



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Efecto de ácido ascórbico y su transportador SVCT2, en la glía radial tardía

Tesis presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular

Natalia Ester Saldivia Soto
Concepción-Chile
2021

Profesor Guía: Dr.Francisco Nualart Santander
Dra. Katterine Salazar Martínez
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Francisco Nualart
Profesor guía tesis
Universidad de Concepción

Dra. Katterine Salazar
Profesora guía tesis
Universidad de Concepción



Dr. Juan Pablo Henríquez
Profesor evaluador interno
Universidad de Concepción

Dr. Jorge Fuentealba
Profesor evaluador interno
Universidad de Concepción

Dr. Juan Larraín
Profesor evaluador externo
Pont. Universidad Católica de Chile

Dr. Ariel Castro
Director Programa Doctorado
Ciencias biológicas, área
biología celular y molecular

Tesis de doctorado financiada por:



Proyecto FONDECYT # 1140477 (2014-2018)

Proyecto FONDECYT # 11140405 (2014-2017)

Proyecto FONDECYT # 1190848 (2018-2021)

Proyecto FONDECYT # 1181243 (2019-2022)

ECM-12 PIA-CONICYT

JM I01 CX001610

Beca UCO 1886 Fondo pasantía en el extranjero (2019-2020)

Beca UCO 1886 Fondo de apoyo a eventos de sociedades científica (2020)

Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción (2016-2019)

Beca décimo semestre proyecto ED



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Nualart y a la Dra. Katterine Salazar, sin duda la mejor dupla científica que me pudo haber guiado. La suma de sus conocimientos y calidez humana fueron los pilares fundamentales para la planificación y ejecución de esta tesis.

A la Dra. Fiona Harrison, por haberme recibido en su laboratorio; su excelente disposición, simpatía y rigor científico hicieron posible la realización de una parte fundamental de esta tesis.

A la comisión evaluadora; Dr. Juan Larraín, Dr. Juan Pablo Henríquez y Dr. Jorge Fuentealba por sus correcciones, comentarios y disposición para que esta tesis se ejecutara de la mejor forma posible.

A los directores del programa del doctorado; Dr. Juan Pablo Henríquez y Dr. Ariel Castro, por haber apoyado mis solicitudes y encontrar soluciones cuando los problemas administrativos surgían.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio: María José Oviedo, Rocío Magdalena, Dr. Eder Ramírez, Dr. Fernando Martínez y Dr. Luciano Ferrada, por hacer del laboratorio de Neurobiología un lugar cálido, por salvar más de una vez alguno de mis experimentos y por ser una alegría constante en el lab.

De manera especial agradezco a la Dra. Antonia Recabal, Dra. Francisca Espinoza y a Víctor Baeza por su amistad y compañerismo científico.

Agradezco con todo mi cariño a mi familia; a mis padres y hermanos, por muchas veces planear sus tiempos en torno a mis horarios, postergarse por mi, apoyarme incondicionalmente y ser fundamentales para alcanzar mis sueños y metas.

Finalmente, agradezco a lo mejor y más bonito que me dejó el doctorado; Diego Zelada, por ser una fuente inagotable de buenos momentos, por tu paciencia para ayudarme científicamente y por sobre todo, por compartir tu vida conmigo y regalarme el inicio de una vida juntos.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN.....	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Corteza Cerebral.....	1
2. Células neuroepiteliales.....	3
3. Glía radial temprana	5
4. Glía radial temprana y neurogénesis	8
5. Glía radial y gliogénesis	11
6. Glía radial tardía	13
7. Factores que regulan la diferenciación de la glía radial	17
8. Vitamina C	19
9. Transportadores de vitamina C.....	20
10. Funciones de ácido ascórbico en el cerebro	25
11. Efectos de ácido ascórbico en la diferenciación celular.....	27
12. Efecto de ácido ascórbico en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre.....	29
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
III . HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	34
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Animales de experimentación	35

2. Fijación por perfusión vascular	35
3. Inclusión y microtomía.....	36
4. Inmunohistoquímica.....	37
5. Inmunocitoquímica.....	38
6. Microscopía.....	39
7. Inmunolocalización ultraestructural.....	40
8. Microdissección Láser	41
9. Extracción ARN total por columna.....	42
10. Transcripción reversa (RT) del ARN total.....	43
11. RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).....	43
12. Obtención de sondas para SVCT2 mediante transcripción <i>in vitro</i>	44
13. Dot blot.....	45
14. Hibridación <i>in situ</i>	46
15. Transducción <i>in vivo</i>	47
16. Cultivo primario enriquecido en glía radial postnatal.....	48
17. Suplementación con ácido ascórbico	49
18. Electroporación <i>in vivo</i>	49
19. Western Blot.....	50
20. Marcaje de BrdU <i>in vivo</i>	51
21. Análisis estadístico.....	52
22. Análisis de superficie y parámetros morfológicos de cultivos primarios	52
V. RESULTADOS	54
Capítulo 1: Caracterización de la glía radial tardía y del patrón de expresión del transportador de vitamina C, SVCT2.....	54

1. Las células de la glía radial tardía pueden ser identificadas detectando proteínas estructurales o enzimas presentes en ellas.	54
2. La glía radial tardía presenta abundantes proyecciones radiales en la región dorsal de los ventrículos laterales.	55
3. El transportador de ácido ascórbico, SVCT2, se encuentra polarizado ventricularmente en las células de la glía radial tardía.	58
Capítulo 2: Análisis del estado de pluripotencia de las células de la glía radial tardía y su diferenciación en estadios postnatales.	83
4. Sox2, un factor de transcripción clave en la pluripotencia de las células madres, se localiza en la región periventricular de los ventrículos laterales.....	83
5. Existen células proliferativas que incorporan BrdU en la zona ventricular y subventricular de los ventrículos laterales.....	84
6. La glía radial tardía <i>in vitro</i> se diferencia en astrocitos.	87
7. La glía radial tardía mantiene una diferenciación neurogénica en estadios postnatales	90
Capítulo 3: Estudio del efecto de ácido ascórbico y su transportador SVCT2 en la diferenciación de la glía radial tardía.....	104
8. Ácido ascórbico mantiene la radialización de la glía radial tardía <i>in vitro</i>	104
9. Los niveles de SVCT2 regulan la radialización y diferenciación de la glía radial tardía <i>in vitro</i>	105
10. La electroporación <i>in vivo</i> permite la sobre-expresión de proteínas en células del ventrículo lateral.....	109
11. La sobre-expresión de SVCT2 <i>in vivo</i> , conlleva a la diferenciación de la glía radial tardía en células con morfología redondeada, migratorias y positivas para marcadores neuronales.....	113
VI. DISCUSIÓN	128
VII. CONCLUSIONES.....	145



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de la glía radial en el desarrollo de la corteza cerebral.	16
Figura 2. La glía radial tardía puede ser detectada en cerebros de rata de 1 día postnatal.	56
Figura 3. La detección de vimentina permite observar la proyección ventricular y cortical de los procesos de la glía radial tardía.....	57
Figura 4. La glía radial tardía presenta proyecciones radiales en regiones específicas de la pared ventricular, en cerebros de 1 día post natal.....	59
Figura 5. La expresión génica para SVCT2 es observada en la pared ventricular durante el desarrollo cerebral y en estadios post-natales.....	61
Figura 6. Análisis del ARNm de SVCT2 en distintos estadios postnatales de cerebro de rata, utilizando microdissección con láser y qRT-PCR.....	62
Figura 7. El ARNm de SVCT2 es intensamente expresado en la pared celular de los ventrículos laterales.....	66
Figura 8. El ARNm de SVCT2 se mantiene expresado a diferentes niveles en la pared celular de los ventrículos laterales y en la corteza cerebral, a los 4 días de desarrollo post-natal.....	67
Figura 9. El ARNm de SVCT2 es débilmente expresado en extensas regiones de la pared celular de los ventrículos laterales, que presentan preferentemente diferenciación endimaria.....	68
Figura 10. SVCT2 es preferencialmente polarizado ventricularmente en la glía radial tardía-3-PGDH/vimentina positiva.....	70
Figura 11. En cerebros de ratas de 1 y 4 días postnatales las células de la glía radial tardía se detectan preferentemente en la región dorsolateral del ventrículo lateral, presentando SVCT2.....	73
Figura 12. Células de la glía radial tardía desaparecen de la ZV y ZSV del ventrículo lateral conforme transcurre el desarrollo. Las células endimarias se encuentran en extensas regiones de la pared ventricular.....	76

Figura 13. La expresión de GLUT1 aumenta de forma progresiva concomitante transcurre el desarrollo.	77
Figura 14. Procesos radiales y somas neuronales se observan en la zona ventricular en cerebros de rata de 3 días postnatales.....	79
Figura 15. Análisis ultraestructural e inmunogold SVCT2 y GFAP en cerebros de rata de 3 días postnatales.....	82
Figura 16. Sox2 se encuentra presente en la región ventricular y subventricular en cerebros de 1 día postnatal.	85
Figura 17. Las células de la pared de los ventrículos laterales tienen capacidad proliferativa..	86
Figura 18. La Glía radial tardía aislada y mantenida <i>in vitro</i> , presenta una morfología elongada y es positiva para marcadores de células madre y SVCT2.	89
Figura 19. La Glía radial tardía se diferencia a astrocitos <i>in vitro</i> , los cuales son reactivos en estas condiciones de cultivo.....	91
Figura 20. La inyección intraventricular con adenovirus-eGFP permite el marcaje <i>in vivo</i> de la zona ventricular.....	93
Figura 21. La glía radial tardía mantiene una diferenciación neurogénica en estadios postnatales.	95
Figura 22. Células transducidas con adenovirus-eGFP presentan células eGFP positivas con fenotipo neuronal tanto a los 2 como a los 12 días post-transducción.	98
Figura 23. Células eGFP+ exhiben arborización dendrítica y son positivas para el marcador neuronal, tubulina βIII.	101
Figura 24. Células eGFP+ son positivas para el marcador neuronal, NeuN.	102
Figura 25. Células transducidas con adenovirus-GFP son positivas para vimentina y Sox2 pero no para el marcaje astrocítico GFAP.	103
Figura 26. Ácido ascórbico posee un efecto radializante en la glía radial tardía <i>in vitro</i>	106
Figura 27. Los niveles de SVCT2 regulan la diferenciación de la glía radial tardía <i>in vitro</i> . .	108

Figura 28. Altos niveles de SVCT2 mantienen e intensifican la radialización de la glía radial tardía <i>in vitro</i>	110
Figura 29. Análisis del subclonamiento de SVCT2 en el vector pAAV.	112
Figura 30. Electroporación intracerebro ventricular con plásmido control-eGFP, muestra células de morfología radial.....	114
Figura 31. La sobre-expresión de SVCT2 genera la migración de células desde la zona ventricular/subventricular hacia la corteza cortical externa.....	117
Figura 32. Células que sobre-expresan SVCT2-eGFP co-localizan con BrdU.	120
Figura 33. Células sobre-expresando SVCT2-eGFP no colocan con el marcador de glía radial 3-PGDH.	122
Figura 34. Células que sobre-expresan SVCT2-eGFP co-localizan con el marcador de progenitores intermediarios Tbr2 y el marcador de neuronas migratorias, doblecortina (DCX).	125
Figura 35. Células sobre-expresando SVCT2-eGFP no colocan con marcador astrocítico GFAP.	126
Figura 36. Efecto de los distintos niveles de SVCT2 sobre la abundancia de NeuN, GFAP y Tubulina-βIII en la corteza cerebral.....	127
Figura 37. Modelo final del estudio.....	144

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo de inclusión en parafina.....	36
Tabla 2. Anticuerpos utilizados	38
Tabla 3. Set de partidores usados para RT-PCR cuantitativo y tamaño del producto final de amplificación.....	44
Tabla 4. Parámetros utilizados para la estandarización de la electroporación intraventricular de ratas de 1 día postnatal.	111



ABREVIATURAS

3-PGDH	:	3-Fosfoglicerato deshidrogenasa
5hmC	:	5 Hidroximetil citosina
5mC	:	5-metil citosina
AA	:	Ácido ascórbico
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	:	Ácido desoxirribonucleico copia
ARN	:	Ácido ribonucleico
ARNm	:	Ácido ribonucleico mensajero
BLBP	:	Proteína de unión a lípidos cerebrales
BME	:	Medio de cultivo basal
BMP	:	Proteínas morfogénicas óseas
BrdU	:	5-bromo-2-deoxiuridina
bRG	:	Glía radial basal
BSA	:	Albúmina de suero bovino
CCE	:	Corteza cerebral externa
Cux2	:	Homeobox tipo cut-2
Cy	:	Cianina
Da	:	Dalton
DCX	:	Doble cortina
DEPC	:	Dietilpirocarbonato
DHA	:	Ácido deshidroascórbico
Dig	:	Digoxigenina
dNTPs	:	Nucleósidos trifosfato

DTT	:	Ditiotreitol
E	:	Embionario
<i>E. coli</i>	:	Escherichia coli
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetracético
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	:	Factor de crecimiento epidérmico
EGFP	:	Proteína verde fluorescente potenciada
ERK 1/2	:	Quinasa regulada por señal extracelular 1/2
EYFP	:	Proteína amarilla fluorescente potenciada
FGF	:	Factor de crecimiento de fibroblastos
Fzd	:	Frizzled
GABA	:	Ácido gamma-aminobutírico
GFAP	:	Proteína ácida fibrilar de la glía
GLAST	:	Transportador de glutamato/aspartato
GLUT	:	Transportador de glucosa
GS	:	Gutamina sintetasa
GSH	:	Glutación
HCl	:	Ácido clorhídrico
HIF	:	Factor inducible por hipoxia
ifu	:	Unidades infectivas virales
IGF	:	Factor de crecimiento semejante a la insulina
iPCS	:	Células madres pluripotentes inducibles
iSVZ	:	Zona subventricular interna
JAK	:	Quinasa Janus
JHDM	:	Dominio Jumonji C

K	:	Lisina
kDA	:	Kilo Dalton
K _m	:	Constante de Michaelis-Menten
LB	:	Luria-Bertani
LCR	:	Líquido cefalorraquídeo
mEPSC	:	Corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura
MNI	:	Migración nuclear interkinética
		Tetrazolio nitroazul y 5-bromo-4-cloro-3'-
NBT/BCIP	:	indolifosfato
NK	:	Natural Killer
oSVZ	:	Zona subvenricular externa
P	:	Postnatal
pb	:	Pares de bases
PC	:	Plexos Coroideos
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	:	Paraformaldehído
PI	:	Progenitores intermediarios
		Molécula de adhesión de células neurales
PSA-NCAM	:	polisialilada
qRT-PCR	:	Retrotranscripción y PCR cuantitativa
RIPA	:	Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación
ROS	:	Especies reactivas de oxígeno
RT	:	Transcripción reversa
RT-PCR	:	Retrotranscripción y PCR
S100b	:	Subunidad b de la proteína de unión al calcio S100

SBF	:	Suero bovino fetal
Shh	:	Sonic hedgehog
SNC	:	Sistema nervioso central
SNP	:	Precusores neurales cortos
SOX2	:	Región Y determinante del sexo-2
SSC	:	Solución salina de citrato
STAT	:	Transductor de señal y activador de la transcripción
SVCT	:	Co-transportador de Sodio-Vitamina C
SVCT2 ^{-/-}	:	Homocigoto <i>knockout</i> para SVCT2
SVCT2 ^{+/-}	:	Heterocigoto <i>knockout</i> para SVCT2
SVCT2tg	:	Transgénico para SVCT2
Svet1	:	Transcripto 1 expresado subventricularmente
Tbr2	:	Proteína cerebral T-box 2
TNC	:	Tenascina C
Tub bIII	:	Tubulina beta III
VL	:	Ventrículos laterales
ZSV	:	Zona subventricular
ZV	:	Zona ventricular
α -KGDD	:	Alfa cetoglutarato

RESUMEN

La glía radial embrionaria da origen a la mayoría de las células neurales presentes en el cerebro y al mismo tiempo, es un elemento estructural esencial para la migración de neuronas durante el proceso de formación de la corteza cerebral. De manera destacable, y contraria a la noción de que la glía radial desaparece con el nacimiento, se ha demostrado que esta célula permanece por una ventana de tiempo postnatal específica, tanto en roedores como humanos. En esta tesis, hemos caracterizado detalladamente esta célula, denominada glía radial tardía. Análisis realizados en cerebros de rata de diferentes estadios postnatales, aplicando técnicas como inmunohistoquímica acoplada a microscopía confocal espectral y de dos fotones como también, análisis *in vivo* mediante la utilización de adenovirus y electroporación, nos permitieron concluir que la glía radial tardía se encuentra de manera abundante entre los estadios de 1 y 4 días postnatales, la cual desaparece de manera ventrodorsal conforme transcurre el desarrollo. Sorprendentemente, detectamos células provenientes de la glía radial tardía transducidas adenoviralmente que presentaron un fenotipo neuronal migratorio evidente, como también la co-localización con marcadores neuronales, proponiendo que la glía radial tardía continúa generando neuronas postnatalmente.

Por otro lado, hemos determinado que ácido ascórbico y su transportador, SVCT2, afectan la diferenciación de la glía radial tardía. Al respecto, por medio de análisis de qRT-PCR de distintas regiones cerebrales obtenidas mediante microdissección láser, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica e inmunogold, concluimos que SVCT2 se encuentra polarizado ventricularmente en la glía radial tardía, sugiriendo que esta célula capta el ácido ascórbico presente en el líquido cefalorraquídeo. Interesantemente, nuestros estudios *in vitro* determinaron que ácido ascórbico promueve el fenotipo radial y en consecuencia, el estado indiferenciado de la glía radial tardía. Además, mediante estudios de ratones SVCT2^{+/-} y transgénicos que sobre-expresan el transportador, determinamos que niveles elevados de SVCT2 mantienen el fenotipo indiferenciado de la glía radial tardía, mientras que niveles

disminuidos del transportador conllevaron a la diferenciación acelerada de la glía radial tardía a astrocitos. Finalmente, la sobre-expresión de SVCT2 en la glía radial tardía *in vivo* generó células que presentaron una morfología redondeada, que migraron desde la zona ventricular hacia la corteza cerebral y que fueron positivas a marcadores de proliferación y neuronales, sugiriendo que altos niveles de SVCT2 y una consecuente captación incrementada de ácido ascórbico por parte de la glía radial tardía, conlleva a la diferenciación neurogénica de esta célula madre neural.



ABSTRACT

Embryonic radial glia cells give rise to the vast majority of the neural cells that make up the brain, and at the same time, are an essential structural element for neuronal migration during cerebral cortex development. Notably, and contrary to the notion that the radial glia disappears at birth, it has been shown that this cell remains for a specific postnatal time window; both in rodents and humans. In this thesis, we have characterized in detail this cell, named the late radial glia. Analysis carried out in rat brains of different postnatal stages, applying techniques such as immunohistochemistry coupled to spectral and two-photon confocal microscopy, as well as *in vivo* approaches using adenovirus and electroporation, allowed us to conclude that the late radial glia cells are highly present between 1 and 4 postnatal days, and disappears ventrodorsally as development proceeds. Surprisingly, we detected adenovirally transduced cells from the late radial glia, which displayed an evident migratory neuronal phenotype as well as co-localization with neuronal markers, suggesting that the late radial glia cells continue generating neurons postnatally.

On the other hand, we have determined that ascorbic acid and its transporter, SVCT2, affect the differentiation of the late radial glia cells. In this regard, by qRT-PCR analysis of different brain regions obtained by laser microdissection, *in situ* hybridization, immunohistochemistry and immunogold, we conclude that SVCT2 is ventricularly polarized in late radial glia cells, suggesting that these cells uptake ascorbic acid that is present in the cerebrospinal fluid. Interestingly, our *in vitro* studies determined that ascorbic acid promotes the radial phenotype and, consequently, the undifferentiated state of the late radial glia cells. Furthermore, through studies of SVCT2^{+/-} and transgenic mice that overexpress SVCT2, we determined that high levels of SVCT2 maintain the undifferentiated phenotype of the late radial glia cells, while decreased levels of the ascorbic acid transporter led to accelerated differentiation of the late radial glia cells into astrocytes. Finally, SVCT2 overexpression in the late radial glia cells *in vivo* generated cells that presented a rounded morphology, migrated from the ventricular zone to the cerebral cortex and were positive for

proliferation and neuronal markers, suggesting that high levels of SVCT2 and a consequent increased uptake of ascorbic acid by the late radial glia cells, leads to neurogenic differentiation of this neural stem cell.



I. INTRODUCCIÓN

1. Corteza Cerebral

La corteza cerebral, o neocorteza, es la sede de las funciones cognitivas superiores. Es en ella donde se llevan a cabo complejos procesos relacionados con nuestras capacidades únicas, tales como el pensamiento abstracto, el lenguaje y la imaginación (Jabaudon 2017). Al respecto, es en los circuitos neuronales donde se encuentra la raíz de la capacidad para percibir el mundo y realizar interacciones con el entorno. Los circuitos neocorticales, a través de su actividad, codifican procesos críticos incluida la percepción e integración sensorial, la transformación sensorial-motora, la planificación y ejecución, como también la memoria y la atención a largo plazo (Javed et al. 2021). Estos circuitos están formados por una diversidad de subtipos especializados de neuronas que pueden distinguirse entre sí por características morfológicas, fisiológicas, hodológicas, es decir, relacionadas con la conectividad como también, por sus propiedades funcionales (Molyneaux et al. 2007, Harris et al. 2015).

Anatómicamente, la corteza cerebral es la porción más externa del cerebro y corresponde a la cubierta de materia gris sobre los hemisferios. Entre especies, su área superficial es extremadamente variable desde aproximadamente $1,5 \text{ cm}^2$ en roedores, 1.500 cm^2 en humanos y hasta 3.000 cm^2 en ballenas (Mota et al. 2015). Por el contrario, su espesor no varía sustancialmente, encontrándose entre 1 mm en roedores y 2,5 mm en humanos (Glasser et al. 2016). En la dirección de su grosor, en mamíferos, la corteza cerebral se estratifica en seis capas (I-VI) de cuerpos celulares neuronales, numeradas desde la capa más externa de la corteza (piamadre) hasta la sustancia blanca (Mrzljak et al. 1990, Narayanan et al. 2017).

La generación de las capas de la corteza procede en una secuencia temporal precisa; las neuronas de las capas profundas se generan primero y posteriormente se forman las neuronas de las

capas superiores. Este proceso forma un gradiente de desarrollo “*inside-out*”. Es por ello que las neuronas que han nacido más temprano forman la capa más cercana al ventrículo (capa VI) y las siguientes neuronas deben viajar distancias más largas para formar las capas más superficiales (Ohtaka-Maruyama et al. 2016). Cada capa de la corteza difiere de las otras en sus propiedades funcionales, en el grupo de conexiones que se producen y en los tipos de neuronas allí encontradas (Agirman et al. 2017). Las neuronas que constituyen la corteza cerebral son clasificadas, en un sentido amplio, como neuronas de proyección e interneuronas. Las neuronas de proyección constituyen la gran mayoría de las neuronas de la corteza (aproximadamente 70-80%), y si bien se distribuyen estereotipadamente dentro de todas las capas, se localizan fundamentalmente en las capas III, V y VI. Las neuronas de proyección típicas tienen somas con una morfología piramidal, emplean como neurotransmisor primario el aminoácido excitador glutamato y extienden axones a distancias dianas intracorticales, subcorticales y subcerebrales (Melzer et al. 2020). Por otro lado, las interneuronas usan el neurotransmisor inhibitor ácido γ -amino butírico (GABA) y constituyen el 20-30% de las neuronas del neocortex. Estas neuronas están localizadas en todas las capas y se proyectan de manera local (Molyneaux et al. 2007, Lodato et al. 2015). La generación de las neuronas corticales ocurre en el desarrollo embrionario, cuyo tiempo de formación es específica de cada especie. Por ejemplo, en humanos, la generación de la gran mayoría de las neuronas corticales comienza en la cuarta semana de gestación y termina alrededor de la semana 20 (Bystron et al. 2008). En roedores, los intervalos neurogénicos son más cortos, como lo demuestran los estudios clásicos de marcaje con [3H]-timidina, donde la neurogénesis cortical se extiende principalmente desde el estadio embrionario (E)11 a E16 en ratones (Angevine & Sidman 1961, Caviness 1982, Takahashi y col. 1995), y del E12 al E17 en ratas (Bayer & Altman 1991, Berry & Rogers 1965). Es importante destacar que estos periodos corresponden a la fase donde se genera la mayor proporción de neuronas corticales a nivel de población de células. Sin embargo, la neurogénesis continúa activa en el periodo posterior a la fase neurogénica, correspondiente a la gliogénesis o formación de astrocitos, aunque en un grado menor (Kriegstein, A. et al. 2009).

De manera importante, los distintos tipos de células diferenciadas, que compondrán la corteza cerebral, tienen su origen en las células madres neurales, las que además de generar neuronas y células gliales - tales como astrocitos y oligodendrocitos -, participan en el correcto posicionamiento de las neuronas en las capas corticales (Arellano et al. 2021). Las células madre neurales que conllevan estos procesos de neurogénesis, gliogénesis y formación de la corteza cerebral, corresponden a las células neuroepiteliales y a la glía radial (Borrell et al. 2014).

2. Células neuroepiteliales

Las células neuroepiteliales y la glía radial son, a nivel celular, la materia prima de la corteza cerebral. Es a partir de ellas que se generarán los distintos componentes neurales de la neocorteza. Estas células madre neurales, al igual que cualquier célula madre, se caracterizan por tener el potencial de autorrenovarse y de generar una o más células especializadas. Con respecto al potencial de diferenciación, ambas son células madre neurales multipotentes, es decir, tienen la capacidad de generar de manera directa o indirecta, los distintos tipos celulares neurales que constituirán la corteza cerebral (Ortiz-Alvarez et al. 2021). Cabe destacar que las células neuroepiteliales originan la glía radial; sin embargo, esto no ocurre en el sentido opuesto. Es así, que esta última tiene un potencial de diferenciación más restringido que su antecesora (Kriegstein, A. et al. 2009).

La morfogénesis de la corteza cerebral comienza en el tubo neural, una estructura hueca compuesta de células neuroepiteliales y en cuya cavidad se encuentra el líquido cefalorraquídeo (LCR). El tubo neural se va regionalizando en respuesta a morfógenos y moléculas de señalización, generando en su porción más rostral, la corteza cerebral, y en la cavidad se dará origen a los ventrículos del cerebro (Kuwar Chhetri et al. 2021). El tubo neural está compuesto por una sola capa de células neuroepiteliales las cuales abarcan la totalidad del grosor de la pared, estas células poseen una morfología bipolar y están orientadas radialmente, presentando un proceso basal que tiene contacto directo con la superficie pial (borde submeningeo) y un proceso apical, que contacta la superficie ventricular, llegando a tener una longitud de 100 μm (Miyata 2008). Morfológicamente el

neuroepitelio parece estratificado, debido a que el núcleo de las células neuroepiteliales se mueven en fase con el ciclo celular, proceso denominado migración nuclear interkinética (MNI). La división de las células neuroepiteliales se produce en la zona ventricular (ZV), mientras que la fase S tiene lugar en una ubicación más basal, con migración nuclear apical-basal en G1 y migración nuclear basal-apical en G2 (Lee y Norden 2013, Taverna y Huttner 2010).

Las células neuroepiteliales muestran típicas características epiteliales y están altamente polarizadas a lo largo de su eje apical-basal, como se desprende de la organización de su membrana plasmática. Así, ciertas proteínas de transmembrana, como la prominina-1 (CD133) se encuentran selectivamente en la membrana plasmática apical; uniones estrechas, adherentes y del tipo gap están presentes en el extremo lateral más apical de la membrana plasmática (Aaku-Saraste et al. 1996, Dubreuil et al. 2007). Por otro lado, receptores para constituyentes de la lámina basal; tal como integrina $\alpha 6$, se concentran en la región basal de la membrana plasmática (Krebsbach et al. 2017). Además, presentan componentes típicos de las células madre neurales, tal como el filamento intermedio nestina y el factor de transcripción Sox2, encargado de mantener la autorrenovación (Zhang, J. et al. 2015).

Hoy en día se reconocen dos zonas proliferativas en la corteza cerebral en desarrollo y se usa la terminología que fue establecida en 1970 por el Comité de Boulder (Angevine 1970); la zona ventricular (ZV), que corresponde a la zona proliferativa primaria que aparece primero durante el desarrollo y es adyacente al ventrículo, y la zona subventricular (ZSV) la cual es la zona proliferativa secundaria que surge durante las etapas posteriores del desarrollo y es superficial a la ZV. Es en la ZV donde residen y se dividen las células madres neurales – células neuroepiteliales y glía radial-. Sin embargo, tal como se discutirá más adelante, en la ZSV se encuentran células progenitoras denominadas progenitores intermediarios (PI), los que a diferencia de las células madres neurales, corresponden a células con capacidad de proliferación y progenie más limitadas (Taverna et al. 2014, Martinez-Cerdeno et al. 2016, Martinez-Cerdeno et al. 2016).

Al comienzo de la formación de la corteza cerebral, el tubo neural se expande gracias a las divisiones proliferativas simétricas que experimentan las células neuroepiteliales (Subramanian et al. 2017). Sin embargo, poco antes o al inicio de la neurogénesis las células neuroepiteliales comienzan a transformarse en la glía radial temprana, una célula madre neural que se encuentra estrechamente relacionada con las células neuroepiteliales pero, presentan características gliales (Figura 1).

3. Glía radial temprana

La glía radial temprana corresponde a la glía radial que se encuentra presente en el desarrollo embrionario. Esta célula madre neural comienza a aparecer poco antes de la neurogénesis, en un proceso gradual que ocurre entre los estadios E9-10 en ratón, donde las células neuroepiteliales comienzan a diferenciarse generando la glía radial temprana (Kriegstein, A. et al. 2009, Gotz et al. 2016). Morfológicamente, esta célula madre neural, al igual que su antecesora, sigue una disposición perpendicular a la superficie ventricular y se caracteriza por exhibir una morfología bipolar (Figura 1). Presenta un cuerpo celular ovoide que se localiza entre la ZV y la ZSV de los ventrículos laterales, donde el núcleo se mueve dentro de los 90-100 μm de la superficie apical de acuerdo a la MNI, siguiendo el mismo principio descrito para las células neuroepiteliales (Gotz et al. 2002). El engrosamiento progresivo de la corteza a lo largo del transcurso del desarrollo, se acompaña de un alargamiento de los procesos radiales. La glía radial temprana emite dos prolongaciones radiales en sentidos opuestos; un corto pie terminal en contacto directo con la ZV, extendiendo un corto cilio dirigido hacia el LCR y un elongado proceso basal que se expande por todo el grosor de la pared del cerebro alcanzando, a través de un pie terminal cónico, la superficie pial (Villalba et al. 2021). En roedores, la longitud de crecimiento del proceso basal aumenta a 200 –300 μm en E13-14 y a 400 – 500 μm en E15 –16 en la región palial telencefálica - futura neocorteza -, llegando hasta 1mm en los periodos neonatales (Rakic 2003, Gotz et al. 2005, Miyata 2008). Estos cambios morfológicos van acompañados de la adquisición de microtúbulos de 24 nm y filamentos intermedios de 9 nm dentro de la fibra radial, así como de gránulos de almacenamiento de glucógeno en los pies terminales

subpiales (Kriegstein, A. et al. 2009).

La glía radial temprana es una célula mitóticamente activa que expresa proteínas típicas de células precursoras neurales, tales como el filamento intermedio nestina, el factor de transcripción Sox2 y distintos marcadores inmunohistoquímicos que facilitan el estudio *in situ* de esta célula. Dentro de ellos, destacan los marcadores astrogliales, tales como el transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST), la proteína de unión a lípidos cerebrales (BLBP), glutamina sintetasa (GS), la subunidad β de la proteína de unión al calcio S100 (S100 β), la tenascina C (TN-C) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Kriegstein, A. et al. 2009, Bramanti et al. 2010). Todos estos antígenos astrogliales, además de localizarse en la glía radial se expresan en los astrocitos inmaduros y maduros (Allen et al. 2018). Cabe destacar que GFAP, tanto en primates como en humanos, se expresa en la glía radial temprana desde el inicio de la neurogénesis sin embargo, en roedores su expresión ocurre posterior a la neurogénesis y sólo en aquellas células de la glía radial que tienen un compromiso de diferenciación astrocítica (Choi et al. 1978, Voigt 1989, Cameron et al. 1991). Por otro lado, la glía radial temprana expresa el filamento intermedio vimentina, el cual también se encuentra presente en los astrocitos inmaduros y reactivos – no así en astrocitos maduros- y células endoteliales (Pixley et al. 1984, Campbell et al. 2002, Gotz et al. 2002). Adicionalmente, el marcador enzimático 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (3-PGDH) se expresa de manera abundante y homogénea en las células neuroepiteliales y en la glía radial temprana. 3-PGDH participa en la síntesis *de novo* de L-serina, siendo este un aminoácido no esencial y un precursor indispensable para la síntesis de proteínas, lípidos de membrana, nucleótidos y aminoácidos neuroactivos tales como D-serina y glicina. Debido a que L-serina es un precursor de la síntesis de lípidos de membrana, como los fosfolípidos y esfingolípidos, las demandas de este aminoácido aumentan durante la diferenciación neuronal, específicamente al expandirse de forma dinámica la membrana plasmática. Sin embargo, 3-PGDH no se encuentra presente en poblaciones neuronales, por lo que no son capaces de sintetizar L-serina. Al respecto, se ha postulado que la glía radial al tener un contacto directo y estrecho con los neuroblastos, es la que le suministra L-serina y sus derivados a las neuronas. Más adelante en el

desarrollo, 3-PGDH se encuentra en los astrocitos (Mitoma et al. 1998, Furuya et al. 2000, Yamasaki et al. 2001) .

Aproximadamente al mismo tiempo que la glía radial temprana comienza aparecer y expresar marcadores astrogliales, los complejos de uniones estrechas que acoplan a las células neuroepiteliales se convierten en uniones adherentes. Estas especializaciones de membrana se encuentran localizadas en los pies terminales apicales de la glía radial temprana y son críticas para mantener la integridad de la ZV y el comportamiento de la glía radial temprana (Villalba et al. 2021). Además, el dominio apical y los pies terminales basales de la glial radial contienen uniones gap, que permiten la comunicación y la señalización intercelulares (Kriegstein, A. R. et al. 2003). Interesantemente, las células de la glía radial temprana comienzan a establecer un contacto especializado - similar a un astrocito - con las células endoteliales del desarrollo vascular cerebral (Takahashi et al. 1990). Se ha demostrado que la vasculatura inmadura en la corteza cerebral embrionaria murina interactúa físicamente con las células de la glía radial temprana positivas a nestina *in vivo* (da Silva et al. 2019). La interacción bidireccional entre estas dos células sería esencial para inducir la maduración vascular, la migración y diferenciación de células endoteliales, la ramificación de los vasos y la estabilización de los mismos. La importancia de esta interacción se observa cuando se genera la ablación de glía radial temprana *in vivo*, observándose una corteza cerebral pobremente vascularizada con una densidad de vasos un 79% menor y una ramificación de vasos un 83% inferior (Cheslow et al. 2016, Siqueira et al. 2018, Zhang, S. et al. 2020).

Las características ultraestructurales e inmunohistoquímicas, incluido el citoplasma electrolúcido, la presencia de filamentos intermedios, los gránulos de glucógeno en los pies terminales, los inmunomarcadores típicos y la morfología bipolar altamente polarizada, confirman la naturaleza glial de estas células (Rakic 1972, Choi 1986, Gotz 2003, Zecevic 2004, Allen et al. 2018). Y son estas características las que otorgan las funciones excepcionales a esta célula madre neural.

4. Glía radial temprana y neurogénesis

Durante el período de neurogénesis cortical, la glía radial temprana posee principalmente dos funciones; (i) generar neuronas y (ii) servir como célula de andamiaje para que los neuroblastos alcancen su destino final (Noctor et al. 2001, Gotz et al. 2016, Mira et al. 2020). En esta etapa del desarrollo, la ZV está compuesta en un 96% por las células de la glía radial temprana (Noctor et al. 2002). La generación de una neurona a partir de la glía radial temprana puede ser de forma directa o indirecta. Particularmente, en el peak de la neurogénesis (E11-E14), la glía radial temprana experimenta una división asimétrica, generando en cada división una célula glial radial autorrenovable que hereda la fibra radial y una célula hija, denominada neuroblasto, célula que se convertirá en una neurona luego de la fase de migración. Este método de división proporciona un mecanismo para generar diversos subtipos de neuronas que eventualmente se posicionan en diferentes capas dentro de la corteza, tal como se ha observado en estudios que evaluaron clones de neuronas marcados retroviralmente en primates (Kornack et al. 1995, Anthony et al. 2004, Kriegstein, A. R. et al. 2004, Noctor et al. 2004). Por otro lado, la generación indirecta de neuronas implica la producción de PI a partir de la glía radial temprana (Figura 1). Los PI, denominadas de esa forma por su posición de linaje intermedio entre la glía radial y las neuronas, también son denominados progenitores basales, debido a su ubicación lejos de la superficie ventricular, específicamente en la ZSV (Haubensak et al. 2004, Noctor et al. 2004, Hevner 2019). Los PI son considerados como células amplificadoras en tránsito, definidas como una clase de células con una vida útil finita, que surgen de las células madre neurales - la glía radial -, proliferan y luego se diferencian (Tajbakhsh et al. 2009, Ruan et al. 2021). A diferencia de las células de la glía radial, que se dividen predominantemente de forma asimétrica durante el período de neurogénesis, los PI experimentan divisiones simétricas, generando dos neuroblastos o bien, pueden dividirse de forma proliferativa para producir dos PI adicionales (Hevner 2019).

Morfológicamente, los PI son células multipolares ubicadas principalmente en la ZSV que no tienen contacto con las superficies ventriculares o piales. Además, no poseen las características de

la glía radial anteriormente descritas; no experimentan MNI, su división ocurre en la ZSV y no expresan los marcadores de glía radial. Los mecanismos moleculares que regulan específicamente la proliferación y diferenciación de las células PI son en gran parte desconocidos. Pocos genes muestran una expresión predominante en los PI, sin embargo, Svet1 (por sus siglas en inglés, transcripto 1 expresado subventricularmente) (Tarabykin et al. 2001) y los factores de transcripción Cux2 (Zimmer et al. 2004) y Tbr2 (Englund et al. 2005) se encuentran expresados de forma robusta por las células PI. La importancia de la generación de los PI radica en la contribución al aumento sustancial de la ZSV y de las capas corticales superiores en la filogenia de los mamíferos, donde las neuronas derivadas de los PI han favorecido notablemente a la expansión evolutiva de la corteza cerebral (Pebworth et al. 2021). Este punto de vista está respaldado por la ausencia de la ZSV en la corteza dorsal de los reptiles, conllevando a que estos presenten sólo 3 capas estratificadas en la corteza cerebral (De Juan Romero et al. 2015).



Cabe destacar que existe una segunda clase de células progenitoras, denominadas precursores neurales cortos (SNP), los que tienen contacto ventricular pero solo procesos basales cortos que no se extienden más allá de la ZSV. Los SNP se describieron por primera vez en el neocórtex en desarrollo del ratón, donde exhiben varias características en común con la glía radial temprana, tal como la morfología bipolar y la integración en el cinturón de uniones adherentes apicales (Gal et al., 2006; Tyler y Haydar, 2013). Sin embargo, aún se encuentra en debate si se trata de un tipo de células progenitoras distintas o de células PI iniciales que aún no han perdido el contacto ventricular. Además, se ha evidenciado que la glía radial temprana genera células gliales radiales basales (bRG) (Hansen et al. 2010, Borrell et al. 2014). Se ha establecido que estas células están enriquecidas en la corteza en desarrollo de especies girencefálicas como los primates o el hurón y sus somas se localizan en la SVZ interna y externa (iSVZ y oSVZ, esta última una subregión superficial que representa el compartimento proliferativo más grande en estas especies) (Ortega et al. 2018). Al respecto, se ha descrito que las bRG tienen un proceso basal pero no apical (Hansen et al. 2010) sin embargo, en

primates también existen células de la glía radial que poseen contacto ventricular y un proceso basal que no llega a tener contacto con el borde submeningeo (Betizeau et al. 2013). Ambos tipos de glía radial, apical y basal, se generan a partir de la glía radial temprana. Estas células progenitoras, son altamente neurogénicas e importantes para el desarrollo del cerebro giroencefálico, especialmente asociado con la aparición de pliegues corticales (circunvoluciones y surcos). Estas células son escasas en especies lisencefálicas, tales como roedores (Penisson et al. 2019).

Con respecto a la migración neuronal, se ha determinado que la migración radial de neuroblastos puede ocurrir en dos modalidades: translocación somal y locomoción (Accogli et al. 2020). La primera ocurre en los estadios tempranos de la neurogénesis (E11-E13), donde la neurona naciente hereda el proceso basal de la glía radial temprana, por lo que está anclada tanto a la superficie pial como ventricular (Miyata et al. 2001). Este tipo de neurona similar a la glía radial, denominada neurona radial, avanza hacia la superficie pial acortando su proceso principal mediante translocación somal, donde el soma de las células en translocación muestra un avance continuo a velocidades promedio de 60 $\mu\text{m}/\text{h}$. (Miyata et al. 2001, Nadarajah et al. 2001, Tamamaki et al. 2001). Más tarde en la corticogénesis (E14-E18), como la pared cerebral se ha ampliado, las neuronas no pueden translocar a través de la extensión completa de la neocorteza. En esta etapa, el proceso de locomoción predomina; sin embargo, el proceso de translocación somal continúa en la mitad superior de la neocorteza. Imágenes de lapso de tiempo de la glía radial temprana marcada retroviralmente y meticulosas reconstrucciones de microscopía electrónica de la corteza cerebral de primates en desarrollo, han demostrado que los neuroblastos migran a lo largo de las fibras de la glía radial parental, utilizándola como una especie de vía férrea por la cual los neuroblastos recién generados avanzan desde la superficie ventricular hasta sus destinos definitivos en la corteza (Noctor et al. 2001, Tamamaki et al. 2001, Gotz et al. 2002, Weissman et al. 2003, Kaur et al. 2020). Estudios de marcadores fluorescentes han demostrado que el proceso basal de la glía radial no se retrae durante la mitosis, sino que permanece en su lugar durante todo el ciclo celular, es así que la migración

neuronal continúa incluso mientras la célula de la glía radial guía se está dividiendo (Noctor et al. 2001, 2008). Una vez que las neuronas recién nacidas se delaminan de la ZV, entran en la ZSV y migran mediante un proceso de avance, denominado proceso líder (*leading process*) (Tsai y Gleeson, 2005; Marin et al., 2006). Este proceso líder establece interacciones adhesivas íntimas con el proceso basal de la glía radial temprana para ser guiados en su desplazamiento migratorio, donde la punta del proceso principal tiene una estructura altamente móvil; el cono de crecimiento (Marin et al., 2010; Cooper, 2013; Evsyukova et al., 2013). Estas células muestran un patrón saltatorio característico de migración: ráfagas cortas de movimientos hacia adelante intercalados con fases estacionarias, lo que resulta en velocidades promedio más lentas que la translocación somal, con un promedio de 35µm/h (Nadarajah et al. 2001).

Los cuerpos de las células de la glía radial temprana residen en la ZV y la ZSV durante todo el período de desarrollo cortical, participando en la neurogénesis y guiando la migración neuronal. Al final de este período del desarrollo, la glía radial comienza a generar las células gliales, en un proceso conocido como gliogénesis (Ortiz-Alvarez et al. 2021).

5. Glía radial y gliogénesis

Durante el desarrollo del sistema nervioso central de los vertebrados, las neuronas se generan primero y las células gliales después (Kriegstein, A. et al. 2009, Ortiz-Alvarez et al. 2021) (Figura 1). Así, los astrocitos aparecen alrededor del estadio E18 en roedores, con su número máximo en el período neonatal. Por su parte, los oligodendrocitos diferenciados se observan por primera vez después del nacimiento. Esta génesis celular cronometrada tiene un sentido biológico, ya que inicialmente se establecen los esquemas básicos de los circuitos neuronales, y luego los números y las posiciones de la glía se corresponden con dichos circuitos (Ohtsuka et al. 2019). De manera destacable, estas observaciones *in vivo*, también se han evidenciado *in vitro*, donde cultivos primarios de estadios E10-E12 de células madres neurales y progenitoras generan sólo neuronas durante los primeros días, y luego astrocitos y oligodendrocitos (Shen et al. 2006).

Los astrocitos constituyen las células gliales más abundantes del cerebro humano (Eroglu et al. 2010). Realizan tareas metabólicas, estructurales, homeostáticas y neuroprotectoras, como la eliminación de neurotransmisores y la regulación de la barrera hematoencefálica (Oberheim et al. 2012, Ransom et al. 2012, Vasile et al. 2017). Por su parte, los oligodendrocitos generan y mantienen la mielina en los axones, aumentando la velocidad y eficiencia de la conducción de señales axonales y contribuyen a la estructura y mantenimiento de los axones envainados (Kuhn et al. 2019). La transformación de la glía radial temprana en astrocitos multipolares comienza al modificar su morfología bipolar a unipolar, retrayendo uno de sus procesos. Usualmente primero deja de tener contacto con el ventrículo sin embargo, se ha observado que algunas células de la glía radial retraen primero el proceso basal (Morest 1970, Choi y Lapham 1978, Schmechel y Rakic 1979, Misson et al. 1991). Posteriormente adquieren de forma progresiva, una morfología multipolar astrocítica. La glía radial temprana puede transformarse en astrocitos o bien generar PI de astrocitos, los cuales se dividen localmente antes de la diferenciación terminal. Este proceso de amplificación astrocítica ocurre principalmente en etapas postnatales (Felix et al. 2020). Por otro lado, el primer paso para la generación de oligodendrocitos es la aparición de PI de oligodendrocitos a partir de la glía radial (Kuhn et al. 2019). Los PI de oligodendrocitos constituyen un grupo de progenitores en división que migran hacia la materia blanca y gris, donde pueden estar inactivos o proliferar simétricamente en respuesta a señales locales donde se diferencian de manera terminal (Mo et al. 2009). Cabe destacar que los PI de los oligodendrocitos se originan en múltiples localidades de los ventrículos laterales durante el desarrollo, existiendo un gradiente temporal ventral-dorsal; los PI se generarán primero a partir de la glía radial temprana ubicada en la zona ventral del ventrículo lateral en estadio E11.5 en ratón, luego en la zona lateral de los ventrículos laterales alrededor del estadio E15 y finalmente desde la corteza – zona dorsal- después del nacimiento. Sin embargo, gran parte de los oligodendrocitos generados de forma temprana desaparecen después del nacimiento, por lo que se ha sugerido que la mayoría de los oligodendrocitos presentes en la corteza adulta derivarían de la zona dorsal de los ventrículos laterales (Spassky et al. 1998, Kessarlis et al. 2006).

De manera destacable, en el cerebro de los roedores y otros vertebrados diversas células de la glía radial persisten en la vida adulta, manteniendo sus características de célula madre (Gage 2002, Lim et al. 2016, Bond et al. 2021)

6. Glía radial tardía

Se ha descrito que una subpoblación de glía radial permanece en la ZV de los ventrículos laterales manteniendo la capacidad de célula progenitora, continuando así la proliferación y la generación de células neurales tanto en estadio postnatal como adulto. Este importante antecedente ha sido ampliamente estudiado en el período adulto, donde la glía radial temprana se transforma en células con características astrocíticas, denominadas células B. Estas células dan lugar a las células C que funcionan como PI o progenitores amplificadores en tránsito en la ZSV del cerebro adulto (Obernier et al. 2018). Las células tipo C dan lugar a neuroblastos inmaduros (células A), que migran en cadenas hacia el bulbo olfatorio (Lois et al. 1994, Belluzzi et al. 2003), donde se diferencian en interneuronas (Carleton et al. 2003). Sin embargo, poca atención se le ha otorgado a la glía radial que permanece en una ventana de tiempo específica del desarrollo postnatal; hasta los 15 días en roedores y aproximadamente hasta los 6 meses en humanos (Tramontin et al. 2003, Sanai et al. 2011). Esta glía radial que permanece después del nacimiento es denominada glía radial tardía y/o glía radial postnatal (Kriegstein, A. et al. 2009) (Figura 1).

La glía radial tardía presenta características morfológicas similares a la glía radial temprana. Exhibe su soma alargado ortogonalmente a la superficie del ventrículo y abundantes filamentos intermedios alineados a lo largo de su eje, los cuales permiten que el proceso de la glía se extienda hacia el parénquima subyacente. Asimismo, la glía radial tardía exhibe la MNI y contacta de forma directa tanto el ventrículo como la superficie basal. Por otro lado, mediante microscopía electrónica, se ha determinado que la glía radial tardía, al igual que la glía radial temprana, presenta uniones adherentes cerca de la superficie apical y extienden hacia el LCR un solo cilio que posee una organización de microtúbulos $9 + 0$ (Tramontin et al. 2003). De manera importante, estudios de

recuento de células mediante microscopía electrónica en la ZV de ratones recién nacidos denota que el 95,1% de las células residentes en la ZV corresponden a la glía radial tardía. Dicho porcentaje va disminuyendo conforme transcurre el desarrollo. Así, en la ZV de ratones de 7 días el 61,8% de las células corresponden a la glía radial tardía y comienza a observarse la aparición de células endimales inmaduras. A los 15 días postnatales, el 77,1% de las células de la ZV corresponden a las células endimales inmaduras y maduras, mientras que las células restantes corresponden a astrocitos contactando el ventrículo, dando cuenta de la desaparición de las células de glía radial tardía (Tramontin et al. 2003). Lo anterior concuerda con que las células endimarias, que corresponden a las células que poblarán la pared ventricular, derivan de la glía radial (Spassky et al. 2005). Las células endimarias son las responsables del movimiento de LCR a lo largo del sistema ventricular mediante el batido coordinado de sus cilios (Sawamoto et al. 2006). A pesar de que un estudio previo sugirió que las células endimarias multiciliadas podrían funcionar como células madres neurales (Johansson et al. 1999), diversas investigaciones demuestran que estas células no generan neuroesferas con propiedades de células progenitoras *in vitro* (Chiasson et al. 1999, Capela et al. 2002) y que se vuelven postmitóticas durante el desarrollo (Spassky et al. 2005), por lo que la única célula con características de célula madre neural en etapas postnatales, en la ZV de los ventrículos laterales, correspondería a la glía radial tardía.

Se ha determinado que en humanos, durante los primeros 6 meses de vida, las células de la glía radial tardía recubren la pared ventricular lateral, expresando tanto vimentina como GFAP, y que adyacente a esta glía radial, existe una red de células unipolares y bipolares alargadas orientadas tangencialmente al revestimiento ventricular. La gran mayoría de estas células expresan los marcadores neuronales inmaduros doblecortina (DCX) y tubulina β -III (Tub β III) y algunas neuronas inmaduras putativas también expresan la molécula de adhesión de células neurales polisialilada (PSA-NCAM), la cual está presente en células migratorias. Cabe destacar que estas células poseen características ultraestructurales de neuronas migratorias inmaduras similares a los neuroblastos

descritos en la ZSV de roedores (Sanai et al. 2011). Este mismo estudio, demostró que entre los 6 y 18 meses de vida, la glía radial tardía no se encuentra presente en los ventrículos laterales. Además, se realizaron análisis de densidad de células positivas para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la ZV de individuos menores de 1 año e individuos sobre los 14 años (considerados como adultos). EGF estimula la división de las células madres neurales multipotentes derivadas de la ZV tanto *in vitro* como *in vivo* y su receptor se encuentra en las células madres proliferativas activas de la ZV y ZSV. Los resultados arrojaron que la densidad de células positivas para el receptor EGF es significativamente mayor en la ZV de individuos menores de 1 año, en comparación con individuos adultos (Weickert et al. 2000). Estos antecedentes, sugieren que la ventana en la que se encuentra la glía radial tardía tanto en humanos como en roedores es estrecha y que, probablemente, continúa diferenciándose en neuronas. Sin embargo, es importante destacar, que los antecedentes en la literatura indican que la diferenciación de la glía radial tardía en estos estadios del desarrollo es mayoritariamente astrocítica (Kriegstein, A. et al. 2009).

