

La hidrocefalia *per se* no modifica la proliferación ni las cadenas de migración de neuroblastos en la zona subventricular (ZSV)

Óscar González-Pérez*

Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Psicología, Universidad de Colima, Colima, Col.; Departamento de Neurociencias, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal.

Resumen

Antecedentes: Defectos genéticos de la movilidad ciliar indican que los cilios del epéndimo contribuyen no sólo al movimiento del líquido cefalorraquídeo (LCR), sino también al direccionamiento de los neuroblastos migradores de la ZSV. Sin embargo, tales alteraciones ciliares se asocian a hidrocefalia secundaria. **Objetivo:** Determinar si la hidrocefalia *per se* afecta al patrón de migración y la proliferación de neuroblastos de la ZSV, el principal nicho de células madre neurales (CMN) del cerebro adulto. **Método:** A ratones de la cepa Balb/C de 60 días posnatales (P60) se les introdujo quirúrgicamente una lámina de acetato de vinilo en el antro del acueducto de Silvio (AS). Siete días después analizamos la dilatación ventricular, el número de progenitores neurales proliferativos y neuroblastos migradores, y la organización de las cadenas de neuroblastos. **Resultados:** Este modelo de hidrocefalia obstructiva parcial indujo un incremento de los ventrículos laterales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en proliferación celular: control: 13 ± 2.2 versus grupo hidrocefálico: 11 ± 2.9 células por campo, ni en el número de neuroblastos: control: 32 ± 3.6 versus grupo hidrocefálico: 27 ± 4.8 células por campo. No se observaron cambios en el patrón de migración de neuroblastos. **Conclusión:** La hidrocefalia subcrónica no modificó la proliferación de precursores neurales ni el patrón de migración de los neuroblastos de la ZSV. Esto sugiere que solamente el flujo del LCR y las proteínas señalizadoras disueltas en él son los principales reguladores de la migración neuronal in vivo.

PALABRAS CLAVE: ZSV. CMN. Hidrocefalia. Doblecortina. Neurogénesis.

Abstract

Background: Genetic mutations that affect cilia beating have shown that ependymal cilia not only contribute to the movement of cerebrospinal fluid, but also to direct migratory neuroblasts in the subventricular zone. These ciliary disturbances are associated with hydrocephalus. **Objective:** To determine whether hydrocephalus *per se* alters migration and proliferation of neuroblasts in the subventricular zone, the largest niche of neural stem cells in the adult brain. **Methods:** A vinyl acetate film was surgically inserted into the atrium of the Aqueduct of Sylvius of P60 Balb/C mice. Seven days later, we analyzed the ventricular dilatation, the number of proliferative neural progenitors and migratory neuroblasts, and the organization of neuroblast chains. **Results:** This model of obstructive hydrocephalus increased the size of the lateral ventricles. No statistically significant differences in cell proliferation (controls 13 ± 2.2 vs. the hydrocephalic group 11 ± 2.9 cells per field) or in the number of neuroblasts (controls 32 ± 3.6 vs. the hydrocephalic group 27 ± 4.8 cells per field). No differences were observed in the migration pattern of neuroblasts. **Conclusion:** Sub-chronic hydrocephalus did not modify the proliferation of neural precursors or the migration pattern of neuroblasts in the subventricular zone. This suggests that only the CSF flow and the dissolved signaling proteins are the main regulators of the neuronal migration in vivo.

KEY WORDS: Subventricular zone. Neural stem cells. Hydrocephalus. Double cortin. Neurogenesis.

Correspondencia:

*Óscar González-Pérez

Universidad de Colima

Facultad de Psicología

Av. Universidad, 333, C.P. 28040, Colima, Col.

E-mail: osglez@uclm.mx

osglez@gmail.com

Fecha de recepción en versión modificada: 10-01-2012

Fecha de aceptación: 13-02-2012

Introducción

En el cerebro adulto, la ZSV se localiza en las paredes de los ventrículos laterales¹⁻³ y en ella residen CMN, las cuales originan neuronas jóvenes (neuroblastos) que migran con un patrón denominado «en cadena» hacia el bulbo olfatorio^{2,4}. Recientemente, se demostró que las CMN producen oligodendrocitos *in vivo*, los cuales migran predominantemente hacia el cuerpo calloso y la fimbria fórnix^{5,6}. Estas CMN pertenecen a una variedad especial de astrocitos, denominados células de tipo-B1⁷, los cuales, al dividirse, dan origen a progenitores secundarios denominados células amplificadoras de tránsito (células de tipo C), que a su vez se diferencian en neuroblastos (células de tipo A) y precursores oligodendrogiales^{8,9}.

