



UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA



INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN

# Neurogénesis y gliogénesis en el cerebro rostral del ratón adulto heterocigoto para Pax6 (+/Sey<sup>Dey</sup>)

T  
E  
S  
I  
S

D  
O  
C  
T  
O  
R  
A  
L

Gloria González Curto

Salamanca, 2010





# VNiVERSiDAD D SALAMANCA

NEUROGÉNESIS Y GLIOGÉNESIS EN EL CEREBRO ROSTRAL  
DEL RATÓN ADULTO HETEROCIGOTO PARA PAX6 (+/SEY<sup>DEY</sup>)

-TESIS DOCTORAL-

GLORIA GONZÁLEZ CURTO

Salamanca, marzo 2010





# VNIVERSIDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA  
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN



## NEUROGÉNESIS Y GLIOGÉNESIS EN EL CEREBRO ROSTRAL DEL RATÓN ADULTO HETEROCIGOTO PARA PAX6 (+/SEY<sup>DEY</sup>)

Memoria presentada por *Gloria González Curto* para optar  
al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Directores:

Prof. Dr. D. José Ramón Alonso Peña

Dra. D<sup>a</sup>. Carmela Gómez Rodríguez

Marzo 2010





**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA  
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN**

**NEUROGÉNESIS Y GLIOGÉNESIS EN EL CEREBRO ROSTRAL  
DEL RATÓN ADULTO HETEROCIGOTO PARA PAX6 (+/SEY<sup>DEY</sup>)**

**Gloria González Curto**

**Marzo 2010**





VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA  
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

INCyL - C/ Pintor Fernando Gallego 1  
E-37007 Salamanca (España/Spain)  
Tel: +34 923 294500 ext. 5324/5325. Fax: +34 923 294750.



José Ramón Alonso Peña, Catedrático de Biología Celular, y Carmela Gómez Rodríguez, Profesor Ayudante Doctor de Biología Celular

HACEN CONSTAR:

QUE el presente trabajo titulado “*Neurogénesis y gliogénesis en el cerebro rostral del ratón adulto heterocigoto para Pax6 (+/Sey<sup>Dy</sup>)*”, ha sido realizado por la licenciada en Biología D<sup>a</sup>. Gloria González Curto en el departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

QUE ha sido desarrollado bajo nuestra dirección y dentro del programa de doctorado *Neurociencias* de nuestra universidad.

QUE, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral y así optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, lo firmamos en Salamanca, a treinta de marzo de dos mil diez.

El director

La directora

Fdo.: José Ramón Alonso Peña

Fdo.: Carmela Gómez Rodríguez



Gracias a todos los que habéis colaborado de forma directa o indirecta, consciente o inconsciente, en la realización de este trabajo de Tesis Doctoral.

A los profesores José Ramón Alonso Peña y Carmela Gómez Rodríguez, directores de este trabajo, por guiarme sin apretar, que es una de las mejores formas de aprender. Gracias por vuestra confianza al permitirme trabajar como lo he hecho durante estos años.

Al Dr. Weruaga, gracias por ocuparse de la organización del grupo durante este tiempo y por estar pendiente del desarrollo de este trabajo. A todos los miembros del equipo de Biología Celular y Patología, por el apoyo recibido durante este tiempo, muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio, presentes y pasados, muchas gracias por hacer la vida mucho más llevadera, ayudarme a crecer y a distinguir lo que es importante (bueno, y también por las risas).

Al Dr. Vicario, por acogerme en su laboratorio todo el tiempo que ha sido necesario, por todo lo que he aprendido con él y las interesantes discusiones de los resultados. También me gustaría agradecer a todos los miembros de su laboratorio su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo. A Anahí y a Vanesa, gracias especialmente porque sin vosotras parte de esto no habría sido posible y por enseñarme vuestro buen hacer.

Al Dr. Holland y la Dra. Brennet, por abrir mi mente a la regulación postraduccional de proteínas y enseñarme sus posibilidades.

Al Dr. Crespo y a todos los miembros de su grupo de investigación, por hacer mi estancia en Valencia muy agradable y transmitirme una pequeña parte de sus conocimientos sobre microscopía electrónica.

A Bego, Eli, Noe y Patri, porque la mayoría de las veces confían en mí más que yo misma.

A Ali, Ana, Ceci y Francisco por ser un ejemplo de constancia, organización y dedicación. Siempre será un placer hacer cosas con vosotros.

A mi familia: A mis hermanos, que son un ejemplo para mí, gracias. A mis padres, muchas gracias por vuestro apoyo y fortaleza.

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Castilla y León, el Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León, la Federación de Cajas de Ahorro de Castilla y León, el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2006-05705; 2003-03719), el Ministerio de Sanidad y Consumo (PNSD SA002A07), la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña, la Universidad de Salamanca y la Fundación Memoria Samuel Solórzano.



Índice



<b>ÍNDICE .....</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>1. Neurogénesis en adultos .....</b>	<b>23</b>
Composición de las regiones neurogénicas: las células madre y el nicho .....	24
Neurogénesis adulta dirigida al BOP .....	26
Estructura y composición celular de la región neurogénica de la ZSV-CMR-BOP .....	26
El bulbo olfatorio principal .....	31
Origen de las células de nueva generación del bulbo olfatorio .....	34
Regulación de la neurogénesis .....	36
Moléculas efectoras de la regulación de la proliferación .....	37
Moléculas efectoras de la regulación de la supervivencia de las células generadas .....	38
<b>2. Generación de nuevas células en regiones no neurogénicas .....</b>	<b>39</b>
Origen embrionario de los progenitores de oligodendrocitos .....	40
Regulación de los precursores de oligodendrocitos .....	41
Ruta de las MAPKs .....	42
Ruta de la PI3K .....	44
<b>3. Pax6 y la regulación de la neurogénesis .....</b>	<b>45</b>
La familia Pax .....	45
El gen y la proteína Pax6 .....	46
Gen Pax6 .....	46
Proteína Pax6 .....	47
Regulación de la proteína .....	49
Regulación transcripcional .....	49
Modificaciones postraduccionales .....	51
Degradación de la proteína .....	51
Mutantes para Pax6 .....	52
El ratón <i>Sey<sup>DeY</sup></i> .....	53
Fenotipo .....	53
Otros genes delecionados en la mutación <i>Sey<sup>DeY</sup></i> .....	53
Función de Pax6 .....	54
Pax6 y la proliferación .....	56
Pax6 y la supervivencia .....	58
Pax6 y la diferenciación .....	58
Genes diana de Pax6 .....	59
Implicación de Pax6 en el desarrollo del BOP .....	60
Implicación de Pax6 en la neurogénesis adulta .....	61
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>69</b>
<b>1. Animales de experimentación .....</b>	<b>71</b>
<b>2. Administración de BrdU .....</b>	<b>71</b>
<b>3. Procesamiento de animales para el análisis histológico .....</b>	<b>72</b>
Inmunohistoquímica para la detección de BrdU .....	76

Inmunohistoquímica para la detección de PCNA.....	77
Inmunohistoquímica para la detección del receptor $\alpha$ de PDGF (PDGFR $\alpha$ ).....	77
<b>4. Detección de células apoptóticas: Técnica de TUNEL.....</b>	<b>80</b>
<b>5. Cultivos de células madre del BOP adulto.....</b>	<b>81</b>
Sacrificio y disección.....	81
<b>6. Análisis de modificaciones postraduccionales de la proteína Pax6 en respuesta a PDGF.....</b>	<b>86</b>
Líneas celulares.....	86
Análisis del efecto de PDGF en la proliferación de los progenitores gliales.....	87
Efecto de PDGF en la proteína Pax6.....	88
Análisis informático de secuencias susceptibles de fosforilación en la proteína Pax6... ..	88
Análisis de la regulación de Pax6 por PDGF.....	88
Análisis de la participación de las proteínas kinasas Akt y Erk.....	88
<b>7. Extracción de proteínas.....</b>	<b>89</b>
<b>8. Cuantificación de proteínas y Western Blot.....</b>	<b>91</b>
<b>9. Cuantificación.....</b>	<b>95</b>
<b>10. Análisis estadísticos.....</b>	<b>97</b>
<b>11. Fotografía y tratamiento de las imágenes.....</b>	<b>98</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>99</b>
<b>1. Región Neurogénica ZSV-CMR-BOP.....</b>	<b>101</b>
Análisis volumétrico.....	101
Expresión y distribución de Pax6 en la ZSV y CMR.....	102
Estructura de la ZSV adulta en animales control y +/Sey <sup>Dey</sup> .....	103
Análisis de la capacidad proliferativa.....	103
Análisis de la tasa proliferativa con PCNA.....	103
Análisis de la tasa de células en fase S del ciclo celular.....	104
Análisis de los progenitores NG2 <sup>+</sup> proliferativos del BOP.....	105
Análisis <i>in vitro</i> de los precursores neurogénicos del BOP.....	105
Análisis de la tasa de crecimiento de las neuroesferas.....	106
Análisis de la tasa proliferativa en células adheridas a sustrato (2 y 4 DIV).....	106
Análisis de la tasa proliferativa en flotación (7 DIV).....	107
Análisis de la capacidad de autorrenovación de las CMBOPa.....	108
Análisis de la diferenciación de las células generadas.....	109
Análisis <i>in vivo</i> de la incorporación de células en el BOP.....	109
Análisis <i>in vitro</i> de la diferenciación a astrocitos, oligodendrocitos y neuronas.....	111
Análisis <i>in vitro</i> de la diferenciación a subtipos de interneuronas del BOP.....	112
Análisis <i>in vivo</i> de la diferenciación a subtipos de interneuronas del BOP.....	114
Análisis de las conexiones sinápticas de los distintos subtipos de interneuronas glomerulares.....	120
Análisis de la supervivencia de las células generadas.....	121
Supervivencia de las células proliferativas <i>in vitro</i> .....	121
Supervivencia de las células en condiciones de diferenciación a tipos celulares neurales.....	122
Supervivencia de las células en condiciones de diferenciación a neuronas.....	123
Supervivencia a largo plazo <i>in vivo</i> .....	123
Muerte celular <i>in vivo</i> .....	123
Análisis <i>in vivo</i> de la supervivencia de las células generadas.....	124

Expresión de moléculas relacionadas con la proliferación y la supervivencia de las células .....	124
Expresión de moléculas en condiciones proliferativas.....	124
Moléculas implicadas en la respuesta a estímulos externos.....	125
Moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular .....	125
Expresión de moléculas en condiciones de diferenciación.....	126
Moléculas implicadas en señalización en respuesta a estímulos externos .....	126
Moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular .....	126
<b>2. Generación de nuevas células en regiones no neurogénicas .....</b>	<b>127</b>
Proliferación y distribución <i>in vivo</i> de precursores NG2 <sup>+</sup> .....	127
Diferenciación <i>in vivo</i> de precursores NG2 <sup>+</sup> .....	128
Supervivencia <i>in vivo</i> de las células de nueva generación en la corteza .....	129
Supervivencia de las células de nueva generación .....	129
Muerte celular en la corteza .....	130
Regulación de Pax6 por PDGF en progenitores gliales.....	130
Análisis informático de secuencias susceptibles de fosforilación en la proteína Pax6 .	130
Regulación de la proliferación de progenitores gliales por PDGF .....	132
Regulación de la proteína Pax6 por PDGF .....	132
<b>ANEXO .....</b>	<b>135</b>
<b>ICONOGRAFÍA .....</b>	<b>143</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>215</b>
<b>1. La haploinsuficiencia, la variabilidad y los estados atractivos.....</b>	<b>217</b>
<b>2. Pax6, el ciclo celular y las decisiones de destino .....</b>	<b>220</b>
<b>3. Pax6 y la diferenciación .....</b>	<b>226</b>
<b>4. Pax6 como punto de encuentro entre reguladores extrínsecos e intrínsecos de la neurogénesis .....</b>	<b>234</b>
<b>5. Regiones neurogénicas y no neurogénicas en el animal adulto y el papel de Pax6.....</b>	<b>238</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>241</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>245</b>



Abreviaturas



<b>ABC:</b> Complejo avidina-biotina-peroxidasa.	<b>FBS:</b> Suero fetal bovino ( <i>Fetal bovine serum</i> ).
<b>APS:</b> Persulfato de amonio ( <i>ammonium persulphate</i> ).	<b>FdU:</b> 5- fluoro-2'-deoxiuridina.
<b>BDNF:</b> Factor de crecimiento derivado del cerebro ( <i>brain derived neurotrophic factor</i> ).	<b>FGF:</b> Factor de crecimiento de fibroblastos ( <i>fibroblast growth factor</i> ).
<b>BMP:</b> Proteína morfogénica del hueso ( <i>bone morphogenic protein</i> ).	<b>GABA:</b> Ácido gamma aminobutírico ( <i>gamma aminobutyric acid</i> ).
<b>BOP:</b> Bulbo olfatorio principal.	<b>HD:</b> Homeodominio.
<b>BrdU:</b> 5-bromo-2'-deoxiuridina.	<b>HIPK2:</b> Proteína quinasa que interacciona con homeodominios ( <i>homeodomain-interacting protein kinase 2</i> ).
<b>CB:</b> Calbindina D-28k.	<b>HRP:</b> Peroxidasa de rábano ( <i>horseradish peroxidase</i> ).
<b>CCK:</b> Colecistoquinina.	<b>IF:</b> Inmunofluorescencia.
<b>CCM:</b> Capa de las células mitrales.	<b>IGF:</b> Factor de crecimiento similar a la insulina ( <i>insuline growth factor</i> ).
<b>CDK:</b> Kinasa dependiente de ciclina.	<b>IP:</b> Yoduro de Propidio ( <i>propidium iodide</i> ).
<b>CDKI:</b> Inhibidor de kinasa dependiente de ciclina.	<b>LGE:</b> Eminencia ganglionar lateral.
<b>CG:</b> Capa glomerular.	<b>MBP:</b> Proteína básica de mielina ( <i>myelin basic protein</i> ).
<b>CGr:</b> Capa de los granos.	<b>MGE:</b> Eminencia ganglionar medial.
<b>CI:</b> Capas internas del BOP.	<b>NGF:</b> Factor de crecimiento nervioso ( <i>Nerve growth factor</i> ).
<b>CMBOPa:</b> Célula madre del bulbo olfatorio adulto.	<b>NO:</b> Nervio olfatorio.
<b>CMN:</b> Célula madre neural.	<b>NOSn:</b> Sintasa de óxido nítrico neuronal.
<b>CMNa:</b> Células madre neurales adultas.	<b>NRO:</b> Neurona receptora olfatoria.
<b>CMR:</b> Corriente migratoria rostral.	<b>NTvA:</b> Nestina-TvA.
<b>CNO:</b> Capa del nervio olfatorio.	<b>OBLS:</b> Estructura similar al BO ( <i>olfactory bulb-like structure</i> ).
<b>CPE:</b> Capa plexiforme externa.	<b>OD:</b> Oligodendrocito.
<b>CPI:</b> Capa plexiforme interna.	<b>OPC:</b> Célula precursora de oligodendrocitos.
<b>CR:</b> Calretinina.	<b>PCNA:</b> Antígeno nuclear de proliferación celular ( <i>proliferative cell nuclear antigen</i> ).
<b>DAB:</b> Diaminobencidina.	<b>PD:</b> Dominio de tipo Paired.
<b>DIV:</b> Días <i>in vitro</i> .	<b>PDGF:</b> Factor de crecimiento derivado de plaquetas ( <i>platelet derived growth factor</i> ).
<b>DMSO:</b> Dimetilsulfóxido.	
<b>EGF:</b> Factor de crecimiento epidérmico ( <i>epidermal growth factor</i> ).	
<b>EGFR:</b> Receptor para el factor de crecimiento epidérmico.	
<b>Fabp7:</b> Proteína de unión a ácidos grasos 7 ( <i>fatty acid binding protein 7</i> ).	

## ABREVIATURAS

**PDGFR:** Receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**PG:** Célula periglomerular.

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3 kinasa.

**PIP3:** Fosfatidil inositol trifosfato.

**pRb:** FosfoRetinoblastoma.

**PST:** Dominio rico en Prolina, Serina y Treonina.

**PV:** Parvalbúmina.

**Rb:** Retinoblastoma.

**Rcn:** Reticulocalbina.

**RTK:** Receptor tirosina kinasa.

**SAC:** Célula superficial de axón corto.

**SDS:** Dodecil Sulfato Sódico.

**Sey:** Small eye.

**Sey<sup>Dey</sup>:** Dickie's small eye.

**Shh:** Sonic Hedhehog.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**TA:** Temperatura ambiente.

**TAD:** Dominio de transactivación.

**TEMED:** N,N,N,N'-tetrametilnediamina.

**TF:** Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,3-7,4.

**TFS:** Tampón fosfato salino pH 7,3-7,4.

**TH:** Tirosina hidroxilasa.

**Tuj1:** Tubulina  $\beta$ 3.

**VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*).

**WB:** Western Blot.

**Wt1:** Tumor de Wilms.

**ZSV:** Zona subventricular.

**ZV:** Zona ventricular.

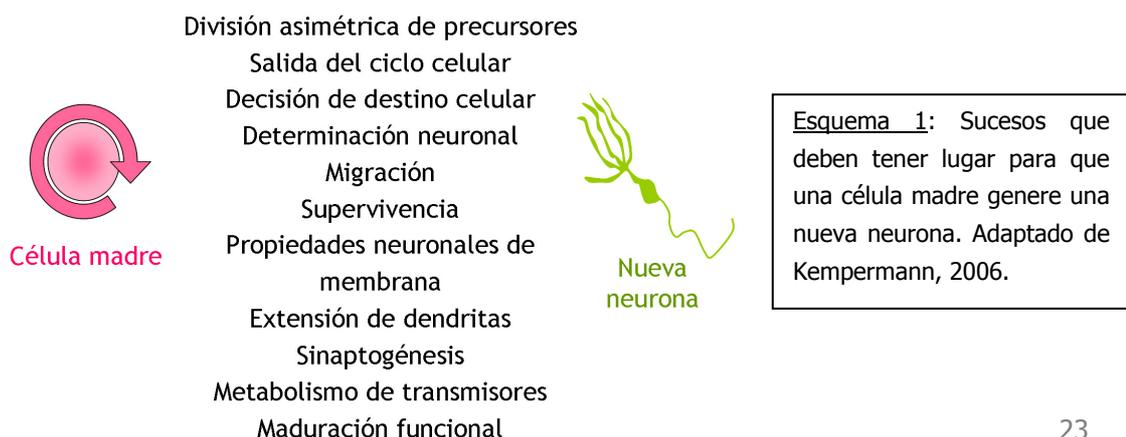
# Introducción



# 1. Neurogénesis en adultos

Los primeros estudios que demuestran fehacientemente la existencia de neurogénesis en animales adultos en el hipocampo datan de 1965 (Altman y Das). La neurogénesis dirigida al bulbo olfatorio principal (BOP) se describió algo más tarde (Kaplan y Hinds, 1977). Sin embargo, estos estudios no tuvieron continuidad durante un largo tiempo. El punto de inflexión tuvo lugar al descubrirse la existencia de células madre en el cerebro adulto (Reynolds y Weiss, 1992; Richards *et al.*, 1992), en paralelo a la identificación de la existencia de células madre en otros órganos adultos como el pulmón y el corazón (Engelhardt *et al.*, 1995; Anversa y Kajstura, 1998; Oh *et al.*, 2003; Beltrami *et al.*, 2003; revisado en Kotton *et al.*, 2004; Stastna *et al.*, 2009; Verstappen *et al.*, 2009). Estos descubrimientos hicieron que se considerase la existencia de las células madre adultas como algo inherente a todos los órganos del cuerpo, no sólo a unos cuantos, clásicamente considerados regenerativos, como la médula ósea, el intestino o la piel. A partir de ese momento, principios de los años 90, la neurogénesis en animales adultos supuso un gran cambio de paradigma en la Neurobiología y, en la actualidad, el funcionamiento del cerebro está siendo revisado incluyendo las posibilidades que plantea la plasticidad debida a la generación de nuevas células.

Como neurogénesis adulta se conoce al proceso de formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto, que comprende desde las señales que inducen la división de la célula precursora hasta su diferenciación y su establecimiento definitivo como una nueva neurona funcional. Este proceso comienza con la determinación del tipo de división que sufre una célula precursora o célula madre, que puede ser simétrica si se producen dos células hijas idénticas, o asimétrica, si las hijas tienen potencial diferente (revisado en Farkas y Huttner, 2008; Zhong y Chia, 2008). Tras una división asimétrica, distintos factores, en su mayoría desconocidos, determinan que alguna de las células hijas se convierta en un tipo celular concreto, por ejemplo una neurona (Kempermann, 2006). Además, hay que tener en cuenta los factores que permiten la supervivencia, la migración y la diferenciación de las neuronas de nueva generación, la ramificación de axones y dendritas y el establecimiento de nuevas sinapsis (Esquema 1).



Las áreas del cerebro capaces de producir nuevas neuronas se conocen como **regiones neurogénicas**. En el cerebro adulto de mamíferos hay dos regiones neurogénicas claramente definidas: la formación hipocampal y la región neurogénica constituida por la zona subventricular -corriente migratoria rostral –bulbo olfatorio principal (ZSV-CMR-BOP). En ambas regiones se producen nuevas interneuronas de forma constante durante toda la vida del animal (revisado en Kempermann, 2006). La capacidad neurogénica fuera de estas dos regiones es una cuestión muy controvertida, siendo la corteza cerebral una de las regiones más polémicas. Por una parte, Gould y colaboradores (1999, 2001) afirman que en la neocorteza adulta se generan nuevas neuronas, aunque sus resultados no han podido ser reproducidos por otros grupos de investigación (Kornack y Rakic, 2001; Rakic, 2002; Koketsu *et al.*, 2003). Por otra parte, la mayor parte de los investigadores apoyan la idea de que, en condiciones fisiológicas, en las regiones no neurogénicas se producen únicamente células gliales, y que la formación de nuevas neuronas en estas regiones se produce solo tras un daño o un estímulo patológico, como puede ser, por ejemplo, un infarto cerebral (revisado en Ming y Song, 2005). El estudio de la neurogénesis adulta junto con el de la formación de nuevas células en regiones no neurogénicas son los objetivos de esta Tesis Doctoral.

## Composición de las regiones neurogénicas: las células madre y el nicho

Las diferencias entre las regiones neurogénicas y no neurogénicas en el cerebro adulto son principalmente dos, y afectan a los precursores y a la permisividad del nicho (Suhonen *et al.*, 1996). Si bien las regiones no neurogénicas contienen precursores (Palmer *et al.*, 1999; Kondo y Raff, 2000), éstos no están organizados en grupos, como sí lo hacen en las regiones neurogénicas, y además carecen del microambiente permisivo necesario para la formación de neuronas. Este hecho se ha comprobado al implantar precursores de zonas neurogénicas en zonas no neurogénicas (Suhonen *et al.*, 1996). Este microambiente permisivo, también conocido como nicho de las células madre o nicho germinativo, consta de varios componentes: las propias células precursoras (células madre, progenitores), astrocitos, células endoteliales, microglía o macrófagos, y componentes extracelulares tales como la matriz extracelular, incluyendo la lámina basal (Kempermann, 2006).

Las **células madre** se caracterizan principalmente por dos propiedades: ser capaces de autorrenovarse ilimitadamente y ser multipotentes, es decir, poseer la capacidad de diferenciarse en, al menos, dos tipos celulares diferentes (McKay, 1997; van der Kooy y Weiss, 2000; Weissman *et al.*, 2001). La capacidad de autorrenovación consiste en que la célula madre es capaz de mantener su población, bien mediante división simétrica,

produciendo dos células hijas iguales a la madre, o bien mediante división asimétrica, dando lugar a una célula hija idéntica a la madre y a otra diferente, más determinada a algún linaje de diferenciación (Noctor *et al.*, 2001; 2004; 2008). La capacidad de autorrenovación integra dos propiedades, el control de la proliferación y el mantenimiento del estado indiferenciado (revisado en Foshay y Gallicano, 2007; Li y Zhao, 2008; Zhong y Chia, 2008). Las células capaces de dividirse y/o altamente indiferenciadas pero que no conservan la capacidad de autorrenovación ilimitada se conocen con el término genérico de **progenitores**. Normalmente, los progenitores se dividen con más frecuencia que las células madre (Kempermann, 2006). En el encéfalo, podemos encontrar células con distintos grados de potencial de autorrenovación y de multipotencialidad que son difíciles de categorizar como células madre o progenitores en un momento concreto. En este caso, es preferible utilizar el término **precursor** para referirse a todas ellas (Kempermann, 2006).

Además de las células madre (que son de naturaleza astrocitaria) y su linaje, en el nicho germinativo están presentes otros componentes celulares, como por ejemplo distintos tipos de **astrocitos**, muy importantes para las funciones del nicho. Tanto en el hipocampo como en la neurogénesis hacia el BOP se ha demostrado que las células madre son astrocitos (Doetsch *et al.*, 1999 a y b; Seri *et al.*, 2001; Merkle *et al.*, 2004), pero en estas regiones también existen otras poblaciones de astrocitos sin potencial neurogénico que favorecen la formación de neuronas (Song *et al.*, 2002). Esta es una habilidad de la que carecen el resto de astrocitos del encéfalo y es de tal magnitud, que incluso favorecen la neurogénesis a partir de precursores de regiones no neurogénicas, como la médula espinal o la *substantia nigra* (Shihabuddin *et al.*, 2000; Lie *et al.*, 2002).

La **microglía** parece tener un papel dual en la regulación de la neurogénesis. Por una parte, la inhibe al producir sustancias inhibitoras como la Interleucina 6 (Mehler *et al.*, 1995; Bonni y Greenberg, 1997; Vallieres *et al.*, 2002). Por otra, al producir neurotrofinas, podría tener también una función trófica (Battista *et al.*, 2006; Walton *et al.*, 2006).

Estos componentes celulares del nicho secretan moléculas que actúan de forma paracrina y/o autocrina promoviendo la neurogénesis *in vitro* e *in vivo*. Muchas de estas moléculas son exclusivas de las regiones neurogénicas (Agasse *et al.*, 2004). Por el contrario, las regiones no neurogénicas secretan moléculas que inhiben la neurogénesis (Agasse *et al.*, 2004).

Los **vasos sanguíneos** (Palmer *et al.*, 2000) producen moléculas como el VEGF (*vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento del endotelio vascular) que contribuirían a la homeostasis de las células madre (Jin *et al.*, 2002; Fabel *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2004; Schanzer *et al.*, 2004), y por ello se les considera componentes esenciales del

nicho. De hecho, los precursores de las regiones neurogénicas adultas se encuentran íntimamente relacionados con ellos, ya que los precursores emiten un proceso que contacta directamente con los vasos (Filippov, 2003; Mirzadeh *et al.*, 2008), lo que ha dado lugar a la teoría del "nicho vascular" (Palmer *et al.*, 2000). Según esta teoría, a través de este contacto, las células madre recibirían señales reguladoras mediante factores solubles y moléculas de la matriz extracelular (Leventhal *et al.*, 1999; Mercier *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004).

Por último, el nicho neurogénico también está constituido por **componentes extracelulares** como la matriz extracelular (Mercier *et al.*, 2002, Álvarez-Buylla y Lim, 2004). El contacto de los precursores con estos componentes es importante para su regulación, aunque se sabe muy poco de las moléculas implicadas.

La compleja composición del nicho neurogénico dibuja un escenario en el que actuarían interacciones célula-célula, moléculas de la matriz extracelular y sustancias difusibles que, bien llegan a la región neurogénica a través de los vasos sanguíneos o bien, son producidas por las propias células del nicho o por fuentes desconocidas. Todas estas sustancias reguladoras que conforman el nicho pueden actuar activando o reprimiendo la neurogénesis en el más amplio sentido del término, incluyendo la actuación sobre la proliferación, autorrenovación, potencialidad, diferenciación, supervivencia y migración de las células.

## Neurogénesis adulta dirigida al BOP

La población de células precursoras de la neurogénesis adulta dirigida al BOP se encuentra en las paredes de los ventrículos laterales (región conocida como ZSV), la CMR y probablemente, en el propio BOP. Los neuroblastos producidos en cualquier punto de la región neurogénica migran una gran distancia a lo largo de una vía definida, la CMR, hasta alcanzar el BOP, donde forman interneuronas (Altman, 1969). Esta ruta migratoria ocupa el lugar adyacente al ventrículo olfatorio obliterado y conecta la ZSV con los BOPs, formando una columna estrecha y larga de células que se expande desde el final de los ventrículos laterales hasta el BOP (Doetsch *et al.*, 1997; Peretto *et al.*, 1999; Gritti *et al.*, 2002; Liu y Martin 2003).

## Estructura y composición celular de la región neurogénica de la ZSV-CMR-BOP

Una de las diferencias fundamentales entre la neurogénesis embrionaria y la adulta es que las células madre neurales adultas están desplazadas de la zona ventricular (ZV) hacia la ZSV por la presencia de células endoteliales (revisado en Farkas y Huttner, 2008),

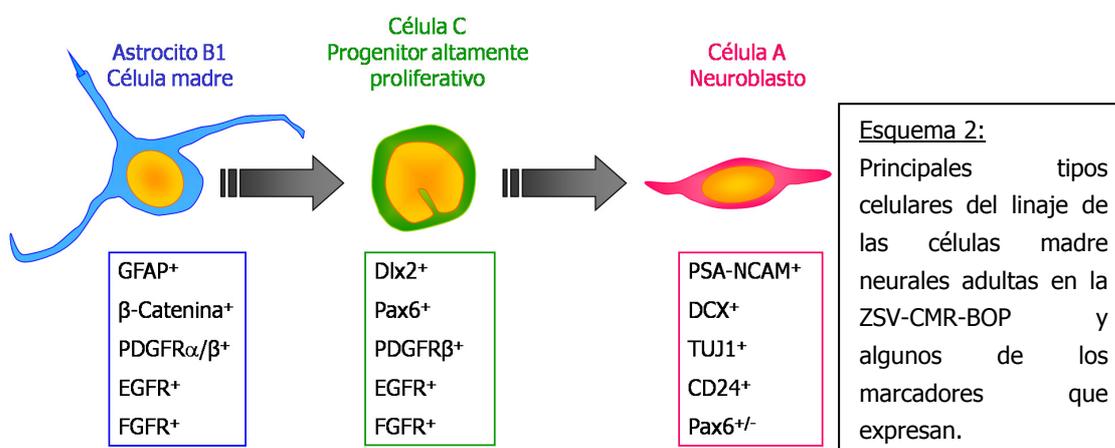
al contrario de lo que sucede durante el desarrollo embrionario, en el que el cuerpo celular de la glía radial (células madre neurales embrionarias), ocupa la zona ventricular. Debido a esto y a que, hasta hace muy poco tiempo la estructura tridimensional de la ZV y ZSV adultas eran desconocidas (Mirzadeh *et al.*, 2008), la regulación de la neurogénesis adulta ha tardado en empezar a ser dilucidada. En la actualidad, se conoce que la ZV y ZSV adultas están compuestas por células con potencial neurogénico y otras células que, aunque favorecen la neurogénesis, no tienen esa potencialidad. A todas estas células se las ha clasificado en:

**Astrocitos tipo B1**, que son las **células madre** de esta región neurogénica. Ultraestructuralmente, se caracterizan por presentar un núcleo poco denso a los electrones con la cromatina dispersa, de contorno irregular y con numerosas indentaciones y un citoplasma electrolúcido con muchos filamentos intermedios (Doetsch *et al.*, 1997). Poseen un cilio único y corto en contacto con el ventrículo y un proceso basal en contacto con vasos sanguíneos (Mirzadeh *et al.*, 2008). Estos procesos basales contribuyen a formar los tubos gliales por los que migran los neuroblastos, participando en su migración y maduración. Además, también podrían permitir a las células B1 recibir señales reguladoras desde la lámina basal de los vasos sanguíneos (Kerever *et al.*, 2007) o desde el torrente circulatorio como hormonas (Shingo *et al.*, 2001) y factores de crecimiento, como el PDGF (*platelet derived growth factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas) (Jackson *et al.*, 2006) y los IGFs (*insuline growth factor*, factores de crecimiento similares a la insulina) (Jiang *et al.*, 1998). Por otra parte, el contacto entre las células B1 y el líquido cefalorraquídeo que se produce en el cilio puede regular los procesos de división simétrica y asimétrica de estas células (Chenn y Walsh, 2002; Kosodo *et al.*, 2004) mediante la exposición a moléculas reguladoras esenciales, integrantes del nicho neurogénico (Lim *et al.*, 2000; Peretto *et al.*, 2004). Las células B1 poseen receptores para los factores de crecimiento PDGF (Ishii *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2008), FGF2 (*Fibroblast growth factor 2*, factor de crecimiento de fibroblastos 2; Chadashvili y Peterson, 2006, Frinchi *et al.*, 2008, Mudo *et al.*, 2009) y EGF (*Epidermal growth factor*, factor de crecimiento epidérmico; Doetsch *et al.*, 2002), que regulan su proliferación, diferenciación y supervivencia (Esquema 2).

**Precusores tipo C**, que son las células más activas mitóticamente y que provienen de los astrocitos B1. Ultraestructuralmente, son más electrodensas que las de tipo B pero menos que las de tipo A (Doetsch *et al.*, 1997; García-Verdugo *et al.*, 1998). Presentan un contorno celular liso, un núcleo con profundas invaginaciones, varios nucleolos reticulares y contactan frecuente entre ellas y con los neuroblastos en migración mediante uniones intercelulares (Doetsch *et al.*, 1997). Están presentes en todos los niveles de la ZSV, pero el número es menor en las partes más caudales (García-Verdugo *et al.*, 1998). Presentan una tasa proliferativa diez veces superior a las demás y, debido a ello, se conocen como precursoros altamente proliferativos (Doetsch *et al.*, 1997). Estas células se acumulan,

no migran, y forman grupos, lo que es característico de los precursores de regiones neurogénicas. Son una población intermedia que se divide rápidamente para dar lugar a muchos neuroblastos que iniciarán después la migración (Doetsch *et al.*, 1997, García-Verdugo *et al.*, 1998). No obstante, algunos autores han propuesto que, *in vitro*, al mantenerlas en contacto con factores de crecimiento, estas células son capaces de reprogramarse y hacerse multipotentes (Doetsch *et al.*, 2002). Una gran proporción de células de tipo C expresa el factor de transcripción Pax6 (Hack *et al.*, 2005; Kowhi *et al.*, 2005), aunque no es un marcador exclusivo de este tipo celular, y presentan también receptores para PDGF (PDGFR; Ishii *et al.*, 2008) y EGF (EGFR; Cesetti *et al.*, 2009; Pastrana *et al.*, 2009) (Esquema 2).

Los **neuroblastos**, células de **tipo A** (proviene de la división de los precursores altamente proliferativos o células de tipo C), son el tipo celular más abundante, y migran grandes distancias de una forma muy peculiar, que se conoce como migración en cadena. Poseen una morfología bipolar con un cuerpo celular alargado y de contorno liso y ultraestructuralmente se caracterizan por tener un núcleo de gran tamaño, eucromático y ocasionalmente con indentaciones (Doetsch *et al.*, 1997). Además, mantienen su capacidad de proliferación durante la migración, lo que constituye una diferencia fundamental respecto a lo que sucede durante el desarrollo embrionario y en el proceso de neurogénesis adulta hipocampal (Menezes *et al.*, 1995; Doetsch *et al.*, 1997; Wichterle *et al.*, 1997; Peretto *et al.*, 1999) (Esquema 2).