A pesar de la importancia biológica que representa la presencia de una célula madre neural postnatal, como lo es la glía radial tardía y que simboliza potenciales blancos terapéuticos de lesiones neurológicas que afectan a los recién nacidos, poca atención se le ha dado al estudio de esta célula, tanto a nivel morfológico como funcional. A este respecto, la gran mayoría de los estudios morfológicos y de factores que regulan la diferenciación, han sido realizados en la glía radial temprana, por lo que se torna relevante estudiar posibles factores que modulen la diferenciación de la glía radial tardía, como a su vez, lograr la caracterización de esta célula madre.

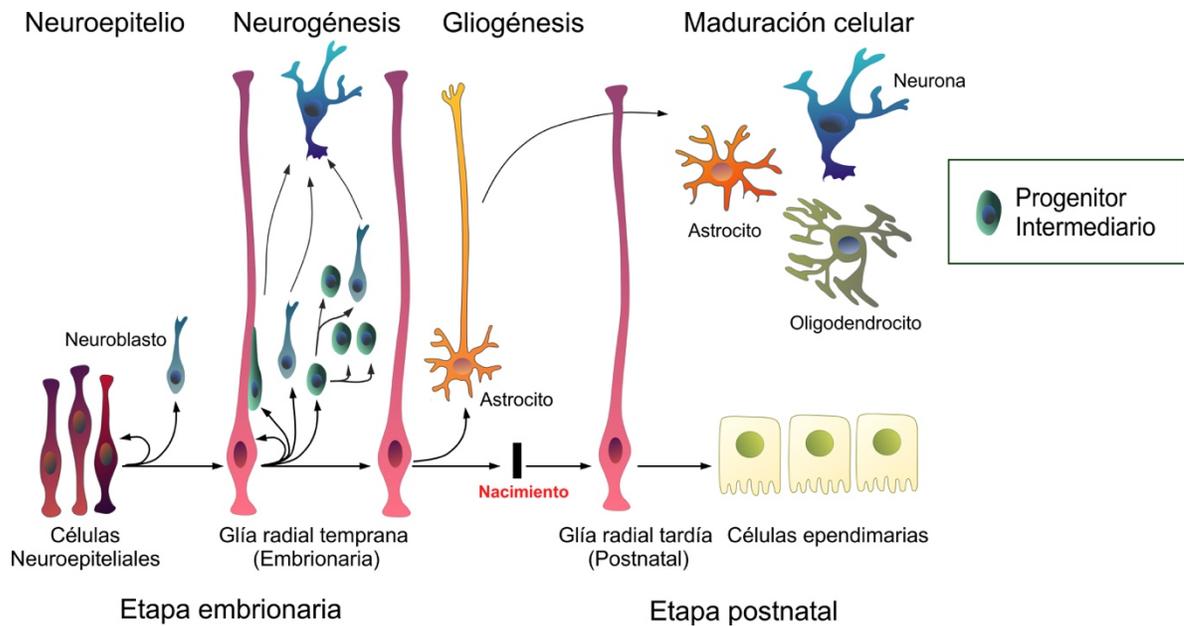


Figura 1. Esquema representativo de la glía radial en el desarrollo de la corteza cerebral.

En el desarrollo temprano de la corteza cerebral, las células neuroepiteliales experimentan rápidas divisiones proliferativas simétricas como también, generan algunos neuroblastos. Poco antes del inicio de la neurogénesis, las células neuroepiteliales dan origen a la glía radial temprana. En esta etapa neurogénica, la glía radial temprana se auto-renueva y genera neuroblastos de manera directa como también, de forma indirecta, a través de progenitores intermediarios (PI). Los PI pueden experimentar divisiones simétricas proliferativas (generando dos PI), asimétricas (produciendo un neuroblasto y un PI) o bien, generar dos neuroblastos a través de divisiones simétricas consuntivas. Los neuroblastos migran a través del proceso basal de la glía radial o mediante translocación somal. Luego de la etapa neurogénica, la glía radial temprana comienza la diferenciación astrocítica. Posterior al nacimiento, en una etapa que es principalmente un período de maduración celular, un remanente de la glía radial temprana, conocida como glía radial tardía permanece por una ventana de tiempo específica, tanto en humanos como roedores.

7. Factores que regulan la diferenciación de la glía radial

En conjunto, las células de la glía radial temprana y tardía, dan a lugar a las células gliales y a una asombrosa variedad de distintos tipos neuronales. Estudios de rastreo de linajes retrovirales *in vivo* demostraron que algunas células de la glía radial temprana generaron sólo neuronas, otras se diferenciaron tanto en neuronas como en astrocitos, mientras que, sorprendentemente, algunas células de la glía radial temprana sólo generaron astrocitos, esto potencialmente debido a los distintos tiempos en la inducción de la diferenciación (McCarthy et al. 2001). Así, aunque la ZV puede parecer una zona proliferativa relativamente uniforme y continua que rodea al ventrículo, de hecho está compuesta, desde la etapa más temprana de la neurogénesis por células de la glía radial que son heterogéneas con respecto a los tipos de células que generarán (Kriegstein, A. et al. 2009). En consecuencia, se ha postulado que tanto las células neuroepiteliales como la glía radial interpretan distintas señales y en respuesta, desarrollan programas únicos de expresión de factores de transcripción para producir la gran diversidad de células neurales. Por consiguiente, la glía radial debe ser heterogénea en cuanto a su función progenitora, dependiendo del conjunto de factores de transcripción que expresen. En este contexto, Pax6, Emx1, Sox2, Gsh1, Gsh2, Er81, Sp8, Nkx2.1, Dlx1, Dlx2 y Olig2 han sido implicados en la generación de diferentes subconjuntos de células neurales en la corteza cerebral (Campbell 2003, Puelles et al. 2003, Flames et al. 2007, Guillemot 2007, Kriegstein, A. et al. 2009). Cabe destacar, que estos factores de transcripción probablemente representan solo un pequeño subconjunto de un grupo mucho mayor (Long et al. 2009). Por ejemplo, recientemente se ha descrito que una disminución de los factores de transcripción SMAD1 y SMAD5 en la glía radial durante el desarrollo cortical temprano en ratón causó microencefalia y una mayor producción de neuronas corticales nacidas tempranamente a expensas de las nacidas tardías, lo que se correlacionó con la diferenciación prematura y el agotamiento de las células de la glía radial (Najas et al. 2020).

Por otro lado, la naturaleza polarizada del telencéfalo en desarrollo permite que este tejido genere señales altamente localizadas que afectan la diferenciación de la glía radial. Las distintas

fuentes de señalización, procediendo en la dirección apico-basal corresponden a las señales del LCR, las células progenitoras vecinas, los vasos sanguíneos, las neuronas, la lámina basal y las meninges. En este contexto, señales provenientes de las meninges, como vitamina A – ácido retinoico-, son captada por el proceso basal de la glía radial temprana. Diferentes estudios han determinado que esta vitamina reduce la autorrenovación de la glía radial, promoviendo la generación de los PI y la diferenciación neuronal (Glaser et al. 2005, Siegenthaler et al. 2009, Chatzi et al. 2013). Por otro lado, la glía radial posee un corto proceso apical que tiene contacto directo con la superficie ventricular. Los ventrículos encapsulan el LCR que es producido principalmente por los plexos coroideos, un epitelio secretor altamente vascularizado (Javed et al. 2021). Las moléculas se transportan de una manera finamente regulada a través de los plexos coroideos, mediante transporte facilitado o activo o por transcitosis de ligandos unidos a receptores. Avances en las técnicas de espectrometría de masas han evidenciado la complejidad de la composición del LCR, conteniendo una alta diversidad de iones inorgánicos, pequeños compuestos orgánicos, nutrientes metabólicos esenciales (glucosa y aminoácidos), hormonas y micronutrientes (vitamina C), polipéptidos y proteínas (Gherzi-Egea et al. 2018). Notablemente, la composición del LCR se conserva entre las especies y se regula dinámicamente durante el desarrollo (Silva-Vargas et al. 2016). Algunas moléculas de señalización producidas por los plexos coroideos incluyen factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), sonic hedgehog (Shh), ácido retinoico, proteínas morfogénicas óseas (BMP) y Wnts (Lehtinen et al. 2013, Gherzi-Egea et al. 2018). Todas estas moléculas poseen funciones establecidas en el desarrollo del cerebro y su efecto está mediado por receptores localizados en la membrana plasmática apical de la glía radial. En este contexto, existen diversas moléculas de señalización en el LCR que regulan la diferenciación de la glía radial temprana. Así por ejemplo, se ha demostrado que Wnt5a es secretado por los plexos coroideos en ventanas de tiempo específicas, de E12.5 a estadios postnatales, encontrándose en altas concentraciones en el LCR, tanto en ratones como en humanos (Kaiser et al. 2019). Interesantemente, la glía radial temprana presenta los receptores de Wnt, *Fzd3* y *Fzd10*, los que una vez activados y a través de la vía Wnt no

canónica, regulan la morfogénesis del cuarto ventrículo (Kaiser et al. 2019). En esta misma línea, Wnt5a se encuentra altamente expresado en el cerebelo de ratón tanto en etapas prenatales como postnatales y, a través de la vía no canónica, regula la proliferación de la glía radial (Subashini et al. 2017). Así, moléculas presentes en elevadas concentraciones en el LCR, actúan regulando la diferenciación de la glía radial. En este contexto, vitamina C, una molécula soluble que se encuentra altamente concentrado en el LCR podría tener un efecto en la regulación en el proceso de diferenciación de la glía radial. Estudios *in vitro* demuestran que el transportador de la forma reducida de vitamina C (SVCT2), se encuentra polarizado ventricularmente expresándose en la membrana apical de la glía radial temprana (Silva-Alvarez et al. 2016) sugiriendo que esta vitamina sería captada desde el LCR por el proceso apical de la glía radial que tiene contacto con el ventrículo y el LCR. Además, se ha determinado *in vitro*, que la vitamina C potencia la radialización de la glía radial temprana (Silva-Alvarez et al. 2016). Este efecto derivaría de un aumento de la actividad promotora y de los niveles proteicos del factor clave en la pluripotencia, Nanog, el cual es regulado por los niveles de vitamina C captados por la glía radial (Gao et al. 2013, Wu et al. 2014). Sin embargo, hasta la fecha, no existen antecedentes que relacionen el efecto de vitamina C en la regulación de la diferenciación de esta célula madre neural que se mantiene en los estadios postnatales humanos; la glía radial tardía.

8. Vitamina C

La mayoría de los mamíferos, incluyendo los roedores, son capaces de sintetizar la vitamina C a partir de la glucosa, sin embargo, humanos y primates de orden superior, así como cobayos y algunas especies de murciélagos, peces y aves carecen de esta capacidad (Drouin et al. 2011). Lo anterior se debe a las múltiples mutaciones y deleciones en el gen que codifica para la L-gulonolactona oxidasa lo cual impide la función de esta enzima y en consecuencia, no cataliza el paso final de la biosíntesis de la vitamina C (Chatterjee et al. 1960, Nishikimi et al. 1994). Por lo tanto, estas especies dependen de un suministro dietético adecuado de vitamina C. Una ingesta insuficiente de

vitamina C genera una serie de desórdenes clínicos y patologías, como lo son fatiga, hemorragia, debilidad muscular, anemia, entre otros. Si esta deficiencia de vitamina C no se trata, puede generar escorbuto, una enfermedad que sin tratamiento puede llegar a ser letal (Delanghe et al. 2011). La denominación vitamina C engloba tanto su forma reducida, ácido ascórbico (AA) como su forma oxidada, ácido dehidroascórbico (DHA). Las reacciones de oxidación y reducción de la vitamina C son reversibles, constituyendo la base de sus propiedades fisiológicas como agente antioxidante (Sapper et al. 1982). Dado que la vitamina C posee dos protones dissociables con valores de pK_a 4.02 y 11.34, es la forma reducida de la vitamina C, AA, la que predomina a pH fisiológico (Rice 2000). Sin embargo, a pesar de que AA representa un 90-95% de la vitamina C en el plasma sanguíneo y que el DHA es altamente inestable presentando una vida media de 2 a 6 minutos, este último adquiere un papel esencial en el reciclaje y recuperación del AA (Koshiishi et al. 1998, Nualart, F. J. et al. 2003, Nualart, F. et al. 2014). El mantenimiento de la reserva corporal de vitamina C depende de la ingesta dietética, la absorción eficaz, el reciclaje y la recaptación renal de la vitamina (Levine et al. 2011). Las concentraciones de vitamina C en la sangre y en los tejidos se controlan estrictamente mediante dos sistemas de transporte de vitamina C, los cuales son altamente específicos y difieren en sus características estructurales y funcionales. Estos corresponden a los transportadores facilitativos de glucosa GLUT, que transportan el DHA y la familia de transportadores de ácido ascórbico acoplados a sodio, SVCT, encargados de transportar AA (Nualart, F. J. et al. 2003, Nualart, F. et al. 2014). Debido a la ingesta, el reciclaje y a los transportadores de vitamina C, las concentraciones de esta vitamina en el plasma sanguíneo se encuentran alrededor de los 40-60 μ M para AA y entre 2 -5 μ M para DHA (Dhariwal et al. 1991, Rice 2000).

9. Transportadores de vitamina C

El DHA ingresa a la célula mediante los transportadores facilitativos de glucosa, los que están conformados por una familia de proteínas integrales de membrana con 14 isoformas funcionales; GLUT1-GLUT14 (Nualart, F. et al. 2014). Estructuralmente, estas proteínas tienen 12 dominios

transmembrana altamente hidrofóbicos con el extremo amino y carboxilo terminal orientado hacia la cara citoplasmática de la membrana plasmática (Tsukaguchi et al. 1999). Estos transportadores se encuentran ubicuamente distribuidos en las células de mamíferos pudiendo expresarse más de un transportador GLUT en un mismo tipo celular (Baldwin 1993). De estos catorce transportadores de glucosa descritos, los miembros GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 y GLUT8 corresponden a transportadores de DHA (Vera et al. 1993, Rumsey et al. 2000, Montel-Hagen et al. 2008, Corpe et al. 2013). Las células transportan DHA mediante difusión facilitada y aunque AA no tiene afinidad por los GLUT, el DHA adquiere una forma hemiacetal bicíclica en solución, similar a la glucosa (Pastore et al. 2001). Una vez dentro de las células, el DHA se reduce rápidamente a AA por las reductasas dependientes de NADH y NADPH, así como por el glutatión reducido (GSH) (Wells et al. 1990), generando de esta forma el reciclamiento de vitamina C (Nualart, F. et al. 2014, Ferrada et al. 2021). En este contexto, un estudio recientemente publicado evidencia que el proceso de reciclamiento de AA, llevado a cabo por el acoplamiento neurona-astrocito, donde el astrocito capta el DHA a través de GLUT1 y lo reduce intracelularmente (Cisternas et al. 2014) es crucial en la maduración neuronal en los estadios postnatales tempranos (Espinoza et al. 2020).

Por otro lado, los distintos componentes de la familia de transportadores GLUT muestran una expresión específica de tejido y célula, así como diversas afinidades y eficiencias en el transporte de DHA. Particularmente, en el cerebro, GLUT1 y GLUT3 son los principales responsables de la captación de DHA, por las células del sistema nervioso central. GLUT1 es la isoforma expresada en los astrocitos, células endoteliales de los vasos sanguíneos de la barrera hematoencefálica y los plexos coroideos. Cabe destacar que los astrocitos sólo captan DHA, transporte que es inhibido en gran medida por citocalacina B, un inhibidor de GLUT. Por su parte, GLUT3 se encuentra presente en las neuronas (Nagamatsu et al. 1992, Vannucci et al. 1994, Nualart, F. et al. 1999, Astuya et al. 2005).

Por otro lado, el transporte de la forma reducida de vitamina C, AA, es llevado a cabo por los transportadores de ácido ascórbico acoplados a sodio, SVCT (por sus siglas en inglés; *Sodium*

dependent Vitamin C Transporters) (Savini et al. 2008). Esta familia está compuesta por dos transportadores; SVTC1 y SVCT2 los cuales son producto de los genes *SLC23A1* y *SLC23A2* respectivamente, ambos miembros de la familia de genes humanos *SLC23* (Takanaga et al. 2004). Estos transportadores comparten entre sí un 65% de homología de secuencia, presentan 12 dominios transmembrana, saturabilidad de sustrato, alta afinidad por el AA, así como dependencia de ATP y sodio (Nualart, F. et al. 2014). La energía para realizar este transporte en contra del gradiente electroquímico, proviene de la entrada de dos moléculas de sodio por cada molécula de AA. Debido a lo anterior, sumado a la naturaleza hidrófila y la carga negativa de AA a pH fisiológico, este mecanismo de transporte es unidireccional (May et al. 1998, Godoy et al. 2007). Los valores de K_m aparentes para los SVCT varían en diferentes investigaciones, dependiendo del sistema celular utilizado. Sin embargo, dado la alta concentración de AA en el LCR y en el parénquima cerebral y las K_m que presenta SVCT2, como por ejemplo una $K_m=20 \mu\text{M}$ en neuronas corticales indican que el transporte de AA se encuentra saturado (Castro et al. 2001), por lo que es a través de la regulación de los transportadores que se modulan las concentraciones de AA y por consiguiente, sus funciones. Cabe destacar que SVCT2 es un transportador de alta afinidad/baja capacidad mientras que SVCT1 es un transportador de baja afinidad/alta capacidad (Savini et al. 2008). Lo anterior se correlaciona con su distribución y función, mientras que SVCT1 se expresa en tejidos epiteliales como el intestino, riñón e hígado, donde contribuye al mantenimiento de los niveles de AA en todo el organismo, la expresión de SVCT2 es relativamente ubicua, encontrándose en células y tejidos metabólicamente activos, estando altamente expresado en el cerebro y los ojos (Nualart, F. et al. 2014).

De las dos isoformas mencionadas, SVCT2 se expresa en el cerebro, órgano donde AA alcanza una concentración 10 veces mayor que en el plasma sanguíneo, reportándose niveles de $500 \mu\text{M}$ en el LCR y en regiones del parénquima cerebral de $200\text{-}400 \mu\text{M}$ (Spector et al. 1974). En este último, la vitamina C se encuentra compartimentalizada, presentando mayores niveles en las neuronas (10 mM) que en las células gliales (1 mM) (Rice 2000). Estudios recientemente publicados han

demostrado que SVCT2 se encuentra localizado basolateralmente en las células de los plexos coroideos (Ulloa et al. 2019) lo cual, considerando que la barrera hematoencefálica es impermeable a AA (Agus et al. 1997) y carece de SVCT2 (Garcia Mde et al. 2005, Qiao et al. 2008), es altamente probable que la entrada de AA al cerebro ocurre a través de los plexos coroideos. Lo anterior se respalda en observaciones *in vitro*, donde células de papiloma de plexo coroideo humano transportan AA a través de SVCT2 (Ulloa et al. 2013). Conjuntamente, estudios de hibridación *in situ*, han demostrado la expresión del ARNm de SVCT2 en estadios tempranos del desarrollo, específicamente en la tela coroidea, estructura que formará los plexos coroideos, sugiriendo que la concentración de AA al LCR comienza de forma temprana a nivel cerebral (Silva-Alvarez et al. 2016).

Adicionalmente a la presencia de SVCT2 en los plexos coroideos, análisis de hibridación *in situ* como también estudios inmunohistológicos e inmunocitológicos han detectado la presencia de SVCT2 en neuronas corticales, hipocampales, cerebelares, tanicitos hipotalámicos, microglía y en células de la glía radial temprana (Tsukaguchi et al. 1999, Astuya et al. 2005, Garcia Mde et al. 2005, Nualart, F. et al. 2012, Ulloa et al. 2013, Salazar et al. 2014, Silva-Alvarez et al. 2016). Además, SVCT2 se detecta en poblaciones de astrocitos altamente especializados, como lo es en la glía limitante, una delgada barrera de astrocitos asociados con la lamina basal que rodea al cerebro (Nualart, F. et al. 2012) como también, en astrocitos reactivos (Salazar et al. 2017). Además, se ha descrito la presencia de SVCT2 durante el desarrollo postnatal cerebeloso, demostrando que primero se expresa en células precursoras granulares y luego en neuronas de Purkinje maduras como también, en neuroesferas cerebelosas derivadas de cerebelo murino de 4 días postnatales encontrando una estrecha correlación entre SVCT2 y nestina, validando la noción de que las células positivas a nestina indiferenciadas expresan el transportador de AA (Oyarce et al. 2018). Con respecto a la glía radial temprana, se ha determinado mediante hibridación *in situ* y el análisis inmunohistoquímico en ratones, que SVCT2 se encuentra polarizado hacia la zona ventricular, región donde la glía radial

posee su soma y contacta al LCR. Asimismo, análisis inmunohistoquímicos en cerebros humanos de 9 semanas de gestación, concordante con el periodo neurogénico humano, demostraron que SVCT2 se encuentra polarizado ventricularmente en la glía radial temprana como también en sus procesos radiales en la zona intermedia de la corteza cerebral (Silva-Alvarez et al. 2016), por lo que, probablemente la glía radial temprana esté captando AA desde el LCR.

La importancia de SVCT2 en el transporte de AA se observa en los ratones *knockout* heterocigotos para SVCT2, donde las concentraciones de AA cerebral disminuyen en un 30 a 50% en los ratones SVCT2^{+/-} y son indetectables para ratones SVCT2^{-/-} con respecto a ratones wild type (Sotiriou et al. 2002). Además, ratones transgénicos que exhiben un aumento de ARNm de SVCT2 en el cerebro, en comparación con ratones wild type, presentan concentraciones de AA significativamente mayores en el cerebro (Harrison et al. 2012). Estas evidencias demuestran que es a través de SVCT2 que AA ingresa a los distintos órganos. Además, se ha demostrado que SVCT2 es esencial para mantener altos niveles de AA en neuronas hipocámpales intracelularmente, como también para mantener la cinética de transporte y el reciclaje de AA. Análisis de cultivos de neuronas hipocámpales provenientes de ratones SVCT2^{-/-} muestran que estas neuronas presentan un menor crecimiento de neuritas, una disminución de la amplitud y frecuencia de las corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura y mayor susceptibilidad al estrés oxidativo con respecto a cultivos de neuronas provenientes de ratones *wild type* (Qiu et al. 2007). Poniendo de manifiesto que el mantenimiento de AA intracelular como resultado de la actividad de SVCT2 es crucial para el desarrollo neuronal, la maduración funcional y las respuestas antioxidantes. Con respecto a los ratones SVCT2^{-/-}, estos mueren pocos minutos después del nacimiento debido a insuficiencia respiratoria y hemorragia en la corteza cerebral y en el tronco encefálico (Sotiriou et al. 2002). Cabe destacar que las causas de la hemorragia cerebral todavía no han sido dilucidadas, ni tampoco se han realizado estudios que correlacionen la muerte de estos ratones con deficiencias en la diferenciación o maduración neuronal, ni tampoco en las posibles conexiones no funcionales y/o aberrantes que

probablemente se generaron. Sin embargo, este estudio pone de manifiesto el requerimiento de la presencia del transportador SVCT2, para que existan los niveles apropiados de AA y así, esta vitamina pueda ejercer su función.

10. Funciones de ácido ascórbico en el cerebro

Debido sus altas tasas de metabolismo celular, el cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo (Halliwell 1992). Diversos experimentos *in vitro* e *in vivo* han respaldado el papel crítico de AA en el cerebro, como un poderoso antioxidante y secuestrador de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como un factor clave en el reciclaje de otros antioxidantes cerebrales, tales como vitamina E. El efecto antioxidante de AA se debe a su capacidad para donar electrones tanto del segundo como del tercer carbono (Padayatty et al. 2003, Mahfouz et al. 2004). Como era de esperar, en ratones SVCT2^{-/-} los niveles de marcadores de estrés oxidativo aumentaron significativamente en la corteza cerebral en respuesta a los bajos niveles de AA (Harrison et al. 2010). Asimismo se ha demostrado que la deficiencia de AA conduce a daño neuronal a través de procesos que implican un aumento de ROS y estrés oxidativo (Tveden-Nyborg et al. 2013). Además de su conocido rol antioxidante, AA ha sido ampliamente descrito como un inhibidor de la apoptosis, ya que disminuye la actividad de las caspasas 3 y 8, aumenta los niveles de Bcl-2, disminuye la expresión de BAX y previene la liberación de citocromo C de las mitocondrias (Dhar-Mascareno et al. 2005, Han et al. 2007, Ferrada et al. 2020). Por consiguiente, en condiciones fisiológicas, AA sería un potente inhibidor de la apoptosis. Por otro lado, estudios recientemente publicados han determinado que, en condiciones de estrés oxidativo y privación de glucosa, la oxidación de AA y la consecuente generación de DHA, se encuentran implicados en la regulación de necroptosis neuronal (Ferrada et al. 2020). La función de AA en un contexto fisiopatológico, como el cáncer, no ha sido del todo dilucidada y las evidencias que se contraponen; existen diversos estudios que demuestran que vitamina C presenta un efecto protector como también, múltiples investigaciones han demostrado que esta vitamina ejerce un rol pro-oxidante (Ferrada et al. 2021). Lo anterior se debe a que en la mayoría

de los estudios no se especifica si sus observaciones se deben a si la función fue ejercida por forma reducida (AA) u oxidada (DHA) de la vitamina C, por lo que la determinación del efecto de AA en un contexto cancerígeno aún permanece en debate. Por otro lado, en el contexto de infartos cerebrovasculares isquémicos, tanto el tratamiento con AA como la sobre-expresión de SVCT2 promueven la recuperación funcional y reducen el volumen de la región infartada, potenciando la migración de las células madre endógenas que recubren la ZSV, las cuales presentan el SVCT2, hacia la región lesionada después de la isquemia, favoreciendo la reconstrucción de la red neurovascular perjudicada. El mecanismo subyacente a la sobreexpresión de SVCT2 o al tratamiento con AA, que promueve la migración, es mediado por el ensamblaje de F-actina mediante la regulación positiva de la expresión de CDC42 (Yang et al. 2019).

Además de las funciones de AA previamente descritas, AA actúa como cofactor en variadas reacciones enzimáticas, incluidas las implicadas en la síntesis de catecolaminas, carnitina, colesterol, aminoácidos y ciertas hormonas peptídicas (Chatterjee et al. 1975). Una de sus funciones más conocida es la de facilitar la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina en el colágeno, lo que permite el plegamiento intracelular adecuado del pro-colágeno para su exportación y deposición como colágeno maduro (Peterkofsky 1991). AA también participa en la recaptación presináptica de glutamato, previniendo el daño excitotóxico causado por el exceso de glutamato extracelular (Tveden-Nyborg et al. 2013). También se ha demostrado que AA inhibe la unión del glutamato al receptor de NMDA, mostrando de esta manera un efecto directo en la prevención de la sobre-estimulación neuronal mediada por glutamato (Majewska et al. 1990, Yusa 2001).

Durante el desarrollo cerebral, tanto en estadios embrionarios como postnatales, la concentración de AA varía en el cerebro. Se ha determinado que en estadios embrionarios los niveles de AA se mantienen altos, alcanzado sus niveles máximos en la etapa gliogénica (E20) y, conforme transcurre el desarrollo, las concentraciones de AA van disminuyendo progresivamente (Kratzing et al. 1985). Por otra parte, en estadios postnatales, el contenido de AA fue mayor en el día 1 postnatal y disminuyó

significativamente alcanzando los niveles de AA promedio en la corteza adulta a los 32 días postnatales (Rice 2000, Meredith et al. 2011). Como se mencionó anteriormente, los roles de AA son cruciales y tanto en estadios embrionarios como postnatales combatiría el estrés oxidativo presente en estas etapas (Harrison et al. 2009). Sin embargo, también se ha demostrado el rol de AA en la diferenciación de células madres y en la maduración neuronal (Salazar et al. 2016, Espinoza et al. 2020). Interesantemente, nuestro grupo ha publicado la detección del ARNm y la proteína para SVCT2 en cerebro fetal de rata localizándose fundamentalmente en el área ventricular y subventricular donde se encuentra el soma de la glía radial temprana (Caprile et al. 2009, Silva-Alvarez et al. 2016), encontrando que los niveles del ARNm de SVCT2, a nivel periventricular, son mayores en las etapas neurogénicas que en el periodo gliogénico embrionario (Silva-Alvarez et al. 2016). Esto sugiere que la incorporación de AA por SVCT2 podría ser importante para procesos de diferenciación celular durante la formación de la corteza cerebral.

11. Efectos de ácido ascórbico en la diferenciación celular

Existen diversas evidencias que postulan a AA como una importante molécula en la diferenciación de las células madre. Así, por ejemplo, se ha evidenciado que AA desencadena la diferenciación de las células madres embrionarias del mesodermo de ratón promoviendo la miogénesis y osteogénesis e inhibiendo la adipogénesis. En este contexto, AA inhibe la neurogénesis para favorecer la miogénesis mediante la activación de la vía p38 MAPK / CREB (Rahman et al. 2017). Además, el tratamiento de AA en células madres embrionarias de la masa interna del blastocito, aumenta notablemente la tasa de diferenciación a miocitos cardíacos. Lo anterior ocurre de forma independiente de la propiedad antioxidante de AA, debido a que el tratamiento con antioxidantes alternativos, tales como vitamina E y N-acetilcisteína son incapaces de imitar el efecto de AA de inducir la diferenciación cardíaca (Takahashi et al. 2003). De igual forma, en células madres pluripotentes inducidas (iPSCs), el tratamiento con AA aumenta robustamente la diferenciación cardíaca, incluso en líneas celulares sin potencial cardiogénico espontáneo (Cao et al. 2012).

Notablemente, la concentración de AA es alta en células madre hematopoyéticas, tanto humanas como de ratón, y disminuye con la diferenciación (Agathocleous et al. 2017). Importantemente, en modelos de ratón de leucemia *in vivo*, al generar una disminución de AA, las células madres hematopoyéticas aumentan su proliferación, en parte, disminuyendo la actividad de las dioxigenasas Tet2, conllevando a una aceleración de la leucemogénesis (Agathocleous et al. 2017).

Además, estudios realizados en nuestro laboratorio, han determinado la presencia de SVCT2 en la línea celular C17.2, originalmente clonada a partir de células madre neurales cerebelosas de ratón, donde el tratamiento con AA aumentó el número de células positivas para el marcador neuronal tubulina β III, lo que sugiere que promueve el fenotipo neuronal. Sin embargo, al aumentar de manera estable la expresión de SVCT2, se detectó un aumento en la muerte celular, lo que propone que la expresión de SVCT2 debe estar finamente regulada durante los procesos de diferenciación (Oyarce et al. 2018). De igual forma, al tratar con AA la línea celular embrionaria derivada de teratocarcinoma de ratón, la cual posee características de célula madre y que genera neuroesferas, se observa un incremento en la expresión de marcadores neuronales y SVCT2, acompañado de un aumento en el transporte de AA (Pastor et al. 2013). Además, neuroesferas obtenidas de los ventrículos laterales de ratas adultas, región donde se encuentra el nicho neurogénico adulto, son inmunopositivas para GFAP y nestina y presentan una baja señal para tubulina β III, sin embargo, al ser tratadas con AA, aumenta la diferenciación neurogénica, observado en el aumento de reactividad para tubulina y una disminución de GFAP (Pastor et al. 2013). También, hemos demostrado que la sobreexpresión de SVCT2 en una línea celular neuronal (N2a), induce la formación de filopodias y lamelopodias, efecto que involucra la activación de la vía ERK1/2 (Salazar et al. 2016). Además, análisis de expresión de SVCT2 indican que este alcanza elevados niveles durante los primeros 5 días postnatales en la corteza cerebral, sugiriendo que las neuronas requieren de una importante captación de AA para llevar a cabo procesos de arborización y maduración neuronal, (Salazar et al. 2014). En concordancia, cultivos de neuronas hipocámpales de ratones SVCT2^{-/-} desarrollan un menor número de neuritas, una actividad

neuronal espontánea reducida, presentan una mayor susceptibilidad al daño oxidativo y excitotoxicidad inducida por N-metil-D-aspartato (Qiu et al. 2007). Así, el mantenimiento del AA intracelular como resultado de la actividad de SVCT2, es crucial para el desarrollo neuronal, la maduración funcional y las respuestas antioxidantes. Por otro lado, análisis inmunocitoquímicos revelaron que AA promueve la diferenciación *in vitro* de células obtenidas de la corteza cerebral de ratones de estadio E14 en neuronas y astrocitos, de una manera dependiente de la densidad celular (Lee et al. 2003). Para determinar que el efecto de diferenciación de AA no se basa en sus propiedades antioxidantes o pro-oxidantes, se utilizaron los antioxidantes GSH y vitamina E, observándose que no afectaron la diferenciación neuronal y/o astrocítica. Este mismo estudio observó que AA aumenta la frecuencia y amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura (mEPSC) en cultivos neuronales primarios (Lee et al. 2003). Estos datos sugieren que AA actúa en el cerebro en desarrollo ayudando en la formación de circuitos neuronales, promoviendo la adquisición de funciones sinápticas neuronales. Diferentes estudios, como los aquí presentados, han demostrado que AA promueve la diferenciación celular, específicamente, la diferenciación neurogénica de las células madres neurales. Sin embargo, existen diversas investigaciones que han demostrado que AA a su vez favorece el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células madre.

12. Efecto de ácido ascórbico en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre

En contraparte al rol de AA en promover la diferenciación neurogénica, diversos estudios describen el rol que vitamina C tendría en la mantención del fenotipo indiferenciado. Al respecto, se ha demostrado que el tratamiento de AA aumenta la proliferación de células de tejido adiposo subcutáneo, derivado de células madres mesenquimales con un incremento en los marcadores de pluripotencia Oct4 y Sox2 (Potdar et al. 2010). Dentro de este contexto, otro estudio, determinó que AA regula la diferenciación de las células madre mesenquimales, aumentando su proliferación. Específicamente se observó que AA inhibe la actividad del factor 1 inducible por hipoxia (HIF1 α) a

través de dos vías paralelas; suprime la transcripción de HIF α , y activa la hidroxilasa de HIF1 α para degradar HIF1 α . La inhibición de HIF1 α conduce a la activación mitocondrial, aumentando la proliferación celular y el metabolismo de las células madres mesenquimales (Fujisawa et al. 2018). Por otra parte, AA generó una mayor proliferación de células progenitoras natural *killer* (NK) derivadas de células madre hematopoyéticas, sin afectar la funcionalidad de estas células (Huijskens et al. 2015). Además, utilizando reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), se ha determinado que la presencia de AA permite la obtención de una mayor cantidad de células indiferenciadas. Esto fue acompañado por un incremento en la demetilación del promotor de *Nanog*, factor de transcripción que induce el fenotipo indiferenciado, sugiriendo que AA estaría involucrado en mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de genes que inducen un fenotipo determinado (Esteban et al. 2010). En este mismo contexto, se ha demostrado que vitamina C puede inducir la generación de células precursoras inducidas (iPCS), ayudando a su mantención y favoreciendo su proliferación donde incluso AA fue capaz de revertir el efecto diferenciador neuronal inducido con ácido retinoico (Wu et al. 2014). Con respecto a la glía radial temprana, se ha determinado que *in vitro* en cultivos enriquecidos de esta célula madre neural, AA potencia la radialización de procesos, contribuyendo al mantenimiento de su fenotipo indiferenciado (Silva-Alvarez et al. 2016).

Cambios en la metilación del ADN y de las histonas se asocian con la diferenciación y reprogramación de células madre. Se sugiere que los mecanismos por los cuales AA podría estar asociado con la regulación de la diferenciación de las células madres se basan en su rol como cofactor enzimático para la desmetilación del ADN e histonas. La metilación en la quinta posición del anillo de pirimidina de citosina (5mC) es una de las modificaciones más comunes del ADN y su desmetilación a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) es catalizada por proteínas Tet (Chen et al. 2013, Shi et al. 2017, Martin et al. 2018, Clare et al. 2019, Lee Chong et al. 2019). Por otro lado, la desmetilación de histonas se lleva a cabo mediante histonas desmetilasas como la familia que contiene el dominio Jumonji-C (JHDM) (Tsukada et al. 2006, Wang et al. 2011). Tanto las proteínas Tet como las JHDM

son hidroxilasas dependientes de Fe^{2+} /alfa-cetoglutarato ($\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{-KGDD}$). Durante la desmetilación, $\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{-KGDD}$ cataliza la reacción que convierte el α -cetoglutarato ($\alpha\text{-KG}$) y O_2 en succinato y CO_2 . La actividad $\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{-KGDD}$ requiere la reacción de oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} (Minor et al. 2013, Wu et al. 2014). AA reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} que luego es utilizado por Tet o JHDM en desmetilación nuevamente, mientras que el AA se oxida en DHA (Yin et al. 2013). Así, AA influye en la desmetilación del ADN mediada por Tet, y promueve la desmetilación de histonas como H3, H3K9, H3K36 y H3K27 (Young et al. 2015, Ebata et al. 2017). En este contexto, se ha determinado que AA promueve la actividad Tet, específicamente de Tet2 en células madres hematopoyéticas y modelos murinos de leucemia *in vivo* (Agathocleous et al. 2017, Cimmino et al. 2017)

Los ejemplos anteriormente expuestos, ponen de manifiesto que AA tiene un rol tanto en promover la diferenciación celular como en el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de distintos tipos de células madre. Interesantemente e independiente del rol dual que pueda tener AA, las evidencias ponen de manifiesto que AA regula procesos de diferenciación de diversas células madres, incluida la glía radial temprana. En este contexto, proponemos que la glía radial tardía seguiría expresando el transportador polarizado ventricularmente al igual que la glía radial temprana y que tanto AA como SVCT2 se encuentran regulando los procesos de diferenciación de la glía radial tardía

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La glía radial embrionaria es una de las principales células madres neurales del cerebro, siendo fundamental para la generación de células neurales como también, para el posicionamiento de las neuronas en la corteza cerebral. A pesar de que esta célula se encuentra presente en estadios embrionarios (glía radial temprana) y en estadios postnatales (glía radial tardía), las principales evidencias que han logrado caracterizar a la glía radial, morfológica y funcionalmente, se han desarrollado en etapas prenatales, por lo que no existen estudios acabados que hayan caracterizado la glía radial tardía y, hasta el momento de la realización de esta tesis, tampoco hay conocimiento de factores que modulen su diferenciación. En este contexto, el estudio de la glía radial tardía es crucial, ya que al ser una célula madre que se encuentra postnatalmente en humanos, su diferenciación podría ser modulada y en consecuencia, utilizarse en intervenciones terapéuticas. Al respecto, dentro las encefalopatías neonatales, la hipoxia isquémica intraparto es la más frecuente, donde la interrupción del suministro de sangre y oxígeno da como resultado, entre otras consecuencias, la muerte neuronal. En Chile, 4-6 de cada 1000 niños nacidos presentan hipoxia isquémica perinatal, lo que se traduce que entre 880-1320 nacidos anualmente podrían presentar afecciones motoras, cognitivas, sensoriales y conductuales de diferente magnitud. Por lo tanto, ampliar el conocimiento sobre la glía radial tardía es fundamental y podría ser utilizado como herramienta clínica frente a daños neurológicos neonatales.

Respecto a los factores existentes en el cerebro, se ha descrito que la forma reducida de vitamina C, ácido ascórbico, presente en elevadas concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR), regula la diferenciación de diferentes células madres. Con respecto a la glía radial, evidencias preliminares generadas en el laboratorio, han demostrado que en estadios embrionarios el transportador de ácido ascórbico, SVCT2, se encuentra polarizado ventricularmente en la glía radial, lo cual sugiere que la captación de ácido ascórbico por parte de esta célula. Además, ensayos *in vitro*,

evidenciaron que ácido ascórbico potencia la radialización de esta célula, favoreciendo el fenotipo indiferenciado. Lo anterior concuerda con distintas investigaciones que han demostrado que esta vitamina participa en el mantenimiento de la pluripotencia, tanto en la reprogramación celular como en células indiferenciadas. Por otro lado, el rol regulador y diferenciador neuronal de ácido ascórbico en células madres neurales ha sido ampliamente descrito, tanto por nuestro grupo de investigación como por otros. Sin embargo, hasta la fecha no existen evidencias que relacionen los posibles efectos de ácido ascórbico y/o su transportador en la diferenciación de glía radial tardía. En esta tesis proponemos realizar, mediante distintas aproximaciones experimentales, una detallada caracterización de la glía radial tardía como también, determinar el efecto de ácido ascórbico y de su transportador sobre esta célula. Para ello, realizaremos nuestros estudios en cerebro de distintos estadios postnatales en ratas normales y en ratones que sobre-expresan el transportador (SVCT2tg) como también, en ratones heterocigotos *knockout* (SVCT2^{+/-}).



III . HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis propone que : **“La expresión del transportador de ácido ascórbico, SVCT2, polarizado ventricularmente en la glía radial tardía en conjunto con ácido ascórbico, regulan la diferenciación de esta célula madre neural.”**

OBJETIVO GENERAL

Determinar el patrón de expresión del transportador SVCT2 en la glía radial tardía y el efecto de ácido ascórbico y su transportador en la diferenciación de la glía radial tardía.



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Determinar el patrón de expresión y distribución del transportador de ácido ascórbico SVCT2, en la glía radial tardía y caracterizar la glía radial durante el desarrollo postnatal.

2.- Analizar la diferenciación de la glía radial en estadios postnatales y el efecto de ácido ascórbico

en cultivos primarios enriquecidos en glía radial tardía.

3.-Evaluar el efecto de distintos niveles de SVCT2 sobre la diferenciación de la glía radial tardía tanto *in vitro* como *in vivo*

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Todos los estudios que se llevaron a cabo utilizando ratas Sprague-Dawley fueron aprobados y revisados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas y por el Comité de Ética, Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Concepción, Chile. Los procedimientos donde se utilizaron ratones *knockout* heterocigotos para SVCT2 (SVCT2^{+/-}) y transgénicos que sobre-expresan SVCT2 (SVCT2-Tg) fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Vanderbilt, USA y se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía del Instituto Nacional de Salud (NIH) para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura 20-25°C, en un ciclo de luz/oscuridad 12/12 horas, con comida y agua *ad libitum*.



2. Fijación por perfusión vascular

Para la obtención de cerebros de ratas de estadio postnatal de 1, 4, 6, 8, 12 y 16 días, los animales fueron insensibilizados mediante la inyección intraperitoneal de la mezcla de anestésicos: ketamina 40% v/v, xilacina 40% v/v y pacifor 20% v/v. Una vez validada la falta de reflejos mediante la ausencia de retracción de la pata trasera, en respuesta al punzamiento de la almohadilla dactilar, se procedió a la perfusión vascular. Para ello, se procedió a abrir la caja torácica, se realizó una incisión a la aurícula derecha y se insertó una cánula en el ventrículo izquierdo para permitir, inicialmente, el ingreso de suero fisiológico y luego del fijador paraformaldehído preparado al 4% p/v (PFA) en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4) o bien el fijador Bouin (formalina 25% v/v, ácido acético 5% v/v en solución saturada de ácido pícrico). A continuación, se procedió a la decapitación y extracción del cerebro, el cual fue dejado por 48 horas en inmersión con PFA 4% (p/v) en PBS o Bouin. Posteriormente se realizó el proceso de corte en vibrátomo (Vibratome line, Leica VT 10005) para obtener cortes de 40-100 μ m.

3. Inclusión y microtomía

Una vez fijados los cerebros con PFA 4% p/v en PBS por perfusión vascular y posteriormente por inmersión, fueron incluidos en bloques de parafina. Para ello, la muestra fue puesta en un *cassette* de inclusión y se procedió a lavar con agua corriente por 5 minutos. Posteriormente, se realizaron los pasos de deshidratación, aclaramiento e inclusión con parafina (Tabla 1). Para el proceso de deshidratación, los cerebros fueron lavados en concentraciones crecientes de alcohol, luego la muestra fue transferida a la batería de Histo-Clear con el fin de generar el aclaramiento del tejido y posteriormente, se realizó la inclusión con parafina, previamente licuada en una estufa regulada a 60°C. Finalmente, se vertió parafina líquida en un molde, se introdujo la muestra posicionándola de manera frontal y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Los bloques de parafina fueron cortados utilizando un micrótopo rotatorio (Reichert- Jung 2040) en láminas de 7 µm de espesor. Estos cortes fueron montados en cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina.

Tabla 1. Protocolo de inclusión en parafina



Batería de inclusión	Tiempo (minutos)
Alcohol 70°	20
Alcohol 96°	20
Alcohol 100° I	15
Alcohol 100° II	15
Alcohol 100° III	10
Alcohol 100° IV	10
Histo-Clear I	15
Histo-Clear II	30
Histo-Clear III	180

Parafina I	30
Parafina II	30
Parafina III	45
Parafina IV	15

4. Inmunohistoquímica

Se utilizaron cortes finos y gruesos de cerebro obtenidos de micrótomo y vibrátomo, respectivamente. En el primer caso, se realizó la desparafinación de las muestras. Para ello, los portaobjetos con las muestras montadas fueron tratados con una batería consistente en Histo-Clear I, II y III con lavados de 5 minutos en cada Histo-Clear y con una batería compuesta con alcoholes en concentraciones decrecientes (100°, 96°I, 96°II, 70° y 50°), donde las muestras fueron dejadas 5 minutos en cada uno de los alcoholes. Luego de desparafinar las muestras, se realizó el mismo procedimiento utilizado para los cortes de cerebros generados utilizando el vibrátomo, consistente en 3 lavados de 10 minutos con tampón Tris fosfato (84 mM Na₂HPO₄, 35 mM KH₂PO₄, 120 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,8) antes de ser incubadas por toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda con los anticuerpos primarios (Tabla 2). Luego de la incubación, se realizaron tres lavados con el tampón tris fosfato por 10 minutos y se realizó la incubación por 2 horas con los respectivos anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos (Tabla 2) y con el marcador nuclear H^oechst (Invitrogen) en diluciones 1:200 y 1:1000, respectivamente. La incubación fue realizada en una cámara húmeda en oscuridad. Tanto el anticuerpo primario como secundario fueron disueltos en tris fosfato, conteniendo albúmina de suero bovino 1% (BSA) p/v y tritón X-100 0,2% (v/v). Posteriormente, las muestras fueron lavadas 3 veces por 10 minutos, con el tampón tris fosfato y montadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako).

5. Inmunocitoquímica

Los cultivos primarios fueron cultivados sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro recubiertos con poli- L-lisina 0,2 mg/mL (Sigma) en placas de 24 pocillos. Para realizar la fijación de las células, se les retiró el medio de cultivo y fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas en PFA 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas y permeabilizadas 3 veces por 10 minutos en tampón tris fosfato con tritón X-100 0.2 % v/v (Sigma) e incubadas con los anticuerpos primarios preparados en Tris-BSA-Tritón X-100 durante toda la noche en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego, las células fueron lavadas 3 veces por 10 minutos en tampón tris fosfato e incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos preparados en Tris-BSA-Tritón X-100 ambiente y con el marcador nuclear H \ddot{o} chst (Invitrogen) en diluciones 1:200 y 1:1000, respectivamente. Se incubó por 2 horas en una cámara húmeda, en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron lavadas 3 veces por 10 minutos en tampón tris fosfato y montadas en 10 μ L de medio de montaje para fluorescencia (DAKO).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo Primario	Especie	Dilución	Origen
Anti-SVCT2 (G19)	Cabra	1:50	Santa cruz Biotechnology
Anti-Vimentina (V9)	Ratón	1:20	Dako
Anti-3PGDH	Conejo	1:300	Donado
Anti-Sox2	Conejo	1:100	Abcam
Anti-GFAP	Conejo	1:200	Dako
Anti- Tubulina β III	Ratón	1:1000	Promega
Anti-doblecortina	Cobayo	1:100	Millipore
Anti-NeuN	Ratón	1:500	Millipore

Anti-Glut1	Conejo	1:100	Millipore
Anti-Nestina	Ratón	1:50	BD Biosciences
Anti-Tbr2	Pollo	1:100	Millipore
Anti-GFAP	Conejo	1:200	Dako
Anticuerpo Secundario			
Anti-IgG conejo – Cy ³	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG conejo – Cy ²	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG conejo – Cy ⁵	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG ratón – Cy ²	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG ratón – Cy ³	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG ratón – Cy ⁵	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG cabra – Cy ²	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG cabra – Cy ³	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG cobayo – Cy ⁵	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG pollo – Cy ³	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG pollo – Cy ⁵	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch

6. Microscopía

Las imágenes en campo claro fueron obtenidas en un microscopio Axioplan 2 (Zeiss). Las imágenes en fluorescencia fueron obtenidas en un microscopio confocal espectral LSM 780 LNO (Zeiss), el cual posee 7 líneas de láser y permite detectar hasta 5 marcajes, en una misma muestra. Además, este microscopio confocal cuenta con láser pulsado multifotónico ajustable desde 680 a 1080 nm, en pasos de 1 nm, el cual fue utilizado como herramienta para obtener imágenes a través de microscopía de dos fotones. Las reconstrucciones bidimensionales en los planos xz e yz y las

proyecciones tridimensionales fueron realizadas con el programa Zen 2011 V7.0.7.2 (Zeiss). Todos estos equipos y software se encuentran disponibles en el Centro de Microscopía Avanzada (www.cmabiobio.cl) de la Universidad de Concepción.

7. Inmunolocalización ultraestructural

Las ratas fueron anestesiadas según el protocolo especificado en la sección 5.2 de materiales y métodos. Luego, se realizó la perfusión vascular con suero fisiológico y a continuación con la mezcla de fijadores; glutaraldehído 0,5 % v/v y PFA al 4 % p/v en PBS. Finalizada la perfusión, los cerebros fueron extraídos y post-fijados en PFA al 4 % p/v durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los cerebros fueron lavados 5 veces por 10 minutos en PBS a 4°C y cortados en secciones de 50 µm en un vibrátomo (Leica VT 1000 S). Posteriormente, los cortes fueron lavados en PBS, tres veces por 5 minutos, e incubados por 30 minutos en borohidruro de sodio 1% en H₂O. Luego de realizar seis lavados en PBS por 10 minutos cada uno, los cortes fueron crioprottegidos con sacarosa al 25% p/v en PBS en agitación por 30 minutos. Se realizó la permeabilización sumergiendo las muestras en metilbutano a -60 °C y luego en sacarosa al 25 % p/v. Subsecuente a la permeabilización, las muestras fueron lavadas 3 veces por 5 minutos en PBS e incubados con BSA 0,3% p/v en PBS durante una hora. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario preparado al 0,3% p/v en PBS por 4 días a 4 °C. Luego, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS y se bloqueó nuevamente incubando las muestras por una hora con BSA 0,5% p/v en PBS. Se realizó la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con partículas coloidales de oro en una dilución 1:50 en BSA al 0,5 % p/v en PBS por 24 horas a temperatura ambiente y en agitación. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS por 10 minutos y 3 lavados en acetato sódico al 2% en H₂O por 15 minutos cada uno. Posteriormente, se realizó la intensificación con plata. Para ello, se sumergieron las muestras en iguales de los reactivos *developer* y *enhancer* por 30 min y se lavó nuevamente en acetato sódico al 2 % tres veces por 5 minutos. A continuación, se incubó en cloruro de oro al 0,05 % en H₂O por 10 minutos a 4 ° C y luego, se lavó en tiosulfato de sodio al 0.3 % en H₂O dos veces por 10 minutos a 4

°C y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS por 10 minutos cada uno. Luego las muestras fueron post-fijadas con glutaraldehído al 2 % v/v en tampón PBS por 30 minutos y se lavaron 5 veces por 5 minutos en PBS y nuevamente post-fijado con tetróxido de osmio al 1 % v/v / glucosa al 7 % p/v en PBS por 30 minutos. Posteriormente, se realizó la inclusión de los tejidos para realizar la microscopía electrónica de transmisión. Para ello, las muestras fueron lavadas en agua destilada 3 veces por 5 minutos y deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol; 25°, 50° y 70° tres veces por 5 minutos cada uno. Subsiguientemente, se incubó en oscuridad por 3 horas a 4 °C con acetato de uranilo 2 % p/v en etanol 70°. De manera conjunta, se preparó la resina Araldita 502 (Electron Microscopy Sciences), realizando una preparación de 10.8 gramos de araldita, 9.2 gramos de anhídrido dodecenilsuccínico (DDSA) y 0.4 gramos del acelerador DMP-30, esta mezcla fue puesta en una cámara de vacío para remover las burbujas. Luego, las muestras fueron lavadas en etanol 70°C por 5 minutos y en etanol 96° y 100 ° tres veces por 10 minutos, todos estos lavados fueron realizados a 4°C y se realizaron dos lavados de 10 minutos en óxido de propileno a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron transferidas a araldita manteniéndose en agitación todo la noche. Posteriormente, las muestras se llevaron a un molde de aluminio y se cubrieron con araldita dejando polimerizar por 3 días a 60 °C. Finalmente, se procedió a realizar los cortes de 60 nm en el ultramicrotomo UltraCutE (Reichert- Jung. Germany) con cuchilla de diamante, a una velocidad de 1.0 mm/s y se recogieron sobre grillas de cobre de 200 mesh, para su observación en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol Jem-1400).