Las células endimarias adyacentes a la ZSV desempeñan un papel fundamental en el control del linaje y la migración celular de esta región¹⁰. Los cilios de las células endimarias contribuyen al flujo intracerebral del LCR y al desarrollo cerebral armónico^{7,11} dentro del intrincado sistema ventricular cerebral¹². De hecho, los pacientes con discinesia ciliar primaria presentan hidrocefalia y alteraciones en el desarrollo neuronal¹³⁻¹⁶. Esto ha sido demostrado en modelos experimentales con defectos genéticos que alteran la movilidad ciliar^{17,18} o la ciliogénesis¹⁹⁻²¹. Un estudio realizado en ratones Tg737Orpk, que poseen un alelo hipomórfico de Polaris (esencial para la ciliogénesis), mostró que el movimiento ciliar del epéndimo, no sólo contribuye a mantener el flujo del LCR, sino también al direccionamiento de la migración tangencial de las cadenas de neuroblastos rumbo al bulbo olfatorio²². Sin embargo, un estudio en ratones con ciliogénesis alterada impide descartar si la alteración migratoria de los neuroblastos se debe al efecto mecánico de la presión hidrostática secundaria a la hidrocefalia o a la disrupción del movimiento ciliar propiamente dicha. El objetivo del presente estudio fue determinar si la hidrocefalia por sí misma produce alteraciones en el patrón de migración y la proliferación de neuroblastos en la ZSV, el principal nicho de CMN del cerebro adulto. Para ello se diseñó y utilizó un modelo de hidrocefalia progresiva en roedores que no altera la integridad del epéndimo adyacente a la ZSV. Los presentes hallazgos indican que este modelo de hidrocefalia obstructiva es bien tolerado por los sujetos experimentales. Asimismo, encontramos que la acumulación de LCR *per se* no produce cambios significativos en la proliferación y migración de neuroblastos, lo cual da soporte a la aseveración de que el movimiento del LCR y las

proteínas señalizadoras presentes en él son los principales reguladores de la migración neuronal *in vivo*.

Materiales y método

Animales experimentales

Se utilizaron ratones de la cepa Balb/C de P60, los cuales fueron alojados en condiciones estándar de bioterio y cuyo manejo se realizó de acuerdo a los lineamientos establecidos por el Comité para el Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio de la Universidad de Colima. Se formaron dos grupos de 10 animales cada uno: el grupo de cirugía simulada y el grupo hidrocefálico. Este último grupo fue sometido a un procedimiento de obstrucción quirúrgica parcial del antro del AS que se describe más adelante.

Modelo de hidrocefalia

Fue inducido un hidrocefalo obstructivo mediante la colocación de una lámina de acetato de vinilo de 3.0 x 0.5 x 0.1 mm (longitud, anchura y espesor, respectivamente) en el antro del AS (Figs. 1 A y B). Para ello, los ratones fueron anestesiados con 0.4 ml de una solución al 1.25% de avertin (2,2,2-tribromoetanol en hidrato de amileno); se les realizó tricotomía craneal y se colocaron en un aparato estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL) acondicionado con un colchón térmico precalentado a 37 °C. Previa antisepsia de la región, se procedió a realizar una incisión de 10 mm en la línea media craneal. Se localizó y marcó la coordenada 0 mm y -2.6 mm, anterior-posterior y lateral en relación con Bregma, respectivamente. Enseguida, se horadó la bóveda craneal con una fresa de carburo de 1 mm de diámetro y se introdujo la lámina de acetato de vinilo a una profundidad de 3 mm por debajo de la superficie cerebral. Antes de introducir la lámina plástica, se aplicó un empaquetamiento cuidadoso con gelatina homeostática absorbible (Surgifoam®, Ethicon) sobre la vena interhemisférica para prevenir y/o reducir el posible sangrado de la misma. Una vez introducido el dispositivo, se aplicó una presión ligera sobre la herida quirúrgica durante 1 min; una vez verificada la ausencia de sangrado, se procedió al cierre de la herida quirúrgica con n-butilcianoacrilato (Vetbond 3M®). Finalmente, los animales fueron colocados para su recuperación en una caja de bioterio limpia y tibia. Los animales del grupo de cirugía simulada fueron sometidos al mismo procedimiento, pero sin la introducción de la lámina de acetato de vinilo.