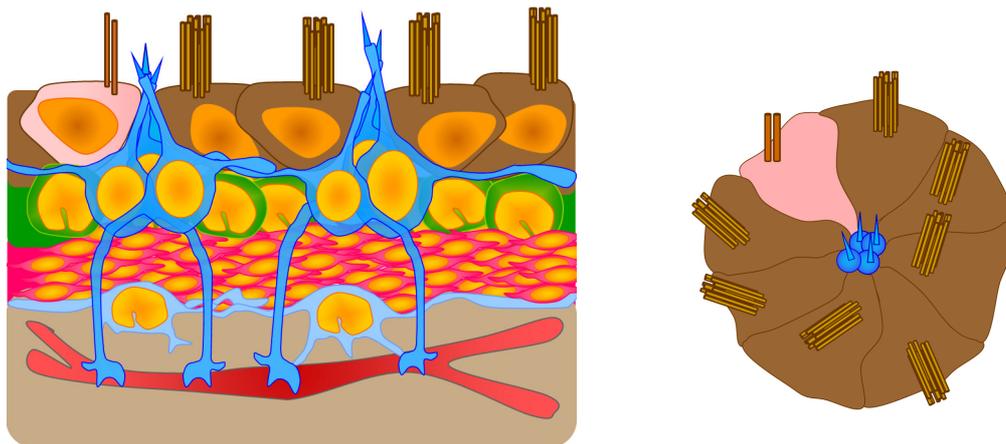


**Células endodiales tipo 1 (E1)** y **células endodiales tipo 2 (E2)**, que se diferencian por el número de cilios que presentan, siendo las E1 multiciliadas y las E2 biciliadas (Mirzadeh *et al.*, 2008). Su contribución a la neurogénesis adulta de la ZSV ha sido muy discutida a lo largo del tiempo, puesto que algunos investigadores afirman que son células madre (Chiasson *et al.*, 1999; Doetsch *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1999; Capela y Temple, 2002; Coskun *et al.*, 2008), aunque otros han probado que no lo son, al menos en las condiciones de un cerebro no patológico (Spassky *et al.*, 2005). Dejando a un lado la

posibilidad de que los endimocitos sean también células madre, lo cierto es que contribuyen al proceso neurogénico de manera esencial, ya que el movimiento de sus cilios produce un flujo del líquido cefalorraquídeo y de determinados factores reguladores, que dirige la migración de los neuroblastos hacia el BOP (Sawamoto *et al.*, 2006).

**Astroцитos tipo B2**, que son considerados astroцитos protoplásmicos. Las células B2 son más electrodensas, más pequeñas y con núcleos más heterocromáticos que las de tipo B1 (Doetsch *et al.*, 1997; Peretto *et al.*, 1997). De forma general, estas células no proliferan o lo hacen con frecuencia muy baja (Lois *et al.*, 1996). Se localizan en el límite con el estriado, rodean a las cadenas de neuroblastos migrantes formando túneles (Doetsch *et al.*, 1997) y son, probablemente, la fuente de FGF2 que estimula la proliferación de las células B1 (Mudo *et al.*, 2009). Además, no expresan receptores para EGF, lo que ha permitido recientemente el desarrollo de un método eficaz de purificación de las diferentes poblaciones de células madre y su progenie (Pastrana *et al.*, 2009).

Todas estas células que componen la ZSV tienen una organización tridimensional característica (Esquema 3). La superficie apical de una o varias células B1 está rodeada por células E1 formando un molinete. Esta estructura es específica de las paredes de los ventrículos laterales, que son las regiones neurogénicas de los ventrículos. El reciente descubrimiento de esta organización tridimensional ha puesto de manifiesto que en el adulto podría mantenerse la estructura de la ZV-ZSV embrionaria (ZV ocupada por células madre (glía radial) y ZSV ocupada por progenitores intermedios), aunque espacialmente los límites entre la ZV y la ZSV adultas no estén tan definidos (Mirzadeh *et al.*, 2008).



**Esquema 3:** Modelo tridimensional de la ZV y ZSV de los ventrículos laterales adultos. Células B1 (azul); células B2 (azul claro); células C (verde); células A (rosa oscuro). Las células B1 tienen un proceso basal largo que acaba en un vaso sanguíneo (rojo) y un proceso apical que acaba en la superficie ventricular. La organización en molinete se observa en la superficie ventricular y está formada por células endimales E1 (marrón) que rodean las superficies apicales de las células B1 (azul). Las células E2, biciliadas, están representadas en rosa claro. Modificado de Mirzadeh *et al.*,

Pese a que tradicionalmente se ha considerado que la pared de los ventrículos laterales era la única zona de esta región neurogénica que contiene células madre, posteriormente se ha comprobado que existen células de tipo B y C residentes tanto en la CMR como en su extensión en el BOP (CMR-BOP) (Gritti *et al.*, 2002). De hecho, la **CMR** está organizada como una gran red de cadenas de neuroblastos migrantes que viajan a través de los procesos de células tipo B. Pero, además, existen parches de células formados por precursores tipo C repartidos entre esa gran red de neuroblastos (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Doetsch *et al.*, 1999). Las cadenas de células cubren la pared de los ventrículos laterales y convergen en la CMR por el asta dorsal de la ZSV, justo debajo del cuerpo calloso, y las células migran tangencialmente hasta alcanzar el BOP (Lois *et al.*, 1996; Doetsch *et al.*, 1997, revisado en Whitman y Greer, 2009).

La migración en cadena constituye un tipo único de migración. Aún así, comparte algunas características con los dos tipos de migraciones que ocurren durante el desarrollo embrionario: las migraciones radiales, en las que los progenitores se apoyan en glía radial; y las tangenciales, en las que la migración es dependiente de moléculas de matriz extracelular. Por una parte, la migración en cadena se apoya en los astrocitos de la región neurogénica, que presentan características únicas que les permiten favorecer la migración de los neuroblastos (Jankovski y Sotelo, 1996; Lois *et al.*, 1996; Peretto *et al.*, 1997; García-Marqués *et al.*, 2010). Por otra parte, los neuroblastos dependen profundamente de la matriz extracelular y del contacto con otros neuroblastos para su movimiento, migrando en pequeños grupos, asemejándose a la migración tangencial que ocurre durante el desarrollo (Rousselot *et al.*, 1995; Chazal *et al.*, 2000). Una de las características propias de la migración en cadena es que las células que migran continúan dividiéndose en el camino (Menezes *et al.*, 1995), aunque la tasa de proliferación es menor que en la ZSV y el ciclo celular se alarga (Smith y Luskin, 1998). Otra de las características propias de esta migración es que no solo depende de moléculas difusibles y de la relación entre los neuroblastos y de éstos con los astrocitos sino que, además, la dirección de la migración depende de la dirección del movimiento del líquido cefalorraquídeo en los ventrículos laterales, marcada fundamentalmente por los cilios de los ependimocitos (Rousselot *et al.*, 1995; Lois *et al.*, 1996; Doetsch *et al.*, 1997; Peretto *et al.*, 1997; Sawamoto *et al.*, 2006).

Una vez en el BOP, las células cambian de tipo de migración, dispersándose de forma radial por todo el BOP, mediante un mecanismo aún desconocido en el que podrían estar implicados los astrocitos (García-Marqués *et al.*, 2010) y los vasos sanguíneos (Bovetti *et al.*, 2007; Snappyan *et al.*, 2009). Sin embargo, y a pesar de su nombre, la migración de los neuroblastos en el BOP no depende de la glía radial, ya que ésta no existe en el BOP adulto (revisado en Whitman y Greer, 2009). Una vez en el BOP, los neuroblastos comienzan a mostrar signos de maduración (expresan neurotransmisores, tienen actividad electrofisiológica) (Carleton *et al.*, 2003). Sin embargo, una gran proporción de las células de

nueva generación que llegan al BOP mueren en un corto periodo de tiempo (Biebl *et al.*, 2000). Por ello, las conexiones funcionales que las células de nueva generación sean capaces de establecer pueden resultar esenciales para su supervivencia. No obstante, una vez superado el pico inicial de muerte celular, que en ratones se produce entre dos semanas y 45 días después de la división inicial de las células, éstas son capaces de sobrevivir al menos 2 años (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002).

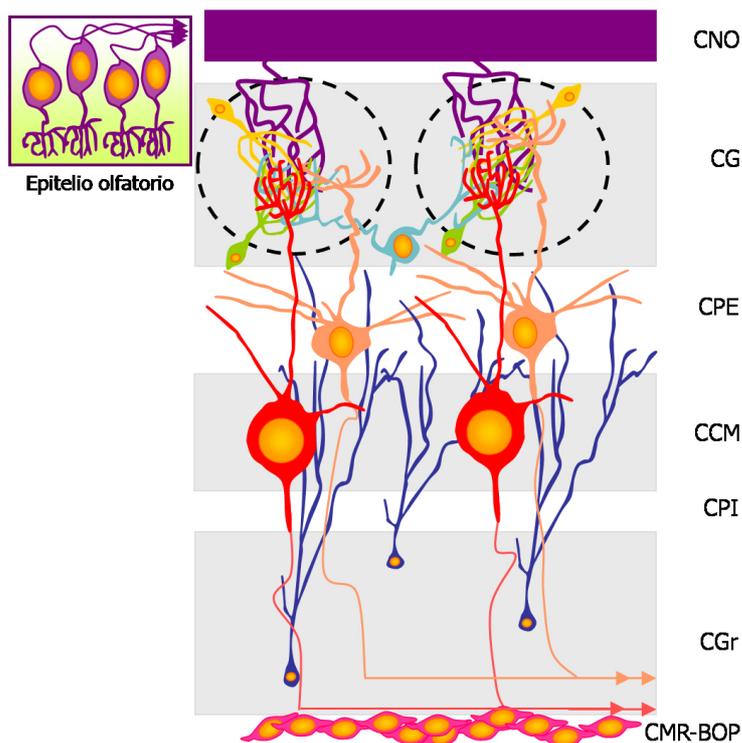
## El bulbo olfatorio principal

El bulbo olfatorio principal es, como se ha mencionado anteriormente, el lugar de incorporación de las interneuronas generadas en la región neurogénica adulta de la ZSV-CMR-BOP. Es una estructura par intracraneal y de forma ovoide que se encuentra en la región más rostral del telencéfalo (Ramón y Cajal, 1911; Shipley *et al.*, 1996; Kratskin y Belluzzi, 2003).

El BOP se encuentra organizado en capas concéntricas en las que se distribuyen los somas, dendritas y axones de las células de proyección y de las interneuronas encargadas de modular el paso de la información olfatoria (Shipley y Ennis, 1996) (Esquema 4). La vía olfatoria comienza cuando los odorantes son reconocidos por moléculas receptoras específicas situadas en las neuronas receptoras olfatorias (NRO) del epitelio olfatorio que recubre una zona de la cavidad nasal (Shipley *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 1999; Leon y Johnson, 2003; Lledó *et al.*, 2005). Sus axones una vez que llegan al BOP conforman la capa del nervio olfatorio (CNO) y se introducen en los glomérulos del BOP (Ramón y Cajal, 1911; Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994; Mombaerts *et al.*, 1996, Shipley *et al.*, 1996; Kratskin y Belluzzi, 2003) donde establecen sinapsis con las células mitrales y células empenachadas, las neuronas de proyección bulbares (Imamura *et al.*, 1992; Mori y Yoshihara, 1995; Mori *et al.*, 1999; Lledó *et al.*, 2005). Estas células de proyección envían la señal sensitiva, previamente modulada, a través del tracto olfatorio lateral a las distintas regiones de la corteza olfatoria primaria (Scott, 1986; Shipley y Ennis, 1996). Los procesos modulatorios que tienen lugar en el BOP están mediados por la actividad de interneuronas (Mori *et al.*, 1999; Kratskin y Belluzzi, 2003) y fibras centrífugas (Linster y Gervais, 1996; Linster y Hasselmo, 1997) y tienen lugar principalmente en los glomérulos olfatorios y en la capa plexiforme externa. Los glomérulos son estructuras esféricas ricas en neuropilo y rodeadas por una cápsula de somas neuronales (interneuronas yuxtglomerulares: periglomerulares, células superficiales de axón corto y células empenachadas externas) y células gliales. La capa en la que se encuentran dispuestos se denomina capa glomerular (CG; Esquema 4). En los glomérulos, los axones procedentes de las NRO hacen sinapsis axodendríticas sobre las neuronas de proyección y sobre diferentes interneuronas (Shipley *et al.*, 1996; Kratskin y Belluzzi, 2003). En esta capa, la modulación de la transmisión de la

## IINTRODUCCIÓN

señal sensorial tiene lugar tanto a nivel del nervio olfatorio (NO) como a nivel de las células de proyección (Nickell *et al.*, 1994; Shipley y Ennis, 1996; Mori *et al.*, 1999; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2000; Berkowicz y Trombley, 2000; McGann *et al.*, 2005). En la capa plexiforme externa (CPE), subyacente a la CG, tiene lugar una segunda modulación del paso de la información olfatoria. Esta modulación está mediada tanto por las propias interneuronas de la CPE, como por granos, cuyo soma se encuentra en una capa más interna: la capa de los granos (CGr; Esquema 4). La CPE se caracteriza por tener una densidad celular relativamente baja y gran cantidad de neuropilo procedente de las dendritas laterales de células mitrales y de células empenachadas, de las dendritas de granos (Shepherd, 1972), de los axones de las células empenachadas y de fibras centrífugas (Shipley *et al.*, 1996; Kratskin y Belluzzi, 2003). Los somas que se encuentran en esta capa pertenecen a interneuronas que presentan distinta morfología pero tienen características neuroquímicas y ultraestructurales similares (van Gehuchten y Martin, 1891; Schneider y Macrides, 1978; Kosaka *et al.*, 1994; Toida *et al.*, 1994; 1998, Crespo *et al.*, 2006). Por último, por la capa más profunda del BOP transcurren fibras aferentes y eferentes que convergen en la zona caudal del BOP con la sustancia blanca dispersa de la CGr, formando el tracto olfatorio lateral (Price y Sprich, 1975; Willey *et al.*, 1983). En este trabajo la llamaremos, por cuestiones prácticas, CMR-BOP ya que puede considerarse como una extensión de la CMR. Por esta capa llegan las células de nueva generación que migrarán radialmente por las distintas capas del BOP y se diferenciarán a interneuronas (Altman, 1969; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Carleton *et al.*, 2003). Además, esta capa resulta la región bulbar más plausible de localización de las células madre residentes en el BOP (Gritti *et al.*, 2002).



**Esquema 4:** Organización de las células en las diferentes capas del BOP. CCM: capa las de células mitrales. CNO: capa de las fibras del nervio olfatorio. CG: capa glomerular. CGr: capa de los granos. CPE: capa plexiforme externa. CPI: capa plexiforme interna. Axones del nervio olfatorio: morado. Células periglomerulares: amarillo y verde. Célula superficial de axón corto: azul claro. Célula empenachada: naranja. Célula mitral: rojo. Granos: azul oscuro. Neuroblastos: fucsia.

Los cambios plásticos que se producen en los componentes que llevan a cabo la modulación olfatoria a nivel bulbar hacen posible el aumento progresivo de las capacidades de discriminación entre odorantes y el establecimiento de la memoria olfatoria (Mori *et al.*, 1999; Kratskin y Belluzzi, 2003). Entre estos cambios plásticos se encuentra la incorporación de interneuronas de nueva generación.

Los principales tipos de interneuronas del BOP generadas de forma continua en la neurogénesis adulta son células periglomerulares (PGs) y granos (revisado en Merkle *et al.*, 2007). Recientemente también se ha descrito la formación en el adulto de otros tipos de interneuronas bulbares, como células empenachadas externas y células de axón corto, aunque comparativamente su número es testimonial (Yang, 2008; Brill *et al.*, 2009).

Las células periglomerulares (PGs) son interneuronas yuxtglomerulares que intervienen en el proceso de inhibición tanto intraglomerular como entre glomérulos próximos (Pinching, 1970; Pinching y Powell, 1971b; Shepherd, 1972; Puopolo y Belluzzi, 1998b; Aungst *et al.*, 2003; Lledó *et al.*, 2005). Son de pequeño tamaño, tienen el soma redondeado y sus dendritas, que presentan gémulas, se suelen ramificar en un único glomérulo u ocasionalmente en dos (Esquema 4). Las PGs pueden recibir la información olfatoria de forma directa desde el NO o de forma indirecta a través de las dendritas apicales de las células mitrales y células empenachadas (Kratskin y Belluzzi, 2003). Se han definido tres tipos de células periglomerulares dependiendo de esta peculiaridad y de su naturaleza GABAérgica (*gamma aminobutyric acid*; ácido gamma aminobutírico). Si sus dendritas contactan con los axones del NO, y son GABAérgicas, se conocen como PGs de tipo I, si no lo hacen y no son GABAérgicas, son de tipo II (Kosaka *et al.*, 1997) y si contactan con el NO y no son GABAérgicas, son de tipo III (Gutiérrez-Mecinas *et al.*, 2005).

Además de esta diferencia, estas células se distinguen por sus características neuroquímicas y fisiológicas (Kosaka *et al.*, 1995; 1997; Puopolo y Belluzzi, 1998a; Toida *et al.*, 1998; 2000; Crespo *et al.*, 2003). En general, en el ratón todos los tipos neuroquímicos coexisten con la expresión de la enzima de síntesis del GABA GAD, por lo que todas las células PGs se consideran GABAérgicas (Kosaka y Kosaka, 2007). Además de ser GABAérgicas, las PGs se pueden subdividir neuroquímicamente en varias poblaciones: células calretinina (CR) positivas, que en un 50% coexpresan sintasa neuronal de óxido nítrico (NOSn) (Kosaka y Kosaka, 2007); células calbindina (CB) positivas, que son capaces de responder a óxido nítrico ya que coexpresan guanilato ciclasa (Gutiérrez-Mecinas *et al.*, 2005; 2008) y células dopaminérgicas (tirosina hidroxilasa, TH, positivas) (Kosaka *et al.*, 1995). Pese a que éstas son las poblaciones mayoritarias, también existe un 30% de PGs NOSn<sup>+</sup> que no coexpresan CR; y una población de PG que coexpresa colecistoquinina (CCK) y parvalbúmina (PV), pero ninguno de los marcadores anteriormente mencionados (Kosaka y Kosaka, 2007; Baltanás, comunicación personal). Estos subtipos celulares tienen diferente conectividad y, por tanto, diferentes funciones en cuanto a la modulación de la señal

olfatoria a nivel bulbar, pero se asemejan en que todos ellos se generan de forma continua durante la neurogénesis adulta (Whitman y Greer, 2009).

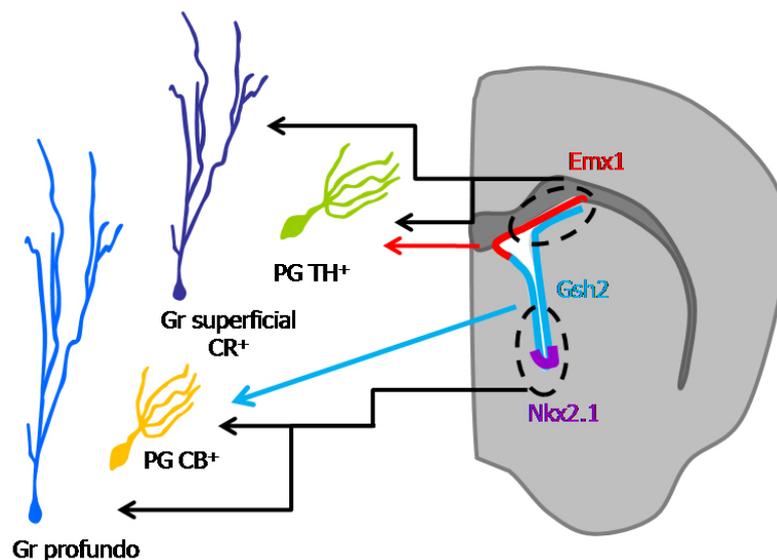
Además de células periglomerulares, en la CG cabe destacar la presencia de otro tipo de interneuronas, las células superficiales de axón corto (SAC). Son de mayor tamaño que las PGs, se sitúan en el límite de la CG con la CPE y poseen varios troncos dendríticos que se ramifican en la periferia de varios glomérulos sin penetrar en su interior (Pinching y Powell, 1971a) (Esquema 4). Estas células son GABAérgicas y se encargan de inhibir a las células de proyección de forma directa e indirecta (Crespo *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2005), permitiendo "limpiar" de ruido la señal olfatoria (Aungst *et al.*, 2003).

Los granos son el tipo celular del BOP que se produce en mayor cantidad en la neurogénesis adulta. Son interneuronas de pequeño tamaño que carecen de axón y poseen dendritas basales que se ramifican en la CGr y dendritas apicales que lo hacen en la CPE (Price y Powell, 1970a) (Esquema 4), donde establecen sinapsis dendrodendríticas, mayoritariamente recíprocas, con las dendritas de las células mitrales y empenachadas (Rall *et al.*, 1966; Price y Powell, 1970b; Shipley y Ennis, 1996). Las células mitrales y empenachadas establecen sinapsis excitatorias glutamatérgicas sobre los granos, mientras que los granos son células inhibitorias GABAérgicas (Halász y Shepherd, 1983; Ottersen y Storm-Mathisen, 1984; Liu *et al.*, 1989; Isaacson y Strowbridge, 1998). Este tipo de interacciones entre las células de proyección y los granos producen una retro-inhibición de las células de proyección, ya que éstas excitan a los granos y como resultado, los granos las inhiben (Rall y Shepherd, 1968; Shepherd, 1972; Shipley y Ennis, 1996; Lledó *et al.*, 2004). Además de esta retroinhibición, las neuronas de proyección también reciben inhibición lateral de granos activados por otras células de proyección vecinas (Rall *et al.*, 1966; Isaacson y Strowbridge, 1998; Margrie *et al.*, 2001). Los granos se clasifican en tres tipos de según la posición más o menos profunda de su soma en la CGr, de sus dendritas en la CPE y del tipo de célula principal con el que contactan (Schneider y Macrides, 1978; Mori y Kishi, 1982; Greer, 1987).

### Origen de las células de nueva generación del bulbo olfatorio

Las distintas subpoblaciones de interneuronas se producen a partir de distintas regiones de la ZSV y la CMR (Merkle *et al.*, 2007). Las regiones anterior y dorsal de la ZSV producen distintos subtipos de PGs, y dentro de ésta, cada subtipo neuroquímico tiene su región preferente de origen. Los granos se producen a partir de toda la ZSV, aunque los granos más superficiales se originan preferentemente a partir de regiones dorsales, mientras que los situados más profundamente tienen su origen en regiones ventrales. Además, se

conoce que los granos  $CR^+$  provienen de células madre situadas en porciones anteriores de la ZSV, que también dan lugar a PGs  $CR^+$ . También parece existir regionalización en el tipo de interneuronas generadas en distintos niveles de la CMR. Así, por ejemplo, a partir de precursores localizados en niveles mediales de la CMR se generan principalmente PGs dopaminérgicas (Hack *et al.*, 2005). Al transplantar las células madre de una región concreta de la ZSV a otra distinta, siguen dando lugar a los mismos subtipos de interneuronas que en su localización original (Merkle *et al.*, 2007), de lo que se deduce que, en este caso, están restringidas intrínsecamente para generar tipos concretos de interneuronas (Esquema 4). De hecho, la regionalización de las distintas poblaciones de la ZSV adulta que generan diferentes tipos de interneuronas se determina durante el desarrollo embrionario. Las distintas regiones de la ZSV adulta surgen a partir de las distintas regiones embrionarias de la ZV, que presentan expresión diferencial de distintos factores de transcripción (Lledó *et al.*, 2008) (Esquema 5).



**Esquema 5:** Regiones de la ZSV que dan lugar a las diferentes poblaciones de interneuronas bulbares de nueva generación. La ZSV dorsal (óvalo superior) da origen a granos superficiales (verde), y células periglomerulares  $TH^+$  (rojo). Las células  $TH^+$  y una subpoblación de  $CR^+$  derivan de progenitores dorsales que expresan *Emx1* (flecha y área roja). Los granos profundos (azul) y las PGs  $CB^+$  derivan de la ZSV ventral (óvalo y flechas negras), regiones que expresan *Nkx2.1* (morado) y *Gsh2* (azul). Las interneuronas  $CB^+$  nacen a partir de precursores  $Gsh2^+$ . Modificado de Lledó *et al.*, 2008.

Algunos estudios cuantitativos han determinado una velocidad de producción basal de células de nueva generación que oscila entre 30.000 y 60.000 células por día, lo que representa el 1% de la población total de granos del BOP, la población más numerosa de interneuronas de esta estructura (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Biebl *et al.*, 2000; Peterson, 2002). En el ratón, las células generadas en la ZSV tardan aproximadamente una semana en

llegar al BOP (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002). A las dos semanas, los granos de nueva generación muestran una estructura morfológica totalmente madura. Sin embargo, las PGs tardan alrededor de cuatro semanas en desarrollar su estructura dendrítica y axonal completa (Belluzzi *et al.*, 2003). Además de en el tiempo de maduración e integración, los granos y las PGs también presentan diferencias en su capacidad de formar sinapsis y de generar potenciales de acción (Belluzzi *et al.*, 2003; Carleton *et al.*, 2003). Estas diferencias sugieren un patrón de integración funcional específico para cada tipo celular, cuyo significado es todavía poco conocido.

Pese a que la neurogénesis es un proceso activo en el adulto, los estudios cuantitativos demuestran que el 50% de las neuronas de nueva generación muere unas semanas después de haber alcanzado la madurez (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002; Winner *et al.*, 2002). Se desconoce si este tiempo de supervivencia es suficiente para que esas células jueguen un papel significativo en la función del BOP, aunque los datos electrofisiológicos apuntan claramente a que tienen una actividad diferente a las más antiguas. Para entender el papel del reemplazo neuronal en el cerebro adulto debemos tener en cuenta que la mitad de las células de nueva generación son transitorias y estarán llevando a cabo un proceso aún por descubrir, que algunos autores relacionan con el aprendizaje olfatorio (Lledó y Lazarini, 2007).

## Regulación de la neurogénesis

Existen gran variedad de factores reguladores de la neurogénesis. Aunque se conocen sus efectos activadores o inhibidores, normalmente se desconoce el mecanismo molecular responsable, lo que hace difícil saber si existen rutas de señalización comunes a todos ellos (revisado en Kempermann, 2006; Whitman y Greer, 2009). Muy probablemente, aunque los estímulos sean distintos y las rutas de señalización que se activen sean diferentes, a nivel transcripcional y del control de dicha transcripción muchos de ellos convergen en unos pocos mecanismos moleculares comunes. De esta manera, el resultado neto de la neurogénesis *in vivo* sería un sumatorio de la acción de factores extrínsecos e intrínsecos que a la vez competirían entre sí y dependerían unos de otros.

Existen cuatro procesos generales susceptibles de regulación: la proliferación de los precursores, la migración de los neuroblastos, su diferenciación a neuronas maduras y la supervivencia de las células generadas. Algunos factores reguladores pueden actuar sobre varios de estos procesos y otros afectar solamente a uno de ellos.

Los factores de crecimiento y las moléculas de señalización paracrina y por contacto regulan distintos procesos de la neurogénesis, como por ejemplo el ciclo celular, la supervivencia de las células y sus decisiones de diferenciación. Los factores de crecimiento

con un efecto importante en la neurogénesis adulta son EGF, FGF2, IGF, PDGF y VEGF (revisado en Moyses *et al.*, 2008, Basak y Taylor, 2009), aunque los más importantes y ubicuos son EGF y FGF2. Todos ellos tienen efecto mitogénico, pero EGF y FGF2 son esenciales para el mantenimiento de las células madre neurales adultas en cultivo (Reynolds *et al.*, 1992; Craig *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 1997) e incluso, pueden desarrollar potencial neurogénico en precursores de regiones no neurogénicas (Palmer *et al.*, 1999). FGF2 es, además, esencial para la diferenciación neuronal (Craig *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 1997; Vergaño-Vera *et al.*, 2009) y promueve la migración de los neuroblastos (Kuhn *et al.*, 1997). Además de los factores de crecimiento, distintas moléculas de señalización paracrina y por contacto están involucradas en la regulación de la permisividad del nicho, la autorrenovación y la diferenciación en el desarrollo, aunque se tienen relativamente pocos datos de su implicación en la neurogénesis adulta. Ejemplos de este tipo de moléculas son los miembros de la familia proteica BMP (*bone morphogenetic protein*, proteína morfogénica del hueso), Noggin (Gross *et al.*, 1996; Wilson y Hemmati-Brivanlou, 1997; Lim *et al.*, 2000; Chen y Panchision, 2007; Mathieu *et al.*, 2008), la familia Wnt (Willert y Nusse, 1998; Muromiya *et al.*, 2004; Lie *et al.*, 2005), y la señalización mediante Notch (Shi *et al.*, 2008; Basak y Taylor; 2009) o Shh (*Sonic Hedgehog*) (Kovacs *et al.*, 2008).

A pesar de que se conoce la acción neta sobre la proliferación y/o la neurogénesis de todas estas moléculas, la existencia o no de cualquier tipo de relación regulatoria entre estas rutas de señalización y los factores de transcripción y otras moléculas efectoras que controlan las distintas etapas de la neurogénesis adulta aún no han sido esclarecidas. En esta Tesis Doctoral, nos centraremos en la regulación de la proliferación de los precursores y de la supervivencia de las células generadas en la región neurogénica ZSV-CMR-BOP.

## Moléculas efectoras de la regulación de la proliferación

Existen varios mecanismos de **control del ciclo celular**, diferentes en los distintos tipos celulares, que regulan la expansión de las distintas poblaciones (Coskun y Luskin, 2001). El paso entre las distintas fases del ciclo celular y el control de la duración de cada una de ellas son parámetros importantes, sobre todo el control de la duración de la fase G1 y el punto de control G1/S (Lobjois *et al.*, 2004). La regulación de estos parámetros está asociada en último término a la expresión de inhibidores de kinasas dependientes de ciclo celular pertenecientes a las familias Kip e Ink. El único miembro de la familia Ink que se expresa en la ZSV/CMR es p19Ink4d. Esta proteína se expresa en neuroblastos y tiene bajo nivel de expresión en la ZSV pero alto en la CMR (Coskun y Luskin, 2001). Su expresión induce la parada del ciclo celular en G1 y de esta manera, provoca la diferenciación celular (Coskun y Luskin, 2001). El único miembro de la familia Kip que se expresa en la ZSV/CMR es p27<sup>Kip1</sup>. Concretamente, p27<sup>Kip1</sup> se expresa en progenitores altamente proliferativos

(células C), y estaría regulando la proporción de divisiones asimétricas de las células C, y por tanto, la generación de neuroblastos a partir de ellas (Doetsch *et al.*, 2002). Además de esta función, p27<sup>Kip1</sup> puede estar implicada en la regulación del mecanismo de **quiescencia**, involucrado en la relación entre las células que se generan y la muerte celular. Mediante este proceso, los precursores pueden salir del ciclo celular, quedarse “hibernando” y más tarde volver a ser reclutados a la población proliferativa (Doetsch *et al.*, 2002). Cabe resaltar que p27<sup>Kip1</sup> es una de las escasas moléculas que se ha demostrado que está bajo el control directo de Pax6, factor de transcripción regulador de la neurogénesis durante el desarrollo (Duparc *et al.*, 2007).

Además de los miembros de las familias Kip e Ink existen otros factores que regulan el paso por el punto de control de G1/S. Por ejemplo, se ha sugerido que la ruta de señalización de FGF2, un mitógeno muy potente para los precursores de la ZSV y el BOP, promueve una salida rápida del ciclo celular en el punto de control de la fase G1, importante para las células madre neurales (Lobjois *et al.*, 2004).

### Moléculas efectoras de la regulación de la supervivencia de las células generadas

Tanto en la neurogénesis embrionaria como en la adulta, tiene lugar una oleada de muerte celular programada dependiente de actividad, justo después de que las nuevas neuronas se formen y comiencen a establecer conexiones funcionales. Según la hipótesis propuesta por Rita Levi-Montalcini en 1987, la supervivencia de las células que prevalecen va a depender en gran medida de su capacidad de responder a factores neurotróficos. El aporte de estos factores neurotróficos puede provenir de forma retrógrada de la neurona postsináptica, anterógrada por la presináptica, de forma autocrina por la propia neurona o paracrina por los astrocitos y/o microglía que están en sus alrededores (Wright *et al.*, 1992; Altar *et al.*, 1998; Kuczewski *et al.*, 2009). Los distintos factores neurotróficos actúan en diferentes poblaciones neuronales dependiendo de los receptores que expresen esas células (Kuczewski *et al.*, 2009).

Hay varias clases de factores neurotróficos, pero los más importantes para la regulación de la neurogénesis adulta son las **neurotrofinas**, que ejercen sus funciones a través de receptores Trk y p75<sup>NTR</sup>. Se conocen bajo el nombre genérico de neurotrofinas al NGF (*nerve growth factor*, factor de crecimiento nervioso), al BDNF (*brain derived neurotrophic factor*, factor neurotrófico derivado del cerebro) y a las neurotrofinas 3, 4 y 5. Las neurotrofinas, en general, actuarían mediante dos vías: por un lado, promoverían la supervivencia de neuronas postmitóticas y el crecimiento de dendritas, mediante la activación de receptores Trk (Altar *et al.*, 1998; Caleo *et al.*, 2000) y por otro, desencadenarían la apoptosis uniéndose con baja afinidad al receptor p75<sup>NTR</sup> (Coulson *et al.*,

2004). Sin embargo, ambos mecanismos están interrelacionados, ya que la unión de factores neurotróficos a receptores Trk inhibiría la señal pro-apoptótica desencadenada por su unión a p75<sup>NTR</sup> (Miller y Kaplan, 2001). En este sentido, una de las neurotrofinas mejor estudiadas en la regulación de la neurogénesis adulta es BDNF (Pencea et al., 2001). La función de BDNF en la supervivencia de una célula concreta depende del balance de los receptores que esa célula presenta. Así, cuando una célula no tiene receptores Trk, los receptores p75<sup>NTR</sup> ejercen una función pro-apoptótica que la conduce a la muerte (Barrett y Bartlett, 1994). Sin embargo, su unión a receptores TrkA provoca la supresión de las señales pro-apoptóticas inducidas por la activación de p75<sup>NTR</sup>. El mecanismo molecular involucra la señalización por la vía de PI3K/Akt (ver más adelante), que inhibe la señal apoptótica dependiente de la proteína p53, desencadenada por la activación de los receptores p75<sup>NTR</sup> (Kaplan y Miller, 2000).

