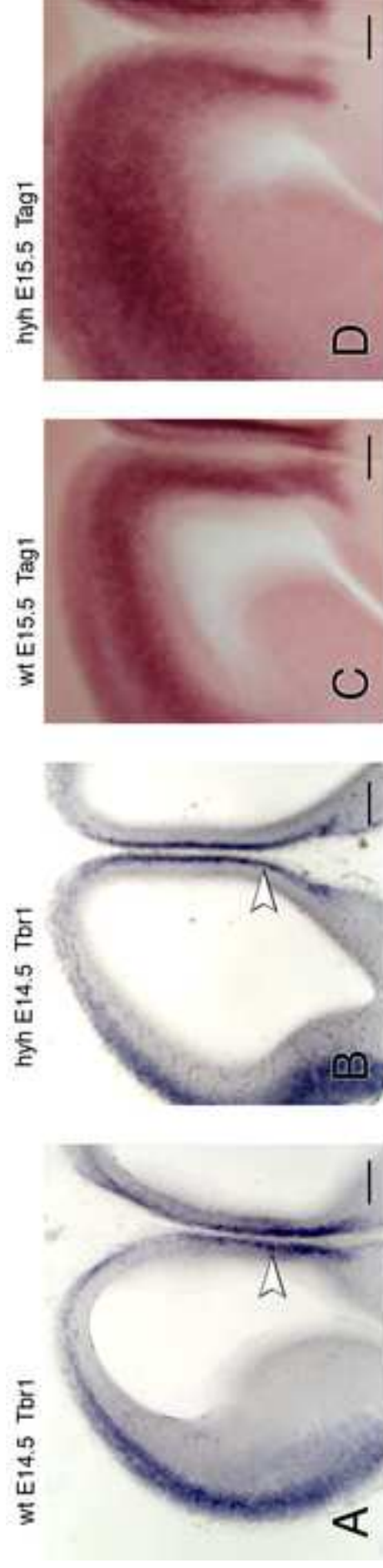


FIGURE 3. Rodríguez-Pérez et al 2014

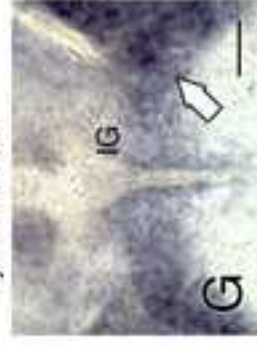
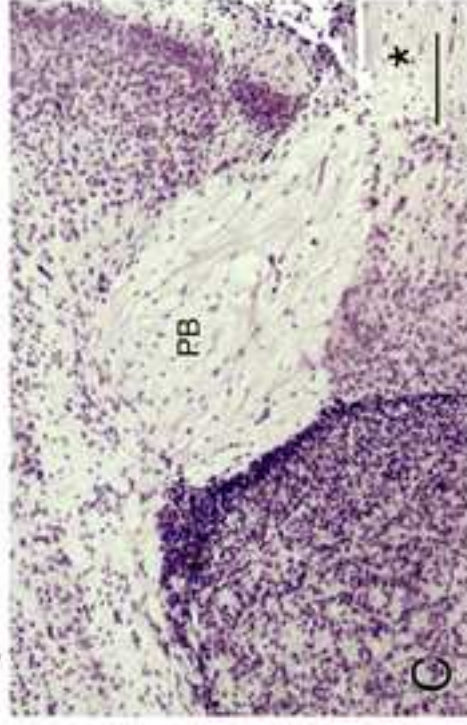
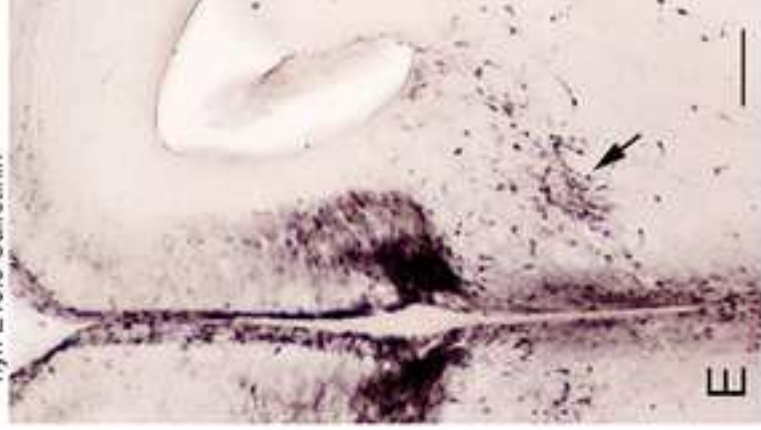
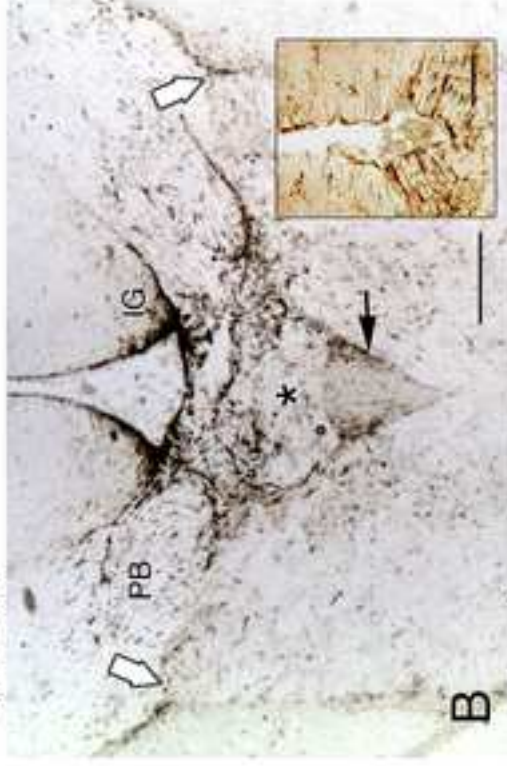
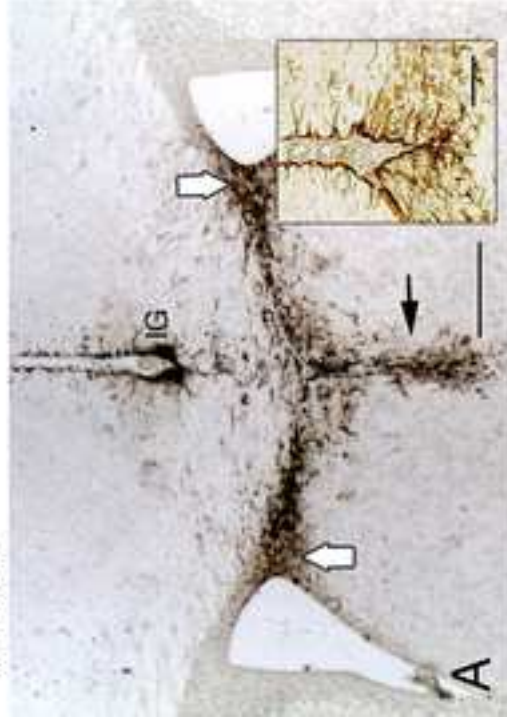