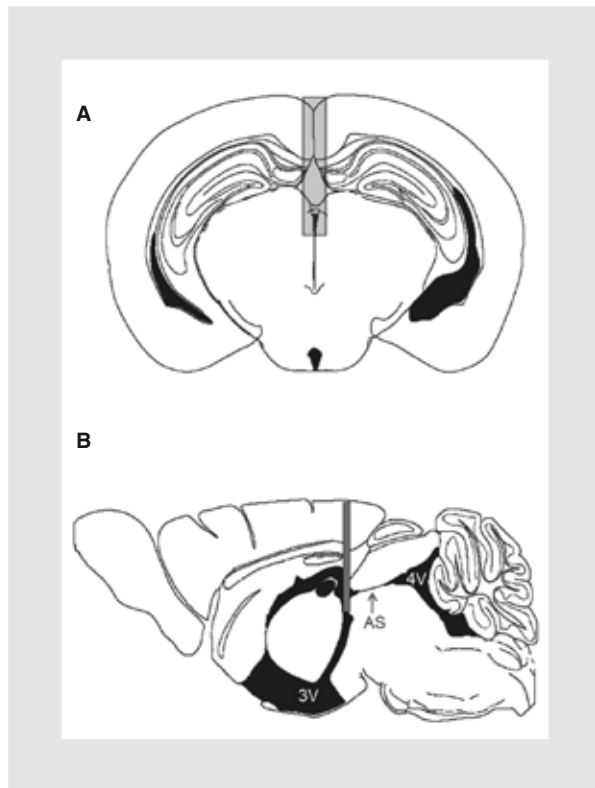


Figura 1. Modelo de hidrocefalia obstructiva en ratón. Dibujos esquemáticos de un corte coronal (A) y uno sagital (B) del cerebro de ratón que muestran la posición donde la lámina obstructiva fue colocada. La hidrocefalia fue producida mediante la colocación de una lámina de acetato de vinilo, de 3.0 mm de largo x 0.5 de ancho y 0.1 de espesor, dentro del atrio del AS durante siete días. 3V: tercer ventrículo; 4V: cuarto ventrículo.

Obtención de tejidos

Siete días después de la cirugía, todos los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) y sacrificados por perfusión intravascular. La perfusión se inició con 150 ml de solución salina fisiológica, seguidos de 150 ml de solución fijadora compuesta por un 4% de paraformaldehído en una solución 0.1 M de *buffer* fosfato salino (PBS) pH = 7.4. Después, los animales fueron decapitados para extraer sus cerebros, que fueron posfijados en la solución fijadora a 4 °C durante 12 h. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 10 min con PBS 0.1 M y se hicieron cortes coronales de 30 µm con un vibratomo, desde -1.5 hasta +2.5 mm, coordinadas respecto a Bregma según el atlas esterotáxico de Paxinos y Franklin²³. Para cada inmunohistoquímica (IHQ), se seleccionaron aleatoriamente 15 rebanadas de cerebro colectadas a cada 120 µm de distancia.

Inmunohistoquímica

Las rebanadas obtenidas fueron teñidas mediante IHQ para microscopia de fluorescencia. Brevemente, las secciones tisulares fueron lavadas (10 min x 3) en 0.1 M PBS. Enseguida, fueron incubadas en solución bloqueadora (0.1 M PBS + 10% suero de cabra + 0.1% Triton-X) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las rebanas se incubaron toda la noche a 4 °C con anticuerpos primarios disueltos en solución bloqueadora. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: cobayo antidoble cortina (1:1000, Millipore™, Billerica, MA) y conejo anti-Ki67 (1:500, Millipore™, Billerica, MA). Después, todas las secciones fueron enjuagadas tres veces con 0.1 M PBS e incubadas en los anticuerpos secundarios apropiados (Alexa® Fluorconjugated, Molecular Probes™) a dilución de 1:1000, disueltos en solución bloqueadora a temperatura ambiente durante 60 min. Finalmente, las rebanadas fueron enjuagadas nuevamente en 0.1 M PBS (10 min x 3) y montadas con DAPI-conjugated Vectashield™ (Vector Laboratories). La captura y el análisis microscópico se realizaron en un microscopio Zeiss Axio Observer D2 (Göttingen, Alemania).

