



Propuesta de proyecto de investigación:  
Papel de RhoE como mecanismo  
molecular implicado en la regulación del  
plegamiento de la corteza cerebral en  
mamíferos durante el desarrollo

---

Trabajo de Fin de Grado

Autor: Marina Herrero Lorenzo

Tutor: Joaquim Egea Navarro

Titulación: Grado en Biotecnología

Curso: 2016-2017



# Índice

Agradecimientos:.....	IV
Resumen:.....	IV
Resum:.....	V
Abstract: .....	VI
<b>1. Introducción: .....</b>	<b>1</b>
1.1. Financiación de los proyectos .....	1
1.1.1. Financiación nacional:.....	1
1.1.2. Financiación Europea e Internacional:.....	2
1.1.3. Financiación privada: .....	3
1.2. Proyecto modelo:.....	3
<b>2. Objetivos:.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Metodología: .....</b>	<b>5</b>
<b>4. Desarrollo de la propuesta de proyecto:.....</b>	<b>6</b>
4.1. Antecedentes:.....	6
4.1.1. Plegamiento de la corteza cerebral: .....	6
4.1.2. RhoE: .....	11
4.2. Hipótesis inicial y objetivos:.....	13
4.3. Material y métodos:.....	14
4.3.1. Material:.....	14
4.3.2. Métodos: .....	15
4.4. Resultados que se espera obtener: .....	20
4.5. Plan de ejecución: .....	21
4.6. Planificación temporal: .....	22
4.7. Plan de difusión:.....	23
4.8. Aspectos éticos y de seguridad:.....	24
4.9. Presupuesto: .....	25
<b>5. Discusión:.....</b>	<b>27</b>
<b>6. Bibliografía: .....</b>	<b>28</b>

## **Agradecimientos:**

Quiero en primer lugar, agradecer al Dr. Joaquim Egea por haber sido un tutor y profesor excelente y por haberme ayudado en todo momento. Compartiendo sus conocimientos conmigo y por darme la oportunidad de aprender sobre el área que tanto me ha llamado la atención, la neurobiología molecular.

También quiero darles las gracias a todos mis compañeros, por ser unos grandes amigos y por haber estado mutuamente siempre que lo hemos necesitado.

Por último y lo más importante, quiero darle las gracias a mi familia, por darme apoyo día tras día para que consiga mis sueños y porque nada de esto lo podría haber conseguido sin ellos.

## **Resumen:**

Elaboración de una propuesta de proyecto de investigación científico competitivo que sigue el modelo I+D “Excelencia” 2017, requerido por el Programa estatal de fomento de la Investigación científica y técnica de Excelencia, buscando la financiación para la realización de una investigación de ciencia básica en el campo de la neurobiología molecular.

A lo largo de la evolución, el cerebro humano ha conseguido crecer gracias a la capacidad de plegamiento de la corteza cerebral. Hasta hace poco, se sabía que este hecho se debía al aumento del espacio, pero se ha descubierto que existen mecanismos que están detrás de estos procesos de plegamiento. Este plegamiento no se produce en todas las especies de mamíferos por lo que, estudiando las diferencias entre cerebros lisos y plegados, se puede dar con los mecanismos clave que participan en este proceso.

En esta propuesta de proyecto se quiere estudiar el papel de un tipo de proteína de la familia de las Rho GTPasas, llamada RhoE. Se sabe que esta molécula en animales con cerebro liso participa en la regulación de los procesos de migración de las neuronas y se piensa que puede estar también involucrado en el correcto desarrollo del plegamiento de la corteza cerebral.

Utilizando ratones mutantes de RhoE, se busca caracterizar el papel de RhoE en el desarrollo de surcos corticales. Para ello, también se determina la función de RhoE en la adhesión y proliferación en la corteza cerebral y su participación en la migración radial neuronal.

## Resum:

Elaboració d'una proposta de projecte d'investigació científic competitiu que segueix el model "I+D Excelencia" 2017 requerit pel "Programa estatal de fomento de la Investigación científica y técnica de Excelencia" amb el propòsit de buscar la financiació per la realització d'una investigació de ciència bàsica en el camp de la Neurobiologia molecular.

Al llarg de l'evolució, el cervell humà ha aconseguit créixer gracies a la capacitat de plegament de l'escorça cerebral. Fins fa ben poc, es sabia que aquest fet era degut al augment del espai, però s'ha descobert que existeixen mecanismes que estan darrere d'aquests processos de plegament. Aquest plegament no es produeix en totes les especies de mamífers per lo que, estudiant les diferencies entres cervells llisos y plegats, es poden donar amb els mecanismes clau que participen en aquest procés.

En aquesta proposta de projecte es vol estudiar el paper d'un tipus de proteïna de la família de les Rho GTPasa, anomenada RhoE. Es sap que aquesta molècula en animal amb cervell llis participa en la regulació dels processos de migració de les neurones i es pensa que pot estar també involucrada amb el correcte desenvolupament del plegament de l'escorça cerebral.

Utilitzant ratolins mutants de RhoE, es busca caracteritzar el paper de RhoE en el desenvolupament de solcs corticals. Per fer-ho, també es determina la funció de RhoR en l'adhesió i proliferació en la escorça cerebral i la seva participació en la migració radial neuronal.

## **Abstract:**

Elaboration of a proposal for a competitive scientific research project that follows the “I+D Excelencia 2017” model required by the “Programa estatal de fomento de la Investigación científica y técnica de Excelencia”, seeking funding for conducting basic science research in the field of molecular neurobiology.

Throughout the evolution, the human brain has been able to grow thanks to the capacity of folding of the cerebral cortex. Until recently, it was known that this fact was due to the increase of space, but it has been discovered that there are mechanisms that are behind these processes of folding. This folding does not occur in all species of mammals so, by studying the differences between smooth and folded brains, can be found with the key mechanisms involved in this process.

In this project proposal, we want to study the role of a type of protein of the Rho GTPase family called RhoE. It is known that this molecule in animals with smooth brain participates in the regulation of neuronal migration processes and is thought that it may also be involved in the correct development of folding of the cerebral cortex.

Using RhoE mutant mice, it seeks to characterize the role of RhoE in the development of cortical sulci. For this purpose, the role of RhoE in the adhesion and proliferation in the cerebral cortex and its participation in radial neuronal migration is also determined.

## 1. Introducción:

### 1.1. Financiación de los proyectos

En un contexto en el que la economía supone el eje central de todo desarrollo, es importante conocer las diferentes ayudas existentes a la hora de acometer un proyecto. Sin embargo, es necesario puntualizar que la financiación de proyectos es un entorno en constante cambio. Las convocatorias se renuevan constantemente, los programas y con ellos sus requisitos y presupuestos cambian de forma periódica (Pisuerga, 2009). Por ello, el estudio de las diferentes ayudas sirve de orientación a la hora de decidir qué tipo de financiación es acorde a nuestras expectativas o necesidades.

#### 1.1.1. Financiación nacional:

Nos encontramos con el Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación, por la Administración General del Estado. Este posee un Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia, cuyo objetivo es incentivar la generación de conocimientos científicos y tecnológicos, sin orientación temática previamente definida. Integrado en este programa, se encuentra el Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento. Tiene como objetivo promover mediante convocatorias altamente competitivas, la ejecución de proyectos de investigación básica (Ministerio de Economía y Competitividad, 2016b).

Con este subprograma puedes realizar diferentes proyectos:

- Proyectos I+D: destinados a actividades I+D+i, con una duración de 3-4 años.
- Proyectos “Explora Ciencia” y “Explora Tecnología”: destinados a actividades I+D+i, con una duración de 1-2 años.
- Acción de dinamización “Europa Excelencia”: ayudas para reconocer la participación en programas de excelencia del Consejo Europeo de Investigación.
- Acción de dinamización “Redes de Excelencia”: para fomentar la creación y consolidación de redes de investigación (Ministerio de Economía y Competitividad, 2016a).

También hay que nombrar al Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), el cual es al igual, un órgano convocante de ayudas y actuaciones que se encuadran en el Subprograma de Generación de conocimiento del Programa Estatal. Esta institución tiene una modalidad de actuación llamado Acción Estratégica en Salud para Proyectos de investigación en Salud (Instituto de Salud Carlos III, 2016). Busca fomentar la salud y el bienestar de la

ciudadanía, así como desarrollar los aspectos preventivos, diagnósticos, curativos, rehabilitadores y paliativos de la enfermedad (Instituto de Salud Carlos III, s. f.).

#### 1.1.1.1. *Financiación Autonómica:*

En los últimos años, desde las administraciones de las comunidades autónomas, se han elaborado numerosos planes regionales de investigación básica y del ámbito de la salud.

Entre ellos, uno de los más característicos es el Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI 2020), llevado a cabo por la Junta de Andalucía. En él se resalta la importancia del conocimiento científico como motor de la modernización y el cambio social en Andalucía, con base en la excelencia científica (Junta de Andalucía, 2016). Otro ejemplo es la Comunidad de Madrid, donde se aprobó el Plan Regional de Investigación Científica e Innovación Tecnología (PRICIT). Aquí el Gobierno madrileño fomenta el desarrollo de proyectos de I+D+i (Comunidad de Madrid, 2016).