## 2. Generación de nuevas células en regiones no neurogénicas

La producción de nuevas células en el encéfalo adulto también tiene lugar fuera de las regiones neurogénicas. En este caso, las células generadas, en condiciones normales, van a ser células gliales. Tradicionalmente, las células gliales en el SNC de mamíferos se han clasificado en las categorías de astrocitos, oligodendrocitos y microglía. Sin embargo, desde hace unos 20 años existen evidencias experimentales que apoyan la existencia de un cuarto tipo de glía, distribuida por todo el sistema nervioso central (SNC) adulto y en desarrollo. Una de las características principales de este tipo glial es la expresión del condroitín sulfato proteoglicano NG2, proteína integral de membrana, por lo que estas células se conocen como células NG2<sup>+</sup>. Algunos autores han propuesto la nomenclatura de polidendrocitos para definir a estas células, haciendo referencia tanto a su morfología, con muchos procesos, como a su relación con los oligodendrocitos (Nishiyama *et al.*, 2009). Los polidendrocitos participan en los fenómenos de plasticidad sináptica y en la comunicación entre la glía y las neuronas. Se ha propuesto que estas células constituyen un tipo celular concreto que estabilizaría y modularía la función neuronal en las sinapsis y en los nódulos de Ranvier, además de prevenir la formación de colaterales axónicos (Nishiyama *et al.*, 2009).

Las células NG2<sup>+</sup> fueron descritas por primera vez por Raff y colaboradores en 1983, en el nervio óptico de rata. Inicialmente se consideró que eran células progenitoras determinadas únicamente al linaje de los oligodendrocitos (OD) y a un tipo de astrocito de la sustancia gris, y se conocían como progenitores O2A (Raff *et al.*, 1983; Franklin *et al.*, 1995; Windrem *et al.*, 2004). Aunque hoy se sabe que son multipotentes y que pueden expresar marcadores de múltiples linajes (Belachew *et al.*, 2003), la mayoría son progenitores de oligodendrocitos (OPC) que actúan tanto durante el desarrollo como en el SNC adulto. Son la

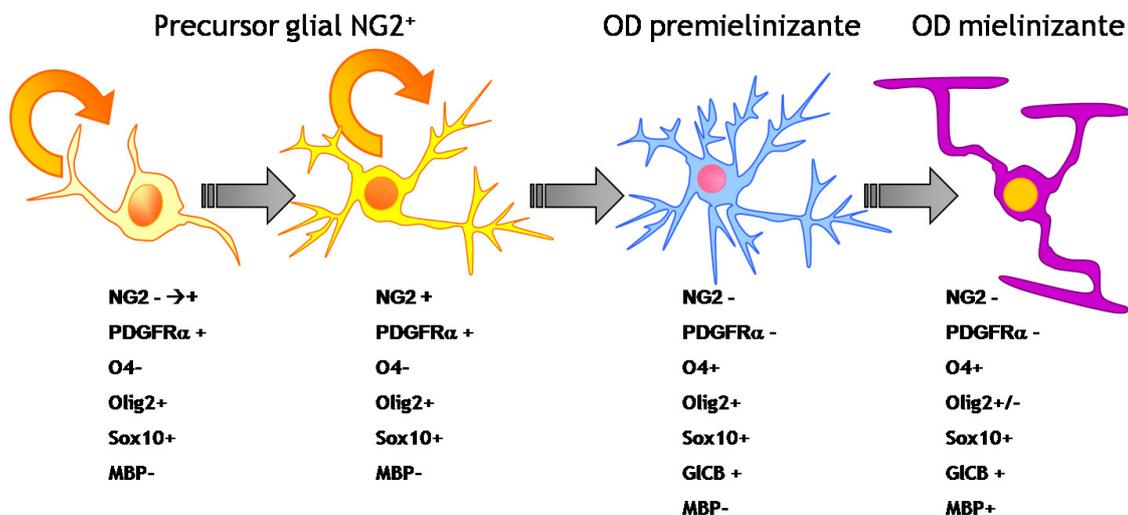
fuentes de los OD remielinizantes tras lesiones desmielinizantes, aunque su potencial para participar en la regeneración es, en la actualidad, un asunto controvertido ya que, en condiciones patológicas, forman parte de la cicatriz glial, impidiendo la regeneración axonal. Cabe resaltar que algunos estudios apuntan hacia la posibilidad de que las células NG2<sup>+</sup> tengan la capacidad de generar neuronas *in vitro* (Omlin y Waldmeyer, 1989; Kondo y Raff, 2000; Belachew *et al.*, 2003), aunque los resultados *in vivo* son contradictorios (Rivers *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008). Actualmente se consideran células con potencial para actuar como precursores neuronales, que podrían activarse tras un daño en el tejido nervioso (Berry *et al.*, 2002; Horner *et al.*, 2002; Stallcup, 2002).

## Origen embrionario de los progenitores de oligodendrocitos

Los OPCs tienen diversos lugares de origen durante el desarrollo, aunque como norma general se puede decir que tienen un origen ventral y pueblan regiones dorsales del tubo neural por proliferación y migración. Algunos autores proponen que, al existir algunas células NG2<sup>+</sup> en la corteza que expresan Pax6, es posible que algunos OPCs tengan origen dorsal (Stoykova *et al.*, 2000; He *et al.*, 2001). Entre los lugares ventrales de origen conocidos se encuentran la médula espinal (Pringle y Richardson, 1993; Richardson *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000; Gregori *et al.*, 2002), el primordio olfatorio (Spassky *et al.*, 2001) y varios focos en el telencéfalo ventral. Entre estos últimos focos del telencéfalo ventral, existe un foco de OPCs en el límite entre el hipotálamo anterior y la eminencia ganglionar medial (MGE) (Pringle y Richardson, 1993; Spassky *et al.*, 1998; Tekki-Kessararis *et al.*, 2001). A partir de la MGE y con origen en las mismas células madre multipotentes, surgirían tanto precursores de neuronas GABAérgicas como OPCs, que migrarían a regiones corticales (He *et al.*, 2001). En éstos focos embrionarios de origen de OPCs aparecen inicialmente células positivas para el receptor para PDGF de tipo  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) que proliferan rápidamente y comienzan a dispersarse por todo el encéfalo, ya especificadas para ser OPCs u ODs (Pringle y Richardson, 1993; Tekki-Kessararis *et al.*, 2001), siendo capaces de migrar varios milímetros (Ono *et al.*, 1997). Los mecanismos que posibilitan la especificación de los OPCs y ODs dependen principalmente de Shh, que en este caso tendría un efecto morfogénico gradual (Echelard *et al.*, 1993; Pringle *et al.*, 1996; Dale *et al.*, 1997; Woodruff *et al.*, 2001). Así, cuando el dominio de expresión de Shh se ha expandido desde las regiones más ventrales hacia la ZSV embrionaria de las eminencias ganglionares mediales, los OPCs comienzan a aparecer en estas regiones (Kohtz *et al.*, 1998; Tekki-Kessararis *et al.*, 2001; Woodruff *et al.*, 2001).

## Regulación de los precursores de oligodendrocitos

El factor regulatorio más indispensable y estudiado hasta el momento relacionado con estas células es el factor de crecimiento PDGF, esencial para su supervivencia, proliferación y diferenciación (Richardson *et al.*, 1988; Noble *et al.*, 1988; Pringle *et al.*, 1992; Pringle y Richardson, 1993; Nishiyama *et al.*, 1996; van Heyningen *et al.*, 2001). Sin embargo, hay otros factores además del PDGF capaces de regular esta población, entre los que se encuentran los factores de crecimiento FGF2 y factores de la familia IGF (Eccleston y Silberberg, 1985; Saneto y de Vellis, 1985; McMorris *et al.*, 1986; Noble *et al.*, 1988; Raff *et al.*, 1988; Richardson *et al.*, 1988; Barres *et al.*, 1992, 1993; McKinnon *et al.*, 1993; Mayer *et al.*, 1994). La acción de algunos de estos factores provoca que los precursores NG2<sup>+</sup> comiencen su diferenciación a oligodendrocitos, proceso durante el cual se produce la expresión diferencial de distintos marcadores. Brevemente, las células precursoras se caracterizan, como ya se ha apuntado, por la expresión del proteoglicano NG2, además del PDGFR $\alpha$ . Posteriormente, según van diferenciándose, pierden la expresión de estas moléculas y adquieren la expresión de proteínas típicas de OD mielinizantes, como la proteína básica de mielina (*myelin basic protein*; MBP) (Esquema 6).



**Esquema 6:** Linaje de los progenitores gliales NG2<sup>+</sup> en su diferenciación a oligodendrocitos (OD). El precursor glial proliferativo se diferencia por la expresión de los marcadores PDGFR $\alpha$  y NG2, que aparecen temporalmente en este orden. A partir de estos precursores surgen OD premielinizantes, que adquieren la expresión de O4 y galactocerebrósido (GICB). Después, éstos expresan proteína básica de mielina (MBP), convirtiéndose en OD mielinizantes. Modificado de Nishiyama *et al.*, 2009.

PDGF promueve la proliferación, migración, supervivencia y maduración de los OPCs (células NG2<sup>+</sup>) durante el desarrollo (Pringle *et al.*, 1989; McKinnon *et al.*, 1990) a través de la señalización desencadenada al unirse a su receptor PDGFR $\alpha$ . De este modo, los niveles de

PDGF son esenciales para la expansión y maduración de los OPCs (van Heyningen *et al.*, 2001; McKinnon *et al.*, 2005). Mientras que la carencia de PDGF produce una falta de OD (Fruttiger *et al.*, 1999), el exceso de PDGF causa una superproducción de OD que se reduce mediante muerte celular (Calver *et al.*, 1998). No obstante y pese a que PDGF y PGDFR $\alpha$  son esenciales para la formación de los ODs, no son necesarios para que una vez generados maduren y creen vainas de mielina de forma correcta (McKinnon *et al.*, 2005). Además, según avanza el proceso de diferenciación desde OPC hasta OD mielinizante, las células dejan de expresar el PGDFR $\alpha$  (Esquema 6).

Las formas activas de PDGF son homodímeros o heterodímeros compuestos por cadenas polipeptídicas denominadas A, B, C y D (Ross *et al.*, 1974; Kohler y Lipton, 1974; Antoniades, 1981; Heldin *et al.*, 1986). Estos dímeros de PDGF se unen a alguno de los dos subtipos de receptores para PDGF que existen, PDGFR  $\alpha$  ó  $\beta$ , haciendo que el receptor también se dimerice (Hart *et al.*, 1988). Dependiendo de la composición específica del dímero de PDGF que se una al receptor monomérico se formarán diferentes dímeros de receptor ( $\alpha$ - $\alpha$ ,  $\alpha$ - $\beta$  ó  $\beta$ - $\beta$ ), y se producirán distintas respuestas en la célula (Hart *et al.*, 1988; Lokker *et al.*, 1997). Los receptores, en su parte extracelular, tienen dominios similares a las inmunoglobulinas con afinidad por PDGF dimérico e, intracelularmente, tienen dominios catalíticos tirosina kinasa, por lo que pertenecen a la familia de receptores tirosina kinasa (RTK) (revisado en Hubbard y Miller, 2007). Al unirse el PDGF dimérico al receptor monomérico se produce la dimerización del receptor y los monómeros se fosforilan entre sí en varios residuos de tirosina, activando la señalización subyacente (Hunter y Avalos, 1998). La autofosforilación del PDGFR sirve para que se formen sitios de unión para proteínas transductoras, que posean dominios SH2 o dominios de unión a fosfotirosina (Songyang *et al.*, 1993; Kuriyan y Cowburn, 1997; Pawson y Scott, 1997; Margolis *et al.*, 1999). El receptor, además, es capaz de fosforilar a otras proteínas diana en tirosinas que pertenezcan a secuencias consenso proteicas específicas (Hubbard *et al.*, 1994; 1997; Mohammadi *et al.*, 1996). Estas fosforilaciones permiten la transmisión de la señal provocando cambios en la expresión génica y en la síntesis de proteínas. Las principales vías de señalización activadas por receptores tirosina kinasa (receptores de PDGF y otros factores de crecimiento), que tienen una relación importante con la fisiología de los OPCs, son la ruta de las MAPKs y la ruta de la PI3K/Akt.

### Ruta de las MAPKs

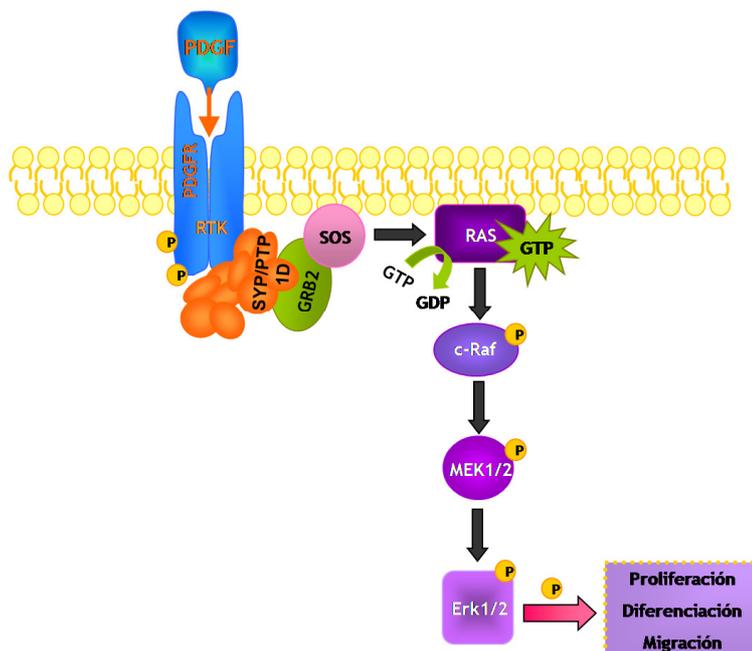
Los miembros de la familia de las MAP kinasas participan en muchas cascadas de transducción de señales extracelulares como, por ejemplo, la ruta de señalización de Erk1/2 (relacionada con proliferación y diferenciación), p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  y JNK1/2 (relacionadas con la regulación de la proliferación, la apoptosis y la supervivencia, activadas en respuesta a

estrés celular, inflamación y factores de crecimiento) (Cano y Mahadevan, 1995; Widmann *et al.*, 1999; Davis, 2000).

La ruta de las MAPKs comienza cuando la proteína adaptadora Grb2 se recluta a la membrana plasmática de la célula y se une al RTK activo, gracias a que presenta dominios SH2. Una vez que Grb2 se une al RTK, su dominio SH3 le permite formar un complejo con SOS, una proteína intercambiadora de nucleótidos (Pawson, 1994; Schlessinger, 1994). La formación del complejo Grb2/SOS permite a Ras (GTPasa monomérica) cambiar GDP por GTP, llevándose a cabo su activación (Pawson, 1994; Schlessinger, 1994; Overbeck *et al.*, 1995; Downward, 1996; Bar-Sagi y Hall, 2000). Una vez unida a GTP, Ras se activa y puede interactuar con muchas otras proteínas, conocidas como Raf. Por ejemplo, en la ruta de Erk, Raf, una vez que está activada, fosforila a una MAPK-kinasa llamada MEK, que a su vez activa a Erk1/2 mediante fosforilación (Widmann *et al.*, 1999; Davis, 2000). Erk1/2 activa es capaz de fosforilar numerosos sustratos, tanto en el citoplasma como en el núcleo y así regular la proliferación celular, la diferenciación o la apoptosis, en función de la diana sobre la que actúe (Waskiewicz y Cooper, 1995; Madhani y Fink, 1998; Garrington y Johnson, 1999) (Esquema 7).

La ruta de las MAPKs está involucrada en la respuesta de los OPCs a PDGF (Bhat y Zhang, 1996). Erk se activa en los OPCs, minutos después de que éstos entren en contacto con el factor de crecimiento de forma directa y también posteriormente, a través de la interacción de la ruta de las MAPKs con la de la PKC (Bhat y Zhang, 1996; Stariha *et al.*, 1997). La activación de la ruta de Erk produce efectos mitogénicos en los OPCs, aunque también está implicada en la posterior migración y diferenciación de los ODs (Bhat y Zhang, 1996, Hu *et al.*, 2008, Frost *et al.*, 2009).

### Señalización de PDGF vía MAPK en los OPCs

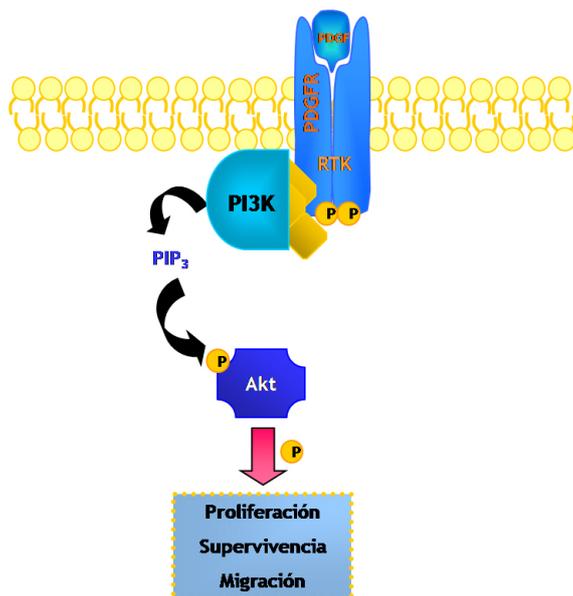


Esquema 7: Resumen de la señalización por PDGF mediada por MAPK.

## Ruta de la PI3K

La mayoría de los RTKs activan a la kinasa de fosfolípidos PI3K (Schlessinger, 2000). PI3K contiene dominios SH2 y forma un complejo con los RTKs activos. La función principal de la PI3K una vez activa es generar fosfatidil inositol trifosfato (PIP<sub>3</sub>), que funciona como segundo mensajero activando diferentes tirosina kinasas, entre las que se encuentra **Akt** (Downward, 1998; Wick *et al.*, 2000) (Esquema 8). La activación de Akt promueve la fosforilación de numerosos sustratos, relacionados principalmente con la proliferación, el crecimiento y la supervivencia celular (Downward, 1998). Así, el mecanismo molecular implicado en la supervivencia de los OD desencadenado por PDGF es, precisamente, la activación de la señalización mediante PI3K/Akt (Vemuri y McMorris, 1996). Otro ejemplo en el que la activación de la ruta de PI3K/Akt por PDGF sería importante es el efecto quimioatrayente que ejerce una concentración baja de PDGF para OPCs y OD, lo que provoca la migración de los ODs. Sin embargo, si los niveles de PDGF son altos, como en los dominios axonales (que secretan PDGF), la ruta de Akt no se activaría y los OD no migrarían (McKinnon *et al.*, 2005).

### Señalización de PDGF vía Akt en los OPCs



Esquema 8: Resumen de la señalización por PDGF mediada por Akt

Aunque cada una de estas rutas de señalización funciona de forma independiente sobre sus propios sustratos, éstos pueden ser compartidos y, además, existen relaciones regulatorias entre las propias rutas de señalización, es decir, las rutas pueden cruzarse en algunos puntos comunes (Bhat, 1991; Bhat y Zhang, 1996; Rodríguez-Viciano *et al.*, 1996;

Stariha *et al.*, 1997; Baron *et al.*, 1998; Schlessinger, 2000; Hubbard y Miller, 2007). A modo de resumen, la producción de células gliales a lo largo de la vida del animal en regiones no neurogénicas es un proceso que sucede de forma habitual en el encéfalo adulto y que está altamente regulado por múltiples factores, siendo el más relevante PDGF, y por la confluencia de varias rutas de señalización. Debido a que la existencia de progenitores gliales NG2<sup>+</sup> en el encéfalo adulto se descubrió recientemente, su importancia y papel en la fisiología cerebral están únicamente comenzando a ser elucidados. De hecho, igual que sucede con la generación de células en regiones neurogénicas adultas, la confluencia de esas rutas de señalización con factores de transcripción que gobiernan el desarrollo de cada linaje celular se desconoce en gran medida.

### 3. Pax6 y la regulación de la neurogénesis

#### La familia Pax

La familia génica *Pax* codifica un grupo de factores de transcripción conservados a lo largo de millones de años de evolución y primordiales durante el desarrollo temprano de los vertebrados (Chalepakakis *et al.*, 1992; Czerny *et al.*, 1993). La familia de genes *Pax* del ratón se identificó por homología de secuencia con los genes de segmentación de *Drosophila*. En todos los mamíferos está formada por 9 miembros (*Pax1-9*), (Treisman *et al.*, 1991; Walther y Gruss, 1991a). Estos genes codifican un elemento conocido como caja o dominio *Paired* (PD) (*Paired box* o Pax), un dominio de unión al ADN cuya actividad fue identificada por primera vez en la proteína Paired de *Drosophila* (Hoey y Levine, 1988; Treisman *et al.*, 1991). Los diferentes dominios PD de las diferentes proteínas de la familia Pax reconocen secuencias de ADN similares, aunque con afinidad diferente (Czerny *et al.*, 1993). De hecho, los distintos sitios de unión al ADN de los diferentes dominios PD son casi idénticos y tienen un motivo central (*core*) conservado. Muchas de las proteínas Pax (*Pax3*, *Pax4*, *Pax6*, *Pax7*) poseen además otro dominio de unión al ADN, un homeodominio tipo *Paired* (*homeo domain*; HD).

La función primaria de las proteínas de la familia Pax es, por una parte, unirse a secuencias de ADN potenciadoras (*enhancers*) de diferentes promotores y, por otra, modificar la actividad de otros factores de transcripción, uniéndose a ellos en actuaciones cooperativas (Callaerts *et al.*, 1997). A través de estas funciones regulan la organogénesis y son factores claves en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las poblaciones de células madre durante el desarrollo (Marquardt *et al.*, 2001). De hecho, muchas de las translocaciones cromosómicas que afectan a estos genes están implicadas en algunos tipos de cáncer humanos. La regulación o la actividad transcripcional alterada de sus productos

génicos puede promover la transformación celular y conducir a la oncogénesis (revisado en Barr, 1997). Incidiendo en esa línea, las proteínas Pax podrían regular la transcripción de Bcl-2 (Hewitt *et al.*, 1997) y de p53 (Stuart *et al.*, 1995; Cartier *et al.*, 2006), moléculas reguladoras del ciclo celular y la supervivencia, cuyas mutaciones se han visto implicadas en muchos tipos de cáncer.

Todos los genes *Pax*, excepto *Pax1* y *Pax9*, se expresan en las regiones más rostrales del encéfalo: *Pax6* en el telencéfalo (Walther y Gruss, 1991; Stoykova y Gruss, 1994), *Pax3* y *Pax7* en el mesencéfalo (Jostes *et al.*, 1990; Goulding *et al.*, 1991; Stoykova y Gruss, 1994) y *Pax2*, *Pax5* y *Pax8* en la unión del cerebro medio y el posterior (Nornes *et al.*, 1990; Plachov *et al.*, 1990; Asano y Gruss, 1992; Stoykova y Gruss, 1994). En la médula espinal, los genes Pax se expresan en zonas concretas a lo largo del eje dorsoventral (Goulding *et al.*, 1993; Liem *et al.*, 1995). Durante el periodo embrionario, todos ellos se localizan frecuentemente en regiones de diferenciación neuronal, lo que sugiere que algunas proteínas Pax son morforreguladoras del desarrollo cerebral (Puelles y Rubenstein, 1993; Macdonald *et al.*, 1994; Stoykova y Gruss, 1994). Por ejemplo, se ha comprobado que *Pax2* y *Pax6* son cruciales para la formación del ojo (Macdonald *et al.*, 1995; Macdonald y Wilson, 1996). Estos datos demuestran que la familia de genes *Pax* constituye un grupo de elementos reguladores esenciales para el desarrollo del sistema nervioso central (SNC).

## El gen y la proteína Pax6

Pax6 fue identificado como miembro de la familia Pax y clonado en base a su homología con el gen *paired* de *Drosophila* en 1991 (Walther y Gruss, 1991b). Es responsable de la enfermedad humana llamada aniridia y de la mutación *Small Eye* en ratón (Ton *et al.*, 1991, Hill *et al.*, 1991). Este factor de transcripción es esencial para el desarrollo del SNC, el ojo, la nariz y el páncreas (Hanson y Van Heyningen, 1995; Kioussi *et al.*, 1999; Dohrmann *et al.*, 2000). La proteína Pax6 se expresa en patrones espacio temporales concretos durante el desarrollo del cerebro y se propone, entre otras funciones, que controla redes génicas implicadas en la formación de patrones de desarrollo, en el mantenimiento de las células madre, en la diferenciación y en la migración neuronal y en la formación de circuitos nerviosos (Osumi, 2001; Simpson y Price, 2002; Manuel y Price, 2005).

## Gen Pax6

Se han identificado genes *Pax6* en especies muy diferentes. Los genes *Pax6* tienen una tasa de conservación tal, que el árbol evolutivo basado en las secuencias de *Pax6*

ratifica los árboles filogenéticos construidos comparando las secuencias de ARN ribosomal (revisión en Callaerts *et al.*, 1997). El locus de *Pax6* tiene, al menos, 6 regiones potenciadoras (*enhancers*) y 3 promotores diferentes (P0, P1 y P $\alpha$ ), a partir de los cuales se transcriben diferentes isoformas de la proteína (revisado en Haubst *et al.*, 2004; Lang, 2004). A partir de los promotores P0 y P1 se transcribe el ARNm que, por procesamiento alternativo, dará lugar a las isoformas Pax6 y Pax6(5a), mientras que a partir del promotor P $\alpha$  se transcribe la isoforma Pax6( $\Delta$ PD). Aunque se conocen los promotores desde hace bastantes años, se desconoce, en muchos casos, los mecanismos que regulan la transcripción a partir de cada uno de ellos y los niveles de cada una de las isoformas. Sin embargo, la existencia de todos estos elementos es indicativa de la alta regulación a la que debe estar sometida la expresión de este factor de transcripción.

## Proteína Pax6

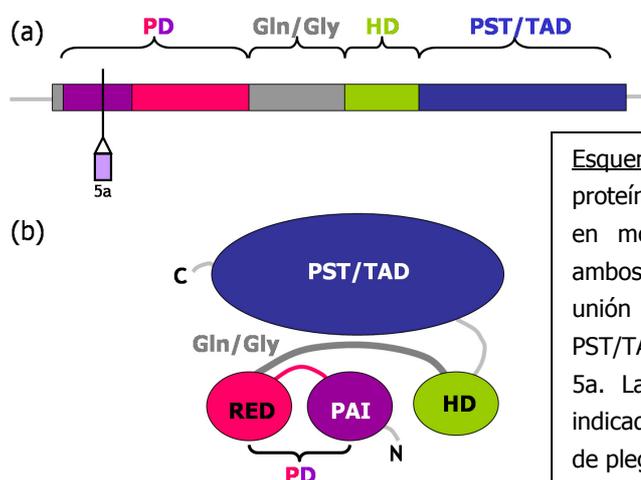
La proteína Pax6 tiene varios dominios (Esquema 9):

Dominio PD, que es un motivo bipartito de unión al ADN (Walther y Gruss, 1991; Czerny *et al.*, 1993). El dominio PD de Pax6 cambia de conformación al unirse a la secuencia consenso y para reconocerla necesita sus dos subdominios (PAI y RED). Esta secuencia consenso de unión al ADN está alterada en la isoforma Pax6(5a) respecto a la secuencia consenso de la isoforma Pax6.

Homeodominio PD (HD), también de unión al ADN (Walther y Gruss, 1991)

Dominio rico en Glutamina y Glicina (Gln/Gly). Es la región de unión que separa el PD del HD.

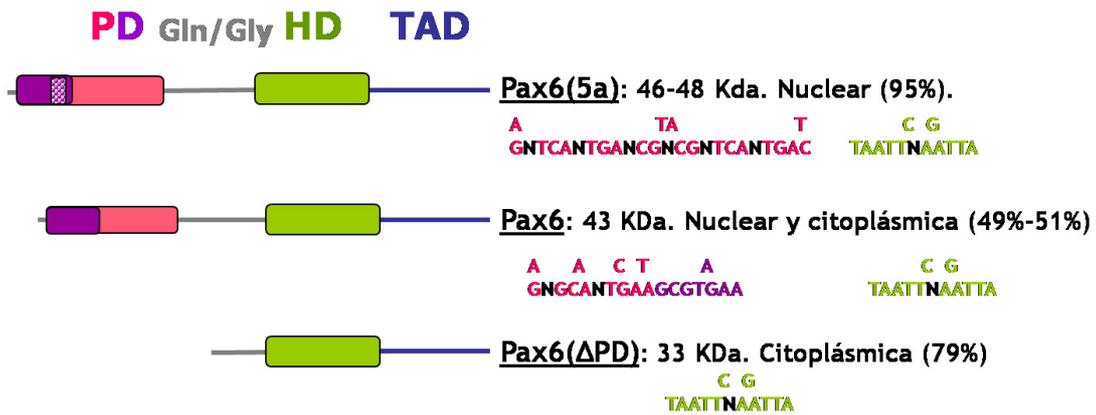
Dominio rico en Prolina, Serina y Treonina (PST) también conocido como dominio TAD (transactivation domain). Por su composición aminoacídica, debe ser sustrato de muchas de las modificaciones postraduccionales que sufre la proteína (Walther y Gruss, 1991; Czerny *et al.*, 1993).



**Esquema 9:** (a) Dominios de las proteínas Pax6 y Pax6(5a). Dominio PAI en morado, dominio RED en fucsia, ambos, forman el dominio PD; región de unión Gln/Gly en gris; HD en verde; PST/TAD en azul. En violeta, la inserción 5a. La longitud de los dominios está indicada con llaves. (b) Esquema teórico de plegamiento de la proteína.

Tanto el dominio PD como el HD de esta proteína tienen actividad independiente de unión al ADN (Holst *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 1997), aunque en algunos casos también actúan cooperativamente para regular la transcripción (Jun y Desplan, 1996; Meech *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2000). Esta actividad transcripcional se ve modificada en las proteínas de la familia Pax mediante variaciones en la especificidad del reconocimiento del ADN debidas a dos mecanismos: el **procesamiento alternativo** y la activación de promotores alternativos (P0, P1 y P $\alpha$ ), que conducen a la existencia de al menos tres isoformas proteicas (Epstein *et al.*, 1994 a y b; Jun y Desplan, 1996; Vogan *et al.*, 1996; Kozmik *et al.*, 1997) (Esquema 10).

La principal diferencia entre las distintas isoformas es una especificidad de unión al ADN diferente del PD (Esquema 10). La isoforma Pax6( $\Delta$ PD) carece de este dominio de unión al ADN y, Pax6 y Pax6(5a), como hemos mencionado anteriormente, tienen dominios PD con una secuencia consenso de unión al ADN diferente, debido a la inserción de 14 aminoácidos en el PD de Pax6(5a). Por ello, regulan diferentes genes diana, relacionados con procesos claramente distintos (Epstein *et al.*, 1994; Kozmik *et al.*, 1997). Por ejemplo, el PD de Pax6 es necesario para la regulación de la neurogénesis, la proliferación y la formación de patrones durante el desarrollo (Haubst *et al.*, 2004). Además, la sobreexpresión de Pax6 afecta tanto a la proliferación como al destino celular, mientras que la sobreexpresión de Pax6(5a) inhibe la proliferación celular, pero no afecta al destino celular (Haubst *et al.*, 2004). Otra de las diferencias entre las tres isoformas, son sus proporciones de localización citoplasmática y nuclear (Carriere *et al.*, 1995). Pese a que la nomenclatura utilizada en la descripción no se adecúa a la impuesta posteriormente, podemos deducir, gracias a los distintos pesos moleculares, que la isoforma Pax6(5a) (46-48 KDa) es predominantemente nuclear (el 95% de la proteína total está en el núcleo), la isoforma Pax6 (43 KDa) es tanto nuclear como citoplasmática (el 51% de la proteína total está en el citoplasma) y que la isoforma Pax6( $\Delta$ PD) (33 KDa) es fundamentalmente citoplasmática (79%).



**Esquema 10:** Isoformas de Pax6. Representación esquemática de las tres isoformas conocidas de Pax6 con su peso molecular, su localización y sus secuencias consenso de unión al DNA. Subdominio PAI en morado; inserción 5a en violeta; subdominio RED en fucsia (PAI y RED forman el dominio PD). Las secuencias consenso de unión al ADN de cada dominio y subdominio están representadas en su mismo color. En las secuencias de nucleótidos, N se refiere a la presencia de cualquier nucleótido.

## Regulación de la proteína

Los reguladores del desarrollo, como Pax6, tienen a menudo funciones distintas, aunque superpuestas y recurrentes, en lugares diferentes en el espacio y en el tiempo. Por ello, la regulación de la expresión de *Pax6* y la que éste mismo ejerce sobre sus genes diana, debe ser muy precisa.

## Regulación transcripcional

Existen múltiples evidencias de que una correcta dosis de proteína Pax6 en la célula es esencial para su especificación y función. Así, tanto la carencia parcial o absoluta de Pax6 como su sobreexpresión, causan anomalías muy graves durante el desarrollo (Hill *et al.*, 1991; Schmahl *et al.* 1993, Schedl *et al.*, 1996; Stoykova *et al.*, 1996, 2000; Simpson y Price 2002; Quinn *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que el nivel de expresión de Pax6 en la célula es determinante para su función, los mecanismos de regulación de expresión de la proteína tienen que estar muy controlados (Berger *et al.*, 2007; Manuel *et al.*, 2007).

Muchos de los factores reguladores de la neurogénesis modulan la expresión de Pax6. Ejemplo de ello es la regulación de la expresión de Pax6 por FGF2 que ocurre durante el desarrollo de la retina (Faber *et al.*, 2001). FGF2 actúa a través de su receptor por medio de la ruta de MAPKs-Erk y esto provoca la fosforilación del Pax6 preexistente. Una vez fosforilado, este Pax6 sería el activador de una segunda oleada de expresión de Pax6, actuando sobre su propio gen (Lang *et al.*, 2004). La consecuencia final de esta activación de la expresión es la proliferación de las células (Spence *et al.*, 2007). Sin embargo, otros

miembros de la familia FGF presentan efectos diferentes en la regulación de la expresión de Pax6, ya que FGF8 la inhibe (Novitch *et al.*, 2003). Otro ejemplo es la señalización por EGF mediada también por la ruta de señalización de Erk que conduce a la inhibición de la expresión de Pax6 y tiene un efecto mitogénico sobre las células corneales (Li y Lu, 2005). Como vemos en estos ejemplos, por un lado, una misma familia de factores de crecimiento y, por otro, un mismo efector, Erk, producen efectos contrarios en la regulación de Pax6, que acaban conduciendo a un mismo resultado, la proliferación de las células.

Además de los factores de crecimiento, existe toda una batería de moléculas que actúan regulando la expresión de Pax6. Algunas neurotrofinas, como el NGF y el BDNF, son capaces de aumentar moderadamente la expresión de Pax6 en células de cerebelo en cultivo (Kioussi y Gruss, 1994). Por otra parte, la señalización por Notch y por ácido retinoico inducen la expresión de Pax6 en determinados procesos de desarrollo (Onuma *et al.*, 2002; Novitch *et al.*, 2003). Otra molécula que inhibe la expresión de Pax6 es Shh, responsable del patrón ventral y de inhibir la expresión de Pax6 en ese territorio a través de la inducción de Vax2, un factor de transcripción que reprime la expresión de Pax6 (Briscoe *et al.*, 2000; Chow y Lang, 2001; Mui *et al.*, 2005; Kim y Lemke, 2006). Además, Shh también induce la expresión de Pax2, que a su vez puede reprimir Pax6 (Schwarz *et al.*, 2000; Kim y Lemke, 2006). Todos estos datos indican que la regulación de Pax6 por factores de crecimiento y neurotrofinas es altamente dependiente tanto del tipo de molécula como de los receptores para ella implicados, del momento del desarrollo en el que ocurren y de los distintos efectores de las rutas de señalización.