Cuantificación

El número de células Ki67+ y de doble cortina+ fue cuantificado en 10 secciones consecutivas de 30 µm de espesor, seleccionadas aleatoriamente a cada 200 µm de distancia (n = 5 animales por grupo). Se cuantificaron todas las células inmunomarcadas encontradas dentro de los primeros 500 µm respecto a la pared ventricular lateral. En todos los casos, se cuantificaron aquellas células que mostraron núcleos claramente distinguibles en un mismo plano focal. El tamaño del campo microscópico utilizado para cada cuantificación fue de 0.64 mm². Todos los datos se expresaron como la media ± su desviación estándar (DE). Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el uso de la prueba *t* de Student, con un valor de *p* < 0.05 para determinar las diferencias estadísticamente significativas.

Resultados

Siete días después de la colocación de la lámina de acetato de vinilo en el antro del AS (Figs. 1 A y B), los animales fueron sacrificados para visualizar las cavidades ventriculares. Durante dicho periodo de tiempo, no se observaron decesos, convulsiones u otro dato

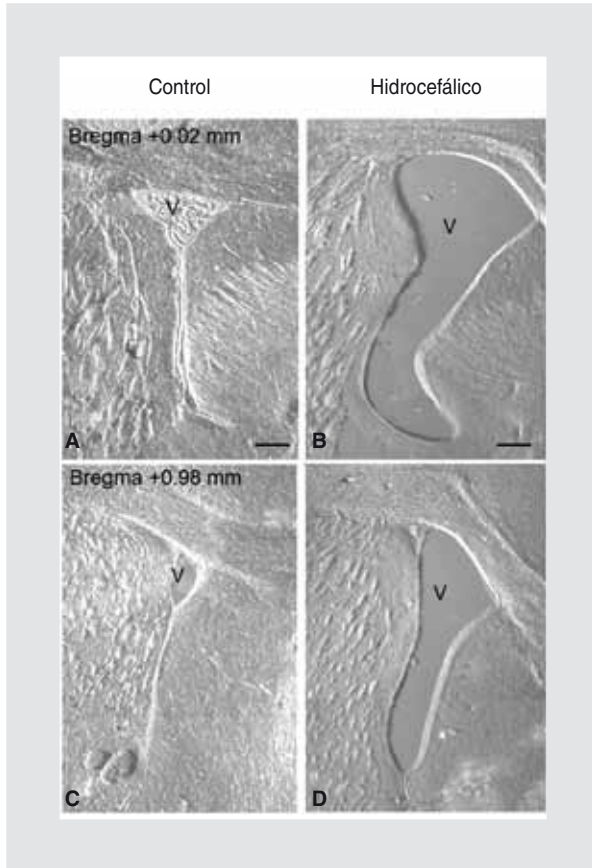


Figura 2. Fotografía tomada en contraste de fases de cortes coronales de un animal del grupo control (**B y D**) y otro del grupo hidrocefálico (**A y C**). Nótese el incremento considerable del sistema ventricular (V) en las diferentes porciones (coordenadas de Bregma) del ventrículo lateral. Barra de calibración = 300 µm.

sugestivo de algún proceso mórbido asociado en ninguno de los grupos. Los ratones del grupo hidrocefálico mostraron una importante dilatación de la cavidad ventricular respecto al grupo de cirugía simulada, la cual se observó en diferentes puntos de la cavidad ventricular (Figs. 2 A-D). La medición de la distancia existente entre la pared lateral y septal en las coordenadas de Bregma +0.02 y +0.98 mm indicó que el promedio de distancia en el grupo control fue de 455 ± 182 versus $1,435 \pm 397$ µm del grupo experimental ($n = 5$ animales por grupo). En conjunto, estos datos sugieren que el modelo de obstrucción parcial indujo eficientemente un acúmulo progresivo de LCR dentro del sistema ventricular.