8. Microdissección Láser

Se utilizaron cerebros de ratas de estadios E15, E17, P1, P4, P8, P12 y P16. Los cerebros de estadios embrionarios fueron fijados por inmersión durante 4 horas y los estadios postnatales fueron fijados inicialmente por perfusión vascular y luego mediante inmersión por 3 horas. En ambos casos, se utilizó el fijador metacarn (Metanol 60% v/v, Cloroformo 30% v/v y ácido acético glacial 10% v/v). Luego de la fijación se realizaron cortes con vibrátomo, obteniéndose muestras de 60-80 µm.

Estos cortes fueron montados en portaobjetos de marco con membrana PEN (polietileno naftalato) para posteriormente, utilizando sistema de microscopía para microdissección láser (LMD 7000, Leica) con el láser UV, proceder a la microdissección de; la ZV-ZSV, la corteza cerebral externa, la corteza total y regiones aleatorias del cerebro. La colección de las muestras se realiza por gravedad evitando la contaminación de la muestra. Finalmente, los cortes generados por microdissección fueron guardados en distintos tubos eppendorf conteniendo RNA later (Ambion) para preservar el ARN y posteriormente, extraer el ARN total.

9. Extracción ARN total por columna

La extracción de ARN de las muestras obtenidas por microdissección láser se realizó por columna utilizando el RNAqueous®-Micro Total RNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific). El tejido se incubó por 30 minutos a 42°C en 100 µL de solución de lisis. Transcurrida la incubación se agitó utilizando un vórtex y se centrifugó brevemente para colectar el lisado en el fondo del tubo. Posteriormente se añadió 3µL de aditivo LCM (laser capture microdissection), se agitó y se centrifugó. Luego, se agregaron 129 µL de etanol 100% y se mezcló por pipeteo para después cargar el lisado a la columna, la cual fue previamente humedecida con 30µL buffer de lisis y centrifugada a máxima velocidad. Para mantener el ARN en el filtro de la columna, se centrifugó el lisado a 10.000g por 10 minutos. Luego, se procedió a realizar los lavados del filtro. Para ello, se lavó con 180 µL de la solución de lavado 1 y se centrifugó a 13.000g durante 30 segundos posteriormente, se realizaron dos lavados con 180 µL la solución de lavado 2/3 y centrifugado a 13.000 x g durante 30 segundos, cada uno. Para remover los residuos, se centrifugó nuevamente a 13.000g por un minuto. Subsiguientemente, se realizó la elución del ARN; el microfiltro fue transferido a un nuevo tubo de microelusión y se agregó 8 µL de solución de elusión, previamente precalentada a 95°C. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 13.000g por un minuto para eluir el ARN del filtro. Se repitió este procedimiento con otros 8 µL de solución de elusión. Finalmente, se realizó el tratamiento con DNasa I e inactivación de DNasa. Se añadió 1/10 de volumen de tampón de DNasa

I 10X y 1 μ L de DNasa I (ThermoFisher Scientific) y se incubó la reacción de DNasa durante 20 minutos a 37°C. Luego, se agregó 1/10 volumen de reactivo de inactivación de DNasa (ThermoFisher Scientific) y se mantuvo por 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 x g por dos minutos para sedimentar el reactivo de inactivación de DNasa y se colectó el ARN por pipeteo en un nuevo tubo y se almacenó a -80°C hasta su uso. Cabe destacar que dado la escasa cantidad de muestra que se recolecta para la extracción de ARN de estadios embrionarios 15 y 17 y estadio postnatal de 1 día, se requirieron 3 cerebros para generar n =1. Por otro lado, en los estadios postnatales posteriores a 1 día, un cerebro corresponde a n=1.

10. Transcripción reversa (RT) del ARN total

El ARN total fue utilizado para la síntesis del ADN copia (ADNc) usando la enzima transcriptasa reversa RevertAid® H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Para un volumen final de 10 μ l, se utilizaron 5 μ l del ARN total– debido a que el volumen de ARN total obtenido por microdissección láser, no es previamente cuantificado – el cual fue incubado con 0,5 μ l de random hexámeros por 5 minutos a 70°C y luego 2 minutos en hielo. A continuación, se agregó el tampón de transcripción (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT 10 mM), la mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno) y 20U de inhibidor de ARNasa o Ribolock (ThermoScientific), y luego se incubó por 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se agregó 200U de la enzima transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV y se incubó a 42°C por 1 hora y finalmente a 70°C por 10 minutos. Los controles negativos fueron realizados utilizando el mismo protocolo descrito, pero sin añadir la enzima transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV.

11. RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).

La reacción de RT-PCR en tiempo real fue preparada con el kit Brilliant II SYBR Green qPCR *Master Mix* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), utilizándose el equipo Mastercycler epgradient realplex2 (Eppendorf). Inicialmente, se realizó la curva de calibración y eficiencia utilizando diluciones seriadas. La reacción fue generada en un volumen final de 10 μ L, conteniendo 1 μ L de ADNc y 500 nM de cada set de partidores (Tabla 3). Cada mezcla de reacción fue realizada por triplicado e incubada a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos. La cuantificación del ARNm para SVCT2 fue realizada en forma relativa al gen de referencia ciclofilina. La expresión relativa fue calculada y gráficamente a partir del método $\Delta\Delta$ CT, donde se muestra la expresión relativa del gen SVCT2 sobre el gen control.

Tabla 3. Set de partidores usados para RT-PCR cuantitativo y tamaño del producto final de amplificación.



Nombre	Secuencia (5'-3')	Antisentido (5'-3')	Producto (pb)
mrSVCT2	TGCCAGGAAGGGTG TACTTC	CCGGTACCAAATATGC CATC	255
Ciclofilina	TGGAGATGAATCTGT AGGAGGAG	TACCACATCCATGCCC TCTAGAA	382

12. Obtención de sondas para SVCT2 mediante transcripción *in vitro*

Para la detección de SVCT2, se generó una ribosonda específica utilizada en el laboratorio (Salazar et al. 2014, Silva-Alvarez et al. 2016). Inicialmente, una secuencia de 620 pares de bases correspondiente a un fragmento de SVCT2 de rata fue clonada en el plásmido pCR[®]4Blunt-TOPO[®] a partir de ARN total de neuronas de rata de estadio E17 utilizando el kit Zero Blunt[®]

TOPO® PCR Cloning (Invitrogen). Para la síntesis de la ribosonda, el vector pCR®4Blunt-TOPO® que posee el inserto de SVCT2, fue incubado con las enzimas de restricción SpeI y NotI (New England Biolabs Inc.) con el fin de linealizarlo para permitir que tanto el promotor T7 como el promotor T3 del plásmido fueran transcritos y así obtener las ribosondas sentido y anti-sentido. Para ello, en una reacción de volumen total de 50µl se utilizaron 10µg del ADN plasmídico, 4U de cada enzima y los tampones NEBuffer (New England Biolabs Inc.) correspondientes, realizando la incubación a 37°C por 4 horas. Una vez obtenidos los plásmidos linealizados, se procedió a purificarlos antes de realizar la síntesis de las ribosondas, utilizando QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) y luego se realizó la cuantificación mediante utilizando espectrofotómetro UV-visible. La obtención de la sonda anti-sentido se generó utilizando el plásmido linealizado con la enzima de restricción SpeI y la polimerasa T7 y la sonda sentido con la plásmido lineal producto de la digestión enzimática con la enzima NotI y la polimerasa T3. La transcripción se realizó utilizando 2U de ARN polimerasa T7 y T3 según corresponda, en presencia de dNTP Dig 1mM (Roche Farma), tampón 1X de transcripción polimerasa (Roche Farma), 2U de inhibidor de ARNasa (Roche Farma), esta mezcla fue incubada por 2 horas a 37°C. Posteriormente, para eliminar el ADN templado se adicionó 1U de ADNasa I libre de ARNasas a la mezcla y fue incubado por 15 minutos a 37°C. Para detener la reacción se agregó EDTA 0,2M. Las sondas sintetizadas fueron purificadas por precipitación con acetato de amonio.

13. Dot blot

La visualización de la sonda fue realizada mediante Dot Blot. Para ello, en una membrana de nitrocelulosa se añadieron 2µl de cada sonda. Se incubó por 90 minutos a 60°C y luego se realizó el bloqueo con PBS-Tween 20 (0,05% v/v)- leche (15% v/v) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a lavar 3 veces por 10 minutos con PBS-Tween 20 (0,05% v/v) para incubar con el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) por 1 hora en una dilución 1:1500 en PBS-Tween 20 (0,05% v/v). A continuación, se lavó 3 veces por 10

minutos con PBS-Tween 20 (0,05% v/v) para finalmente revelar en oscuridad con NTB/BCIP en agua destilada (NTB/BCIP tablets, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) hasta visualizar la coloración correspondiente a las sondas.

14. Hibridación *in situ*

Los cortes fueron montados utilizando agua-DEPC (0,1% v/v) en portaobjetos tratados con Vectabond® (Vector Laboratories, Inc., CA, USA) y mantenidos durante la noche en estufa humidificada a 60°C. Luego, se procedió a desparafinar las muestras en histoclear y a rehidratarlas con concentraciones decrecientes de alcohol hasta PBS-DEPC (0,1% v/v). Posteriormente, las muestras fueron tratadas con proteinasa K (1µg/µL; Sigma) a 37 °C por 5 minutos y la reacción fue detenida lavando las muestras 2 veces por 3 minutos cada una con PBS-DEPC. Posteriormente, se re-fijaron los cortes con PFA 4% frío en PBS-DEPC por 5 minutos y se lavaron los cortes con PBS-DEPC frío 2 veces por 3 minutos cada lavado y 2 veces por 4 minutos con PBS-DEPC a temperatura ambiente, de modo de retirar el exceso de fijador. Luego los tejidos fueron acetilados con una solución compuesta por trietanolamina 120 mM (pH 8,0) (Sigma Aldrich Co, St.Louis, USA), HCl 36% v/v (Merck, Darmstadt, Germany) y anhídrido acético 0,26 %v/v (Merck, Darmstadt, Germany) en PBS-DEPC durante 10 minutos en agitación suave. A continuación, se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS-DEPC y los cortes fueron pre-hibridados a 37°C por 30 minutos con solución de pre-hibridación compuesta por una solución salina (0,28M NaCl; 0,001M Tris-Base; 0,009M Tris-HCl; 0,0034M NaH₂PO₄; 0,005M Na₂HPO₄), 1µL de ARNt (100mg/mL) (Roche Applied Science), formamida 50% v/v, DTT 10 mM, dextran sulfato 10% p/v, solución Denhart 1X (ficoll 0,2% v/v, polivinilpirolidona 0,2% v/v y BSA 0,2% p/v) y H₂O-DEPC 0,1% v/v. Luego el tampón de pre-hibridación fue reemplazado por la solución de hibridación en una dilución 1:50, la cual fue preparada incubando las sondas anti-sentido y sentido por 5 minutos a 80°C en la solución de pre-hibridación luego fueron puestas de inmediato en hielo y se incubó a 42°C durante toda la noche. Una vez hibridadas las muestras, se procedió a realizar lavados astringentes con solución salina de citrato

(SSC) 2X SSC a 42°C, 2 veces por 15 minutos cada una, 1X, 0,2X y 0,03X a 37°C, 2 veces cada uno por 15 minutos. Las diluciones de SSC fueron generadas usando como solución madre SSC 20x: 3M NaCl, 0.3M citrato sodio, pH 7,0. Subsiguientemente, se realizó un lavado por 10 minutos con el tampón 1 consistente en Tris- HCl pH 7,5, 400 mM, NaCl 300 mM y se incubó por 20 minutos en suero de oveja normal (SON) al 2% v/v en tampón 1 por 20 min. Una vez bloqueado el tejido, se procedió a incubar por 2 horas con el anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina anti-digoxigenina en una dilución 1:1500 en el tampón 1 y SON 0,01% v/v en oscuridad. Para proceder al revelado de la hibridación *in situ*, se lavaron las muestras 2 veces por 10 minutos con el tampón 1 y se equilibraron con 3 lavados de 10 minutos cada uno con el tampón 2 consistente en Tris-HCl pH 9,5, 200 mM NaCl, 100 mM y MgCl₂ 50 mM. Para revelar la actividad de la fosfatasa alcalina, los cortes fueron incubados en oscuridad con NTB/BCIP en agua destilada (NTB/BCIP tablets, Roche Applied Science) hasta visualizar el revelado de la hibridación *in situ*. La reacción se detuvo utilizando el tampón 1, las muestras fueron montados en medio de montaje acuoso y observados bajo microscopía de campo claro utilizando un microscopio Leica DME (Leica microsystem Inc.). Como control, se utilizó el mismo procedimiento con la sonda sentido.

15. Transducción *in vivo*

Para generar el marcaje de la glía radial *in vivo*, se utilizó un adenovirus y lentivirus control previamente generados en el laboratorio. El adenovirus contiene una secuencia, bajo el promotor H1, de shRNA no relacionada para inhibir a la enzima β -galactosidasa de *E. coli* y como gen reportero, bajo el promotor de ubiquitina humano, la proteína fluorescente verde (EGFP). Las partículas adenovirales fueron generadas utilizando células HEK293A (invitrogen) mediante la co-transfección del plásmido pBHGlox Δ E1,3Cre, que contiene la delección de los genes E1 y E3 con el vector de transferencia pDC311.2- β gal. El medio condicionado de estas células contiene las partículas virales, siendo recolectado y utilizado para transducir células *in vivo*. Por otro lado, el lentivirus fue generado mediante la co-transfección de 4 plásmidos en las células HEK 293T y la expresión del gen reportero

EGFP está regulada bajo el promotor de citomegalovirus humano (hCMV). Los títulos de ambos virus fue realizada en células HEK 293T, siendo 2×10^7 unidades infectivas virales (ifu)/mL, tanto para el lentivirus como el adenovirus.

Ratas de estadio P1 fueron anestesiadas por frío durante 2 minutos para inyectar de forma intracerebro ventricular 3 μ L del virus correspondiente. Para ello, se trazó una línea imaginaria entre el ojo y el bregma y a 1,0 mm hacia la zona caudal del punto medio de esta línea se realizó una punción cerebral de 2,0 mm de profundidad. Posterior a la recuperación de la temperatura corporal de las ratas, estas fueron devueltas a su camada. Los animales fueron mantenidos por distintos tiempos, periodo en el cual fueron monitoreadas de acuerdo al protocolo de observación para detectar padecimiento de dolor y angustia en ratas. Posterior al tiempo de mantenimiento requerido, las ratas fueron sacrificadas para análisis inmunohistoquímicos y/o de microscopia confocal.

16. Cultivo primario enriquecido en glía radial postnatal

Se realizaron cultivos primarios enriquecido en glía radial tanto de ratas como ratones SVCT2^{+/-} y SVCT2-tg de estadio P1. Los animales fueron anestesiados por frío y rápidamente sacrificados por dislocación cervical para la extracción del cerebro el cual fue traspasado a la solución de disección (Glucosa 20 mM, sacarosa 44 mM, Hepes 1M, NaCl 135 mM, KCl 5mM, Na₂HPO₄ 0.15mM y KH₂PO₄ 0.2mM). Utilizando lupa estereoscópica se realizó la disección del cerebro en la solución de disección fría, se extrajeron las cortezas cerebrales y se eliminaron las meninges. Luego, las cortezas fueron incubadas en tripsina 0,25% p/v (Gibco) y EDTA 0,20% p/v (Sigma) por 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se disgregó de forma mecánica mediante pipeteo suave en medio de plantado MEM (Invitrogen), suero bovino fetal (SBF) 10% (v/v), glutamina 2 mM y DNAsa I 40 μ g/mL. Con el método de exclusión por azul de tripán (0,2 % p/v) se realizó el conteo de las células y se sembró una densidad aproximada de 3×10^6 células/ cm² en placas de cultivo tratadas con poli-L-lisina 0,2 mg/mL (Sigma-aldrich®) con el medio de cultivo BME (Invitrogen), suero bovino fetal (SBF) 10% (v/v), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 μ g/mL y fungizona

2,5 µg/mL. Se realizó el primer cambio de medio 30 minutos después de ser sembradas las células para luego efectuarse el cambio de medio cada 2 días. Los cultivos primarios enriquecidos en glía radial tardía fueron mantenidos en estufas de cultivo a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los procedimientos tanto de la obtención de los cultivos como los tratamientos posteriores fueron realizados en gabinetes de seguridad biológica nivel II.

17. Suplementación con ácido ascórbico

La suplementación con ácido ascórbico se realizó utilizando una concentración de 200 µM de L-ácido ascórbico (Sigma), la cual fue preparada antes de su uso en PBS estéril frío. Los cultivos primarios enriquecidos en glía radial luego de 2 días *in vitro* fueron suplementados cada 24 horas por un periodo de 4 días. Como control se suplementó con el mismo volumen de PBS, solvente de ácido ascórbico. Los cambios de medio se realizaron cada dos días.

18. Electroporación *in vivo*

Para estudios de sobre-expresión de SVCT2 en la glía radial tardía *in vivo*, se utilizaron constructos de ADN que contienen el gen del transportador SVCT2 humano fusionado a la proteína fluorescente amarilla (hSVCT2-EYFP) y como control se utilizó el mismo constructo que sólo expresa el gen reportero (EYFP-N1) (Clontech) (Dado que todas las electroporaciones serán mostradas en color verde, la nomenclatura para estos plásmidos se escribirá como EGFP). Estos plásmidos fueron amplificados mediante la transformación de bacterias *Escherichia Coli* químicamente competentes de One Shot® TOP10 (Invitrogen). Para ello, 100 ng de cada plásmido fueron agregados a los viales que contienen las *E.Coli* y se incubó por 30 minutos en hielo para posteriormente realizar otra incubación de 30 segundos a 42°C. Luego, fue dejado en hielo por 2 minutos, se agregaron 250 µL de medio S.O.C (Invitrogen) y se incubó por 1 hora a 37°C a 250 rpm. A continuación, se sembraron las bacterias en una placa agar LB con ampicilina 100 µg/mL y se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias obtenidas fueron crecidas en 3 mL de medio LB con

ampicilina 100 µg/mL por 8 horas a 37°C y a 250 rpm. Luego una dilución de 1/1000 fue dejada incubándose por 12 horas a 37°C en 300 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL a 250 rpm. Posteriormente, se realizó la purificación utilizando el kit de purificación del plásmido libre de endotoxinas (Macherey-Nagel) de acuerdo al protocolo especificado por el fabricante. Para la electroporación *in vivo*, ratas de 1 día postnatal fueron anestesiadas por frío durante 2 minutos, y se les realizó una inyección intracerebro ventricular (de la misma manera que fue especificada en el punto 5.9) 1 µg de cada plásmido contenido en aproximadamente 1 µL. Inmediatamente después de la inyección ventricular del plásmido, utilizando un electroporador de pulso cuadrado (BTX 830) se aplicaron 5 pulsos de 100V por 10 milisegundos cada uno generados con los electrodos tipo pinzas posicionados en la región cefálica de la rata, con el electrodo positivo por sobre hemisferio donde fue previamente inyectado el plásmido. Luego de que las ratas recuperaran su temperatura corporal normal, fueron devueltas a su camada. Los animales fueron mantenidos por distintos tiempos, periodo en el cual fueron monitoreadas de acuerdo al protocolo de observación para detectar padecimiento de dolor y angustia en ratas. Posterior al tiempo de mantenimiento requerido, las ratas fueron sacrificadas para análisis inmunohistoquímicos y/o de microscopía confocal.

19. Western Blot

Para la obtención de proteínas, se realizó la disrupción y homogenización de la corteza cerebral a través de un sonicador mediante 8 pulsos de 5 segundos al 70% de intensidad utilizando buffer RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1% (v/v), deoxicolato de sodio 0.5% (p/v), SDS 0.1% (p/v) y Tris 50 mM pH 8.0) en conjunto con inhibidores de proteasas (Roche; 11873580001) y fosfatasas (Na₃VO₄ 2mM y NaF 100mM). Posteriormente, el homogenizado se incubó 20 minutos en hielo antes de ser centrifugado a 13.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue colectado y cuantificado mediante el método de Bradford (1610406; Bio Rad), utilizando una curva de BSA como referencia. Luego, 50 µg de proteínas fueron mezcladas con buffer de carga NuPage™ conteniendo dodecil sulfato de litio (LDS) al 4X (Invitrogencon; NP0007) y calentadas por 5 minutos a 95°C.

Posteriormente se cargaron en geles SDS-PAGE preparados al 10%. Subsecuentemente, las proteínas fueron transferidas durante 90 minutos a membranas de PVDF, las que fueron previamente activadas con metanol al 100%. Para corroborar una transferencia correcta de proteínas, se tiñeron las membranas con Rojo Ponceau durante 1 minuto a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada 3 veces. Posteriormente, los sitios inespecíficos fueron bloqueados mediante la incubación de las membranas con una solución de PBS/leche libre de grasa al 5% (p/v) por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-SVCT2 (1:200, Santa Cruz) y anti- β actina (1:2000, Santa Cruz) diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Luego se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 0,05% (v/v) (PBS-T), las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-cabra acoplados a peroxidasa de rábano (1:10000; Jackson ImmunoResearch 705-035-003) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, luego de 5 lavados con PBS-T, las membranas fueron reveladas utilizando el kit quimioluminiscente Clarity Western ECL Substrate (1705061; Bio-Rad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las bandas respectivas fueron detectadas a través del sistema de imagen ChemiDoc MP (1708280; Bio-Rad) utilizando capturas acumuladas de 2 segundos de exposición cada una, hasta alcanzar el punto más alto previo a la saturación de la banda.

20. Marcaje de BrdU *in vivo*

Para análisis de proliferación de la región ventricular, se realizaron inyecciones intracerebro ventriculares a ratas de estadio P1 siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.15 de materiales y métodos utilizando 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, Sigma). Se realizó una inyección de 3 μ l de BrdU 50 mg/kg disuelto en suero fisiológico estéril. Luego de 2 días, los animales fueron fijados con PFA 4% p/v en solución salina, los cerebros extraídos y cortados con vibrátomo. Para su detección, antes de la realización de la inmunohistoquímica convencional (protocolo especificado en el punto 5.4) se llevó a cabo con un paso adicional que permitió la denaturación de ADN utilizando HCl 1 M a 45°C por 30 minutos, antes del bloqueo. El ácido fue neutralizado lavando las muestras tres veces

por 10 minutos con tampón Tris fosfatos y posteriormente se realizó la inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo secundario anti-BrdU (1:500, Abcam, AB1893).

21. Análisis estadístico

Para estudiar la existencia de significancia en la expresión del ARNm de SVCT2 con respecto al gen de referencia ciclofilina a través de qRT-PCR, los datos fueron analizados mediante la prueba t de student, comparando los distintos estadios estudiados respecto al grupo de estadio más temprano (E15 y P1 respectivamente). Por otro lado, la abundancia de células eGFP positivas que se localizaron ya sea en la ZV/ZSV o en la zona intermedia de los ventrículos laterales electroporados con el constructo SVCT2-EGFP o EGFP, fueron analizadas mediante la prueba t de student. De igual manera, la comparación entre los grupos de ratones SVCT2^{wt} y SVCT2^{tg} en las cuantificaciones del porcentaje de células con proyecciones; largo promedio de estas; número de proyecciones por célula; porcentaje de distribución del largo de las proyecciones y porcentaje de distribución del número de proyecciones por célula se realizó mediante la prueba t de student. En los ensayos de western blot, la comparación de la intensidad de banda de cada grupo normalizada respecto al grupo control se realizó mediante la prueba t student; analizando el grupo SVCT2^{tg} o SVCT2^{+/-} versus la condición SVCT2^{wt}. En todos los casos anteriormente descritos, la significancia fue asignada para un valor de $p < 0,05$.

22. Análisis de superficie y parámetros morfológicos de cultivos primarios

Las imágenes adquiridas por microscopía confocal fueron analizadas posteriormente mediante el software Image J (National Institutes of Health). Al respecto, la superficie celular promedio fue determinada en cada condición trazando de forma manual una región de interés (herramienta *freehand selection*), la que abarcó el contorno de cada célula presente en el campo. Por otro lado, se cuantificó el porcentaje de células que exhibían procesos, como también el largo promedio de estos procesos; los cuales fueron definidos como una proyección celular que superó el largo del cuerpo celular de

aquella misma célula. Este largo fue determinado al delinear manualmente el proceso celular de interés, utilizando la herramienta *freehand line*. Respecto al porcentaje de células con fenotipo de astrocito o glía radial, se contabilizó a través de la herramienta *multi-point* la abundancia del fenotipo anteriormente descrito respecto al total de células en cada campo para cada condición.



V. RESULTADOS

Capítulo 1: Caracterización de la glía radial tardía y del patrón de expresión del transportador de vitamina C, SVCT2.

La glía radial embrionaria es una célula madre neural fundamental para el desarrollo del SNC. Diversas investigaciones han permitido su caracterización morfológica, lo cual ha contribuido en gran parte, a definir su función. Sin embargo, pese a la importancia de que esta célula madre neural persista en los estadios postnatales - glía radial tardía - existen escasos antecedentes sobre esta célula. Su caracterización morfológica y funcional es insuficiente y hasta la fecha, no se han dilucidado posibles moléculas que regulen su diferenciación. En este capítulo realizamos una detallada caracterización morfológica de la glía radial tardía y, mediante diferentes aproximaciones experimentales, determinamos el patrón de expresión del transportador de AA, SVCT2 en la glía radial tardía.

1. Las células de la glía radial tardía pueden ser identificadas detectando proteínas estructurales o enzimas presentes en ellas.

Para la observación de las células de la glía radial tardía, se utilizaron los marcadores estructurales clásicos; GFAP y vimentina como también, el marcador enzimático 3-PGDH. Se realizaron estudios inmunohistoquímicos en tejidos cerebrales de rata de 1 día postnatal utilizando dos fijadores; Bouin y PFA 4% p/v en PBS (Figura 2A-F). Una vez procesadas las muestras, estas fueron visualizadas mediante microscopía confocal espectral, obteniéndose que el fijador más apropiado corresponde a PFA 4% p/v en PBS (Figura 2A-C). Utilizando esta aproximación en conjunto con los anticuerpos anti-vimentina, anti-GFAP y anti-3PGDH, fue posible detectar de forma adecuada las células de la glía radial tardía (Figura 2A-C). Estos marcadores permitieron visualizar los procesos celulares, con recorrido rectilíneo y algunos de forma ondulatoria, que caracterizan a las células de la glía radial. Además, tal como se ha reportado en roedores, el anticuerpo anti-GFAP

reconoció una glía radial tardía con compromiso de diferenciación astrocítica, presentando también un marcaje positivo para los astrocitos (flechas en Figura 2B). Finalmente, al utilizar el fijador Bouin no se observó un marcaje positivo con los anticuerpos GFAP y 3-PGDH (Figura 2E-F).

A continuación, se realizó un análisis detallado de las células de la glía radial positivas a vimentina. Para ello, se analizó la región ventricular (Figura 3A y 3D), corteza cerebral externa (Figura 3B) y de manera más amplia, la corteza cerebral a bajo aumento (Figura 3C). Se observó que los procesos de la glía radial tardía tienen un contacto directo con la ZV de los ventrículos laterales (Figura 3D). Además, tal como ha sido reportado en el contexto cerebral embrionario, estos procesos se proyectan hacia la corteza cerebral externa y alcanzan, a través de un pie terminal, la superficie pial (flechas en Figura 3B). Por otra parte, al analizar mediante Tile-Scan (menor aumento) la corteza cerebral, se distinguieron abundantes procesos radiales positivos a vimentina, con recorridos ondulatorios, dando cuenta de la abundancia de células radiales en el cerebro de rata de 1 día postnatal (Figura 3C).



2. La glía radial tardía presenta abundantes proyecciones radiales en la región dorsal de los ventrículos laterales.

De forma paralela, realizamos análisis más profundos utilizando microscopía de dos fotones (Figura 4). Con esta aproximación, se logró visualizar en detalle las células de la glía radial tardía en 3 zonas de los ventrículos laterales; dorsal (Figura 4B), lateral (Figura 4C), y ventral (Figura 4D). Al respecto, se distingue que es en la zona dorsal del ventrículo donde existe una mayor población de procesos radiales elongados (Figura 4B). Estos procesos comienzan con un estrecho contacto en la superficie ventricular de la zona dorso-lateral del ventrículo, proyectándose radialmente hacia la zona intermedia de la corteza (Figura 4C) hasta alcanzar la superficie pial (Figura 4D). Por otro lado, en la zona lateral del ventrículo se observó una disminución de las células de la glía radial tardía (Figura 4E). Cabe destacar que los procesos de la glía radial tardía ubicados en esta región se extienden de forma más ondulante (Figura 4E). En contraparte, en la zona ventral del

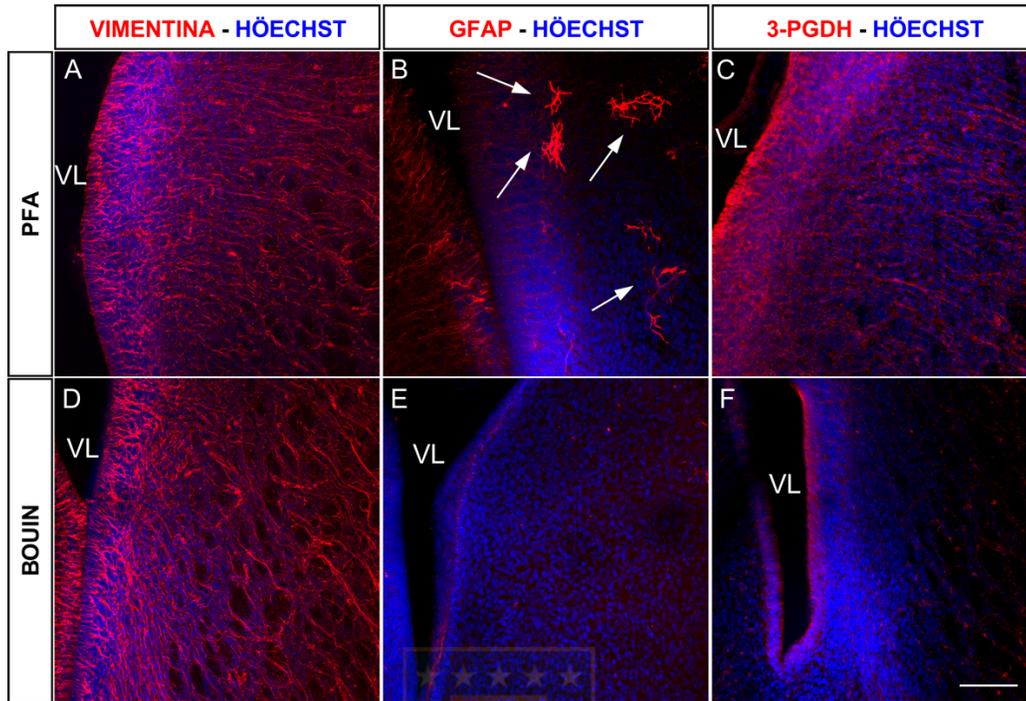


Figura 2. La glía radial tardía puede ser detectada en cerebros de rata de 1 día postnatal.

Análisis mediante microscopía confocal espectral para inmunofluorescencias realizadas en cortes cerebrales frontales de rata de 1 día postnatal fijados por perfusión vascular con paraformaldehído (A-C) y Bouin (D-F), para los marcadores (rojo); vimentina (A y D), GFAP (B y E) y 3-PGDH (C y F). Las flechas en B indican la presencia de astrocitos. Los núcleos son visualizados en azul con Hóechst. VL: Ventriculo Lateral. Barra escala: 100 μ m

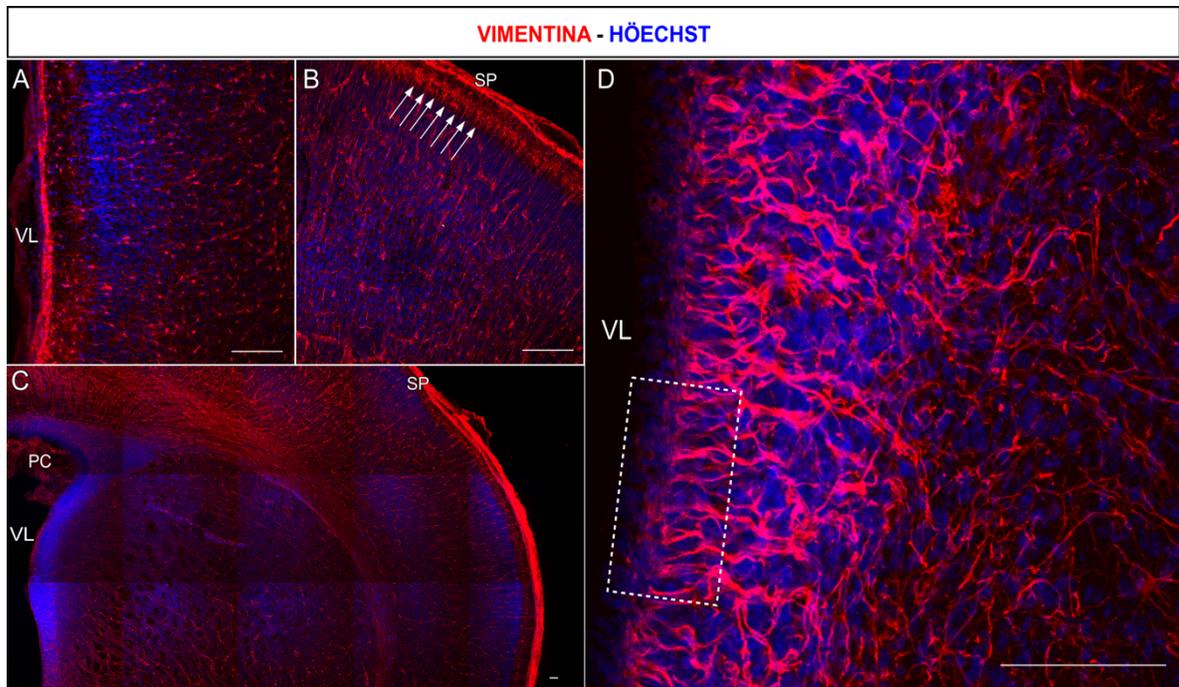


Figura 3. La detección de vimentina permite observar la proyección ventricular y cortical de los procesos de la glía radial tardía.

Análisis de microscopía confocal para la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-vimentina en secciones frontales del cerebro de rata de 1 día donde se muestra la zona ventricular y corteza cerebral. (A) Imagen de la pared ventricular y corteza cerebral. Se distinguen procesos celulares positivos a vimentina (rojo) (B) Imagen de la corteza cerebral externa, flechas indican pie terminal de la glía radial tardía contactando la superficie pial. (C) Tile-Scan que abarca parte de la zona ventricular y corteza cerebral. (D) Reconstrucción 3D obtenida apilando el eje Z (Z-Stack) de numerosos planos ópticos de A, recuadro muestra la zona ventricular y subventricular del ventrículo lateral. Los núcleos se observan en azul (Höchst) en todas las imágenes. VL: Ventrículo Lateral; SP: Superficie Pial; PC: Plexos Coroideos; Barra escala: 100 μ m.

ventrículo, no se distinguen procesos radiales que se estuvieran extendiendo hacia distintas zonas del cerebro (Figura 4G y 4H). Como se mencionó anteriormente, la ramificación de los procesos, da cuenta de una glía radial tardía que probablemente se encuentra en un proceso de diferenciación astrocítica. Además, nuestros datos indican que la morfología de glía radial tardía es heterogénea en la extensión ventricular.

Una vez definida la presencia de la glía radial tardía en cerebros de 1 día postnatal, se procedió a evaluar la expresión y distribución del transportador de AA, SVCT2, en estadios embrionarios y postnatales en la corteza cerebral.

3. El transportador de ácido ascórbico, SVCT2, se encuentra polarizado ventricularmente en las células de la glía radial tardía.

Actualmente no existen estudios publicados que demuestren la presencia del transportador de vitamina C, SVCT2, en la glía radial tardía, lo cual es esencial para poder definir el posible rol que tendría AA en la diferenciación de esta célula madre neural. Para el análisis se aisló mediante microdissección láser, la ZV y la ZSV dorsal ventricular como también, la zona cortical externa y la corteza cerebral total de los cerebros de rata de distintos estadios. Mediante qRT-PCR se determinó la expresión del ARNm de SVCT2 con respecto al gen de referencia ciclofilina (Figura 5A). Los análisis fueron realizados en los estadios embrionario 15 y 17, como también, en los estadios postnatales 1, 4, 8, 12, 16 y 21 días (Figura 5 y 6). Los resultados indican que SVCT2 se encuentra expresado, tanto en estadios embrionarios como postnatales, en la ZV y ZSV dorsal de los ventrículos laterales, región donde se encuentra el proceso apical y el cuerpo celular de la glía radial. De igual forma, existe una expresión del transportador en la región cortical externa y corteza cerebral total en todos los estadios analizados.

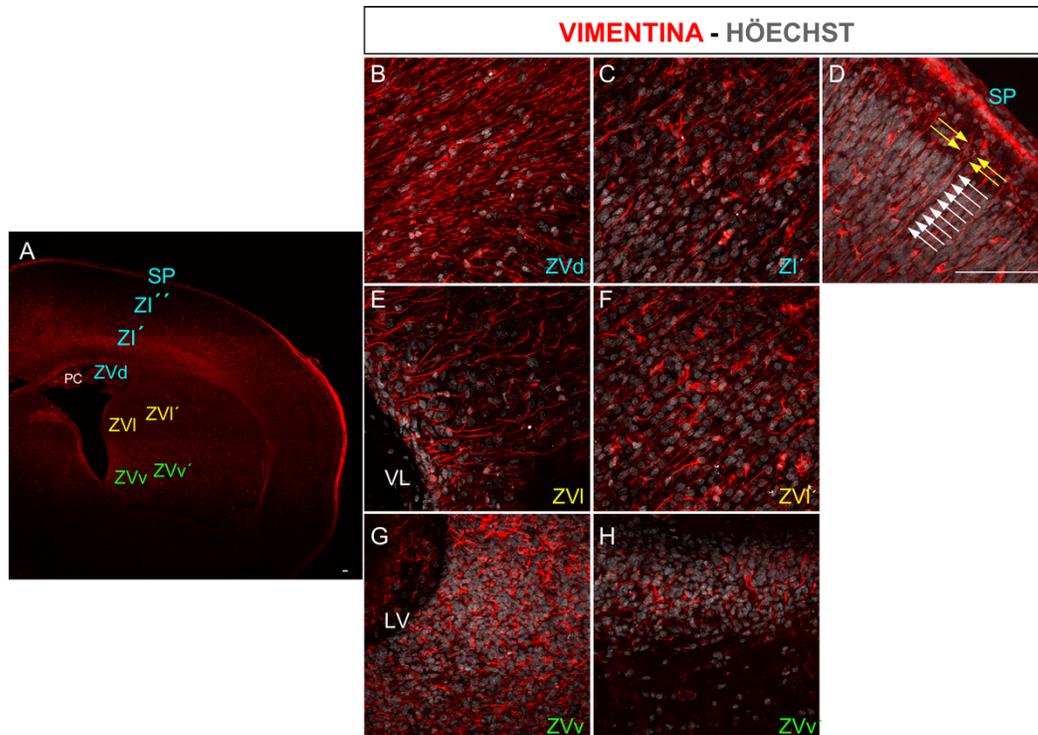


Figura 4. La glía radial tardía presenta proyecciones radiales en regiones específicas de la pared ventricular, en cerebros de 1 día post natal.

Análisis de microscopía de dos fotones en cerebros de rata de 1 día postnatal en diferentes zonas del ventrículo lateral. (A) Tile-Scan de corte frontal del cerebro de rata de 1 día. Se identifican los procesos de la glía radial con vimentina (rojo) en la zona ventricular dorsal (B), lateral (E) y ventral (G) del ventrículo lateral. (C, F y H) Zona intermedia de la corteza cerebral. (D) Imagen de la corteza cerebral externa, se distinguen procesos de la glía radial en contacto con la superficie pial. Flechas blancas indican un proceso radial; flechas amarillas muestran un pie terminal de la glía radial tardía. Los núcleos de las células se observan en gris (Höchst). SP: Superficie Pial; ZI: Zona Intermedia; ZVd: Zona Ventricular dorsal; ZVi: Zona Ventricular intermedia; ZVl: Zona Ventricular lateral; ZVv: Zona Ventricular ventral; PC: Plexos Coroideos; Barra escala: 100µm.

Específicamente, en estadios embrionarios, la expresión de SVCT2 en E15 es significativamente mayor en la ZV y ZSV dorsal de los ventrículos laterales con respecto al estadio E17, diferencia aún más pronunciada en relación al estadio posnatal de 1 día (Figura 5B). Por otro lado, la expresión de SVCT2 en la zona cortical externa y en la corteza cerebral total aumenta de manera significativa conforme transcurre el desarrollo (Figura 5C y 5D). Lo anterior concuerda con que, a medida que avanza la corticogénesis y con ello aumenta el número de neuronas, la expresión génica de SVCT2 aumenta significativamente en esta región, indicando que las neuronas corticales estarían expresando el transportador de AA.

En relación a los resultados obtenidos en estadios postnatales (Figura 6), se realizó un análisis donde se comparó la expresión de los distintos estadios respecto a día postnatal 1. Al respecto, se observó que la expresión de SVCT2 en la ZV y ZSV dorsal no es significativa al comparar con el estadio de 4 días postnatales (Figura 6A) y esta expresión decae hasta ser significativamente menor al día 8 (Figura 6A), etapa en la cual probablemente las células de la glía radial tardía van desapareciendo o bien, pierden la expresión del transportador. Sin embargo, a partir del día 12 postnatal, la expresión de SVCT2 aumentó de forma significativa (Figura 6A). Con respecto a la zona cortical externa, la expresión del transportador aumentó de forma significativa respecto al día 1 postnatal en todos los estadios analizados (Figura 6B). Lo mismo fue observado para la expresión de SVCT2 en la corteza cerebral total (Figura 6C). Lo anterior probablemente se deba al aumento de la densidad de neuronas que van poblando la región cortical y que expresan SVCT2.

Para definir de forma más detallada la distribución del ARNm de SVCT2, en forma paralela al estudio de microdissección láser y qRT-PCR, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* para SVCT2 en cerebros de rata de 1, 4 y 8 días a nivel de los ventrículos laterales. Para ello, se clonó un fragmento de 620pb de SVCT2 el cual se utilizó para sintetizar las sondas sentido y antisentido.

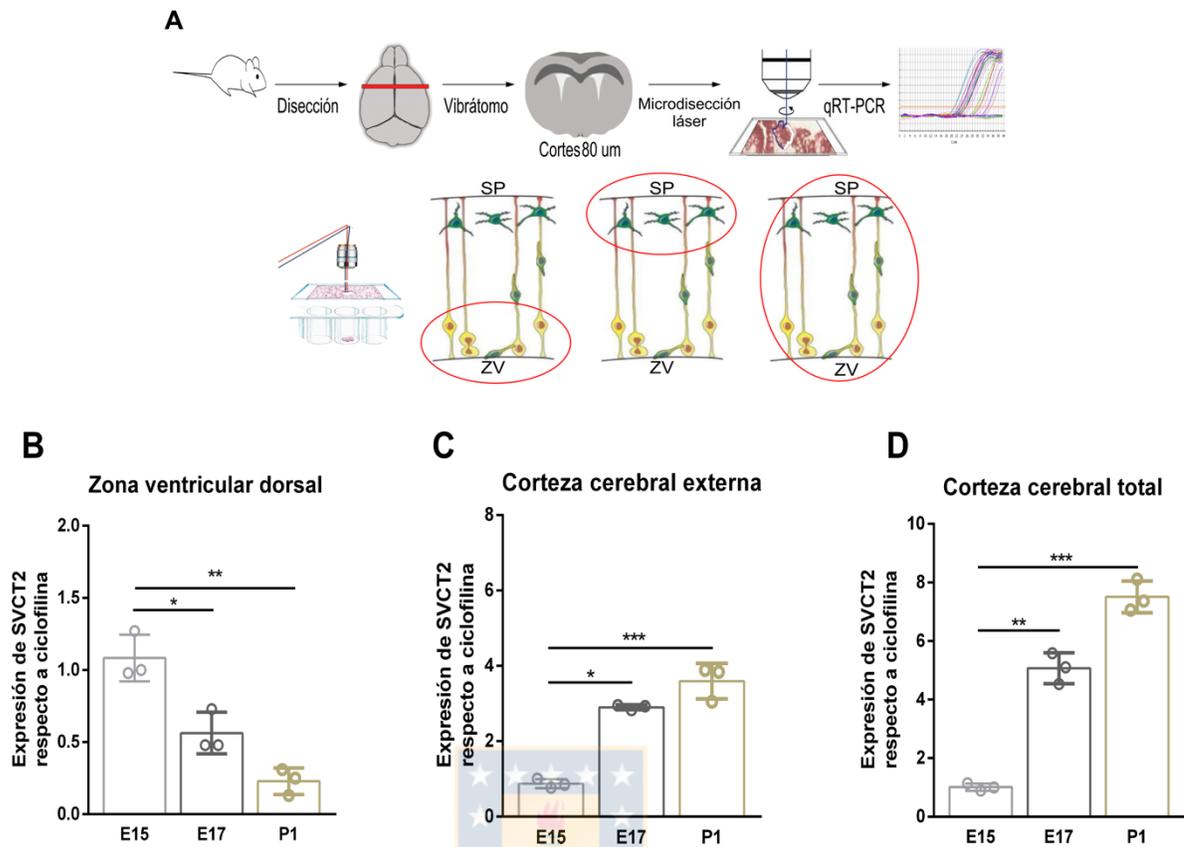


Figura 5. La expresión génica para SVCT2 es observada en la pared ventricular durante el desarrollo cerebral y en estadios post-natales.

Análisis de la expresión del ARNm de SVCT2 en cerebros embrionarios de 15 y 17 días y cerebros en etapa postnatal de 1 día, utilizando microdissección láser y qRT-PCR. (A) Diagrama de la aproximación experimental utilizada. (B-D) Cuantificación de la expresión del ARNm de SVCT2 de la zona ventricular y subventricular dorsal de los ventrículos laterales (B), zona cortical externa (C) y corteza cerebral total (D). Análisis estadístico t-student se utilizó para comparar el estadio E15 versus E17 y P1 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). SP: Superficie Pial; ZV: Zona Ventricular

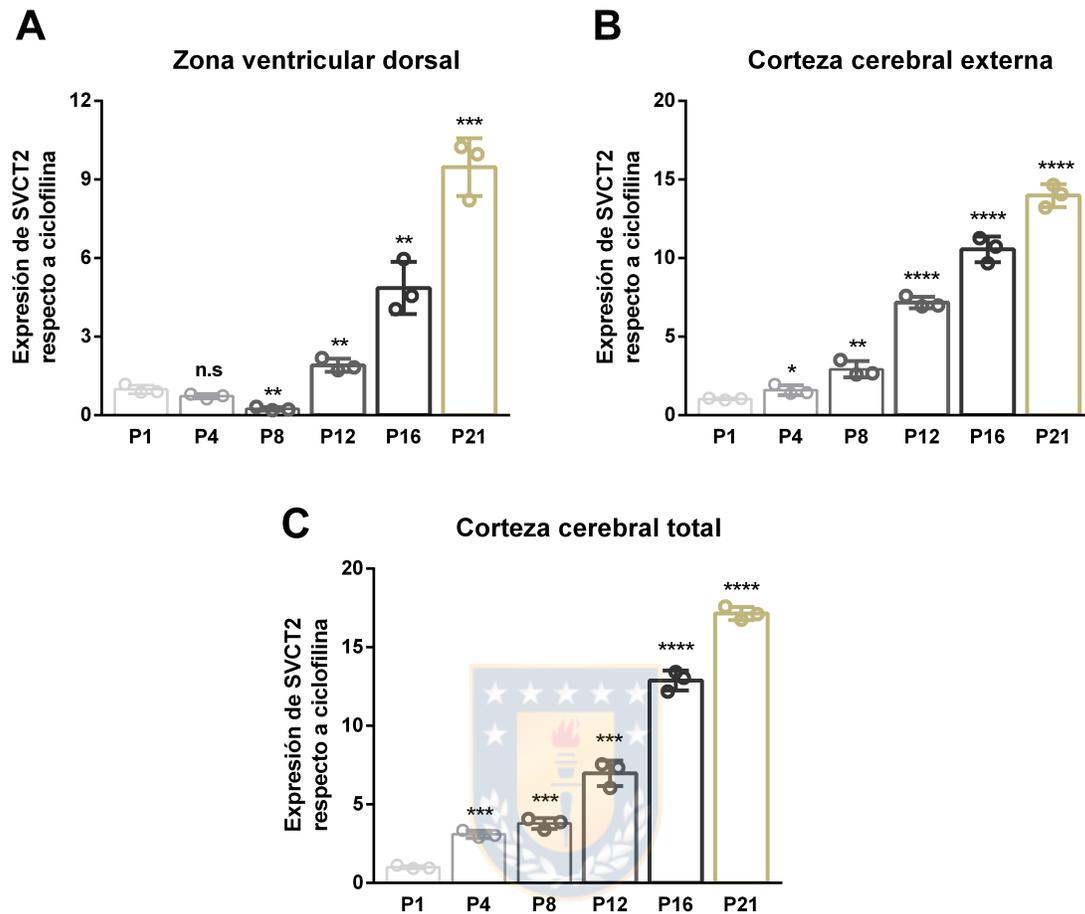


Figura 6. Análisis del ARNm de SVCT2 en distintos estadios postnatales de cerebro de rata, utilizando microdissección con láser y qRT-PCR.

(A-C) Cuantificación de la expresión del ARNm de SVCT2 en estadios postnatales de 1, 4, 8, 12, 16 y 21 días, en la zona ventricular dorsal de los ventrículos laterales (A), zona cortical externa (B) y corteza cerebral total (C). Análisis estadístico t-student se utilizó para comparar el estadio 1 día versus P4, P8, P12, P16 y P21 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). P: Postnatal.

Ambas sondas fueron marcadas con digoxigenina-UTP mediante transcripción *in vitro*, utilizando los promotores T3 y T7. La integridad de las sondas fue verificada mediante ensayos de *dot blot*. La detección del ARNm se realizó en cortes frontales de cerebro de rata fijadas en formalina (Figura 7A). Los resultados indican que durante el día 1 postnatal existe una alta señal de hibridación para SVCT2 en la ZV y ZSV de los ventrículos laterales (Figura 7B I, II, III, IV y V), región en la que se encuentra el cuerpo y el proceso apical de la glía radial, indicando que SVCT2 se expresa polarizado ventricularmente en la glía radial tardía. De igual manera, y como control positivo, se detectó la expresión del ARNm de SVCT2 en los plexos coroideos (Figura 7B VI), sitio de entrada de la vitamina C al cerebro, lo cual ha sido previamente descrito (Ulloa et al. 2018). Además, como un segundo control positivo, se observó reacción de hibridación para células con morfología neuronal migratoria en la región cortical externa (recuadro en Figura 7B VII). A su vez, el control negativo para el cual se utilizó la sonda sentido para SVCT2, la que no generó una reacción de hibridación detectable (Figura 7B, VIII).

Por otro lado, en cerebro de 4 días postnatales, el ARNm del transportador se encuentra expresado en distintos niveles a lo largo de los ventrículos laterales (Figura 8A-E). Se detectó que mantuvo su expresión en la ZV y ZSV de la zona dorsal de los ventrículos laterales (Figura 8A-C). Sin embargo, su expresión disminuyó considerablemente en la zona ventral y más aún en la región lateral del ventrículo. Por otro lado, al igual que en el estadio de 1 día postnatal, se puede apreciar señal de hibridación para el ARNm de SVCT2 en los plexos coroideos (Figura 8F). En contraparte, no se observó un marcaje positivo al utilizar la sonda sentido para SVCT2 (Figura 8G).