Además de la regulación dependiente de moléculas difusibles y de contacto, también se han descrito bucles regulatorios entre Pax6 y algunas de sus dianas transcripcionales. Así, algunos productos de genes diana de Pax6 pueden ser necesarios para aumentar su propia activación (Mikkola *et al.*, 2001; Planque *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2001; Goudreau *et al.*, 2002). También se han descrito bucles de regulación negativa (Schwarz *et al.*, 2000; Englund *et al.*, 2005). Por ejemplo, los genes de Pax6 y Pax2 presentan sitios de unión para la proteína codificada por el otro gen en sus promotores, es decir, cuando la proteína Pax6 se une al promotor de Pax2 inhibe su expresión y al contrario (Schwarz *et al.*, 2000). Esta inhibición mutua de ambas proteínas es importante para el establecimiento de fronteras entre varios territorios encefálicos durante el desarrollo (Matsunaga *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2000). Otro tipo de regulación es la ejercida mediante interacciones proteína-proteína. Un ejemplo de ello es la relación entre Pax6 y Sox2. Ambas proteínas son capaces de unirse al promotor de la otra, tanto juntas como por separado, activando la expresión génica, y forman complejos de unión al ADN importantes durante etapas iniciales del desarrollo (Kamachi *et al.*, 2001; Kondoh *et al.*, 2004; Lengler *et al.*, 2005; Inoue *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2008).

Por último, Pax6 es capaz de autorregularse tanto positiva como negativamente (Aota *et al.*, 2003; Morgan, 2004; Manuel *et al.*, 2007). El propio gen Pax6 contiene varias secuencias consenso de unión para su proteína en sus regiones reguladoras (Morgan, 2004). Por ejemplo, uno de sus elementos reguladores, el conocido como potenciador específico de la superficie del ectodermo de la cabeza, contiene sitios de unión para la proteína Pax6 con objeto de promover su propia expresión (Aota *et al.*, 2003).

## Modificaciones postraduccionales

La importancia de Pax6 durante el desarrollo, su expresión en un gran número de tipos celulares y la posibilidad de que actúe en compañía de otras proteínas, la hacen una candidata ideal a sufrir todo tipo de modificaciones postraduccionales, tanto en su dominio PST como en cualquier otra región. Por ejemplo, se ha demostrado que las MAPKs Erk y p38 pueden fosforilar a Pax6 en su dominio PST, lo que hace a Pax6 más activo como factor de transcripción (Mikkola *et al.*, 1999). Además, la HIPK2 (homeodomain-interacting protein kinase 2; proteína kinasa que interacciona con homeodominios) es también capaz de fosforilar a Pax6 en su dominio PST, provocando su activación como factor de transcripción y haciendo posible su interacción con otras proteínas (Kim *et al.*, 2006). HIPK2 es una Ser/Thr kinasa que regula la expresión génica al fosforilar factores de transcripción. Se activa en respuesta a daños en el ADN (está implicada en el punto de control entre las fases G2 y M del ciclo celular) o señales morfogenéticas (factores de crecimiento, neurotrofinas y morfógenos) e induce la expresión de patrones génicos implicados en la diferenciación, el desarrollo y la apoptosis (revisado en Rinaldo *et al.*, 2007), procesos en los que también está implicado Pax6. Por último, se ha descrito que la proteína Ser/Thr fosfatasa 1 (PP-1) defosforila Pax6, atenuando su actividad transcripcional (Yan *et al.*, 2007).

## Degradación de la proteína

Además de regular el nivel de expresión de la proteína y de su actividad, en determinados momentos se necesita actuar de forma directa y precisa sobre la proteína para regular su concentración en la célula. Recientemente se han empezado a descubrir los mecanismos que permiten controlar la cantidad de Pax6 en cada célula. Se ha descrito que Trim11, una proteína de la familia de las E3 ubiquitina ligasas, es la responsable, en los progenitores de corteza, de la degradación de Pax6 por la vía ubiquitina-proteasoma (Tuoc y Stoykova, 2008). Así, durante la diferenciación neuronal en el desarrollo de la corteza, los niveles de proteína Pax6 descienden mucho más rápido que los niveles de mensajero, debido a la degradación de la proteína mediada por Trim11 (Tuoc Y Stoykova, 2008).

Además, la expresión de Trim11 está a su vez regulada positivamente por Pax6, lo que constituiría un mecanismo de retroalimentación negativa (Tuoc y Stoykova, 2008).

### Mutantes para Pax6

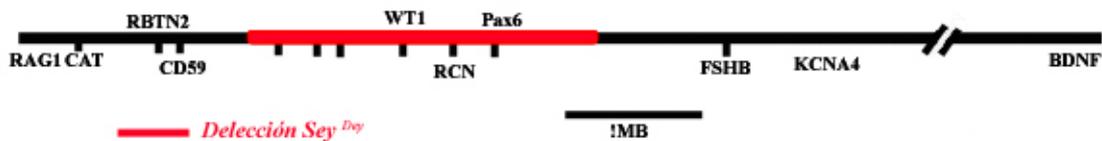
La función de Pax6 ha sido analizada estudiando el fenotipo de varios tipos de ratones que contienen mutaciones en el gen Pax6. Se han aislado distintas mutaciones semidominantes del gen Pax6 en el ratón, que se conocen como Small Eye (Sey) y, a pesar de su variabilidad, todas ellas originan fenotipos comparables. La mayor parte de las mutaciones son puntuales y afectan a pocos pares de bases, produciéndose en ocasiones proteínas truncadas (Hogan *et al.*, 1986, 1988, Favor *et al.*, 1988, 2001; Glaser *et al.*, 1990, Hill *et al.*, 1991, Grindley *et al.*, 1997, Kent *et al.*, 1997). Además, en los últimos años se han generado en varios laboratorios distintos ratones *knock-out* para Pax6, en muchos casos con pérdida de función de la proteína dirigida a tipos celulares específicos, gracias a alteraciones en elementos reguladores del gen.

Las mutaciones Small Eye en **homocigosis** son letales. Dos de ellas (Sey<sup>Dey</sup>, Sey<sup>H</sup>) tienen su fase letal en la etapa cercana a la implantación del blastocisto, lo que probablemente se deba a la pérdida de genes cercanos a Pax6 importantes para el desarrollo temprano (Kent *et al.*, 1997). Sey y Sey<sup>Neu</sup> se desarrollan, pero mueren en edades perinatales, con defectos cerebrales graves y carencia completa de ojos y cavidades nasales (Schmahl *et al.*, 1993). Además, los bulbos olfatorios están muy reducidos y alterados (Stoykova *et al.*, 1996, López-Mascaraque *et al.*, 1998, Jiménez *et al.*, 2000).

En **heterocigosis** ninguna de las mutaciones es letal. Los heterocigotos, con un único alelo mutado, viven el mismo tiempo que los ratones sin la mutación pero poseen diferentes grados de alteración en el sistema visual, el sistema olfatorio y otras zonas encefálicas, que se manifiestan macroscópicamente al presentar un tamaño reducido de los ojos y un hocico redondeado (Theiler *et al.*, 1978, Hogan *et al.*, 1988, Glaser *et al.*, 1990, Fujiwara *et al.*, 1994, Hanson *et al.*, 1994, Dellovade *et al.*, 1998). Todas las malformaciones observadas en el encéfalo y la retina de los ratones mutantes heterocigotos concuerdan con las zonas de expresión de Pax6 durante el desarrollo (Walther y Gruss, 1991) y reflejan los mecanismos moleculares mediante los cuales actúa la proteína Pax6, especialmente la importancia de la concentración de la proteína en el núcleo de las células (Plaza *et al.*, 1993).

## El ratón *Sey<sup>Dey</sup>*

La mutación original fue observada en 1964 por la Dra. Dickie (Laboratorio Jackson) en la colonia C3H/HeJ (Theiler *et al.*, 1978). Los ratones *Sey<sup>Dey</sup>* poseen una mutación autosómica y semidominante denominada Dickie's small eye (*Sey<sup>Dey</sup>*). Se trata de una delección de entre 1370 y 2300 Kb en el cromosoma 2 del ratón que afecta a *Pax6*, a sus elementos reguladores y a otros genes próximos, como el *Wt1* (gen del tumor de Wilms) y el *Rcn* (gen de la Reticulocalbina) (Theiler *et al.*, 1978; 1980, Glaser *et al.*, 1990, Kent *et al.*, 1997) (Esquema 11).



**Esquema 11:** Esquema del cromosoma 2 del ratón donde se representa la extensión de la mutación *Sey<sup>Dey</sup>* (en rojo). Modificado de Kent *et al.*, 1997.

## Fenotipo

Los **homocigotos** (*Sey<sup>Dey</sup>/Sey<sup>Dey</sup>*) mueren antes del 6º día de gestación (E6) y presentan una actividad mitótica muy baja. Por ello, el blastocisto es pequeño o está ausente y el trofoectodermo no se forma (Theiler *et al.*, 1978, 1980), lo que puede deberse a que la delección causante de esta mutación incluye genes esenciales para la supervivencia en la gestación temprana distintos a *Pax6*, que se comienza a expresar algo más tarde durante el desarrollo, en el día embrionario 8 (Glaser *et al.*, 1990; Walther y Gruss, 1991).

Aunque aproximadamente el 5% de los **heterocigotos** (*+/Sey<sup>Dey</sup>*) muere 8-10 horas después del nacimiento, el 95% restante es viable y alcanza la edad adulta (Theiler *et al.*, 1978). Sin embargo, su desarrollo es anormal (Theiler *et al.*, 1978). Ya en el día E7-8 se observa un retraso en el desarrollo respecto a los animales *+/+*, que se mantiene a lo largo de toda la vida del animal y que se traduce en una reducción del tamaño corporal del 10% respecto a los animales control. Los ratones heterocigotos tienen un fenotipo variable, pero se pueden identificar por el tamaño reducido de los ojos, por la falta de protuberancia del globo óptico y porque los párpados pueden estar cerrados o mostrar una pequeña abertura a través de la cual se pueden observar cataratas (Hogan *et al.*, 1988, Baumer *et al.*, 2002, Ramaesh *et al.*, 2003, 2005, Davis *et al.*, 2003).

## Otros genes delecionados en la mutación *Sey<sup>Dey</sup>*

### Gen del tumor de Wilms (*Wt1*)

## INTRODUCCIÓN

El gen *Wt1* codifica para un factor de transcripción con 4 dominios “dedos de Zinc” en el extremo C-terminal de la proteína, que median en la unión a secuencias específicas del ADN. Tiene también un dominio N-terminal rico en Prolina/Glutamina implicado en la activación transcripcional. Las proteínas *Wt1* tienen dos funciones principales: regulan la transcripción de sus genes diana, y están implicadas en el procesamiento postranscripcional de ARN (Haber *et al.*, 1991, Lee y Haber, 2001, Wagner *et al.*, 2003). Debido a estas funciones, su expresión es importante para el desarrollo de muchos órganos, principalmente del riñón, las gónadas y el bazo (revisión en Lee y Haber, 2001). Además, *Wt1* está implicado en el desarrollo del epitelio olfatorio, pero los animales heterocigotos *knock-out* para el gen no presentan cambios respecto a los animales control (Wagner *et al.*, 2002, 2005).

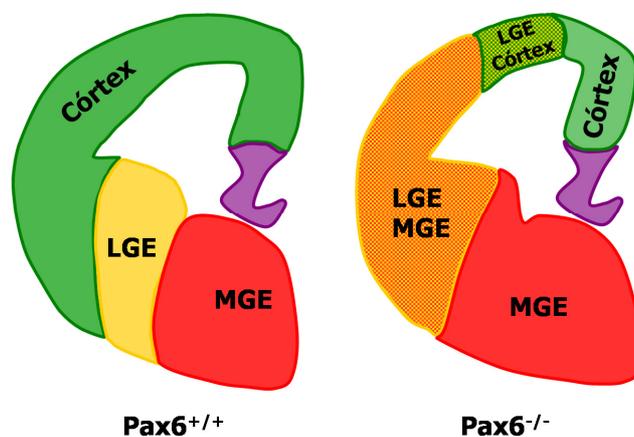
### Reticulocalbina (Rcn)

La reticulocalbina es una proteína luminal soluble del retículo endoplasmático (Ozawa y Muramatsu, 1993). Pertenece a una familia de proteínas ligantes de calcio de la ruta secretora de las células de mamíferos (Kobayashi *et al.*, 1998) que están implicadas en procesos patológicos, tales como la transformación en célula maligna (Chen *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997) y en la formación de placas amiloides (Vorum *et al.*, 1999).

## Función de Pax6

En el encéfalo, los grandes dominios de expresión de *Pax6* se observan durante el desarrollo temprano y, posteriormente, quedan restringidos a algunas poblaciones celulares en el adulto (Walther y Gruss, 1991; Callaerts *et al.*, 1997). Aunque desde que se describió en 1991 se han realizado numerosos estudios sobre *Pax6*, aún no se conocen con certeza sus dianas como factor de transcripción, las moléculas a las que podría unirse para ejercer su función y su participación en redes de señalización y en funciones celulares. *Pax6* participa en muchas etapas distintas del desarrollo y en procesos diferentes a lo largo de la vida celular. Así, se sabe que durante el desarrollo del SNC regula la proliferación, muerte celular, diferenciación, interviene en la formación de patrones, en migración y relaciones célula-célula, en la guía axonal y muy probablemente también en la formación de conexiones (Walther y Gruss, 1991; Callaerts *et al.*, 1997; Simpson y Price, 2002; Osumi *et al.*, 2008). Su función depende del momento del desarrollo, la etapa de la vida de la célula y, en muchas ocasiones, de la cantidad de *Pax6* presente en un momento y lugar determinados (Berger *et al.*, 2007; Manuel *et al.*, 2007). Sin embargo, y a pesar de expresarse en neuronas maduras, hasta la fecha no se conoce qué papel ejerce en ellas (revisado en Simpson y Price, 2002).

Uno de los primeros mecanismos en los que participa Pax6 al comienzo del desarrollo embrionario es en la formación de patrones en el encéfalo. La gran diversidad de núcleos encefálicos, con sus diferentes funciones, surge a partir de un tubo de epitelio, el tubo neural, que se especifica en regiones distintas gracias a la acción inductora de diversas moléculas. Las células neuroepiteliales (que son células madre) situadas a lo largo del tubo neural van adquiriendo identidades distintas según su posición en los ejes antero-posterior y dorso-ventral. Estos procesos de formación de patrones son esenciales para la posterior diferenciación de las distintas poblaciones neuronales que componen el encéfalo, generadas a partir de células multipotentes situadas en lugares concretos (Takahashi y Liu, 2006; Lichtneckert y Reichert, 2008; Urbach y Technau, 2008). Un ejemplo de ello es la formación de la frontera entre el telencéfalo dorsal y ventral, que está delimitada por la región de expresión de Pax6 (dorsal) y la de Nkx2.1 (ventral) (Corbin *et al.*, 2003; Hebert y Fishell, 2008). Algo más tarde en el desarrollo, se comienza a expresar Gsx2 (antes conocido como Gsh2) en la frontera dorso-ventral y se forma la frontera palio-subpalio, delimitada por la expresión de Pax6 (palio) y Gsx2 (subpalio). Sin embargo, los dominios de expresión de ambos genes se superponen en una pequeña región, el límite más dorsal del subpalio, conocida como eminencia ganglionar lateral dorsal (Corbin *et al.*, 2003; Hebert y Fishell, 2008). Si se elimina la expresión de Pax6, el primordio cortical se ventraliza y el territorio de la eminencia ganglionar lateral dorsal se extiende dorsalmente (Stoykova *et al.*, 2000; Toresson *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2001) (Esquema 12).



**Esquema 12:** Ventralización del telencéfalo como consecuencia de la ausencia de Pax6. El esquema de la izquierda representa la regionalización del telencéfalo en circunstancias normales. El esquema de la derecha representa la ventralización del telencéfalo causada por la falta de Pax6. La región cortical se reduce y se restringe a las porciones más dorsales. La LGE se extiende dorsalmente, al igual que la MGE, y el territorio de la LGE se mezcla dorsalmente con el cortical y centralmente con el de la MGE.

### Pax6 y la proliferación

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la relación de Pax6 con la regulación de la proliferación, y particularmente con varios aspectos del ciclo celular de los precursores. Los estudios llevados a cabo hasta la fecha han sido realizados durante el desarrollo de la corteza, de la retina y también durante la división de precursores neuroepiteliales. Analizando todos ellos se concluye que la influencia de Pax6 sobre el ciclo celular y la proliferación depende del momento del desarrollo y del tipo celular. Se han descrito incrementos de la proliferación en ausencia de Pax6, relacionados con acortamientos del ciclo celular (Götz *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 1999; Estivill-Torrus *et al.*, 2002; Duparc *et al.*, 2007). Sin embargo, también se ha descrito un descenso de la proliferación de los precursores, tanto en ausencia de Pax6 como en condiciones de sobreexpresión (Ouyang *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2007; Duparc *et al.*, 2007; Manuel *et al.*, 2007; Tamai *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007; Hsieh y Yang, 2009). A continuación nos centraremos en explicar la función de Pax6 en el desarrollo de la corteza y de la retina, puesto que es en el desarrollo de estas regiones donde mejor se conoce tanto su efecto en la neurogénesis y en la autorrenovación de los precursores como los mecanismos moleculares dependientes de Pax6.

Las células piramidales de la corteza provienen de la ZV embrionaria, que está formada fundamentalmente por somas de células neuroepiteliales cuyo citoplasma se extiende verticalmente de un extremo a otro del primordio de la corteza. Estas células se conocen como glía radial y tienen una función dual: por una parte son un andamio para que las neuronas de nueva generación alcancen su posición final en la corteza y por otra, son las células madre del desarrollo de la corteza, a partir de las cuales se van a producir las neuronas piramidales glutamatérgicas (Campbell y Götz, 2002, Kriegstein y Götz, 2003). Tras el nacimiento, la glía radial se transforma en células epéndimales y astrocitos, incluyendo a las células madre de la ZSV (Voigt, 1989; Merkle *et al.*, 2004; Spassky *et al.*, 2005).

En el desarrollo de la corteza participan dos tipos de precursores: la glía radial que se divide bien de forma simétrica para dar dos células hijas proliferativas, o de forma asimétrica dando una hija proliferativa y otra que sale de ciclo; y los progenitores basales, que derivan de la glía radial y que se dividen de forma simétrica dando dos células hijas que salen de ciclo y se diferencian (Götz *et al.*, 1998; Englund *et al.*, 2005; Hevner, 2006; Quinn *et al.*, 2007). Mientras que los progenitores basales no expresan Pax6, la glía radial sí lo hace y, de hecho, esta expresión es esencial para regular su morfología, su ciclo celular y su número (Götz *et al.*, 1998). Así, la proporción de glía radial que sale de ciclo y se diferencia en ratones homocigotos para Pax6 es mayor, por lo que quedan cada vez menos células en ciclo y los precursores se agotan (Quinn *et al.*, 2007). Además, Pax6 también está implicada

en la proliferación de progenitores de la ZSV embrionaria provenientes de la glía radial, ya que induce la expresión de Sox2, necesario para su división (Wen *et al.*, 2008). En ausencia total de Pax6, la ZV prolifera menos (Fukuda *et al.*, 2000) y sufren una aceleración de la neurogénesis (Estivill-Torrus *et al.*, 2002). Sin embargo, los mutantes homocigotos sin Pax6 presentan una gran reducción de la producción de neuronas corticales (Schmahl *et al.*, 1993; Stoykova *et al.*, 1996; Warren *et al.*, 1999; Fukuda *et al.*, 2000; Estivill-Torrus *et al.*, 2002). La causa de esta falta de neuronas en la corteza se debe a que, en ausencia de Pax6, se produce un agotamiento temprano de los precursores y una diferenciación neuronal precoz (Quinn *et al.*, 2007). Por ello, la población de neuronas más afectada en los homocigotos sin Pax6 es la de las neuronas de nacimiento tardío (Fukuda *et al.*, 2000). Sin embargo, y sorprendentemente, la sobreexpresión de Pax6 en precursores corticales también inhibe su proliferación, al inducir la diferenciación (Berger *et al.*, 2007, Sansom *et al.*, 2009). Por lo tanto, el nivel óptimo de expresión de Pax6 determina en las células de glía radial el balance entre la capacidad de autorrenovación de los precursores y la neurogénesis, así como la identidad de las futuras neuronas (Sansom *et al.*, 2009).

La participación de Pax6 en el desarrollo de la retina sigue estos mismos parámetros (Philips *et al.*, 2005), aunque en este caso se conoce que la causa subyacente a los defectos de proliferación en homocigotos sin Pax6 está relacionada con el punto de control entre las fases G1 y S del ciclo celular. Sin Pax6, los precursores tienen mayor probabilidad de superar la transición entre las etapas del ciclo celular G1 y fase S. Por el contrario, una gran cantidad de Pax6 en los progenitores de la copa óptica produce bien la salida de ciclo de las células, bien su parada en la fase G1 (Duparc *et al.*, 2007). Los datos apuntan a que el control de la expresión de distintos reguladores negativos del ciclo celular, entre los que se encuentra p27<sup>Kip1</sup> (implicado durante la neurogénesis adulta en la regulación de la proporción entre progenitores altamente proliferativos y neuroblastos), es uno de los mecanismos que utiliza Pax6 para regular la proliferación en el desarrollo de la retina y la corteza (Duparc *et al.*, 2007). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que el nivel de expresión de Pax6 está íntimamente relacionado con la progresión del ciclo celular y con la capacidad neurogénica de los precursores. Por ejemplo, las células en fase S en condiciones fisiológicas presentan niveles de expresión de Pax6 bajos, que varían en las demás fases del ciclo celular. El mantenimiento de estos niveles de expresión reducidos durante la fase S es necesario para la reentrada en ciclo de los precursores y, si no se produce, las células se diferencian (Hsieh y Yang, 2009).

Por todo ello, Pax6 y la regulación precisa de su concentración en la célula son esenciales para el control del ciclo celular y la relación de éste con la dicotomía de los precursores entre la autorrenovación y la diferenciación.

### Pax6 y la supervivencia

La glía radial puede generarse a partir del neuroepitelio en ausencia de Pax6, pero, además de los problemas de proliferación indicados anteriormente, muestra un cambio en su potencial de generación de tipos neuronales. En los homocigotos sin Pax6, en lugar de generar neuronas corticales glutamatérgicas, la glía radial genera interneuronas GABAérgicas que mueren rápidamente por apoptosis. El mecanismo molecular implicado está relacionado con la sobreexpresión del receptor de muerte de las neurotrofinas, p75<sup>NTR</sup>, debido a que las células sin Pax6 son incapaces de regular la expresión de este gen a la baja durante el proceso de diferenciación. Además, no son capaces de expresar el receptor de neurotrofinas TrkB, por lo que la respuesta de estas células sin Pax6 a las neurotrofinas es la muerte por apoptosis. Este mecanismo también se ha descrito durante el desarrollo del BOP (Nikoletopoulou *et al.*, 2007). No obstante, la sobreexpresión de Pax6 en progenitores corticales también causa apoptosis. En este caso, el mecanismo molecular involucrado está relacionado con moléculas implicadas en la interacción célula-célula y en su señalización, como la Efrina A5, N-CAM, R-Cadherina, Tenascina-C, Integrina  $\beta$ 3, Integrina  $\alpha$ 5 y Paxillin, que se sobreexpresan cuando se sobreexpresa Pax6 (Berger *et al.*, 2007). Estos dos grupos de datos demuestran una vez más que la regulación precisa de Pax6 es necesaria para el desarrollo normal de la vida celular y, tal y como hemos revisado en el apartado correspondiente, se está comenzando a vislumbrar la regulación postraducciona que sufre Pax6. Se ha demostrado que Pax6 está regulado por Erk, p38 MAPK y HIPK2 (Mikkola *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006), todas ellas kinasas involucradas en rutas relacionadas con la supervivencia celular y que podrían ejercer esta función a través de la regulación de este factor de transcripción.

### Pax6 y la diferenciación

Pax6 es necesario para la diferenciación celular en todos los procesos de desarrollo en los que participa. En la corteza, es necesario para la generación de neuronas glutamatérgicas y para la formación de poblaciones neuronales más tardías (Schmahl *et al.*, 1993; Stoykova *et al.*, 1996; Warren *et al.*, 1999; Fukuda *et al.*, 2000; Estivill-Torru *et al.*, 2002). Además, la generación de interneuronas corticales procedentes de las eminencias ganglionares, también depende de Pax6, ya que en su ausencia, el telencéfalo se ventraliza y hay un cambio en el destino final de diferenciación de las células que se generan (Stoykova *et al.*, 2000; Toresson *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2001), produciéndose un incremento de interneuronas inhibitorias (Sansom *et al.*, 2009). En el desarrollo de la retina, Pax6 es necesario para la diferenciación de los siete tipos neuronales retinianos (Marquardt *et al.*, 2001). Por otra parte, la generación de distintos tipos de motoneuronas en la médula espinal involucra la regulación negativa de la expresión de Pax6 (Ericson *et al.*, 1997). Pax6

también participa en la diferenciación de tipos celulares del BOP, como veremos más adelante en esta Introducción (Implicación de Pax6 en el desarrollo del BOP, Implicación de Pax6 en la neurogénesis adulta).

La sobreexpresión de Pax6 produce la diferenciación neuronal en todos los casos estudiados (Götz *et al.*, 1998; Heins *et al.*, 2002; Hack *et al.*, 2004, 2005; Cartier *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2007). Aunque los mecanismos moleculares exactos que llevan a ello son desconocidos, se ha demostrado en una línea celular no neural (células HeLa) que la sobreexpresión de Pax6 es capaz de producir la diferenciación de estas células a neuronas, al inducir la expresión de p21<sup>Cip1</sup> dependiente de p53 (Cartier *et al.*, 2006). No obstante, y pese a la gran implicación de Pax6 en la diferenciación neuronal, Pax6 es también necesario para la diferenciación de astrocitos y su expresión se mantiene en algunos astrocitos distribuidos por todo el encéfalo adulto (Sakurai y Osumi, 2008).

Por último, como hemos mencionado anteriormente, Pax6 está implicado en la relación entre la autorrenovación de los precursores, su salida de ciclo y la neurogénesis. El descenso en la expresión de Pax6 produce una disminución de la autorrenovación, la salida acelerada de los precursores del ciclo celular para su diferenciación y una depleción del conjunto de los precursores (Quinn *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). Sin embargo, la sobreexpresión de Pax6 también produce este mismo efecto: el incremento de la neurogénesis a expensas de la autorrenovación de los precursores (Sansom *et al.*, 2009).

## Genes diana de Pax6

La regulación que ejerce Pax6 sobre los procesos y mecanismos moleculares descritos depende de los genes diana sobre los que actúa como factor de transcripción. Dentro de los genes diana de Pax6, existen muchos factores de transcripción relacionados con la adquisición de fenotipo neuronal en general y también de subpoblaciones neuroquímicas concretas. Los múltiples genes diana de este factor de transcripción participan en muchos procesos (formación de patrones, migración, proliferación, supervivencia, diferenciación, crecimiento celular,...; revisado en Simpson y Price, 2002; Osumi *et al.*, 2008, Sansom *et al.*, 2009), aunque son pocos los que se han demostrado fehacientemente bajo regulación directa de la proteína Pax6. Entre estos últimos, cabe destacar aquellos que tienen funciones importantes en la regulación del ciclo celular y en el resultado de la división de los precursores neurales. Entre ellos se encuentran p27<sup>Kip1</sup> (Duparc *et al.*, 2007), que regula negativamente la progresión del ciclo celular, y Fabp7 (*fatty acid binding protein 7*, proteína de unión a ácidos grasos 7) (Arai *et al.*, 2005), que mantiene a las células neuroepiteliales y a la glía radial en estado indiferenciado, evitando su diferenciación neuronal (Arai *et al.*, 2005). Otras de las dianas de Pax6 regulan las propiedades de autorrenovación y multipotencialidad de las células madre, como por

ejemplo algunos miembros de la familia proteica Wnt y proteínas secretadas implicadas en su ruta de señalización (Ericson *et al.*, 1997; Osumi *et al.*, 1997; Maekawa *et al.*, 2005; Lei *et al.*, 2006). Pax6 también controla la expresión de distintas moléculas implicadas en la adhesión célula-célula y/o la unión celular a la matriz extracelular, importantes para el mantenimiento del estado indiferenciado y la regulación del destino final de diferenciación (Chalepakis *et al.*, 1994; Callaerts *et al.*, 1997). Ejemplos de estas dianas son NCAM-L1, Optimedina, N-Cadherina,  $\beta$ -Catenina,  $\alpha$ -Catenina, Ocludina,  $\delta$ -Catenina y Tenascina-C (Chalepakis *et al.*, 1994; Callaerts *et al.*, 1997; Götz *et al.*, 1998; Grinchuk *et al.*, 2005, Duparc *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; von Holst *et al.*, 2007; Osumi *et al.*, 2008). De este modo, Pax6 estaría regulando directamente tanto mecanismos intrínsecos a las propias células implicados en la regulación de la proliferación, como moléculas responsables de la respuesta a estímulos externos por contacto, además de factores de transcripción proneurales que promueven la diferenciación a neuronas de precursores indiferenciados.

### Implicación de Pax6 en el desarrollo del BOP

El sistema olfatorio se forma en fases tempranas del desarrollo embrionario y sus componentes celulares se influyen mutuamente, por lo que resulta complejo conocer los mecanismos moleculares y celulares implicados. Numerosos estudios han demostrado que Pax6 es imprescindible para el desarrollo de la placoda olfatoria y el epitelio olfatorio, el posicionamiento y la guía axonal de las neuronas bulbares, la migración y alineamiento de las neuronas de la corteza olfatoria, y la generación de tipos celulares específicos en el BOP postnatal (Matsuo *et al.*, 1993; Davis y Reed, 1996; Anchan *et al.*, 1997; López-Mascaraque *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 2002, Nomura y Osumi, 2004, Nomura *et al.*, 2006). De hecho, los ratones homocigotos sin Pax6 tienen problemas durante el desarrollo del sistema olfatorio. Una de las consecuencias de la ausencia de Pax6 es que no se forman neuronas receptoras olfatorias, probablemente por defectos en la síntesis y la señalización del ácido retinoico (Hill *et al.*, 1991; Matsuo *et al.*, 1993; Grindley *et al.*, 1995, Davis y Reed, 1996, Anchan *et al.*, 1997, Jiménez *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2000). Por otra parte, células derivadas de las crestas neurales que invaden la placoda olfatoria durante el desarrollo no son capaces de hacerlo en ausencia de Pax6, debido a defectos en su migración (Matsuo *et al.*, 1993).

Además de estos defectos en la formación de distintos componentes del sistema olfatorio, el propio BOP deriva de una protrusión del telencéfalo rostral que necesita Pax6 para su desarrollo (López-Mascaraque y de Castro, 2002). Su formación en el ratón comienza alrededor del día embrionario 11.5 (E11.5), al llegar los axones de las neuronas

receptoras olfatorias a la parte rostral del telencéfalo (Gong y Shipley, 1995; López-Mascaraque y de Castro, 2002), lo que induce la formación del primordio del BOP (Gong y Shipley, 1995). En los homocigotos sin Pax6, el BOP no se desarrolla en la región más dorsal del telencéfalo y se forma una estructura similar al BO conocida como OBLS (*olfactory bulb like structure*; estructura similar al BO) en el telencéfalo lateral (López-Mascaraque *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 2002) compuesta por células mitrales que extienden sus axones hacia la corteza olfatoria, al igual que en los animales control, pero que sus dendritas no están orientadas hacia la superficie del BOP (Jiménez *et al.*, 2000, Hirata *et al.*, 2002, López-Mascaraque *et al.*, 2005). Las células mitrales son las primeras que se desarrollan en el BO, entre E11 y E13, mientras que las células empenachadas lo hacen entre E13 y E18 (Hinds *et al.*, 1968, Bayer *et al.*, 1983) y tanto en los ratones control como en los homocigotos sin Pax6 se generan a partir de la región rostral del telencéfalo. Sin embargo, en los homocigotos sin Pax6 acaban situadas en la región telencefálica lateral, debido a un defecto que no depende ni de las propias células mitrales ni de la ausencia de axones del nervio olfatorio (Nomura y Osumi, 2004). Por otra parte, los ratones homocigotos sin Pax6 presentan una ausencia de expresión de receptores de FGF y esta señalización es esencial para la formación del BO, por lo que es posible que éste sea el mecanismo molecular implicado (Nomura y Osumi, 2004).

Aunque las primeras interneuronas bulbares se generan a partir de la zona neuroepitelial del ventrículo del BOP en desarrollo a la edad de E13.5 (Vergaño-Vera *et al.*, 2006), la mayoría se producen en las primeras dos o tres semanas postnatales (Hinds, 1968). Las células neuroepiteliales del ventrículo olfatorio expresan Pax6, al igual que las interneuronas GABAérgicas que se generan a partir de ellas (Vergaño-Vera *et al.*, 2006). Más tarde, cuando el ventrículo olfatorio se cierra, estas interneuronas pasan a generarse en la ZSV adyacente a los ventrículos laterales. En este último caso, las células migran tangencialmente desde la ZSV, a través de la CMR, hasta alcanzar el BOP (Lois *et al.*, 1996; Peretto *et al.*, 1997). Como ya se ha mencionado, la gran mayoría de las interneuronas del BOP se genera postnatalmente (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002) y, además de los defectos en la diferenciación de algunos tipos celulares en la neurogénesis adulta en ausencia de Pax6 (que detallaremos en el siguiente apartado), se ha descrito que en los animales heterocigotos para Pax6 el número de interneuronas de la CPE que expresan PV y CR está muy reducido (Haba *et al.*, 2009). Estas interneuronas de la CPE se producen durante la etapa perinatal (Batista-Brito *et al.*, 2008).

## Implicación de Pax6 en la neurogénesis adulta

En el SNC de ratones adultos, Pax6 se expresa en el BOP, la CMR, la ZSV y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, todas ellas regiones neurogénicas en el adulto

(Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Gage, 2002; Maekawa *et al.*, 2005; Náchter *et al.*, 2005; Hack *et al.*, 2005; Kohwi *et al.*, 2005).

En el giro dentado del hipocampo, Pax6 se expresa en las células madre neurales, llamados también precursores tempranos, y en la población de progenitores neuronales tardíos, es decir, en los dos tipos de precursores de esta región (Maekawa *et al.*, 2005; Náchter *et al.*, 2005). Las células madre neurales del hipocampo son muy similares a la glía radial, tanto en los marcadores que expresan, como en su capacidad para actuar como células madre y como facilitadoras de la migración (Forster *et al.*, 2002). En ratas y ratones haploinsuficientes para Pax6, la proliferación y la producción de neuronas están gravemente afectadas en el hipocampo, además de presentar defectos en la capacidad de autorrenovación de las células madre (Maekawa *et al.*, 2005; Sakurai y Osumi, 2008). Se ha propuesto que la reducción en la producción de neuronas en el hipocampo se debería a una transición acelerada por las distintas fases neurogénicas ya que, con el paso del tiempo, la zona subgranular adelgaza (Maekawa *et al.*, 2005). Estos datos concuerdan con los defectos en la proliferación debidos a la falta de Pax6 descritos durante el desarrollo. En este caso, uno de los mecanismos moleculares que parece estar implicado sería la señalización mediada por Wnts, ya que se ha descrito una expresión reducida de algunos integrantes de esta ruta de señalización en la zona subgranular del hipocampo de ratones heterocigotos para Pax6 (Maekawa *et al.*, 2005).