Para determinar si la hidrocefalia condicionaba cambios en la tasa de proliferación de las células progenitoras subventriculares, cuantificamos el número de células Ki67+ encontradas a lo largo de la pared ventricular. El número de células encontradas en

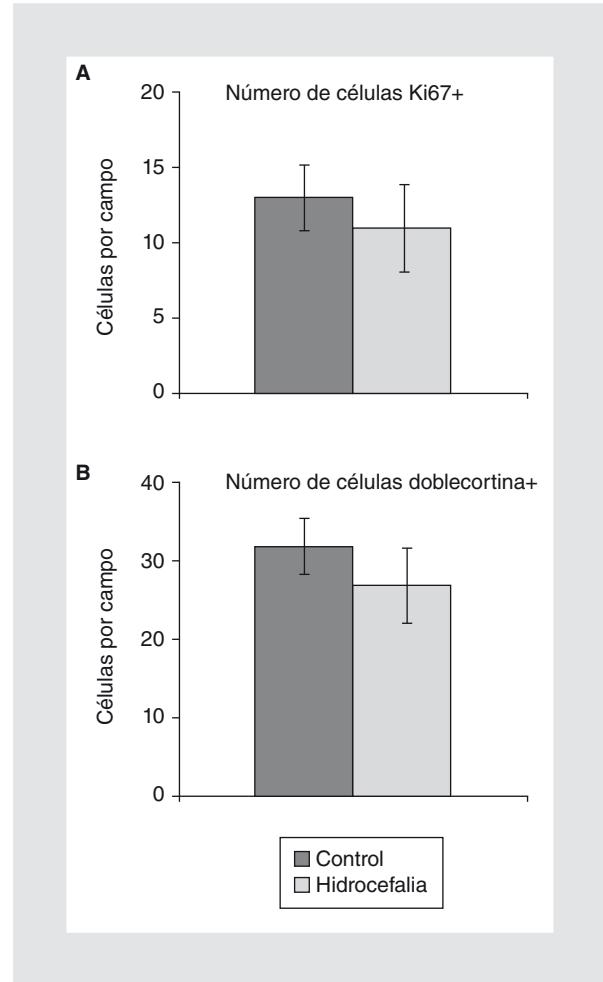


Figura 3. Gráficos de la cuantificación del número de células proliferativas (**A**) que expresaban Ki67+ y de neuroblastos (doblecortina+) subventriculares (**B**) a los siete días posquirúrgicos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos ($n = 5$ animales por grupo).

ambos grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas: grupo control: 13 ± 2.2 versus grupo hidrocefálico: 11 ± 2.9 células por campo; $n = 5$ animales por grupo; $p = 0.27$; prueba t de Student (Fig. 3 A). Paralelamente, para determinar si la tasa de neurogénesis subventricular se modificaba por efecto de la hidrocefalia, analizamos el número de células que expresaban doblecortina (marcador de neuroblastos). Los datos indican que el número de células doblecortina positivas fue de 32 ± 3.6 versus 27 ± 4.8 células por campo del grupo hidrocefálico (Fig. 3 B). El análisis de los datos no reveló diferencias estadísticamente significativas ($n = 5$ animales por grupo; $p = 0.46$; prueba t de Student).

Para determinar si la organización migratoria de las cadenas de neuroblastos se afectaba debido a la