Figure 5  
[Click here to download high resolution image](#)

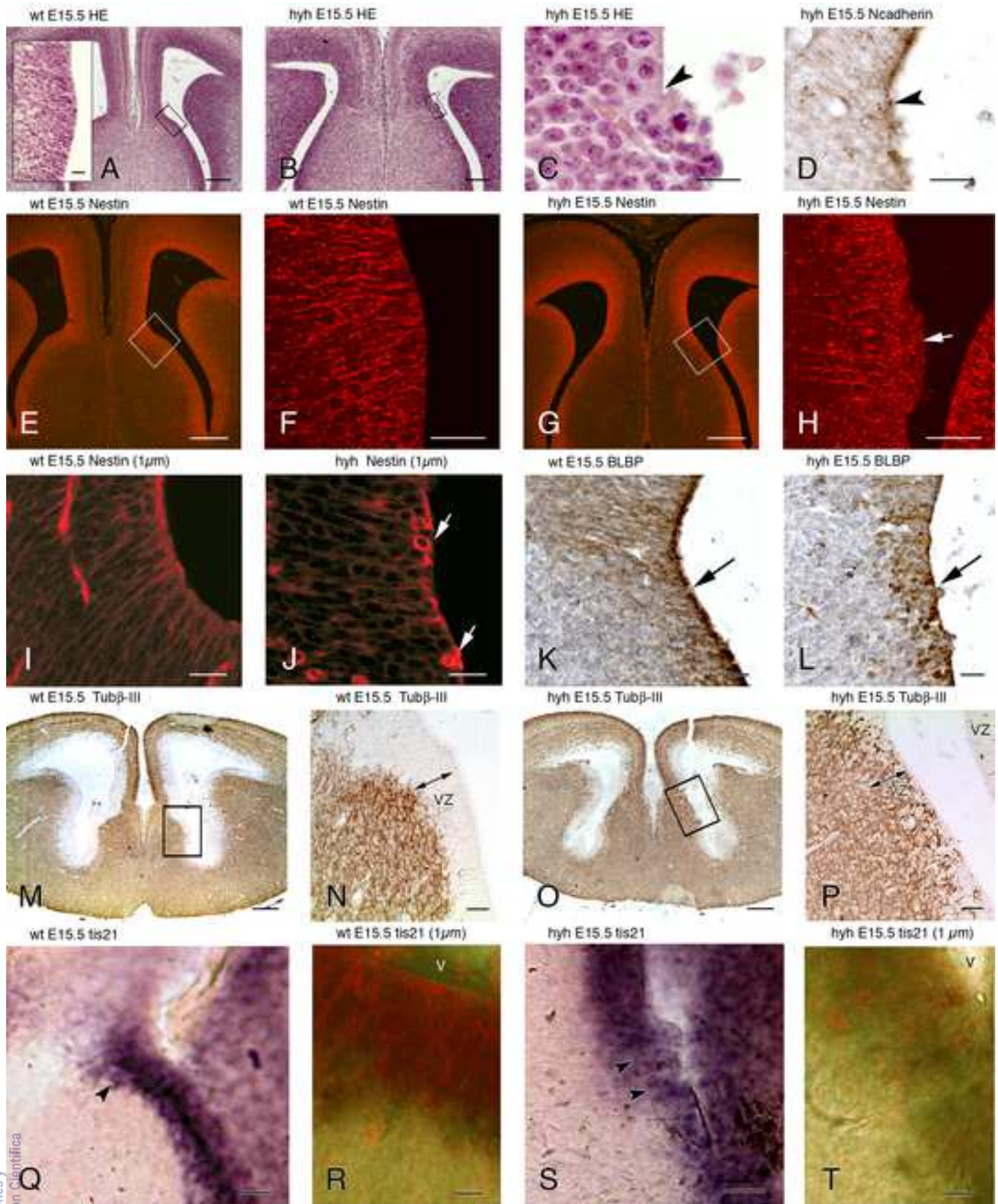


FIGURE 5. Rodríguez-Pérez et al 2014