Respecto a la neurogénesis adulta dirigida al BOP, hasta la fecha, se ha descrito en la literatura la expresión de Pax6 en neuroblastos (células de tipo A), progenitores altamente proliferativos (células de tipo C) y se ha propuesto su expresión en las células madre de esta región, aunque no se ha demostrado (células B1; Kohwi *et al.*, 2005). Sin embargo, existe controversia en la proporción de neuroblastos y células altamente proliferativas que expresan este factor de transcripción (Hack *et al.*, 2005; Kohwi *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado la baja expresión de Pax6 en neurosféricas obtenidas a partir de la ZSV adulta de ratón. Este nivel de expresión aumenta al sembrar las células en condiciones que favorecen la diferenciación (Hack *et al.*, 2004). Estos estudios se centran en el papel que ejerce Pax6 en la diferenciación de interneuronas del BOP. De este modo, se ha demostrado que Pax6 es esencial para promover la diferenciación de las células a neuronas en general y específicamente a PGs dopaminérgicas y a granos GABAérgicos situados preferentemente en la zona superficial de su capa (Hack *et al.*, 2005; Kohwi *et al.*, 2005).

## Justificación y Objetivos



La neurogénesis adulta puede considerarse como el desarrollo neuronal que se lleva a cabo en las condiciones del organismo adulto. Así, la neurogénesis adulta se produce en función de las propiedades inherentes a las células madre y progenitores del encéfalo adulto y de su interacción con el nicho, que favorece el desarrollo neuronal. Para entender mejor esta relación, es necesario estudiar la neurogénesis adulta conociendo los fenómenos que se producen durante el desarrollo embrionario.

Numerosas evidencias apuntan hacia la posibilidad de que Pax6 esté implicado en la regulación de la neurogénesis adulta. Muchas de estas evidencias vienen de su participación en procesos comparables que tienen lugar durante el desarrollo embrionario. Por ejemplo, Pax6 es esencial para la función de la glía radial controlando parámetros como su ciclo celular, su capacidad de dividirse simétricamente, su morfología, estrechamente relacionada con su función en la migración, su respuesta a diferentes estímulos, su potencial de diferenciación y la supervivencia de las células que genera (Heins et al., 2002). Estas células de glía radial se consideran el nexo entre el desarrollo embrionario y la neurogénesis adulta (Álvarez-Buylla et al., 2001) ya que, tanto en la zona subgranular adulta del hipocampo como en la zona subventricular, se ha demostrado que los precursores neurales son células similares a la glía radial de la corteza, y además provienen de ella (Alves et al., 2002, Merkle et al., 2004). Por otra parte, Pax6 también es importante para el desarrollo del BOP. En el adulto, aunque se desconoce su función, se expresa intensamente tanto en diversas poblaciones de interneuronas del BOP como en la CMR y la ZSV, aunque existen controversias en las poblaciones celulares concretas que expresan Pax6 en la región neurogénica.

Cuando comenzamos esta Tesis Doctoral, no había publicaciones que reseñasen la participación de Pax6 en el proceso neurogénico adulto. Al poco tiempo se puso de manifiesto que estaba directamente implicado en la diferenciación de algunas interneuronas de nueva generación, células PG dopaminérgicas y granos situados en la región superficial de su capa (Hack et al., 2005, Kohwi et al., 2005). Sin embargo, estos estudios restringían su análisis a estas poblaciones concretas de interneuronas, sin considerar la gran diversidad de poblaciones de otros tipos presentes en el BOP. Además, tampoco tenían en cuenta la posible participación de Pax6 en la regulación de la proliferación y la supervivencia celular así como en su distribución, procesos en los que Pax6 participa durante el desarrollo embrionario.

Otros datos que apoyarían la posible participación de Pax6 en la modulación de la neurogénesis adulta serían, por ejemplo, las alteraciones en la expresión de receptores y moléculas de señalización en ausencia de Pax6, así como su regulación, durante el desarrollo embrionario, por parte de factores de crecimiento, neurotrofinas, moléculas de adhesión y morfógenos. Todos estos factores están implicados en la regulación de distintos eventos durante la neurogénesis adulta, lo que refuerza aún más la posible implicación de Pax6 en ellos.

Por otra parte, existe otra población de progenitores proliferativos en el encéfalo adulto fuera de las regiones neurogénicas, los OPCs NG2<sup>+</sup>. Estos precursores están ampliamente distribuidos por todo el cerebro, especialmente en la corteza. Pax6 podría estar participando en la generación de nuevas células a partir de estos precursores de regiones no neurogénicas por varios motivos. Uno de ellos es la implicación de Pax6 en la generación de patrones durante el desarrollo embrionario y que su ausencia tiene como consecuencia la ventralización del telencéfalo. Esta región expandida como consecuencia de la falta de Pax6 constituye uno de los focos de origen de los OPCs durante el desarrollo embrionario. Por otra parte, se ha descrito que Pax6 está implicado en la regulación del balance de producción entre ODs y neuronas, y la carencia de Pax6 determina un incremento en la población de ODs (Hack et al., 2004, 2005). Todo ello nos llevó a plantear que Pax6 también podría estar implicado en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de los OPCs en el encéfalo adulto. Además, como PDGF participa en múltiples procesos durante el desarrollo embrionario y la neurogénesis adulta y, en particular, es el factor regulador de todos estos procesos en este tipo celular y está relacionado con la formación de tumores cerebrales, en los que se han descrito alteraciones de la expresión de Pax6, consideramos que podría estar implicado en estos procesos a través de la regulación de la proteína Pax6.

Todos estos datos nos llevaron a formular la siguiente hipótesis: "El factor de transcripción Pax6 participa en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de los distintos tipos de precursores del encéfalo adulto, tanto en la región neurogénica ZSV-CMR-BOP como en la región no neurogénica de la corteza, regulando a las células NG2<sup>+</sup>".

De esta hipótesis general de partida, surgen los siguientes objetivos, divididos en dos grupos:

### REGIÓN NEUROGÉNICA DE LA ZSV-CMR-BOP:

**a)** Analizar la distribución de las células Pax6<sup>+</sup> en la ZSV-CMR-BOP, conocer qué tipos celulares concretos implicados en la neurogénesis adulta están expresando la proteína y evaluar la participación de Pax6 en la organización estructural de la ZSV adulta.

**b)** Estudiar la participación de Pax6 en la regulación de la proliferación en la ZSV, CMR y BOP tanto *in vivo* como *in vitro*.

**c)** Examinar la participación de Pax6 en la regulación de la capacidad de autorrenovación de las células precursoras.

**d)** Valorar la participación de Pax6 en la diferenciación hacia células gliales o hacia neuronas de nueva generación y estudiar la capacidad sinaptogénica de las nuevas neuronas.

**e)** Determinar la participación de Pax6 en la capacidad de supervivencia de las células indiferenciadas y diferenciadas.

**f)** Analizar la relación de Pax6 con distintas moléculas integrantes de diferentes rutas de señalización, implicadas en el control de la proliferación, la supervivencia de las células, y la respuesta celular a moléculas extracelulares.

#### REGIÓN NO NEUROGÉNICA DE LA CORTEZA:

**g)** Analizar la implicación de Pax6 en la proliferación y distribución de las células NG2<sup>+</sup>.

**h)** Conocer la participación de Pax6 en la diferenciación de estos OPCs.

**i)** Estudiar la participación de Pax6 en la supervivencia de las células de nueva generación de la corteza rostral.

**j)** Analizar la influencia de PDGF sobre Pax6 y la participación de las rutas de señalización de Akt y Erk en esta regulación.

Mediante el cumplimiento de estos objetivos conoceremos en mayor profundidad la regulación de la neurogénesis en animales adultos y la generación de nuevas células a partir de precursores no neurogénicos, permitiéndonos establecer comparaciones entre ambos procesos. Un mayor entendimiento de los procesos fisiológicos que conducen a la formación de neuronas y oligodendrocitos en el encéfalo de adultos podría resultar de gran utilidad en futuras terapias celulares de neuroreparación y en la comprensión de los cambios moleculares patológicos que conducen al desarrollo de tumores cerebrales.



## Material y Métodos



## 1. Animales de experimentación

La especie utilizada para la experimentación *in vivo* es el ratón *Mus musculus*, L. 1758, de la estirpe B6EiC3Sn-a/A-Pax6<sup>Sey<sup>Dey</sup></sup>, adquirida a los laboratorios Jackson (Bar Harbor, EEUU), que carecen tanto del gen Pax6 al completo como de sus regiones génicas reguladoras.

La mitad de los animales utilizados fueron homocigotos control (+/+) y la otra mitad fueron heterocigotos para la mutación Sey<sup>Dey</sup> (+/Sey<sup>Dey</sup>). Se utilizaron ratones macho de 75, 90 y 135 días de edad postnatal (P75, P90, P135). Los heterocigotos +/Sey<sup>Dey</sup> se diferenciaron fenotípicamente de los animales control gracias a que presentan un menor tamaño corporal y del globo ocular (Fotografía 1).



**Fotografía 1:** Ratón +/Sey<sup>Dey</sup> (izquierda) y ratón control +/+ (derecha) de P90.

Los animales se criaron y mantuvieron en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca a temperatura y humedad relativa constantes, con fotoperiodo artificial de 12/12 horas y alimentados *ad libitum* con agua y pienso compuesto para roedores. Tanto los protocolos de mantenimiento como los procesos experimentales a los que fueron sometidos los animales fueron aprobados por el Comité Ético para la Experimentación Animal y Humana del Instituto de Neurociencias de Castilla y León y cumplían la legislación española para el uso y cuidado de animales de experimentación (RD 1201/2005) y la normativa al respecto de la Unión Europea (86/609/CEE).

## 2. Administración de BrdU

La 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) es un análogo de la timidina que se incorpora en el DNA durante la fase S del ciclo celular y permite marcar tanto las células proliferativas como su progenie. Las inyecciones de BrdU son un método ampliamente utilizado para

estudiar la proliferación y la formación de nuevas de células tanto durante el desarrollo como en la neurogénesis adulta.

La BrdU (Sigma-Aldrich) se administró mediante inyecciones intraperitoneales en animales adultos de 75 días de edad (P75), con una dosis de 30 µg BrdU/ g de peso corporal mezclada con 3 µg/g de peso corporal de 5- fluoro-2'-deoxiuridina (FdU, Sigma-Aldrich) disueltas en tampón fosfato salino 0.1 M pH 7,35 (TFS). La FdU favorece la incorporación de la BrdU en las células. Los tiempos de sacrificio posteriores a la inyección fueron diferentes dependiendo del análisis a realizar.

Para el estudio de la fase S del ciclo celular se realizó una única inyección de BrdU/FdU 30 min antes del sacrificio del animal (P75).

Para el estudio de la migración de los precursores, su incorporación y la diferenciación temprana se realizaron tres inyecciones de BrdU/FdU con un intervalo de 3 h entre cada una de ellas y los animales se sacrificaron 15 días después (P90).

Para el estudio de la supervivencia de las células de nueva generación y su diferenciación tardía también se realizaron tres inyecciones de BrdU/FdU con un intervalo de 3 h entre cada una de ellas, pero en este caso los animales se sacrificaron 60 días después (P135).

### 3. Procesamiento de animales para el análisis histológico

Todos los animales se anestesiaron intraperitonealmente con una mezcla de 1 µl/ g de peso corporal de ketamina (Imalgène, Merial) y 0,5 µl/ g de peso corporal de xilacina (Rompún, Bayer). El efecto anestésico se comprobó por la ausencia de reflejo palpebral. Se abrió la caja torácica y se inyectó directamente en el ventrículo izquierdo del corazón 0,1 ml de heparina sódica (Sigma-Aldrich) (5 u.I./ml), para evitar la formación de coágulos. A continuación se introdujo una cánula en el corazón y se perfundieron a través de la aorta ascendente, con una bomba peristáltica que producía un flujo de 13-15 ml/min. Inicialmente, se eliminó la sangre del animal con solución salina (Fluka) al 0,9% (p/v) en agua destilada durante 1 min y posteriormente se pasó una solución fijadora que dependió del experimento a realizar, tal y como se indica en la Tabla I. Finalizada la perfusión, se extrajo el cerebro, se separó la parte caudal de la rostral a nivel del hipocampo y la parte rostral se dividió en hemisferios. En estos bloques de tejido se realizó una postfijación según las necesidades del experimento (Tabla I). Tras la postfijación, los bloques se lavaron en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,35 (TF) durante 2 h en agitación y a temperatura ambiente.

<b>Tabla I: Procedimientos de fijación por perfusión</b>			
<b>Técnica</b>	<b>Solución fijadora</b>	<b>Tiempo de perfusión y volumen de fijador</b>	<b>Postfijación</b>
<b>Histología convencional y técnica de TUNEL</b>	Somogyi sin glutaraldehído: paraformaldehído (Sigma-Aldrich) 4% (p/v) y ácido pícrico (PanReac) 0,2% (v/v) en TF	15 minutos (125 ml aproximadamente)	2 h en la misma solución fijadora
<b>Microscopía electrónica</b>	Somogyi con glutaraldehído: paraformaldehído 4% (p/v), ácido pícrico 0,2% (v/v), glutaraldehído (Sigma-Aldrich) 0,5% (v/v) en TF	15 minutos (125 ml aproximadamente)	Sin postfijación
<b>Detección de NG2</b>	Paraformaldehído 4% (p/v) en TF	5 minutos (40 ml aproximadamente)	Sin postfijación

Una vez eliminados los restos de fijador, los bloques de cerebro utilizados para Histología convencional, técnica de TUNEL y detección de NG2 se incubaron a 4 °C toda la noche en una solución crioprotectora de sacarosa (Sigma-Aldrich) al 30% (p/v) en TF en agitación. Se encastraron en una mezcla de agar (Fluka) al 1,5% (p/v) y sacarosa al 5% (p/v) en TF y se sumergieron de nuevo en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% (p/v) en TF en agitación a 4 °C durante 24 h. Se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta el momento de su seccionamiento por congelación. Los cerebros utilizados para microscopía electrónica de transmisión se encastraron en agar al 4% (p/v) en TF para su seccionamiento y se conservaron siempre a 4 °C.

## Seccionamiento

Los cerebros destinados a las técnicas de Histología convencional se seccionaron por congelación con la ayuda de un criostato (Leica CM3050 S ó Microm HM560, Thermo Scientific). Se realizaron secciones de 30 µm y se recogieron sobre placas de 24 pocillos que contenían TF. Mediante lavados sucesivos en este mismo tampón se eliminaron los restos del medio de encastrado y fijador. Posteriormente, las secciones se embebieron en mezcla congeladora [TF, glicerol (PanReac) 30% (v/v), polietilenglicol (PanReac) 30% (v/v)] y se guardaron a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

Los cerebros utilizados para microscopía electrónica de transmisión se cortaron a 50 µm con un vibratomo (VT 1000E, Leica), se recogieron en viales de vidrio con azida sódica

(Sigma-Aldrich) al 0,05% (p/v) en TF y se mantuvieron a 4 °C hasta su posterior procesamiento.

### Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para microscopía óptica

Para el marcaje de las moléculas de interés empleamos tanto el método inmunohistoquímico del complejo de la avidina-biotina-peroxidasa (ABC), como la inmunofluorescencia (IF) simple, doble o triple. El protocolo utilizado para la detección de la mayoría de moléculas fue el siguiente:

Las secciones se lavaron con TF durante 10 min tres veces (3 x 10 min). Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios específicos (Tabla II) durante 72 h a 4 °C en agitación. Estos anticuerpos primarios se diluyeron con 5% (v/v) de suero normal (Sigma-Aldrich) del animal en el que esté hecho el anticuerpo secundario que se vaya a utilizar y 0,2% (p/v) de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) en TF. En el caso de la detección de factores de transcripción, se añadió también dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) al 1% (v/v) para abrir el ADN y facilitar la penetración de los anticuerpos. Tras otros 3 lavados de 10 min en TF, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario que podía estar bien unido a biotina (Vector; dilución 1:200) bien combinado con el fluorocromo correspondiente (Cy2, Cy3; Cy5; Alexa 488; Jackson; dilución 1:500) (Tabla II) en TF durante 2 h y en agitación. Una vez realizados los lavados pertinentes (3 x 10 min) con TF, terminó el procesamiento de las secciones reveladas con fluorescencia. Sin embargo, las secciones que iban a ser reveladas mediante el método ABC se incubaron con el complejo ABC (Vector) diluido 1:250 en TF durante 1 h. La actividad de la peroxidasa se localizó histoquímicamente sumergiendo las secciones en un medio de revelado que contenía 0,003% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PanReac) y 0,02% (p/v) del cromógeno diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich), en TF. La reacción se controló bajo el microscopio y se detuvo, mediante 2 lavados de 10 min con TF, cuando se alcanzó la tinción óptima de elementos positivos respecto a la tinción inespecífica de fondo. Finalmente, las secciones se montaron ordenadas rostro caudalmente sobre portaobjetos gelatinizados y posteriormente se deshidrataron en una serie de etanoles (PanReac) de graduación creciente, se aclararon con xileno y se montaron con Entellan (Merck).

<b>Tabla II: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunohistoquímica e IF.</b>			
<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Origen</b>	<b>Concentración</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>
<b><math>\alpha</math>-BrdU</b>	Accurate	1:5000	$\alpha$ -rata
<b><math>\alpha</math>-CB</b>	Swant	1:8000	$\alpha$ -conejo
<b><math>\alpha</math>-CCK</b>	Cure/Ria	1:200	$\alpha$ -ratón
<b><math>\alpha</math>-CR</b>	Cedido por el Dr. Schwaller	1:10.000	$\alpha$ -conejo
<b><math>\alpha</math>-GABA</b>	Sigma-Aldrich	1:2000	$\alpha$ -conejo
<b><math>\alpha</math>-GFAP</b>	Sigma-Aldrich	1:2000	$\alpha$ -ratón
<b><math>\alpha</math>-Iba1</b>	Everest	1:1000	$\alpha$ -cabra
<b><math>\alpha</math>-MAP2ab</b>	Sigma-Aldrich	1:150	$\alpha$ -conejo
<b><math>\alpha</math>-NeuN</b>	Chemicon	1:8000	$\alpha$ -ratón
<b><math>\alpha</math>-NG2</b>	Chemicon	1:600	$\alpha$ -conejo
<b><math>\alpha</math>-NOSn</b>	Cedido por el Dr. Emson	1:10.000	$\alpha$ -oveja
<b><math>\alpha</math>-O4</b>	Cedido por el Dr. Vicario	1:6	$\alpha$ -ratón IgM
<b><math>\alpha</math>-Olig2</b>	Chemicon	1:1000	$\alpha$ -conejo
<b><math>\alpha</math>-Pax2</b>	Covance	1:1000	$\alpha$ -conejo
<b><math>\alpha</math>-Pax6</b>	Covance	1:1000	$\alpha$ -conejo
<b><math>\alpha</math>-PCNA</b>	Santa Cruz	1:3000	$\alpha$ -ratón
<b><math>\alpha</math>-PDGFR<math>\alpha</math></b>	Santa Cruz	1:50	$\alpha$ -conejo
<b><math>\alpha</math>-Sox10</b>	Chemicon	1:1000	$\alpha$ -conejo
<b><math>\alpha</math>-TH</b>	Jacques Boy	1:10.000	$\alpha$ -conejo
<b><math>\alpha</math>-Tubulina <math>\beta</math>3 (Tuj1)</b>	Covance	1:1000	$\alpha$ -conejo

## MATERIAL Y MÉTODOS

En el caso de secciones reveladas con inmunofluorescencia, se utilizaron indistintamente para el contrastado nuclear, yoduro de propidio (*propidium iodide*; IP) (Sigma-Aldrich; 1:2000 en TF, 30 min) o DAPI (Sigma-Aldrich; 1:10.000 en TF, 10 min). Estas secciones se montaron ordenadas de manera rostro caudal sobre portaobjetos gelatinizados utilizando Mowiol como medio de montaje.

### Preparación de Mowiol:

Echar 6 g de glicerol (PanReac) en un vaso de precipitados y añadir lentamente 2,4 g de Mowiol 4-88 (Fluka), mientras se va mezclando.

Añadir 6 ml de H<sub>2</sub>O destilada y dejar a TA toda la noche.

Añadir 12 ml de tampón Tris-HCl (Sigma) 0,2 M pH 6,8 y calentar 10 min a 50 °C, mezclando de vez en cuando.

Cuando se disuelva el Mowiol, centrifugar 15 min a 5000 rpm. Se guarda congelado a -20 °C y a la alícuota en uso se le añade un 10% (p/v) de N-Propilgalato (Sigma) y se centrifuga 4 min a 4000 rpm.

### Controles de la técnica:

A) Omisión del anticuerpo primario en la primera incubación, para detectar posibles uniones inespecíficas del anticuerpo secundario al tejido.

B) Eliminación del anticuerpo secundario fluorescente para detectar posible autofluorescencia del tejido.

C) Eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios, por si existen uniones inespecíficas del complejo ABC.

D) Suprimir las incubaciones con el anticuerpo primario, secundario y complejo ABC, y realizar únicamente la histoquímica de la peroxidasa para poner de manifiesto una posible actividad peroxidasa endógena.

## Tratamientos especiales

En algunos casos, para obtener la máxima calidad en el marcaje, las secciones tuvieron que someterse a tratamientos especiales, tras los cuales se realizaba el protocolo habitual de inmunohistoquímica o IF explicado anteriormente.

### Imunohistoquímica para la detección de BrdU

La detección de BrdU en las secciones se realizó con la ayuda de un tratamiento con HCl 2 N durante 1 h a 37 °C en agitación, previo a la incubación con el anticuerpo primario. Se lavaron las secciones (3 x 10 min) con tampón borato (Sigma-Aldrich) 0,1 M, pH 8,5. Por

último, se realizaron lavados con TF (3 x 10 min) y se realizó el protocolo de inmunohistoquímica detallado anteriormente.

### Inmunohistoquímica para la detección de PCNA

Para la detección de PCNA (*proliferative cell nuclear antigen*; antígeno nuclear de proliferación celular) las secciones se sumergieron en la solución fijadora de Bouin-4% (paraformaldehído al 4% (p/v), ácido pícrico al 75% (v/v), ácido acético (PanReac) al 5% (v/v) en TF) durante 2 h. Posteriormente se realizaron lavados con TF (5 x 10 min) para eliminar los restos de fijador y se procedió con el protocolo habitual de inmunohistoquímica.

### Inmunohistoquímica para la detección del receptor $\alpha$ de PDGF (PDGFR $\alpha$ )

Para detectar este receptor fue necesario someter al tejido a recuperación antigénica. Las secciones se sometieron a 2 choques térmicos de 4 min en un microondas con potencia de 500 W. Durante los choques térmicos las secciones estaban sumergidas en 200 ml de tampón citrato (Sigma-Aldrich) 0,1 M, pH 6,0, que se renovó entre ambos choques térmicos. Tras ello, se lavaron con TF y se procedió con el protocolo de inmunohistoquímica o IF habitual.

## Inmunohistoquímica para microscopía electrónica de transmisión

### Inmunohistoquímica en preinclusión

Esta metodología se utilizó con dos finalidades. Una de ellas fue conocer la sinaptología de las subpoblaciones de células yuxtglomerulares analizadas a lo largo de este estudio (CB, CCK, CR, NOSn y TH positivas) y la otra fue identificar los tipos celulares que expresan la proteína Pax6 en la ZSV y la CMR.

Para neutralizar en lo posible el marcaje de fondo debido a los grupos aldehído de la fijación se sumergieron las secciones en una solución de borohidruro sódico (Sigma-Aldrich) al 1% (p/v) en TF durante 30 min. Las secciones se lavaron abundantemente con TF (6 x 5 min) y se incubaron en una solución crioprotectora (sacarosa al 25% (p/v), glicerol al 10% (v/v) en TF 0.05 M) durante 30 min. Se realizó la permeabilización de las secciones mediante ciclos de congelación-descongelación con vapores de nitrógeno líquido (3 veces/sección) y se lavaron con TF (3 x 10 min). A continuación, las secciones se incubaron en solución de bloqueo (BSA al 2% (p/v) (Sigma-Aldrich), suero normal de cabra al 5% (v/v) y azida sódica al 0,05% (p/v) en TF) durante 45 min y a continuación se incubaron durante

## MATERIAL Y MÉTODOS

72 h a 4 °C con el antisuero primario (anticuerpo primario, suero normal de cabra 1% (v/v) en TF, Tabla II). A partir de este momento se siguió el protocolo habitual de inmunohistoquímica por el método ABC detallada en la sección anterior.

Para realizar el contrastado, las secciones se incubaron con una solución de tetróxido de osmio al 1% (Electron Microscopy Sciences; EMS) y glucosa (Sigma-Aldrich) al 7% (p/v) en TF durante 1 h en oscuridad y a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron abundantemente con TF (6 x 5 min) y se procedió al contrastado con acetato de uranilo (Merck). Para ello, se lavaron con tampón maleato (Sigma-Aldrich) 0,2 M a 4 °C (2 x 15 min), se pasaron a una solución de coloración (acetato de uranilo 2,5% (v/v) en tampón maleato) a 4 °C en oscuridad durante 90 min y se lavaron con tampón maleato a 4 °C (3 x 10 min). Se deshidrataron en una serie de alcoholes crecientes (PanReac) a 4 °C y se aclararon con óxido de propileno (PanReac) (2 x 8 min). Se embebieron en resina epoxi Durcupan (EMS/Fluka) y se dejaron a temperatura ambiente toda la noche. Transcurridas 12 h, las secciones se montaron con resina en portaobjetos sin gelatinizar y se polimerizaron a 60 °C hasta el día siguiente, cuando se despegó el cubreobjetos y se diseccionaron las áreas de interés (glomerulos, ZSV o CMR). Las regiones diseccionadas se reincluyeron en bloques de resina Durcupan y se dejaron polimerizar a 60 °C toda la noche.

### Preparación de Resina Durcupan:

La resina epoxi Durcupan consta de 4 componentes. Mezclar 10 g de componente AM y 10 g de B y remover bien. Incorporar 0,3 g de componente D y 0,3 g de componente C. Remover bien.

## Seccionamiento en ultramicrotomo

Una vez obtenidos los bloques de tejido incluidos en resina, se tallaron y cortaron en un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung). Se obtuvieron cortes ultrafinos de 60-70 nm de grosor y se recogieron sobre rejillas de níquel de ojal (Electron Microscopy Sciences) recubiertas por Formvar (Sigma-Aldrich). El recubrimiento de las rejillas con Formvar se realizó mediante el siguiente protocolo:

Se preparó una solución de Formvar al 1% (p/v) (Sigma-Aldrich) en cloroformo (PanReac) y en ella se bañaron portaobjetos limpios no gelatinizados. Se dejó secar y se rallaron los extremos de los portaobjetos con una cuchilla. Posteriormente, los portaobjetos se introdujeron cuidadosamente en una cubeta con H<sub>2</sub>O Milli-Q para que la película de Formvar se despegara y quedase estirada. Con unas pinzas, se fueron poniendo las rejillas sobre la película de Formvar. Por último, se cubrió la película recubierta de rejillas con un trozo de Parafilm, se sacó del agua y se guardó en una placa Petri a temperatura ambiente.

## Contrastado de las rejillas

Los cortes ultrafinos se contrastaron sumergiéndolos en citrato de plomo de Reynolds durante 8-10 min a temperatura ambiente (TA) y en oscuridad.

### Preparación del citrato de plomo de Reynolds:

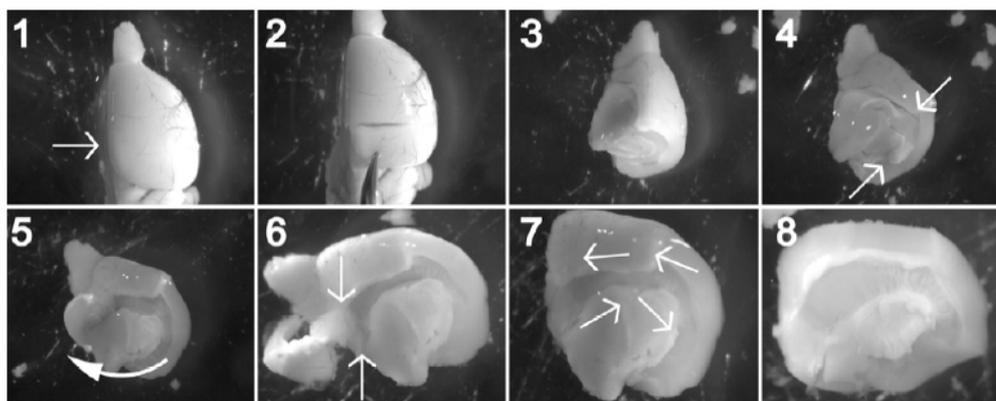
Nitrato de plomo (Merck) 1,33 g  
 Citrato sódico di-hidrato (Fluka) 1,76 g  
 H<sub>2</sub>O Milli-Q 30 ml  
 Hidróxido sódico 1 N (Fluka) 8 ml  
 Ajustar el volumen hasta 50 ml con H<sub>2</sub>O Milli-Q

Indicaciones: Añadir el nitrato de plomo y el citrato sódico en los 30 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Agitar fuertemente durante 1 min y luego cada 5 min durante 30 min en total. La solución adquiere aspecto lechoso. Añadir los 8 ml de hidróxido sódico 1 N y agitar hasta obtener una solución transparente. Completar con H<sub>2</sub>O Milli-Q hasta 50 ml. Filtrar.

## Inmunofluorescencia *in toto* de la ZSV

Para conocer la organización tridimensional de la zona subventricular y la distribución de los astrocitos en la misma, realizamos inmunofluorescencias para detectar GFAP *in toto* de esta región. Para ello, se utilizó el protocolo descrito por Mirzadeh y colaboradores (2008).

Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajeron sus encéfalos. Se separaron los hemisferios cerebrales y se seccionó el encéfalo conservando las  $\frac{3}{4}$  partes más rostrales del mismo (Fotografía II, 1 a 3). Se realizó un corte transversal en la zona caudal, para exponer la cavidad ventricular y el estriado (Fotografía II, 4 y 5). Posteriormente, se seccionó la región rostral para aislar el ventrículo lateral y por último se eliminó el estriado (Fotografía II, 6 a 8). Se obtuvo un fragmento que contenía la ZSV, el cuerpo calloso y la corteza situada sobre ellos. Este fragmento se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% (p/v), Triton X-100 al 0,1% (p/v) en TF durante la noche a 4 °C. Los fragmentos se lavaron abundantemente con TF (6 x 10 min) y se procedió con el marcaje inmunofluorescente para GFAP. Para ello, los fragmentos de tejido se incubaron con el antisuero primario ( $\alpha$ -GFAP 1:1000, Triton X-100 al 2% (p/v), suero normal de cabra al 10% (v/v) en TF, ver Tabla II) durante 48 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo se lavaron los fragmentos (3 x 10 min) y se continuó con su disección, eliminando bajo lupa la corteza y parte del cuerpo calloso situados sobre la ZSV. Una vez aislada la ZSV se incubó con el anticuerpo secundario (cabra  $\alpha$ -conejo conjugado con Cy2 1:500 en TF) durante 6 h a TA. Por último, se lavó la ZSV con TF y se montó con Mowiol sobre portaobjetos gelatinizados con la cavidad ventricular orientada hacia la superficie.



Fotografía II: Fotografías tomadas bajo lupa que muestran el proceso de disección de la ZSV. Obtenido de Mirzadeh *et al.*, 2008.

## 4. Detección de células apoptóticas: Técnica de TUNEL

La técnica de TUNEL permite identificar cuerpos apoptóticos. Consiste en marcar los extremos mellados de DNA con dUTP biotinado, mediante la acción enzimática de la desoxinucleotidil transferasa terminal.

La detección de cuerpos apoptóticos *in vivo* se realizó sobre secciones de tejido que se posfijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 20 min. Después de lavar las secciones con TF (3 x 10 min), se trataron con etanol/ácido acético (2:1) a -20 °C durante 5 min. Tras este tratamiento inicial, las secciones se lavaron de nuevo en TF (3 x 10 min) y se permeabilizaron a TA durante 15 min con Triton X-100 0,2% (p/v) diluido en citrato sódico al 0.1% (p/v) en agua destilada. Después de esta permeabilización, se realizó la técnica de TUNEL tal y como se ha descrito previamente en la literatura (Gascon *et al.*, 2005). Brevemente, los tejidos se lavaron en TF (2 x 5 min) y se sumergieron durante 30 min en tampón TUNEL (Tris-HCl 30 mM, pH 7,2, cacodilato sódico (Roche) 0,14 M, CoCl<sub>2</sub> (Roche) 1 mM, Triton X-100 al 0,3% (p/v)). Transcurridos los 30 min, las secciones se incubaron durante 2 h a 37 °C con la mezcla de reacción TUNEL que contenía 800 U/ml de transferasa terminal (Roche) y biotina-16-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato 1 μM (Roche) diluidos en tampón TUNEL. Para finalizar, las secciones se lavaron en TF (3 x 10 min), se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente con estreptavidina conjugada con Cy2 a una dilución 1:500 (Jackson) y se contratiñeron con IP 1:2000. Después de tres lavados con TF, las secciones se montaron ordenadas rostro caudalmente en portaobjetos gelatinizados utilizando Mowiol como medio de montaje.

Además de en secciones, esta técnica también se realizó en cultivos de células madre de BOP adulto (siguiente apartado). El protocolo seguido fue exactamente el mismo, exceptuando la postfijación inicial con paraformaldehído, que no se llevó a cabo.

## 5. Cultivos de células madre del BOP adulto

El potencial de diferenciación y muchos otros aspectos de las células madre neurales son difíciles de estudiar *in vivo* y es necesario aislar las células para realizar estos estudios *in vitro*. Las células madre neurales (CMN) se pueden cultivar de dos maneras: en agregados flotantes, llamados neurosféricas, o en cultivos de células adheridas. Lo que tienen en común ambos tipos de cultivos es que, en el caso del ratón, las células se deben mantener en presencia de reguladores extrínsecos, como los factores de crecimiento FGF2 y EGF; y deben estar en ausencia de suero, para que se mantengan en estado indiferenciado y proliferativas (Reynolds y Weiss, 1992; procedimientos de cultivo revisados en Ahmed, 2009 y Deleyrolle y Reynolds, 2009).