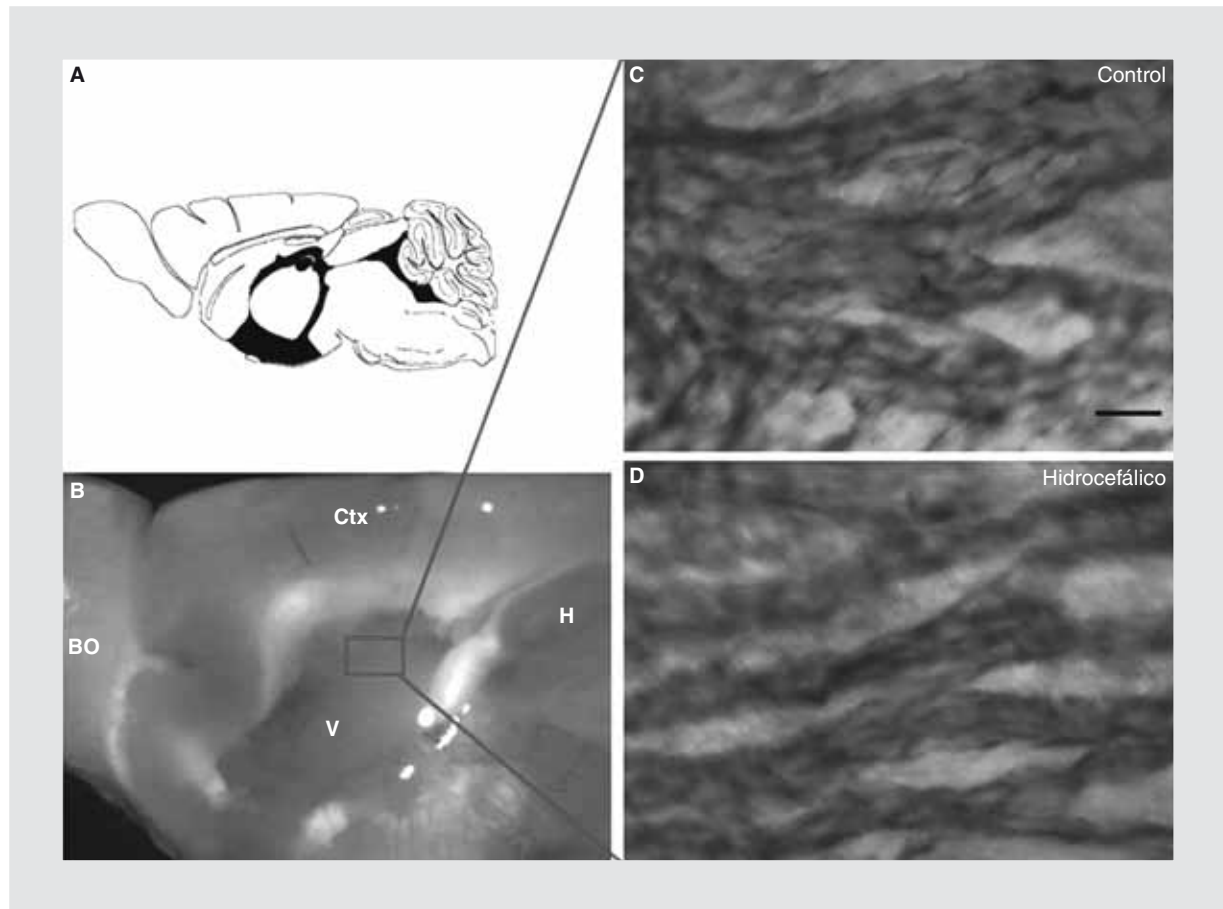


Figura 4. IHQ de la pared estriatal del ventrículo lateral a los siete días posquirúrgicos. El esquema coronal muestra la imagen del sistema ventricular del ratón (A). Después de la remoción del septo, la pared estriatal del ventrículo lateral queda expuesta (B). La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos antidoblecortina muestra múltiples cadenas de neuroblastos que migran paralelas al eje longitudinal del ventrículo (C-D). Barra de calibración = 15 μ m. La organización en cadenas no se afectó por efecto de la hidrocefalia. BO: Bulbo olfatorio; Ctx: córtex; V: ventrículo; H: hipocampo.

hidrocefalia, hicimos un corte sagital del cerebro de los ratones y disecamos la pared lateral del ventrículo para realizar un marcaje inmunohistoquímico para detectar doblecortina (Figs. 4 A y B). Interesantemente, en ninguno de los dos grupos estudiados se afectó la organización típica en cadenas de los neuroblastos subventriculares (Figs. 4 C y D), lo cual sugiere que la migración de estos progenitores neuronales no se modificó por el efecto de la hidrocefalia.

Discusión

En el presente estudio presentamos un modelo experimental para inducción de hidrocefalia con el cual observamos que el acúmulo de LCR por sí mismo no produce cambios en la proliferación de los progenitores neurales residentes en la ZSV, no modifica el número de neuroblastos migradores y no afecta al patrón de migración de los mismos, al menos durante el

periodo de tiempo analizado. Los presentes hallazgos apoyan la hipótesis que descarta el efecto mecánico producido por el LCR como la fuente principal de la alteración migratoria y proliferativa descrita en modelos de ratones con epéndimo aciliar, los cuales concomitantemente cursan con hidrocefalia¹⁷⁻²¹. Dichos ratones mutantes presentan importantes alteraciones en la migración de neuroblastos²², por lo cual resultaba necesario discernir si dicha alteración migratoria se debía a la relativa inmovilidad del LCR (y las proteínas señalizadoras contenidas en él) o al efecto mecánico que produce el aumento de la presión hidrostática dentro del sistema ventricular.