#### 1.1.1.2. *Financiación Europea e Internacional:*

Desde 2007, el consejo Europeo de Investigación (*European Research Council, ERC*) busca financiar a largo plazo proyectos de investigadores excelentes, a fin de que lleven a cabo una investigación novedosa y potencialmente muy rentable, pero de alto riesgo (Horizonte2020, 2017). Posee un presupuesto para el período 2014-2020 de 13,1 mil millones de euros, que provienen del programa Horizonte 2020 (H2020). Este programa, un Programa de Investigación de la Unión Europea, apoya el liderazgo de la Unión Europea en materia de ciencia, incluyendo las actividades del ERC dentro de su gran presupuesto para Ciencia Excelente.

Hay diferentes ayudas según el tipo de investigador que requiera la financiación:

- “*Starting Grants*”: supone una verdadera oportunidad para que investigadores jóvenes con buenas ideas puedan convertirse en líderes de grupos de investigación. El Investigador requiere de la posesión de un título de doctor con antigüedad de entre 2 y 7 años.
- “*Consolidator grants*”: El Investigador requiere de la posesión de un título de doctor con antigüedad de entre 7 y 12 años.
- “*Advanced Grants*”: encaminado a investigadores senior con al menos 10 años de experiencia.



- “*Proof of Concept*”: brinda apoyo a proyectos ya financiados por el ERC en alguna convocatoria anterior (European Research Council, 2017)

También hay que mencionar centros internacionales como es el ejemplo de una gran entidad, el NIH (*National Institutes of Health*) en Estados Unidos. A día de hoy es uno de los centros más grandes del mundo en el campo de la investigación biomédica. Ofrece financiación para muchos tipos de becas en investigación y también en contratos y préstamos para la formación de los investigadores (National Institutes of Health, 2017).

### 1.1.3. Financiación privada:

Como hemos visto hasta ahora, la realización de un proyecto en el ámbito de I+D+i puede estar respaldada por numerosas opciones de financiación pública. No obstante, este tipo de financiación no siempre es viable, debido bien a que no se cumplan con los criterios requeridos o bien porque sea insuficiente.

Fuera del ámbito de la financiación pública, existen varias opciones de financiación privada. Podemos incluir en este apartado la obtención de financiación mediante recursos provenientes de la industria farmacéutica, empresas del sector biosanitario o de desarrollo tecnológico, fundaciones, mutuas, asociaciones, e incluso universidades existentes en este ámbito.

Sirvan de ejemplo, por su importancia y consolidación en el panorama de la investigación en nuestro país: La fundación La Marató TV3 en Cataluña, que proporciona ayudas para la financiación de proyectos de investigación Biomédica (Fundació La Marató de TV3, 2017). También, las convocatorias de las Fundaciones ligadas a las cajas de ahorro, como la Fundación mutua madrileña, la Fundación BBVA, la Fundación Banco Sabadell y la Fundación Caja Navarra.

## 1.2. Proyecto modelo:

Para la realización de este tipo de proyecto, se propone una propuesta que sigue el modelo y formulario establecido por una convocatoria competitiva seleccionada. Durante la elección de la entidad que ofrece dicha convocatoria adecuada y que se ajusta a la propuesta del proyecto elaborado, se ha tenido en cuenta la financiación que proporciona y el tipo de proyecto que busca.

La propuesta de este trabajo constará de un proyecto de investigación científico básico, ya que lo que se busca es aumentar los conocimientos en el campo de la neurociencia y poder entender mecanismos aún desconocidos. La elección de este tema se debe al

gran interés en el área de la Neurobiología Molecular y del Desarrollo, fruto de la realización de un período de prácticas en el grupo de investigación del investigador Joaquim Egea.

Se ha utilizado el procedimiento requerido por el ministerio para la obtención de financiación a nivel estatal-europeo en la Convocatoria de ayudas a Proyectos de I+D “Excelencia” del Subprograma de Generación de Conocimiento de 2017 (Programa Estatal de Fomento de la investigación Científica y Técnica de Excelencia). La entidad financiera elegida para el proyecto es adecuada ya que lo que se plantea es proponer una investigación de ciencia básica, que se realice a lo largo de 3 años.

A lo largo de la evolución, el cerebro humano, limitado por el cráneo que lo protege, ha conseguido crecer gracias a la capacidad de plegamiento de la corteza cerebral. Hasta hace poco, se sabía que este hecho se debía al aumento del espacio para llevar a cabo el pensamiento, la planificación o la percepción. Pero se ha descubierto que existen mecanismos que están detrás de estos procesos de plegamiento. Este plegamiento no se produce en todas las especies de mamíferos por lo que, estudiando las diferencias entre ambos tipos de cerebro (plegado y liso), se puede dar con los mecanismos clave que participan en este proceso. Durante el desarrollo del cerebro, las neuronas migran desde el lugar donde nacen del interior del cerebro, hasta la zona externa, la corteza.

En esta propuesta de proyecto se quiere estudiar el papel de un tipo de proteína de la familia de las Rho GTPasas, llamada RhoE. Se sabe que esta molécula en animales con cerebro liso participa en la regulación de los procesos de migración de las neuronas y se piensa que puede estar también involucrado en el correcto desarrollo del plegamiento de la corteza cerebral.

## **2. Objetivos:**

El objetivo principal de este trabajo es la elaboración de un proyecto de investigación básica cuyo resultado pueda llegar a representar un avance significativo del conocimiento, el cual a su vez produzca nuevas ideas e interrogantes, y así conseguir avanzar en ciencia y tecnología. El estudio de los mecanismos moleculares que controlan el plegamiento de la corteza cerebral, ayudará a la comprensión de los complejos procesos implicados en el desarrollo embrionario en mamíferos. A su vez, a largo plazo, podrá permitir comprender enfermedades causadas por malformaciones en el desarrollo cortical.

Buscando la confección de un proyecto de investigación científico de calidad, ambicioso y competitivo, que consiga obtener una financiación para conseguir proporcionar una prospectiva internacional beneficiosa para el país. Por tanto, se realizará una propuesta que cumpla con los criterios importantes de las líneas nacionales e internacionales de innovación, desarrollo e investigación.

La propuesta de investigación también se ciñe a cumplir los criterios de calidad y las decisiones estratégicas de la H2020 y de la Estrategia Española de Ciencia Tecnología e Innovación. Con la finalidad de permitir finalmente, la estabilización del grupo de investigación que desarrollará el proyecto, formado en 2014, y la integración de los Investigadores principales de la propuesta en el Sistema español de investigación.

### **3. Metodología:**

Este proceso de búsqueda y elaboración del trabajo de fin de grado se ha llevado a cabo durante el periodo comprendido entre abril y junio de 2017.

La información relacionada con el proyecto de investigación y sus posibles formas de financiación se han buscado a través de las páginas webs (European Research Council, 2017; Fundació Banc Sabadell, 2017; Fundació La Marató de TV3, 2017; Fundación BBVA, 2017; Fundación Caja Navarra, 2017; Fundación Mutua Madrileña, 2017; Horizonte2020, 2017; ISCIII, 2017; Junta de Andalucía, 2016; «Ministerio de Economía, Industria y Competitividad», 2017; National Institutes of Health, 2017) y programas (Instituto de Salud Carlos III, 2016; Ministerio de Ciencia y Tecnología, 2007; Ministerio de Economía y Competitividad, 2016), que ofrecen las propias entidades financieras para dar a conocer sus ayudas.

Se ha realizado una revisión bibliográfica con la ayuda de las principales fuentes y bases de datos biomédicas y biotecnológicas. La más utilizada ha sido la base de datos NBCI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando la literatura de PubMed. También se ha utilizado *Web of Science*, con la que se pueden reducir las búsquedas según la categoría relacionada con tu tema, en este caso *Neurosciences*. En menos ocasiones se ha utilizado *Nature* y *ScienceDirect*.

Se han aceptado los artículos más relevantes de los últimos años, desde 2010 hasta la actualidad, ya que el conocimiento científico tiende a renovarse en periodos de tiempo cortos. Todos los artículos están relacionados con el tema del proyecto de investigación y principalmente se han centrado en los que tratan sobre:

- Desarrollo embrionario de la corteza cerebral.
- Mecanismos implicados en el plegamiento de la corteza.
- Estudios sobre mecanismos celulares y moleculares implicados en el plegamiento de la corteza cerebral.
- Función de la proteína RhoE y su posible participación en el plegamiento de la corteza.

La búsqueda se ha realizado en inglés ya que es la lengua principal en la publicación de artículos científicos. Las palabras clave utilizadas para la búsqueda han sido:

- Desarrollo y plegamiento de la corteza cerebral: “folding cerebral cortex”, “development cortical folding”, “regulation cerebral cortex”, “mammalian cerebral cortex”.
- RhoE: “Rho GTPase neuronal migration”, “Rnd3 cortical development”, “RhoE development”.

De esta manera, se ha podido obtener una serie de artículos originales y revisiones publicados en revistas científicas, los cuales han sido útiles para la elaboración de los antecedentes.

Con la ayuda del programa informático Mendeley, se han recogido todos los artículos y documentos consultados y citados durante el proceso de elaboración del proyecto.