### Sacrificio y disección

Los animales se sacrificaron mediante esguince cervical y se extrajeron sus BOPs, que se colocaron en una placa de 60 mm con solución de Hanks fría. Bajo lupa, se procedió a retirar las meninges de los BOPs y posteriormente, los BOPs se pasaron a una nueva placa con solución de Hanks con EDTA (0,2 mg/ml), en la que se trocearon finamente. Se transfirió el tejido a un tubo de 15 ml y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se añadió una solución compuesta de Hanks-EDTA (0,2 mg/ml), papaína (Worthington; 1 mg/ml) y cisteína (Sigma-Aldrich; 0,2 mg/ml) para disgregar el tejido enzimáticamente. Se resuspendió el tejido en esta solución y se pasó a una placa, que se incubó a 37 °C durante 45 min. Transcurrido ese tiempo, el tejido disgregado se recogió en un tubo de 15 ml y se inhibió la reacción por dilución, añadiendo 10 ml de medio de cultivo (DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub>). Se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm, se retiró el sobrenadante y se disgregó mecánicamente el tejido utilizando una pipeta de 1000 µl. Se añadieron 5 ml de solución de Hanks y se centrifugó nuevamente a 1000 rpm durante 5 min. Se repitieron las centrifugaciones y la disgregación mecánica hasta que el tejido perdió el aspecto mucoso (habitualmente 2-3 veces). Después de la última centrifugación, el pellet se resuspendió en 2 ml de DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub>/medio condicionado (DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub> en el que han crecido neurosféricas de BOP embrionario) en proporción 1/1 y se sembró en un pocillo de una placa de 6 pocillos. Se añadió el suplemento B27 (Invitrogen) (10 µl/ml) al medio de cultivo. Además, diariamente se añadieron FGF2 (Peprotech) y EGF (Peprotech) a una concentración de 20 ng/ml, para que las células estuvieran en un medio con factores de crecimiento mitógenos. De esta manera, obtuvimos los cultivos de células madre de BOP adulto (CMBOPa), con los que se realizaron diferentes experimentos.

### Preparación de Hanks:

Solución comercial de Hanks (Invitrogen), 400 ml  
Hepes (Sigma): 15 mM  
NaHCO<sub>3</sub> (Sigma): 10 mM  
D(+)Glucosa (Sigma): 0,45 g  
Estreptomina/Penicilina (Invitrogen): 10.000 u/10.000 u; 2,5 ml  
Ajustar el pH a 7,15-7,20  
Enrasar con H<sub>2</sub>O Milli-Q hasta 500 ml y pasar por un filtro de 0,22 µm de poro (Millipore o Nalgene)

### Preparación de Hanks-EDTA:

A 300 ml de la solución de Hanks suplementada se le añaden 0.06 g de EDTA (Sigma) (concentración final: 0,2 mg/ml). Ajustar el pH a 7,15-7,20 y filtrar.

### Preparación de DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub> (volumen final 200 ml):

DMEMF<sub>12</sub> (Invitrogen): 3,116 g  
Piruvato sódico (Sigma): 1 mM  
NaHCO<sub>3</sub> (Sigma) 22 mM  
L-Glutamina (Invitrogen): 2 mM  
Apotransferrina (Sigma): 103,2 mg/ml  
Putrescina (Sigma): 1 mM  
Progesterona (Sigma): 20 nM  
Selenito sódico (Sigma): 30 nM  
Penicilina/Estreptomina (Invitrogen): 10.000 u/10.000 u  
Insulina (Sigma): 10 µg/ml  
Ajustar hasta 200 ml con H<sub>2</sub>O Mili-Q  
Ajustar pH a 7,15-7,20 y filtrar.

## Mantenimiento de los cultivos

Cuando las neurosféricas sobrepasan un determinado tamaño, el oxígeno y los nutrientes no llegan bien a las células centrales y la neurosfera adquiere un tono marrón. Esta fase se conoce como confluencia. Las neurosféricas de CMBOPa alcanzan la confluencia tras aproximadamente 7 días *in vitro* (7 DIV). En este momento, hay que disgregar las células y volverlas a sembrar, lo que permite, además, expandir la población. Para ello, se recogieron las neurosféricas de la placa de cultivo y se pasaron a un tubo de 15 ml. Se añadió el mismo volumen de Hanks-EDTA que volumen de células se hubo recogido y el tubo se introdujo durante 25 min en el incubador a 37 °C. Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y se retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió añadiendo solución de Hanks. Se centrifugó de nuevo y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 200 µl de medio de cultivo DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub> y se disgregaron mecánicamente. Se completó el volumen a 1 ml con el mismo medio y se evaluó la supervivencia, contando las células vivas y muertas con una cámara Neubauer utilizando azul tripán (Sigma-Aldrich), que tiñe de azul las células muertas. Se calculó el número de células necesario en función de las condiciones de siembra y de la placa de cultivo y se ajustó el volumen con medio de cultivo que varió en función del experimento a realizar. Cuando el objetivo de la siembra era la expansión de la población o

el análisis de la proliferación, la densidad de siembra fue de 5000 células/cm<sup>2</sup> y el medio utilizado fue DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub> con mitógenos (FGF2 y EGF a una concentración de 20 ng/ml), que se renovaron diariamente. Si se quería analizar la diferenciación a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (diferenciación a tipos neurales generales) se sembró a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup> y se utilizó DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub> sin mitógenos. Por último, si el objetivo era analizar la diferenciación a subtipos neuroquímicos neuronales, se utilizaron condiciones de siembra que favorecen la diferenciación neuronal, con una densidad de siembra de 100.000 células/cm<sup>2</sup> y siendo el medio de cultivo DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub> suplementado con B27 (10 µl/ml), 2% de suero fetal bovino (v/v) (FBS, *Fetal bovine serum*; suero fetal bovino) y una única dosis de FGF2 (20 ng/ml).

## Análisis de proliferación

Los análisis de la capacidad proliferativa *in vitro* se realizaron de dos maneras diferentes, para tener en cuenta la influencia que la adhesión al sustrato pudiera estar ejerciendo.

Para el análisis de proliferación con células adheridas a sustrato, se trataron cubreobjetos con poliornitina (Sigma-Aldrich; 1 µg/ml) durante 24-48 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se lavaron con TFS estéril 3 veces y se añadió fibronectina (Invitrogen; 1 µg/ml). Los cubreobjetos se incubaron en la solución de fibronectina a 37 °C durante 4-6 h. Se retiró la solución de fibronectina y se sembraron las células en las condiciones de proliferación. Una hora antes de fijar las células, se añadió BrdU (Sigma-Aldrich) en el medio de cultivo a una concentración final de 5 µM. Transcurrida la incubación con BrdU, los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) en TF durante 25 min a dos tiempos diferentes, tras 2 DIV y tras 4 DIV. Estos cubreobjetos se utilizaron tanto para el análisis de la proliferación (inmunofluorescencia frente a BrdU) como para el análisis de la muerte celular por apoptosis en condiciones proliferativas (técnica de TUNEL). En todos los análisis se utilizó DAPI o IP como contrastado nuclear que nos permitió conocer el número total de células. Por último, se analizaron en un microscopio de epifluorescencia.

Para el análisis de la proliferación en las neuroesferas en flotación, los cultivos se mantuvieron en placas de cultivo hasta que las neuroesferas estuvieron confluentes (aproximadamente 7 DIV). Además, se fueron tomando fotografías de los cultivos en flotación todos los días, para evaluar el crecimiento de las neuroesferas mediante medidas del diámetro de las mismas. Cuando alcanzaron la confluencia, se añadió BrdU al medio de cultivo a una concentración de 5 µM durante una hora y transcurrido ese tiempo se sembró la suspensión de neuroesferas en cubreobjetos previamente recubiertos con Matrigel disuelto

en medio de cultivo (1:100; Matrigel Matrix Basement Membrane, BD Biosciences). Las neuroesferas se dejaron reposar durante 10 min para permitir que se introdujeran en el Matrigel y posteriormente se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v) durante 25 min. Sobre esos cubreobjetos, al igual que en el caso anterior, se realizaron inmunofluorescencias para la detección de BrdU y se utilizó IP como contraste nuclear. Las esferas se analizaron con un microscopio confocal.

En ambos tipos de experimentos se obtuvieron datos del número de células positivas por esfera o por 10 campos escogidos al azar, del número de células totales, del porcentaje de células proliferativas y del porcentaje de cuerpos apoptóticos respecto al total. Los datos se expresaron tanto en número de células marcadas, número total de células y en el porcentaje de células marcadas respecto al total.

### Análisis clonal

Para evaluar la capacidad de autorrenovación de las células madre se realizaron experimentos de análisis clonal. Para ello, se sembraron placas de 96 pocillos (200  $\mu$ l/pocillo) con una dilución de 1 célula/100  $\mu$ l de medio de cultivo (mezcla a partes iguales de DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub> nuevo y DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub> en el que previamente habían crecido neuroesferas de bulbo olfatorio embrionario). El día siguiente a la siembra, se comprobaron los pocillos y se marcaron aquellos que tenían una única célula, en los que se indujo la proliferación mediante la adición diaria de factores de crecimiento (FGF2 y EGF a concentración de 20 ng/ml). Los cultivos se fijaron 8 días después de su siembra y se procedió a cuantificar la cantidad de células individuales que habían generado una neuroesfera con más de 8 células, el diámetro de esas esferas y la cantidad de células que permanecían únicas (aisladas pero vivas), las que habían formado dupletes y las que habían dado lugar a grupos de entre 4 y 8 células.

### Análisis de diferenciación a astrocitos, neuronas y oligodendrocitos

Las células se sembraron a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos tratados con poliornitina y fibronectina. Como medio de cultivo se utilizó DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub> sin factores de crecimiento. Las células se fijaron a 1, 2 y 4 DIV con paraformaldehído 4% (p/v) y se comprobó mediante inmunohistoquímica la expresión de O4 (marcador de oligodendrocitos), GFAP (marcador de astrocitos) y  $\beta$ 3-tubulina (Tuj1, marcador neuronal de expresión temprana) (ver Tabla II para las especificaciones de los anticuerpos primarios y secundarios). Además, también se analizó la muerte celular mediante TUNEL. En todos los

análisis se utilizó DAPI o IP como contraste nuclear para poder conocer el número total de células. Los datos se expresaron tanto en número total de células positivas como en porcentaje de células marcadas respecto al total.

## Análisis de diferenciación a subtipos de interneuronas del BOP

Las neuroesferas disgregadas se sembraron a una densidad de 100,000 células/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos tratados con poliornitina y fibronectina y como medio de cultivo se utilizó DMEMF<sub>12</sub>N<sub>2</sub> con B27 (10 µl/ml), 2% de FBS y una única dosis de FGF2 (20 ng/ml). Tras 7 DIV, los cultivos se fijaron y se analizó mediante doble inmunofluorescencia la coexpresión de MAP2ab (marcador neuronal) con marcadores de subtipos de interneuronas específicas del BOP (CB, CR, CCK, NOSn y TH) (ver Tabla II para las especificaciones de los anticuerpos primarios y secundarios). Además, también se realizó la técnica de TUNEL para analizar la muerte celular por apoptosis. En todos los casos se realizaron recuentos celulares y los datos se expresaron como número total de células positivas y como porcentaje de células marcadas respecto al total.

## Inmunofluorescencia para cultivos celulares

La única diferencia con la técnica inmunohistoquímica realizada sobre secciones, son tiempos de incubación y lavado más cortos. Brevemente, los cubreobjetos con las células fijadas se lavaron 3 veces con TF durante 5 min. La incubación con el anticuerpo primario ( $\alpha$ -BrdU,  $\alpha$ -CB,  $\alpha$ -CCK,  $\alpha$ -CR,  $\alpha$ -GFAP,  $\alpha$ -MAP2ab,  $\alpha$ -NOSn,  $\alpha$ -O4,  $\alpha$ -TH y  $\alpha$ -Tuj-1; Tabla II) (anticuerpo/s primario/s, suero normal 5% (v/v), Triton X-100 0,2% (p/v) en TF) se realizó toda la noche a 4 °C. En el caso de que el anticuerpo primario reconociera el antígeno O4, se eliminó el Triton X-100 de la solución. Transcurrido ese tiempo, los cubreobjetos se lavaron con TF (3 x 5 min) y la incubación con el anticuerpo secundario fue de 90 min (Tabla II).

Para detectar BrdU se realizó el pretratamiento con HCl 2 N a 37 °C en agitación durante un tiempo más reducido (10 min) que en las secciones. Los cubreobjetos se lavaron con tampón borato 0,1 M, pH 8,5 (3 x 10 min) y otras 3 veces con TF (3 x 10 min). Los tiempos de incubación para IP y DAPI se redujeron a 10 min y 5 min, respectivamente.

## 6. Análisis de modificaciones postraduccionales de la proteína Pax6 en respuesta a PDGF

Debido a que la proteína Pax6 participa en múltiples procesos durante el desarrollo embrionario y la neurogénesis adulta y a que se expresa en tipos celulares muy variados con funciones muy distintas (desde células madre hasta neuronas maduras) y a que PDGF tiene un papel esencial en la regulación de estos aspectos, y en particular en la biología de los progenitores de oligodendrocitos, decidimos analizar si la proteína Pax6 estaba regulada postraduccionamente por este factor de crecimiento.

La extracción de proteínas, su cuantificación y la técnica de western blot (WB), utilizadas en estos experimentos, se explican de forma detallada en las secciones 7 y 8 de este material y métodos.

### Líneas celulares

Para realizar este estudio, utilizamos varias líneas celulares de progenitores gliales, fácilmente manipulables y de las cuales se conoce bien tanto su respuesta a PDGF como las dosis y tiempos de reacción para cada una de las moléculas implicadas en la señalización celular por PDGF y sus inhibidores. Las líneas celulares utilizadas en esta Tesis Doctoral fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Eric C. Holland, del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York (EEUU), donde se obtuvieron a partir de progenitores gliales postnatales (P0-P1) de ratones transgénicos Nestina-TvA (NTvA). Estos animales expresan el receptor TvA, específico para un virus aviar, bajo el control del promotor de nestina, por lo que las células que expresan nestina (precursores de todo tipo) se pueden infectar de forma específica con vectores virales de tipo RCAS para modificar su expresión génica. Los progenitores gliales fueron infectados por diversos vectores RCAS, para obtener las siguientes líneas celulares:

RCASLacZ (NTvA/Z): Utilizada como línea celular control.

RCAS-Akt (NTvA/Akt): Expresan constitutivamente Akt activada, kinasa de la ruta de señalización de los factores de crecimiento, implicada en el control de la proliferación y la supervivencia.

RCAS-K-Ras (NTvA/Ras): Expresan constitutivamente Ras activada, una de las kinasas de la ruta de señalización por factores de crecimiento, que inicia la ruta de las MAPK.

RCAS-PDGF (NTvA/PDGF): Expresan de forma constitutiva PDGF, por lo que las células siempre están en contacto con el factor de crecimiento que actúa sobre ellas de manera autocrina.

RCAS-K-Ras/Akt (NTvA/Ras-Akt): Expresan constitutivamente formas activas de Ras y Akt.

El mantenimiento de las líneas celulares se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo. Como medio de cultivo se utilizó DMEM alto en glucosa (Lonza/Invitrogen) con 10% de FBS (v/v) (Lonza) y 2 mM de L-Glutamina (Lonza/Invitrogen) y los antibióticos penicilina y estreptomina (Lonza/Invitrogen; 500 u/ml de cada antibiótico), que llamaremos DMEM suplementado + FBS. Las células se sembraron a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup> y, cuando estaban confluentes, se lavó la placa con tampón fosfato salino (TFS) sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> y se disgregaron enzimáticamente con la ayuda de tripsina (0,5 mg/ml)-EDTA (0,2 mg/ml) (Lonza/Invitrogen). Tras 2 min de incubación se inhibió la tripsina por dilución con medio de cultivo. Las células se resuspendieron y disgregaron mecánicamente y se pasaron a un tubo de 15 ml para centrifugarlas a 1000 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de medio. Se contaron en una cámara Neubauer utilizando azul tripán (Sigma-Aldrich) para evaluar la muerte celular y se sembraron a la densidad indicada anteriormente.

## Análisis del efecto de PDGF en la proliferación de los progenitores gliales

Para analizar si PDGF regulaba la proliferación en la línea celular control de progenitores gliales NTvA-Z, al igual que sucede en los progenitores gliales *in vivo*, y si los progenitores NTvA-PDGF eran más o menos proliferativos que los control, sembramos células NTvA-Z y NTvA-PDGF sobre cubreobjetos redondos estériles a una densidad de 5000 células/cm<sup>2</sup> y las cultivamos en DMEM suplementado sin FBS. Después de mantenerlas en cultivo durante 24 h se añadió BrdU en el medio de cultivo a una concentración final 5 µM. Además, a una parte de los cubreobjetos de progenitores NTvA-Z se les añadió también el factor de crecimiento PDGF (10 ng/ ml). Una hora más tarde se fijaron todas las células con paraformaldehído al 4% (p/v) en TF (20 min). Se realizó la inmunohistoquímica para BrdU tal y como se ha descrito anteriormente y se contaron las células positivas de la misma forma que lo hicimos para el análisis de la proliferación de las CMBOPa.

## Efecto de PDGF en la proteína Pax6

### Análisis informático de secuencias susceptibles de fosforilación en la proteína Pax6

Antes de comenzar el análisis del efecto de la señalización por PDGF en la proteína Pax6, comprobamos de forma teórica la posibilidad de que distintas kinasas que participan en las rutas de señalización de PDGF pudieran fosforilarla, al presentar sitios consenso para kinasas en su secuencia de aminoácidos o bien que la proteína Pax6 presentase sitios de unión para moléculas implicadas en la señalización (sitios SH2 y SH3).

Para ello, utilizamos la secuencia de la proteína Pax6 de ratón publicada en la base de datos Pubmed con la referencia gi|15277449|gb|AAH11272.1 en formato FASTA. Se utilizó el programa en línea de predicción de sitios de fosforilación ScanSite (Obenauer et al., 2003) ([http://scansite.mit.edu/motifscan\\_seq.phtml](http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml)), ya que permite conocer los motivos de una proteína que pueden bien ser fosforilados por las principales Ser/Thr o Tyr kinasas implicadas en la señalización de los factores de crecimiento, o bien mediar en interacciones específicas con otras proteínas o con ligandos fosfolipídicos.

### Análisis de la regulación de Pax6 por PDGF

Para analizar el efecto de PDGF y su señalización celular subyacente sobre la proteína Pax6 en progenitores gliales control utilizamos células de la línea NTvA/Z cultivadas en placas de 10 cm de diámetro con DMEM suplementado + FBS. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70-80% se retiró el medio de cultivo, se lavó la placa con TFS estéril sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  y se cultivaron en DMEM suplementado sin FBS. Es decir, las células se mantuvieron en privación de suero durante al menos 12 h antes de comenzar los experimentos. Transcurrido ese tiempo, se procedió a tratar las células con PDGF a una concentración final de 10 ng/ml durante distintos tiempos (10 min, 20 min, 1 h, 3 h y 24 h), transcurridos los cuales se tomaron muestras celulares. Además también se tomaron muestras de células privadas de suero sin tratar con PDGF y de células sin privación de suero que se utilizaron como valores de referencia. En estas muestras se valoró la cantidad de proteína Pax6 mediante Western Blot (WB).

### Análisis de la participación de las proteínas kinasas Akt y Erk

Para conocer si Akt y Erk, como proteínas kinasas efectoras de la señalización por factores de crecimiento, estaban mediando en los efectos de PDGF sobre la proteína Pax6 se utilizaron diferentes estrategias:

Por una parte, y para impedir su activación, se utilizaron inhibidores de las kinasas de interés. Para inhibir la acción de Akt se utilizó LY294002 (Cell Signalling), un inhibidor específico de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K), que es la que activa a Akt. Las células estuvieron expuestas al LY294002 (100  $\mu$ M diluído en DMSO) desde 3 horas antes de la adición de PDGF hasta el momento de la toma de muestras. Para inhibir la activación de Erk se utilizó U0126 (Cell Signalling), un inhibidor específico de las kinasas MEK1 y 2 que activan a Erk. U0126 se utilizó a una dosis de 10  $\mu$ M diluído en DMSO desde la noche previa al tratamiento con PDGF (aproximadamente 12 h). Tras los tratamientos con los distintos inhibidores se realizó el análisis temporal con PDGF (ver apartado anterior), se extrajeron las proteínas y se analizó la cantidad de Pax6 mediante WB. Ya que el DMSO es citotóxico y los inhibidores se disolvieron en DMSO, siempre se incluyó como control un análisis similar únicamente con DMSO y sin inhibidor.

Por otra parte, se utilizaron las líneas celulares NTvA-Ras, NTvA-Akt, NTvA-Ras/Akt y NTvA-PDGF en las que se comprobó el nivel de proteína Pax6 mediante WB para analizar si había modificaciones en su expresión al tener distintos puntos de la ruta constitutivamente activos durante largos periodos de tiempo.

## 7. Extracción de proteínas

Utilizamos la técnica de Western Blot (WB) para conocer la posible regulación de Pax6 ejercida por PDGF en progenitores gliales en cultivo y para evaluar la expresión de distintas proteínas relacionadas con la regulación de la supervivencia de las células y el ciclo celular en muestras obtenidas de neurosféricas de BOP y CMBOPa en diferenciación, con el objeto de analizar los mecanismos moleculares responsables de los resultados obtenidos. Los procedimientos de extracción de proteínas totales variaron en función del tipo de muestra de origen y se detallan a lo largo de esta sección.

### Extracción de proteínas de neurosféricas de BOP y de células en diferenciación

Para evaluar la expresión de distintas proteínas en los cultivos de CMBOPa se utilizaron dos métodos de extracción, dependiendo de si las células estaban sembradas en flotación (condiciones proliferativas) o adheridas a la placa de cultivo (diferenciación):

#### Extracción de proteínas en condiciones proliferativas

Las células se sembraron en placas de 100 mm de diámetro en condiciones proliferativas (sección 6 del Material y Métodos). Cuando las neurosféricas estuvieron confluentes (7 DIV), se recogieron en un tubo de 15 ml y se centrifugaron durante 5 min a

## MATERIAL Y MÉTODOS

1000 rpm. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 30-50 µl de tampón de lisis con inhibidores de fosfatasa (Tabla V) para estudiar proteínas fosforiladas. Se disgregaron las células mecánicamente y se incubó durante 20 min a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 4 °C durante 20 minutos a 14.000 rpm. Se recogió el sobrenadante y los extractos proteicos se conservaron a -80 °C hasta su posterior cuantificación y análisis mediante WB (sección 8 del Material y Métodos).

<b>Tabla V: Composición del tampón de lisis para extracción de proteínas de CMBOPa</b>	
<b>Producto</b>	<b>Concentración final</b>
<b>Tris-HCl 1 M, pH 7.4 (Sigma-Aldrich)</b>	50 mM
<b>Cloruro de Sodio 5 M (Sigma-Aldrich)</b>	300 mM
<b>Triton X-100 (Sigma-Aldrich)</b>	1% (p/v)
<b>Ortovanadato de Sodio 100 mM (Sigma-Aldrich)</b>	1 mM
<b>Fluoruro de Sodio 1 M (Sigma-Aldrich)</b>	25 mM
<b>Pirofosfato de Sodio 230 mM (Sigma-Aldrich)</b>	4 mM
<b>EDTA 500 mM (Sigma-Aldrich)</b>	1 mM
<b>Roche complete mini EDTA-free protease inhibitor (Roche)</b>	½ tableta
<b>H<sub>2</sub>O Milli-Q</b>	hasta 5 ml

### Extracción de proteínas en condiciones de diferenciación

Las células se sembraron en placas de 100 mm de diámetro recubiertas de fibronectina y poliornitina, en condiciones de diferenciación a astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (ver sección 6). Transcurridos 2 días, se retiró el medio de cultivo de la placa, se realizó un lavado con solución de Hanks para eliminar las células en suspensión y se levantaron las células en diferenciación con un rascador. Las muestras se recogieron en un tubo de 15 ml y se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 30-50 µl de tampón de lisis con inhibidores de fosfatasa. A partir de este momento se procedió igual que en el caso de las células en proliferación.

## Extracción de proteínas para el análisis de la regulación de Pax6 por la señalización de PDGF

Para extraer las proteínas de las diferentes muestras se retiró el medio de las células, se lavaron con TFS estéril sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  y se añadieron, por placa de 100 mm de diámetro, 100  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción RIPA (Santa Cruz) complementado con ortovanadato sódico (Santa Cruz; 10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ), PMSF (Santa Cruz; 10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) e inhibidor de proteasas (Santa Cruz; 10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ). Las células se despegaron de la placa utilizando un rascador estéril, se disgregaron mecánicamente y se pasaron a un tubo estéril. A continuación, se sometieron a 3 ciclos de 10 min de reposo en hielo y 1 min de agitación fuerte. Por último, se centrifugaron a 4 °C durante 15 min a 14.000 rpm y se retiró el sobrenadante. Los extractos proteicos se conservaron a -80 °C hasta su posterior cuantificación y análisis mediante WB.

## 8. Cuantificación de proteínas y Western Blot

### Cuantificación de proteínas

La valoración de la cantidad de proteínas totales obtenidas en las diferentes muestras, según indicamos en la sección anterior, se llevó a cabo mediante el método Bradford. Las muestras de proteínas se diluyeron a una concentración de 1:1000 en  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q. De estas diluciones, se tomaron 800  $\mu\text{l}$  a los que se les añadió 200  $\mu\text{l}$  del reactivo de Bradford (BioRad). Se mezclaron y dejaron reposar durante 10 min a TA. A continuación se midió su absorbancia a 595 nm. Además, se elaboró también una recta patrón utilizando diluciones de BSA de concentración conocida que sirvieron de referencia para calcular la concentración de proteínas de cada muestra.

### Western Blot

#### Preparación de geles de SDS-poliacrilamida

Una vez conocida la cantidad de proteínas de cada muestra, el siguiente paso consistió en separarlas según su peso molecular mediante electroforesis. Los geles utilizados para la separación fueron de poliácridamida al 10% (p/v) (Tabla VI), de un grosor de 1 mm a 1,5 mm.

El gel de separación se depositó entre los cristales de electroforesis hasta dos tercios de su altura. El resto del espacio se recubrió con  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q y se esperó hasta la polimerización del gel. Posteriormente, se eliminó el  $\text{H}_2\text{O}$  y se añadió el gel de

concentración, insertando rápidamente el peine para la formación de los pocillos. Una vez polimerizado el gel de concentración, se retiró el peine para comenzar la electroforesis.

<b>Tabla VI: Composición de los geles de poliacrilamida</b>		
<b>Componente</b>	<b>Separación</b>	<b>Concentración</b>
<b>Acrilamida/Bisacrilamida 40% 37.5:1 (Applichem)</b>	1,25 ml	6 ml
<b>Tris Base 0.5 M, pH 6.8</b>	2,5 ml	---
<b>Tris Base 1.5 M, pH 8.8</b>	---	7,5 ml
<b>SDS 10% (v/v) (Sigma-Aldrich)</b>	300 µl	100 µl
<b>APS (Bio-Rad)</b>	300 µl	100 µl
<b>TEMED (Bio-Rad)</b>	12 µl	10 µl
<b>H<sub>2</sub>O Milli-Q</b>	6,05 ml	15,9 ml

## Electroforesis

Para cargar las proteínas en el gel de poliacrilamida, se diluyeron los µg correspondientes de cada una de las muestras de proteínas en 5 µl de tampón de carga. A continuación, con el fin de desnaturalizar las proteínas, se hirvieron las muestras durante 5 min a 100 °C y posteriormente se mantuvieron en hielo hasta que se cargaron en el gel de poliacrilamida. El primero de los pocillos se utilizó para el marcador de peso molecular (Bio-Rad). Una vez cargadas las muestras en sus pocillos, se procedió a la separación de las proteínas mediante la aplicación de una diferencia de potencial de 160 V durante aproximadamente 90 min. Durante la electroforesis, el gel estuvo sumergido en un tampón de separación que contenía Tris-glicina 10% (p/v) pH 8,3 y 10% SDS (p/v) en H<sub>2</sub>O Milli-Q.

Composición del tampón de carga:

7 ml de Tris Base 0,5 M, pH 6,8; 1 g de SDS; 3 ml de Glicerol (PanReac); 0,6 ml de β-Mercaptoetanol (Bio-Rad) y 1,2 mg de Azul de bromofenol (Bio-Rad).

Concluida la separación, procedimos a la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF (*PolyVinildene DiFluoride*; Immobilon-P, Millipore). Para ello, se realizó un "sandwich" entre ambos lados de una carpeta de plástico con rejilla, que constaba de una esponja, papel de filtro Whatman, el gel de poliacrilamida,

la membrana de PVDF, otro papel de filtro Whatman y otra esponja. Todos los componentes del "sandwich" estaban embebidos en el tampón de transferencia. Una vez montada, se introdujo la carpetilla en una cubeta con tampón de transferencia (Glicina 0,1 M, Tris Base 0,025 M, metanol al 20% (v/v) en H<sub>2</sub>O Milli-Q) y se aplicó un voltaje de 90 V durante 2 h y media a 4 °C, de tal forma que las proteínas previamente separadas en el gel se transfirieron a la membrana.

La correcta transferencia de las proteínas a la membrana se comprobó tiñendo la membrana con rojo Ponceau al 0,1% (p/v) diluido en ácido acético al 5% (v/v). Esta coloración marca las proteínas transferidas a la membrana, mientras que las proteínas que no lo hayan hecho se detectan introduciendo el gel en azul de Comassie (Bio-Rad) al 0,13% (p/v).

## Inmunodetección

Para detectar las proteínas de interés en la membrana, realizamos un inmuno blot según el siguiente protocolo. La membrana se preincubó con un medio de bloqueo formado por leche desnatada en polvo (Nestlé) al 5% (p/v) en tampón fosfato salino pH 7,3-7,4 y Tween-20 (Sigma-Aldrich) al 1% (v/v) a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se incubó el anticuerpo primario contra la proteína de interés (Tabla VII) diluido en el mismo medio de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavó la membrana con tampón fosfato salino pH 7,3-7,4 y Tween-20 (Sigma-Aldrich) al 1% (v/v) (3 x 10 min) y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano (HRP; Tabla VII), a temperatura ambiente durante 1 h. Después de lavar de nuevo la membrana (3 x 10 min), revelamos el marcaje, utilizando un kit de quimioluminiscencia para detectar el anticuerpo secundario (Western-blotting luminol reagent, Santa Cruz). Este kit posee H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se reduce en presencia de la peroxidasa. El luminol presente en la reacción se oxida, dando lugar a un compuesto que emite luz. En los casos en los que la señal emitida por este compuesto no fue suficiente debido a la baja concentración de la proteína de interés, se utilizó el kit de detección quimioluminiscente SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce-Thermo Scientific), que permite la detección de pocos femtogramos de antígeno. Finalmente, la membrana se expuso a una película fotográfica que detecta la señal quimioluminiscente y las películas se revelaron según un protocolo mecanizado (Kodak X-OMAT 2000).

<b>Tabla VII: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en WB</b>					
<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Origen</b>	<b>Concentración</b>	<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Origen</b>	<b>Concentración</b>
<b><math>\alpha</math>-Akt total</b>	Santa Cruz	1:1000	$\alpha$ -cabra-HRP	Jackson	1:10.000
<b><math>\alpha</math>-Fosfo-Akt (Ser473)</b>	Cell Signalling	1:1000	$\alpha$ -conejo-HRP	Amersham	1:5000
<b><math>\alpha</math>-Fosfo-p44/p42 MAPK (Thr202/Tyr204)</b>	Cell Signalling	1:2000	$\alpha$ -ratón-HRP	Jackson	1:10.000
<b><math>\alpha</math>-GAPDH</b>	Ambion	1 $\mu$ g/ml	$\alpha$ -ratón-HRP	Jackson	1:10.000
<b><math>\alpha</math>-p21<sup>Cip1</sup></b>	Santa Cruz	1:1000	$\alpha$ -cabra-HRP	Jackson	1:10.000
<b><math>\alpha</math>-p27<sup>Kip1</sup></b>	Santa Cruz	1:1000	$\alpha$ -conejo-HRP	Amersham	1:5000
<b><math>\alpha</math>-p53 total</b>	Santa Cruz	1:1000	$\alpha$ -conejo-HRP	Amersham	1:5000
<b><math>\alpha</math>-Pax6</b>	Covance	1:500	$\alpha$ -conejo-HRP	Amersham	1:5000
<b><math>\alpha</math>-PTEN</b>	Santa Cruz	1:1000	$\alpha$ -cabra-HRP	Jackson	1:10.000

Una vez obtenida la impresión en película fotográfica del inmuno blot, para reutilizar la membrana e incubarla con otro anticuerpo primario, realizamos un protocolo de "borrado" de la membrana, mediante pH y temperatura. Se introdujo la membrana en el tampón de "borrado" durante 30 min a 55 °C y en agitación. Se lavó con tampón fosfato salino pH 7,3-7,4 y Tween-20 (Sigma-Aldrich) al 1% (v/v) (3 x 10 min) y se realizó el siguiente inmuno blot.

Tampón de "borrado" de membranas:

Tris-HCl 1 M, pH 6,8; 6,42 ml

$\beta$ -mercaptoetanol, 700  $\mu$ l

20% SDS (p/v), 20 ml

Ajustar pH a 6,8

Añadir H<sub>2</sub>O Milli-Q hasta un volumen final de 100 ml

## 9. Cuantificación

### Elección de los niveles para la cuantificación *in vivo*

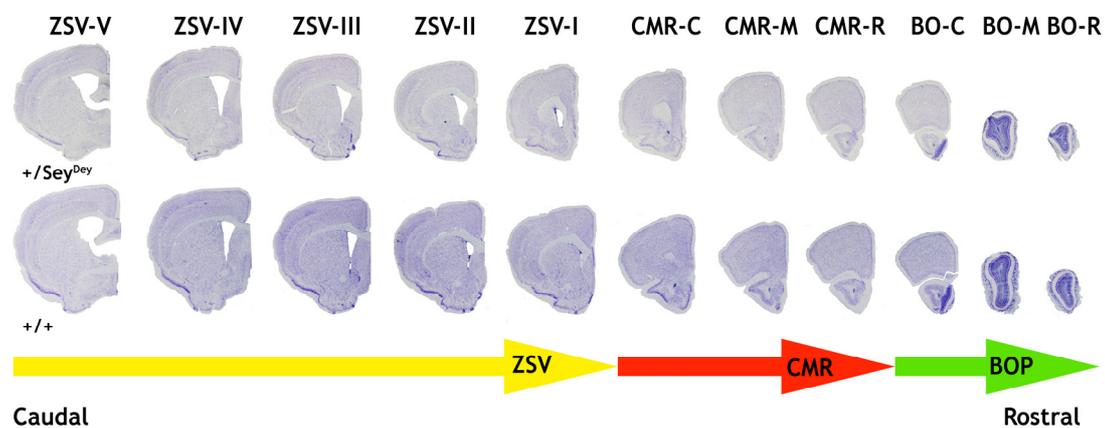
Debido a las deformidades anatómicas que presentan los BOPs de los heterocigotos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ , la elección de niveles representativos equivalentes en los animales  $+/+$  y  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  dentro de cada región de interés se llevó a cabo según el protocolo descrito por Weruaga y colaboradores (1999). Brevemente, se eligieron tres niveles rostro caudales en el BOP (caudal, C; medial, M; y rostral, R), tres niveles rostro caudales en la CMR (caudal, C; medial, M; y rostral, R) y 5 niveles rostro caudales en la ZSV (V-I), siguiendo los criterios expuestos a continuación para delimitar cada una de las regiones:

Región ZSV: Se tomó como región ZSV-I la sección más rostral de la serie con ventrículo lateral. La región ZSV-V era la primera sección que presentaba fimbria.

Región CMR: Comprendida entre la sección más caudal sin ventrículo lateral y la sección más rostral sin BOP.

Región BOP: A partir de la primera sección caudal con capa de los granos y capa glomerular.

Además, se analizó la corteza correspondiente a cada uno de los niveles (Fotografía III).