En cerebros de 8 días, al igual que en el estadio de 4 días postnatal, se distingue un patrón de expresión diferencial del transportador en los ventrículos laterales. Existe una alta reactividad para la sonda de SVCT2 acotada a la zona ventral del ventrículo (recuadro en Figura 9D). Esta expresión probablemente se debe a las células endimarias que se encuentran en esta región. Por otra parte, al igual que lo observado en el estadio de 4 días, la región lateral se mantuvo con una escasa señal de

hibridación (Figura 9C), la cual va en aumento a medida que se acerca a la zona dorsal del ventrículo (Figura 9A y 9B). Además, como control positivo, se observan células con un fenotipo de neurona migratoria, expresando el ARNm de SVCT2 (Figura 9E). En estas células es posible distinguir el proceso líder (*leading process*) que caracterizan a estas células (flechas en Figura 9E). El control negativo de la técnica no exhibe reacción de hibridación (Figura 9F). Cabe destacar que los resultados obtenidos mediante hibridación *in situ* concuerdan con lo observado mediante la técnica de microdissección láser en conjunto con qRT-PCR, donde de igual manera se observó que la expresión de SVCT2 se encuentra en la ZV y ZSV de los ventrículos laterales y que su expresión es mayor al primer día postnatal.

En una segunda etapa, se determinó mediante ensayos inmunohistoquímicos la presencia del transportador SVCT2 en la ZV y ZSV y si además, este co-localiza con los marcadores de la glía radial en cerebro de rata de 1 día postnatal. Para ello, se utilizaron los anticuerpos 3-PGDH y vimentina como también, un anticuerpo policlonal purificado por afinidad, que reconoce un dominio extracelular de SVCT2 de rata y humano. Los resultados muestran inmunorreactividad de SVCT2 en la ZV y ZSV de la región dorsal de los ventrículos laterales (flechas Figura 10A y F), co-localizando a nivel apical con los marcadores de glía radial 3-PGDH y vimentina (Figura 10D y recuadro en figura 10H). Para una caracterización más acabada de las células de la glía radial tardía con el transportador SVCT2, se realizaron estudios inmunohistoquímicos en cerebros de rata de 1, 4, 12 y 16 días postnatales. Se localizó vimentina con el fin de visualizar la glía radial tardía, y el transportador de glucosa 1 (GLUT1) para analizar las células endoteliales y los vasos sanguíneos.

En cerebros de 1 día postnatal se detectó la glía radial tardía tanto en la ZV y ZSV y en los procesos corticales (Figura 11A I, V y IX). Como era esperado, se observaron los procesos de las células de la glía radial tardía extendiéndose desde la ZV y ZSV del ventrículo dorsal (Figura 11A, I) hacia la corteza cerebral externa (flechas punteadas Figura 11A, I) como también, en la zona ventrolateral del ventrículo (Figura 11A, IX).

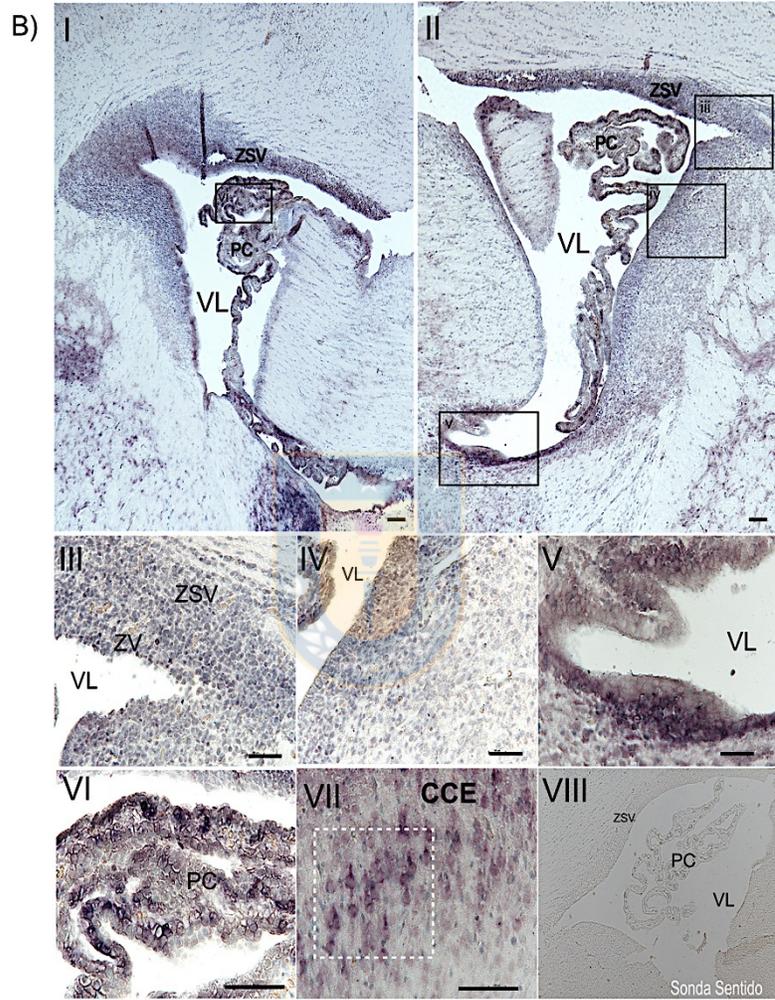
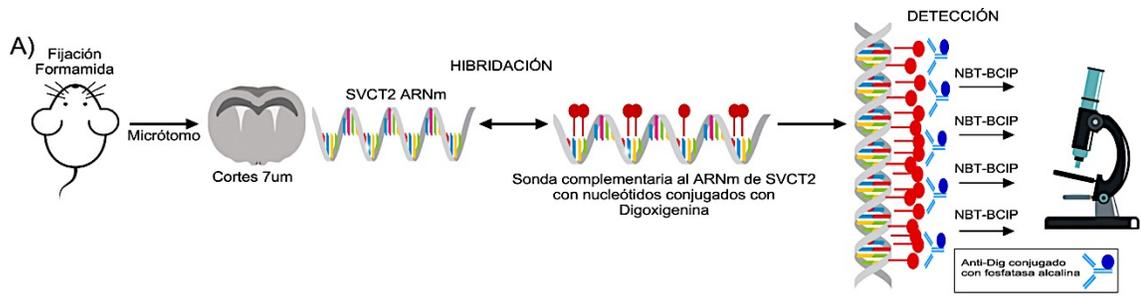


Figura 7. El ARNm de SVCT2 es intensamente expresado en la pared celular de los ventrículos laterales.

(A) Esquema de la técnica de hibridación *in situ*. Secciones frontales de cerebro de rata de 1 día postnatal se hibridaron utilizando una ribosonda específica anti-sentido marcada con digoxigenina contra el ARNm de SVCT2. (B) Hibridación *in situ* para SVCT2 en ambos ventrículos laterales y corteza cerebral de un cerebro de rata de 1 día postnatal. (I-II) Reacción de hibridación para toda la extensión del ventrículo lateral. Recuadros en (II) muestran señal de hibridación en la zona dorsal (iii), zona lateral (iv) y zona ventral del ventrículo lateral (v). (III) Imagen aumentada de recuadro (iii). (IV) Imagen aumentada de recuadro (iv). (V) Imagen aumentada de recuadro (v). (VI) Reacción de hibridación en los plexos coroideos. (VII) Región cortical externa, recuadro indica reacción de hibridación en células con morfología neuronal migratoria. (VIII) Control negativo de la sonda sentido para SVCT2. VL: Ventrículo Lateral; CCE: Corteza Cerebral Externa; PC: Plexos Coroideos; ZV: Zona Ventricular ; ZSV: Zona Subventricular. Barra escala : 50 μ m.



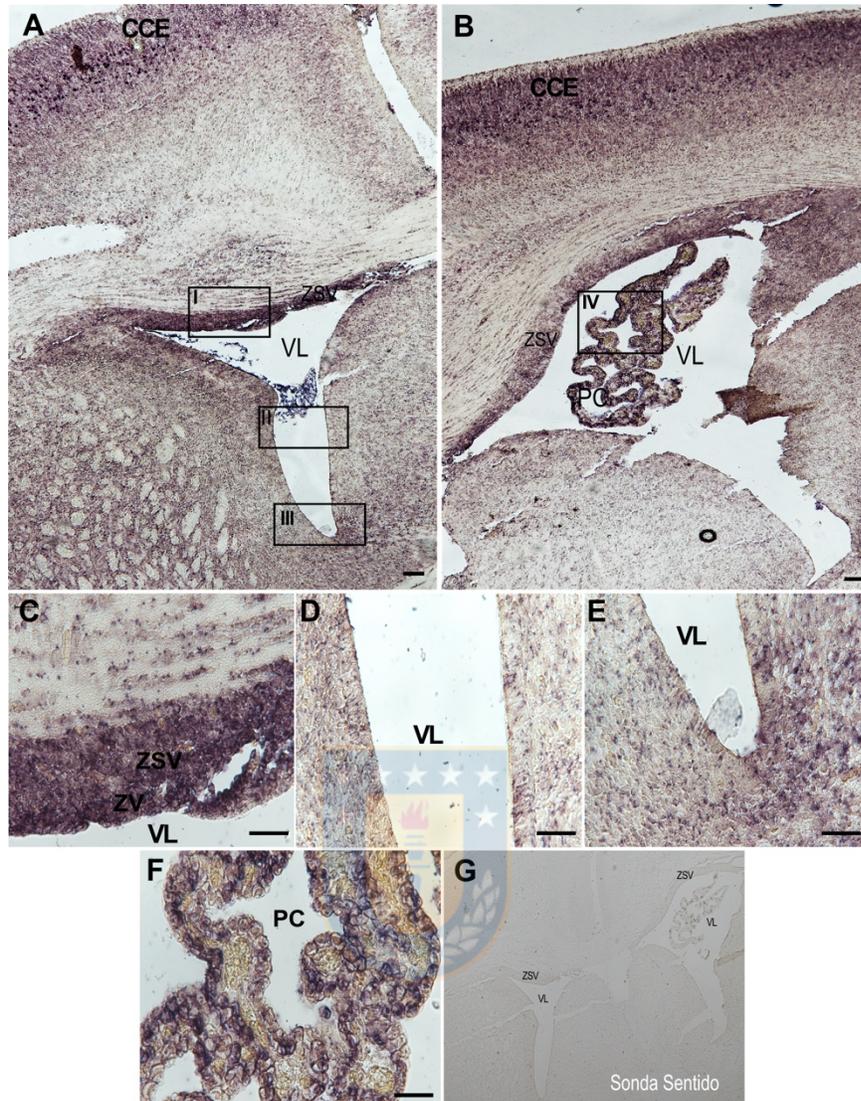


Figura 8. El ARNm de SVCT2 se mantiene expresado a diferentes niveles en la pared celular de los ventrículos laterales y en la corteza cerebral, a los 4 días de desarrollo post-natal.

Expresión del ARNm de SVCT2 en ventrículos laterales de cerebros de rata de 4 días postnatales mediante hibridación *in situ*. (A-B) Reacción de hibridación en ventrículos laterales y en células de la corteza cerebral externa. (C) Imagen aumentada de recuadro (I). (D) Imagen aumentada de recuadro (II). (E) Imagen aumentada de recuadro (III). (G) Reacción de hibridación en los plexos coroideos. (H) Control negativo de la técnica utilizando una sonda sentido para SVCT2. VL: Ventriculo Lateral; CCE: Corteza Cerebral Externa; PC: Plexos Coroideos; ZV: Zona Ventricular; ZSV: Zona Subventricular. Barra de escala: 50µm.

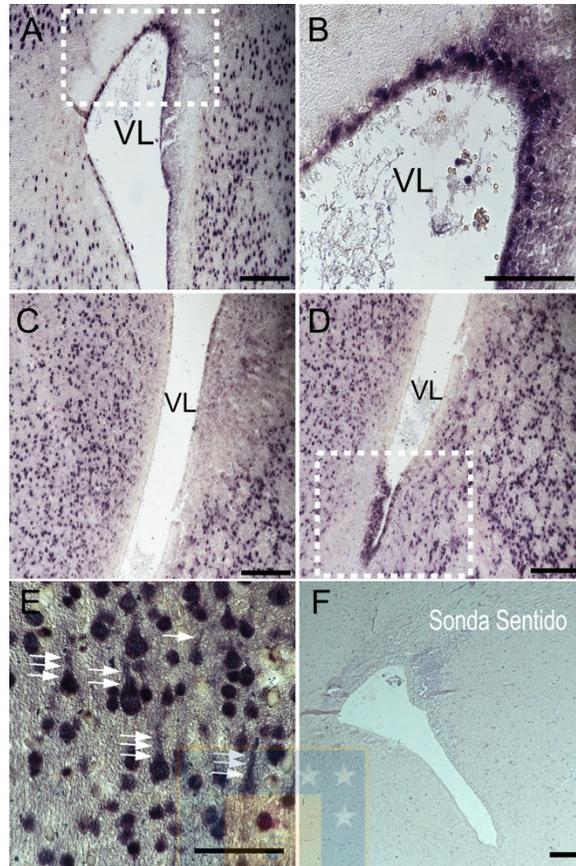
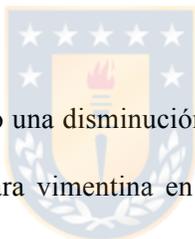


Figura 9. El ARNm de SVCT2 es débilmente expresado en extensas regiones de la pared celular de los ventrículos laterales, que presentan preferentemente diferenciación ependimaria.

Expresión de ARNm de SVCT2 en ventrículos laterales de cerebro de rata 8 días postnatales mediante hibridación *in situ*. (A) Reacción de hibridación en la región dorsal ventricular. (B) Imagen ampliada de (A). (C) Región lateral del ventrículo. (D) Región ventral ventricular. (E) Reacción de hibridación en células con morfología neuronal migratoria, flechas indican el proceso líder (*leading process*). (F) Control negativo utilizando la sonda sentido para SVCT2. VL: Ventrículo Lateral. Barra escala: 50 μm .

Por otro lado, se identificó inmunoreactividad para vimentina en el sistema de vasos sanguíneos de la macro circulación en la región cortical externa (flechas continuas Figura 11A I). Con respecto a la detección con anti-GLUT1, no se visualizó en las células de la glía radial tardía como tampoco en la región dorsal de los ventrículos (Figura 11A, VI). En cambio, se distinguió tenuemente en la región ventro-lateral de los ventrículos, probablemente siendo expresados por las células endimarias inmaduras (recuadro en Figura 11A, X). Además, la microcirculación principalmente observada en las regiones proximales al ventrículo como también, los vasos sanguíneos correspondientes a la macro circulación que se distinguen en la corteza cerebral externa, presentaron una inmunorreacción para GLUT1 (flechas en Figura 11A, VI y X y flechas en Figura 11A II). Por su parte, SVCT2 se detectó preferentemente en los vasos de la macro circulación (flechas Figura 11A, III), en las células de la glía radial tardía (Figura 11A VII y XI) y en los plexos coroideos (Figura 11A XI), como ha sido previamente descrito.



En cerebros de 4 días, se observó una disminución generalizada en el número de células de la glía radial tardía inmunorreactivas para vimentina en los ventrículos laterales, lo cual es más evidente en la región ventro-lateral (recuadro Figura 11B V y IX). Sin embargo, aún se mantienen células de la glía radial tardía inmunorreactivas para vimentina y SVCT2 en la región ventricular dorsal (Figura 11B, V y VIII), donde se identificó que los procesos se extienden radialmente desde la región ventricular hacia la corteza cortical externa (flechas en Figura 11B, I y Figura 11B, V). Con respecto a la macro circulación observada la región cortical externa, estas siguen siendo inmunorreactivas para GLUT1, pero no para SVCT2 (Figura 11B, II y III). Además, se detectó un mayor número de células endimarias presente en las regiones ventro-laterales del ventrículo (recuadro en Figura 11B X). Cabe destacar que estas células endimarias son inmunorreactivas tanto para vimentina como para SVCT2 (Figura 11B IX, X y XI).

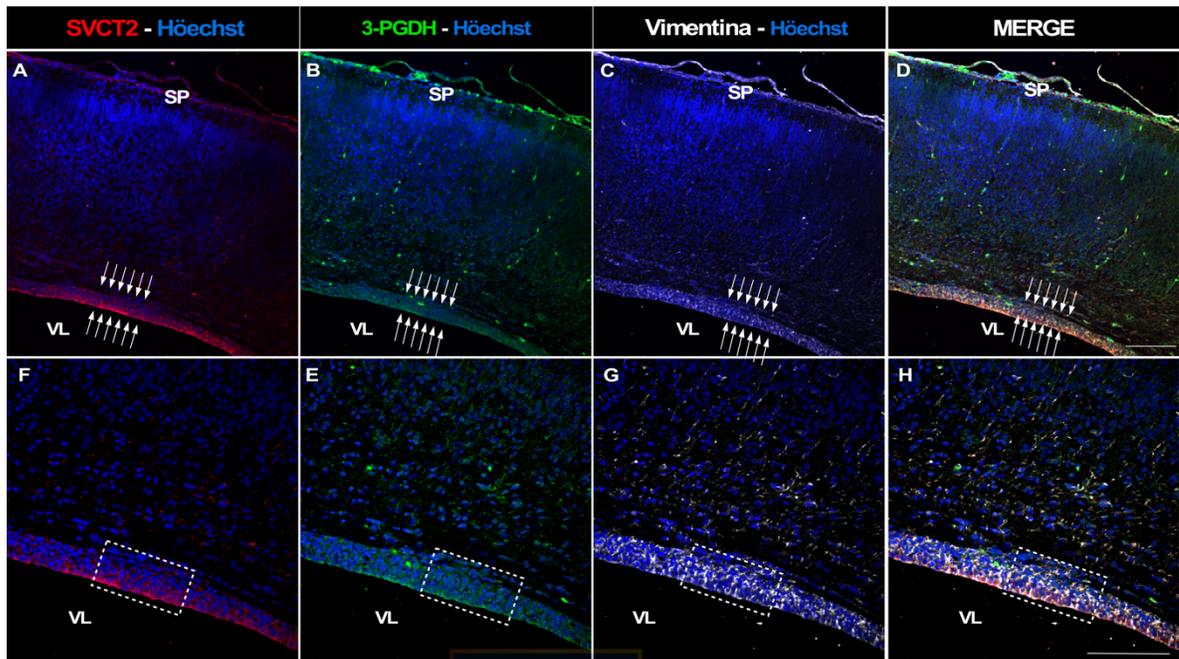


Figura 10. SVCT2 es preferencialmente polarizado ventricularmente en la glía radial tardía-3-PGDH/vimentina positiva.

Análisis de inmunohistoquímicos de marcadores de glía radial y SVCT2 en corteza cerebral de rata 1 día postnatal. (A-D) Flechas indican la ZV y ZSV del ventrículo lateral. (A) Inmunoreacción en la ZV y ZSV para SVCT2 (A, señal en rojo), 3-PGDH (B, señal en verde) y vimentina (C, señal en blanco). (D) Superposición de las imágenes (A-C). (F-H) Imágenes aumentadas de A-D, respectivamente. Los recuadros indican la ZV y ZSV de la región dorsal ventricular. Los núcleos fueron marcados con Hóechst (azul). VL: Ventrículo Lateral SP: Superficie Pial. Barra de escala: 100µm.

Conforme transcurre el desarrollo, en los cerebros de 12 días postnatales se observó que los procesos radiales detectados con anti-vimentina no presentan una extensión con morfología radial, por el contrario; se distinguen de forma ramificada (Figura 12A V y IX). Además, no se distinguieron procesos alcanzando al superficie pial ni en la región cortical externa (Figura 12A, I), indicando la existencia de un alto número de células de la glía radial tardía que se encuentran retrayendo sus procesos y perdiendo su morfología radial. Además, en este estadio se identificaron células que probablemente correspondan a astrocitos inmaduros (Flechas en Figura 12A IX). Paralelamente, las células endimarias se observan poblando extensas zonas de la región lateral ventricular, siendo inmunoreactivas para vimentina, GLUT1 y SVCT2 (Recuadro Figura 12A IX, X, XI y XII). De igual forma, se visualizan algunas células endimarias en la región dorsal ventricular (flechas Figura 12A VI). En la corteza cerebral, se observó inmunoreacción para SVCT2, cuyas células corresponderían a neuronas (Figura 12A III). Por otro lado, los plexos coroideos aumentan su inmunoreacción para SVCT2, transportador que se detecta polarizado de forma basolateral (Figura 12A VII y 11B VII y XI). Los vasos sanguíneos (macro y micros) fueron identificados con anti-GLUT1 (Figura 12 II, VI y X).

De acuerdo a la literatura, la anatomía y composición de la pared ventricular lateral desde el estadio de 15 días en adelante es altamente similar al observado en el cerebro adulto, por lo que analizamos un estadio postnatal de 16 días para definir los cambios producidos en las células de la glía radial tardía. Al respecto, se observó una fuerte disminución en el número de procesos de las células de la glía radial tardía, y aquellos que se encuentran remanentes, no exhiben una morfología radial sino que se distinguen ramificados (Figura 12B I, V y IX). En la región ventricular dorsal se observó un número mayor de células endimarias inmunoreactivas para GLUT1, SVCT2 y vimentina que en cualquiera de los estadios analizados previamente (Figura 12B V, VI, VII y VIII). Lo anterior estaría indicando una fase de maduración de carácter más terminal del epéndimo. Con respecto a la micro y macrocirculación, esta se mantiene positiva para GLUT1 y negativa para

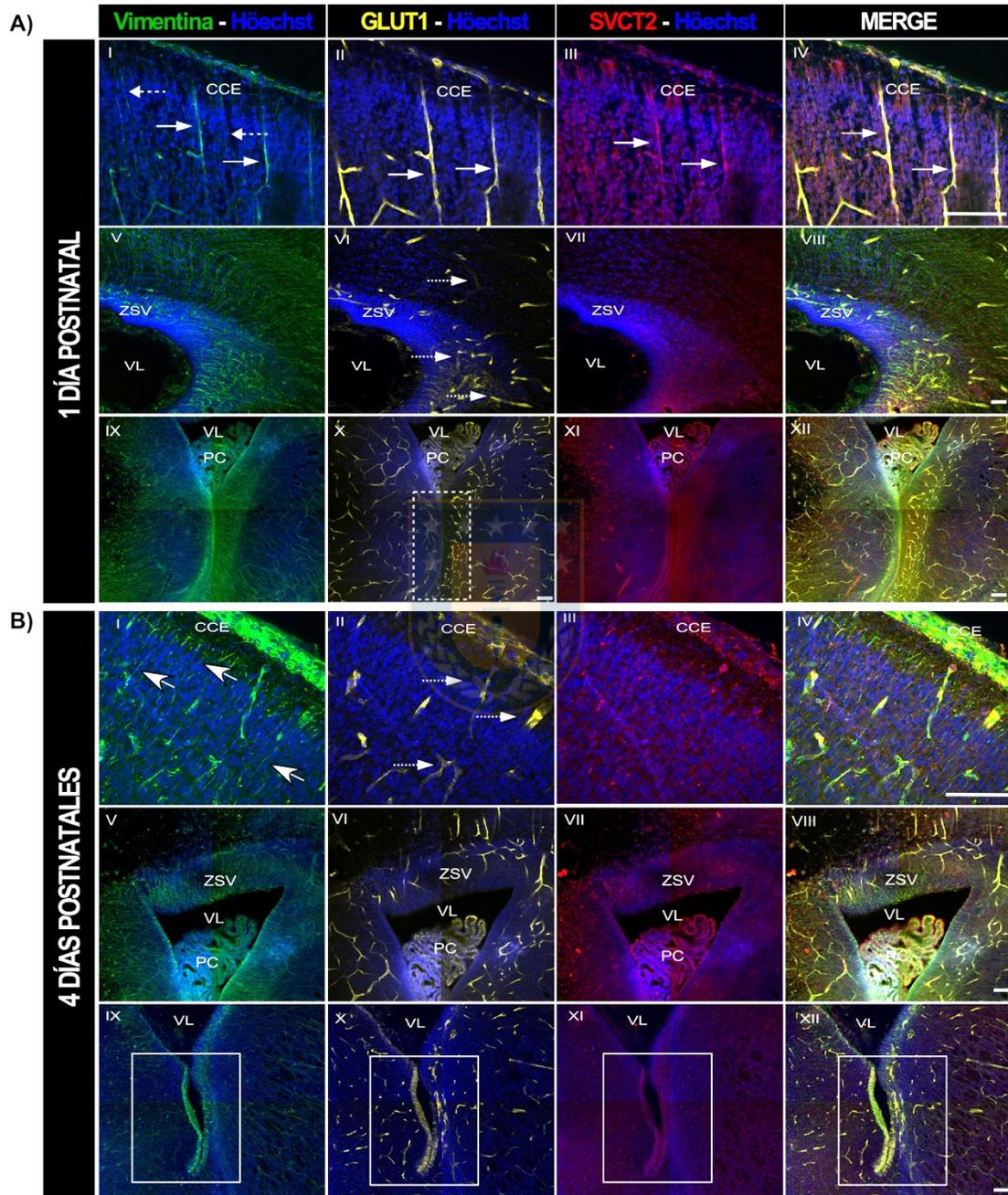


Figura 11. En cerebros de ratas de 1 y 4 días postnatales las células de la glía radial tardía se detectan preferentemente en la región dorsolateral del ventrículo lateral, presentando SVCT2.

A) Imágenes de la corteza cerebral de cerebros de 1 días postnatal. Inmunoreacción para vimentina (señal verde, I,VI y IX), GLUT1 (señal amarilla, II, VII y X) y SVCT2 (señal roja III, VIII y XI) en la corteza cerebral externa (I, II y III), en la región dorsal ventricular (V, VI y VII) y en la región ventral ventricular (IX, X y XI). Se detecta GLUT1 en la macrocirculación (flechas en II, señal amarilla), microcirculación (flechas en VI) y en la pared ventricular ventral (recuadro en X). SVCT2 se distingue en toda la extensión ventricular (VII, XI) y en la macrocirculación (II).(IV, VIII y XII) Superposición de las imágenes (I-III), (V-VII) y (IX-XI), respectivamente. (B) Imágenes de la corteza cerebral de cerebros de 4 días postnatales. Inmunoreacción para vimentina (señal verde, I, VI y IX), GLUT1 (señal amarilla, II, VII y X) y SVCT2 (señal roja III, VIII y XI) en la corteza cerebral externa (I, II y III), en la región dorso-lateral ventricular (V, VI y VII) y en la región ventral del ventrículo (IX, X y XI). Celulas inmunoreactivas para GLUT1, vimentina y SVCT2 se indican en la pared ventricular (recuadro en IX, X y XI).(IV, VIII y XII) Superposición de las imágenes I-III, V-VII y IX-XI, respectivamente. Los núcleos celulares fueron marcados con H \ddot{o} echst (azul) en todas las imágenes. VL: Ventrículo Lateral; CCE: Corteza cerebral Externa; CP: Plexos Coroideos. Barra de escala: 100 μ m

SVCT2. Este último, tampoco fue observado en los astrocitos, ya diferenciados a partir de la glía radial tardía.

Los estudios realizados hasta el momento demuestran que a medida que disminuyen las células de la glía radial tardía en la pared ventricular, aumenta la presencia de las células endimarias, las cuales presentan GLUT1. Por consiguiente, existiría una correlación entre la presencia de GLUT1 y la ausencia de la glía radial tardía. Por lo que en forma complementaria a los resultados presentados previamente, se analizó por medio de microdissección láser de la ZV y la ZSV de la región dorsal ventricular y posterior qRT-PCR la expresión de GLUT1. Para ello, se comparó la expresión del ARNm de GLUT1 de 1 día postnatal con respecto a 4, 8, 12, 16 y 21 días postnatales (Figura 13). Los resultados indican que no existe una diferencia significativa con respecto a los 4 días postnatales, lo cual refuerza la hipótesis de que existen abundantes células de la glía radial en la región dorsal ventricular entre el primer y cuarto día postnatal. Interesantemente, en la pared ventricular dorsal, a partir de los 8 días postnatales en adelante, el ARN mensajero de GLUT1 va incrementando sostenida y significativamente durante los estadios postnatales (Figura 13). Los resultados indican que el aumento progresivo del ARNm de GLUT1 estaría asociado a la diferenciación endimaria en conjunto con la disminución y final desaparición de las células de la glía radial tardía.

Finalmente, para continuar con una detallada caracterización de la glía radial tardía, se realizó la observación de los ventrículos laterales mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión. Inicialmente, se analizaron cerebros de rata de 3 y 6 días postnatales mediante microscopía electrónica de barrido, de manera de obtener una visión tridimensional de la pared ventricular. Los resultados muestran en el cerebro de rata de 3 días numerosos somas de neuronas corticales en la corteza cerebral externa (flechas en Figura 14C) y procesos radiales alargados (flechas en figura 14B) localizados en la zona intermedia de la corteza cerebral. En la imagen de menor aumento de la zona ventricular, se observaron algunos procesos radiales (flechas en Figura 14A)

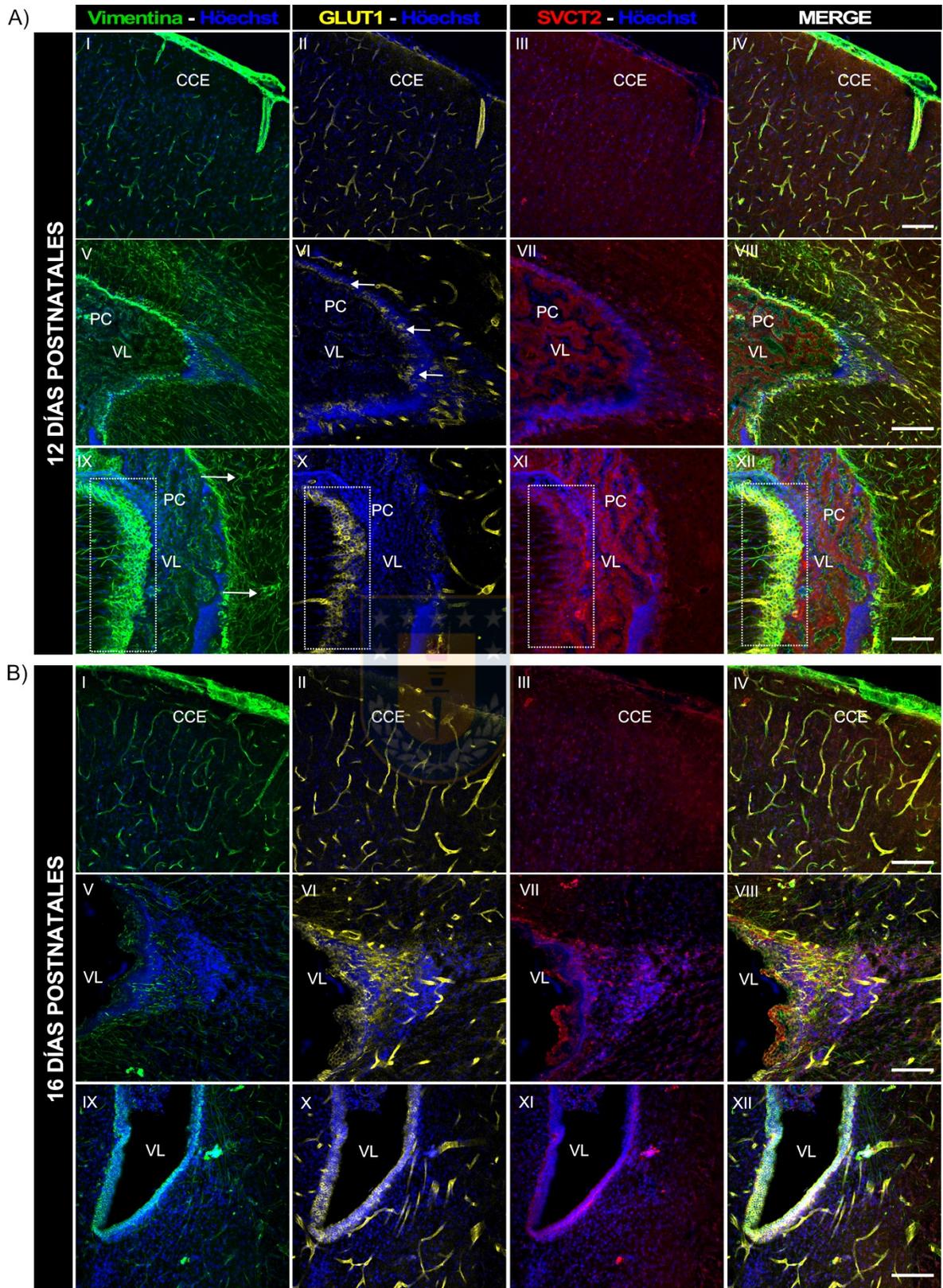


Figura 12. Células de la glía radial tardía desaparecen de la ZV y ZSV del ventrículo lateral conforme transcurre el desarrollo. Las células endimarias se encuentran en extensas regiones de la pared ventricular.

(A) Imágenes de la corteza cerebral de cerebros de 12 días postnatales. Inmunoreacción para vimentina (señal verde, I,VI y IX), GLUT1 (señal amarilla, II, VII y X) y SVCT2 (señal roja III, VIII y XI) en la corteza cerebral externa (I, II y III), en la región dorsal ventricular (V, VI y VII) y en la región lateral ventricular (IX, X y XI). Células inmunoreactivas para GLUT1, vimentina y SVCT2 se indican en la pared ventricular (recuadro en IX, X y XI). (IV, VIII y XII) Superposición de las imágenes I-III, V-VII y IX-XI, respectivamente. (B) Imágenes de la corteza cerebral de cerebros de 16 días postnatales. Inmunoreacción para vimentina (señal verde, I,VI y IX), GLUT1 (señal amarilla, II, VII y X) y SVCT2 (señal roja III, VIII y XI) en la corteza cerebral externa (I, II y III), en la región dorsal ventricular (V, VI y VII) y en la región ventral del ventrículo (IX, X y XI). GLUT1 se distingue en la región dorsal del ventrículo (VI), región ventral ventricular (X) y en los vasos sanguíneos de la corteza cerebral (II). SVCT2 se visualiza en la corteza cerebral (III), pared ventricular (VII y XI) y en los plexos coroideos (VII). (IV, VIII y XII) Superposición de las imágenes I-III, V-VII y IX-XI, respectivamente. Los núcleos celulares fueron marcados con H_{oechst} (azul) en todas las imágenes. VL: Ventrículo Lateral; CCE: Corteza cerebral Externa; CP: Plexos Coroideos. Barra de escala: 100µm

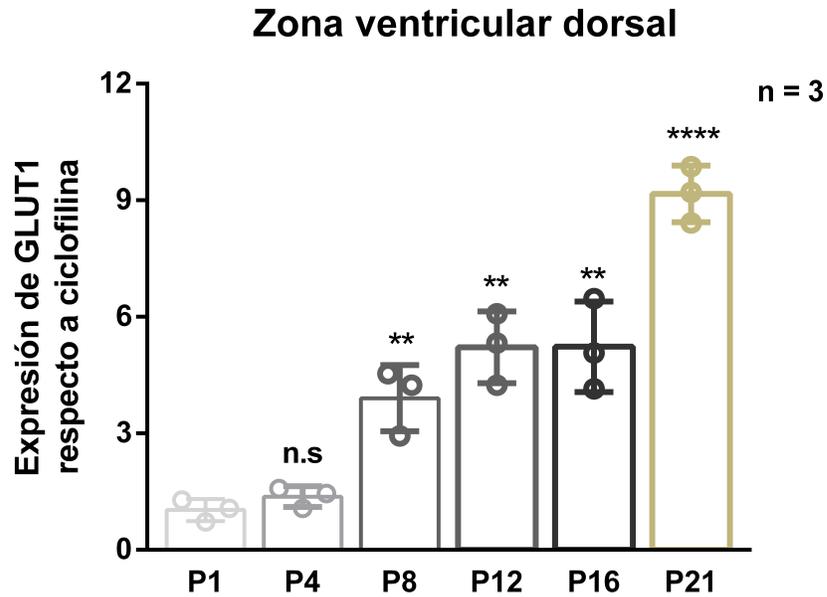


Figura 13. La expresión de GLUT1 aumenta de forma progresiva concomitante transcurre el desarrollo.

(A) Representación gráfica de la cuantificación de la expresión del ARNm de GLUT1 en la zona ventricular dorsal de la corteza cerebral en estadios postnatales de 1, 4, 8, 12, 16 y 21 días. No existe diferencia significativa entre el día 1 y 4 postnatal en la expresión de GLUT1. Se distingue un aumento significativo de la expresión de GLUT1 a partir del día 8 postnatal con respecto al día 1. Análisis estadístico t-student se utilizó para comparar el estadio 1 día versus P4, P8, P12, P16 y P21 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). P: Postnatal

como también, que esta región carece de células ciliadas (Figura 14A). Por el contrario, a los 6 días postnatales se observó claramente la pared ventricular con un mayor grado de maduración, detectándose múltiples células ciliadas y un epitelio con microvellosidades (Figura 14D-F).

La conjetura respecto si dentro de los 4 primeros días postnatales existirían células de la glía radial, nos llevó a realizar análisis con microscopía electrónica de transmisión en conjunto con la tinción ultraestructural de inmunogold para observar la localización de SVCT2 en cerebros de rata de 3 días postnatales. Los resultados muestran en la zona ventricular procesos celulares de la glía radial tardía con un citoplasma electrón-lucido (Figura 15I E y F “GR”), como también se observaron expansiones celulares que corresponden a cilios primarios, los cuales están en contacto con el LCR (Flechas rojas en figura 15I E). Cabe mencionar, que los cilios primarios son una estructura característica presentada por la glía radial embrionaria. Por otra parte, la zona intermedia de la corteza se encontró poblada con numerosos neuroblastos (remarcados en amarillo en la Figura 15I C y D) los cuales se caracterizan por tener un núcleo heterocromático y un citoplasma electrón-denso. En la región cortical externa se distinguieron neuronas más maduras (Recuadro en Figura 15I A). Al analizar los resultados de la tinción ultraestructural de inmunogold, se detectó que el transportador se encuentra en la zona ventricular de la glía radial tardía (Flechas en Figura 15I F), pero no en los procesos basales de esta célula (Figura 15I A, flechas amarillas). Lo anterior sumado a lo reportado previamente, nos indica de manera más certera que SVCT2 se encuentra polarizado ventricularmente en las células de la glía radial tardía. Además, algunos neuroblastos son inmunorreactivos para SVCT2, como también neuronas maduras de la corteza cerebral externa (Figura 15I C y C’, remarcado en rojo se muestra un neuroblasto y recuadro en Figura 15I A y A’). Adicionalmente, se realizó un análisis de la tinción ultraestructural de inmunogold con GFAP (Figura 15II). Al respecto, se observó de manera clara en procesos de la glía radial tardía (Figura 15II B y C) además, se distinguió GFAP en proyecciones de astrocitos que tienen contacto con los vasos sanguíneos (Recuadro en Figura 15II E y F). En este estadio se observa múltiples partículas de oro en la neuropila

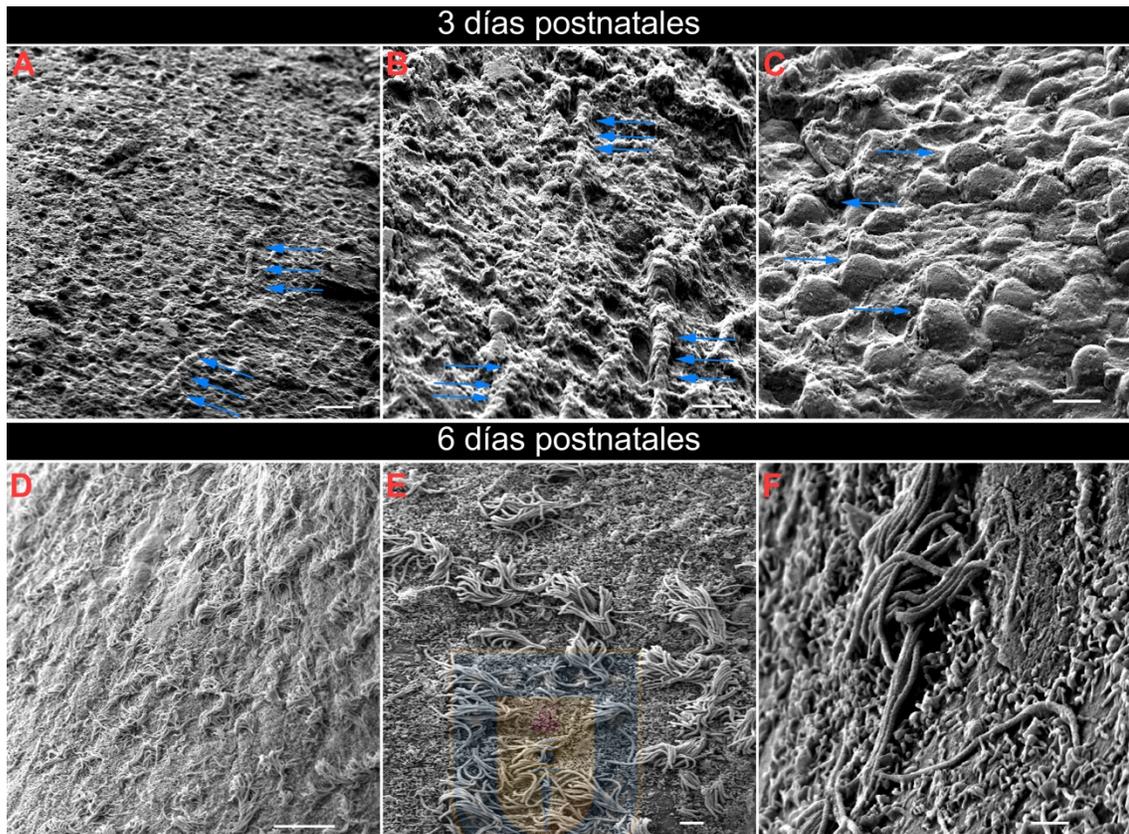


Figura 14. Procesos radiales y somas neuronales se observan en la zona ventricular en cerebros de rata de 3 días postnatales

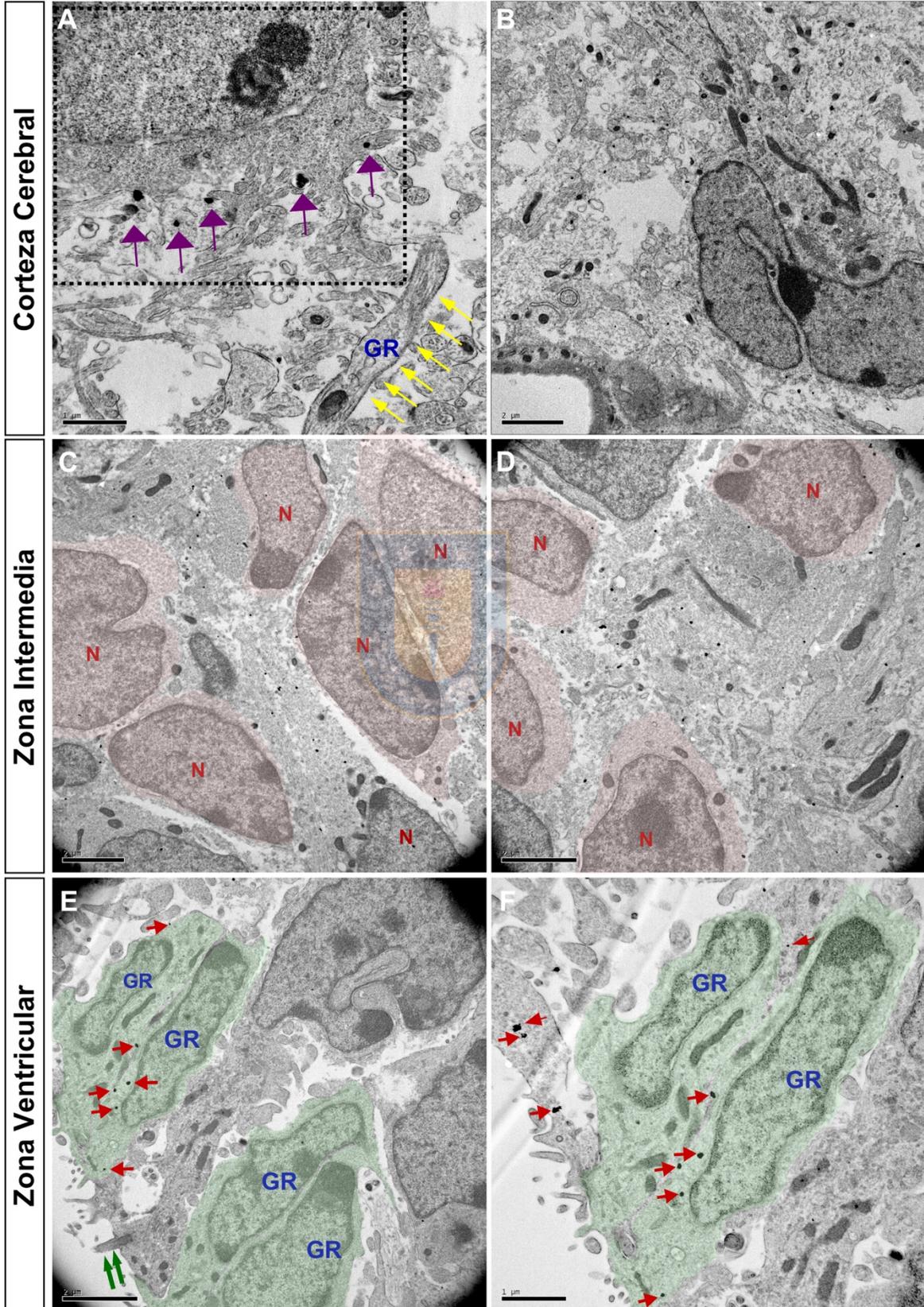
(A-C) Imágenes de microscopía electrónica de barrido en la zona ventricular y la corteza cerebral en cerebros de rata de 3 días postnatales. Se muestran procesos celulares en la pared ventricular (flechas en A) y en la zona intermedia (flechas en B). (C) En la región cortical externa se observan múltiples somas celulares. (D-F) Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la corteza cerebral de cerebros de rata de 6 días postnatales Se visualiza muestran un epitelio ventricular ciliado. Barras escala : A: 20 μ m, B-C: 10 μ m; E: 2 μ m y F:1 μ m

de la corteza, que es donde se encuentran los procesos astrocíticos. Para neuronas GFAP es negativo (Figura 15II A y D).

Los resultados presentados en este capítulo muestran que las células de la glía radial tardía son abundantes en la región dorsal ventricular, desde el estadio de 1 día hasta los 4 días postnatales. Además, esta célula se caracterizó por presentar procesos radiales elongados, los que poseen contacto con la ZV y la ZSV, como también con la superficie pial. Conforme transcurre el desarrollo, se observó una disminución del número de células de la glía radial tardía de manera ventrodorsal, llegando a la desaparición prácticamente total a los 16 días postnatales. La desaparición de las células de la glía radial viene acompañada de la expresión y presencia del transportador GLUT1, el cual es expresado por las células ependimarias. Con respecto a la expresión de SVCT2, las diferentes técnicas expuestas en esta tesis, determinaron que el transportador se encuentra polarizado ventricularmente en la glía radial. Lo anterior nos indica que la glía radial tardía probablemente se encuentra captando ácido ascórbico desde el LCR.

Dado estos hallazgos, en una siguiente etapa se procedió a evaluar si las células de la glía radial tardía mantienen su pluripotencia y se evaluó su diferenciación en estadios postnatales tanto *in vitro* como *in vivo*.

I) Inmunogold SVCT2 cerebros de rata de 3 día postnatal



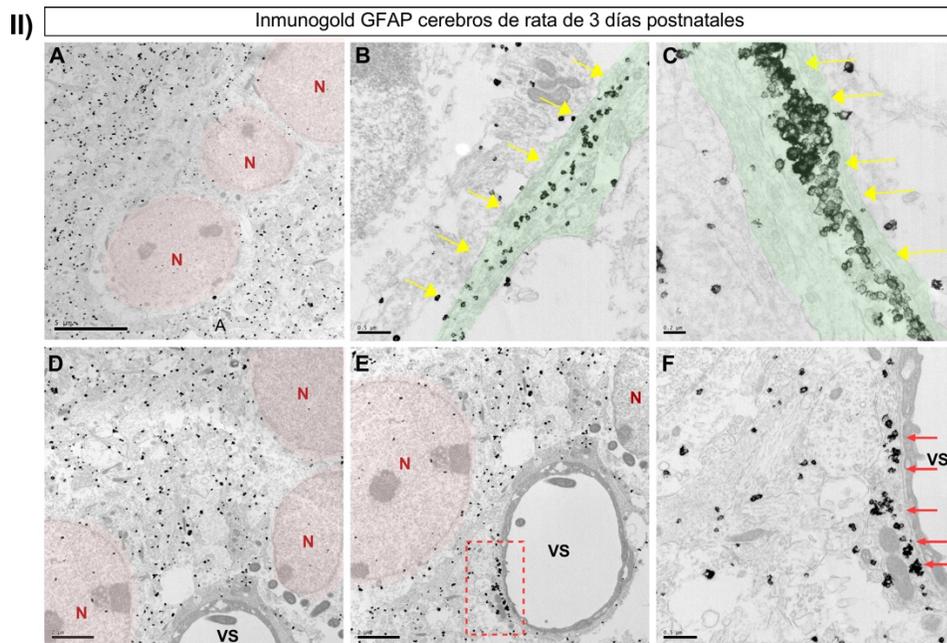


Figura 15. Análisis ultraestructural e inmunogold SVCT2 y GFAP en cerebros de rata de 3 días postnatales. (I) Inmunogold para SVCT2 muestra partículas de oro en procesos de la glía radial tardía que se encuentran en la región ventricular (sombreado en verde en E y F). Procesos de la glía radial tardía en la zona de la corteza cerebral es negativa para SVCT2 (flechas amarillas en A). Cilio primario es visualizado en F (flechas verdes). Múltiples neuroblastos (sombreados en rosado C y D) se encuentran en la zona intermedia de la corteza. Estos se caracterizan por tener un núcleo heterocromático y un citoplasma electrodenso. Neurona más diferenciadas se localiza en la corteza cerebral son positivas para SVCT2 (flechas moradas, recuadro en A). **(II)** Inmunogold para GFAP se visualiza en los procesos de la glía radial tardía (flechas amarillas en sombreado en verde en B y C) y en proyecciones de astrocitos que tienen contacto con los vasos sanguíneos (recuadro en E y flechas en F). Se distinguen múltiples partículas de oro en la neuropila de la corteza, que es donde se encuentran los procesos astrocíticos (A, D y E). Para neuroblastos GFAP es negativo (sombreado en rojo A y D). GR: Glía radial; VS: Vaso sanguíneo; N: neuroblastos. Barra escala: I A, A', F: 1μm; B,C,C',D,E: 2 μm. II A:5μm; B y F: 0.5μm; C:0,2μm; D y E: 2μm. GR: Glía radial; N: Neuroblasto; VS: Vaso sanguíneo

Capítulo 2: Análisis del estado de pluripotencia de las células de la glía radial tardía y su diferenciación en estadios postnatales.

Los resultados anteriormente expuestos sugieren que las células de la glía radial tardía se encuentran de manera abundante hasta el día 4 postnatal, manteniendo una morfología similar a la de la glía radial embrionaria. Sin embargo, la visualización de la morfología de la glía radial tardía no es suficiente para determinar si esta célula continua siendo proliferativa o mantiene una capacidad de diferenciación neuronal, por lo que se desconoce si su potencial de diferenciación se ha restringido. Para responder estas interrogantes, en este capítulo realizamos estudios del estado proliferativo y de pluripotencia de la ZV y ZSV de los ventrículos laterales como también, analizamos la diferenciación de la glía radial tardía tanto *in vitro* como *in vivo*.