## **4. Desarrollo de la propuesta de proyecto:**

### **4.1. Antecedentes:**

#### **4.1.1. Plegamiento de la corteza cerebral:**

La corteza cerebral de mamíferos es un tejido laminar altamente organizado en 6 capas, que controla complejos comportamientos cognitivos (Hirota & Nakajima, 2017; Sun & Hevner, 2014). Está formado por trillones de neuronas excitatorias e inhibitorias exquisitamente interconectadas por una comunicación rápida y eficiente (Martínez & Borrell, 2015). El desarrollo cortical varía notablemente entre las especies de mamíferos, pudiendo dividirse en lisencefálicos (como los ratones), que tienen la superficie cortical lisa, y en girencefálicos (como los humanos, hurones y la mayoría de los primates), que presentan circunvoluciones en la corteza. Durante la evolución, el plegamiento cortical ha permitido que el cerebro de los mamíferos crezca de forma

notable en volumen y en vez de adoptar una conformación de tipo globo, se pliegue sobre sí misma, minimizando el volumen total del cerebro, a pesar de estar confinado dentro del cráneo. (Sun & Hevner, 2014). Evidencias recientes apoyan que los ancestros mamíferos placentarios eran girencefálicos y los lisencefálicos emergieron de forma secundaria (Borrell & Götz, 2014).

Además de minimizar el volumen cerebral, el plegamiento cortical tiene una importancia clave en la optimización de las conexiones cerebrales y organización funcional, y las alteraciones en el plegamiento cortical conllevan a alteraciones intelectuales severas y epilepsias intratables en humanos.

En muchos estudios se ha visto que ciertas moléculas y rutas de señalización, conservadas normalmente en los mamíferos, poseen papeles cruciales en la regulación del plegamiento cortical durante el desarrollo y difieren entre mamíferos lisencefálicos y girencefálicos (Fernández, Llinares-Benadero, & Borrell, 2016).

#### *4.1.1.1. Mecanismos celulares implicados en el plegamiento:*

En el embrión temprano, hay una única monocapa de células neuroepiteliales (NECs) en el primordio cortical. Las NECs están altamente polarizadas y unidas entre sí en el dominio apical (superficie interna de la vesícula telencefálica). Durante la fase de expansión se dividen simétricamente para autoamplificarse, aumentando exponencialmente su número. Estas son las células progenitoras fundadoras de la corteza cerebral y determinan el número final de neuronas corticales y el tamaño de la corteza madura, siendo ya mayor en el embrión humano que en el embrión de ratón. Por tanto, se ha visto que el aumento de la abundancia de NECs conduce a la expansión de la superficie y consecuentemente al plegamiento del neuroepitelio.

Al inicio de la neurogénesis, los NECs se convierten en células gliales radiales apicales (aRGC). Sufren migración nuclear intercinética y experimentan divisiones auto-amplificadoras, pero de forma asimétrica, dando lugar a aRGCs y a células progenitoras intermedias (IPCs). Las aRGCs, permanecen en el lado apical, formando la zona ventricular (VZ) y se acumulan formando la denominada fibra glial radial. Las IPCs, células progenitoras neurogénicas secundarias sin polaridad y sin migración, pero que generan la mayoría de las neuronas excitatorias corticales, forman la zona subventricular (SVZ). En la zona subventricular (SVZ), encontramos también células gliales radiales basales (bRGCs), que comparten similitudes con las aRGCs, pero no se auto-amplifican ni producen IPCs, pero son altamente neurogénicas (Fernández et al., 2016).

En especies girencefálicas, la abundancia de aRGCs es mucho mayor que en especies lisencefálicas, formando una VZ más extensa y tienen una SVZ varias veces más gruesa, la cual está subdividida en una subcapa subventricular interna (ISVZ) y una externa (OSVZ). Por tanto, contienen también una mayor cantidad de IPCs y de bRGCs que en especies lisencefálicas (De Juan Romero & Borrell, 2015; Martínez & Borrell, 2015).

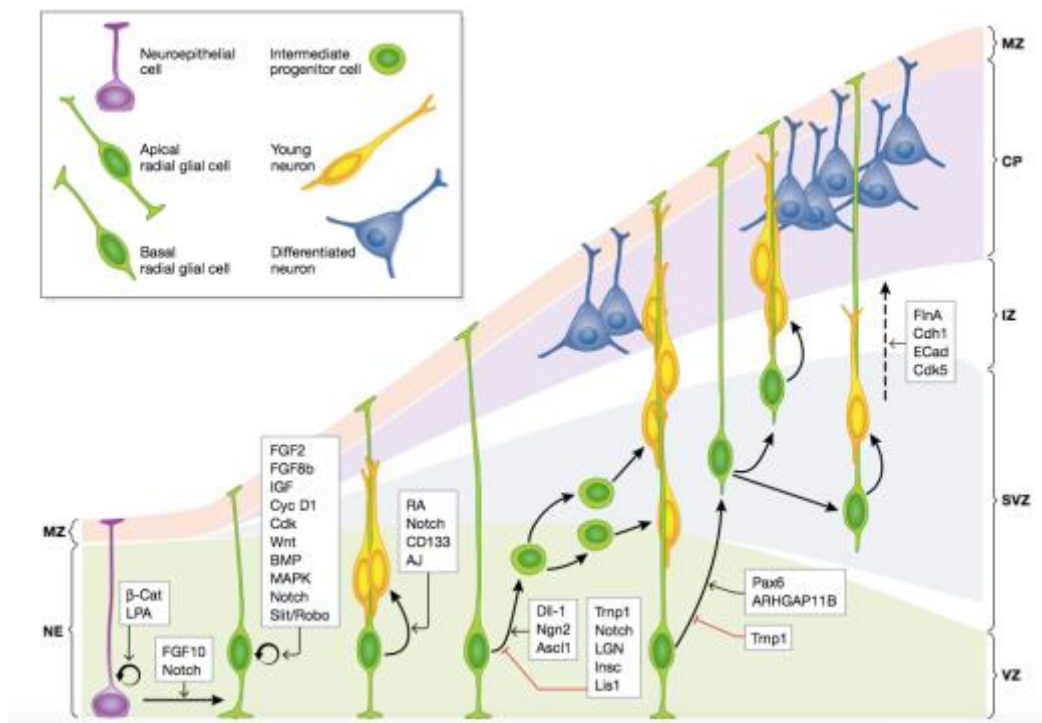


Figura 1: Tipos principales de células madre y sus relaciones de linaje en el desarrollo de la corteza cerebral girencefálica y su regulación molecular. MZ, zona marginal; CP, placa cortical; IZ, zona intermedia; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular (Fernández et al., 2016)

Por tanto, la OSVZ, que existe solo en especies girencefálicas y es rica en progenitores basales neurogénicos, siendo la mayoría bRGCs y una pequeña cantidad IPCs, se cree que tiene un papel clave en la neurogénesis y en el plegamiento de la corteza cerebral de los mamíferos superiores. Hay trabajos experimentales en hurón (girencefálico) que demuestran un aumento del plegamiento de la corteza, por la sobreproliferación forzada de progenitores en la OSVZ (Reillo, De Juan Romero, García-Cabezas, & Borrell, 2011).

Durante la migración radial, las neuronas excitatorias corticales viajan desde su capa de nacimiento hasta zonas próximas de la superficie cortical y forman nuevas capas. Las fibras gliales radiales se extienden perpendicularmente entre la superficie ventricular y pial de la corteza y son las que hacen de sustrato y guía para la migración radial de las neuronas.

En las cortezas lisencefálicas, las neuronas que nacen, ocupan posiciones vecinas y se acumulan en capas corticales de mayor grosor sin una separación lateral significativa. En cambio, en las cortezas girencefálicas, aparece la llamada divergencia tangencial. Hay un aumento significativo de fibras radiales al andamio preexistente, en forma de abanico que se expande basalmente, imponiendo divergencia a la migración radial de las neuronas corticales (Borrell & Götz, 2014). Las neuronas que migran radialmente no se amontonan en capas gruesas, sino que se distribuyen a lo largo de la corteza, aumentando su número y haciendo que la superficie pial esté expandida y sea mucho mayor que la ventricular (Fernández et al., 2016).

Esto se debe a la abundante proliferación de bRGCs en la OSVZ, teniendo esta zona un papel clave en la expansión tangencial y plegamiento de la corteza cerebral, y llega a ser la zona proliferativa predominante en el desarrollo de cerebros como el de los humanos (Zilles, Palomero-Gallagher, & Amunts, 2013), aunque los factores impulsores de este crecimiento son todavía desconocidos (Sun & Hevner, 2014). Esto se ha demostrado en varios laboratorios, donde bloqueando la proliferación de progenitores en OSVZ en corteza de hurón en desarrollo, conduce a una reducción del plegamiento cortical e incluso a una corteza lisencefálica (Poluch & Juliano, 2015). También, sobreproliferando las células progenitoras de OSVZ en hurón, se aumenta significativamente el plegamiento y área cortical (Toda, Shinmyo, Dinh Duong, Masuda, & Kawasaki, 2016).

#### *4.1.1.2. Regulación molecular de los mecanismos celulares en el plegamiento:*

En las primeras etapas del desarrollo cortical, la regulación de la auto-amplificación de las NECs a RGCs es llevado por varias cascadas de señalización. Una de ellas es la vía de la  $\beta$ -catenina, donde su activación de forma constitutiva en embriones de ratón conduce a la formación de surcos y giros similares a los de mamíferos superiores (Ohtaka-Maruyama & Okado, 2015). De forma contraria, la vía del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el ligando FGF10, termina con la amplificación de NEC reteniendo el destino final de las aRGC hacia progenitores basales. También la vía de señalización Notch promueve la transición de las NECs (Fernández et al., 2016).

Posteriormente, durante la amplificación de los progenitores, ligandos de la vía de FGF, FGF2 o FGF8b, impulsan la expansión cortical y consecuentemente el plegamiento de la corteza cerebral de especies lisencefálicas. Se ha visto que mediante inyección intraventricular de FGF2 durante el desarrollo cortical temprano en ratón se induce la formación de giros corticales, incrementando el crecimiento tangencial y radial (Rash,

Tomasi, Lim, Suh, & Vaccarino, 2013; Sun & Hevner, 2014), como también la sobreexpresión de FGF2 en especies girencefálicas como el hurón, provoca plegamientos adicionales (Masuda et al., 2015).