**Fotografía III:** Niveles representativos de estudio elegidos en animales  $+/+$  y  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$

### Medida del volumen

Las áreas de las distintas regiones de estudio (BOP, CMR, SVZ y corteza) se midieron, utilizando el programa informático NeuroLucida (MicroBrightField), en secciones seriadas de  $30\ \mu\text{m}$  de grosor, con una distancia entre una sección y la siguiente de  $180\ \mu\text{m}$ . Los volúmenes de las regiones se estimaron a partir de estas áreas, empleando el software

TableCurve 2D v5.01 (AISN Software) que calcula el área encerrada debajo de una curva, construida con los valores de las áreas de la sección y la distancia entre cada una de ellas.

### Análisis cuantitativos de células BrdU<sup>+</sup>

La cuantificación del número de células BrdU-positivas (BrdU<sup>+</sup>) en el encéfalo rostral *in vivo* se realizó usando los programas informáticos NeuroLucida y Neuroexplorer (MicroBrightField). Para ello se utilizó la densidad de células BrdU<sup>+</sup> en cada uno de los niveles de estudio, las estimaciones del volumen de las regiones de interés y el diámetro medio de los núcleos BrdU<sup>+</sup>. El número total de células BrdU<sup>+</sup> en cada región se estimó utilizando un método basado en el método Abercrombie descrito anteriormente en estudios similares (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002). Brevemente, se aplica la fórmula  $N=(d*V)/(g+D)$ ; donde **N** es el número de células BrdU<sup>+</sup> totales estimado en el volumen **V**, **d** es la densidad de células BrdU<sup>+</sup>, **g** es el grosor de las secciones y **D** el diámetro medio de las partículas analizadas (en este caso, los núcleos positivos a BrdU).

Además, para analizar la distribución rostro caudal de las células de nueva generación, se hicieron comparaciones de la densidad de células BrdU<sup>+</sup> en las diferentes regiones de interés.

### Análisis de colocalización

El porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> que expresaban diferentes marcadores neuronales se analizó empleando imágenes confocales de los cuadrantes dorsal, lateral, ventral y medial de secciones del BOP equivalentes en ratones control y heterocigotos. Mediante los programas informáticos del confocal Leica v2.61 y el programa ImageJ 1.37i (Rosband, W. S., National Institutes of Health) se contó el número de células BrdU<sup>+</sup> totales, el número de células positivas para cada marcador empleado y el número de células de cada marcador que colocalizó con BrdU. Los datos se expresaron como porcentajes de colocalización, tanto de células de nueva generación marcadas  $[(\text{células BrdU}^+/\text{células BrdU}^+\text{marcador}^+) \times 100]$  como de células que expresaban el marcador que eran de nueva generación  $[(\text{células marcador}^+/\text{células BrdU}^+\text{marcador}^+) \times 100]$ . Además, se tomaron datos de densidad de células positivas a cada marcador que se corrigieron en función de la reducción volumétrica, debido a la variación de volumen entre animales control y heterocigotos.

Se empleó la misma metodología para determinar el porcentaje de células PCNA<sup>+</sup>, Pax6<sup>+</sup> y dobles.

## Análisis cuantitativo de los cuerpos apoptóticos TUNEL-positivos

Debido a que el número de cuerpos TUNEL<sup>+</sup> en cada sección de 30 µm era muy pequeño, el análisis de las células apoptóticas se realizó mediante recuento directo bajo un microscopio de epifluorescencia. Los resultados se expresaron como número medio de cuerpos apoptóticos por sección para cada región de interés (ZSV, CMR, BOP y corteza).

## Análisis cuantitativos *in vitro*

Las cuantificaciones de células proliferativas, muerte celular y diferenciación *in vitro* se realizaron utilizando el programa Image J. Para ello, se tomaron fotografías de 10 campos diferentes distribuidos al azar por el cubreobjetos con el objetivo de 40 aumentos. En las imágenes obtenidas se contaron, tanto las células que presentaban el marcaje de interés como las células totales, marcadas con DAPI o IP. Los resultados se expresaron como número de células totales en 10 campos, número de células positivas y como porcentaje de células positivas respecto a las células totales.

## Análisis cuantitativos de los Western Blots

Para la cuantificación de la cantidad de proteína de interés presente en las muestras, se escanearon las distintas películas y se empleó el programa informático ImageJ, con el que se cuantificó la cantidad de píxeles de cada una de las bandas de proteína y la intensidad media de las bandas. Los datos se normalizaron en función de la expresión de la proteína GAPDH en cada muestra, utilizada como control de carga, y se expresaron como intensidades relativas y como porcentajes de variación de la expresión respecto a la intensidad relativa de los animales +/- cuando se presentaron diferencias significativas.

## 10. Análisis estadísticos

Para realizar los diferentes análisis estadísticos utilizamos el programa SPSS versión 15.0 (SPSS). Los test realizados fueron diferentes en función de la normalidad y homocedasticidad de los datos. Se analizó la normalidad de los datos y si estos eran paramétricos se utilizó el test de comparación por pares de la t-Student (p-valor). Por otra parte, los datos no-paramétricos se analizaron mediante el test U-Mann Whitney (significación asintótica). El nivel de significación para todos los análisis realizados se estableció en <0,05.

## 11. Fotografía y tratamiento de las imágenes

Para la obtención de las microfotografías de este trabajo utilizamos dos microscopios equipados con campo claro y epifluorescencia: un Olympus AX70 conectado a una cámara digital (Olympus DP70) y con los programas DP Manager y DP Controller y un Olympus AX70 equipado con una cámara XM10 y el programa Cell<sup>^</sup>F.

Los análisis de colocalización se realizaron tomando fotografías de planos focales con un microscopio láser confocal (Leica TCS SP2) usando los láseres de ArKr (488 nm), HeNe (543 nm) y HeNe (633 nm).

Las imágenes de microscopía electrónica se tomaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 con cámara óptica y cámara digital MegaView I, equipado con el programa de adquisición de imágenes AnalySIS. Este equipamiento pertenece al Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia.

El tratamiento digital posterior de todas las imágenes se realizó con el programa Adobe Photoshop CS.

## Resultados



## 1. Región Neurogénica ZSV-CMR-BOP

### Análisis volumétrico

A simple vista se observa una reducción en el volumen del BOP de los animales +/Sey<sup>Dev</sup> respecto a los +/+ de la misma edad. Por ello, y debido a la necesidad de realizar análisis estereológicos para cuantificar diferentes poblaciones celulares en las regiones de interés, decidimos evaluar la posible pérdida de volumen en las zonas de estudio (región neurogénica ZSV-CMR-BOP) de los animales heterocigotos. El volumen promedio de la ZSV, la cavidad ventricular, la CMR, el BOP y las diferentes capas del BOP de los animales control y heterocigotos, junto con sus respectivos errores estándar y los p-valores, se encuentran representados en la Tabla VIII. De las tres regiones analizadas, solamente se encontraron diferencias significativas en el tamaño total del BOP (reducción del 30% en los heterocigotos). Dentro de éste, los estratos más afectadas por la reducción fueron la capa glomerular, con una pérdida de volumen del 35%, y las capas internas (CI; capa de las células mitrales, capa plexiforme interna, capa de los granos y CMR-BOP), que sufren una reducción del 29%.

<b>Tabla VIII: Volumen en mm<sup>3</sup> de las distintas áreas de estudio en la región neurogénica ZSV-CMR-BOP de animales +/+ y +/Sey<sup>Dev</sup> (n=6 +/+; 6+/Sey<sup>Dev</sup>).</b>			
	<b>Volumen +/+ (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Volumen +/Sey<sup>Dev</sup> (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Ventrículo</b>	1,86 ± 0,24	1,71 ± 0,32	0,301
<b>ZSV</b>	1,54 ± 0,27	1,21 ± 0,32	0,498
<b>CMR</b>	0,032 ± 0,002	0,035 ± 0,009	0,707
<b>BOP</b>	4,66 ± 0,328	3,25 ± 0,095	0,000
<b>CG</b>	1,27 ± 0,115	0,83 ± 0,04	0,001
<b>CPE</b>	1,24 ± 0,15	0,96 ± 0,05	0,054
<b>CI</b>	2,07 ± 0,156	1,47 ± 0,063	0,002

## Expresión y distribución de Pax6 en la ZSV y CMR

Debido a que en la literatura existe controversia tanto en los tipos celulares de la región neurogénica ZSV-CMR-BOP que expresan Pax6 como en la distribución rostro-caudal de la expresión de Pax6, decidimos estudiar estos dos parámetros tanto en animales control como en heterocigotos para la mutación.

Para conocer la distribución rostro-caudal de Pax6 en esta región neurogénica, se realizó la inmunofluorescencia para este factor de transcripción. Pese a que la distribución es heterogénea, la expresión de Pax6 es elevada tanto en la ZSV como en el BOP, mientras que decae en la CMR. Dentro de la CMR, el nivel medial es el que presenta un mayor porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> (Figura 1 A). Con respecto a los animales heterocigotos, el porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> es siempre menor que en los ratones control y la distribución rostro-caudal es más homogénea, aunque también se produce una caída en la CMR (Figura 1 A). De hecho, los análisis estadísticos comparando el porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> en animales control y heterocigotos solo revelaron diferencias significativas en el nivel medial de la CMR (+/+ :  $22,2 \pm 3,02\%$ ; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $2,61 \pm 1,08\%$ ; p-valor: 0,001) (Figura 1 A).

Debido a la ausencia de marcadores específicos, la manera más precisa para conocer la expresión de Pax6 en los distintos tipos celulares de la ZSV y CMR es realizar inmunohistoquímica y observar las células positivas mediante un microscopio electrónico de transmisión. Utilizando esta metodología, observamos marcaje para Pax6 en todos los tipos de precursores (células A, B y C) tanto en la ZSV como en la CMR (Figura 1 B). Sin embargo, las células de tipo B contienen poco inmunoprecipitado, por lo que deducimos que deben expresar muy poca cantidad de Pax6 en comparación con los otros tipos celulares. Se realizaron colocalizaciones confocales de la expresión de GFAP (proteína típica de células B) con la proteína Pax6 demostrando que ambos marcadores colocalizan. Este dato confirmó la expresión de Pax6 en este tipo celular (Figura 1 D). Las mismas aproximaciones metodológicas realizadas en animales heterocigotos +/Sey<sup>DeY</sup> demostraron que la única diferencia con respecto a los animales control es una reducción del inmunoprecipitado en todos los tipos celulares (Figura 1 C).

Para comprobar si Pax6 se encontraba presente en las células precursoras en división, realizamos dobles inmunofluorescencias para PCNA, presente en células proliferativas, y Pax6. Nuestros datos demuestran que Pax6 está presente en células en división de esta región neurogénica (Figura 1 E).

## Estructura de la ZSV adulta en animales control y +/Sey<sup>Dey</sup>

Las células de tipo B derivan de la glía radial embrionaria y se han descrito alteraciones morfológicas graves en la glía radial durante el desarrollo en animales homocigotos sin Pax6. Ya que, como acabamos de demostrar, las células de tipo B en el adulto presentan expresión de Pax6, decidimos analizar la estructura de la ZSV adulta de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> realizando inmunofluorescencias frente a GFAP de la ZSV *in toto*.

En los animales control, las células de tipo B (GFAP<sup>+</sup>), pueden observarse de dos maneras diferentes. Por una parte, observamos "celdillas" positivas para GFAP que se corresponden con los cuerpos celulares y los procesos más cercanos al soma (Figura 2 A) y, en otras áreas, vemos que los procesos GFAP<sup>+</sup> están ordenados recorriendo longitudinalmente la pared de la cavidad ventricular (Figura 2 B). En los animales heterocigotos se observaron las dos mismas áreas con características similares a las mostradas en animales control (Figura 2 C y D). De hecho, en las áreas que únicamente presentan procesos, éstos no parecen más tortuosos ni están mal orientados. Por lo tanto, según nuestros resultados la heterocigosis para Pax6 no provoca alteraciones morfológicas en las células de tipo B de la ZSV adulta.

## Análisis de la capacidad proliferativa

Debido a que Pax6 interviene en la regulación del ciclo celular de los precursores durante el desarrollo, a que se han descrito alteraciones del ciclo celular en animales homocigotos sin Pax6, particularmente en la fase S, y a que, como acabamos de ver, Pax6 se expresa en células proliferativas en el adulto, decidimos analizar la influencia de la proteína Pax6 en la proliferación comparando animales +/+ y animales +/Sey<sup>Dey</sup> adultos de dos formas diferentes, mediante un análisis de las células PCNA<sup>+</sup> para observar células en cualquier fase del ciclo celular, y mediante inyecciones de BrdU y 30 minutos de supervivencia, para observar células en fase S.

## Análisis de la tasa proliferativa con PCNA

El recuento del número total de células PCNA<sup>+</sup> únicamente mostró diferencias significativas entre grupos en el cuadrante ventral del nivel más rostral de la ZSV (ZSV-I). Nuestros resultados muestran que la tasa proliferativa es del orden de 3.6 veces (+/+ : 29,56 ± 3,31%; +/Sey<sup>Dey</sup>: 8,21 ± 1,32%; p-valor: 0,006) más baja en animales heterocigotos que en los control. En esta misma región, también encontramos diferencias altamente significativas en el número de células totales por sección (marcadas con IP) (+/+ :

## RESULTADOS

69,2 ± 1,8 células; +/Sey<sup>DeY</sup>: 91,06 ± 1,35 células; p-valor: 0,001) (Figura 3 A-C), lo que demuestra que, a pesar de que la proliferación sea menor, la densidad celular es superior en los animales +/Sey<sup>DeY</sup>.

La distribución rostro-caudal de las células proliferativas PCNA<sup>+</sup> que expresan Pax6 es heterogénea, siendo más elevada en la CMR que en la ZSV (Figura 4 A). Sin embargo, el porcentaje de células proliferativas PCNA<sup>+</sup> que expresan Pax6 (PCNA<sup>+</sup>/Pax6<sup>+</sup>) en los animales +/Sey<sup>DeY</sup> es significativamente inferior que en los +/+ únicamente en los niveles CMR-M (+/+ : 60,32 % ± 16,4%; +/Sey<sup>DeY</sup>: 9,09% ± 4,98; p-valor: 0,019) y CMR-R (+/+ : 59,88 % ± 8,3%; +/Sey<sup>DeY</sup>: 24,32% ± 6,32; p-valor: 0,018), presentando reducciones de 6,6 y 2,5 veces respectivamente (Figura 3 A). El resto de niveles analizados no presentaron diferencias significativas. Estos datos indican que Pax6 está directamente relacionado con la proliferación de células adultas, siendo las células que se dividen en la CMR especialmente sensibles a la falta de un alelo del gen.

La distribución rostro-caudal del porcentaje de las células Pax6<sup>+</sup> en ciclo es heterogénea en los animales +/+, con un mayor número de células Pax6<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> en la CMR y los porcentajes más bajos de coexpresión en el BOP (Figura 4 B). Los animales mutantes presentan el mismo patrón de distribución y no encontramos diferencias significativas en ninguno de los niveles de estudio.

### Análisis de la tasa de células en fase S del ciclo celular

El número total de células en fase S estimado en la región neurogénica ZSV-CMR-BOP no presenta variaciones significativas entre animales control y mutantes (+/+ : 60.151,573 ± 4516,961 células BrdU<sup>+</sup> totales; +/Sey<sup>DeY</sup>: 71.830,993 ± 16.055,453 células BrdU<sup>+</sup> totales; p-valor: 0,456). Sin embargo, desglosando los datos por regiones (ZSV, CMR y BOP) encontramos diferencias significativas en la ZSV (Figura 5 A), donde el número de células proliferativas en fase S en animales +/Sey<sup>DeY</sup> está reducido en un 31,04% respecto al control (+/+ : 6805,4 células en fase S ± 375,9; +/Sey<sup>DeY</sup>: 4692,7 ± 639,3; p-valor: 0,029). No encontramos diferencias significativas en la proliferación en la CMR y en la CMR-BOP.

Una vez comprobado que sólo existían diferencias significativas en relación a este parámetro en la ZSV, quisimos analizar qué niveles concretos de la ZSV (ZSV-V a ZSV-I) estaban alterados. Nuestros datos indican que la densidad de células proliferativas aumenta rostralmente en los animales control, al contrario de lo que sucede en los heterocigotos (Figura 5 B) y, por tanto, encontramos diferencias significativas entre genotipos en los niveles más rostrales: ZSV-II (+/+ : 1529,29 células en fase S/mm<sup>2</sup> ± 62,87; +/Sey<sup>DeY</sup>: 1282,85 ± 53,69; p-valor 0,036) y ZSV-I (+/+ : 1863,17 células en fase S/mm<sup>2</sup> ± 195,79;

+/*Sey*<sup>DeV</sup>: 587,10 ± 488,18; p-valor 0,042). Al igual que observábamos en los datos de PCNA, la menor proliferación en los heterocigotos se produce en las regiones más rostrales.

En el BOP, encontramos células en fase S no solo en la CMR-BOP, sino por todas las capas. Por tanto, decidimos estimar el número de células BrdU<sup>+</sup> tanto en el BOP completo como desglosado por capas. En los animales control, la mayoría de las células proliferativas (63,5%) se encuentran en la CMR-BOP. Este dato se reduce al 47% en los animales +/*Sey*<sup>DeV</sup>. Esta diferencia en la contribución al número estimado de células en fase S en el BOP se distribuye entre las distintas capas de esta estructura. Por ello, en los animales heterocigotos, la proporción de células proliferativas respecto al total de células en fase S que se localizan en cualquiera de las capas del BOP, excepto en la CMR-BOP, es más elevada que en los ratones control. Por lo tanto, es probable que los animales heterocigotos presenten un menor número de precursores neurogénicos (los situados en la CMR-BOP) y un mayor número de precursores no neurogénicos NG2<sup>+</sup> (situados en el resto de las capas del BOP). Puesto que la tendencia de los animales mutantes era a presentar un menor número de células en fase S en el total del BOP (+/+ : 2677,53 ± 275,84 células en fase S estimadas; +/*Sey*<sup>DeV</sup>: 1620,68 ± 302,81 células en fase S estimadas; p-valor 0,051), decidimos analizar por separado las dos poblaciones proliferativas del BOP: los progenitores gliales NG2<sup>+</sup> y los precursores neurogénicos.

### Análisis de los progenitores NG2<sup>+</sup> proliferativos del BOP

El análisis de las células NG2<sup>+</sup> con respecto al total de células en fase S demostró que las células BrdU<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup> se distribuyen por todas las capas del BOP (Figura 5 D-F), excepto en la CMR-BOP y en el NO. En la CG, CPE y CI del BOP la gran mayoría de las células proliferativas son NG2<sup>+</sup>, es decir, son OPCs. La tendencia en los animales mutantes es a presentar un mayor porcentaje de células en fase S NG2<sup>+</sup> que los animales control, siendo esta diferencia significativamente mayor en la CPE (+/+ : 79,6 ± 2,7%; +/*Sey*<sup>DeV</sup>: 95,83 ± 4,17%; p-valor: 0,031) (Figura 5 C). Por lo tanto, los animales heterocigotos presentan una mayor proporción de precursores no neurogénicos NG2<sup>+</sup> en el BOP que los animales control.

### Análisis *in vitro* de los precursores neurogénicos del BOP

Para analizar la otra población proliferativa del BOP, los precursores neurogénicos, decidimos realizar cultivos celulares de precursores (neurosferas), que nos permitieron aislar la población neurogénica y estudiarla en detalle.

### Análisis de la tasa de crecimiento de las neuroesferas

Mediante mediciones del diámetro de las neuroesferas durante todos los días de un pase, observamos que las esferas procedentes del BOP de animales +/Sey<sup>Dey</sup> siempre tienen un diámetro menor que las de las procedentes de animales control. De hecho, en todos los días de medición (2 a 7 DIV), las diferencias en la medida de los diámetros de las esferas son altamente significativas, excepto en el día de pase (7 DIV) (Tabla IX y Figura 6). Esta ausencia de diferencias significativas en el día de pase se debe a que las esferas más pequeñas de los cultivos control presentan un tamaño similar al de las esferas más grandes de los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> y a que, al haber alcanzado la confluencia, los cultivos +/+ han dejado de crecer.

<b>Tabla IX: Seguimiento de los cultivos +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> a lo largo de un pase mediante medidas del diámetro de las esferas.</b>			
	<b>Diámetro +/+ (μm)</b>	<b>Diámetro +/Sey<sup>Dey</sup> (μm)</b>	<b>p-valor/ significación asintótica</b>
<b>2 DIV</b>	42,86 ± 3,63	21,30 ± 1,04	<b>0,001</b> (sig. asint.)
<b>3 DIV</b>	52,74 ± 4,56	29,19 ± 2,80	<b>0,001</b> (p-valor)
<b>4 DIV</b>	68,76 ± 4,83	39,38 ± 1,84	<b>0,001</b> (sig. asint.)
<b>5 DIV</b>	77,60 ± 5,10	46,45 ± 3,21	<b>0,001</b> (sig. asint.)
<b>6 DIV</b>	116,40 ± 10,78	58,99 ± 3,93	<b>0,001</b> (sig. asint.)
<b>7 DIV</b>	123,67 ± 10,80	112,62 ± 8,23	0,418

### Análisis de la tasa proliferativa en células adheridas a sustrato (2 y 4 DIV)

Los análisis de incorporación de BrdU realizados en células disgregadas adheridas a sustrato demostraron que la pérdida de un alelo de Pax6 provoca graves defectos en la proliferación de las CMBOPa en los dos tiempos estudiados. Tras 2 DIV, ambos cultivos presentaron diferencias significativas tanto en el número total de células (+/+ : 100,67 ± 24,19 células en 10 campos; +/Sey<sup>Dey</sup>: 55,67 ± 8,14 células en 10 campos; p-valor: 0,038) como en el número total de células proliferativas (+/+ : 57,33 ± 17,09 células BrdU<sup>+</sup> en 10 campos; +/Sey<sup>Dey</sup>: 11,66 ± 1,54 células BrdU<sup>+</sup> en 10 campos; p-valor: 0,046) (Figura 7 C). De modo que los animales +/+ presentan una tasa proliferativa 2,65 veces mayor que los

animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  ( $+/+$ :  $56,5 \pm 3,47\%$  células  $\text{BrdU}^+$  respecto al total;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $21,36 \pm 4,54\%$ ; p-valor: 0,000) (Figura 7 D). A los 4 DIV, las células de los animales  $+/+$  se distribuyen formando agrupaciones esféricas adheridas al sustrato similares a las neuroesferas que forman al crecer en flotación (Figura 7 A). Sin embargo, las células de los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  están mayoritariamente aisladas unas de otras o, a lo sumo, se disponen formando grupos de muy pocas células (Figura 7 B). Al igual que en los cultivos fijados a los 2 DIV, encontramos diferencias altamente significativas tanto en el número de células totales ( $+/+$ :  $1.203,17 \pm 430,15$  células;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $289,33 \pm 71,27$  células; p-valor: 0,004) como en el número de células  $\text{BrdU}^+$  ( $+/+$ :  $368,5 \pm 144,58$  células  $\text{BrdU}^+$  en 10 campos;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $53,67 \pm 27,36$  células  $\text{BrdU}^+$  en 10 campos; p-valor: 0,004) (Figura 7 C). Además, la tasa proliferativa de las CMBOPa de los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  también está afectada, siendo 1,65 veces menor que la de los animales control ( $+/+$ :  $30,32\%$  células  $\text{BrdU}^+ \pm 2,10$ ;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $18,42\% \pm 7,12$ ; p-valor: 0,01) (Figura 7 D).

Por lo tanto, los animales heterocigotos presentan un déficit en la proliferación de las CMBOPa, que es mayor en los primeros días de cultivo. Estos datos concuerdan con el análisis de la tasa de crecimiento de las neuroesferas mediante la medida de su diámetro detallado en el apartado anterior.

### Análisis de la tasa proliferativa en flotación (7 DIV)

La tasa proliferativa en el día de pase (7 DIV) se estudió mediante la incorporación de  $\text{BrdU}$  en células creciendo en flotación, que se adhirieron a un sustrato (matrigel) minutos antes de su fijación para su análisis mediante inmunofluorescencia y microscopía láser confocal. La media del número de células totales en un plano focal por neuroesfera ( $+/+$ :  $412,07 \pm 38,64$  células;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $69,48 \pm 8,07$  células; significación asintótica: 0,000) y de células  $\text{BrdU}^+$  ( $+/+$ :  $106,84 \pm 9,21$  células  $\text{BrdU}^+$ ;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $30,54 \pm 3,59$  células  $\text{BrdU}^+$ ; significación asintótica: 0,000) es significativamente menor en las neuroesferas  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  que en las  $+/+$  (Figura 8). Sin embargo, el porcentaje de células proliferativas respecto al total es 1,5 veces mayor en los cultivos procedentes de animales heterocigotos que en los control ( $+/+$ :  $28,6 \pm 1,28\%$  de células proliferando;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $42,99 \pm 1,69\%$  de células proliferando; p-valor: 0,000) (Figura 8). Este dato concuerda con el hecho de que a los 7 DIV no encontramos diferencias significativas en la medida del diámetro de las neuroesferas entre animales control y heterocigotos. Es decir, los cultivos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  presentan déficits de proliferación en los primeros días de pase, lo que provoca un retraso en el crecimiento de las esferas. Este retraso y los déficits de proliferación van paulatinamente superándose, conduciendo a que, en el día en que las células  $+/+$  están confluentes (7 DIV)

y, por tanto, el crecimiento de las esferas está atenuado, las neuroesferas  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  continúan creciendo porque aún no han alcanzado la confluencia.

Según el análisis *in vitro* de la proliferación, nuestros resultados indican que los precursores de los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  presentan un déficit inicial de proliferación y una posterior hiperproliferación al comparar su crecimiento con el de los animales  $+/+$ . Nuestros estudios *in vivo* e *in vitro* permiten afirmar que la mutación  $\text{Sey}^{\text{Dey}}$  en heterocigosis, y por lo tanto la haploinsuficiencia de Pax6, afecta a la proliferación de los precursores neurogénicos de la ZSV, la CMR y el BOP, pareciendo favorecer la presencia en el BOP de precursores  $\text{NG2}^+$  en división.

## Análisis de la capacidad de autorrenovación de las CMBOPa

Debido a que la carencia de Pax6 altera la capacidad de autorrenovación de diferentes tipos de células madre durante el desarrollo, estudiamos, mediante análisis clonal, si la capacidad de autorrenovación de los precursores de la neurogénesis adulta estaba alterada en nuestros mutantes heterocigotos. Los cultivos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  no presentan diferencias significativas en cuanto al porcentaje de esferas (con un número de células igual o mayor a 8) formadas a partir de una célula única ( $+/+$ :  $42,24 \pm 5,41$  % de esferas generadas a partir de células únicas;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $34,7 \pm 7,65$  %; p-valor: 0,466) (Figura 9 C, D y G). Sin embargo, una proporción de células únicas  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  dan lugar a grupos de entre 4 y 8 células ( $+/+$ :  $0,51 \pm 0,51$  % grupos de 4 a 8 células;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $13,90 \pm 2,43$  % grupos de 4 a 8 células; p-valor: 0,012) (Figura 9 E y G), o incluso hay células únicas  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  que permanecen vivas y aisladas ( $+/+$ :  $0 \pm 0$  % células aisladas;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $9,79 \pm 1,53$  % células aisladas; p-valor: 0,007) (Figura 9 B, F y G). En la generación de dupletes ( $+/+$ :  $0 \pm 0$  % dupletes;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $2,40 \pm 1,72$  % dupletes; p-valor: 0,259) no se presentan diferencias significativas (Figura 9 G). La proporción de células únicas  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  que generan de 1 a 8 células es, por tanto, menor ( $+/+$ :  $0,51 \pm 0,51$  % menos de 8 células;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $26,09 \pm 4,06$  % menos de 8 células; p-valor: 0,008) (Figura 9 G). Aquellas esferas generadas con un número de células mayor que 8 en los cultivos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  poseían diámetros similares a las generadas en los cultivos control ( $+/+$ :  $74,32 \mu\text{m} \pm 6,27$ ;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $75,22 \mu\text{m} \pm 5,64$ ; p-valor: 0,916) (Figura 9 C y D). Estos datos ponen de manifiesto que si bien algunas células únicas  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  son precursores capaces de dividirse de manera similar a las células control, su capacidad de autorrenovación se ve afectada de forma variable, ya que algunas células se dividen un número reducido de veces o permanecen vivas sin llegar a dividirse (Figura 9).

## Análisis de la diferenciación de las células generadas

Pax6 es necesario durante el desarrollo embrionario para la diferenciación neuronal en general y de algunos subtipos de neuronas en particular. Además, el análisis de su participación en la neurogénesis adulta realizado por otros grupos de investigación ha puesto de manifiesto que es necesario para la diferenciación de algunos tipos de interneuronas del BOP, como PGs dopaminérgicas y granos superficiales. Por ello, decidimos analizar en profundidad los efectos de la haploinsuficiencia de Pax6 en distintos parámetros relacionados con la diferenciación tanto *in vivo*, para conocer la llegada de células de nueva generación al BOP (recuentos de células BrdU<sup>+</sup> tras 15 días de supervivencia después de la inyección), como *in vitro*, para conocer el potencial de diferenciación de las células haploinsuficientes para Pax6.

### Análisis *in vivo* de la incorporación de células en el BOP

A los 15 días de las inyecciones de BrdU, encontramos células de nueva generación (BrdU<sup>+</sup>) en la ZSV, CMR y en el BOP. Debido a la metodología empleada, las células observadas en la ZSV y CMR pueden haberse dividido 15 días antes del sacrificio del animal o pueden ser descendientes de células que se dividieron en ese momento. Además, tampoco podemos saber si se trata de células residentes en la región en la que las encontramos o, por el contrario, son células en migración. Por ello, la presencia de diferencias en el número de células BrdU<sup>+</sup> en la ZSV y la CMR de animales *+/+* y *+/Sey<sup>Dey</sup>* nos puede indicar bien alteraciones en la proporción de células residentes en la región analizada, bien defectos de migración de los progenitores. La estimación del número total de células BrdU<sup>+</sup> no demostró diferencias significativas entre ambos grupos de animales en la ZSV (*+/+*: 1373,26 ± 231,63 células BrdU<sup>+</sup>; *+/Sey<sup>Dey</sup>*: 1480,50 ± 200,71 células BrdU<sup>+</sup>; p-valor: 0,739). La comparación entre los distintos niveles rostro-caudales de la ZSV de ambos grupos de animales tampoco demostró diferencias significativas en la densidad de células BrdU<sup>+</sup> (Figura 10 A).

En la CMR de los animales *+/+* se encuentra un número significativamente mayor de células BrdU<sup>+</sup> que en la CMR de los animales *+/Sey<sup>Dey</sup>* (*+/+*: 405,67 ± 70,16 células BrdU<sup>+</sup> estimadas; *+/Sey<sup>Dey</sup>*: 172,55 ± 31,8 células BrdU<sup>+</sup>; p-valor: 0,006) (Figura 10 B). Estudiando la distribución rostro-caudal de las células, es decir, su densidad en los diferentes niveles de estudio, identificamos que ésta era significativamente menor en el nivel medial de la CMR de los animales *+/Sey<sup>Dey</sup>* (*+/+*: 788,12 ± 146,48 células BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; *+/Sey<sup>Dey</sup>*: 196,95 ± 57,96 células BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,002) (Figura 10 C-E). Atribuimos el menor número de células estimadas en la CMR de los animales *+/Sey<sup>Dey</sup>* a un descenso de las células proliferativas localizadas de forma específica en el nivel medial, poniendo estos resultados en relación con que, en los animales heterocigotos, existe un menor número de

## RESULTADOS

células proliferativas que expresan Pax6 en este nivel de estudio, y descartamos por tanto que este resultado se deba a una alteración de la migración de los precursores.

Posteriormente a estos análisis, evaluamos distintos parámetros con respecto a la presencia de células de nueva generación en el BOP a los 15 días de la inyección de BrdU, tales como el número total de células estimadas BrdU<sup>+</sup> en el BOP y en cada una de sus capas, la distribución rostro-caudal de las células de nueva generación en los 3 niveles bulbares de estudio (BOP-R, BOP-M, BOP-C) y la proporción de nuevas células presente en cada una de las capas del BOP respecto al total de células generadas. Con el estudio de estos parámetros queríamos analizar si Pax6 regula la llegada, distribución y diferenciación de las células de nueva generación.

El número total de células BrdU<sup>+</sup> en el BOP es significativamente menor en los animales +/-Sey<sup>Dey</sup> que en los animales control (+/+ : 24.731,43 ± 1.559,64 células BrdU<sup>+</sup>; +/-Sey<sup>Dey</sup>: 16.755,48 ± 1.184,82 células BrdU<sup>+</sup>; p-valor: 0,001), con una reducción en la incorporación celular del 32%, equivalente a la pérdida de volumen del BOP observada en estos animales. Desglosando la cantidad estimada de células de nueva generación por capas bulbares, encontramos diferencias significativas en todas ellas, excepto en la CPE (Tabla X).

<b>Tabla X: Estimación del número de células de nueva generación tras 15 días de inyección de BrdU en las capas del BOP.</b>				
	<b>+/+</b>	<b>+/-Sey<sup>Dey</sup></b>	<b>p-valor</b>	<b>Reducción</b>
<b>CG</b>	2640,89 ± 212,27	1536,10 ± 145,65	0,001	42%
<b>CPE</b>	1132,28 ± 170,33	802,12 ± 89,33	0,09	Sin diferencias
<b>CI</b>	20.958,26 ± 1372,73	14.417,26 ± 1203,18	0,004	31%

El análisis de la distribución rostro-caudal de las células BrdU<sup>+</sup> en los diferentes niveles de estudio del BOP (BOP-C, BOP-M y BOP-R) mediante la comparación de las densidades de cada uno de los niveles, tanto en todo el BOP como en cada una de las capas, demostró que, en este parámetro, no existían diferencias significativas entre los animales heterocigotos para Pax6 y los control. Este dato indica que en los animales +/-Sey<sup>Dey</sup>, las células no se acumulan en ningún nivel rostro-caudal de estudio y, por tanto, no parece verse afectada la capacidad de migración rostro-caudal por la pérdida de un alelo para Pax6.

Para conocer si las células de nueva generación de los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  se distribuían en las capas del BOP de manera equivalente a los animales control, es decir, si Pax6 regula aspectos de la migración radial en el BOP, calculamos el porcentaje del número de nuevas células en cada una de las capas respecto a las células BrdU<sup>+</sup> estimadas en la totalidad del BOP. Nuestros datos indican que Pax6 no parece estar regulando la migración radial, ya que no observamos diferencias significativas en ninguna de las capas bulbares (Tabla XI).