4. Sox2, un factor de transcripción clave en la pluripotencia de las células madres, se localiza en la región periventricular de los ventrículos laterales

Se realizaron análisis inmunohistoquímicos acoplados con microscopía confocal espectral en ratas de estadios de 1 y 4 días postnatales, para determinar si la glía radial tardía mantiene su pluripotencia. Para ello, se utilizó el marcador Sox2, un factor de transcripción cuya función es esencial en el mantenimiento de la auto-renovación y pluripotencia de las células madres. De igual forma, se utilizó anti-GFAP para determinar si las células de la glía radial tardía presentan un compromiso de diferenciación astrocítica. En cerebros de 1 día, los resultados muestran una alta inmunorreacción para Sox2 en la ZV y la ZSV del ventrículo lateral, (Figura 16A), la cual disminuye y se expande por la corteza en cerebros de 4 días postnatales (Figura 16D). Probablemente, el marcaje positivo para Sox2 en la zona intermedia cerebral se deba a células de la glía radial tardía que recién comienzan el proceso de diferenciación. Con respecto a GFAP, se observa que la glía radial tardía comienza a tener un compromiso de diferenciación astrocítica al día 1 postnatal (Figura 16B). Sin embargo, la presencia más notoria junto con la adquisición de una morfología astrocítica ocurre en cerebros de 4 días (flechas en Figura 16E). De este resultado se desprende que existirían células de la

glía radial tardía manteniendo un estado indiferenciado como también, células que presentan un compromiso de diferenciación astrocítico.

5. Existen células proliferativas que incorporan BrdU en la zona ventricular y subventricular de los ventrículos laterales

Para determinar si las células de la glía radial tardía continúan siendo proliferativas, se realizó una única inyección intra-cerebro ventricular en ratas de 1 día postnatal de bromodesoxiuridina (BrdU), un nucleótido sintético análogo a la timidina, el cual es incorporado al ADN en replicación. Los animales fueron sacrificados 2 días post-inyección. Se detectó la presencia de células BrdU positivas, utilizando el anticuerpo anti-BrdU. Además, en conjunto se realizó una inmunotinción utilizando el anticuerpo anti-GFAP para detectar la población de células de la glía radial tardía con compromiso de diferenciación astrocítica. Los resultados muestran que en cerebros de rata de 3 días existe una población de células positivas a BrdU localizadas mayoritariamente en la ZV y ZSV de los ventrículos laterales (flechas en Figura 17A). Además, se observaron células BrdU positivas localizadas en la corteza cerebral, las que probablemente correspondan a células hijas provenientes de la glía radial tardía (Figura 17A). Por otro lado, consistente con resultados anteriores (figura 16B), en el cerebro de rata de 3 días, se encuentran células de la glía radial con compromiso de diferenciación astrocítica, distinguiéndose procesos inmunorreactivos para el marcador GFAP (Figura 17B). Estos resultados nos indicarían la co-existencia de células de la glía radial, indiferenciadas/proliferativas, como también células que ya presentan un compromiso de diferenciación astrocítico.

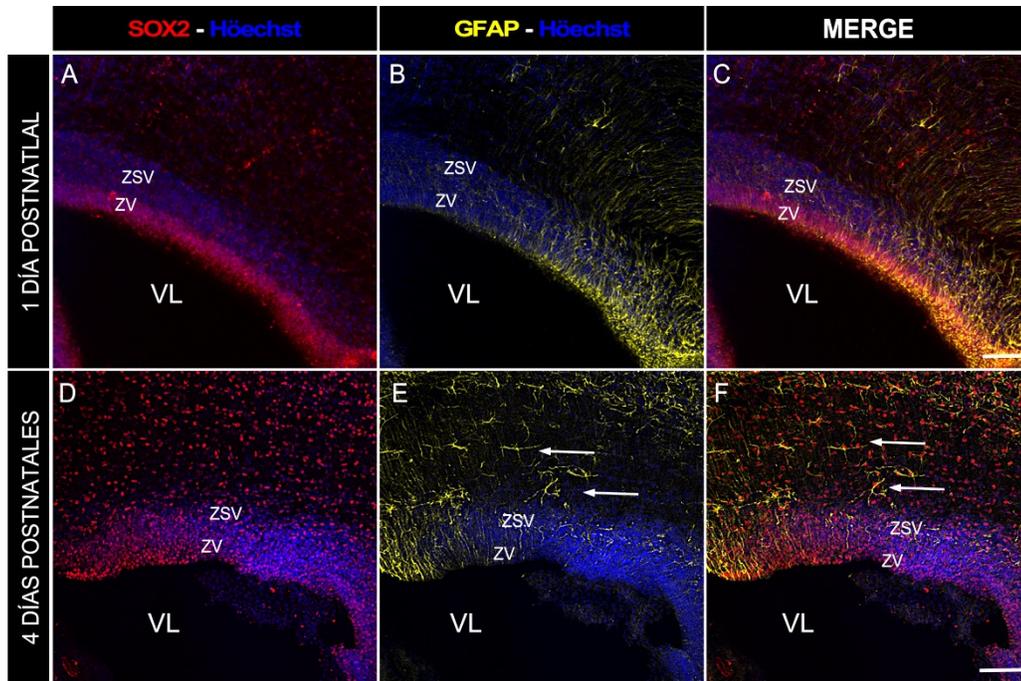


Figura 16. Sox2 se encuentra presente en la región ventricular y subventricular en cerebros de 1 día postnatal.

Análisis inmunohistoquímicos mediante microscopía confocal de cortes frontales de cerebros de rata. (A-C) Cerebros de 1 día postnatal. Inmunoreacción para Sox2 (señal en rojo, A), GFAP (señal en amarillo, B) en la zona ventricular y subventricular dorsal. (D) Superposición de las imágenes (A) y (B). (D-F) Cerebros de 1 día postnatales. Inmunoreacción para Sox2 (señal en rojo, D), GFAP (señal en amarillo, E) en la zona ventricular y subventricular dorsal. Flechas en E indican células con morfología astrocítica. (F) Superposición de las imágenes (D) y (E). Los núcleos celulares fueron marcados con Hoechst (azul) en todas las imágenes. LV: Ventriculo Lateral. ZV: Zona Ventricular; ZSV: Zona Subventricular. Barra escala : 100µm.

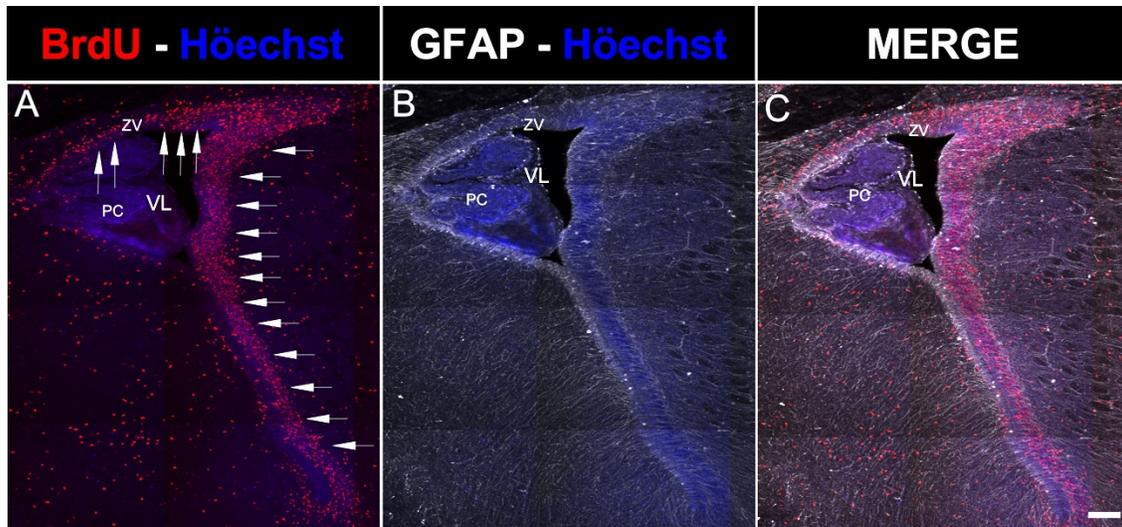


Figura 17. Las células de la pared de los ventrículos laterales tienen capacidad proliferativa.

Las células BrdU positivas fueron detectadas con el anticuerpo anti-BrdU en cortes frontales de rata de 3 días postnatales. (A) Células BrdU positivas (señal en rojo) presentes en la zona ventricular y subventricular (flechas). (B) Inmunoreacción para GFAP (blanco) a lo largo del ventrículo. (C) Superposición de las imágenes A y B. Los núcleos celulares fueron marcados con Hoechst (azul) en todas las imágenes. VL: Ventrículo Lateral; PC: Plexos Coroideos; ZV: Zona Ventricular. Barra escala: 200 μ m

6. La glía radial tardía *in vitro* se diferencia en astrocitos.

De forma paralela, se realizaron análisis para determinar la diferenciación de la glía radial tardía *in vitro*. Para ello, se aislaron las células de la corteza cerebral de ratas de 1 día postnatal, las que fueron cultivadas durante 4 días *in vitro*. La caracterización de este cultivo primario se realizó utilizando diferentes marcadores gliales y de célula madre. Además, se determinó la presencia del transportador SVCT2. Como criterio de reconocimiento de la glía radial se consideró la expresión de marcadores selectivos y su morfología *in vitro* (Pollard et al. 2007).

Los resultados analizados mediante microscopía confocal en cultivos primarios de 4 días *in vitro*, muestran que las células de la glía radial tardía exhiben una morfología ramificada, con uno o dos largos procesos elongados y un núcleo ovoide (Figura 18A, 18C, algunas células de la glía radial tardía mostradas en flechas punteadas en figura 18E-H, recuadro punteado en Figura 18H y Figura 18I'). Las células de la glía radial presentaron una alta inmunorreacción para los anticuerpos de células madre; nestina y Sox2 (Figura 18A, 18F y 18G) pero no así para GFAP (Figura 18B), lo que en concordancia a lo observado en los resultados anteriores, nos indicarían que esta célula mantiene su estado de célula madre indiferenciada. Además, se detectó el transportador SVCT2 a lo largo de los procesos de la glía radial tardía (Figura 18E). Por otro lado, se distinguieron células con una clara morfología astrocítica, las que presentan un cuerpo celular y un núcleo redondeado, de un tamaño superior al de la glía radial tardía (algunas astrocitos señalados con flechas continuas en Figura 18E-H, recuadro continuo en Figura 18H y Figura 18J'). Se visualizó que algunos astrocitos extienden cortos procesos. Estas células presentan, con menor intensidad de fluorescencia, un marcaje para Sox2, nestina y SVCT2 (Figura 18E-H). Tal como es mostrado, la morfología de la glía radial versus la astrocítica es fácilmente identificable por lo cual, se procedió a clasificar el tipo de célula – astrocitos o glía radial- que compone el cultivo primario. Para ello, se cuantificaron 6 imágenes adquiridas de manera aleatoria de 3 cultivos primarios independientes. Los resultados mostraron que los cultivos presentaban un $73,7 \pm 3,4$ % de células con morfología radial y $26,3 \pm 3,4$ % con morfología astrocítica (Figura 18K). Lo anterior, nos generó una idea inicial de la composición del

cultivo primario, sin embargo, para tener una mayor exactitud se procedió a cuantificar las células que presentaban procesos celulares. Así, se consideró una célula de la glía radial tardía, aquella que presenta uno o dos procesos radiales – el cual es considerado como tal al presentar una longitud igual o mayor al diámetro del cuerpo celular–. Los resultados muestran que un $65,43 \pm 5,13\%$ de las células presentaron procesos, lo cual es significativamente mayor a las células que no los presentan ($34,57 \pm 5,13\%$) (Figura 18L). Estos procesos presentaron una longitud media de $57,23 \pm 2,26 \mu\text{m}$. Lo anterior sugiere que se generaron cultivos enriquecidos de glía radial tardía, en los que coexisten células tanto de la glía radial como astrocitos. Para comprobar que la glía radial tardía se diferencia en astrocitos, se prolongó el tiempo de estos cultivos, los que fueron dejados 10 días *in vitro*. Los análisis mediante microscopía confocal muestran que las células presentes en cultivos primarios enriquecidos de glía radial presentan una morfología celular completamente diferente. Se detectaron células con una morfología típica astrocítica, las que tienen un soma de un mayor tamaño que las de la glía radial tardía y no presentan los típicos procesos elongados que se extienden desde el soma. Además, estas células exhiben una escasa inmunoreactividad para los marcadores de células madres; nestina y Sox2 (Figura 19A, 19B, 19E y 19F). En contraparte, se observa un marcaje altamente positivo para GFAP (Figura 19C, 19G, 19K), como también para vimentina (Figura 19J) y SVCT2 (Figura 19I) lo cual sugiere que bajo estas condiciones de cultivo, se trataría de astrocitos reactivos. Cabe destacar que la cuantificación demuestra que el cultivo primario de 10 días *in vitro* presentan un número significativamente mayor de células con morfología astrocítica (Figura 10M). Además, al realizar la cuantificación de células que presentan procesos (glía radial tardía) versus aquellas células que no presentan (astrocitos) se obtuvo que un porcentaje significativamente mayor de células que no presentan procesos $98,96 \pm 2,95\%$, mientras que un $1,04 \pm 2,95\%$ de las células presentaron procesos (Figura 19O). Adicionalmente, se comparó la morfología celular del cultivo primario enriquecido de glía radial tardía de 10 días *in vitro* versus el cultivo primario de 4 días *in vitro*.

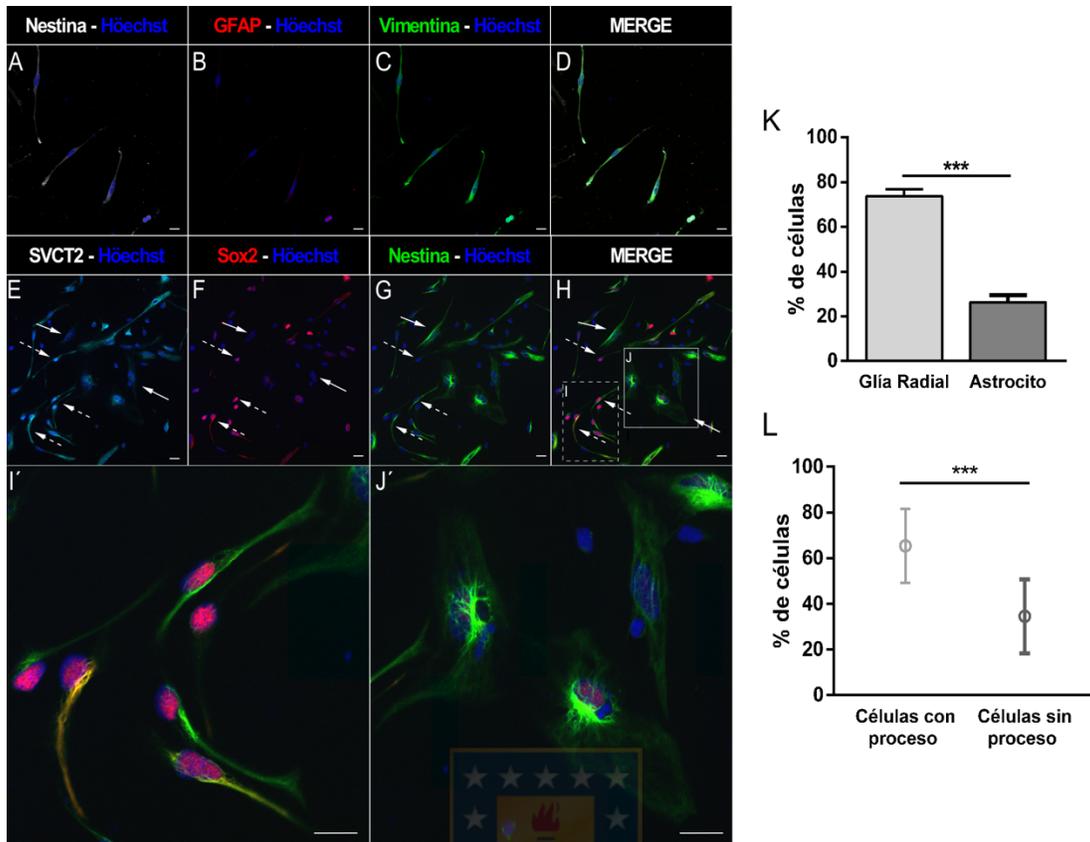


Figura 18. La Glía radial tardía aislada y mantenida *in vitro*, presenta una morfología elongada y es positiva para marcadores de células madre y SVCT2.

Análisis de microscopía confocal para cultivo primario de 4 días *in vitro*. (A-D) Se distinguen células con morfología de glía radial, las que son inmunoreactivas para nestina (A, señal en blanco), vimentina (C, señal en verde) y, en menor medida para GFAP (B, señal en rojo). (D) Superposición de las imágenes A-C. (E-H) Se muestran células con morfología de glía radial (flechas discontinuas) y astrocítica (flechas continuas). Células con fenotipo radial son inmunoreactivas para SVCT2 (E, celeste), Sox2 (F, señal en rojo) y nestina (G, señal en verde). (H) Superposición de las imágenes E-G. (I, J) Imágenes aumentadas digitalmente de los recuadros punteados y continuos de H, respectivamente. Se muestran células de la glía radial (I) y astrocitos J. Tinción nuclear con Hoechst (señal azul). (K-L) Cuantificación imágenes (n=3) indicando el porcentaje de células con procesos radiales (K) y la longitud de los procesos radiales (L). (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; *** p <0.0001) Barra escala: 20µm.

Los resultados indicaron que existe un número significativamente mayor de células con morfología astrocítica ($98,86 \pm 1,14\%$) en los cultivos primarios de 10 días *in vitro* y de manera concordante, una disminución significativa en el número de células de la glía radial tardía ($1,14 \pm 1,14\%$), con respecto al cultivo primario de 4 días *in vitro* (Figura 19N). Así, de manera esperada y de acuerdo con la literatura, es probable que la glía radial tardía se diferencie de manera preferente a astrocitos *in vitro*.

7. La glía radial tardía mantiene una diferenciación neurogénica en estadios postnatales

Finalmente, para los análisis *in vivo* sobre la diferenciación de la glía radial tardía, se procedió a realizar inyecciones utilizando partículas lentivirales o adenovirales de manera intra-cerebro ventricular en ratas de 1 día postnatal (Figura 20A). Tanto el lentivirus como el adenovirus han sido ampliamente utilizados en nuestro laboratorio; el primero ha sido extensamente caracterizado por su tropismo neuronal (Salazar et al. 2016), mientras que el adenovirus inyectado a nivel del tercer ventrículo, mostró una gran eficacia para la transducción de tanicitos; células ependimogliales localizadas en la eminencia media (Martinez et al. 2019). Ambos virus presentan el gen reportero eGFP, por lo cual, una vez realizada la transducción, las células que tienen contacto con el ventrículo son infectadas y posteriormente visualizadas presentando fluorescencia en color verde. Se realizó una única inyección cerebral en el ventrículo lateral, en un total de 6 ratas de 1 día postnatal, para cada virus. Luego de 5 días, los animales fueron sacrificados y se analizó el tropismo presentado por cada virus. Para ello, se realizaron cortes cerebrales de $60 \mu\text{m}$ los que una vez montados, fueron analizados por microscopía confocal espectral. Los resultados mostraron que ninguno de los 6 cerebros a los cuales se les inyectó el lentivirus, presentó transducción ventricular (Figura 20B-C). En contraparte, los 6 cerebros inyectados con adenovirus presentaron un intenso marcaje ventricular, de los cuales se muestran 3 imágenes representativas (Figura 20D-F).

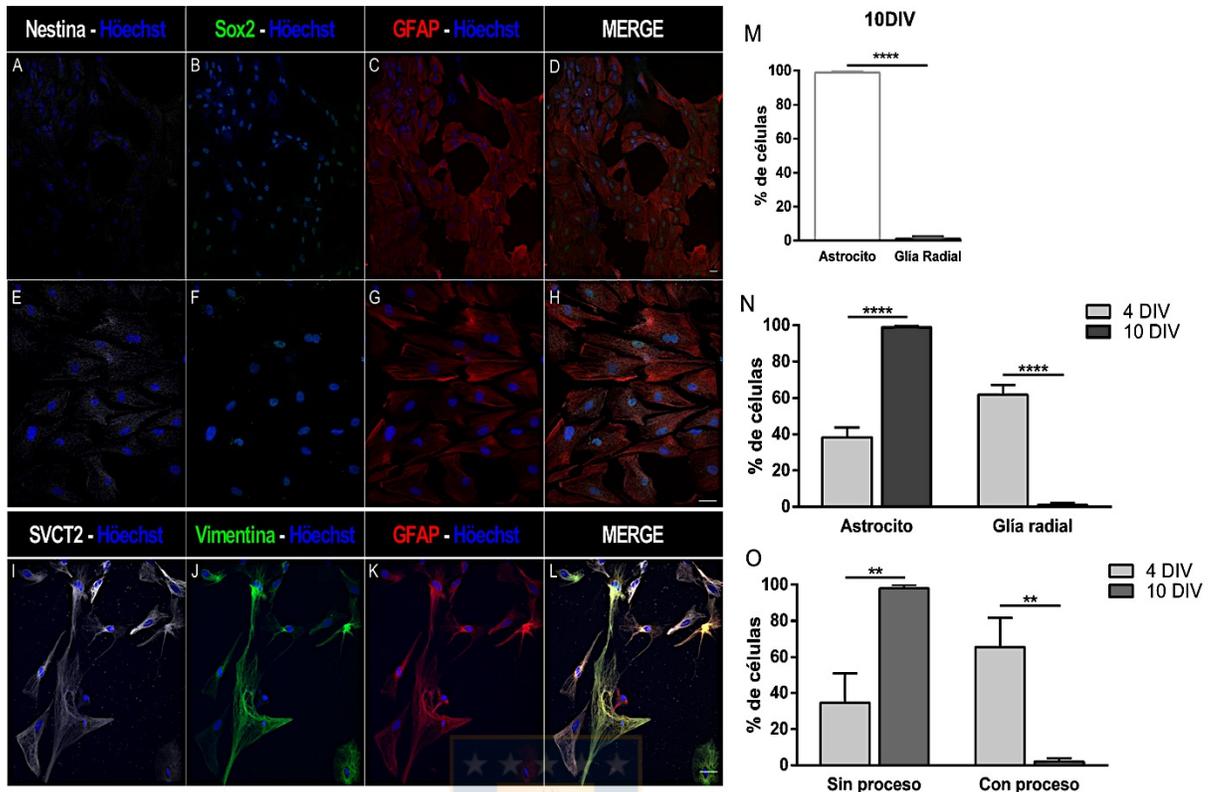


Figura 19. La Glía radial tardía se diferencia a astrocitos *in vitro*, los cuales son reactivos en estas condiciones de cultivo.

Análisis de microscopía confocal para cultivo primario enriquecido en glía radial tardía de 10 días *in vitro*. Se visualiza la inmunorreacción para nestina (blanco, A y E) y Sox2 (verde, B y F) y GFAP (rojo, C y G). (D, H) Corresponden a la superposición de A- C y E- G, respectivamente. (I-L) En imágenes de mayor aumento se detecta la inmunorreacción para SVCT2 (blanco, I), vimentina (verde J) y GFAP (rojo, K). (L) Superposición de las imágenes I-K. En todas las imágenes, los núcleos celulares fueron marcados Hóechst (azul). (L-M) Representación gráfica de la cuantificación imágenes (n=3) indicando el porcentaje de células con y sin procesos en cultivos celulares enriquecidos en glía radial tardía de 4 días *in vitro* (M) y gráfico comparativo de porcentaje de células con y sin procesos de 4 y 10 días *in vitro* (L). Barra escala: 20µm (* p <0.05; ** p <0.01).

Se realizó un análisis más detallado de las células infectadas luego de 5 días post-transducción adenoviral (Figura 21). Los resultados mostraron una alta densidad de células con marcaje eGFP positivo en la región ventricular. Se observó que los procesos radiales comienzan desde la ZV y la ZSV del ventrículo (flechas Figura 21B), extendiéndose radialmente hacia la superficie pial (flechas en Figura 21C). Sorprendentemente y de manera inesperada, se observaron células con una morfología neuronal migratoria (flechas blancas en Figura 21D, 21E y Figura 21F). Estas células se distinguen por poseer un cuerpo celular alargado que se estrecha en sentido de la migración, una estructura conocida como el proceso líder. Este proceso líder, que presenta un promedio de entre 20-70 μm de longitud (Rivas et al. 1995) (variación en su longitud se debe a la retracción/elongación que presenta) fue claramente identificado en las neuronas migratorias observadas (flechas celestes en Figura 21E). Estas células con fenotipo neuronal migratorio se detectaron en la zona intermedia, como también en las capas más superiores de la corteza cerebral (Figura 21D, 21E). Así, de manera destacable, los resultados muestran que el adenovirus se transduce de manera selectiva en la glía radial tardía, como también en células que proceden de la misma, las cuales presentan un fenotipo neuronal migratorio. Cabe destacar, que las células con morfología neuronal migrando, fueron observadas en todos los cerebros analizados (n=6). Lo anterior, indica la existencia de neurogénesis postnatal a partir de la glía radial tardía. Sin embargo, es importante mencionar que probablemente la proporción de diferenciación neurogénica versus gliogénica, debe ser considerablemente menor. Lo anterior, sumado a los resultados obtenidos previamente, sugieren que en estos estadios postnatales aún existirían células de la glía radial tardía que presentan características (i) proliferativas (positivas a BrdU), (ii) pluripotentes (positivas a Sox2) y (iii) que exhiben una diferenciación gliogénica y neurogénica.

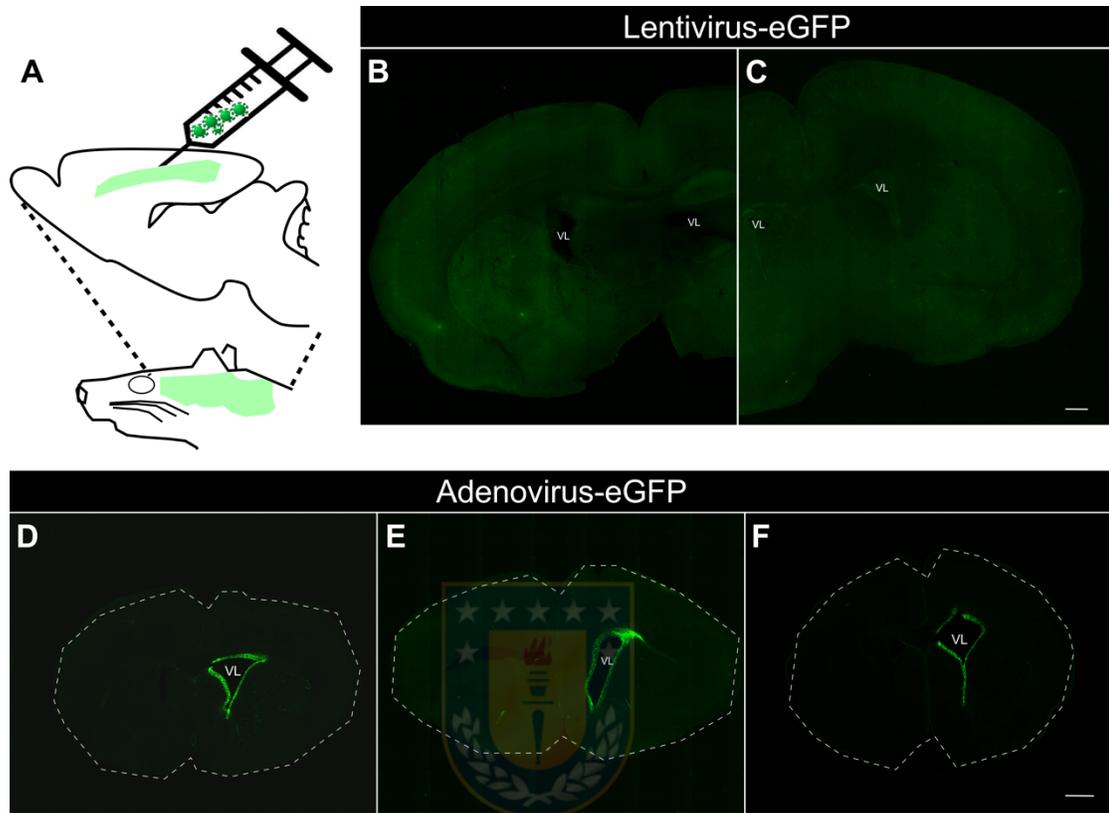


Figura 20. La inyección intraventricular con adenovirus-eGFP permite el marcaje *in vivo* de la zona ventricular.

(A) Representación gráfica de la inyección de los virus en ratas de 1 día postnatal. (B-F) Cortes frontales cerebrales de rata inyectadas a 1 día postnatal y analizadas por microscopía confocal a 5 días post-transducción. (B-C) Tile-scan de cortes cerebrales de dos animales distintos inyectados con lentivirus. (D-F) Tile-Scan de cortes frontales de 3 cerebros distintos inyectados con adenovirus. VL: Ventriculo Lateral. Barra escala: 1mm

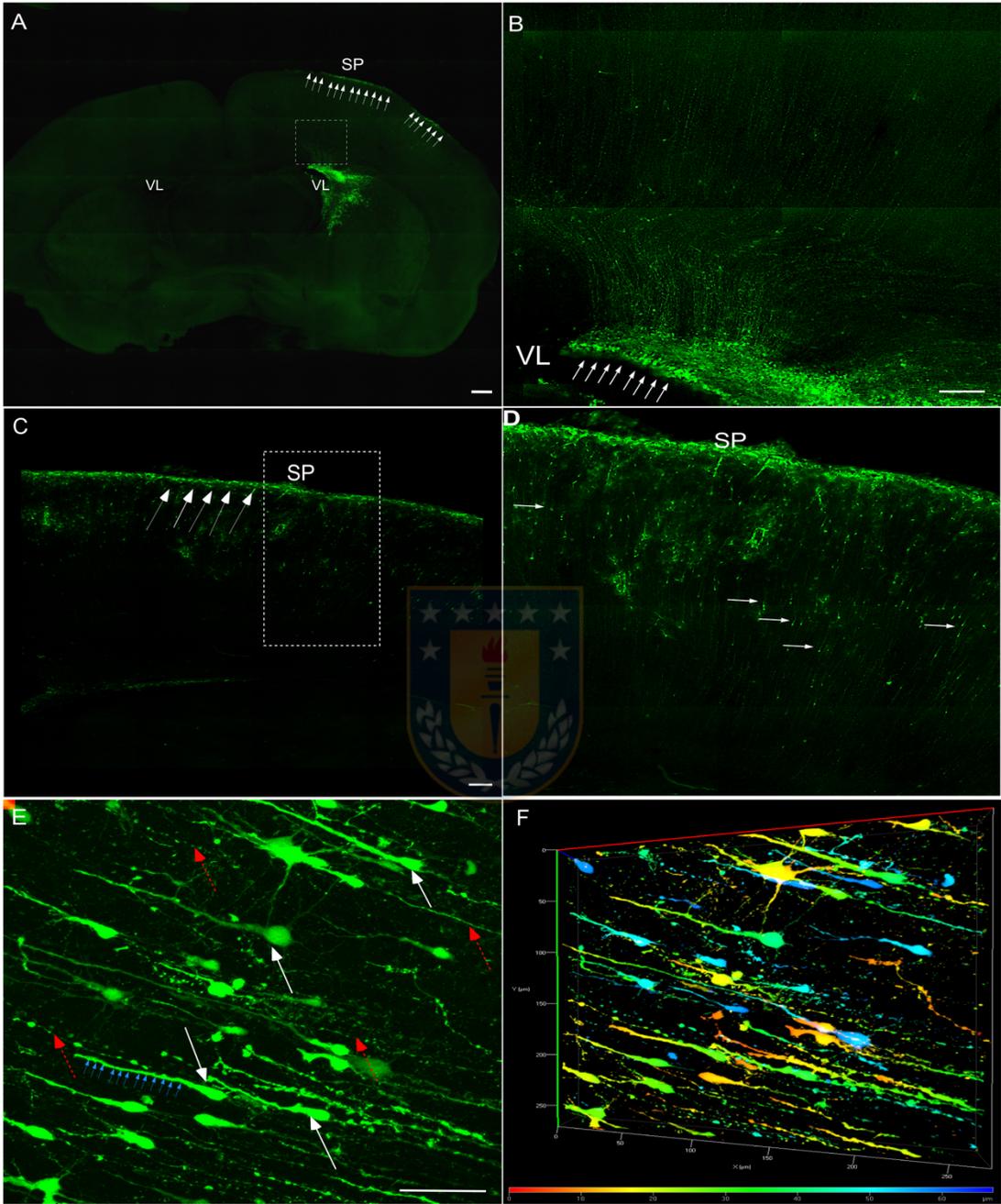


Figura 21. La glía radial tardía mantiene una diferenciación neurogénica en estadios postnatales.

(A) Análisis de microscopía confocal espectral y Tile-Scan de la transducción realizada con adenovirus GFP. Se visualiza una infección adenoviral en la región ventricular y en la superficie pial (flechas). (B) Imagen aumentada de A, se indican procesos celulares que se extienden desde el ventrículo (flechas). (C) Imagen aumentada de la región cortical externa de la imagen A, se identifica un marcaje positivo en la superficie pial (flechas). (D) Imagen aumentada del recuadro en C, se muestran células con morfología neuronal migratoria (flechas). (E) Reconstrucción 3D obtenida mediante el apilamiento en el eje Z (Z-stack) de numerosos planos de A, flechas celestes indican una célula el proceso líder de una neurona migratoria. Se indican procesos radiales (flechas rojas) y células con morfología neuronal (flechas blancas). (D) Representación 3D de C, neuroblastos migran a diferentes profundidades. VL: Ventrículo lateal; SP: Superficie Pial. Barras escala: A:1mm, B-D: 100 μ m, E: 50 μ m

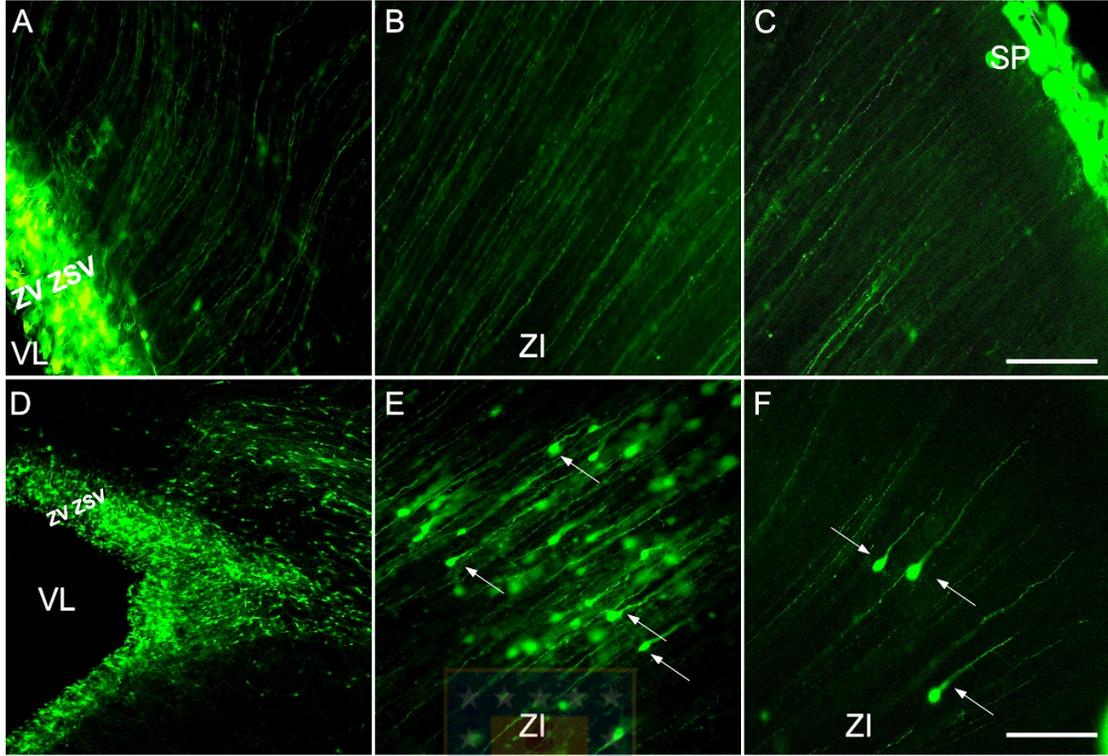


De manera complementaria, se analizaron estadios más tempranos y tardíos post-inyección adenoviral. En los experimentos se inyectaron intra-ventricularmente 4 ratas en estadio de 1 día postnatal y fueron analizados a los 2, 12 y 16 días post-transducción. A los 2 días post-inyección, se observó el cuerpo celular de la glía radial tardía ubicada en la ZV y ZSV (Figura 22A), desde donde se extienden abundantes procesos radiales que se dirigen a través de la zona intermedia (Figura 22B) hacia la superficie pial (Figura 22C). Interesantemente, en estos estadios se observan células con fenotipo de neuronas migratorias con un claro proceso líder (flechas Figura 22E y 22F). Cabe destacar que similar a lo observado a los 5 días post-transducción adenoviral, se detectó que estas células con fenotipo neuronal migratorio se desplazan a través de la corteza cerebral, principalmente de manera agrupada (Figura 21E). Estos *clusters* de células migratorias, luego de 2 días post-transducción se visualizaron esencialmente en las cercanías del ventrículo (Figura 22D) y en la zona intermedia (Figura 22E), no así en la región cortical externa.

En estadios más avanzados, luego de 12 días post-transducción adenoviral, se distinguen escasas células de la glía radial en la zona ventricular y cortical (Figura 22G-I), lo cual concuerda con que en estos estadios la glía radial tardía se encuentra desapareciendo. Las células observadas en las cercanías ventriculares (recuadro Figura 22G), probablemente correspondan a células de la glía radial en diferenciación, por tanto, no se visualizan los procesos extendidos radialmente por la corteza cerebral. De manera interesante, en estos estadios se identificaron células con un fenotipo neuronal en proceso de maduración (flechas blancas en Figura 21H, 21J y 21K), ya que se observa el crecimiento y arborización de dendritas. De igual manera, se detectan algunas células con un fenotipo neuronal migratorio (flechas rojas en Figura 21 I y 21L), como también, se encontraron cúmulos neuronales, los que probablemente provengan de neuronas que migraron agrupadas (Recuadro Figura 21 I).

De manera complementaria, se realizaron análisis inmunohistoquímicos con los anticuerpos vimentina, GFAP, tubulina β III y NeuN en cortes de cerebros de 16 días post-transducción adenoviral.

ADENOVIRUS-eGFP 2 DÍAS POST-TRANSDUCCION



ADENOVIRUS-eGFP 12 DÍAS POST-TRANSDUCCION

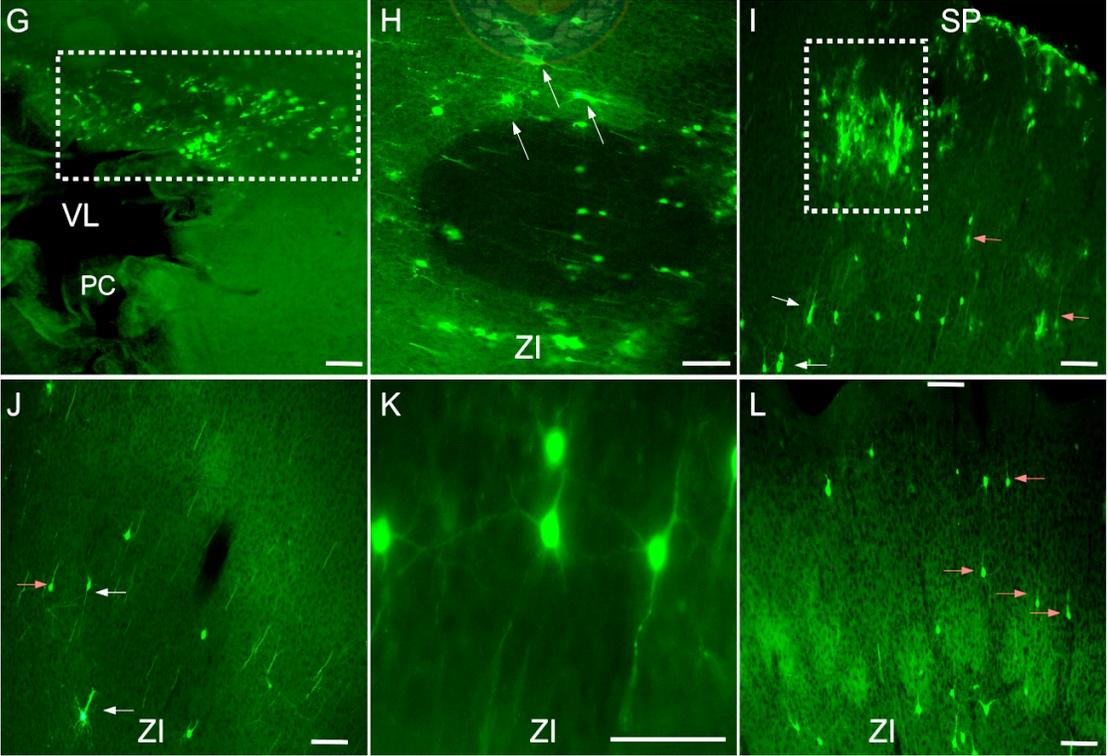
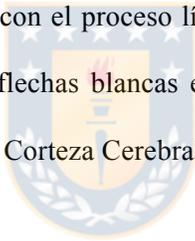


Figura 22. Células transducidas con adenovirus-eGFP presentan células eGFP positivas con fenotipo neuronal tanto a los 2 como a los 12 días post-transducción.

Imágenes de la ZV y ZSV (A), zona intermedia (B) y corteza cerebral externa (C) de cerebros de rata de 3 días transducidos con adenovirus-eGFP inyectado ventricularmente al día 1 postnatal. (D) Transducción adenoviral en la ZV y ZSV dorsal. (E) Imagen de mayor aumento de la zona intermedia, flechas indican células con fenotipo neuronal. (F) Se indican células con fenotipo neuronal migratorio. (G-L) Análisis post-transducción de cerebros de 13 días inyectado ventricularmente con adenovirus-eGFP al día 1 postnatal. (G) Se distinguen células positivas a eGFP en las proximidades ventriculares. (H) Imagen de la zona intermedia, se indican células con fenotipo neuronal arborizado (flechas). (I) Imagen de la region cortical externa, recuadro indica cúmulos de células positivas a eGFP y flechas células con morfología neuronal. (J-L) Imagen de la zona cerebral intermedia, se muestran células neuronales migratorias con el proceso líder (flechas rojas en J y L) y células con morfología neuronal mas mádura (K y flechas blancas en J). ZV: Zona Ventricular; ZSV: Zona subventricular; ZI: Zona Intermedia; CC: Corteza Cerebral; SP: Superficie Pial. Barra escala: 50µm



Los resultados indicaron la existencia de una alta transducción adenoviral en la pared ventricular del ventrículo lateral (Figura 23F) donde se observan células eGFP positivas en el cuerpo calloso, las que probablemente corresponden a neuroblastos. De manera destacable, se observa que estas células se encontrarían migrando a través de procesos radiales positivos a vimentina (flechas Figura 23G, H-I). Además, tal como es esperado en estos estadios más avanzados del desarrollo, se detectan escasos procesos celulares en la región ventricular dorsal (flechas Figura 23E). Por otro lado, se visualizaron células migrando hacia la corteza cerebral externa (flechas amarillas en Figura 23F), de las cuales algunas se muestran arborizadas y con claros procesos dendríticos (Figura 23A, B y J). Estas células en proceso de maduración neuronal también son observadas en la corteza cerebral externa (Figura 23J) las que son positivas para el marcador neuronal, tubulina β III (Figura 23L). De manera complementaria, se realizaron ensayos inmunohistoquímicos utilizando un marcador nuclear de neuronas maduras, NeuN (Figura 24). Los resultados confirman que las células eGFP positivas (Figura 24A y E) corresponden a neuronas, co-localizando con NeuN (Figura 24D, H y i-iv). Además, estas células no exhiben un marcaje positivo para el marcador glial GFAP, descartándose que correspondan a astrocitos.

Finalmente, para corroborar que lo observado mediante la transducción adenoviral corresponde a una glía radial tardía, se procedió a realizar análisis inmunohistoquímicos utilizando los anticuerpos GFAP, vimentina y Sox2. Los resultados muestran que en cerebros de 6 días postnatales, inyectados intraventricularmente al día 1 postnatal, existe una extensa red astrocítica, las cuales son visualizados en las proximidades ventriculares (Figura 25H), en la zona intermedia (Figura 25B) y en la glía marginal, ubicada por encima de las primeras capas neuronales (flechas en Figura 25H). Los resultados muestran que no existe co-localización entre las células eGFP positivas con el marcaje para GFAP (recuadros Figura 25D-F). Además, en la región cortical externa se distinguieron células con morfología neuronal migratoria (flechas en Figura 25A), las que al igual que nuestros resultados anteriores, no exhiben una co-localización con GFAP (Figura 25C). Por otro lado, al

analizar la inmunorreacción para Sox2, se observó que aún existe una abundante población de células positivas a Sox2 en la ZV y en la ZSV (Figura 25Q), algunas de las cuales co-localizan con las células positivas a eGFP (recuadro Figura 25R). Además, se visualizaron procesos positivos a vimentina, tanto de manera radial como ondulante (Figura 25N). Se observó que en la zona intermedia y en la corteza cerebral externa, algunos procesos eGFP positivos co-localizan con vimentina (Figura 25O y Figura 25L), sugiriendo que el adenovirus tiene un tropismo por la glía radial tardía.

Posterior al desarrollo de este análisis, se procedió a evaluar el efecto de la vitamina C en la diferenciación de la glía radial. Para ello, se realizaron cultivos celulares primarios enriquecidos en glía radial tardía de cerebros de ratas de 1 día postnatal, los que fueron suplementados con concentraciones fisiológicas de ácido ascórbico (200 μ M). Igualmente, se realizaron análisis en cultivos primarios obtenidos de cerebros de ratón heterocigotos *knockout* para el transportador SVCT2 y ratones transgénicos que sobre-expresan SVCT2 (SVCT2tg). Además, se realizaron estudios *in vivo*, electroporando SVCT2 a 1 día post-natal.



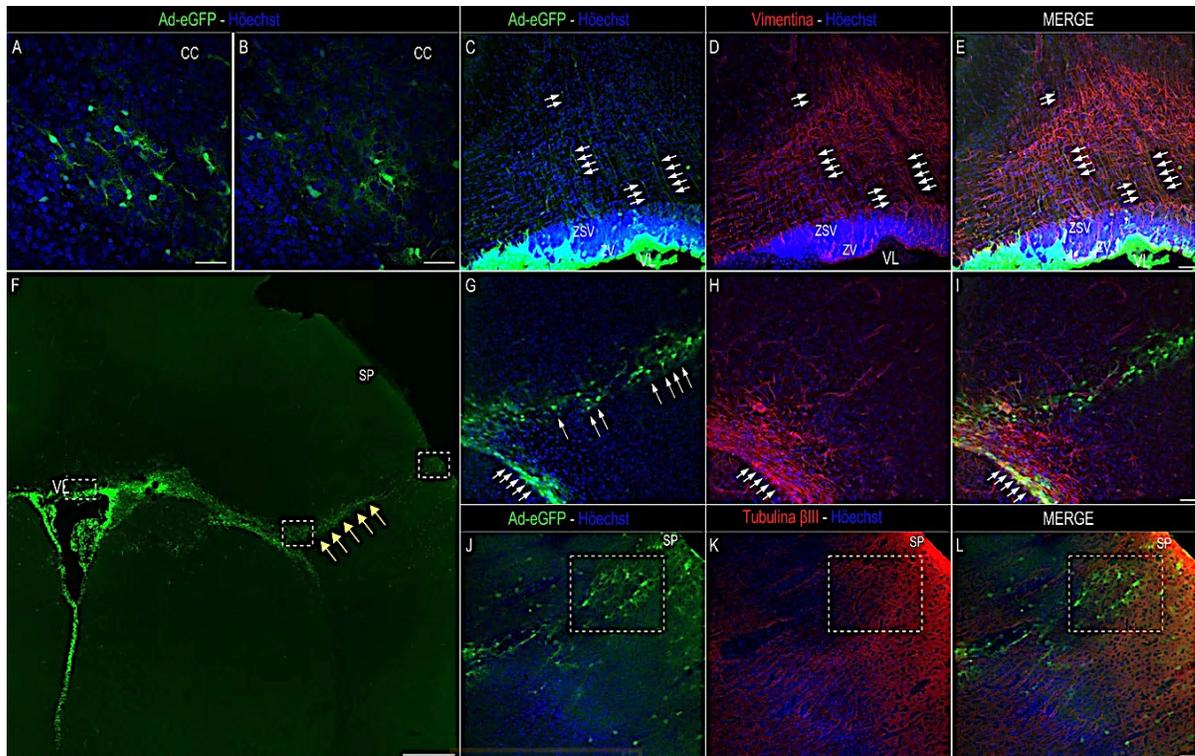


Figura 23. Células eGFP+ exhiben arborización dendrítica y son positivas para el marcador neuronal, tubulina β III.

(A-L) Análisis inmunohistoquímico de cortes frontales de cerebros de 17 días inyectados ventricularmente con adenovirus-eGFP, al día 1 postnatal. (A-B) Imágenes de la corteza cerebral. (C-D) Imágenes de la región ventricular dorsal, flechas indican procesos eGFP+ (A) e inmunoreacción para vimentina (rojo, B). (E) Superposición de las imágenes D y C. (F) Células transducidas adenoviralmente se distinguen en la pared ventricular, cuerpo calloso y migrando hacia la corteza cerebral externa (flechas amarillas). (G-H) Imagen del cuerpo calloso y corteza cerebral, se detectan células eGFP+ (G) e inmunoreacción para vimentina (H). (I) Superposición de las imágenes G y H. (J-L) Imagen de la corteza cerebral externa, recuadro indica célula eGFP+ arborizadas (J) e inmunoreacción para tubulina β III (rojo, K). (L) Superposición de las imágenes J y K. Los núcleos se visualizan con H \ddot{o} chst (azul) en todas las imágenes. VL: Ventrículo Lateral; CC: Corteza Cerebral. Barra escala (A-C, G-L) 50 μ m; F: 500 μ m.

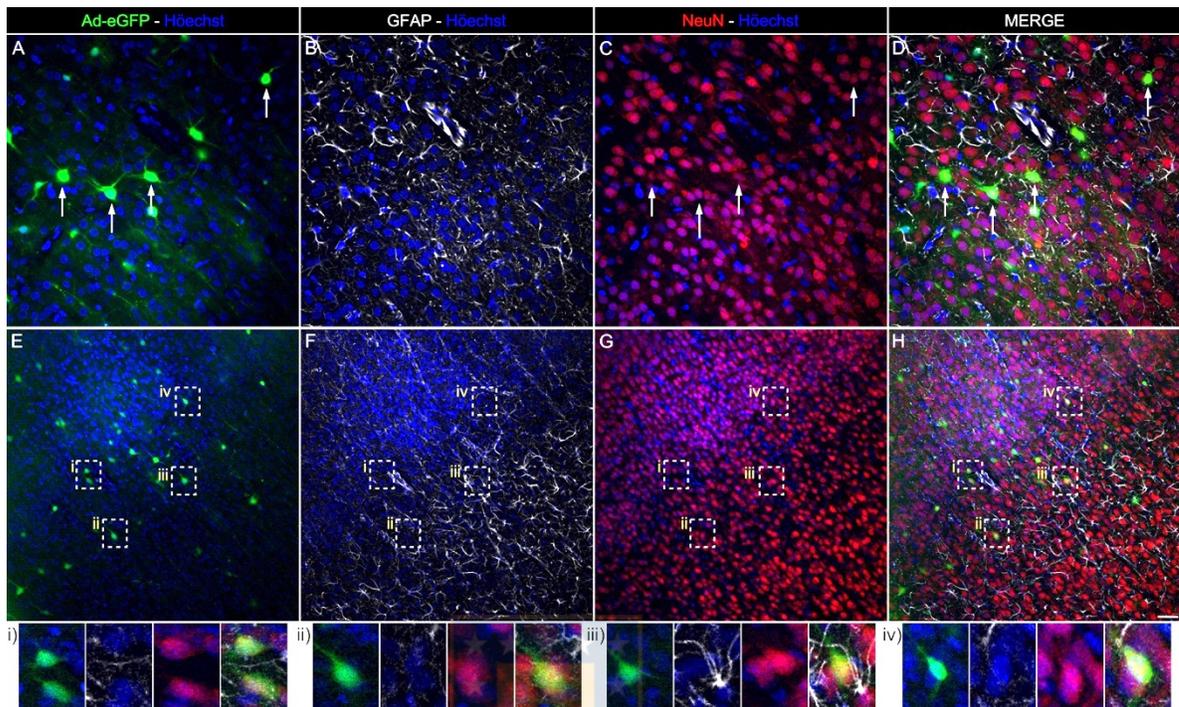


Figura 24. Células eGFP+ son positivas para el marcador neuronal, NeuN.