Otras vías de señalización importantes de la regulación de la proliferación de los progenitores corticales son las vías Cdk4-Ciclina D1, Wnt, BMP, MAPK y Notch, pero de momento, no se ha encontrado que ninguna induzca el plegamiento de la corteza en ratones (Sun & Hevner, 2014), excepto la sobreexpresión de Cdk4 y Ciclina D1 en corteza de hurón, sí que supone un aumento del área de la superficie y la formación de plegamientos corticales adicionales (Borrell & Götz, 2014; Nonaka-Kinoshita et al., 2013).

Recientemente, se ha identificado que la señalización del ácido retinoico (AR) en las membranas meníngeas, promueve la neurogénesis al tiempo que limita la amplificación de aRGC. Es una vía prometedora como importante regulador de la expansión y plegamiento cortical.

Respecto al linaje de las células progenitoras corticales, se ha visto que la formación de bRGCs a partir de aRGCs está controlado por la orientación del huso mitótico. En mamíferos este proceso está regulado por una serie de factores como LGN, Insc y Lis1. Otros mecanismos también implicados son proteínas relacionadas con las uniones adherentes apicales como Notch, Par3, Par6 y prominin-1 (CD133) (Fernández et al., 2016).

Se ha identificado la proteína *Trnp1* como un regulador dinámico del control de la expansión radial y tangencial en la corteza cerebral en mamíferos. Se ha demostrado que en cortezas lisencefálicas de ratón, altos niveles de *Trnp1* promueven la expansión tangencial y bajos niveles de *Trnp1*, promueven la expansión radial debido a un aumento de bRGCs. Esto provoca plegamiento en la corteza lisa del ratón (Stahl et al., 2013; Sun & Hevner, 2014).

Recientemente se ha identificado otro gen que provoca el plegamiento de la corteza de ratón, denominado ARHGAP11B. Su expresión en embriones de ratón conduce a la amplificación masiva de bRGCs, traducándose en plegamientos de la corteza cerebral de ratón (Florio et al., 2015).



#### 4.1.2. RhoE:

La hipótesis que prevalece propone que es la combinación de la amplificación de los progenitores basales con la divergencia de la migración radial la que contribuye en la expansión de la corteza en los ejes radiales y tangenciales y que provoca el plegamiento.

Se ha identificado la vía de adhesión de moléculas FLRT como un posible regulador. La delección de las moléculas de adhesión FLRT1 y FLRT3 en ratones da lugar al desarrollo surcos corticales macroscópicos durante la embriogénesis (del Toro et al., 2017). Esto sugiere que la adhesión intercelular puede ser una pieza clave como regulador del plegamiento cortical en las especies.

También están implicadas proteínas del citoesqueleto que controlan los movimientos de las neuronas. Mutaciones en este tipo de proteínas dan lugar a defectos en la migración neuronal. Entre los reguladores del citoesqueleto, uno de los factores más prominentes son las proteínas de la familia de las Rho GTPasas, las cuales se han convertido en importantes partícipes de la neurogénesis.

##### 4.1.2.1. Familia de las Rho GTPasas en el desarrollo del cerebro:

La familia de las Rho GTPasas y por extensión de la superfamilia Ras, funcionan como interruptores moleculares ciclando entre el estado inactivo (cargadas con GDP) y el activo (cargadas con GTP) (Iturrioz Rodríguez, 2013). Su actividad puede estar positivamente influenciada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs, *Guanine exchange factors*) o negativamente influenciada por proteínas activadoras de GTPasas (GAPs, *GTPase-activating protein*) (Govek, E. Hatten, & Vn Aelst, 2011).

Las Rho GTPasas se sabe que controlan la reorganización del citoesqueleto (Menna, Cardama, Comin, Alonso, & Gomez, 2010) y están implicadas en una cantidad de mecanismos neurales, incluidos la proliferación de los neuroblastos, la extensión de las neuritas, el crecimiento y regeneración de los axones y en concreto, son críticos reguladores de los pasos clave en la migración celular (Ballester-Lurbe et al., 2014; Govek et al., 2011; Ohtaka-Maruyama & Okado, 2015).

Al menos 22 miembros de la familia Rho en mamíferos han sido identificados y los más descritos son: Rho (A, B y C), Rac (1, 2 y 3), Cdc42, RhoD, RhoG, RhoH/TTF, TC10, y Rnd (1, 2 y 3). Las proteínas Rnd, en concreto, son unas de las proteínas más atípicas y menos estudiadas de la familia de las Rho GTPasas, que tienen baja actividad GTPasa

y se piensa que están constitutivamente activas en la célula. Rnd1, Rnd2 y Rnd3/RhoE son los tres miembros de esta familia y se ha visto que regulan la formación de la neurita, la extensión axonal, el desarrollo dendrítico y también el ciclo celular (Pacary, Azzarelli, & Guillemot, 2013).

#### *4.1.2.2. RhoE: función celular, molecular y migración:*

Rnd3/RhoE es un miembro atípico de la familia de las Rho GTPasas con bajo nivel de actividad GTPasa. Se supone que está siempre en forma activa, unida a GTP.

Respecto a la regulación de la función de la actina, RhoE se une y activa a p190 Rho-GAP, que es un supresor de la actividad RhoA GTPasa, causando la inhibición de RhoA (Ohtaka-Maruyama & Okado, 2015). RhoA es un activador de ROCK-I, que cuando está activo promueve la contracción de la actina, provocando la inhibición del crecimiento y migración axonal (Talens-Visconti, Peris, Guerri, & Guasch, 2010).

RhoE aparentemente tiene dos funciones principales: regula el citoesqueleto y participa en el ciclo celular. En el sistema nervioso, RhoE está implicado en la inducción de la proliferación de las neuritas, en la migración de las neuronas corticales y en la regulación de los pasos tempranos y tardíos de la migración radial (Ohtaka-Maruyama & Okado, 2015). Recientemente, se ha visto que la expresión de RhoE está regulado por el factor de transcripción *Ascl1/Mash1* en la VZ y SVZ, que potencia la migración radial (Pacary et al., 2011).

Esta migración es llevada por el control de la locomoción en la placa cortical y la migración nuclear intercinética de las células madre gliales radiales, interrumpiendo su unión apical y modificando la orientación de su plano de división (Pacary et al., 2013). Por tanto, se ha visto mediante la experimentación en ratones, que RhoE es esencial para el correcto desarrollo de las células de la SVZ. La consecuencia de la ausencia de RhoE, es el incremento de la proliferación de neuroblastos en la SVZ y la reducción de las capacidades de migración celular (Ballester-Lurbe et al., 2014).

#### *4.1.2.3. Posible regulador del plegamiento de la corteza:*

Como se ha visto en estudios anteriores, Rnd3/RhoE ejerce funciones pleiotrópicas en los primeros pasos de la neurogénesis cortical mediante el uso de diferentes mecanismos en las células gliales radiales y en los progenitores basales (Pacary et al., 2013). Por tanto, la proteína Rnd3/RhoE puede ser un posible regulador del plegamiento de la corteza.

## 4.2. Hipótesis inicial y objetivos:

Resultados anteriores han puesto de manifiesto la importancia de entender el desarrollo del cerebro. La existencia de trastornos neurológicos asociados a alteraciones en el plegamiento cortical relacionadas con las deficiencias en genes que controlan estos procesos de plegamiento. El estudio de los mecanismos celulares y moleculares que controlan el plegamiento cortical ayudará a la comprensión de aspectos del desarrollo cortical críticos durante la embriogénesis. Se ha visto que la adhesión intercelular de la migración cortical neuronal es un factor clave en el plegamiento de la corteza cerebral y que la proteína RhoE ejerce funciones pleiotrópicas en los primeros pasos de la neurogénesis cortical.

Esto ha llevado a la hipótesis de que RhoE participa en la regulación molecular del desarrollo del cerebro y se ha sugerido que puede participar en el plegamiento de la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario en mamíferos.

Por tanto, de acuerdo a la hipótesis inicial, el objetivo general de esta propuesta de proyecto es caracterizar y describir el papel molecular de la proteína RhoE durante la regulación del plegamiento cortical en el cerebro de mamíferos durante el desarrollo.

Los objetivos específicos serán:

Objetivo 1 (O.1): Comparación del nivel de expresión de RhoE en segmentos de la corteza cerebral de embriones de hurón (cerebro girencefálico) y en la corteza cerebral de embriones de ratón (cerebro lisencefálico).

Objetivo 2 (O.2): Caracterización del posible desarrollo de surcos y giros corticales macroscópicos en ratones knock-out (KO) y condicionales de RhoE.

Objetivo 3 (O.3): Determinación de la adhesión y proliferación en la corteza cerebral de embriones de ratones KO de RhoE.

Objetivo 4 (O.4): Caracterización de la participación de RhoE en la migración radial neuronal mediante el estudio en ratones KO de RhoE y ratones wild type (WT) por electroporación *in utero*.

### 4.3. Material y métodos:

#### 4.3.1. Material:

Todos los grupos de investigación adscritos al IRBLLEIDA, grupos de la Universitat de Lleida, Hospital Universitario Arnau de Vilanova (HUAV) y otras instituciones, disponen de dos edificios, denominados Biomedicina I y Biomedicina II, situados junto al HUAV, con el fin de facilitar la conexión entre la clínica y las investigaciones básicas.