Desde el descubrimiento de la generación de neuronas *de novo* en la ZSV y su ruta migratoria hacia el bulbo olfatorio en el cerebro adulto, se ha tratado de dilucidar las proteínas y mecanismos señalizadores que controlan dichos procesos. El epéndimo secreta Noggin, un antagonista de la proteína morfogenética

ósea 4 (BMP-4), la cual favorece el linaje neuronal a expensas de la producción de glía¹⁰. Por otra parte, las proteínas Slit-1 y Slit-2, presentes en el LCR, son producidas por los plexos coroideos^{24,25} y parecen ser las principales direccionadoras de la migración cefalocaudal de los neuroblastos subventriculares²².

El movimiento ciliar favorece no sólo el movimiento del LCR, sino también el depósito de Slits a lo largo de la pared ventricular, lo cual genera un gradiente de concentración que orienta la migración celular²². La carencia o inmovilidad ciliar altera el gradiente de proteínas intraventriculares. Por lo tanto, la migración neuronal, pero no la proliferación de neuroblastos²⁶, se ve dramáticamente afectada en ausencia de células endimarias o de sus cilios²². Dado que la inmovilidad ciliar condiciona simultáneamente hidrocefalia, debido a la interrupción del flujo intraventricular del LCR¹³⁻¹⁵, en este estudio se analizó el efecto de la hidrocefalia sobre el fenómeno migratorio. Los presentes hallazgos indican que la hidrocefalia por sí misma no modifica la migración neuronal, lo cual sugiere que el movimiento ciliar y el gradiente de proteínas resultante son los principales controladores del direccionamiento de neuroblastos en el parénquima cerebral. Existen algunos reportes que señalan que la hidrocefalia inducida con neuramidasas, derivada de la toxina del *Clostridium perfringens* que destruye el epéndimo, es capaz de incrementar la proliferación de los progenitores neurales subventriculares²⁶. No obstante, nuestros hallazgos indican que la proliferación de progenitores neurales subventriculares no se modifica por efecto de la hidrocefalia. Esta aparente discrepancia pudiera deberse al tipo de modelo implementado y al tipo de marcadores utilizados en cada estudio. En el presente estudio se cuantificó el número de células que expresaban Ki67, un marcador de proliferación ampliamente utilizado en tejido neural²⁷, y la cuantificación se efectuó en los límites anatómico-histológicos del nicho germinal subventricular²⁸. La combinación de estas estrategias ofrece un análisis más general de todo el nicho germinativo.

Por otra parte, el presente modelo tiene dos ventajas primordiales: en primer lugar, induce hidrocefalia pura sin la necesidad de inducir mutaciones genéticas que afectan el movimiento ciliar o destruyen la capa de células endimarias, y, en segundo lugar, al producirse un efecto de «tipo válvula» en el antro del AS se evita bloquear bruscamente el flujo de LCR, lo cual evita la compresión brusca del tejido cerebral, que comprometería la vida del individuo experimental. Una limitante del presente estudio radica en el tiempo de

obstrucción analizado, por lo cual, en futuros estudios, sería interesante analizar tiempos de obstrucción más prolongados y con ello establecer si obstrucciones crónicas condicionan cambios adicionales en la citoarquitectura o proliferación celular de la ZSV. Otros interrogantes permanecen sin dilucidar, tales como determinar si el incremento del LCR modifica la integración y/o la maduración de los neuroblastos dentro del bulbo olfatorio. Igualmente se desconoce si la oligodendrogénesis subventricular se modificaría por efecto de la hidrocefalia. Por lo tanto, otros estudios son necesarios para responder tales preguntas.