(A-H) Análisis inmunohistoquímico de cortes frontales de cerebros de 17 días inyectados ventricularmente con adenovirus-eGFP al día 1 postnatal. Imágenes de la corteza cerebral, se indican células positivas a eGFP (A y E), inmunoreacción para GFAP (blanco, B y F) y para Sox2 (rojo, C y G). (D y H) Superposición de las imágenes A-C y E-G, respectivamente. (i-iv) Aumento digital de los recuadros i-iv de E-G, respectivamente. Los núcleos se visualizan con Hóechst (azul) en todas las imágenes. Barra escala: 50 μm .

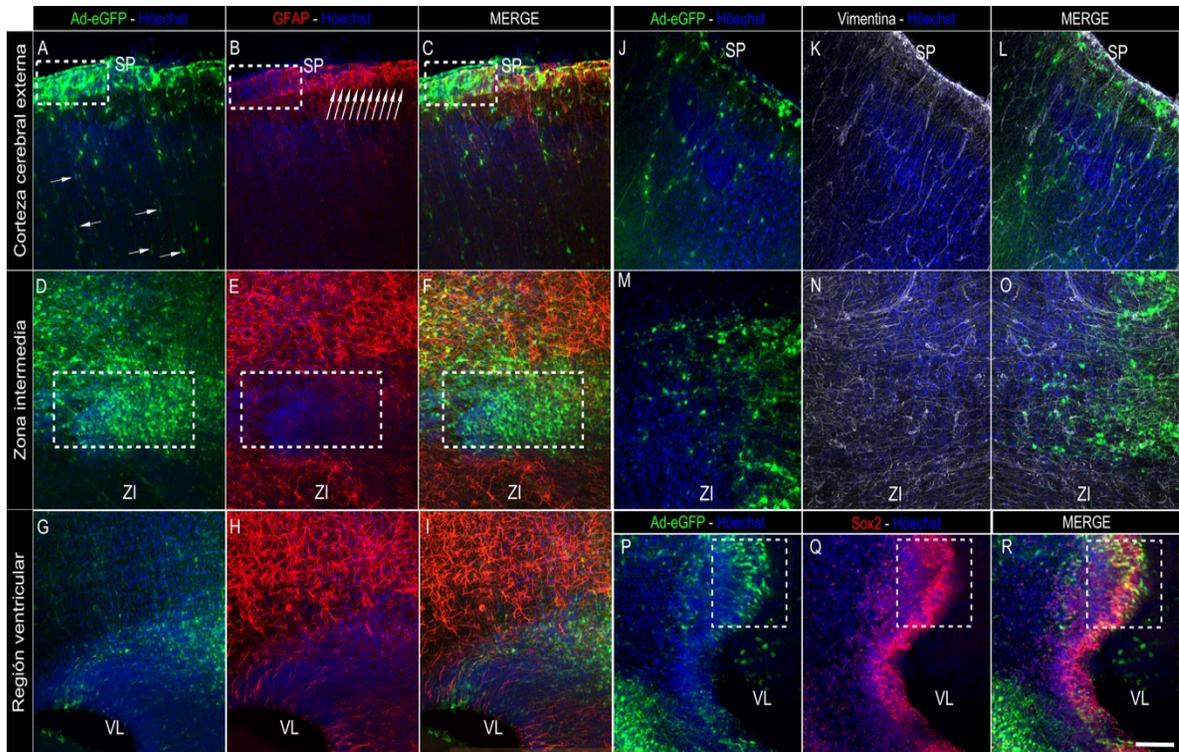


Figura 25. Células transducidas con adenovirus-GFP son positivas para vimentina y Sox2 pero no para el marcaje astrocítico GFAP.

(A-R) Análisis de microscopía confocal de cortes cerebrales inyectados con adenovirus-GFP de 6 días transducidos con adenovirus-eGFP (verde) inyectado ventricularmente al día 1 postnatal. (A-I) Células eGFP⁺ se visualizan en la corteza cerebral externa (A), zona intermedia (D) y en la región ventricular (G). (B, E y H) Inmunoreacción para GFAP (rojo). (C, F e I) Superposición de imágenes A-B, D-E y G-H, respectivamente. (J-O) Análisis inmunohistoquímicos utilizando anti-vimentina (blanco). (L-O) Superposición de imágenes J-K y M-N, respectivamente. (P-R) Análisis de la zona ventricular utilizando anti-Sox2 (R) superposición de las imágenes P y Q. Los núcleos son visualizados en todas las imágenes en azul con Hoechst. VL: Ventrículo lateral; ZI: Zona Intermedia; SP: superficie pial. Barra escala: 50µm.

Capítulo 3: Estudio del efecto de ácido ascórbico y su transportador SVCT2 en la diferenciación de la glía radial tardía

Como se expuso en la introducción de esta tesis, existen diversas evidencias que han posicionado al ácido ascórbico como una molécula que participa en la diferenciación neurogénica, como también, que contribuye al mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células madre. En este contexto, efectuamos distintos experimentos para determinar la función de la vitamina sobre la diferenciación de la glía radial tardía. Para ello, analizamos el efecto de AA en cultivos enriquecidos de glía radial tardía. Por otro lado, estudiamos *in vitro* la diferenciación de esta célula aislada de ratones heterocigotos *knockout* para SVCT2 (SVCT2^{+/-}) y de ratones transgénicos, que poseen una sobre-expresión del transportador (SVCT2tg). Considerando que los niveles de expresión de SVCT2, a nivel ventricular, son significativamente menores en el día 1 de diferenciación postnatal, (en comparación con el periodo embrionario), se procedió a sobre-expresar SVCT2 en la zona ventricular de ratas de 1 día postnatal.

8. Ácido ascórbico mantiene la radialización de la glía radial tardía *in vitro*

Para determinar el efecto del AA sobre la diferenciación de la glía radial tardía *in vitro*, se generaron cultivos primarios enriquecidos en glía radial tardía, provenientes de la corteza cerebral de rata de 1 día postnatal. Estos cultivos fueron suplementados con concentraciones fisiológicas de AA, 200 μ M o con PBS (control) cada 24 horas, por 7 días. Luego, las células fueron fijadas y se realizaron análisis inmunocitoquímicos con anti-vimentina, para visualizar la morfología celular. Los resultados muestran que los cultivos enriquecidos en glía radial tardía tratados con PBS, se componen principalmente de células con fenotipo astrocítico, observándose escasas células radiales (Figura 26C-D). Interesantemente, los cultivos primarios tratados con AA, presentaron abundantes células con morfología de glía radial, visualizándose claramente células de menor tamaño con finos procesos radiales y núcleos ovalados (Figura 26A-B). Cuantitativamente, los resultados indicaron que los cultivos primarios tratados con AA presentan un porcentaje significativamente mayor de células con

morfología radial ($41,21 \pm 7,95\%$) con respecto al control ($4,48 \pm 0,99\%$) (Figura 26E). Lo anterior, concuerda con el porcentaje de células que presentan procesos, en los cultivos primarios suplementados con AA ($42,14 \pm 8,49\%$) en comparación al control ($3,57 \pm 1,80\%$) (Figura 26F). Interesantemente, el largo de los procesos, en los cultivos tratados con AA, fue $60,88 \pm 3,94 \mu\text{m}$, aproximadamente una longitud 1.7 veces mayor que lo observado en el control, el cual presentaba procesos de $35,63 \pm 4,47 \mu\text{m}$ (Figura 26H). Finalmente, al promediar la superficie celular de todas las células cuantificadas, se obtuvo que en el cultivo primario tratado con PBS, las células presentan un área promedio de $702,6 \pm 53,2 \mu\text{m}^2$, el cual es significativamente mayor con respecto al tratado con AA, con un valor de $456,6 \pm 33,7 \mu\text{m}^2$ (Figura 26G). Lo anterior coincide con el porcentaje de células astrocíticas presentes en el cultivo control, el cual correspondió al $95,52 \pm 0,99\%$, siendo significativamente mayor que en los cultivos primarios tratados con AA ($58,79 \pm 7,95\%$) (Figura 26E).



9. Los niveles de SVCT2 regulan la radialización y diferenciación de la glía radial tardía *in vitro*.

Con respecto a ratones *wild type*, los ratones SVCT2^{+/-} y SVCT2tg presentan niveles significativamente disminuidos y aumentados del ARNm de SVCT2 y, en consecuencia, mayores y menores niveles de ácido ascórbico, respectivamente (Sotiriou et al. 2002, Harrison et al. 2012). Bajo este contexto, para evaluar el efecto de los distintos niveles de SVCT2 en la diferenciación de la glía radial tardía, realizamos cultivos primarios enriquecidos en glía radial. Estos cultivos fueron realizados con la corteza cerebral de ratones SVCT2^{+/-}, SVCT2tg y ratones SVCT2-*wild type* de 1 día postnatal. Luego de 4 y 7 días *in vitro*, las células fueron fijadas y analizadas mediante inmunohistoquímica, con el marcador vimentina, de tal manera de visualizar la morfología celular. Para determinar si existen diferencias significativas, cada condición se comparó con respecto al cultivo primario SVCT2-*wild type*. Luego de 4 días *in vitro*, los cultivos primarios provenientes de

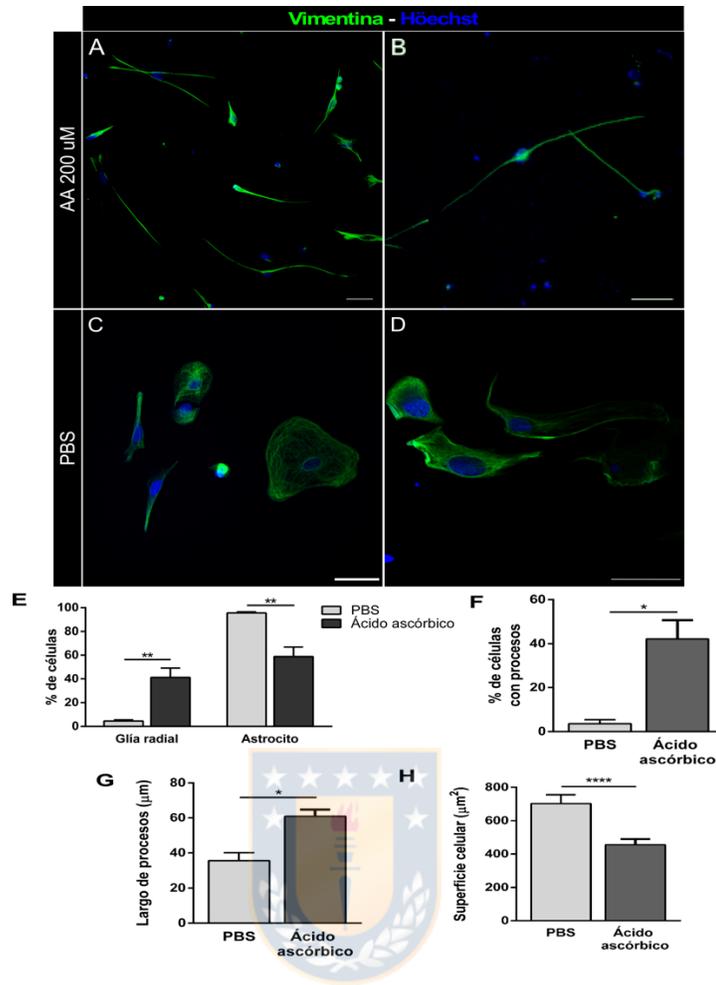


Figura 26. Ácido ascórbico posee un efecto radializante en la glía radial tardía *in vitro*

(A-D) Imágenes de microscopía confocal espectral de inmunocitoquímica de cultivos primarios enriquecidos en glía radial tardía de cerebros de ratas de 1 día postnatal. Se observa la morfología celular con vimentina (verde) y los núcleos celulares con Hóechst (azul). (A-B) Cultivo primario enriquecido en glía radial tardía tratado por 7 días con ácido ascórbico cada 24 horas. (C-D) Cultivo primario enriquecido en glía radial tardía tratado por 7 días con PBS cada 24 horas. (E-H) Análisis cuantitativo del porcentaje de células con fenotipo de glía radial y astrocítica (E), porcentaje de células que exhiben procesos (F), promedio de la superficie celular (G) y largo de procesos (H) presentes en los cultivos tratados con AA y PBS. n=3 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001). Barra escala: 50μm. AA: Ácido ascórbico.

ratones *wild type* presentaron tanto células con morfología radial ($54,98 \pm 7,44 \%$), como astrocítica ($45,01 \pm 7,44\%$) (Figura 27A y 27D). Interesantemente, en los cultivos primarios obtenidos desde cerebros SVCT2^{+/-}, el porcentaje de astrocitos aumentó considerablemente ($98,08 \pm 1,39\%$) y disminuyó significativamente el porcentaje de células de glía radial tardía ($1,93 \pm 1,39\%$) (Figura 27B y 27D). Sorprendentemente, al analizar la composición del cultivo primario obtenido desde cerebros SVCT2tg, las células que se encuentran mayormente presentes corresponden a glía radial tardía ($84,67 \pm 3,73\%$) y en menor medida a astrocitos ($15,33 \pm 3,73\%$) (Figura 27C y 27D). Al realizar análisis cuantitativos del porcentaje de células que presentan procesos, en cada una de las condiciones, se obtuvo que en el cultivo primario *wild type*, un $50,52 \pm 6,15\%$ de las células presentaron procesos (Figura 27E), mientras que en los cultivos SVCT2^{-/-}, las células con procesos disminuyeron significativamente, encontrándose sólo un $1,93 \pm 1,39\%$ (Figura 27E). En contraparte, en los cultivos primarios SVCT2tg, las células con procesos aumentaron significativamente a $81,13 \pm 3,17\%$ (Figura 27E). De manera destacable, la longitud de los procesos de las células de los ratones SVCT2tg fue de $84,21 \pm 3,44 \mu\text{m}$, con una longitud 2.1 veces mayor con respecto a las células aisladas de los animales *wild type* ($39,69 \pm 1,38 \mu\text{m}$) (Figura 26G). Además, al determinar el área promedio que presentan las células que componen en cultivo primario SVCT2^{+/-}, se obtuvo que presentaron $457,6 \pm 28,7 \mu\text{m}^2$, siendo significativamente mayor para el cultivo control, con un valor de $194,3 \pm 10,1 \mu\text{m}^2$ (Figura 27F) mientras que las células presentes en el cultivo SVCT2tg $310,0 \pm 21,3 \mu\text{m}^2$

Interesantemente, al analizar los cultivos primarios enriquecidos en glía radial tardía a los 7 días *in vitro*, se observó que los cultivos provenientes de cerebros *wild type* y SVCT2^{+/-} presentaban un 100% de células con fenotipo astrocítico (figura 28A-B y 28D) y no exhibían células con procesos (Figura 28E). Además, al cuantificar el promedio de la superficie que presentan las células, se obtuvo que los cultivos SVCT2^{+/-} están compuestos por células de aproximadamente $1.133,0 \pm 51,8 \mu\text{m}^2$, lo cual es significativamente mayor que el área que presentan las células del cultivo primario proveniente de cerebros *wild type*; $756,3 \pm 127,1 \mu\text{m}^2$ (Figura 28F). Lo anterior, sugiere que las células que componen estos cultivos son principalmente astrocitos y, los que se encuentran presentes

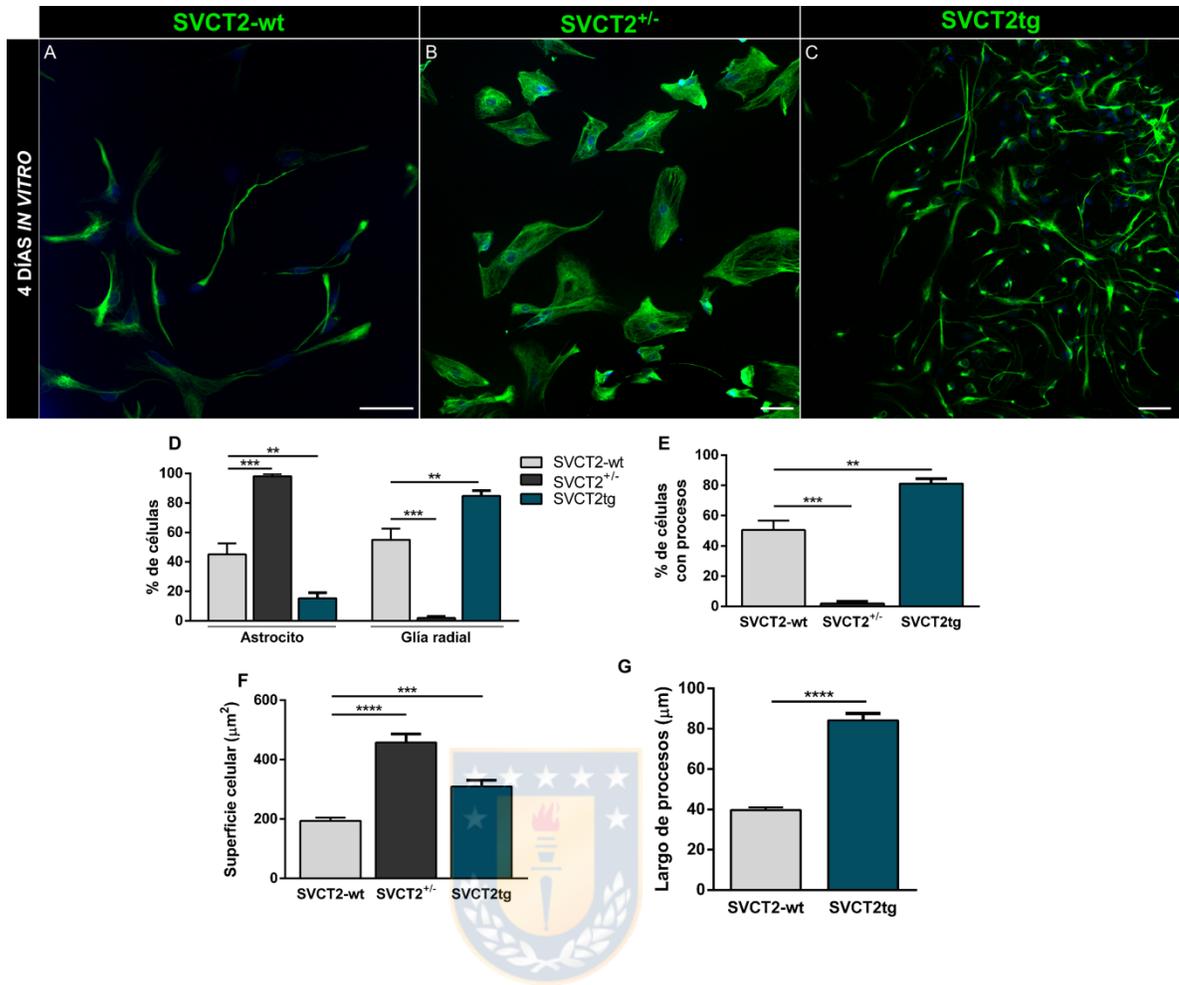


Figura 27. Los niveles de SVCT2 regulan la diferenciación de la glía radial tardía *in vitro*.

(A-C) Análisis de inmunocitoquímica mediante microscopía confocal espectral de cultivos primarios enriquecidos en glía radial tardía de 4 días *in vitro* obtenida de la corteza cerebral de 1 día postnatal de ratones *wild type* (A), *knockout* heterocigotos para SVCT2 (B) y SVCT2tg (C). Los procesos celulares se observan con vimentina (verde) y los núcleos con Hóechst (azul). (D-F) Análisis cuantitativo (n=3) de los cultivos primarios enriquecidos en glía radial tardía proveniente de ratones *wild type*, SVCT2^{+/-} y SVCT2tg. Porcentaje de células con fenotipo astrocítico y de glía radial (D), porcentaje de células que presentan procesos (E) y promedio de la superficie celular (F). (G) Análisis comparativo del largo promedio de los procesos presentes en los cultivos primario enriquecidos en glía radial tardía proveniente de ratones *wild type* y SVCT2tg. Barra escala: 50 μm. n=3

en los cultivos SVCT2^{+/-} (al ser de un mayor tamaño) exhiben un grado de diferenciación más avanzada que los astrocitos del cultivo control. Por otro lado, las células que componen el cultivo primario enriquecido en glía radial tardía, proveniente de cerebros de ratones SVCT2tg, mostraron que el $79,35 \pm 5,63\%$ de las células presentan un fenotipo de radializado (Figura 28D), lo cual concuerda con el número de células que exhiben procesos; $77,97 \pm 6,27\%$ (Figura 28E). Sorprendentemente, estos procesos presentan un promedio de $173,7 \pm 6,27 \mu\text{m}$, lo cual es de una longitud 1.6 veces mayor que los observados a los 4 días *in vitro* ($84,21 \pm 3,44 \mu\text{m}$). Finalmente, el promedio de la superficie celular de este cultivo primario es de $427,7 \pm 43,3 \mu\text{m}^2$ (Figura 28F), siendo significativamente menor que la superficie celular de las células que componen el cultivo primario proveniente de cerebros de ratones *wild type*. Lo anterior, sugiere que las células que componen el cultivo primario SVCT2tg corresponden principalmente a glía radial tardía y a astrocitos en etapas iniciales de maduración.



10. La electroporación *in vivo* permite la sobre-expresión de proteínas en células del ventrículo lateral.

Para evaluar los efectos de la sobre-expresión de SVCT2 en la diferenciación de la glía radial *in vivo*, se intentó generar un adenovirus asociado serotipo IV (pAAV-IV). Para este efecto, se procedió a realizar la digestión enzimática del vector adenoviral con las enzimas SnaBI y BsrGI obteniendo un producto de 3798 pares de bases (Figura 29A). Del mismo modo, se realizó la digestión enzimática del vector pEYFP-N1/SVCT2 obteniendo un producto de alrededor de 3000 pares de bases (Figura 29A). Posteriormente, se realizó la extracción y purificación de los productos de la digestión, obteniéndose ambas bandas del tamaño correspondiente para cada vector (Figura 29B). Luego, se efectuó la reacción de ligación y el producto fue transformado en bacterias *E.coli*. Se analizó si poseían el inserto de SVCT2, mediante reacción de PCR con partidores específicos, los que deberían generar un producto de 512 pares de bases (Figura 29C). Luego de múltiples intentos con diferentes protocolos de ligación y de análisis por PCR de variadas colonias, se observaron dos clones

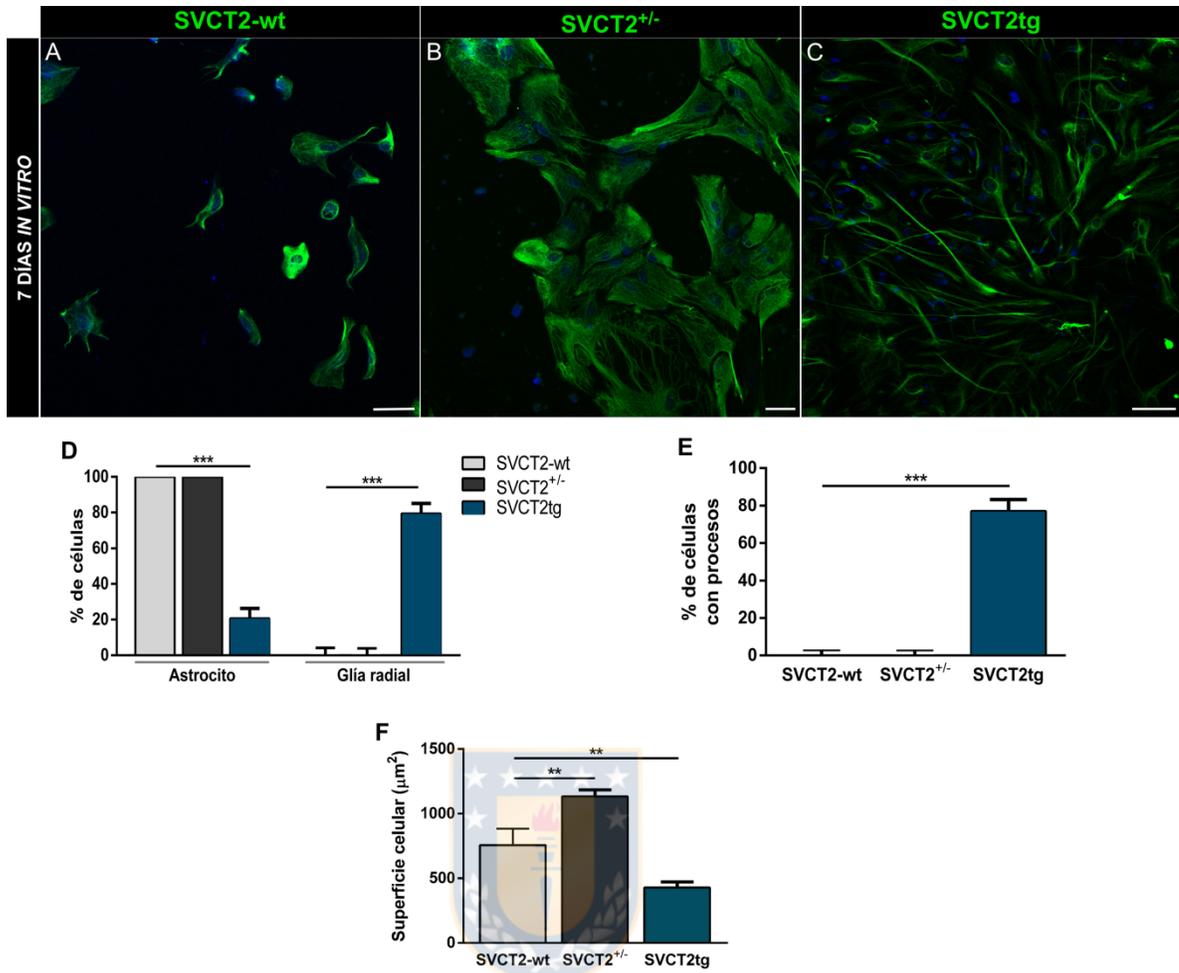


Figura 28. Altos niveles de SVCT2 mantienen e intensifican la radialización de la glía radial tardía *in vitro*.

(A-C) Análisis de microscopía confocal espectral de inmunocitoquímica de cultivos primarios enriquecidos en glía radial tardía de 7 días *in vitro* obtenida de la corteza cerebral de 1 día postnatal de ratones *wild type*(A), *knockout* heterocigotos SVCT2^{+/-} (B) y transgénicos, SVCT2tg (C). Los procesos celulares se observan con vimentina (verde) y los núcleos con Hóechst (azul). (D-F) Análisis cuantitativo de los cultivos primario enriquecidos en glía radial tardía proveniente de ratones *wild type*, SVCT2^{+/-} y SVCT2tg. Se determinó porcentaje de células con fenotipo astrocítico y de glía radial que componen los cultivos primarios (D), porcentaje de células que presentan procesos (E) y promedio de la superficie celular (F). Barra escala: 50 µm.

que presentan el subclonamiento de SVCT2 en el vector pAAV. Sin embargo, al realizar el alineamiento de la secuenciación obtenida, se obtuvo que el inserto no correspondía a SVCT2. Concluimos que el inserto de SVCT2 es de un tamaño superior a lo recomendado para ser incorporado en el pAAV. Esto nos llevó a cambiar la aproximación experimental, utilizando la electroporación como metodología para sobre-expresar SVCT2 a nivel ventricular. Para ello, se realizó una única inyección intracerebro ventricular de un plásmido control que codifica para el gen reportero eYFP en ratas de 1 día postnatal, realizándose la estandarización de los parámetros de voltaje y concentración de ADN (Tabla 3). Dado que en los resultados se mostrarán las células electroporadas en verde, será rotulado como eGFP.

Tabla 4. Parámetros utilizados para la estandarización de la electroporación intraventricular de ratas de 1 día postnatal.

Nº de animales electroporados	Voltaje	Concentración de ADN	Nivel de células electroporadas
3	150V	4ug	No hubo sobrevivencia
3	150V	2ug	+
3	125V	4ug	++
3	125V	2ug	+
3	110V	4ug	+++
4	110V	2ug	+

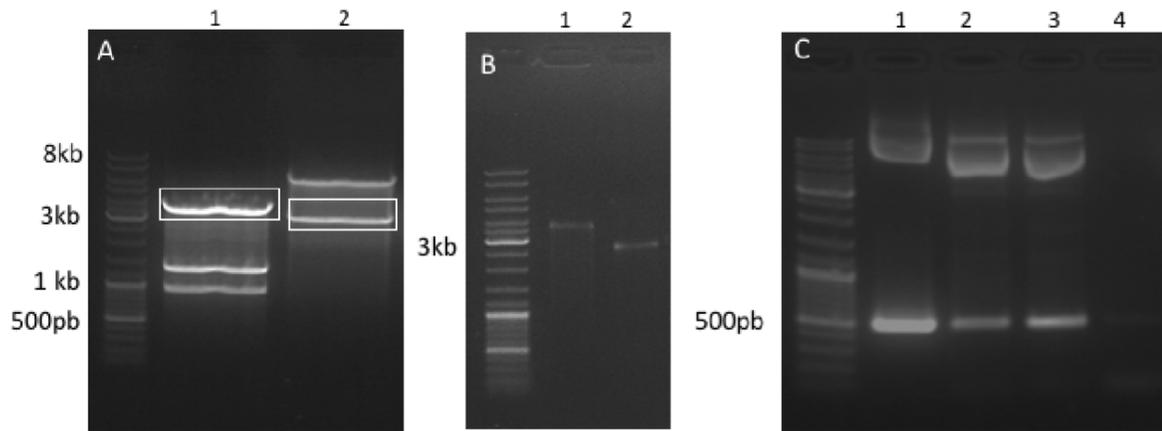
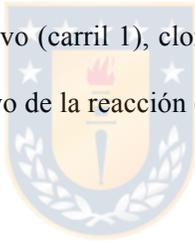


Figura 29. Análisis del subclonamiento de SVCT2 en el vector pAAV.

(A) Digestión enzimática con las enzimas SnaBI y BsrGI del vector pAAV (carril 1) que genera un producto de 3798 pb y del vector pEYFP-N1/SVCT2 (carril 2) con un producto de aproximadamente 2.938 pb. (B) Productos de las digestiones enzimáticas de A purificados. (C) PCR convencional para SVCT2, control positivo (carril 1), clones con el inserto obtenido de la reacción de ligación (carril 2 y 3) y control negativo de la reacción (carril 4).



Se analizaron los cerebros mediante microscopía de fluorescencia, 4 días post-electroporación. Al inyectar intraventricularmente el plásmido control-eGFP, en ratas de 1 día postnatal, y electroporar utilizando 110V y 4ug de ADN se observaron células positivas a eGFP que presentaban morfología de glía radial (Figura 30). Tal como era esperado, se distinguieron los cuerpos celulares en la ZV y ZSV (Figura 30B, 30E-G- flechas) del ventrículo lateral, desde los cuales se extienden finos procesos que se distribuyen por la corteza cerebral (Figura 30C-D), alcanzando la superficie pial a través del pie terminal (flechas Figura 30C-D). En consecuencia, esta aproximación experimental es adecuada y permite la sobre-expresión de proteínas a nivel ventricular.

11. La sobre-expresión de SVCT2 *in vivo*, conlleva a la diferenciación de la glía radial tardía en células con morfología redondeada, migratorias y positivas para marcadores neuronales.

Con el objetivo de generar la sobre-expresión de SVCT2 y con ello, incrementar la incorporación de ácido ascórbico en la glía radial tardía, se inyectó el plásmido que codifica para SVCT2-eGFP intraventricularmente, para posteriormente, realizar la electroporación de ratas de 1 día. Interesantemente, luego de 4 días post-electroporación, las células SVCT2-eGFP-positivas no presentaron una morfología de la glía radial, sino que exhibieron una morfología celular redondeada (Figura 31). De manera sorprendente, se visualizó la gran mayoría de las células localizadas en distintas capas de la corteza cerebral y escasas células en la zona ventricular y subventricular (Figura 31A-C). Además, algunas de estas células SVCT2-eGFP-positivas se observaron de manera agrupada en la corteza cerebral (Figura 31B). Los resultados sugieren que las células electroporadas migraron desde la zona ventricular y subventricular, hacia distintas capas de la corteza cerebral. Para determinar lo anterior, se procedió a cuantificar el número de cuerpos celulares localizados en la zona ventricular/subventricular y las células ubicadas en la zona intermedia. Los resultados mostraron que luego de 4 días post-electroporación con el plásmido control-eGFP, 560 células (83,11%) de 698 células eGFP-positivas cuantificadas, se localizaron en la zona ventricular/subventricular. Solamente 138 células (16,89%) se observaron en la zona intermedia. Interesantemente, estos valores se invierten

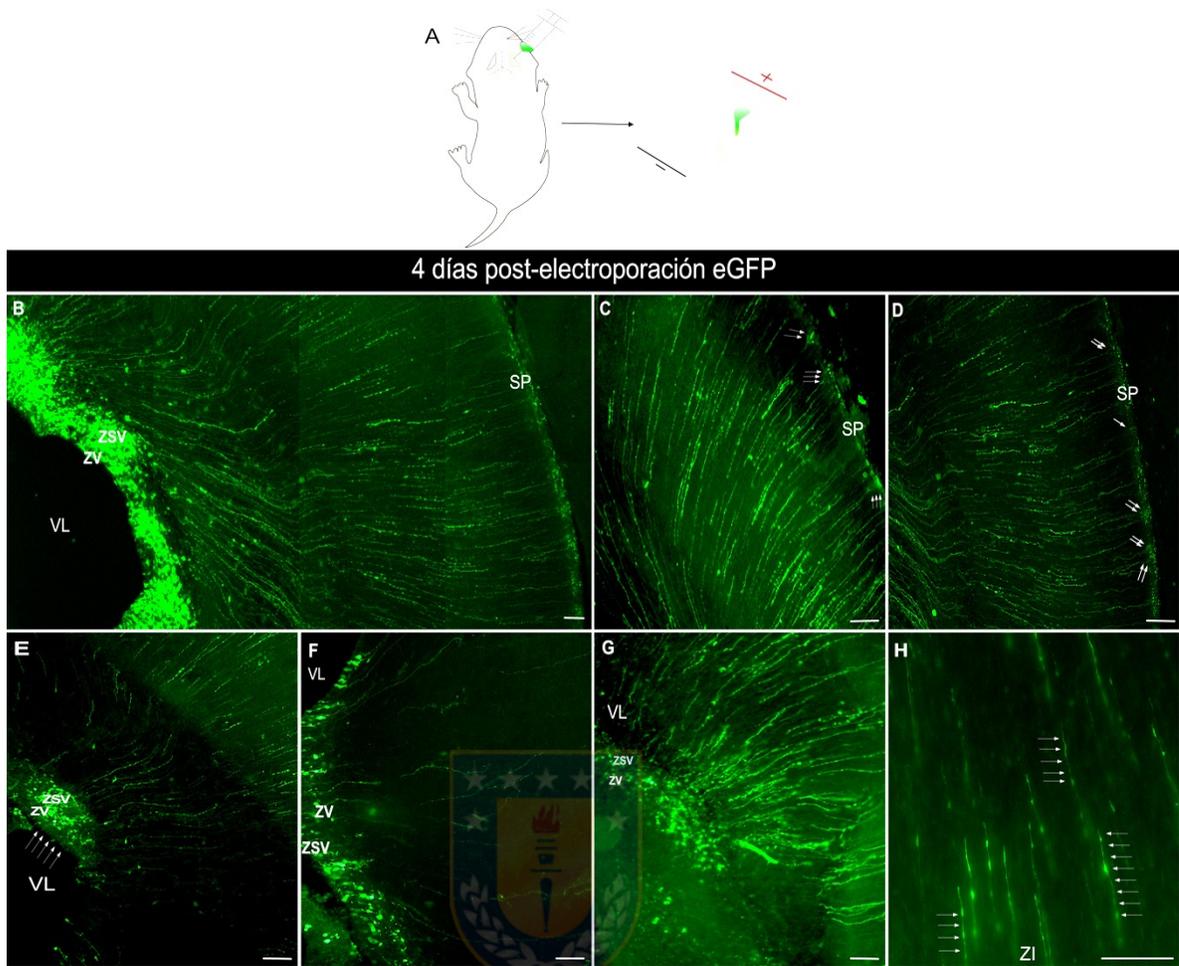


Figura 30. Electroporación intracerebro ventricular con plásmido control-eGFP, muestra células de morfología radial.

(A) Representación esquemática de la electroporación intraventricular de ratas de 1 día postnatal. (B-H) Análisis de cortes frontales de ratas de 5 días postnatales electroporadas intraventricularmente con el plásmido-eGFP, al día 1 postnatal. (B) Tile-Scan de la corteza cerebral. (C-D) Imagen de mayor aumento de la corteza cerebral, las flechas indican la localización de los pies terminales de la glía radial tardía. Imágenes de la zona dorsal (E), lateral-ventral (F) y ventral (G), del ventrículo lateral. (H) Imagen de la zona intermedia de la corteza cerebral, flechas indican algunos de estos procesos. ZV: Zona Ventricular; ZSV: Zona Subventricular; SP: Superficie Pial. Barra escala: 50 μ m.

al analizar la cuantificación de la electroporación con SVCT2-eGFP, donde 273 (80,23%) células se localizaron en la zona intermedia y 123 células (19,77%) en la región ventricular y subventricular, de un total de 396 células cuantificadas.

Para comprobar si estas células SVCT2-eGFP-positivas migran desde de la zona ventricular y subventricular, se realizaron análisis a distintos tiempos post-electroporación. Todos los animales fueron electroporados en el estadio de 1 día postnatal y se analizaron las células SVCT2-eGFP positivas mediante microscopía confocal espectral luego de 1, 2, 3 y 7 días post-electroporación. Los resultados indicaron que luego de 1 día post-electroporación, las células SVCT2-eGFP se localizaron principalmente en la zona ventricular/subventricular del ventrículo lateral (Figura 32A). Interesantemente, posterior a 2 días post-electroporación, la mayoría de las células SVCT2-eGFP se visualizaron en la zona intermedia y escasas células en la zona ventricular/subventricular (Figura 32B). Además, al observar 3 días post-electroporación, las células SVCT2-eGFP se distinguieron en una región más superficial de la zona intermedia (Figura 32C). En estadios posteriores, después de 7 días post-electroporación, se observan células SVCT2-eGFP en la corteza cerebral externa y no se visualizaron células SVCT2-eGFP positivas en la zona ventricular-subventricular, ni en la zona intermedia de la corteza cerebral (Figura 32D y 32D'). Por otro lado, la morfología que presentan las células control-eGFP es de glía radial. Este fenotipo se observó en las células eGFP positivas en todos los estadios post-electroporación analizados; se visualizaron los cuerpos celulares localizados principalmente en los ventrículos laterales (Figura 32E-G) y procesos radiales (Figura 32E-H) extendidos hacia la superficie pial.

El evidente cambio morfológico presentado por las células que sobre-expresan SVCT2, en comparación al control, nos llevó a analizar la identidad de las células SVCT2-eGFP positivas mediante inmunohistoquímica. Primero, se corroboró la co-localización de las células SVCT2-eGFP positivas, con el anticuerpo anti-SVCT2. Para ello, se utilizaron cerebros de 2 días post-electroporación con el plásmido SVCT2-eGFP y se realizó inmunohistoquímica con el anticuerpo

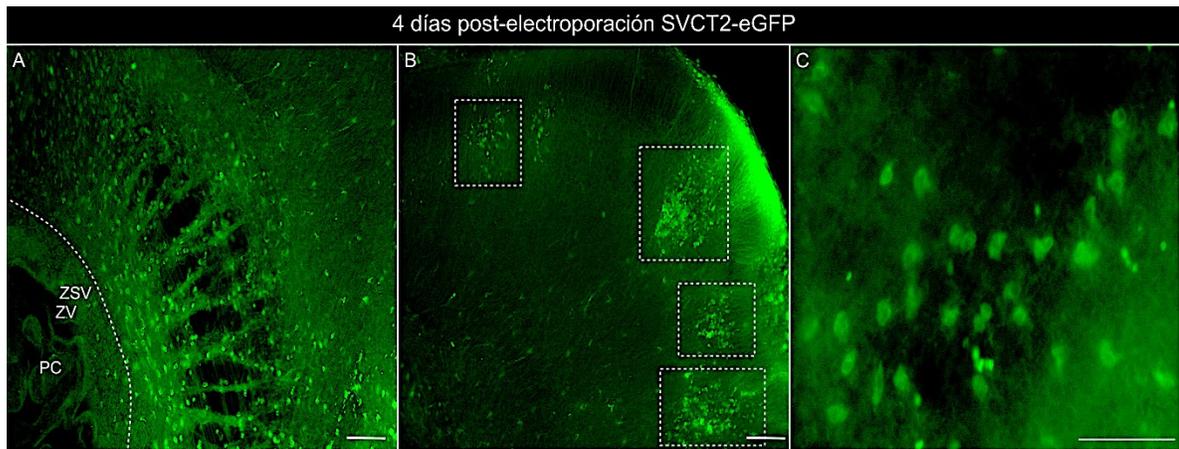


Figura 30. Células electroporadas que incorporan SVCT2-eGFP exhiben una morfología redondeada, localizadas en distintas regiones de la corteza cerebral.

(A-C) Análisis mediante microscopía de epifluorescencia de ratas de 5 días postnatales, electroporadas intraventricularmente con el plásmido-SVCT2-eGFP (verde) al día 1 postnatal. (A) Imagen de la region ventricular y de parte de la corteza cerebral. Línea blanca punteada delimita la zona ventricular y subventricular. (B) Imagen de la región cerebral externa. Recuadros indican células agrupadas. (C) Imagen de mayor aumento, donde se distingue la morfología de las células SVCT2-eGFP positivas. ZV: Zona Ventricular; ZSV: Zona subventricular; PC: Plexos Coroideos. Barra escala: 50 μ m.

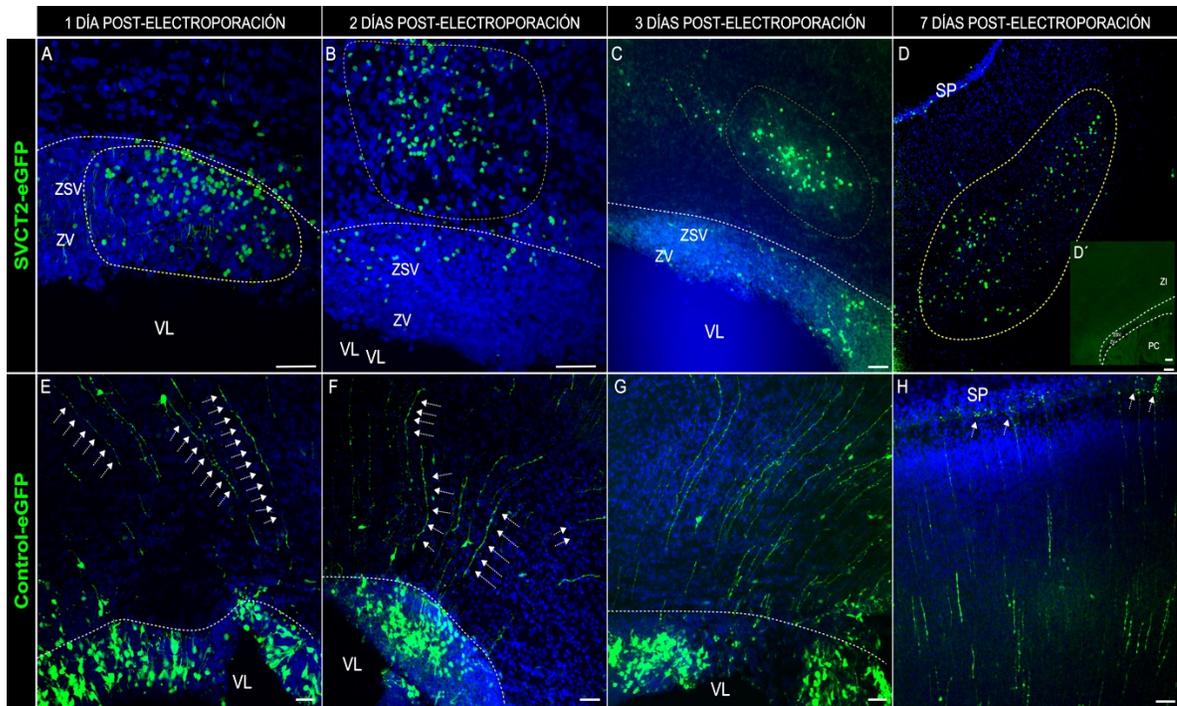


Figura 31. La sobre-expresión de SVCT2 genera la migración de células desde la zona ventricular/subventricular hacia la corteza cortical externa.

(A-H) Imágenes de microscopía confocal espectral donde se observan células sobre-expresando SVCT2-eGFP (A-D) o eGFP (E-H). Los núcleos se visualizan con H \ddot{o} chst (azul). (A) La regi \ddot{o} n demarcada en amarillo destaca las células localizadas en la ZV/ZSV, 1 día post-electroporación. (B-C) 2 y 3 días post-electroporación, respectivamente, se demarcaron en amarillo células en la zona intermedia de la corteza cerebral (círculo amarillo). (D) Luego de 7 días post-electroporación las células se localizan en capas más superficiales de la corteza cerebral (región en amarillo). (D') Imagen de la ZV/ZSV y la zona intermedia. (E-H) Cuerpos celulares ubicados en la ZV/ZSV del ventrículo lateral y procesos radiales (flechas), se distinguen en 1 día (E), 2 días (F) y 3 días post-electroporación(G). (H) Procesos radiales presentes en la corteza cerebral. Pies terminales de la glía radial tardía son señalizados con flechas. En todas las imágenes, se delimitó la zona ventricular y subventricular con línea blanca punteada. SP: Superficie Pial; VL: Ventrículo Lateral; ZV: Zona Ventricular; ZSV: Zona Subventricular; PC: Plexos Coroideos; SP: Superficie Pial. Barra escala: 50 μ m.

anti-SVCT2. Tal como era esperado, se observó una alta co-localización (Figura 33J-L, 33i-iii). Al realizar el análisis cuantitativo (n=3), se determinó que $97,03 \pm 1,94\%$ células SVCT2-eGFP positivas co-localizaron con el anticuerpo anti-SVCT2 (Figura 33M). Además, como control positivo, se realizó inmunohistoquímica para SVCT2 en cerebros electroporados con el plásmido control eGFP. Se observó una alta inmunotinción de SVCT2 en la zona ventricular y subventricular, co-localizando con los cuerpos celulares de la glía radial tardía, como también, un marcaje positivo en la zona intermedia cortical (Figura 33G-I). En un segundo análisis, se realizó la inyección intracerebro-ventricular de BrdU en conjunto con el plásmido SVCT2-eGFP, en ratas de 1 día postnatal, seguido de la electroporación. Luego de 3 días post-electroporación, se realizó inmunohistoquímica anti-BrdU y posteriormente, el análisis cuantitativo del porcentaje de co-localización. Nuevamente, se observó una evidente co-localización entre las células SVCT2-eGFP y BrdU (Figura 33A-F). Al realizar el análisis cuantitativo, se obtuvo que $81,76 \pm 10,43\%$ de las células SVCT2-eGFP presentan co-localización con anti-BrdU (Figura 33M). En consecuencia, lo anterior sugiere que la mayoría de las células SVCT2-eGFP proceden de células proliferativas - glía radial tardía- y/o son células que se encuentran proliferando.

Por otro lado, se procedió a realizar inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo de glía radial, anti-3-PGDH. Las células SVCT2-eGFP positivas presentaron una co-localización prácticamente nula con el anticuerpo anti-3-PGDH (Figura 34A-C). Al realizar los análisis cuantitativos (n=3), se determinó que las células SVCT2-eGFP y 3-PGDH positivas poseían un porcentaje de $3,58 \pm 2,62\%$ de co-localización (Figura 33G). En contraparte, las células electroporadas con el plásmido control eGFP presentaron una co-localización de $90,47 \pm 2,02\%$. Lo anterior, sugiere que las células eGFP positivas observadas corresponden a glía radial tardía mientras que las células SVCT2-eGFP no comparten la morfología de glía radial, ni co-localización con el marcador 3-PGDH. Los resultados obtenidos hasta el momento; la morfología redondeada, la alta

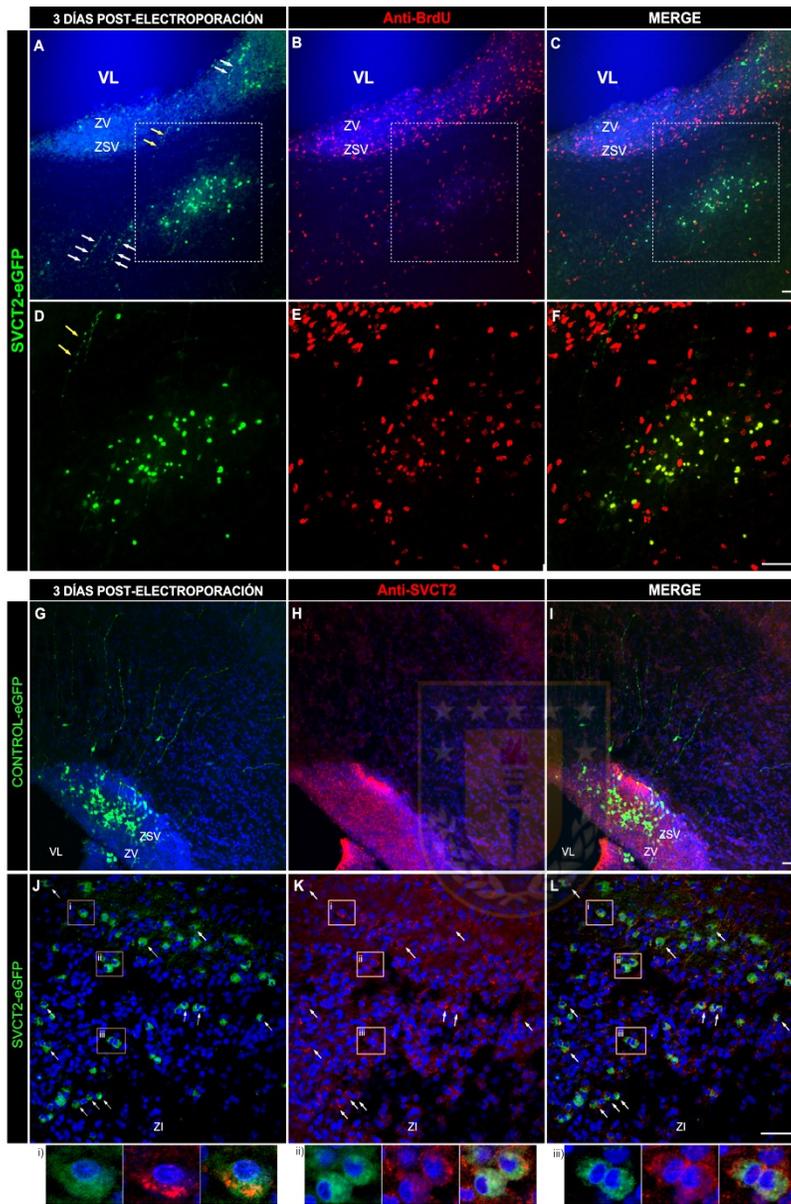


Figura 32. Células que sobre-expresan SVCT2-eGFP co-localizan con BrdU.