Biomedicina I y II proporciona a los grupos de investigación equipos de laboratorio nuevos, y en el caso de nuestro grupo, disponemos de suficiente espacio de laboratorio para albergar 5 investigadores activos.

Nuestro laboratorio cuenta con todos los dispositivos pequeños necesarios (frigoríficos, congeladores, centrifugadoras, baños de agua, agitadores, cámaras de electroforesis para el análisis de ADN y proteínas, aparatos de transferencia, fuentes de alimentación...) para realizar el trabajo rutinario necesario para la metodología propuesta. Además, nuestro laboratorio cuenta con equipos específicos que son necesarios para el desarrollo de algunos aspectos propuestos, incluyendo estereoscopios para la disección de embriones.

El IRBLLEIDA alberga equipos e infraestructuras comunes que están disponibles para todas las investigaciones y que serán ampliamente utilizados para esta propuesta de proyecto: máquinas de PCR, un área de histología con criostatos, vibrátomos y micrótomos, sistemas de imagen de ADN y Western-blot, microscopios (epifluorescencia y confocal), salas de cultivo de tejidos (cultivo de tejidos primarios y líneas celulares), ultra-congeladores, cámaras frigoríficas y ultracentrífugas. Por último, otras instalaciones de la Universitat de Lleida, relevantes para esta propuesta, se encuentran en el IRBLLEIDA o próximos a él, como un estabulario SPF (*Specific Pathogen Free*) y un servicio de transgénicos para la generación de ratones modificados genéticamente. El IRBLLEIDA y la Universitat de Lleida apoyan la investigación con personal que se encarga de la limpieza básica, así como técnicos más especializados para tareas avanzadas. En general, el material, las infraestructuras, los equipos generales y específicos y el apoyo técnico prestado por el IRBLLEIDA y la Universitat de Lleida garantizan el logro de los objetivos planteados en la propuesta.

Además, hasta ahora, la atmósfera de trabajo del IRB LLEIDA nos ha permitido utilizar dispositivos de otros laboratorios como el electroporador y los electrodos, necesarios para la electroporación *in utero* de los cerebros embrionales de ratón. Sin embargo, para

la presente propuesta consideramos que sería conveniente adquirir nuestro propio electroporador y conjunto de electrodos. En consecuencia, hemos citado este gasto en el presupuesto del proyecto.

#### 4.3.2. Métodos:

##### **Objetivo 1 (O.1): Comparación del nivel de expresión de RhoE en segmentos de la corteza cerebral de embriones de hurón (cerebro girencefálico) y en la corteza cerebral de embriones de ratón (cerebro lisencefálico).**

En nuestros estudios previos, se vio fenotípicamente que la ablación de RhoE produjo la formación de surcos en el neocortex liso de ratón. Nosotros proponemos analizar la expresión de RhoE en especies girencefálicas como en el hurón y compararla con la expresión de RhoE en especies lisencefálicas como el ratón. Planteamos la hipótesis de que los niveles de expresión de RhoE pueden ser generalmente más bajos en especies girencefálicas para permitir el plegamiento que en especies lisencefálicas y una abundancia relativamente más baja en el área de los surcos que en el de los giros en especies girencefálicas.

##### O.1.1. Nivel de expresión de RhoE en especies lisencefálicas:

Disponemos de una línea de ratones knock-out de RhoE, RhoE<sup>gt/gt</sup> (gt: gene-trap). El casete del gene-trap tiene un gen reportero lacZ, por lo que los ratones RhoE<sup>gt/gt</sup> tienen el gen lacZ insertado en el locus de RhoE, bajo el control de la región reguladora del gen RhoE.

Se realizan tinciones enzimáticas en segmentos de la corteza cerebral de embriones de ratón mediante la actividad de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal), la cual es codificada por el gen lacZ. Mediante técnicas *in situ* incubándose con el sustrato X-gal de la  $\beta$ -gal, dando una coloración azul en las células con actividad lacZ, permitiendo la identificación de la expresión de RhoE en los segmentos de la corteza. Las secciones cerebrales son teñidas con *Nuclear Fast Red* para dar contraste en tinciones azules de células progenitoras neurales.

También, se realizarán inmunofluorescencias en secciones de cortezas cerebrales embrionarias de ratones wild type, para ver el nivel de expresión y localización de RhoE. Se utiliza como anticuerpo primario, anti-RhoE, como anticuerpo secundario fluorescente, el marcado por el protocolo y para la visualización del núcleo, las secciones de cerebro son incubadas con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Las imágenes son hechas por un microscopio de fluorescencia y analizadas por *ImageJ*.

### O.1.2. Nivel de expresión de RhoE en especies qirencefálicas:

Disponemos de hurones pigmentados (*Mustela putorius furo*) obtenidos gracias a la colaboración con el grupo de Neurogénesis y expansión cortical del Dr. Víctor Borrell del Instituto de Neurociencias de Alicante.

Analizamos la expresión de RhoE en segmentos de la corteza cerebral de hurones antes de la distinción morfológica de los giros y surcos, en la etapa post-natal (P), P0. Se realizan técnicas de ISH (*in situ hybridization*) para RhoE para revelar la localización y nivel de expresión de RhoE. Las sondas se diseñan mediante la base de datos Ensembl.org, se sintetizan y se etiquetan con digoxigenina (DIG). Segmentos de cerebro son hibridados con las sondas de cRNA-DIG. Para la visualización las secciones se incuban con solución NBT-BCIP y se toman imágenes digitales usando el software ImageJ. Se realizan dos mediciones por cada sección y se toman 3 secciones por cada embrión analizado.

### **Objetivo 2 (O.2): Caracterización del posible desarrollo de surcos y giros corticales macroscópicos en ratones knock-out (KO) y condicionales de RhoE.**

Nuestra hipótesis sugiere que RhoE tiene un papel clave en la formación de la corteza lisa en especies lisencefálicas y que, por tanto, la ablación del gen RhoE en animales como el ratón puede dar lugar a la formación de surcos y giros.

#### O.2.1. Comprobar que los ratones KO de RhoE desarrollan surcos corticales:

Vamos a realizar un estudio que consiste en la inspección detallada de numerosas cortezas de cerebro de ratones KO de RhoE a diferentes etapas del desarrollo embrional (E), en E15,5 y E17,5 y en la etapa P1. En primer lugar, se examinarán secciones de corteza cerebral E15,5 y E17,5 de ratones RhoE<sup>gt/gt</sup>. En segundo lugar, se buscará también la presencia de surcos en etapas postnatales de ratones KO de RhoE, para comprobar que estas estructuras no son transitorias en las etapas embrónicas. Se examinarán secciones de cerebros de ratones KO de RhoE en P1.

Se efectuarán tinciones por inmunohistoquímica de las secciones de corteza cerebral con X-gal y con un marcador nuclear *Nuclear Fast Red*. La caracterización se llevará a cabo observando los diferentes grados de formación de surcos en la placa cortical. También se hará por inmunofluorescencia tinciones con anticuerpos anti-Cux1 y anti-Ctip2 para distinguir la capa superior e inferior de la placa cortical, respectivamente.

Se calculará la penetrancia del plegamiento cortical de todos los segmentos analizados en las diferentes etapas embrónicas y postnatales de cada genotipo.

### O.2.2. Comprobar que ratones condicionales de RhoE desarrollan surcos corticales:

Como complemento al O.1.1, se va a repetir el experimento utilizando en vez de la línea de ratones RhoE<sup>gt/gt</sup>, una línea de ratones condicionales para el gen RhoE (cKO RhoE). Esta línea está disponible ya que ha sido obtenida anteriormente en el laboratorio, mediante el cruzamiento de ratones con las regiones *loxP* flanqueando el gen RhoE (RhoE<sup>fl/fl</sup>) y ratones con el gen de la recombinasa Cre, bajo un promotor específico, *Emx1*, activo en las regiones del desarrollo cerebral incluida la corteza cerebral.

Esta línea de ratones cKO RhoE, permite la delección de RhoE en solo unas cuantas neuronas, permitiendo la caracterización de este nuevo fenotipo en las secciones de cerebro mediante las tinciones de inmunohistoquímica, como en el objetivo O.2.1.

### **Objetivo 3 (O.3): Determinación de la adhesión y proliferación en la corteza cerebral de embriones de ratones KO de RhoE.**

#### O.3.1. Análisis de la proliferación celular en secciones de cerebro a diferentes etapas del desarrollo cortical:

El primer paso hacia el entendimiento de los mecanismos implicados en el plegamiento cortical en cerebros de ratones consiste en analizar la proliferación celular comparando entre secciones de corteza cerebral de ratones KO de RhoE y ratones *wild type* en diferentes etapas del desarrollo cortical.

La distribución y fenotipo de las células en proliferación o división se analiza mediante técnicas de inmunofluorescencia en secciones de corteza. Es visualizado usando anticuerpos contra la fosfoquinasa (PH3), que marca las células en mitosis, ki-67, que se expresa en células en división. Además, también se combina con un marcador nuclear, como DAPI y con anticuerpos contra Pax6 y Tbr2 que determinan los límites entre las regiones proliferativas. Pax6 y Tbr2 cuantifican el número de progenitores apicales y basales, respectivamente.