En conclusión, el modelo de hidrocefalia obstructiva es bien tolerado y constituye una herramienta valiosa para el estudio de los progenitores subventriculares multipotenciales. Los hallazgos del presente estudio sugieren que la hidrocefalia subcrónica por sí misma no modifica la tasa de proliferación ni el patrón de migración de los neuroblastos subventriculares del ratón adulto.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del Fondo de Apoyo para la Ciencia Básica (CB-2008-101476) y *The National Institute of Health and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NIH/NINDS; R01 NS070024-02).

Bibliografía

1. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: A relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*. 1994;13:1071-82.
2. Lois C, Álvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:2074-7.
3. Álvarez-Palazuelos LE, Robles-Cervantes MS, Castillo-Velázquez G, et al. Regulation of neural stem cell in the human SVZ by trophic and morphogenic factors. *Curr Signal Transduct Ther*. 2011;6:320-6.
4. Lois C, Álvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994;264:1145-8.
5. Menn B, García-Verdugo JM, Yaschine C, González-Pérez O, Rowitch D, Álvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci*. 2006;26:7907-18.
6. González-Pérez O, Romero-Rodríguez R, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells*. 2009;27:2032-43.
7. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*. 2008;3:265-78.
8. González-Pérez O, Álvarez-Buylla A. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev*. 2011;67:147-56.
9. González-Pérez O, Quinones-Hinojosa A. Dose-dependent effect of EGF on migration and differentiation of adult subventricular zone astrocytes. *Glia*. 2010;58:975-83.
10. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 2000; 28:713-26.

11. Mirzadeh Z, Han YG, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Cilia organize ependymal planar polarity. *J Neurosci*. 2010;30:2600-10.
12. Torres-Corzo J, Vecchia RR, Rangel-Castilla L. [Observation of the ventricular system and subarachnoid space in the skull base by flexible neuroendoscopy: normal structures]. *Gac Med Mex*. 2005;141:165-8.
13. al-Shroof M, Karnik AM, Karnik AA, Longshore J, Sliman NA, Khan FA. Ciliary dyskinesia associated with hydrocephalus and mental retardation in a Jordanian family. *Mayo Clin Proc*. 2001;76:1219-24.
14. Afzelius BA. Cilia-related diseases. *J Pathol*. 2004;204:470-7.
15. Jabourian Z, Lublin FD, Adler A, Gonzales C, Northrup B, Zwillenberg D. Hydrocephalus in Kartagener's syndrome. *Ear Nose Throat J*. 1986;65:468-72.
16. Vélez-Domínguez LC. [Neuronal migration disorders]. *Gac Med Mex*. 1998;134:207-15.
17. Torikata C, Kijimoto C, Koto M. Ultrastructure of respiratory cilia of WIC-Hyd male rats. An animal model for human immotile cilia syndrome. *Am J Pathol*. 1991;138:341-7.
18. Ibanez-Tallon I, Pagenstecher A, Fliegauf M, et al. Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum Mol Genet*. 2004;13:2133-41.
19. Chen J, Knowles HJ, Hebert JL, Hackett BP. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest*. 1998;102:1077-82.
20. Sapiro R, Kostetskii I, Olds-Clarke P, Gerton GL, Radice GL, Strauss IJ. Male infertility, impaired sperm motility, and hydrocephalus in mice deficient in sperm-associated antigen 6. *Mol Cell Biol*. 2002;22:6298-305.
21. Banizs B, Pike MM, Millican CL, et al. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development*. 2005;132:5329-39.
22. Sawamoto K, Wichterle H, González-Pérez O, et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*. 2006;311:629-32.
23. Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA: Academic Press; 2001.
24. Wu W, Wong K, Chen J, et al. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature*. 1999;400:331-6.
25. Nguyen-Ba-Charvet KT, Picard-Riera N, Tessier-Lavigne M, Baron-Van Evercooren A, Sotelo C, Chedotal A. Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci*. 2004;24:1497-506.
26. Del Carmen Gómez-Roldán M, Pérez-Martín M, Capilla-González V, et al. Neuroblast proliferation on the surface of the adult rat striatal wall after focal ependymal loss by intracerebroventricular injection of neuraminidase. *J Comp Neurol*. 2008;507:1571-87.
27. Torp SH. Diagnostic and prognostic role of Ki67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies. *Clin Neuropathol*. 2002;21:252-7.
28. Doetsch F, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. 1997;17:5046-61.