(A-F) Análisis de microscopía confocal espectral de cortes frontales de cerebros inyectados intraventricularmente con BrdU y con el plásmido SVCT2-eGFP, en estadio de 1 día postnatal y analizados 2 días post-electroporación. (A) Células SVCT2-eGFP positivas se observan en verde. Procesos celulares son indicados con flechas. (B) Células BrdU positivas se distinguen en rojo. (C) Superposición de imágenes (A) y (B). (D-F) Imágenes aumentadas del recuadro (A-C), respectivamente. (G-I) Análisis de microscopía confocal espectral de cerebros electroporados con el plásmido control eGFP. (G) Cuerpos celulares y procesos positivos a eGFP se distinguen en verde. (H) Inmunotinción positiva para SVCT2 se observa en rojo. (I) Superposición de imágenes (G) y (H). (J-L) Análisis de microscopía confocal espectral de cerebros electroporados con el plásmido control SVCT2-eGFP. (J) Células SVCT2-eGFP son visualizadas en la zona intermedia de la corteza cerebral. (K) Inmunorreacción para SVCT2. (L) Superposición de las imágenes (J) y (K). Flechas y recuadros indican algunas células SVCT2-eGFP y SVCT2 positivas que co-localizan (i-iii). Imágenes aumentadas de los recuadros en (J-K). Los núcleos se observan con H \ddot{o} chst en azul. (M) Análisis cuantitativo de co-localización de células SVCT2-eGFP con BrdU y SVCT2, respectivamente. VL: Ventrículo Lateral; ZV: Zona Ventricular; ZSV: Zona Subventricular; ZI: Zona Intermedia. Barra escala: 50 μ m.

co-localización entre las células SVCT2-eGFP con BrdU y la escasa co-localización con 3-PGDH, sería un indicativo que estas células correspondan a progenitores intermediarios (PI).

Los PIs se caracterizan por presentar una morfología esférica, ser células altamente proliferativas, encontrarse localizados principalmente en la ZSV y generar únicamente neuronas (Hevner 2019). Para determinar si las células SVCT2-eGFP corresponden a PIs, se realizó inmunohistoquímica con el anticuerpo Tbr2, un factor de transcripción que se encuentra presente exclusivamente en los PIs. Se analizó la ZV, ZSV y la región interna de la zona intermedia. Se observó la inmunotinción positiva para Tbr2, acotada principalmente a la zona ventricular y subventricular (Figura 34B y 34E) y a la existencia de células SVCT2-eGFP positivas, que co-localizaron con el marcaje de Tbr2 (Figura 34A-F). Al realizar los análisis cuantitativos (n=3), se obtuvo que el $58,21 \pm 1,71\%$ de las células SVCT2-eGFP co-localizan con Tbr2 (Figura 34O). Sin embargo, en las distintas capas de la corteza cerebral no existe marcaje positivo para Tbr2, ya que los PIs no se localizan en estas zonas. Por lo tanto, dado que Tbr2 presenta un linaje neuronal y, que algunas células SVCT2-eGFP de la zona ventricular, subventricular y de la región interna de la zona intermedia co-localizan con este, hipotetizamos que las células SVCT2-eGFP que migraron a las distintas capas de la corteza cerebral correspondan a neuronas inmaduras. Para determinar lo anterior, se procedió a realizar análisis inmunohistoquímicos utilizando el anticuerpo doblecortina (DCX), una proteína asociada a los microtúbulos expresada en las neuronas migratorias (Gleeson et al. 1999). Además, con el objetivo de descartar que las células que sobre-expresan SVCT2 presenten un linaje astrocítico, se realizó inmunohistoquímica con el marcador astrocitos, GFAP. Los resultados mostraron que existió una evidente co-localización entre las células SVCT2-eGFP positivas, ubicadas en la corteza cerebral externa, luego de 7 días post-electroporación, con el marcador DCX y una escasa o nula co-localización con el marcador GFAP (Figura 34G-N, 34i-iii). Destacablemente, se determinó cuantitativamente (n=3), que $84,8 \pm 7,18\%$ de células SVCT2-eGFP positivas co-localizaron con DCX (Figura 34O). Finalmente, para descartar de forma precisa que las células SVCT2-eGFP sean de linaje gliogénico, se procedió a realizar inmunohistoquímica con GFAP, en

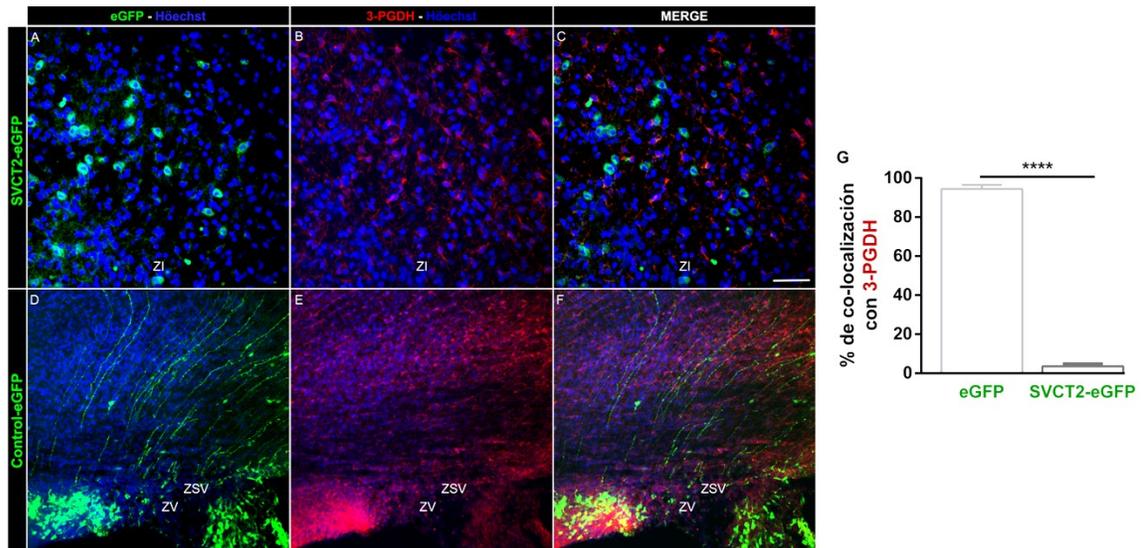


Figura 33. Células sobre-expresando SVCT2-eGFP no colocalizan con el marcador de glía radial 3-PGDH.

(I-L) Imágenes de microscopía confocal de cortes frontales de cerebros de rata electroporados en 1 día postnatal y analizados al estadio de 3 días postnatales. (A-C) Imagen de la zona intermedia donde se distinguen células SVCT2-eGFP positivas (verde, A) y (células positivas a 3-PGDH (rojo, B). (C) Superposición de las imágenes (A) y (B). (D-F) Imagen de la zona ventricular y subventricular, y corteza cerebral, se distinguen las células eGFP positivas (D) e inmunoreacción para 3-PGDH (rojo, D). (F) Superposición de las imágenes (D) y (E). (G) Análisis cuantitativo del porcentaje de co-localización entre células eGFP o SVCT2-eGFP con el marcador 3-PGDH. ZV: Zona Ventricular; ZSV: Zona Subventricular; ZI: Zona Intermedia. Barra escala: 50µm.

cerebros electroporados con el plásmido control eGFP o SVCT2-eGFP y analizado un día post-electroporación. Interesantemente, se visualizaron células eGFP positivas co-localizando con el marcador GFAP (Figura 35D-F), al realizar el análisis cuantitativo se determinó que el $63,77 \pm 3,73\%$ de células co-localizaron con GFAP (Figura 35G). En contraparte, no se observó co-localización entre las células SVCT2-eGFP y GFAP (Figura 35A-C), $0,85 \pm 0,54\%$ células. La recolección de estos datos, proporcionan una fuerte evidencia que la sobre-expresión de SVCT2 en células de la región ventricular, conlleva a la diferenciación de la glía radial tardía hacia un linaje neuronal.

Finalmente, para determinar si los distintos niveles de SVCT2 conducen a un incremento o disminución en marcadores neuronales (NeuN y Tubulina- β III) o astrocíticos (GFAP), se analizaron extractos obtenidos de la corteza de ratones SVCT2wt, SVCT2^{+/-} y SVCT2tg de 1 día postnatal, mediante western blot (Figura 36). De manera interesante, al utilizar el marcador de neuronas maduras, anti-NeuN, se observó que la banda inmunorreactiva de ~50 kDa se encontraba significativamente disminuida en los ratones SVCT2^{+/-} (Figura 36A) mientras que en el grupo SVCT2tg, se observó una intensidad mayor al doble respecto al grupo control (Figura 36C). Este patrón fue invertido cuando se utilizó un anticuerpo anti-GFAP, donde en este caso, la acumulación de la banda inmunorreactiva de ~50 kDa se enriqueció preferentemente en el grupo SVCT2^{+/-}, incrementando significativamente sobre el doble respecto al grupo control (Figura 36D). Por su parte, el grupo SVCT2tg exhibía una disminución significativa de GFAP, respecto a la condición control (Figura 36D). Por último, al analizar los niveles de tubulina- β III, se obtuvo que el grupo SVCT2tg exhibió una acumulación robusta y significativa en la banda inmunorreactiva de ~55 kDa (Figura 37B), cuyos niveles fueron el doble respecto al grupo *wild-type* (Figura 36E). Por su parte, si bien se observó que el grupo SVCT2^{+/-} presentó una menor abundancia en la banda inmunorreactiva de ~55 kDa respecto al control, esta disminución no fue significativa ($p > 0,05$. Prueba t student).

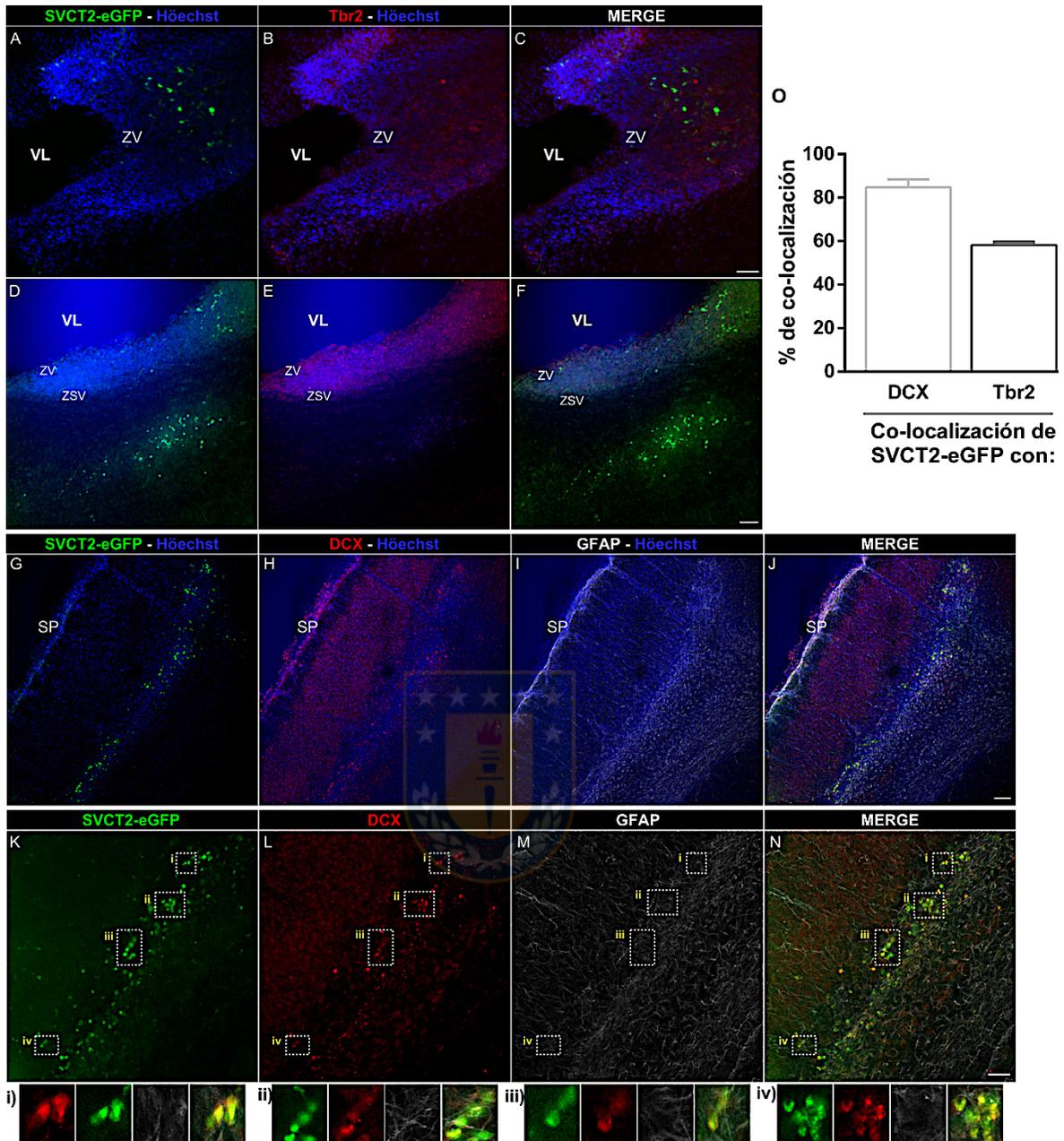


Figura 34. Células que sobre-expresan SVCT2-eGFP co-localizan con el marcador de progenitores intermediarios Tbr2 y el marcador de neuronas migratorias, doblecortina (DCX).

(A-F) Análisis de microscopía confocal espectral de cortes frontales de cerebros de rata electroporados con SVCT2-eGFP en estadio de 1 día postnatal y sacrificado a 2 días postnatales (A-C) y 4 días postnatales (D-F). (A-D) Células SVCT2-eGFP positivas se observan en verde. (B-E) Inmunoreacción para el marcador de progenitores intermediarios, Tbr2 (rojo). (C) Superposición de imágenes (A) y (B). (F) Superposición de imágenes (D) y (E). (G-N) Análisis de microscopía confocal espectral de cortes frontales de cerebros de rata electroporados con SVCT2-eGFP en estadio de 1 día postnatal y observado 7 días post-electroporación. (G) Imagen de la corteza cerebral, se detectan células SVCT2-eGFP. (H) Inmunoreacción para doblecortina en la corteza cerebral (rojo). (I) Inmunorreacción para el marcador de astrocitos, GFAP (blanco). (J) Superposición de las imágenes (G-I). (K-N) Imágenes de mayor aumento de la corteza cerebral externa, se detectan células SVCT2-eGFP (K), neuronas inmaduras con anti-doblecortina (L) y astrocitos con anti-GFAP(M). (N) superposición de las imágenes (K-M). (i-iii) Imágenes ampliadas de los recuadros i-iii de (K-N). (O) Análisis cuantitativo del porcentaje de co-localización entre células SVCT2-eGFP con Tbr2 y doblecortina. VL: Ventrículo Lateral; ZV: Zona Ventricular; SP: Superficie Pial. Barra escala: 50µm.

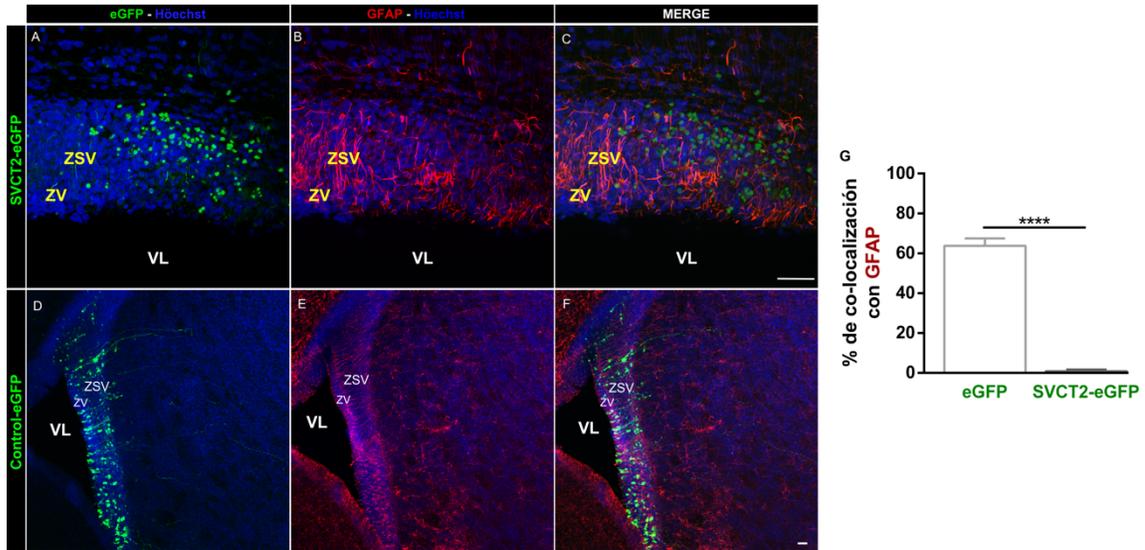


Figura 35. Células sobre-expresando SVCT2-eGFP no colocalizan con marcador astrocítico GFAP.

(A-F) Imágenes de microscopía confocal de cortes frontales de cerebros de rata electroporados en 1 día postnatal y analizados al estadio de 2 días postnatales. (A-C) Imagen de la zona ventricular/subventricular se observan (A) células positivas a SVCT2-eGFP (verde) y (B) los procesos celulares con GFAP (rojo). (C) Superposición de las imágenes (A) y (B). (D-F) Imagen del ventrículo lateral y parte de la corteza cerebral en la cual se visualizan (D) células sobre-expresadas positivas a eGFP (verde) y (E) procesos celulares positivos a GFAP (rojo). (F) Superposición de las imágenes (D) y (E). Todos los núcleos se observan con Hoechst (azul). (G) Análisis cuantitativo del porcentaje de co-localización entre células eGFP o SVCT2-eGFP con el GFAP. VL: Ventrículo lateral; ZV: Zona ventricular; ZSV: Zona subventricular; ZI: Zona intermedia. Barra escala: 50µm.

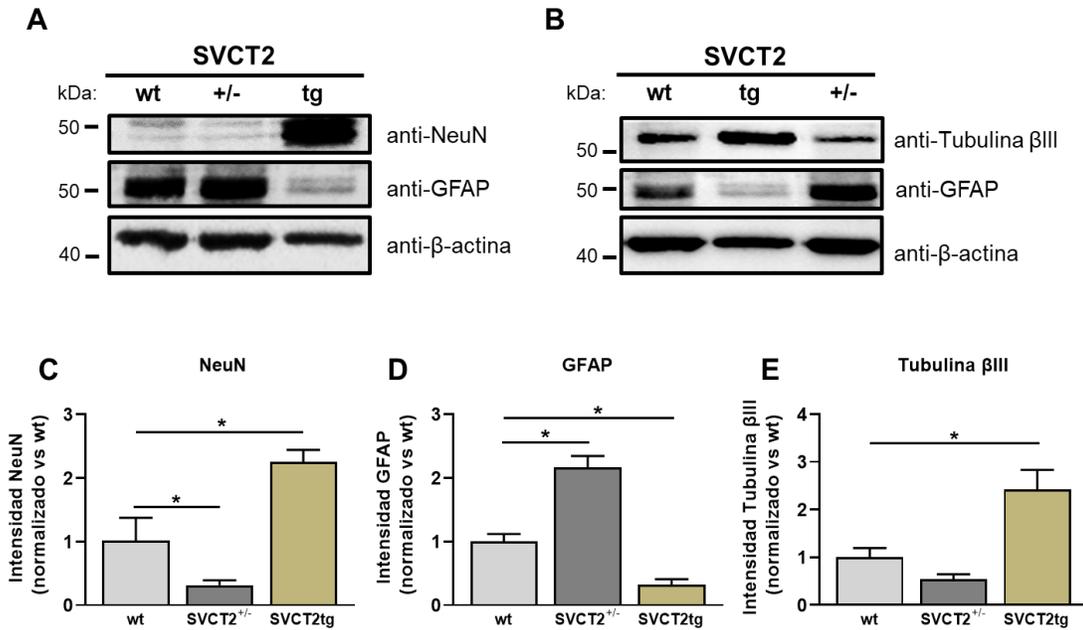


Figura 36. Efecto de los distintos niveles de SVCT2 sobre la abundancia de NeuN, GFAP y Tubulina-βIII en la corteza cerebral.

(A-B) Western blots realizados a extractos proteicos colectados desde la corteza cerebral de animales SVCT2wt, SVCT2^{+/-} o SVCT2tg, de 1 día postnatal. Se utilizaron anticuerpos anti-NeuN, anti-GFAP y tubulina-βIII, cuyos niveles fueron normalizados respecto a β-actina. (C-E) La intensidad de las distintas bandas fue cuantificada mediante ImageJ y normalizada respecto a la intensidad de β-actina, donde posteriormente se graficó como el promedio ± SEM para cada condición. * p < 0,05 al realizar la prueba t de student entre los grupos señalados. n=3.

VI. DISCUSIÓN

La glía radial embrionaria es una célula madre neural fundamental para el desarrollo del SNC, generando una miríada de neuronas y de células gliales que constituirán la corteza cerebral (Balmaceda-Aguilera et al. 2012, Ortiz-Alvarez et al. 2020, Villalba et al. 2021). Conjuntamente, y siendo su función más descrita, actúa como una célula de andamiaje guiando la migración neuronal (Rakic 1972). Notablemente, se ha postulado la existencia de un “remanente” de glía radial embrionaria, denominada glía radial tardía o postnatal, la cual permanece hasta los 15 días en ratones, 21 días en hurones y hasta aproximadamente los 6 meses en humanos (Voigt 1989, Tramontin et al. 2003, Merkle et al. 2004, Sanai et al. 2011). En esta tesis, se realizó una detallada caracterización de la glía radial tardía. Para ello, se emplearon diferentes anticuerpos que han sido utilizados en la detección de proteínas estructurales y enzimas presentes en la glía radial embrionaria (Kriegstein, A. et al. 2009, Nualart, F. et al. 2012, Silva-Alvarez et al. 2016). Con el fin de lograr una óptima detección de las proteínas de interés, fue necesario utilizar diferentes fijadores para preservar diferencialmente los sitios de unión para los anticuerpos (epítomos) y su accesibilidad (Shi, S. R. et al. 2007). Es importante considerar que estudios recientes han generado diferentes controversias respecto a la existencia de neurogénesis hipocampal en humanos adultos (Sorrells et al. 2018, Moreno-Jimenez et al. 2019). El principal punto crítico expuesto por Moreno-Jimenez *et al.*, para explicar por qué el grupo de Álvarez-Buylla concluye que la neurogénesis, en la circunvolución dentada no continúa (Moreno-Jimenez et al. 2019), corresponde a que la visualización de neuronas inmaduras positivas a DCX depende fuertemente del tratamiento histológico y de la metodología de fijación (Sorrells et al. 2018) demostrando, que distintas condiciones de fijación conducen a diferentes resultados (Hoog et al. 1988, Sillevis Smitt et al. 1993, Tu et al. 2011, Rowley et al. 2020). En este estudio, determinamos que paraformaldehído, a diferencia de Bouin, es el mejor fijador que permite observar y analizar la glía radial tardía. Lo anterior puede estar dado por el mecanismo de fijación

particular del paraformaldehído, el cual reacciona principalmente con las aminas primarias de las proteínas, para formar enlaces cruzados conocidos como puentes de metileno (Howat et al. 2014). En contraparte, Bouin, compuesto mayoritariamente por ácido pícrico, genera la fijación del tejido mediante un efecto coagulante sobre las proteínas (Howat et al. 2014). Por lo tanto, es posible que la fijación particular con Bouin, enmascare los epítomos y provoque la pérdida de la inmunoreactividad, indicando de forma errada que la glía radial tardía no se encuentra presente en estadios postnatales.

La glía radial tardía, en términos simples, es un “remanente” de la glía radial embrionaria y por consiguiente, comparten características morfológicas y la expresión de marcadores inmunohistoquímicos (Hartfuss et al. 2001, Tramontin et al. 2003, Merkle et al. 2004, Kriegstein, A. et al. 2009, Sanai et al. 2011). Los resultados obtenidos en esta tesis, sugieren fuertemente que la morfología de las células que residen en los ventrículos laterales postnatales, es análoga a la de la glía radial embrionaria. Nuestros análisis inmunohistoquímicos y ultraestructurales mostraron que esta célula exhibe un cuerpo celular localizado entre la ZV/ZSV, generando una apariencia pseudoestratificada del epitelio ventricular. Además, se observó la presencia de un corto proceso apical que presenta un cilio primario en contacto con el LCR y un largo y fino proceso basal en contacto directo con la superficie pial, a través de un pie terminal. La longitud del proceso basal de la glía radial tardía es destacable, alcanzando hasta más de 1 mm de extensión en los cerebros de rata postnatales. Sin embargo, aunque pudiese parecer una gran longitud, durante el *peak* de la neurogénesis en roedores, la glía radial embrionaria crece aproximadamente al doble en longitud en apenas un par de días; desde 200-300µm en E13-14 a 400-500µm en E15-16 (Miyata et al. 2001, Miyata 2008) y más notable aún, al final del periodo neurogénico, el proceso basal en cerebros de macacos, adquiere entre 3000-7000 µm (Rakic 1972). De esta manera, es una característica del proceso basal alcanzar grandes longitudes, con el fin de mantener el contacto con la superficie basal, a medida que la corteza cerebral aumenta en grosor. Así, continúa actuando como un andamio para la migración de neuronas recién nacidas, recibe señales que regulan el destino celular de la glía radial

(por ejemplo, la vitamina A proveniente de las meninges es captada por el proceso basal conllevando a una diferenciación neurogénica de la glía radial), mantiene la polaridad celular, como también la orientación del plano de escisión y la citocinesis (Kosodo et al. 2009, Siegenthaler et al. 2009). Por otra parte, la caracterización inmunohistoquímica de la glía radial tardía, determinó que esta célula presenta la expresión de Sox2, vimentina, 3-PGDH, nestina y GFAP; las que en conjunto con las características morfológicas detalladas anteriormente, son compartidas con la glía radial temprana (Noctor et al. 2001, Malatesta et al. 2008, Kriegstein, A. et al. 2009, Nualart, F. et al. 2012, Gotz et al. 2016, Silva-Alvarez et al. 2016, Bond et al. 2021), proponiendo que la célula observada a nivel ventricular corresponde a la glía radial tardía. Sin embargo, tal como se discutirá más adelante, al ser la diferenciación un proceso gradual, el número de células de la glía radial tardía va disminuyendo y su morfología va cambiando en el transcurso del desarrollo.

A pesar de lo mencionado anteriormente, aún se podría especular que las células observadas en los ventrículos laterales corresponderían a las células B1, células madres neurales adultas presentes en la pared de los ventrículos laterales (Lois et al. 1994, Doetsch et al. 1999). Las células B1 se generan a partir de la glía radial embrionaria (Merkle et al. 2004, Mirzadeh et al. 2008, Fuentealba et al. 2015) y comparten características con su antecesora, tales como la retención de la polaridad apico-basal, la expresión de marcadores gliales y de células madre (GFAP, Sox2 y nestina), como también una morfología radial presentando un proceso apical con un cilio primario que tiene contacto con el ventrículo y un elongado proceso basal (Zhang, J. et al. 2015, Falk et al. 2017). Sin embargo, existen claras diferencias con la glía radial tardía. En este sentido, los procesos basales de las células B1 no tienen contacto con la superficie pial, sino que su pie terminal se encuentra en estrecho contacto con los vasos sanguíneos (Tavazoie et al. 2008) o con la matriz extracelular que los rodea (Kerever et al. 2007). Además, su cuerpo celular se encuentra localizado exclusivamente en la ZSV (Mirzadeh et al. 2008). Por otro lado, las células B1 no expresan 3-PGDH ni vimentina. Finalmente, se ha determinado en el cerebro de la rata, que el nicho neurogénico se encuentra estructuralmente organizado a los 15

días de desarrollo postnatal (Pastor et al. 2013), donde recién se puede detectar a las células B1 diferenciadas en los ventrículos laterales.

Mediante microscopía electrónica de transmisión, se demostró que más de un 90% de las células que residen en las paredes ventriculares laterales (ratones recién nacidos) corresponden a glía radial tardía, porcentaje que disminuye luego de una semana de vida (65,1%) para finalmente desaparecer a los 15 días de desarrollo postnatal (Tramontin et al. 2003). En este contexto, nuestros resultados concuerdan con la existencia postnatal de una abundante población de células de la glía radial tardía, específicamente, entre el primer y cuarto día, la cual disminuye notablemente conforme transcurre el desarrollo. Sin embargo, la morfología celular analizada con anti-vimentina a través de microscopía de 2-fotones, es diferencial en función de su ubicación en la pared ventricular (dorsal, lateral y ventral). En la zona dorsal, es donde existe una mayor cantidad de procesos radiales elongados, los cuales tienen contacto con la ZV y se extienden hacia la superficie pial, mientras que, en la región lateral del ventrículo, estos procesos se distinguen menos radiales y más ondulantes. Además, en la región ventral no se distinguieron procesos que se estuvieran extendiendo desde la ZV hacia las distintas regiones cerebrales. Esto podría ser explicado considerando que la morfología de la glía radial sufre modificaciones durante el desarrollo (Lu et al. 2015). La pérdida, en especial de la morfología radial a través de la retracción del proceso basal y apical, da cuenta de un estado de diferenciación terminal, en la cual se generarán los astrocitos, las células B1 y las células endimarias (Spassky et al. 2005, Redmond et al. 2019, Ortiz-Alvarez et al. 2021). Esta diferenciación terminal conlleva a la desaparición de la glía radial tardía (Rakic 2009). Por lo tanto, es probable que sea en la zona dorsal de los ventrículos laterales donde exista un mayor porcentaje de glía radial tardía indiferenciada.

Para definir que los ventrículos laterales presentan glia radial tardía en diferentes etapas de diferenciación, analizamos el marcaje diferencial de GLUT1 en los ventrículos laterales. GLUT1 fue preferentemente detectado en células ventriculares, sin procesos, que parecen haber alcanzado un

grado casi terminal de diferenciación. En este sentido, se ha determinado que la diferenciación endimaria del tercer ventrículo, acueducto cerebral y del cerebelo (además de los tanicitos), va acompañada con un aumento en la expresión de GLUT1 (Nualart, F. et al. 1999, Silva-Alvarez et al. 2005). GLUT1 aumenta su expresión en células diferenciadas que cambian su actividad metabólica, lo que ocurre con la diferenciación de la célula endimaria. Los resultados expuestos en esta tesis, demuestran que la expresión de GLUT1 y la consecuente desaparición de la glía radial ocurre en un sentido ventro-dorsal en los ventrículos laterales, correlacionándose con estudios que han determinado que la diferenciación endimaria ocurre en un sentido ventro-dorsal y caudal-rostral (Spassky et al. 2005). Por otro lado, recientemente se ha descrito que a los 5 días postnatales (en un gradiente ventrodorsal y caudorostral), comienza a emerger en los ventrículos cerebrales una estructura conocida como molinillo (*pinwheel*). Esta estructura, donde las células endimarias rodean a las células B1, es uno de los indicadores del comienzo de la formación del nicho neurogénico adulto (Redmond et al. 2019) y en consecuencia, un parámetro de la desaparición de la glía radial tardía. Por lo tanto, la observación de esta estructura a partir de los 5 días postnatales, nos lleva a proponer que la glía radial tardía se mantiene de manera abundante durante los 4 días postnatales. Además, consistente con los resultados obtenidos anteriormente, al realizar el análisis de la expresión del ARN mensajero para GLUT1 en la zona dorso-ventricular, se determinó que no existe diferencia significativa en la expresión entre el primer y cuarto día postnatal, condición que incrementa sostenidamente en estadios posteriores.

Si bien existe un número considerable de células de la glía radial tardía en el cerebro postnatal, es probable que una gran cantidad de estas células no mantengan sus características de célula madre, es decir, que hayan perdido su capacidad proliferativa y de generar distintos tipos celulares. Estudios previos han demostrado que la glía radial embrionaria se especifica en linaje endimario entre E14-E16; por lo tanto, sufre su última división en estos periodos embrionarios. No obstante, y curiosamente, mantiene sus características morfológicas y gliales hasta el nacimiento

(Kyrrousi et al. 2017). De manera similar, la mayoría de los precursores de células B1 de ratón, se producen a partir de la glía radial embrionaria presente en los estadios E13.5-E15.5 y permanecen quiescentes, hasta su reactivación en la etapa adulta (Fuentealba et al. 2015). Por otra parte, las células de la glía radial embrionaria restringen progresivamente su potencial de diferenciación, generando primero las neuronas de las capas más profundas, luego las superficiales y finalmente las células gliales (Qian et al. 2000, Temple 2001, Shen et al. 2006, Slater et al. 2009); estas identidades temporales se especifican mediante factores de transcripción expresados secuencialmente en progenitores neuronales (Kriegstein, A. et al. 2009). En esta misma línea, se ha evidenciado que la glía radial embrionaria conserva su capacidad para producir secuencialmente distintos tipos de células en condiciones de cultivo (Frantz et al. 1996, Desai et al. 2000). En consecuencia, si bien la glía radial tardía está altamente presente en los primeros días postnatales, conservando su morfología, una gran cantidad de estas células deben haber perdido su capacidad proliferativa y probablemente, su potencial de diferenciación se encuentra restringido a la generación de astrocitos. No obstante, en esta tesis observamos un marcaje Sox2 positivo en la ZV/ZSV dorsal del ventrículo lateral, en cerebros de rata de 1 día. Al respecto, Sox2 es un factor de transcripción cuya función es esencial en el mantenimiento de la auto-renovación y pluripotencia de las células madres (Graham et al. 2003). Además, realizamos ensayos de proliferación inyectando BrdU intraventricularmente, en ratas de 1 día postnatal. Luego de dos días post-inyección, se observó la existencia de un marcaje BrdU positivo en toda la extensión ventricular. Por lo tanto, es probable que exista una subpoblación de células de la glía radial tardía que se encuentre de manera proliferativa e indiferenciada postnatalmente, propiedades que se pierden a medida que avanza el desarrollo.

Con respecto al potencial de diferenciación de la glía radial tardía, este fue analizado inyectando intra-ventricularmente, en cerebros de rata de 1 día postnatal, un adenovirus con el gen reportero eGFP, el cual ha sido ampliamente utilizado para el marcaje de la glía radial temprana y tardía (Tamamaki et al. 2001, Merkle et al. 2004, Pilz et al. 2013, Jinnou et al. 2018, Andrews et al.

2020), como también de células endimogliales (tanicitos) (Martinez et al. 2019). Cabe destacar, que la transducción adenoviral, no ha sido utilizada para el marcaje neuronal, astrocítico o microglial. En este contexto, al realizar un análisis a distintos días post-infección, se detectó de manera evidente una alta transducción ventricular, visualizándose células con morfología de glía radial tardía, tal como ha sido descrita anteriormente. Recientemente, se ha determinado que el receptor adenoviral CAR (Coxsackievirus y receptor de adenovirus), se localiza en la ZV/ZSV de los ventrículos laterales de embriones de rata co-localizando con Sox2 (Chen, M. et al. 2019), lo cual nos confirma que probablemente las células infectadas correspondan a glía radial tardía. Sin embargo, uno de los resultados más inesperados e interesantes de esta tesis, fue haber observado células con morfología neuronal migratoria. La morfología neuronal migratoria se encuentra bien descrita; presentan un proceso líder de avance de aproximadamente 90 μm y un corto proceso final (Noctor et al. 2004). En este contexto, Los movimientos de las neuronas están controlados por la generación, mantenimiento y remodelación del proceso líder, el cual marca la direccionalidad de la migración (Noctor et al. 2002, Tan et al. 2013, Rahimi-Balaei et al. 2018), ambos procesos celulares son exclusivos de las neuronas migratorias y no se han descrito en otros tipos celulares. Esta morfología neuronal migratoria fue claramente visualizada en los distintos estadios post-infección analizados. Además, estas neuronas fueron observadas migrando radialmente, detectándose algunos clústers migratorios, indicando que se generaron en una misma ventana de tiempo. Por otro lado, al ser detectadas luego de 12 y 16 días post-transducción, estas células alcanzaron capas corticales más superficiales, donde algunas de ellas, adquirieron una morfología multipolar, dando cuenta de que finalizaron el proceso migratorio y comienzan con la etapa de maduración, distinguiéndose claramente procesos dendríticos y de arborización. De manera concordante, estas células co-localizaron con marcadores neuronales, NeuN y tubulina β III y fueron negativas para marcadores astrocíticos, indicando que corresponden a neuronas. Es probable que estas neuronas se ubiquen en las capas corticales II/III y, dado que su migración fue radial y no tangencial, correspondan a neuronas piramidales; sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar con exactitud la identidad neuronal. Cabe destacar que la

generación de neuronas a partir de la glía radial tardía posiblemente se encuentre muy por debajo de la producción glial. No obstante, es destacable el hecho de que en estadios postnatales aún exista una capacidad de diferenciación neuronal. Por otro lado, es importante mencionar que la glía radial tardía, a nivel apical, no presenta uniones estrechas, sino que exhibe uniones adherentes. De esta forma, no se descarta que el virus haya difundido para transducir neuroblastos que se encuentren en la región periventricular del ventrículo lateral. Sin embargo, cuando se realizó la inyección intraventricular utilizando un lentivirus, el cual presenta un alto tropismo neuronal y ha sido ampliamente utilizado en nuestro y otros laboratorios (Zhang, Y. et al. 2006, Ding et al. 2013, Salazar et al. 2016), no observamos neuronas migrando, indicando que la difusión viral a través de las células ventriculares es poco probable. Es importante destacar, que los virus utilizados presentan el mismo título; 2×10^{-7} unidades infectivas virales (ifu)/mL.

Hasta la fecha no existen investigaciones que propongan factores o moléculas que puedan estar regulando la diferenciación de la glía radial tardía. En este contexto, los datos presentados en esta tesis sugieren que ácido ascórbico y su transportador, SVCT2, podrían estar involucrados en este proceso. Nuestros análisis inmunohistoquímicos, de *immunogold*, como también de hibridación *in situ* y microdissección láser acoplada a PCR en tiempo real, demuestran que SVCT2 se encuentra altamente polarizado a nivel ventricular, co-localizando con marcadores de la glía radial. A su vez, la detección de SVCT2 en la región apical de la glía radial tardía, que tiene contacto con el LCR, sugiere que ácido ascórbico está siendo captado por esta célula madre neural. Concordante con estos resultados, nuestro laboratorio ha demostrado la polarización ventricular de SVCT2 en cerebros embrionarios de rata (Caprile et al. 2009) como también, de ratón y humanos, co-localizando con marcadores de la glía radial (Silva-Alvarez et al. 2016). Esta notable polarización ventricular de SVCT2 fue confirmada a través de la sobre-expresión mediante electroporación *in utero* en cerebros embrionarios de ratón (Silva-Alvarez et al. 2016). En este aspecto, la polarización apical de SVCT2 también ha sido demostrada en las células ependimarias del tercer ventrículo (Ulloa et al. 2019) y en

las células gliales hipotalámicas, conocidas como tanicitos (Garcia Mde et al. 2005). Los tanicitos son células que provienen de la glía radial y delimitan el tercer ventrículo, participando en mecanismos de detección y transporte de glucosa en el cerebro (Cortes-Campos et al. 2011, Nualart, F. et al. 2012, Martinez et al. 2019). Estas células comparten diversas características morfológicas y celulares con la glía radial; tienen contacto con el LCR, presentan un largo proceso radial que expresa filamentos intermedios tales como vimentina, GFAP y nestina y son eficientemente transducidas *in vivo* al utilizar adenovirus (Lee, D. A. et al. 2012, Martinez et al. 2019, Langlet 2020). Además, se ha propuesto que los tanicitos adultos presentan auto-renovación y pueden generar distintos tipos celulares, incluidas neuronas (Lee, D. A. et al. 2012, Haan et al. 2013, Robins et al. 2013). Debido a las similitudes entre estas células, es posible que el mecanismo de direccionamiento (*sorting*) apical de SVCT2 en la glía radial tardía, sea similar al que ocurre en la glía radial temprana y en tanicitos.

Diversos datos experimentales sugieren que tanto el extremo amino, como el carboxilo terminal de los transportadores de ácido ascórbico, desempeñan un papel clave regulando su distribución apical o basolateral en la membrana celular (Subramanian, V. S. et al. 2004, Subramanian, V. S. et al. 2009, Varma et al. 2009, Subramanian, V. S. et al. 2010, Kuo et al. 2013). Sin embargo, esta localización también depende del tipo celular que lo expresa. Así, fuera del SNC también se ha demostrado una polarización apical de SVCT2, observándose su expresión en el epitelio bronquial (Larsson et al. 2015), epitelio de tráquea (Jin et al. 2005) y en células epiteliales nasales (Fischer et al. 2004). En contraparte, otras investigaciones han determinado que SVCT2 se encuentra polarizado basolateralmente, como es el caso observado en las líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano (Caco-2), de epitelio de riñón canino Madin-Darby (MDCK) (Boyer et al. 2005), en los plexos coroideos (Ulloa et al. 2013, Ulloa et al. 2019) como también, durante la ontogenia, en las células epiteliales tubulares del riñón (Nualart, F. et al. 2013). En este contexto, se ha descrito que en el extremo N-terminal de SVCT2, existe una secuencia de direccionamiento basolateral (ELMAI) crucial para dirigir la proteína hacia la membrana basolateral

(Varma et al. 2009, Kuo et al. 2013). Al respecto, las señales de clasificación basolateral suelen ser "dominantes" sobre las señales de clasificación apical, es decir, si están presentes tanto una señal basolateral como una apical, se producirá mayoritariamente un direccionamiento basolateral de la proteína (Mellman et al. 2008). Por consiguiente, se ha sugerido que la clasificación apical corresponde a una vía predeterminada por defecto y que no requiere señales de clasificación especializadas (Willenborg et al. 2011). Esto es consistente con la observación de que la mutación de la secuencia de direccionamiento basolateral de SVCT2, lo redirige hacia la membrana apical (Varma et al. 2009) o bien, que el miembro de la familia SLC23, SLC23A4 (transportador de nucleobases dependiente de sodio), no presenta el motivo ELMAI y está localizado apicalmente en células MDCK (Kuo et al. 2013). En consecuencia, es probable que el transportador SVCT2, que se encuentra polarizado apicalmente en la glía radial, carezca de la secuencia de direccionamiento basolateral.

Por otro lado, sólidas evidencias plantean que ácido ascórbico ingresa al LCR a través de los plexos coroideos, los cuales presentan el transportador SVCT2 polarizado basolateralmente (Ulloa et al. 2013, Ulloa et al. 2019). Este transporte genera una alta concentración de ácido ascórbico en el LCR; entre 200-400 μM en ratas (Spector et al. 1973, Schenk et al. 1982, Miele et al. 1996) y 160 μM en humanos (Reiber et al. 1993), excediendo en varios ordenes de magnitud la concentración plasmática correspondiente a 40-60 μM (Evans et al. 1982). La importancia de SVCT2 en el transporte de ácido ascórbico quedó demostrada en la generación de ratones homocigotos *knockout* para SVCT2, los cuales murieron pocos minutos después de nacer y en los que los niveles de ácido ascórbico fueron casi indetectable en todos los órganos analizados (cerebro, hígado, glándulas suprarrenales, riñón, glándulas pituitarias, páncreas y músculo) (Sotiriou et al. 2002). Además, a diferencia de otros órganos, el cerebro tiene la capacidad de retener ácido ascórbico, mostrándose refractario a la pérdida de esta vitamina (Harrison et al. 2010); demostrando así, la importancia de vitamina C a nivel cerebral. Aparte del rol más conocido que tiene ácido ascórbico como antioxidante (Rice 2000), se ha descrito también que participa como cofactor enzimático de diversas reacciones

(Monfort et al. 2013, Yin et al. 2013, Kuiper et al. 2014), incluyendo moderador de la muerte celular (Ferrada et al. 2020, Ferrada et al. 2021) y regulador de la diferenciación celular (Salazar et al. 2016, Silva-Alvarez et al. 2016, Oyarce et al. 2018, Espinoza et al. 2020). En este último aspecto, nuestros análisis *in vitro* demuestran que tanto el tratamiento con ácido ascórbico como también altos niveles de SVCT2, inducen fuertemente la radialización de la glía radial tardía, aumentando significativamente la longitud de sus procesos con respecto al control. Consistentemente, y en similares ordenes de magnitud, el efecto radializante de ácido ascórbico ha sido reportado sobre la glía radial embrionaria (Silva-Alvarez et al. 2016). En esta misma línea, los resultados obtenidos en esta tesis, en cultivos primarios provenientes de cerebros de ratones SVCT2^{+/-}, sugieren que la glía radial tardía con bajos niveles de SVCT2, pierde su estado indiferenciado, su morfología radial y se transforma en astrocitos de manera más rápida que una glía radial con niveles normales de SVCT2. En consecuencia, en un contexto *in vitro*, tanto ácido ascórbico como SVCT2 promoverían la morfología radial, manteniendo el estado indiferenciado de la glía radial tardía. En contraparte, los análisis de la sobre-expresión de SVCT2 *in vivo*, demostraron que las células que sobre-expresaron el transportador, presentan una morfología redondeada y migraron hacia capas corticales superiores. Interesantemente, estas células co-localizaron de manera robusta con marcadores de progenitores intermediarios neuronales (Tbr2⁺), de proliferación (BrdU⁺) y de neuronas inmaduras (DCX⁺), sugiriendo que la sobre-expresión de SVCT2 como también, el probable aumento en la captación de ácido ascórbico por parte de la glía radial tardía, conllevaría a una diferenciación neurogénica. En concordancia con lo anterior, resultados obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que en el nicho neurogénico adulto, SVCT2 co-localiza con las células tipo C (Pastor et al. 2013), las cuales corresponden a progenitores intermediarios altamente proliferativos (Tbr2⁺, Brdu⁺) que generan las células tipo A o neuroblastos (Alvarez-Buylla et al. 1998, Nualart, F. et al. 2012, Li, Y. et al. 2021).

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis demuestran que tanto ácido ascórbico como SVCT2 mantendrían el estado indiferenciado de la glía radial tardía *in vitro* como también,

promoverían la diferenciación neurogénica *in vivo*. La existencia de efectos duales de ácido ascórbico ha sido ampliamente demostrada en la literatura. Con respecto a su efecto neurogénico en células madres indiferenciadas, nuestro laboratorio ha demostrado su rol en la diferenciación de neuroesferas, donde ácido ascórbico potencia el fenotipo neuronal, estimulando el crecimiento de neuritas, incluso aún más que el tratamiento con ácido retinoico (Espinoza et al. 2020). De igual manera, ácido ascórbico incrementó la expresión de marcadores neuronales en neuroesferas formadas con la línea celular de teratocarcinoma P19 (Pastor et al. 2013) y, tanto la sobre-expresión de SVCT2 como la suplementación con ácido ascórbico, indujeron un fenotipo neuronal en una línea celular multipotente cerebelar (C17.2) (Oyarce et al. 2018). Asimismo, otros grupos de investigación han evidenciado que en células madre mesencefálicas ventrales, el tratamiento con ácido ascórbico incrementó 10 veces los niveles de neuronas dopaminérgicas (Yan et al. 2001), lo cual puede ser un indicativo de que ácido ascórbico promueve un tipo neuronal específico de acuerdo a la célula madre neural estimulada. Además, se ha determinado que ácido ascórbico induce la expresión genes neurogénicos en células madre pluripotentes de ratón R1 (Shin et al. 2004) como también, en células de carcinoma de ratón F9 (Han, Z. et al. 2021). Por otro lado, en la corteza cerebral de los ratones SVCT2^{+/-} existe aproximadamente entre un 30-40% menos de ácido ascórbico que en cerebros normales (Meredith et al. 2013, Dixit et al. 2015), condición que puede estar presente en un número significativo de seres humanos, con una ingesta dietética reducida o pérdida de vitamina C (Hansen, S. N. et al. 2014). Estos ratones presentaron una hiperactividad moderada, alteraciones en la coordinación motora y equilibrio, como también, una disminución en la memoria espacial (Dixit et al. 2015). Al respecto, la memoria espacial es una tarea dependiente del hipocampo (Fritch et al. 2020), y se ha determinado que neuronas embrionarias hipocampales provenientes de ratones SVCT2^{-/-} exhiben una menor amplitud y frecuencia de las mEPCs al igual que un menor número y largo de dendritas, además de una disminución del número de receptores de glutamato GLUR1, con respecto a cultivos neuronales hipocampales *wild type* (Qiu et al. 2007). En esta misma línea, investigaciones en ratones SVCT2^{-/-}, SVCT2^{+/-} y ratones *wild type*, analizaron el número de neuronas dopaminérgicas embrionarias a

nivel mesencefálico. Se determinó que entre menores son los niveles de SVCT2, menor es el número de neuronas dopaminérgicas Th⁺ que se generan a partir de las células madres neurales (He et al. 2015), indicando que niveles disminuidos de SVCT2 se traducen en una menor tasa de neurogénesis. Lo anterior concuerda con nuestros resultados, donde determinamos que la corteza cerebral de ratones con bajos niveles de SVCT2 presentan una abundancia significativamente menor de marcadores neuronales (NeuN y tubulina- β III), lo que se invierte al analizar la corteza cerebral que presenta con altos niveles de SVCT2. Además, nuestros resultados muestran que la expresión de SVCT2 en la ZV y en la ZSV, es significativamente mayor en el periodo neurogénico en comparación con el estadio gliogénico y postnatal. Lo anterior sugiere que SVCT2 es necesario para la generación de neuronas a partir de la glía radial. Por consiguiente, al sobre-expresar *in vivo* SVCT2 en la glía radial tardía, es probable que se diferencie a neuronas, ya de forma indirecta, generando progenitores intermedarios los cuales a su vez, se diferenciarán en neuroblastos. O bien, también es posible, que la glía radial tardía se diferencie de manera directa en neuronas inmaduras.

Interesantemente y aunque queda bien definida la participación de ácido ascórbico en la diferenciación neuronal, no se puede dejar de lado nuevas propuestas que plantean que SVCT2 puede actuar, no sólo como un transportador, sino que también como un receptor y generar una respuesta en la diferenciación celular por sí mismo (Han, Z. et al. 2021). En relación a lo anterior, Salazar *et al.*, demostraron que la sobre-expresión de SVCT2 en la línea celular de neuroblastoma N2a, indujo la diferenciación neuronal incrementando la formación de filopodios y procesos de arborización neuronal. Notablemente, ni la suplementación con ácido ascórbico ni la sobre-expresión de SVCT1 en esta línea celular, reprodujo los cambios morfológicos ocasionados por la sobre-expresión de SVCT2 (Salazar et al. 2016). Por lo tanto, si bien es probable que la sobre-expresión de SVCT2 *in vivo* promueva una mayor captación de ácido ascórbico por parte de la glía radial tardía y en consecuencia, una diferenciación neuronal de la misma, se requieren estudios complementarios para determinar si el efecto observado es producido por ácido ascórbico y/o su transportador, SVCT2. En

este contexto, cabe mencionar que el medio de cultivo (BME) utilizado en los ensayos *in vitro* de glía radial tardía, provenientes de ratones SVCT2^{+/-} y SVCT2^{tg}, no contiene ácido ascórbico; por lo tanto, los efectos observados probablemente se deben a funciones complementarias del transportador. De esta manera, sería atractivo realizar tratamientos con ácido ascórbico en los cultivos generados con los ratones SVCT2^{+/-} y SVCT2^{tg}, para analizar si se puede generar un rescate de función y mantener una glía radial indiferenciada, en aquella glía radial tardía con bajos niveles de SVCT2, o potenciar el efecto radializante observado con la glía radial tardía que mantiene altos niveles del transportador. De igual manera, es necesario determinar si la función de SVCT2 como posible receptor, también se reproduce en condiciones *in vivo*, ya que esta propuesta sólo ha sido estudiada *in vitro*, analizando las líneas celulares F9 y HEK293T (Han, Z. et al. 2021).