También se realiza un análisis del número de progenitores proliferativos usando tinción inmunohistoquímica de bromodeoxiuridina (BrdU). Es un análogo de la timidina, que se incorpora durante la fase S del ciclo celular. A las ratonas embarazadas se les inyecta intraperitonealmente BrdU disuelto en PBS antes de ser sacrificadas y se estudia con la incubación con anti-BrdU.

Esto sugerirá si el desarrollo de los surcos corticales depende o no de los cambios en la proliferación celular.

### O.3.2. Análisis de la adhesión en secciones de cerebro a diferentes etapas del desarrollo cortical:

Se quiere analizar si la pérdida de RhoE da lugar a dispersión gradual de las uniones adherentes en el desarrollo de la corteza cerebral de mamíferos lisencefálicos, como los ratones.

El estudio se realiza al igual que en la determinación de la proliferación, mediante técnicas de inmunofluorescencia, contra proteínas de uniones adherentes, como  $\beta$ -catenina, cadherinas o F-actina. Permiten visualizar las características de los patrones de uniones adherentes. Utilizaremos para ello anticuerpos primarios contra  $\beta$ -catenina y los filamentos de F-actina son visualizados usando faloidina unida a rodamina.

**Objetivo 4 (O.4): Caracterización de la participación de RhoE en la migración radial neuronal mediante el estudio en ratones KO de RhoE y ratones wild type (WT) por electroporación *in utero*.**

### O.4.1. Determinar si la formación de surcos está correlacionada con cambios en la migración radial y la carencia de RhoE influye en la velocidad de migración:

Previamente, se ha sugerido que RhoE puede participar en la migración neuronal directamente ya que afecta al citoesqueleto durante la migración de las neuronas.

Para comprobar estas posibilidades, vamos a estudiar *in vivo* a embriones de ratonas embarazadas usando la técnica de electroporación *in utero*. Esta aproximación permite la visualización de la migración neuronal marcada fluorescentemente y su manipulación genética en un ambiente natural. Los embriones son electroporados en la etapa E14.

Utilizaremos una línea de ratones RhoE<sup>fl/fl</sup>, obtenida por EUCOMM (Genoway). Estos ratones, tienen insertado las secuencias específicas *loxP* en la región flanqueante del gen RhoE que queremos noquear. Una recombinasa llamada Cre, es capaz de reconocer las secuencias *loxP* que flanquean a nuestro gen y eliminar su expresión.

Primero, se electropora unas construcciones formadas por plásmidos pCAG-CreGFP con el promotor CAG unido a Cre-Green Fluorescent Protein (GFP) o solo unido con GFP (será el control), en la corteza cerebral de embriones de una línea de ratones RhoE<sup>fl/fl</sup>.

Esto consigue eliminar RhoE en unas cuantas células y durante los procesos de desarrollo, las células electroporadas con CreGFP se deberían distribuir a lo largo de toda la corteza, diferenciándose y migrando hacia la placa cortical (CP).



Tres días después de la electroporación se realizan análisis de la corteza, examinando los niveles de expresión de RhoE, mediante la cuantificación de la proporción de células marcadas con GFP (GFP+). Se cuenta el número de células en cada capa de la corteza (VZ, SVZ, CP) y se representa como porcentaje sobre el número total de células electroporadas.

De esta manera se podrá determinar no solo la eficacia de la migración neuronal, sino también si las neuronas con ausencia de RhoE tienen una migración más rápida o más lenta. Si existe una proporción significativamente mayor de células GFP positivas (GFP+) en la capa más superior de corteza cerebral (correspondiendo a la placa cortical, PC) confirmará una migración aparentemente más rápida.

Las secciones de embriones son analizadas en un microscopio confocal. La cuantificación de células se realiza con *ImageJ CellCounter* y los resultados son analizados por *GraphPad Prism 6.0*.

Tabla 1: Lista de anticuerpos y diluciones utilizadas para inmunohistoquímica.

RECURSOS	CASA COMERCIAL	IDENTIFICADOR
<b>Anticuerpos primarios para inmunofluorescencia</b>		
Anti-Cux1 rabbit	Santa Cruz	SC-13024
Anti-RhoE mouse	Millipore	05-723
Anti-Ctip2 rat	Abcam	AB18465
Anti-Histona H3 rat	Abcam	AB10543
Anti-ki67 rabbit	ThermoFisher	PA5-19462
Anti-Pax6 rabbit	BioLegend	901301
Anti-Tbr2 rabbit	Abcam	AB23345
Anti-BrdU rat	Abcam	AB6326
Anti- $\beta$ catenina rabbit	Sigma	C2206
<b>Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia</b>		
De acuerdo a los protocolos de cada casa comercial (Jackson ImmunoResearch)		
<b>Químicos, péptidos y proteínas recombinantes</b>		
BrdU	Sigma-Aldrich	B5002
DAPI	Sigma-Aldrich	D9542
Nuclear Fast Red	Sigma-Aldrich	N3020
Faloidina-rodamina	ThermoFisher	R415
X-gal	ThermoFisher	B1690

Tabla 2: Lista de organismos utilizados como modelo en experimentación.

ORGANISMO	ORIGEN
Modelos de experimentación: Organismos/Raza	
Ratón: Wild type	Ya disponible
Ratón: RhoE gt/gt	Ya disponible
Ratón: RhoE fl/fl	EUCOMM
Ratón: Emx1-Cre	Ya disponible
Hurón pigmentado: <i>Mustela putorius furo</i>	Dr. Victor Borrell

#### 4.4. Resultados que se espera obtener:

##### OBJETIVO 1:

Hito 1 (H1): Demostrar que, en la corteza de hurón, los niveles de expresión de RhoE son menos abundantes en los prospectivos surcos que en las áreas de giro.

Hito 2 (H2): Demostrar que se expresa un nivel más bajo de RhoE en la corteza de especies girencefálicas que en la corteza de especies lisencefálicas que en la corteza de ratón.

##### OBJETIVO 2:

Hito 3 (H3): Demostrar que la ablación de RhoE en ratones, promueve la formación de surcos en su corteza lisencefálica, observable fenotípicamente.

Hito 4 (H4): Comprobar que RhoE tiene una función clave en la formación de la corteza lisa en especies lisencefálicas.

Entregable 1 (E1): Publicación de los resultados obtenidos en revistas de mayor impacto.

##### OBJETIVO 3:

Hito 5 (H5): Determinar si el desarrollo de los surcos corticales regulado por la proteína RhoE, depende o no de los cambios en la adhesión celular.

Hito 6 (H6): Determinar si el desarrollo de los surcos corticales regulado por la proteína RhoE, depende o no de los cambios en la proliferación celular.

Entregable 2 (E2): Publicación de los resultados obtenidos en revistas de mayor impacto.

#### **OBJETIVO 4:**

Hito 7 (H7): Caracterizar la influencia de RhoE en la velocidad de migración

Entregable 3 (E3): Publicación de los resultados obtenidos en revistas de mayor impacto.

#### **4.5. Plan de ejecución:**

El personal de nuestro equipo de investigación está integrado por 5 investigadores: Investigador principal 1 (doctor), IP1; Investigador principal 2 (doctor), IP2; Investigador predoctorado 1 (Estudiante de doctorado con máster), PHD1; Investigador predoctorado 2 (Estudiante de doctorado con máster), PHD2; Estudiante colaborador (Estudiante máster graduado), EC.

El plan de ejecución para la resolución de la propuesta de proyecto está comprendido a lo largo de 3 años (12 trimestres) y el personal está repartido, para que se lleven a cabo todos los objetivos.

**Objetivo 1 (O.1) (IP1, EC, PHD1):** Comparación del nivel de expresión de RhoE en segmentos de la corteza cerebral de embriones de hurón (cerebro girencefálico) y en la corteza cerebral de embriones de ratón (cerebro lisencefálico). El responsable de este objetivo es el IP1. El estudio del nivel de expresión de RhoE en especies lisencefálicas se realizará durante el primer año (T1-T4) y los participantes serán IP1 y EC. De forma paralela, durante el primer año (T1-T4), también se realizará el estudio del nivel de expresión de RhoE en especies girencefálicas y los participantes serán IP1 y PHD1. Se espera obtener el H1 y el H2 durante el final del primer año (T4).

**Objetivo 2 (O.2) (IP1, IP2, PH1, PH2):** Caracterización del posible desarrollo de surcos y giros corticales macroscópicos en ratones knock-out (KO) de RhoE. Los responsables de este objetivo son el IP1 y el IP2. Se comenzará a principios del segundo año (T5-T8) con la caracterización en secciones de corteza cerebral de ratones E15,5 y E17,5 (T5-T6). En este primer semestre participarán el IP1 y el PH1 y en el segundo semestre del segundo año, se hará la caracterización en secciones de corteza cerebral de ratones P1 y los cálculos de la penetrancia de cada caracterización (T7-T8), realizado por el IP2 y el PH2. Durante el segundo semestre (T7-T8) se quiere obtener el H1 y H2, para conseguir en el último trimestre del segundo año (T8) el E1.

**Objetivo 3 (O.3) (IP1, IP2, PH2, EC, PH1):** Determinación de la adhesión y proliferación en la corteza cerebral de embriones de ratones KO de RhoE. Los responsables de este objetivo son el IP1 y el IP2. La primera parte de análisis de la proliferación celular comenzará al final del primer año y se alargará hasta el primer semestre del segundo año (T4-T7). Participarán el IP2 y el PH2. En el T7 se espera conseguir el H5. La segunda parte de análisis de adhesión celular, comenzará en el segundo semestre del segundo año y durará hasta el segundo semestre del tercer año (T7-T10). Participarán el IP1, el EC y el PH1. En el T10 se espera conseguir el H6 y el E2.