Figure 6  
[Click here to download high resolution image](#)

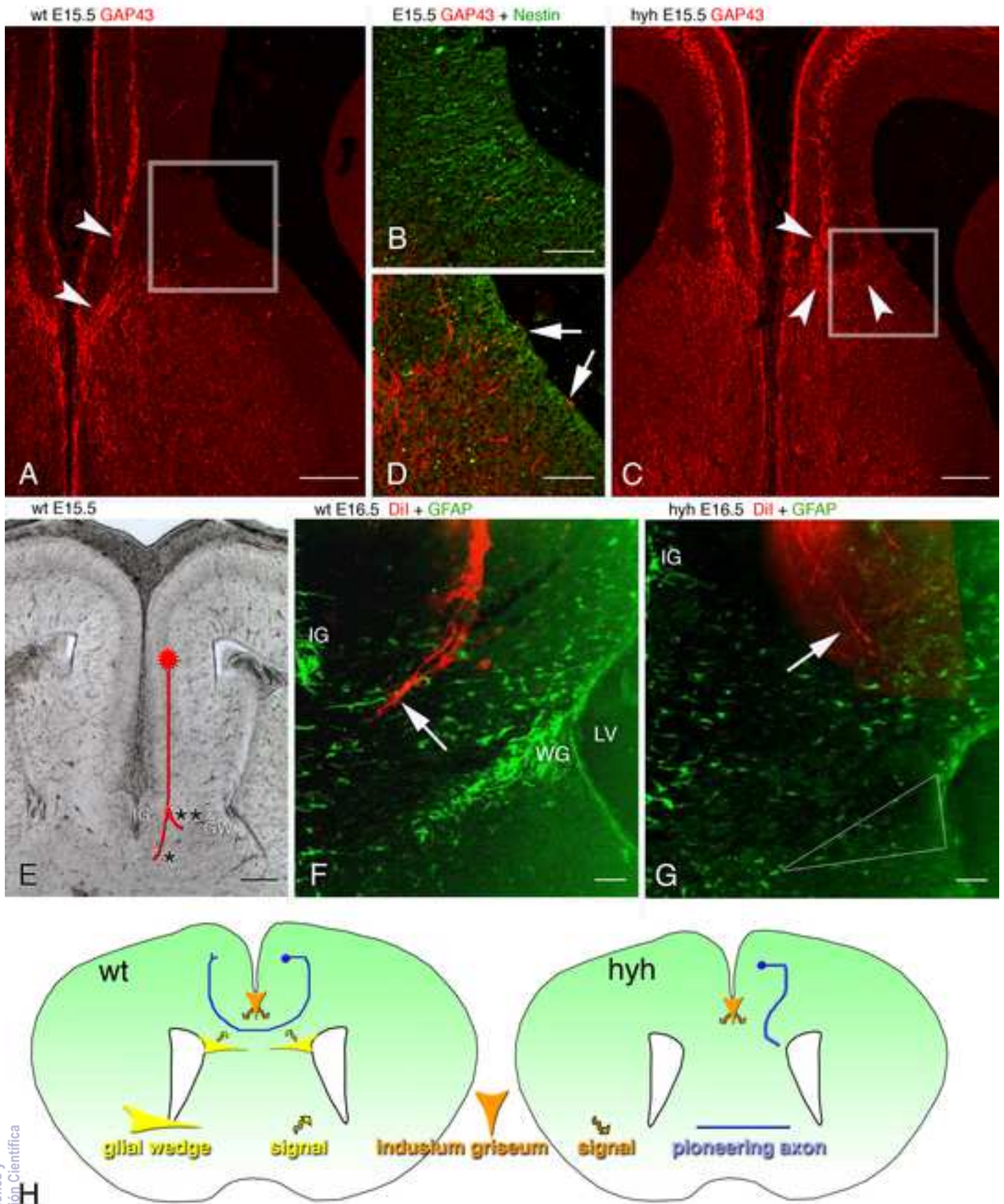


FIGURE 6. Rodríguez-Pérez et al 2014