Con respecto a los estudios que han propuesto a ácido ascórbico como una molécula que mantiene la indiferenciación, tanto en células madres como también en la reprogramación celular, se ha demostrado que en las células madre F9, ácido ascórbico aumenta los niveles de Nanog, un factor de transcripción clave en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madres (Wu et al. 2014) y que bloquea la diferenciación (Pan et al. 2007). En este contexto, el tratamiento con ácido ascórbico mantuvo el estado indiferenciado, aumentó la auto-renovación e incrementó la actividad de la fosfatasa alcalina (un marcador de indiferenciación) en la línea celular J1 (células de la masa interna del blastocito) (Gao et al. 2013). Interesantemente, al diferenciar la línea celular J1 con ácido retinoico y luego tratarlas con ácido ascórbico, estas células vuelven a presentar características de células madres indiferenciadas (Wu et al. 2014). Además, se ha determinado que ácido ascórbico, independiente de su actividad antioxidante, aumenta la generación de células pluripotentes inducidas (iPSC) tanto en humano como de ratón (Esteban et al. 2010). Simultáneamente, se suman otros estudios que han demostrado que la adición de ácido ascórbico en los medios de cultivo, de las células somáticas (durante la reprogramación); mejora la eficiencia, el mantenimiento y la proliferación de las iPSC (Wang et al. 2011, Stadtfeld et al. 2012). Es probable que los efectos previamente

mencionados, sean generados preferentemente en los cultivos primarios enriquecidos en glía radial tardía. En este contexto, se ha demostrado que ácido ascórbico activa, a través de SVCT2, la vía de señalización JAK/STAT, aumentando los niveles de nanog y manteniendo así, el estado indiferenciado de las células madres (Wu et al. 2014, Han, Z. et al. 2021). Es posible que, en la glía radial tardía *in vitro*, (con altos niveles de SVCT2 y tratada con ácido ascórbico) se active preferentemente la vía JAK/STAT/nanog. Esta respuesta *in vitro*, estaría potenciada por la falta de interacciones entre la glía radial y los distintos tipos celulares que componen la corteza cerebral y las meninges (matriz extracelular). Sin embargo, ¿cómo se explicaría la diferenciación neuronal de la glía radial *in situ* y el efecto generado por ácido ascórbico?. Referente a esta pregunta, pensamos que *in situ*, existen otros factores que cambian la respuesta de la glia radial frente al ácido ascórbico. Referente a esto, se ha demostrado en algunos modelos celulares (neuroblastoma), que el tratamiento con ácido ascórbico y la sobre-expresión de SVCT2 promueve la fosforilación de ERK1/2 (Salazar et al. 2016). Al respecto, se ha determinado que la fosforilación de ERK1/2 es un evento de señalización temprana necesaria para la diferenciación neuronal de células madre embrionarias (Li, Z. et al. 2006). Además, otros estudios han demostrado que la inhibición de ERK1/2 previene la diferenciación neural y promueve la autorrenovación de las células madre embrionarias humanas (Na et al. 2010). Por lo tanto, es probable que la sobre-expresión *in vivo* de SVCT2 genere la activación de la vía ERK1/2 e inhiba la vía de señalización de pluripotencia JAK/STAT/nanog, debido a la presencia de otros factores que condicionan la respuesta, entre ellos, el ácido retinoico. En resumen, vitamina C puede activar las vías de señalización JAK/STAT/nanog y también, ERK1/2. Debido a que estas vías de señalización pueden hacer *crossstalk* (Arredondo et al. 2006, Dai et al. 2013, Gkouveris et al. 2014, Le et al. 2016), la respuesta final de la glia radial dependerá de otros factores que regulen la vía predominante de activación, por ejemplo, ácido retinoico. Específicamente, se ha descrito que ERK regula la actividad de STAT, mediante la fosforilación del mismo (Winston et al. 1995, Steelman et al. 2004). Así, se ha demostrado que ERK regula la activación de genes de respuesta temprana de interferones, modificando la cascada de señalización JAK/STAT (David et al.

1995). En este sentido, es probable que en estas condiciones *in vivo*, al sobre-expresar SVCT2 en conjunto con otros factores necesarios (por ejemplo, ácido retinoico), que no se encuentran presentes *in vitro*, la vía ERK predomine e inhiba la vía de señalización JAK/STAT. En contraparte, *in vitro*, al no activarse la vía ERK1/2, será JAK/STAT/Nanog la que se encuentre predominando.

De esta forma, nuestros resultados demuestran que tanto el ácido ascórbico como su transportado SVCT2, modulan la diferenciación de la glía radial tardía. *In vitro*, ácido ascórbico y SVCT2 promueven la radialización y fenotipo indiferenciado de la glía radial; mientras que *in vivo*, la sobre-expresión de SVCT2 conlleva a la diferenciación neuronal de la glía radial tardía (Figura 37).



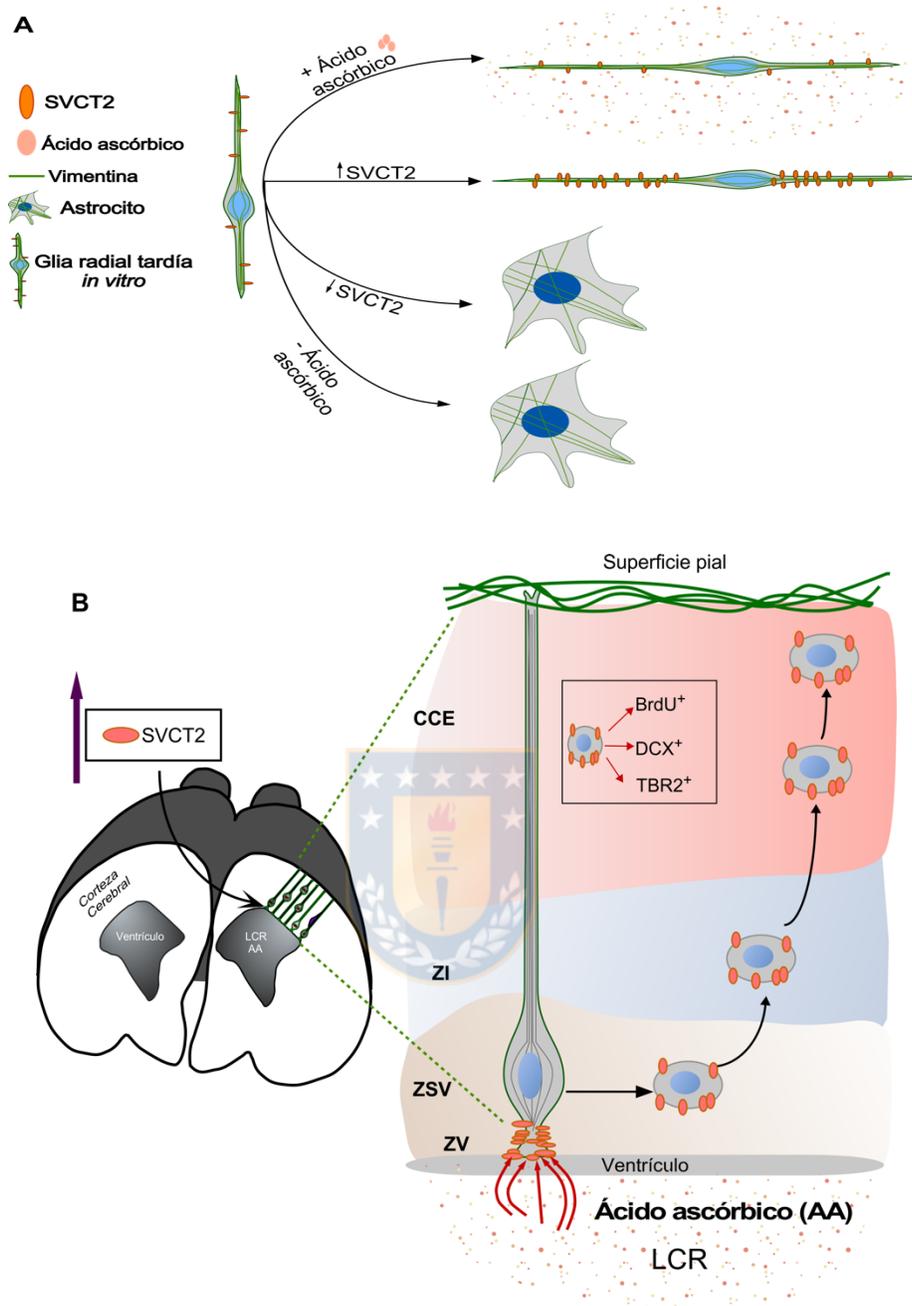


Figura 37. Modelo final del estudio.

(A) *In vitro*, el tratamiento con ácido ascórbico y altos niveles de SVCT2 aumentan la radialización de la glía radial tardía, mientras que bajos niveles de SVCT2 conllevan a su diferenciación astrocítica. (B) La sobre-expresión *in vivo* de SVCT2 en la glía radial tardía genera su diferenciación neuronal, ya sea de manera directa o indirecta, esta última a través de progenitores intermedios.

VII. CONCLUSIONES

1.- Las células de la glía radial tardía se encuentran de manera abundante entre el primer y cuarto día postnatal, manteniendo la expresión ventricularmente polarizada de SVCT2. SVCT2 disminuye su expresión a medida que avanza el desarrollo postnatal.

2.- La glía radial tardía mantiene su capacidad de diferenciación neurogénica en los estadios posnatales. La sobre-expresión *in vivo* de SVCT2, en estas células, genera una morfología redondeada con reacción positiva para marcadores neuronales. Esto sugiere un proceso de diferenciación neuronal.

3.- El tratamiento con ácido ascórbico a células de la glía radial *in vitro*, con alta expresión de SVCT2, potencia un fenotipo radial. Sin embargo, bajos niveles de SVCT2, conllevan a la diferenciación astrocítica por parte de la glía radial tardía *in vitro*.



VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aaku-Saraste, E., A. Hellwig & W. B. Huttner (1996). "Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis." *Dev Biol* **180**(2): 664-679.
- Accogli, A., N. Addour-Boudrahem & M. Srour (2020). "Neurogenesis, neuronal migration, and axon guidance." *Handb Clin Neurol* **173**: 25-42.
- Agathocleous, M., C. E. Meacham, R. J. Burgess, E. Piskounova, Z. Zhao, G. M. Crane, B. L. Cowin, E. Bruner, M. M. Murphy, W. Chen, G. J. Spangrude, Z. Hu, R. J. DeBerardinis & S. J. Morrison (2017). "Ascorbate regulates haematopoietic stem cell function and leukaemogenesis." *Nature* **549**(7673): 476-481.
- Agirman, G., L. Broix & L. Nguyen (2017). "Cerebral cortex development: an outside-in perspective." *FEBS Lett* **591**(24): 3978-3992.
- Agus, D. B., S. S. Gambhir, W. M. Pardridge, C. Spielholz, J. Baselga, J. C. Vera & D. W. Golde (1997). "Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters." *J Clin Invest* **100**(11): 2842-2848.
- Allen, N. J. & D. A. Lyons (2018). "Glia as architects of central nervous system formation and function." *Science* **362**(6411): 181-185.
- Angevine, J. B., Jr. (1970). "Time of neuron origin in the diencephalon of the mouse. An autoradiographic study." *J Comp Neurol* **139**(2): 129-187.
- Anthony, T. E., C. Klein, G. Fishell & N. Heintz (2004). "Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system." *Neuron* **41**(6): 881-890.
- Arellano, J. I., Y. M. Morozov, N. Micali & P. Rakic (2021). "Radial Glial Cells: New Views on Old Questions." *Neurochem Res*.
- Astuya, A., T. Caprile, M. Castro, K. Salazar, L. Garcia Mde, K. Reinicke, F. Rodriguez, J. C. Vera, C. Millan, V. Ulloa, M. Low, F. Martinez & F. Nualart (2005). "Vitamin C uptake and recycling among normal and tumor cells from the central nervous system." *J Neurosci Res* **79**(1-2): 146-156.
- Baldwin, S. A. (1993). "Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins." *Biochim Biophys Acta* **1154**(1): 17-49.
- Belluzzi, O., M. Benedusi, J. Ackman & J. J. LoTurco (2003). "Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb." *J Neurosci* **23**(32): 10411-10418.
- Betizeau, M., V. Cortay, D. Patti, S. Pfister, E. Gautier, A. Bellemin-Menard, M. Afanassieff, C. Huissoud, R. J. Douglas, H. Kennedy & C. Dehay (2013). "Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate." *Neuron* **80**(2): 442-457.
- Bond, A. M., G. L. Ming & H. Song (2021). "Ontogeny of adult neural stem cells in the mammalian brain." *Curr Top Dev Biol* **142**: 67-98.
- Borrell, V. & M. Gotz (2014). "Role of radial glial cells in cerebral cortex folding." *Curr Opin Neurobiol* **27**: 39-46.
- Bramanti, V., D. Tomassoni, M. Avitabile, F. Amenta & R. Avola (2010). "Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture." *Front Biosci (Schol Ed)* **2**: 558-570.
- Cameron, R. S. & P. Rakic (1991). "Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis." *Glia* **4**(2): 124-137.

Campbell, K. (2003). "Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon." Curr Opin Neurobiol **13**(1): 50-56.

Campbell, K.&M. Gotz (2002). "Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development." Trends Neurosci **25**(5): 235-238.

Cao, N., Z. Liu, Z. Chen, J. Wang, T. Chen, X. Zhao, Y. Ma, L. Qin, J. Kang, B. Wei, L. Wang, Y. Jin&H. T. Yang (2012). "Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells." Cell Res **22**(1): 219-236.

Capela, A.&S. Temple (2002). "LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal." Neuron **35**(5): 865-875.

Caprile, T., K. Salazar, A. Astuya, P. Cisternas, C. Silva-Alvarez, H. Montecinos, C. Millan, M. de Los Angeles Garcia&F. Nualart (2009). "The Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids." J Neurochem **108**(3): 563-577.

Carleton, A., L. T. Petreanu, R. Lansford, A. Alvarez-Buylla&P. M. Lledo (2003). "Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb." Nat Neurosci **6**(5): 507-518.

Castro, M., T. Caprile, A. Astuya, C. Millan, K. Reinicke, J. C. Vera, O. Vasquez, L. G. Aguayo&F. Nualart (2001). "High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons." J Neurochem **78**(4): 815-823.

Chatterjee, I. B., G. C. Chatterjee, N. C. Ghosh, J. J. Ghosh&B. C. Guha (1960). "Biological synthesis of L-ascorbic acid in animal tissues: conversion of D-glucuronolactone and L-gulonolactone into L-ascorbic acid." Biochem J **76**: 279-292.

Chatterjee, I. B., A. K. Majumder, B. K. Nandi&N. Subramanian (1975). "Synthesis and some major functions of vitamin C in animals." Ann N Y Acad Sci **258**: 24-47.

Chatzi, C., T. J. Cunningham&G. Duester (2013). "Investigation of retinoic acid function during embryonic brain development using retinaldehyde-rescued Rdh10 knockout mice." Dev Dyn **242**(9): 1056-1065.

Chen, J., L. Guo, L. Zhang, H. Wu, J. Yang, H. Liu, X. Wang, X. Hu, T. Gu, Z. Zhou, J. Liu, J. Liu, H. Wu, S. Q. Mao, K. Mo, Y. Li, K. Lai, J. Qi, H. Yao, G. Pan, G. L. Xu&D. Pei (2013). "Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming." Nat Genet **45**(12): 1504-1509.

Cheslow, L.&J. I. Alvarez (2016). "Glial-endothelial crosstalk regulates blood-brain barrier function." Curr Opin Pharmacol **26**: 39-46.

Chiasson, B. J., V. Tropepe, C. M. Morshead&D. van der Kooy (1999). "Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics." J Neurosci **19**(11): 4462-4471.

Choi, B. H. (1986). "Glial fibrillary acidic protein in radial glia of early human fetal cerebrum: a light and electron microscopic immunoperoxidase study." J Neuropathol Exp Neurol **45**(4): 408-418.

Choi, B. H.&L. W. Lapham (1978). "Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study." Brain Res **148**(2): 295-311.

Cimmino, L., I. Dolgalev, Y. Wang, A. Yoshimi, G. H. Martin, J. Wang, V. Ng, B. Xia, M. T. Witkowski, M. Mitchell-Flack, I. Grillo, S. Bakogianni, D. Ndiaye-Lobry, M. T. Martin, M. Guillaumot, R. S. Banh, M. Xu, M. E. Figueroa, R. A. Dickins, O. Abdel-Wahab, C. Y. Park, A. Tsirigos, B. G. Neel&I. Aifantis (2017). "Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression." Cell **170**(6): 1079-1095 e1020.

Cisternas, P., C. Silva-Alvarez, F. Martinez, E. Fernandez, L. Ferrada, K. Oyarce, K. Salazar, J. P. Bolanos&F. Nualart (2014). "The oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, regulates neuronal energy metabolism." J Neurochem **129**(4): 663-671.

Clare, C. E., A. H. Brassington, W. Y. Kwong&K. D. Sinclair (2019). "One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development." Annu Rev Anim Biosci **7**: 263-287.

Corpe, C. P., P. Eck, J. Wang, H. Al-Hasani&M. Levine (2013). "Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8." J Biol Chem **288**(13): 9092-9101.

da Silva, S. M., G. D. Campos, F. C. A. Gomes&J. Stipursky (2019). "Radial Glia-endothelial Cells' Bidirectional Interactions Control Vascular Maturation and Astrocyte Differentiation: Impact for Blood-brain Barrier Formation." Curr Neurovasc Res **16**(4): 291-300.

De Juan Romero, C.&V. Borrell (2015). "Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex." Glia **63**(8): 1303-1319.

Delanghe, J. R., M. R. Langlois, M. L. De Buyzere, N. Na, J. Ouyang, M. M. Speeckaert&M. A. Torck (2011). "Vitamin C deficiency: more than just a nutritional disorder." Genes Nutr **6**(4): 341-346.

Dhar-Mascareno, M., J. M. Carcamo&D. W. Golde (2005). "Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C." Free Radic Biol Med **38**(10): 1311-1322.

Dhariwal, K. R., W. O. Hartzell&M. Levine (1991). "Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum." Am J Clin Nutr **54**(4): 712-716.

Drouin, G., J. R. Godin&B. Page (2011). "The genetics of vitamin C loss in vertebrates." Curr Genomics **12**(5): 371-378.

Dubreuil, V., A. M. Marzesco, D. Corbeil, W. B. Huttner&M. Wilsch-Brauninger (2007). "Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1." J Cell Biol **176**(4): 483-495.

Ebata, K. T., K. Mesh, S. Liu, M. Bilenky, A. Fekete, M. G. Acker, M. Hirst, B. A. Garcia&M. Ramalho-Santos (2017). "Vitamin C induces specific demethylation of H3K9me2 in mouse embryonic stem cells via Kdm3a/b." Epigenetics Chromatin **10**: 36.

Englund, C., A. Fink, C. Lau, D. Pham, R. A. Daza, A. Bulfone, T. Kowalczyk&R. F. Hevner (2005). "Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex." J Neurosci **25**(1): 247-251.

Eroglu, C.&B. A. Barres (2010). "Regulation of synaptic connectivity by glia." Nature **468**(7321): 223-231.

Espinoza, F., R. Magdalena, N. Saldivia, N. Jara, F. Martinez, L. Ferrada, K. Salazar, F. Avila&F. Nualart (2020). "Vitamin C Recycling Regulates Neurite Growth in Neurospheres Differentiated In Vitro." Antioxidants (Basel) **9**(12).

Esteban, M. A., T. Wang, B. Qin, J. Yang, D. Qin, J. Cai, W. Li, Z. Weng, J. Chen, S. Ni, K. Chen, Y. Li, X. Liu, J. Xu, S. Zhang, F. Li, W. He, K. Labuda, Y. Song, A. Peterbauer, S. Wolbank, H. Redl, M. Zhong, D. Cai, L. Zeng&D. Pei (2010). "Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells." Cell Stem Cell **6**(1): 71-79.

Felix, L., J. Stephan&C. R. Rose (2020). "Astrocytes of the early postnatal brain." Eur J Neurosci.

Ferrada, L., M. J. Barahona, K. Salazar, P. Vandenabeele&F. Nualart (2020). "Vitamin C controls neuronal necroptosis under oxidative stress." Redox Biol **29**: 101408.

Ferrada, L., R. Magdalena, M. J. Barahona, E. Ramirez, C. Sanzana, J. Gutierrez&F. Nualart (2021). "Two Distinct Faces of Vitamin C: AA vs. DHA." Antioxidants (Basel) **10**(2).

Flames, N., R. Pla, D. M. Gelman, J. L. Rubenstein, L. Puelles&O. Marin (2007). "Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes." J Neurosci **27**(36): 9682-9695.

Fujisawa, K., K. Hara, T. Takami, S. Okada, T. Matsumoto, N. Yamamoto & I. Sakaida (2018). "Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells." *Stem Cell Res Ther* **9**(1): 93.

Furuya, S., T. Tabata, J. Mitoma, K. Yamada, M. Yamasaki, A. Makino, T. Yamamoto, M. Watanabe, M. Kano & Y. Hirabayashi (2000). "L-serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11528-11533.

Gage, F. H. (2002). "Neurogenesis in the adult brain." *J Neurosci* **22**(3): 612-613.

Gao, Y., L. Yang, L. Chen, X. Wang, H. Wu, Z. Ai, J. Du, Y. Liu, X. Shi, Y. Wu, Z. Guo & Y. Zhang (2013). "Vitamin C facilitates pluripotent stem cell maintenance by promoting pluripotency gene transcription." *Biochimie* **95**(11): 2107-2113.

Garcia Mde, L., K. Salazar, C. Millan, F. Rodriguez, H. Montecinos, T. Caprile, C. Silva, C. Cortes, K. Reinicke, J. C. Vera, L. G. Aguayo, J. Olate, B. Molina & F. Nualart (2005). "Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells." *Glia* **50**(1): 32-47.

Gherzi-Egea, J. F., N. Strazielle, M. Catala, V. Silva-Vargas, F. Doetsch & B. Engelhardt (2018). "Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease." *Acta Neuropathol* **135**(3): 337-361.

Glaser, T. & O. Brustle (2005). "Retinoic acid induction of ES-cell-derived neurons: the radial glia connection." *Trends Neurosci* **28**(8): 397-400.

Glasser, M. F., T. S. Coalson, E. C. Robinson, C. D. Hacker, J. Harwell, E. Yacoub, K. Ugurbil, J. Andersson, C. F. Beckmann, M. Jenkinson, S. M. Smith & D. C. Van Essen (2016). "A multi-modal parcellation of human cerebral cortex." *Nature* **536**(7615): 171-178.

Gleeson, J. G., P. T. Lin, L. A. Flanagan & C. A. Walsh (1999). "Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons." *Neuron* **23**(2): 257-271.

Godoy, A., V. Ormazabal, G. Moraga-Cid, F. A. Zuniga, P. Sotomayor, V. Barra, O. Vasquez, V. Montecinos, L. Mardones, C. Guzman, M. Villagran, L. G. Aguayo, S. A. Onate, A. M. Reyes, J. G. Carcamo, C. I. Rivas & J. C. Vera (2007). "Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations." *J Biol Chem* **282**(1): 615-624.

Gotz, M. (2003). "Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells." *Neuroscientist* **9**(5): 379-397.

Gotz, M. & Y. A. Barde (2005). "Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons." *Neuron* **46**(3): 369-372.

Gotz, M., E. Hartfuss & P. Malatesta (2002). "Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice." *Brain Res Bull* **57**(6): 777-788.

Gotz, M., M. Nakafuku & D. Petrik (2016). "Neurogenesis in the Developing and Adult Brain-Similarities and Key Differences." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**(7).

Guillemot, F. (2007). "Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes." *Development* **134**(21): 3771-3780.

Halliwell, B. (1992). "Reactive oxygen species and the central nervous system." *J Neurochem* **59**(5): 1609-1623.

Han, J. M., B. J. Chang, T. Z. Li, N. H. Choe, F. S. Quan, B. J. Jang, I. H. Cho, H. N. Hong & J. H. Lee (2007). "Protective effects of ascorbic acid against lead-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat hippocampus in vivo." *Brain Res* **1185**: 68-74.

Hansen, D. V., J. H. Lui, P. R. Parker & A. R. Kriegstein (2010). "Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex." *Nature* **464**(7288): 554-561.

Harris, K. D. & G. M. Shepherd (2015). "The neocortical circuit: themes and variations." *Nat Neurosci* **18**(2): 170-181.

Harrison, F. E., J. L. Best, M. E. Meredith, C. R. Gamlin, D. B. Borza & J. M. May (2012). "Increased expression of SVCT2 in a new mouse model raises ascorbic acid in tissues and protects against paraquat-induced oxidative damage in lung." PLoS One **7**(4): e35623.

Harrison, F. E., R. J. Green, S. M. Dawes & J. M. May (2010). "Vitamin C distribution and retention in the mouse brain." Brain Res **1348**: 181-186.

Harrison, F. E. & J. M. May (2009). "Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2." Free Radic Biol Med **46**(6): 719-730.

Haubensak, W., A. Attardo, W. Denk & W. B. Huttner (2004). "Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3196-3201.

Hevner, R. F. (2019). "Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development." J Anat **235**(3): 616-625.

Huijskens, M. J., M. Walczak, S. Sarkar, F. Atrafi, B. L. Senden-Gijsbers, M. G. Tilanus, G. M. Bos, L. Wieten & W. T. Germeraad (2015). "Ascorbic acid promotes proliferation of natural killer cell populations in culture systems applicable for natural killer cell therapy." Cytotherapy **17**(5): 613-620.

Jabaudon, D. (2017). "Fate and freedom in developing neocortical circuits." Nat Commun **8**: 16042.

Javed, K., V. Reddy & F. Lui (2021). Neuroanatomy, Choroid Plexus. StatPearls. Treasure Island (FL).

Johansson, C. B., S. Momma, D. L. Clarke, M. Risling, U. Lendahl & J. Frisen (1999). "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system." Cell **96**(1): 25-34.

Kaiser, K., D. Gyllborg, J. Prochazka, A. Salasova, P. Kompanikova, F. L. Molina, R. Laguna-Goya, T. Radaszkiewicz, J. Harnos, M. Prochazkova, D. Potesil, R. A. Barker, A. G. Casado, Z. Zdrahal, R. Sedlacek, E. Arenas, J. C. Villaescusa & V. Bryja (2019). "WNT5A is transported via lipoprotein particles in the cerebrospinal fluid to regulate hindbrain morphogenesis." Nat Commun **10**(1): 1498.

Kaur, N., W. Han, Z. Li, M. P. Madrigal, S. Shim, S. Pochareddy, F. O. Gulden, M. Li, X. Xu, X. Xing, Y. Takeo, Z. Li, K. Lu, Y. Imamura Kawasawa, B. Ballester-Lurbe, J. A. Moreno-Bravo, A. Chedotal, J. Terrado, I. Perez-Roger, A. J. Koleske & N. Sestan (2020). "Neural Stem Cells Direct Axon Guidance via Their Radial Fiber Scaffold." Neuron **107**(6): 1197-1211 e1199.

Kessarlis, N., M. Fogarty, P. Iannarelli, M. Grist, M. Wegner & W. D. Richardson (2006). "Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage." Nat Neurosci **9**(2): 173-179.

Kornack, D. R. & P. Rakic (1995). "Radial and horizontal deployment of clonally related cells in the primate neocortex: relationship to distinct mitotic lineages." Neuron **15**(2): 311-321.

Koshiishi, I., Y. Mamura, J. Liu & T. Imanari (1998). "Degradation of dehydroascorbate to 2,3-diketogulonate in blood circulation." Biochim Biophys Acta **1425**(1): 209-214.

Kratzing, C. C., J. D. Kelly & J. E. Kratzing (1985). "Ascorbic acid in fetal rat brain." J Neurochem **44**(5): 1623-1624.

Krebsbach, P. H. & L. G. Villa-Diaz (2017). "The Role of Integrin alpha6 (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker." Stem Cells Dev **26**(15): 1090-1099.

Kriegstein, A. & A. Alvarez-Buylla (2009). "The glial nature of embryonic and adult neural stem cells." Annu Rev Neurosci **32**: 149-184.

Kriegstein, A. R. & M. Gotz (2003). "Radial glia diversity: a matter of cell fate." Glia **43**(1): 37-43.

Kriegstein, A. R. & S. C. Noctor (2004). "Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex." Trends Neurosci **27**(7): 392-399.

Kuhn, S., L. Gritti, D. Crooks & Y. Dombrowski (2019). "Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond." *Cells* **8**(11).

Kuwar Chhetri, P. & M. D. J (2021). *Neuroanatomy, Neural Tube Development and Stages. StatPearls*. Treasure Island (FL).

Lee Chong, T., E. L. Ahearn & L. Cimmino (2019). "Reprogramming the Epigenome With Vitamin C." *Front Cell Dev Biol* **7**: 128.

Lee, J. Y., M. Y. Chang, C. H. Park, H. Y. Kim, J. H. Kim, H. Son, Y. S. Lee & S. H. Lee (2003). "Ascorbate-induced differentiation of embryonic cortical precursors into neurons and astrocytes." *J Neurosci Res* **73**(2): 156-165.

Lehtinen, M. K., C. S. Bjornsson, S. M. Dymecki, R. J. Gilbertson, D. M. Holtzman & E. S. Monuki (2013). "The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy." *J Neurosci* **33**(45): 17553-17559.

Levine, M., S. J. Padayatty & M. G. Espey (2011). "Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries." *Adv Nutr* **2**(2): 78-88.

Lim, D. A. & A. Alvarez-Buylla (2016). "The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**(5).

Lodato, S. & P. Arlotta (2015). "Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex." *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**: 699-720.

Lois, C. & A. Alvarez-Buylla (1994). "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain." *Science* **264**(5162): 1145-1148.

Long, J. E., C. Swan, W. S. Liang, I. Cobos, G. B. Potter & J. L. Rubenstein (2009). "Dlx1 & Mash1 transcription factors control striatal patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways." *J Comp Neurol* **512**(4): 556-572.

Mahfouz, M. M. & F. A. Kummerow (2004). "Vitamin C or Vitamin B6 supplementation prevent the oxidative stress and decrease of prostacyclin generation in homocysteinemic rats." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(10): 1919-1932.

Majewska, M. D., J. A. Bell & E. D. London (1990). "Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate." *Brain Res* **537**(1-2): 328-332.

Martin, E. M. & R. C. Fry (2018). "Environmental Influences on the Epigenome: Exposure-Associated DNA Methylation in Human Populations." *Annu Rev Public Health* **39**: 309-333.

Martinez, F., M. Cifuentes, J. C. Tapia & F. Nualart (2019). "The median eminence as the hypothalamic area involved in rapid transfer of glucose to the brain: functional and cellular mechanisms." *J Mol Med (Berl)* **97**(8): 1085-1097.

Martinez-Cerdeno, V. & S. Noctor (2016). "Cortical Evolution Conference 2015." *J Comp Neurol* **524**(3): 431-432.

Martinez-Cerdeno, V. & S. C. Noctor (2016). "Cortical evolution 2015: Discussion of neural progenitor cell nomenclature." *J Comp Neurol* **524**(3): 704-709.

May, J. M., C. E. Cobb, S. Mendiratta, K. E. Hill & R. F. Burk (1998). "Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase." *J Biol Chem* **273**(36): 23039-23045.

McCarthy, M., D. H. Turnbull, C. A. Walsh & G. Fishell (2001). "Telencephalic neural progenitors appear to be restricted to regional and glial fates before the onset of neurogenesis." *J Neurosci* **21**(17): 6772-6781.

Melzer, S. & H. Monyer (2020). "Diversity and function of corticopetal and corticofugal GABAergic projection neurons." *Nat Rev Neurosci* **21**(9): 499-515.

Meredith, M. E., F. E. Harrison & J. M. May (2011). "Differential regulation of the ascorbic acid transporter SVCT2 during development and in response to ascorbic acid depletion." *Biochem Biophys Res Commun* **414**(4): 737-742.

Minor, E. A., B. L. Court, J. I. Young & G. Wang (2013). "Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine." *J Biol Chem* **288**(19): 13669-13674.

Mira, H.&J. Morante (2020). "Neurogenesis From Embryo to Adult - Lessons From Flies and Mice." Front Cell Dev Biol **8**: 533.

Mitoma, J., S. Furuya&Y. Hirabayashi (1998). "A novel metabolic communication between neurons and astrocytes: non-essential amino acid L-serine released from astrocytes is essential for developing hippocampal neurons." Neurosci Res **30**(2): 195-199.

Miyata, T. (2008). "Development of three-dimensional architecture of the neuroepithelium: role of pseudostratification and cellular 'community'." Dev Growth Differ **50 Suppl 1**: S105-112.

Miyata, T., A. Kawaguchi, H. Okano&M. Ogawa (2001). "Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons." Neuron **31**(5): 727-741.

Mo, Z.&N. Zecevic (2009). "Human fetal radial glia cells generate oligodendrocytes in vitro." Glia **57**(5): 490-498.

Molyneaux, B. J., P. Arlotta, J. R. Menezes&J. D. Macklis (2007). "Neuronal subtype specification in the cerebral cortex." Nat Rev Neurosci **8**(6): 427-437.

Montel-Hagen, A., L. Blanc, M. Boyer-Clavel, C. Jacquet, M. Vidal, M. Sitbon&N. Taylor (2008). "The Glut1 and Glut4 glucose transporters are differentially expressed during perinatal and postnatal erythropoiesis." Blood **112**(12): 4729-4738.

Mota, B.&S. Herculano-Houzel (2015). "BRAIN STRUCTURE. Cortical folding scales universally with surface area and thickness, not number of neurons." Science **349**(6243): 74-77.

Mrzljak, L., H. B. Uylings, C. G. Van Eden&M. Judas (1990). "Neuronal development in human prefrontal cortex in prenatal and postnatal stages." Prog Brain Res **85**: 185-222.

Nadarajah, B., J. E. Brunstrom, J. Grutzendler, R. O. Wong&A. L. Pearlman (2001). "Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex." Nat Neurosci **4**(2): 143-150.

Nagamatsu, S., J. M. Kornhauser, C. F. Burant, S. Seino, K. E. Mayo&G. I. Bell (1992). "Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization." J Biol Chem **267**(1): 467-472.

Najas, S., I. Pijuan, A. Esteve-Codina, S. Usieto, J. D. Martinez, A. Zwijsen, M. L. Arbones, E. Marti&G. Le Dreau (2020). "A SMAD1/5-YAP signalling module drives radial glia self-amplification and growth of the developing cerebral cortex." Development **147**(13).

Narayanan, R. T., D. Udvary&M. Oberlaender (2017). "Cell Type-Specific Structural Organization of the Six Layers in Rat Barrel Cortex." Front Neuroanat **11**: 91.

Nishikimi, M., R. Fukuyama, S. Minoshima, N. Shimizu&K. Yagi (1994). "Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man." J Biol Chem **269**(18): 13685-13688.

Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, R. S. Dammerman&A. R. Kriegstein (2001). "Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex." Nature **409**(6821): 714-720.

Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, W. S. Wong, B. K. Clinton&A. R. Kriegstein (2002). "Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia." J Neurosci **22**(8): 3161-3173.

Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic&A. R. Kriegstein (2004). "Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases." Nat Neurosci **7**(2): 136-144.

Nualart, F., A. Godoy&K. Reinicke (1999). "Expression of the hexose transporters GLUT1 and GLUT2 during the early development of the human brain." Brain Res **824**(1): 97-104.

Nualart, F., L. Mack, A. Garcia, P. Cisternas, E. R. Bongarzone, M. Heitzer, N. Jara, F. Martinez, L. Ferrada, F. Espinoza, V. Baeza&K. Salazar (2014). "Vitamin C Transporters,

Recycling and the Bystander Effect in the Nervous System: SVCT2 versus Gluts." J Stem Cell Res Ther **4**(5): 209.

Nualart, F., K. Salazar, K. Oyarce, P. Cisternas, N. Jara, C. Silva-Alvarez, P. Pastor, F. Martinez, A. Garcia, L. Garcia-Robles Mde&J. C. Tapia (2012). "Typical and atypical stem cells in the brain, vitamin C effect and neuropathology." Biol Res **45**(3): 243-256.

Nualart, F. J., C. I. Rivas, V. P. Montecinos, A. S. Godoy, V. H. Guaiquil, D. W. Golde&J. C. Vera (2003). "Recycling of vitamin C by a bystander effect." J Biol Chem **278**(12): 10128-10133.

Oberheim, N. A., S. A. Goldman&M. Nedergaard (2012). "Heterogeneity of astrocytic form and function." Methods Mol Biol **814**: 23-45.

Obernier, K., A. Cebrian-Silla, M. Thomson, J. I. Parraguez, R. Anderson, C. Guinto, J. Rodas Rodriguez, J. M. Garcia-Verdugo&A. Alvarez-Buylla (2018). "Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation." Cell Stem Cell **22**(2): 221-234 e228.

Ohtaka-Maruyama, C., K. Nakajima, A. Pierani&N. Maeda (2016). "Editorial: Mechanisms of Neuronal Migration during Corticogenesis." Front Neurosci **10**: 172.

Ohtsuka, T.&R. Kageyama (2019). "Regulation of temporal properties of neural stem cells and transition timing of neurogenesis and gliogenesis during mammalian neocortical development." Semin Cell Dev Biol **95**: 4-11.

Ortega, J. A., F. Memi, N. Radonjic, R. Filipovic, I. Bagasrawala, N. Zecevic&I. Jakovcevski (2018). "The Subventricular Zone: A Key Player in Human Neocortical Development." Neuroscientist **24**(2): 156-170.

Ortiz-Alvarez, G.&N. Spassky (2021). "One progenitor to generate them all: new evidence for multi-fated neural progenitors." Curr Opin Neurobiol **66**: 186-194.

Oyarce, K., C. Silva-Alvarez, L. Ferrada, F. Martinez, K. Salazar&F. Nualart (2018). "SVCT2 Is Expressed by Cerebellar Precursor Cells, Which Differentiate into Neurons in Response to Ascorbic Acid." Mol Neurobiol **55**(2): 1136-1149.

Padayatty, S. J., A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J. H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S. K. Dutta&M. Levine (2003). "Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention." J Am Coll Nutr **22**(1): 18-35.

Pastor, P., P. Cisternas, K. Salazar, C. Silva-Alvarez, K. Oyarce, N. Jara, F. Espinoza, A. D. Martinez&F. Nualart (2013). "SVCT2 vitamin C transporter expression in progenitor cells of the postnatal neurogenic niche." Front Cell Neurosci **7**: 119.

Pastore, P., T. Rizzetto, O. Curcuruto, M. D. Cin, A. Zaramella&D. Marton (2001). "Characterization of dehydroascorbic acid solutions by liquid chromatography/mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **15**(22): 2051-2057.

Pebworth, M. P., J. Ross, M. Andrews, A. Bhaduri&A. R. Kriegstein (2021). "Human intermediate progenitor diversity during cortical development." Proc Natl Acad Sci U S A **118**(26).

Penisson, M., J. Ladewig, R. Belvindrah&F. Francis (2019). "Genes and Mechanisms Involved in the Generation and Amplification of Basal Radial Glial Cells." Front Cell Neurosci **13**: 381.

Peterkofsky, B. (1991). "Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy." Am J Clin Nutr **54**(6 Suppl): 1135S-1140S.

Pixley, S. K.&J. de Vellis (1984). "Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin." Brain Res **317**(2): 201-209.

Pollard, S. M.&L. Conti (2007). "Investigating radial glia in vitro." Prog Neurobiol **83**(1): 53-67.

Potdar, P. D.&S. B. D'Souza (2010). "Ascorbic acid induces in vitro proliferation of human subcutaneous adipose tissue derived mesenchymal stem cells with upregulation of embryonic stem cell pluripotency markers Oct4 and SOX 2." Hum Cell **23**(4): 152-155.

Puelles, L.&J. L. Rubenstein (2003). "Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model." Trends Neurosci **26**(9): 469-476.

Qiao, H.&J. M. May (2008). "Development of ascorbate transporters in brain cortical capillary endothelial cells in culture." Brain Res **1208**: 79-86.

Qiu, S., L. Li, E. J. Weeber&J. M. May (2007). "Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity." J Neurosci Res **85**(5): 1046-1056.

Rahman, F., B. Bordignon, R. Culerrier, F. Peiretti, S. Spicuglia, M. Djabali, J. F. Landrier&M. Fontes (2017). "Ascorbic acid drives the differentiation of mesoderm-derived embryonic stem cells. Involvement of p38 MAPK/CREB and SVCT2 transporter." Mol Nutr Food Res **61**(5).

Rakic, P. (1972). "Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex." J Comp Neurol **145**(1): 61-83.

Rakic, P. (2003). "Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective." Glia **43**(1): 19-32.

Ransom, B. R.&C. B. Ransom (2012). "Astrocytes: multitasking stars of the central nervous system." Methods Mol Biol **814**: 3-7.

Rice, M. E. (2000). "Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain." Trends Neurosci **23**(5): 209-216.

Rivas, R. J.&M. E. Hatten (1995). "Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons." J Neurosci **15**(2): 981-989.

Ruan, X., B. Kang, C. Qi, W. Lin, J. Wang&X. Zhang (2021). "Progenitor cell diversity in the developing mouse neocortex." Proc Natl Acad Sci U S A **118**(10).

Rumsey, S. C., R. Daruwala, H. Al-Hasani, M. J. Zarnowski, I. A. Simpson&M. Levine (2000). "Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in Xenopus oocytes and isolated rat adipocytes." J Biol Chem **275**(36): 28246-28253.

Salazar, K., G. Cerda, F. Martinez, J. M. Sarmiento, C. Gonzalez, F. Rodriguez, M. Garcia-Robles, J. C. Tapia, M. Cifuentes&F. Nualart (2014). "SVCT2 transporter expression is post-natally induced in cortical neurons and its function is regulated by its short isoform." J Neurochem **130**(5): 693-706.

Salazar, K., F. Martinez, M. Perez-Martin, M. Cifuentes, L. Trigueros, L. Ferrada, F. Espinoza, N. Saldivia, R. Bertinat, K. Forman, M. J. Oviedo, A. J. Lopez-Gambero, C. Bonansco, E. R. Bongarzone&F. Nualart (2017). "SVCT2 Expression and Function in Reactive Astrocytes Is a Common Event in Different Brain Pathologies." Mol Neurobiol.

Salazar, K., M. Martinez, V. Ulloa, R. Bertinat, F. Martinez, N. Jara, F. Espinoza, E. R. Bongarzone&F. Nualart (2016). "SVCT2 Overexpression in Neuroblastoma Cells Induces Cellular Branching that is Associated with ERK Signaling." Mol Neurobiol **53**(10): 6668-6679.

Sanai, N., T. Nguyen, R. A. Ihrie, Z. Mirzadeh, H. H. Tsai, M. Wong, N. Gupta, M. S. Berger, E. Huang, J. M. Garcia-Verdugo, D. H. Rowitch&A. Alvarez-Buylla (2011). "Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy." Nature **478**(7369): 382-386.

Sapper, H., S. O. Kang, H. H. Paul&W. Lohmann (1982). "The reversibility of the vitamin C redox system: electrochemical reasons and biological aspects." Z Naturforsch C Biosci **37**(10): 942-946.

Savini, I., A. Rossi, C. Pierro, L. Avigliano&M. V. Catani (2008). "SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake." Amino Acids **34**(3): 347-355.

Sawamoto, K., H. Wichterle, O. Gonzalez-Perez, J. A. Cholfin, M. Yamada, N. Spassky, N. S. Murcia, J. M. Garcia-Verdugo, O. Marin, J. L. Rubenstein, M. Tessier-Lavigne, H.

Okano & Alvarez-Buylla (2006). "New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain." *Science* **311**(5761): 629-632.

Shen, Q., Y. Wang, J. T. Dimos, C. A. Fasano, T. N. Phoenix, I. R. Lemischka, N. B. Ivanova, S. Stifani, E. E. Morrisey & S. Temple (2006). "The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells." *Nat Neurosci* **9**(6): 743-751.

Shi, D. Q., I. Ali, J. Tang & W. C. Yang (2017). "New Insights into 5hmC DNA Modification: Generation, Distribution and Function." *Front Genet* **8**: 100.

Siegenthaler, J. A., A. M. Ashique, K. Zarbalis, K. P. Patterson, J. H. Hecht, M. A. Kane, A. E. Folias, Y. Choe, S. R. May, T. Kume, J. L. Napoli, A. S. Peterson & S. J. Pleasure (2009). "Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation." *Cell* **139**(3): 597-609.

Silva-Alvarez, C., K. Salazar, P. Cisternas, F. Martinez, S. Liour, N. Jara, R. Bertinat & F. Nualart (2016). "Apical Polarization of SVCT2 in Apical Radial Glial Cells and Progenitors During Brain Development." *Mol Neurobiol*.

Silva-Vargas, V., A. R. Maldonado-Soto, D. Mizrak, P. Codega & F. Doetsch (2016). "Age-Dependent Niche Signals from the Choroid Plexus Regulate Adult Neural Stem Cells." *Cell Stem Cell* **19**(5): 643-652.

Siqueira, M., D. Francis, D. Gisbert, F. C. A. Gomes & J. Stipursky (2018). "Radial Glia Cells Control Angiogenesis in the Developing Cerebral Cortex Through TGF-beta1 Signaling." *Mol Neurobiol* **55**(5): 3660-3675.

Sotiriou, S., S. Gispert, J. Cheng, Y. Wang, A. Chen, S. Hoogstraten-Miller, G. F. Miller, O. Kwon, M. Levine, S. H. Guttentag & R. L. Nussbaum (2002). "Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival." *Nat Med* **8**(5): 514-517.

Spassky, N., C. Goujet-Zalc, E. Parmantier, C. Olivier, S. Martinez, A. Ivanova, K. Ikenaka, W. Macklin, I. Cerruti, B. Zalc & J. L. Thomas (1998). "Multiple restricted origin of oligodendrocytes." *J Neurosci* **18**(20): 8331-8343.

Spassky, N., F. T. Merkle, N. Flames, A. D. Tramontin, J. M. Garcia-Verdugo & A. Alvarez-Buylla (2005). "Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis." *J Neurosci* **25**(1): 10-18.

Spector, R. & A. V. Lorenzo (1974). "Specificity of ascorbic acid transport system of the central nervous system." *Am J Physiol* **226**(6): 1468-1473.

Subashini, C., S. B. Dhanesh, C. M. Chen, P. A. Riya, V. Meera, T. S. Divya, R. Kuruvilla, K. Buttler & J. James (2017). "Wnt5a is a crucial regulator of neurogenesis during cerebellum development." *Sci Rep* **7**: 42523.

Subramanian, L., M. Bershteyn, M. F. Paredes & A. R. Kriegstein (2017). "Dynamic behaviour of human neuroepithelial cells in the developing forebrain." *Nat Commun* **8**: 14167.

Tajbakhsh, S., P. Rocheteau & I. Le Roux (2009). "Asymmetric cell divisions and asymmetric cell fates." *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 671-699.

Takahashi, T., B. Lord, P. C. Schulze, R. M. Fryer, S. S. Sarang, S. R. Gullans & R. T. Lee (2003). "Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes." *Circulation* **107**(14): 1912-1916.

Takahashi, T., J. P. Misson & V. S. Caviness, Jr. (1990). "Glial process elongation and branching in the developing murine neocortex: a qualitative and quantitative immunohistochemical analysis." *J Comp Neurol* **302**(1): 15-28.

Takanaga, H., B. Mackenzie & M. A. Hediger (2004). "Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23." *Pflugers Arch* **447**(5): 677-682.

Tamamaki, N., K. Nakamura, K. Okamoto & T. Kaneko (2001). "Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex." *Neurosci Res* **41**(1): 51-60.

Tarabykin, V., A. Stoykova, N. Usman & P. Gruss (2001). "Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression." *Development* **128**(11): 1983-1993.

Taverna, E., M. Gotz & W. B. Huttner (2014). "The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex." *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**: 465-502.

Tramontin, A. D., J. M. Garcia-Verdugo, D. A. Lim & A. Alvarez-Buylla (2003). "Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment." *Cereb Cortex* **13**(6): 580-587.

Tsukada, Y., J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M. E. Warren, C. H. Borchers, P. Tempst & Y. Zhang (2006). "Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins." *Nature* **439**(7078): 811-816.

Tsukaguchi, H., T. Tokui, B. Mackenzie, U. V. Berger, X. Z. Chen, Y. Wang, R. F. Brubaker & M. A. Hediger (1999). "A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters." *Nature* **399**(6731): 70-75.

Tveden-Nyborg, P. & J. Lykkesfeldt (2013). "Does vitamin C deficiency increase lifestyle-associated vascular disease progression? Evidence based on experimental and clinical studies." *Antioxid Redox Signal* **19**(17): 2084-2104.

Ulloa, V., M. Garcia-Robles, F. Martinez, K. Salazar, K. Reinicke, F. Perez, D. F. Godoy, A. S. Godoy & F. Nualart (2013). "Human choroid plexus papilloma cells efficiently transport glucose and vitamin C." *J Neurochem* **127**(3): 403-414.

Ulloa, V., N. Saldivia, L. Ferrada, K. Salazar, F. Martinez, C. Silva-Alvarez, R. Magdalena, M. J. Oviedo, H. Montecinos, P. Torres-Vergara, M. Cifuentes & F. Nualart (2019). "Basal Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 2 polarization in choroid plexus explant cells in normal or scorbutic conditions." *Sci Rep* **9**(1): 14422.

Vannucci, S. J., L. B. Seaman, R. M. Brucklacher & R. C. Vannucci (1994). "Glucose transport in developing rat brain: glucose transporter proteins, rate constants and cerebral glucose utilization." *Mol Cell Biochem* **140**(2): 177-184.

Vasile, F., E. Dossi & N. Rouach (2017). "Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain." *Brain Struct Funct* **222**(5): 2017-2029.

Vera, J. C., C. I. Rivas, J. Fischbarg & D. W. Golde (1993). "Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid." *Nature* **364**(6432): 79-82.

Villalba, A., M. Gotz & V. Borrell (2021). "The regulation of cortical neurogenesis." *Curr Top Dev Biol* **142**: 1-66.

Voigt, T. (1989). "Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes." *J Comp Neurol* **289**(1): 74-88.

Wang, T., K. Chen, X. Zeng, J. Yang, Y. Wu, X. Shi, B. Qin, L. Zeng, M. A. Esteban, G. Pan & D. Pei (2011). "The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner." *Cell Stem Cell* **9**(6): 575-587.

Weickert, C. S., M. J. Webster, S. M. Colvin, M. M. Herman, T. M. Hyde, D. R. Weinberger & J. E. Kleinman (2000). "Localization of epidermal growth factor receptors and putative neuroblasts in human subependymal zone." *J Comp Neurol* **423**(3): 359-372.

Weissman, T., S. C. Noctor, B. K. Clinton, L. S. Honig & A. R. Kriegstein (2003). "Neurogenic radial glial cells in reptile, rodent and human: from mitosis to migration." *Cereb Cortex* **13**(6): 550-559.

Wells, W. W., D. P. Xu, Y. F. Yang & P. A. Rocque (1990). "Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity." *J Biol Chem* **265**(26): 15361-15364.

Wu, H., Y. Wu, Z. Ai, L. Yang, Y. Gao, J. Du, Z. Guo & Y. Zhang (2014). "Vitamin C enhances Nanog expression via activation of the JAK/STAT signaling pathway." *Stem Cells* **32**(1): 166-176.

Wu, H.&Y. Zhang (2014). "Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions." Cell **156**(1-2): 45-68.

Yamasaki, M., K. Yamada, S. Furuya, J. Mitoma, Y. Hirabayashi&M. Watanabe (2001). "3-Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for l-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain." J Neurosci **21**(19): 7691-7704.

Yang, Y., K. Zhang, X. Chen, J. Wang, X. Lei, J. Zhong, J. Xian, Y. Quan, Y. Lu, Q. Huang, J. Chen, H. Ge&H. Feng (2019). "SVCT2 Promotes Neural Stem/Progenitor Cells Migration Through Activating CDC42 After Ischemic Stroke." Front Cell Neurosci **13**: 429.

Yin, R., S. Q. Mao, B. Zhao, Z. Chong, Y. Yang, C. Zhao, D. Zhang, H. Huang, J. Gao, Z. Li, Y. Jiao, C. Li, S. Liu, D. Wu, W. Gu, Y. G. Yang, G. L. Xu&H. Wang (2013). "Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals." J Am Chem Soc **135**(28): 10396-10403.

Young, J. I., S. Zuchner&G. Wang (2015). "Regulation of the Epigenome by Vitamin C." Annu Rev Nutr **35**: 545-564.

Yusa, T. (2001). "Increased extracellular ascorbate release reflects glutamate re-uptake during the early stage of reperfusion after forebrain ischemia in rats." Brain Res **897**(1-2): 104-113.

Zecevic, N. (2004). "Specific characteristic of radial glia in the human fetal telencephalon." Glia **48**(1): 27-35.

Zhang, J.&J. Jiao (2015). "Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis." Biomed Res Int **2015**: 727542.

Zhang, S., H. J. Wang, J. Li, X. L. Hu&Q. Shen (2020). "Radial Glial Cell-Derived VCAM1 Regulates Cortical Angiogenesis Through Distinct Enrichments in the Proximal and Distal Radial Processes." Cereb Cortex **30**(6): 3717-3730.

Zimmer, C., M. C. Tiveron, R. Bodmer&H. Cremer (2004). "Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons." Cereb Cortex **14**(12): 1408-1420.