**Objetivo 4 (O.4) (IP1, IP2, PH1, PH2, EC):** Caracterización de la participación de RhoE en la migración radial neuronal mediante el estudio en ratones KO de RhoE y ratones wild type (WT) por electroporación *in utero*. Los responsables de este objetivo son el IP1 y el IP2. Se realizará a lo largo de todo el tercer año (T9-12) y participarán todos los integrantes del equipo realizando cada uno diferentes tareas. A lo largo del segundo semestre del tercer año (T11-T12) se espera conseguir el H7 y al final del tercer año (T12), el E3.

#### 4.6. Planificación temporal:

##### AÑO 1:

Tabla 3: Cronograma gráfico de la planificación temporal del primer año del plan de ejecución.

Objetivo		Año 1 (trimestres)			
		1	2	3	4
1	1.1	X	X	X	H1
	1.2	X	X	X	H2
2	2.1				
	2.2				
3	3.1				X
	3.2				
4	4.1				

## AÑO 2:

Tabla 4: Cronograma gráfico de la planificación temporal del segundo año del plan de ejecución.

Objetivo		Año 2 (trimestres)			
		5	6	7	8
1	1.1				
	1.2				
2	2.1	X	X	H3	H4, E1
	2.2	X	X	H3	H4,E1
3	3.1	X	X	H5	
	3.2			X	X
4	4.1				

## AÑO 3:

Tabla 5: Cronograma gráfico de la planificación temporal del tercer año del plan de ejecución.

Objetivo		Año 3 (trimestres)			
		9	10	11	12
1	1.1				
	1.2				
2	2.1				
	2.2				
3	3.1				
	3.2	X	H6, E2		
4	4.1	X	X	X	H7, E3

### 4.7. Plan de difusión:

Durante la ejecución del proyecto nosotros planeamos presentar nuestros resultados contribuyendo en congresos científicos y participando en foros o congresos profesionales especializadas en la comunidad de la Neurociencia a través de presentaciones orales o comunicaciones tipos póster. Los congresos diana donde estos datos pueden generar mayor interés y que se han previsto para el primer año de la ejecución de la propuesta:

- Fall Brain Conference 2017 (Copenhagen, Denmark): sobre “Cortex Evolution and Development”.
- FENS (Federation of European Neurosciences) meeting 2018 (Berlin, Germany).
- SENC (Sociedad Española de Neurociencia) 2018.

La difusión de nuestros resultados también incluirá la asistencia a las conferencias internacionales, como por ejemplo a la conferencia anual *Society for Neuroscience (SfN)* en 2018 en San Diego, Estados Unidos; en 2019 en Chicago, Estados Unidos; y en 2020 en Washington, Estados Unidos.

A lo largo del cronograma de nuestra propuesta, estimamos la presentación continuada de los resultados obtenidos. Intentaremos la publicación de nuestros resultados en revistas científicas seleccionadas con el mayor público posible y mayor factor de impacto. Tenemos en mente que los resultados de nuestra investigación se publiquen, por lo menos, en revistas del primer cuartil y si puede ser en revistas dentro del 10% (primer decil) de revistas con mayor índice de impacto del campo específico tratado.

#### **4.8. Aspectos éticos y de seguridad:**

La experimentación con animales en ratones y el uso de modelos transgénicos de ratones (OGMs) da una gran relevancia de los procesos biológicos y de los mecanismos subyacentes que estamos estudiando. Esto suele ser reconocido por las revistas de investigación de mayor impacto y por la aplicación más directa a otros sistemas de vertebrados como los seres humanos.

En general, la experimentación animal de esta propuesta ha sido evaluada positivamente (CEEAA 04 acta 05/13) por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Lleida bajo el plan de calidad del IRBLLEIDA (Calidad & Irbllleida, 2012), de acuerdo con la legislación en vigor en España, el Real Decreto 53/2013, basándose en la legislación europea, la Directiva 2010/63/UE. Además, también en Cataluña, siguen en vigor la Ley 5/1995 de protección de los animales utilizados para la experimentación y para otras finalidades científicas, y el decreto 214/1997, que regula la utilización de estos animales.

La evaluación ha valorado positivamente el cumplimiento de estos requisitos:

- Se evita el uso de animales cuando exista un método alternativo que proporcione resultados satisfactorios.
- Se cumple con los objetivos y metas de la propuesta.
- Se minimiza el sufrimiento innecesario de los animales, proporcionándoles cuando sea necesario, analgésicos, anestésicos u otros métodos destinados a eliminar al máximo el dolor, el sufrimiento o la angustia.
- Se utilizan métodos eutanásicos humanitarios.

- El personal que participa en los procedimientos está preparado para llevar a cabo las tareas encomendadas, teniendo una formación específica en las ciencias del animal de laboratorio.
- Cumple con los principios "3Rs" (Reducción, Refinamiento y Reemplazo).

Los animales serán alojados en un estabulario SPF totalmente equipado con un personal bien capacitado. Los recursos, así como la infraestructura disponible, son adecuados para los requerimientos de la presente propuesta para alcanzar el logro de los objetivos previstos y cumplir con la Directiva 2010/63/UE.

#### 4.9. Presupuesto:

El presupuesto consta de una estimación aproximada de los costes en personal, material fungible, equipamiento, viajes y dietas, gastos en publicación y otros gastos, necesarios para poder llevar a cabo la propuesta de este proyecto de investigación. El coste total será de 205.700 €.

En cuanto al personal, se solicita en el presupuesto la contratación de un investigador de doctorado durante los 3 años de duración del proyecto. Este estudiante, PH2 en el cronograma, participará en los objetivos 2, 3 y 4, por lo que este contrato nos ayudaría a llevar a cabo correctamente todo el proyecto.

El resto de costes viene desglosado en la Tabla 6 siguiente:

Tabla 6: Presupuesto aproximado de los costes de la propuesta de proyecto.

<b>PRESUPUESTO</b>	<b>COSTE AÑO 1</b>	<b>COSTE AÑO 2</b>	<b>COSTE AÑO 3</b>	<b>COSTE TOTAL</b>
<b>PERSONAL:</b>				
Investigador doctorado (PH2)	29.500 €	29.500 €	29.500 €	88.500 €
<b>MATERIAL FUNGIBLE:</b>				
Animal de experimentación: cría y mantenimiento	8.000 €	14.000 €	7.000 €	29.000 €
Sales y buffers (sacarosa, NaCl, PBS, agarosa...)	500 €	500 €	300 €	1.300 €
Medios de cultivo celular: BSE, DMEM	500 €	800 €	400 €	1.700 €

Placas de cultivo celular: placas de petri, portaobjetos, cubreobjetos...	1.000 €	1.200 €	700 €	2.900 €
Anticuerpos	1.800 €	3.500 €	300 €	5.600 €
Plástico y vidrio: pipetas, puntas de pipeta...	1.000 €	1.500 €	900 €	3.400 €
Reactivos inmunohistoquímica: GFP, BrdU, Nuclear fast red...	1.500 €	1.500 €	1.000 €	4.000 €
<b>EQUIPO:</b>				
Laboratorio cultivo celular, microscopia fluorescencia, microscopia confocal, crostato, microscopia digital...	3.500 €	3.500 €	3.500 €	10.500 €
<b>VIAJES Y DIETAS:</b>				
Asistencia a congresos y reuniones científicas (Europa)	1.500 €	1.500 €	1.500 €	4.500 €
Asistencia a congresos y reuniones científicas (EEUU)	3.000 €	3.000 €	3.000 €	9.000 €
<b>GASTOS EN PUBLICACIÓN:</b>				
Publicación de artículos científicos (3 entregables aprox.)	- €	4.000 €	8.000 €	12.000 €
<b>OTROS GASTOS:</b>				
Gastos de inscripción a congresos	100 €	100 €	100 €	300 €
<b>Nuevo equipo:</b>				
Vibrátomo "Leica VT1000S Vibrtaing Blade"	20.000 €			20.000 €
Electroporador "Gemini Twin Wave" BTX			10.000 €	10.000 €
Electrodos "Tzeezertrodes electrodes" BTX			3.000 €	3.000 €
<b>COSTE ESTIMADO TOTAL DE LA PROPUESTA DE PROYECTO:</b>				<b>205.700 €</b>



## 5. Discusión:

Mediante la ejecución de propuestas de proyectos de investigación como esta, se espera que los resultados obtenidos supongan un avance conceptual importante en la comprensión de los mecanismos moleculares que rigen la conectividad neuronal y el desarrollo de la corteza cerebral, un campo de investigación emergente desde hace poco tiempo en el área de la neurobiología molecular.

La perspectiva de estos resultados no tendrá un impacto social directo a corto plazo, sin embargo, el conocimiento de las distintas etapas de la embriogénesis de la corteza cerebral como el plegamiento de la corteza, sí que ayudará a comprender en el futuro enfermedades causadas por malformaciones del desarrollo cortical, las cuales, son responsables de un grupo de enfermedades raras, denominadas lisencefalias, que van acompañadas de epilepsia, trastornos motores y retraso cognitivo. Por tanto, futuras investigaciones serán importantes para establecer una teoría integrativa de los procesos de girificación.

En este marco, se pone de manifiesto la posible función de la proteína RhoE en la regulación del plegamiento de la corteza cerebral, siendo sugerido en ocasiones anteriores, como partícipe de procesos como la migración neuronal.

En cuanto a la elaboración de este trabajo, se ha necesitado una búsqueda bibliográfica para poder enmarcar el tema del proyecto, la cual ha sido amplia y compleja, viendo la gran extensión del área de la neurobiología molecular y todo lo que queda por descubrir y comprender.

A través de él, se consigue demostrar la posesión de las competencias y habilidades necesarias para afrontar el futuro profesional de forma competente. Su redacción no solo busca la transmisión de conocimiento, sino optar por ser el creador del avance del conocimiento. El plantear un problema y el buscar activamente la forma de dar con las respuestas.

Una de las maneras para asumir este reto como estudiante ha sido el disfrutar del proceso y entender el trabajo de fin de grado (TFG), como una oportunidad para aprender, no solo a nivel académico, sino también a nivel personal, conectando con tus intereses y motivaciones. La elaboración del TFG conlleva enfrentarse por primera vez a un trabajo sobre una propuesta de proyecto de investigación para el cual, durante la formación académica no se prepara, y es aquí donde el tutor ha sabido animar y apoyar, implicándose en el proyecto activamente.

## 6. Bibliografía:

- Ballester-Lurbe, B., González-Granero, S., Mocholí, E., Poch, E., García-Manzanares, M., Dierssen, M., ... Terrado, J. (2014). RhoE deficiency alters postnatal subventricular zone development and the number of calbindin-expressing neurons in the olfactory bulb of mouse. *Brain Structure and Function*, 220(6), 3113-3130.
- Borrell, V., & Götz, M. (2014). Role of radial glial cells in cerebral cortex folding. *Current Opinion in Neurobiology*, 27, 39-46.
- Calidad, P. D. E., & Irbleida, D. E. L. (2012). Plan de Calidad 2008-2012 IRBLleida.
- Comunidad de Madrid. (2016). V PRICIT.
- De Juan Romero, C., & Borrell, V. (2015). Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia*, 63(8), 1303-1319.
- del Toro, D., Ruff, T., Cederfjäll, E., Villalba, A., Seyit-Bremer, G., Borrell, V., & Klein, R. (2017). Regulation of Cerebral Cortex Folding by Controlling Neuronal Migration via FLRT Adhesion Molecules. *Cell*, 169(4), 621-635.e16.
- European Research Council. (2017). ERC: European Research Council. Recuperado 29 de mayo de 2017, a partir de <https://erc.europa.eu/>
- Fernández, V., Llinares-Benadero, C., & Borrell, V. (2016). Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *The EMBO journal*, 35(10), 1-24.
- Florio, M., Albert, M., Taverna, E., Namba, T., Brandl, H., Lewitus, E., ... Huttner, W. B. (2015). Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion.
- Fundació Banc Sabadell. (2017). Fundació Banc Sabadell. Recuperado 12 de junio de 2017, a partir de <http://www.fundacionbancosabadell.com/>
- Fundació La Marató de TV3. (2017). Fundació La Marató de TV3. Recuperado 12 de junio de 2017, a partir de <http://www.ccma.cat/tv3/marato/fundacio/>
- Fundación BBVA. (2017). Fundación BBVA. Recuperado 12 de junio de 2017, a partir de <http://www.fbbva.es/TLFU/tfu/esp/home/index.jsp>
- Fundación Caja Navarra. (2017). Fundación Caja Navarra. Recuperado 12 de junio de 2017, a partir de <http://www.fundacioncajanavarra.es/>
- Fundación Mutua Madrileña. (2017). Fundación Mutua Madrileña. Recuperado 12 de junio de 2017, a partir de <https://www.fundacionmutua.es/>
- Govek, E.-E., E. Hatten, M., & Vn Aelst, V. (2011). The Role of Rho GTPase Proteins in CNS Neuronal Migration. *Nano*, 6(9), 2166-2171.
- Hirota, Y., & Nakajima, K. (2017). Control of Neuronal Migration and Aggregation by Reelin Signaling in the Developing Cerebral Cortex. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(April), 1-8.

- Horizonte2020. (2017). Horizonte2020. Recuperado 29 de mayo de 2017, a partir de <http://eshorizonte2020.es/>
- Instituto de Salud Carlos III. (s. f.). Convocatorias y ayudas Acción Estratégica de Salud. Recuperado 29 de mayo de 2017, a partir de <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-investigacion/fd-financiacion/convocatorias-ayudas-accion-estrategica-salud.shtml>
- Instituto de Salud Carlos III. (2016). Proyectos de Investigación en salud ( PI ), 1-10.
- ISCIII. (2017). ISCIII. Recuperado 12 de junio de 2017, a partir de <http://www.isciii.es/>
- Iturrioz Rodríguez, N. (2013). Papel de las GTPasas de la familia Rho en la señalización mediada por el receptor P2X7, 0-23.
- Junta de Andalucía. (2016). PAIDI 2020. Recuperado 12 de junio de 2017, a partir de <https://www.paidi2020.es/>
- Martínez, M. Á., & Borrell, V. (2015). What makes us human ? Developmental mechanisms of cerebral cortex expansion and folding : evolving towards human uniqueness, (October), 16-19.
- Masuda, K., Toda, T., Shinmyo, Y., Ebisu, H., Hoshiba, Y., Wakimoto, M., ... Kawasaki, H. (2015). Pathophysiological analyses of cortical malformation using gyrencephalic mammals. *Scientific Reports*, 5, 15370.
- Menna, P. L., Cardama, G. A., Comin, M. J., Alonso, D. F., & Gomez, D. E. (2010). Rho GTPasas como blancos terapéuticos relevantes en cancer y otras enfermedades humanas. *Medicina*, 70(6), 555-564.
- Ministerio de Ciencia y Tecnología. (2007). Plan nacional de investigación científica, desarrollo e innovación 2004-2007.
- Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. (2017). Recuperado 12 de junio de 2017, a partir de <http://www.mineco.gob.es/>
- Ministerio de Economía y Competitividad. (2016a). Plan actuación 2016.
- Ministerio de Economía y Competitividad. (2016b). Plan Estatal de Investigación Científica Técnica y de Innovación 2013-2016, 55. Recuperado a partir de [http://www.idi.mineco.gob.es/stfls/MICINN/Investigacion/FICHEROS/Plan\\_Estatal\\_Inves\\_cientifica\\_tecnica\\_innovacion.pdf](http://www.idi.mineco.gob.es/stfls/MICINN/Investigacion/FICHEROS/Plan_Estatal_Inves_cientifica_tecnica_innovacion.pdf)
- National Institutes of Health. (2017). National Institutes of Health (NIH). Recuperado 12 de junio de 2017, a partir de <https://www.nih.gov/>
- Nonaka-Kinoshita, M., Reillo, I., Artegiani, B., Angeles Martínez-Martínez, M., Nelson, M., Borrell, V., & Calegari, F. (2013). Regulation of cerebral cortex size and folding by expansion of basal progenitors. *The EMBO Journal*, 32(13), 1817-1828.
- Ohtaka-Maruyama, C., & Okado, H. (2015). Molecular pathways underlying projection neuron production and migration during cerebral cortical development. *Frontiers in Neuroscience*, 9(DEC), 1-24.
- Pacary, E., Azzarelli, R., & Guillemot, F. (2013). Rnd3 coordinates early steps of cortical neurogenesis

- through actin-dependent and -independent mechanisms. *Nature Communications*, 4, 1635.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms2614>
- Pacary, E., Heng, J., Azzarelli, R., Riou, P., Castro, D., Lebel-Potter, M., ... Guillemot, F. (2011). Proneural transcription factors regulate different steps of cortical neuron migration through rnd-mediated inhibition of RhoA signaling. *Neuron*, 69(6), 1069-1084.
- Pisuerga, C. (2009). Estudio de las fuentes de financiación de la investigación Estudio de las Fuentes de Financiación de la Investigación.
- Poluch, S., & Juliano, S. L. (2015). Fine-tuning of neurogenesis is essential for the evolutionary expansion of the cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 25(2), 346-364.
- Rash, B. G., Tomasi, S., Lim, H. D., Suh, C. Y., & Vaccarino, F. M. (2013). Cortical Gyrification Induced by Fibroblast Growth Factor 2 in the Mouse Brain. *Journal of Neuroscience*, 33(26), 10802-10814.
- Reillo, I., De Juan Romero, C., García-Cabezas, M. Á., & Borrell, V. (2011). A Role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 21(7), 1674-1694.
- Stahl, R., Walcher, T., De Juan Romero, C., Pilz, G. A., Cappello, S., Irmeler, M., ... Götz, M. (2013). Trnp1 regulates expansion and folding of the mammalian cerebral cortex by control of radial glial fate. *Cell*, 153(3), 535-549.
- Sun, T., & Hevner, R. F. (2014). Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(4), 217-232.
- Talens-Visconti, R., Peris, B., Guerri, C., & Guasch, R. M. (2010). RhoE stimulates neurite-like outgrowth in PC12 cells through inhibition of the RhoA/ROCK-I signalling. *Journal of Neurochemistry*, 112(4), 1074-1087.
- Toda, T., Shinmyo, Y., Dinh Duong, T. A., Masuda, K., & Kawasaki, H. (2016). An essential role of SVZ progenitors in cortical folding in gyrencephalic mammals. *Scientific Reports*, 6(1), 29578.  
<https://doi.org/10.1038/srep29578>
- Zilles, K., Palomero-Gallagher, N., & Amunts, K. (2013). Development of cortical folding during evolution and ontogeny. *Trends in Neurosciences*, 36(5), 275-284.