<b>Tabla XI: Análisis de la migración radial de las células de nueva generación en el BOP según el porcentaje de contribución de las células de cada capa al total de células estimadas en el BOP.</b>			
	<b>+/+</b>	<b>+/<math>\text{Sey}^{\text{Dey}}</math></b>	<b>p-valor</b>
<b>CG</b>	10,67 ± 0,48 %	9,56 ± 1,08 %	0,419
<b>CPE</b>	4,61 ± 0,69 %	4,89 ± 0,62 %	0,770
<b>CI</b>	84,72 ± 1,06 %	85,55 ± 1,3 %	0,647

### Análisis *in vitro* de la diferenciación a astrocitos, oligodendrocitos y neuronas

A partir de la región neurogénica ZSV-CMR-BOP se producen fundamentalmente neuronas. Esta circunstancia, unida a los déficits de proliferación y de llegada de células al BOP en los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  y a la presencia de OPCs en el BOP (además de precursores neurogénicos) hacían especialmente difícil analizar el potencial de diferenciación de los precursores haploinsuficientes para Pax6 *in vivo*, por lo que decidimos analizar este parámetro *in vitro* estudiando la capacidad de diferenciación de las CMBOPa a astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. Para ello, realizamos recuentos de células positivas para TUJ1 (neuronas), O4 (oligodendrocitos) y GFAP (astrocitos) en células  $+/+$  y  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  sembradas en condiciones de diferenciación durante 1 y 2 DIV.

La generación de **neuronas** TUJ1<sup>+</sup> se ve afectada en los cultivos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  de forma muy temprana, ya que tanto el número de neuronas ( $+/+$ : 13,34 ± 1,86 células TUJ1<sup>+</sup> en 10 campos;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ : 3 ± 2 células TUJ1<sup>+</sup> en 10 campos; p-valor: 0,019) como el porcentaje de neuronas generadas ( $+/+$ : 6 ± 0,98 % células TUJ1<sup>+</sup> respecto al total de células;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ : 1,12 ± 0,59% células TUJ1<sup>+</sup> respecto al total; p-valor: 0,013) disminuye a 1 DIV. Estos resultados se siguen manteniendo a los 2 DIV, cuando también obtenemos un menor porcentaje de neuronas en los cultivos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  ( $+/+$ : 19,37 ± 3,8% células TUJ1<sup>+</sup> respecto al total;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ : 18,75 ± 2,04% células TUJ1<sup>+</sup> respecto al total; p-valor: 0,05) (Figura 11 A, D, G, H, I y L).

## RESULTADOS

También se ve afectada drásticamente la generación de **oligodendrocitos** a partir de CMBOPa +/Sey<sup>DeY</sup>. A 1 DIV, obtenemos diferencias significativas tanto en el número de oligodendrocitos (+/+ :  $6 \pm 0,71$  células O4<sup>+</sup> en 10 campos; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $1,5 \pm 0,64$  células O4<sup>+</sup> en 10 campos; p-valor: 0,003) como en el porcentaje de oligodendrocitos generados (+/+ :  $2,19 \pm 0,47\%$  células O4<sup>+</sup> respecto al total; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $0,57 \pm 0,22\%$  células O4<sup>+</sup>; p-valor: 0,021). Estas diferencias se siguen manteniendo a los 2 DIV en los dos parámetros analizados (+/+ :  $14 \pm 1,53$  células O4<sup>+</sup> en 10 campos; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $2,34 \pm 0,67$  células O4<sup>+</sup> en 10 campos; p-valor: 0,002; +/+ :  $5,9 \pm 1,07\%$  células O4<sup>+</sup> respecto al total de células; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $0,71 \pm 0,21\%$  células O4<sup>+</sup> respecto al total; p-valor: 0,009) (Figura 11 B, E, G, H, J y M).

Por el contrario, la generación de **astrocitos** no se ve afectada ni a 1 DIV (+/+ :  $30,94 \pm 8,03\%$  células GFAP<sup>+</sup>; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $51,27 \pm 4,64\%$  células GFAP<sup>+</sup>; p-valor: 0,083) ni a 2 DIV (+/+ :  $43,4 \pm 8,48\%$  células GFAP<sup>+</sup>; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $66,52 \pm 10,14\%$  células GFAP<sup>+</sup>; p-valor: 0,131) (Figura 11 C, F, G, H, K y N), aunque los cultivos de heterocigotos tienden a tener una mayor proporción de astrocitos que los cultivos control .

Resumiendo, en ausencia de un alelo de Pax6 se produce un déficit muy temprano en la diferenciación hacia oligodendrocitos y neuronas, mientras que la población de astrocitos no se ve afectada.

### Análisis *in vitro* de la diferenciación a subtipos de interneuronas del BOP

Debido a que tanto la proliferación como la llegada de células de nueva generación están reducidas en los animales +/Sey<sup>DeY</sup> y a que esto podría estar enmascarando posibles diferencias en la generación de subtipos de interneuronas respecto a los animales control, decidimos llevar a cabo el análisis de la diferenciación, a partir de CMBOPa, a subtipos bulbares de interneuronas *in vitro*. De esta manera, al sembrar un número equivalente de células en ambos cultivos, pudimos analizar la influencia de Pax6 en el potencial de diferenciación de los precursores, sin interferencia de sus funciones en la proliferación de los precursores. Otros autores han descrito la relevancia de Pax6 en la diferenciación de PGs dopaminérgicas y en la formación de un tipo de granos, pero el BOP se caracteriza por presentar una gran variedad neuroquímica de poblaciones de interneuronas. Por ello, decidimos analizar con más profundidad el posible efecto de la haploinsuficiencia de Pax6 en la generación de los principales subtipos neuroquímicos de interneuronas del BOP (CB, CCK, CR, NOSn y TH). Además, para comprobar el potencial para generar neuronas en las condiciones de siembra que favorecen la diferenciación neuronal, utilizamos **MAP2** como marcador neuronal genérico. Encontramos que, en los cultivos +/Sey<sup>DeY</sup>, se produce un descenso altamente significativo tanto en el número de neuronas generadas (+/+ :  $117,87 \pm$

14,98 células MAP2<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $18 \pm 2,75$  células MAP2<sup>+</sup>; significación asintótica 0,000), como en la proporción de neuronas generadas respecto al total de células (+/+ :  $30,77 \pm 4,44\%$  MAP2<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $6,30 \pm 0,75 \%$  MAP2<sup>+</sup>; significación asintótica 0,000) (Figura 13 F).

Respecto a las poblaciones neuroquímicas concretas, en los cultivos control se generan células **CB**<sup>+</sup> con diferentes morfologías, aunque la mayor parte de ellas tienen una o dos dendritas principales (Figura 12 A). Sin embargo, en los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> se generan células CB<sup>+</sup> de aspecto estrellado y con ramificaciones muy cortas (Figura 12 B). Además de los cambios morfológicos, en los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> se produce tanto un déficit de generación de células CB<sup>+</sup> (+/+ :  $34 \pm 5,2$  células CB<sup>+</sup> en 10 campos; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $2,5 \pm 1,2$  células CB<sup>+</sup> en 10 campos; significación asintótica 0,000) como un menor porcentaje de este tipo celular respecto al total de células (+/+ :  $8,78 \pm 1,32\%$ ; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $0,67 \pm 0,34 \%$ ; significación asintótica 0,000) (Figura 13 E).

Las células **CCK**<sup>+</sup> en cultivos +/+ son grandes y con 3 ó 4 dendritas principales ramificadas (Figura 12 C). En los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> estas células CCK<sup>+</sup> presentan menos dendritas y sus procesos son más cortos (Figura 12 D). Además, también se reduce muy significativamente la generación de este tipo celular, medida como número de células CCK<sup>+</sup> (+/+ :  $35 \pm 1$  células CCK<sup>+</sup> en 10 campos; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $4,5 \pm 1,5$  células CCK<sup>+</sup> en 10 campos; significación asintótica 0,003), y también como porcentaje de células CCK<sup>+</sup> respecto al total de células (+/+ :  $8,25 \pm 1,12\%$ ; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $1,30 \pm 0,12\%$ ; significación asintótica 0,007) (Figura 13 E).

En los cultivos +/+ se generan células **CR**<sup>+</sup> con 2 o 3 prolongaciones (Figura 12 E) mientras que en los +/Sey<sup>Dey</sup> la generación de células CR<sup>+</sup> es prácticamente nula (Figura 12 F) (+/+ :  $30 \pm 5,1$  células CR<sup>+</sup> en 10 campos; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $0,5 \pm 0,5$  células CR<sup>+</sup> en 10 campos; significación asintótica 0,000). Al igual que para las otras poblaciones neuroquímicas estudiadas, la proporción de células CR<sup>+</sup> generadas respecto al total es significativamente menor en los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> que en los control (+/+ :  $8,94 \pm 1,76 \%$ ; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $0,18 \pm 0,18 \%$ ; significación asintótica 0,000) (Figura 13 E).

El estudio de las células nitrérgicas (**NOSn**<sup>+</sup>) demostró que en los cultivos control presentan varias morfologías, hay células pequeñas con pocas prolongaciones y otras más grandes con 3 ó 4 dendritas principales ramificadas (Figura 13 A). En los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> no se observan células NOSn<sup>+</sup> (+/+ :  $44,5 \pm 4,83$  células NOSn<sup>+</sup> en 10 campos; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $0 \pm 0$  células NOSn<sup>+</sup> en 10 campos; significación asintótica 0,000) (Figura 13 E).

El último marcador estudiado demostró que la generación de células dopaminérgicas también está alterada en ausencia de un alelo para Pax6. En los cultivos +/+ se generan células **TH**<sup>+</sup> (dopaminérgicas) muy ramificadas (Figura 13 C) y en los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> no se

## RESULTADOS

genera ninguna célula TH<sup>+</sup> (Figura 13 D) (+/+ : 44,5 ± 3,36 células TH<sup>+</sup>; +/Sey<sup>DeY</sup>: 0 ± 0 células TH<sup>+</sup>; significación asintótica 0,000) (Figura 13 E).

Estos datos demuestran que la capacidad para generar neuronas en general, y de cada subtipo en particular, está comprometida en ausencia de un alelo de Pax6, siendo las subpoblaciones de interneuronas más severamente afectadas las TH<sup>+</sup>, NOSn<sup>+</sup> y CR<sup>+</sup>.

### Análisis *in vivo* de la diferenciación a subtipos de interneuronas del BOP

Tras comprobar la existencia de diferencias significativas en la incorporación de células de nueva generación en el BOP, y en la diferenciación a distintos subtipos neuroquímicos de interneuronas *in vitro*, nos centramos en analizar el fenotipo de las células de nueva generación *in vivo*. Para ello, realizamos inmunofluorescencias dobles de BrdU con distintos marcadores (CB, CR, NeuN, Pax6 y TH), para conocer si la haploinsuficiencia de Pax6 afecta a la diferenciación de algún subtipo neuroquímico específico de interneurona del BOP. Además, el uso de dos tiempos diferentes de supervivencia tras las inyecciones de BrdU (15 y 60 días), nos permitieron conocer si alguna de las poblaciones tiene una diferenciación más tardía en los animales +/Sey<sup>DeY</sup> o si su supervivencia se ve afectada por la mutación. Por otra parte, ya que utilizamos porcentajes para evaluar el potencial de diferenciación de las células y que nuestros resultados demuestran que existe una menor incorporación de nuevas células en el BOP, analizamos la densidad de células positivas a los marcadores (CB, CCK, CR, NeuN, NOSn, Pax6 y TH) realizando en los animales mutantes una corrección para compensar la pérdida de volumen, para conocer si alguna de las poblaciones neuroquímicas de interés estaba afectada en los animales heterocigotos.

La población de neuronas positivas para **Pax6** en el BOP se corresponde con la población de PGs dopaminérgicas (TH<sup>+</sup>), una subpoblación de PGs CB<sup>+</sup> y CR<sup>+</sup> (Hack *et al.*, 2005; Baltanás *et al.*, 2009) y una amplia población de granos. A los 15 días de la inyección, tanto en los animales control como en los heterocigotos, prácticamente todas las células de nueva generación (células BrdU<sup>+</sup>) expresan Pax6, tanto en la CG (+/+ : 98,33 ± 1,67 % células de nueva generación Pax6<sup>+</sup>; +/Sey<sup>DeY</sup>: 96,30 ± 3,70 % células de nueva generación Pax6<sup>+</sup>; p-valor: 0,642) (Figura 14 A-C) como en la CGr (+/+ : 100 ± 0 % células de nueva generación Pax6<sup>+</sup>; +/Sey<sup>DeY</sup>: 100 ± 0 % células de nueva generación Pax6<sup>+</sup>) (Figura 15 A-C). Debido a que la práctica totalidad de las células de nueva generación a los 15 de la inyección de BrdU expresan Pax6 y a que los animales heterocigotos presentan un número de células de nueva generación en el BOP significativamente menor que los animales control

en este tiempo de inyección, podemos inferir que la incorporación de células Pax6<sup>+</sup> se ve reducida en los animales +/Sey<sup>Dey</sup>. Sin embargo, a los 60 días este porcentaje de colocalización se reduce en ambos grupos experimentales, no encontrándose diferencias entre los grupos, ni en la CG (+/+ : 73,38 ± 7,78 % células de nueva generación Pax6<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 72,22 ± 7,35 % células de nueva generación Pax6<sup>+</sup>; p-valor: 0,919) (Figura 14 C) ni en la CGr (+/+ : 22,39 ± 4,45 % células de nueva generación Pax6<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 48,54 ± 17,93 % células de nueva generación Pax6<sup>+</sup>; p-valor: 0,279) (Figura 15 C). Nuestros resultados indican que Pax6 parece ser más importante en las primeras etapas de la diferenciación neuronal que en las más tardías, ya que las células de nueva generación a los 60 días de la inyección de BrdU colocalizan en menor proporción con Pax6. Aún así, un porcentaje de las células de nueva generación conserva la expresión de Pax6 a los 60 días de su generación. Estas nuevas interneuronas son ya células maduras, por lo que Pax6 podría estar ejerciendo alguna función desconocida en ellas.

Respecto al número de células Pax6<sup>+</sup> de nueva generación (células Pax6<sup>+</sup> que son BrdU<sup>+</sup>) a los 15 días de la inyección, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ni en la CG (+/+ : 3,1 ± 0,28 % células Pax6<sup>+</sup> de nueva generación; +/Sey<sup>Dey</sup>: 2,12 ± 0,35 % células Pax6<sup>+</sup> de nueva generación; p-valor: 0,098) (Figura 14 A, B, D) ni en la CGr (+/+ : 3,78 ± 0,28 % granos Pax6<sup>+</sup> de nueva generación; +/Sey<sup>Dey</sup>: 2,83 ± 0,73 % granos Pax6<sup>+</sup> de nueva generación; p-valor: 0,297) (Figura 15 A, B, D). A los 60 días de la inyección de BrdU tampoco existen diferencias significativas ni en la CG (+/+ : 1,28 ± 0,42 % células Pax6<sup>+</sup> de nueva generación; +/Sey<sup>Dey</sup>: 3,01 ± 0,72 % células Pax6<sup>+</sup> de nueva generación; p-valor: 0,108) (Figura 14 D) ni en la CGr (+/+ : 0,74 ± 0,09 % granos Pax6<sup>+</sup> de nueva generación; +/Sey<sup>Dey</sup>: 2,57 ± 0,83 % granos Pax6<sup>+</sup> de nueva generación; p-valor: 0,123) (Figura 15 D).

A pesar de que no existen diferencias significativas en ninguno de los casos entre ambos genotipos, la tendencia temporal de las células Pax6<sup>+</sup> de nueva generación es negativa (el número de células Pax6/BrdU doble positivas se reduce a lo largo del tiempo) en los animales control, mientras que es positiva (aumenta a lo largo del tiempo) en el caso de los heterocigotos, tanto en la CG (Figura 14 D) como en la CGr (Figura 15 D). Estas diferencias de tendencia podrían indicar cambios en la supervivencia de las células Pax6<sup>+</sup>, aunque también existe otra posibilidad de interpretación. Para esta segunda interpretación también hay que tener en cuenta que a los 15 días de la inyección, casi todas las células de nueva generación tanto en la CG como en la CGr expresan Pax6 y que este porcentaje de colocalización disminuye en el caso de las inyecciones de 60 días de supervivencia (Figura 14 C y Figura 15 C). Teniendo en cuenta todos estos datos, proponemos que la expresión de Pax6 cae en las nuevas células según estas maduran, aunque una proporción de ellas conserve la expresión de este factor de transcripción. Debido a que la tendencia temporal del número de células Pax6<sup>+</sup> de nueva generación en los glomérulos y los granos está

## RESULTADOS

invertida en los animales heterocigotos (Figura 14 D y Figura 15 D), podría existir un defecto o retraso en la maduración de las células, además de cambios que favorecieran su supervivencia.

Por otra parte, analizamos la densidad de las células Pax6<sup>+</sup> en la CG y CGr, encontrando reducciones significativas en este parámetro tanto en la CG (+/+ : 1800,89 ± 229,51 células Pax6<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 907,96 ± 197,34 células Pax6<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,01) (Figura 14 A, B y E) como en la CGr de animales +/Sey<sup>Dey</sup> (+/+ : 2447,45 ± 211,14 células Pax6<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 1479,77 ± 201,61 células Pax6<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,007) (Figura 15 A, B y E).

Otro de los marcadores que hemos estudiado es **NeuN**, que se expresa en una pequeña población de células en la CG y en muchos granos. Tras 15 días de inyección de BrdU los animales +/Sey<sup>Dey</sup> tienen una proporción significativamente menor de células NeuN<sup>+</sup> de nueva generación en la capa glomerular (+/+ : 4,5 ± 0,44 % células NeuN<sup>+</sup> de nueva generación; +/Sey<sup>Dey</sup>: 2,03 % ± 0,75 células NeuN<sup>+</sup> de nueva generación; p-valor: 0,046), por lo que su generación estaría disminuida. Esta disminución del porcentaje de colocalización no se observa tras dos meses de inyección (Figura 16 A-D), por lo que la supervivencia de las células NeuN<sup>+</sup> se vería favorecida o su maduración podría estar retrasada en los animales heterocigotos respecto a los animales control. Al igual que sucede en la CG, la capa de los granos de los animales heterocigotos presenta, a los 15 post-inyección, una menor proporción de granos NeuN<sup>+</sup> de nueva generación (+/+ : 2,81 ± 0,24 % células NeuN<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 1,89 ± 0,18 % células NeuN<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>; p-Valor: 0,04), aunque la proporción de células BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> no se vea alterada. Estas diferencias no están presentes a los 60 días postinyección (Figura 17 A-D).

Las pendientes de la representación de los porcentajes de células NeuN<sup>+</sup> de nueva generación a los 15 y 60 días de animales +/+ y animales +/Sey<sup>Dey</sup> indican que la pendiente en los animales heterocigotos es menos negativa que la de los animales +/+, tanto en la CG como en la CGr (Figura 16 D y Figura 17 D) por lo que la pérdida de un alelo de Pax6 puede estar alterando la supervivencia de esta población celular o modificando la maduración de las nuevas interneuronas, en consonancia con los resultados obtenidos del análisis de los porcentajes de colocalización.

La densidad de células NeuN<sup>+</sup> en la CG no presenta diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (+/+ : 195,15 ± 12,63 células NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 200,58 ± 25,27 células NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,336) (Figura 16 E). Por el contrario, la densidad corregida de granos NeuN<sup>+</sup> es significativamente menor en los animales heterocigotos respecto a los animales control (+/+ : 1383,51 ± 105,31 células NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 1048,17 ± 24,41 células NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,036) (Figura 17 E).

La población de interneuronas del BOP que expresa **CB** son exclusivamente PGs. El porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> que coexpresan CB a los 15 (+/+ : 36,07 ± 6,28 %; +/Sey<sup>Dey</sup>: 32,93 ± 5,58 %; p-valor: 0,728) y 60 días post-inyección (+/+ : 33,09 ± 6,77 %; +/Sey<sup>Dey</sup>: 41,5 ± 8,36%; p-valor: 0,447) no presenta diferencias significativas entre animales control y mutantes, a pesar de que la proporción de células BrdU<sup>+</sup>/CB<sup>+</sup> en los animales +/+ permanece estable mientras que en los animales +/Sey<sup>Dey</sup> tiende a incrementarse a lo largo del tiempo (Figura 15 A). A los 15 días de la inyección de BrdU, el porcentaje de PGs CB<sup>+</sup> de nueva generación tampoco presenta diferencias entre animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> (+/+ : 2,82 ± 0,21 %; +/Sey<sup>Dey</sup>: 8,81 ± 4,84 %; p-valor: 0,513) (Figura 18 B, D y E). Sin embargo, a los 60 días de la inyección de BrdU los animales +/Sey<sup>Dey</sup> muestran un incremento altamente significativo en la proporción de células CB<sup>+</sup> de nueva generación respecto a los animales control (+/+ : 1,44 ± 0,31 %; +/Sey<sup>Dey</sup>: 3,29 ± 0,72 %; p-valor: 0,009) (Figura 18 B, D y E). Aún así, no podemos afirmar que la supervivencia de las PGs CB<sup>+</sup> esté favorecida en los heterocigotos, ya que el valor de colocación a los 15 días es mayor en éstos que en los controles y, al representar gráficamente ambos valores, la pendiente de la recta es mucho más negativa que la de los animales control. Es decir, la diferencia en el número de PGs CB<sup>+</sup> de nueva generación a los 15 y 60 días de la inyección es mayor en los ratones heterocigotos que en los controles, por lo que su supervivencia podría verse disminuida (Figura 18 B).

Por otra parte, la densidad de células CB<sup>+</sup> en la CG de los animales +/Sey<sup>Dey</sup> es menor que la observada en los animales control (+/+ : 342,33 ± 8,18 células CB<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 167,04 ± 19,58 células CB<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,001), por lo que la diferenciación de neuroblastos a PGs CB<sup>+</sup> parece estar reducida por la mutación Sey<sup>Dey</sup> (Figura 18 C-E).

El bajo número de células **CCK**<sup>+</sup> dificulta la cuantificación de su colocación con BrdU, por lo que decidimos analizar únicamente la densidad de células positivas para este marcador en la CG. Al igual que ocurre con los otros marcadores analizados, la densidad de células CCK<sup>+</sup> es inferior en los animales heterocigotos para Pax6 respecto a los animales control (+/+ : 123,44 ± 2,75 células CCK<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 58,4 ± 2,9 células CCK<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,000). Dentro de las poblaciones de interneuronas que expresan este marcador, tanto las PGs CCK<sup>+</sup> (+/+ : 34,06 ± 1,51 PGs CCK<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 11,13 ± 1,32 PGs CCK<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,000), como las células empenachadas externas CCK<sup>+</sup> (+/+ : 89,38 ± 3,81 empenachadas externas CCK<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 47,27 ± 1,83 empenachadas externas CCK<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,001) se encuentran reducidas en los animales heterocigotos, por lo que la generación de estos tipos de interneuronas parece verse afectada por la mutación. (Figura 19 A-C).

## RESULTADOS

La población **NOSn<sup>+</sup>**, las células productoras de óxido nítrico, se localizan en todas las capas del BOP, siendo especialmente abundante en la CG. En esa capa, las células positivas son células PGs, células superficiales de axón corto y células empenachadas externas. Debido a problemas con el doble marcaje NOSn-BrdU, decidimos analizar esta población evaluando únicamente la densidad de los elementos positivos. Encontramos una densidad menor de células NOSn<sup>+</sup> en la CG de animales +/Sey<sup>Dey</sup> respecto a la densidad control (+/+ : 325,25 ± 39,5 células NOSn<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 182,54 ± 6,74 células NOSn<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,031) (Figura 19 D-F).

La adquisición del fenotipo dopaminérgico (células **TH<sup>+</sup>**) por parte de las células de nueva generación del BOP es tardía (Kowhi *et al.*, 2005). De hecho, nuestros análisis revelaron que a los 15 días post-inyección no existían células TH<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>, por lo que únicamente realizamos el análisis cuantitativo de la generación de estas dos poblaciones glomerulares positivas a TH (PGs y SACs) con el grupo de animales de 60 días de supervivencia. Además, en ninguno de los casos estudiados se encontraron SAC TH<sup>+</sup> que fueran de nueva generación (Figura 20 A-B).

En los animales +/Sey<sup>Dey</sup>, existe una disminución significativa de células de nueva generación que son PGs TH<sup>+</sup> (+/+ : 48,93 ± 11,86 %; +/Sey<sup>Dey</sup>: 6,46 ± 1,7 %; p-valor: 0,024). Sin embargo, la proporción de PGs TH<sup>+</sup> que contienen marcaje de BrdU no varía entre animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> (+/+ : 4,75 % ± 0,89; +/Sey<sup>Dey</sup>: 9,79 % ± 2,25; p-valor: 0,106) (Figura 20 A-D). Estos resultados indican que la población de células de nueva generación en los animales +/Sey<sup>Dey</sup> contiene un número menor de células TH<sup>+</sup>, aunque la población de células dopaminérgicas en el BOP de los animales +/Sey<sup>Dey</sup> tiene una tasa de recambio o renovación de la población similar a la de los animales +/+, por lo que, una vez formadas, las PGs TH<sup>+</sup> de los animales +/Sey<sup>Dey</sup> sobreviven en iguales condiciones que las de los animales control.

En cuanto a la densidad de células TH<sup>+</sup> en la CG, analizando las dos poblaciones de células dopaminérgicas y aplicando el factor de corrección para la pérdida de volumen, encontramos diferencias altamente significativas entre genotipos. Los animales +/Sey<sup>Dey</sup> tienen una densidad de células dopaminérgicas en los glomérulos mucho menor que los control (+/+ : 284,29 ± 25,02 células TH<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 38,18 ± 10,94 células TH<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,001) (Figura 20 A, B y E). Estas diferencias son debidas a variaciones en la incorporación de PGs dopaminérgicas (+/+ : 270,52 ± 25,8 PGs TH<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 16,37 ± 7,49 PGs TH<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,001), puesto que la densidad de SAC TH<sup>+</sup> corregida no varía entre ambos grupos experimentales (+/+ : 13,77 ± 2,04 SAC TH<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 21,81 ± 3,45 SAC TH<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,115) (Figura 20 A, B y E).

La **CR** se expresa en el BOP en una subpoblación de células PGs y en los granos situados en la parte más superficial de su capa. A los 15 y 60 días de la inyección de BrdU, el porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> que coexpresan CR en la CG de los animales +/Sey<sup>Dey</sup> no presenta diferencias significativas respecto a los animales control (15d +/+ : 37,02 ± 4,51 %; 15d +/Sey<sup>Dey</sup>: 38,98 ± 7,59%, p-valor: 0,835; 60d +/+ : 39,61 ± 7,96 %; 60d +/Sey<sup>Dey</sup>: 36,48 ± 4,01%; p-valor: 0,743). A los 15 días de la inyección de BrdU, la proporción de células CR<sup>+</sup> que coexpresan BrdU en los animales +/Sey<sup>Dey</sup> tampoco presenta diferencias significativas con los animales +/+ (+/+ : 1,43 ± 0,06%; +/Sey<sup>Dey</sup>: 1,59 ± 0,31%, p-valor: 0,637). Sin embargo, a los 60 días de la inyección, la proporción de PGs CR<sup>+</sup> de nueva generación es significativamente mayor en los animales +/Sey<sup>Dey</sup> que en los animales control (+/+ : 0,77 ± 0,02%; +/Sey<sup>Dey</sup>: 0,99 ± 0,06%; p-valor: 0,026). Representando los valores de células CR<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>, la diferencia cronológica (representada por la pendiente de la línea entre el número de células doble positivas a los 15 y 60 días tras la inyección) en animales +/Sey<sup>Dey</sup> es similar a la de animales +/+, por lo que no podemos afirmar que la supervivencia de esta población se vea favorecida en los animales +/Sey<sup>Dey</sup> (Figura 21 A-D).

Analizando la densidad de PGs CR<sup>+</sup>, observamos que ésta es significativamente menor en los animales heterocigotos (+/+ : 1097,68 ± 44,89 células CR<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 622,9 ± 40,91 células CR<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,001), por lo que la generación de PGs CR<sup>+</sup> se ve comprometida en ausencia de Pax6 (Figura 21 A, B y E).

Los análisis de colocalización de BrdU y CR en la capa de los granos no resultan en diferencias significativas, ni en el porcentaje de granos BrdU<sup>+</sup> que coexpresan CR (15d +/+ : 20,30 ± 2,61% granos de nueva generación CR<sup>+</sup>; 15d +/Sey<sup>Dey</sup>: 22,50 ± 2,72% granos de nueva generación CR<sup>+</sup>; p-valor: 0,592; 60d +/+ : 20,10 ± 2,53% Granos BrdU<sup>+</sup>/CR<sup>+</sup>; 60d +/Sey<sup>Dey</sup>: 16,53 ± 1,26% Granos BrdU<sup>+</sup>/CR<sup>+</sup>; p-valor: 0,275) ni en el porcentaje de granos CR<sup>+</sup> que son de nueva generación (BrdU<sup>+</sup>) (15d +/+ : 2,47 ± 0,19% Granos CR<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>; 15d +/Sey<sup>Dey</sup>: 3,69 ± 1,19% Granos CR<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>; p-valor: 0,275; 60d +/+ : 2,04 ± 0,31% Granos CR<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>; 60d +/Sey<sup>Dey</sup>: 2,15 ± 0,29% Granos CR<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>; p-valor: 0,812) (Figura 22 A-D)

Al igual que observamos para el resto de poblaciones, la densidad de granos CR<sup>+</sup> es significativamente menor en los animales +/Sey<sup>Dey</sup> respecto a los control, por lo que se están generando menos granos CR<sup>+</sup> (+/+ : 472,34 ± 18,11 células CR<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 405,91 ± 15,35 células CR<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>, p-valor: 0,049) (Figura 22 A, B y E).

Los resultados de los análisis de diferenciación muestran que en el BOP de los animales +/Sey<sup>Dey</sup> se está incorporando un número menor de células de nueva generación tanto en la CG como en la CGr. Los análisis *in vitro* de la diferenciación dan como resultado una menor generación de oligodendrocitos y neuronas en los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup>, y de todos

los subtipos neuroquímicos de interneuronas analizados, especialmente de células TH y NOSn positivas. Los resultados *in vivo* apoyan los obtenidos *in vitro*, ya que los animales +/-Sey<sup>Dey</sup> presentan una menor densidad de todas las poblaciones de interneuronas analizadas, tanto en la CG como en la CGr, a excepción de dos poblaciones que no presentan diferencias (SACs TH<sup>+</sup> y células de la CG NeuN<sup>+</sup>). Además, a los 15 días de la inyección de BrdU ninguno de los porcentajes de colocalización con BrdU se ve incrementado en los animales heterocigotos respecto a los control y la llegada de células de nueva generación al BOP es menor en estos animales, por lo que la generación de todos los tipos neuroquímicos analizados está afectada por la falta de un alelo de Pax6. A los 60 días de la inyección, cuando no hay cambios en el número de células de nueva generación entre genotipos, encontramos una mayor proporción de células CB<sup>+</sup> y CR<sup>+</sup> en la CG. Aun así, no podemos afirmar que la supervivencia de estas poblaciones se vea favorecida en los animales heterocigotos debido a que presentan tendencias temporales muy negativas al comparar las proporciones de colocalización a los 15 y 60 días de la inyección, respecto a las de los animales control (Figura 18 B, Figura 21 D y Figura 22 D). También hay que tener en cuenta que existe una menor proporción de diferenciación de nuevas células NeuN tanto en la CG como en la CGr a los 15 días de la inyección y que una gran parte de las células de nueva generación pierden la expresión de Pax6 a los 60 días de la inyección. Todo ello nos lleva a plantear que, además de los defectos iniciales en la generación de los distintos tipos neuroquímicos de interneuronas bulbares que presentan los animales heterocigotos, los neuroblastos que consiguen llegar al BOP podrían sufrir retrasos en la adquisición de sus fenotipos finales como neuronas maduras.

### Análisis de las conexiones sinápticas de los distintos subtipos de interneuronas glomerulares

Uno de los procesos que intervienen en la supervivencia y la diferenciación de las nuevas neuronas es el establecimiento de conexiones sinápticas (Esquema 1). Debido a que, por la heterocigosis de Pax6, tanto algunas moléculas de guía axonal como los propios axones que llegan del nervio olfatorio al glomérulo pueden estar afectados y, por tanto, estaría afectada la formación de nuevas sinapsis, nos planteamos analizar la sinaptología glomerular. Estudiamos las conexiones realizadas por los distintos subtipos neuroquímicos de interneuronas yuxtglomerulares empleados en nuestro estudio, exceptuando Pax6 y NeuN por ser marcadores nucleares. No se encontraron diferencias en el tipo de sinapsis realizadas por las PGs de cada tipo neuroquímico entre animales control y heterocigotos, aunque la densidad de elementos positivos en los animales heterocigotos era claramente menor que en el caso de los animales control.

Brevemente, todos los tipos neuroquímicos de PGs analizados reciben y hacen sinapsis con células mitrales y empenachadas (Figura 23 D-F; Figura 24 C, E, F; Figura 25 B-D; Figura 26 B, C, E y F; Figura 27 B y D). Los tipos neuroquímicos de PGs que no reciben sinapsis del nervio olfatorio son las PGs **CB**<sup>+</sup> (Figura 23) y las **CR**<sup>+</sup> (Figura 25). Sin embargo, las PGs **CCK**<sup>+</sup> (Figura 24 D y F), las **NOSn**<sup>+</sup> (Figura 26 D y F) y las positivas a **TH** (Figura 27 C) reciben contactos sinápticos del nervio olfatorio. En el caso de los animales heterocigotos, no se encontraron diferencias en el tipo de conexiones que realiza cada uno de los tipos neuroquímicos analizados en comparación a lo que se observa en los animales control.

Los análisis de conectividad de las distintas subpoblaciones de PGs nos permiten afirmar, por una lado, que las PGs de los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  son capaces de funcionar como elementos pre y postsinápticos y que, además, la sinaptología de los subtipos de interneuronas analizados no varía respecto a la de animales control, a pesar del menor número de células de nueva generación en general y, en particular, del descenso de diferentes poblaciones neuroquímicas en el BOP de los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ .

## Análisis de la supervivencia de las células generadas

Para conocer si Pax6 está influyendo en la supervivencia celular realizamos estudios tanto *in vitro*, en células proliferativas y en diferenciación, como *in vivo*.

### Supervivencia de las células proliferativas *in vitro*

Con el objetivo de conocer si la supervivencia de las células proliferativas estaba alterada en los heterocigotos para Pax6 evaluamos la tasa de muerte en los cultivos mantenidos en condiciones proliferativas de CMBOPa a los 2 y 4 DIV en condiciones proliferativas en CMBOPa adheridas a sustrato.

Los cultivos procedentes de animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  presentaban un número significativamente menor de células totales que los animales  $+/+$  tanto a los 2 DIV ( $+/+$ :  $121 \pm 38,57$  células en 10 campos;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $45,67 \pm 6,66$  células en 10 campos; p-valor: 0,048) (Figura 28 A-B) como a los 4 DIV ( $+/+$ :  $634 \pm 197,52$  células en 10 campos;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $100 \pm 20,07$  células en 10 campos; p-valor: 0,048). Este dato concuerda con el hecho de que, a los 2 DIV, el número de cuerpos apoptóticos era significativamente mayor en los cultivos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  que en los control ( $+/+$ :  $0,33 \pm 0,58$  células TUNEL<sup>+</sup> en 10 campos;  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ :  $6,33 \pm 0,58$  células en 10 campos; p-valor: 0,000) (Figura 28 A-B). A los 4 DIV no encontramos diferencias significativas en este parámetro ( $+/+$ :  $1,33 \pm 0,33$  células TUNEL<sup>+</sup>

## RESULTADOS

en 10 campos; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $5,33 \pm 3,84$  células en 10 campos; p-valor: 0,346), aunque el número de células totales en este momento está reducido.

La tasa de muerte (porcentaje de células TUNEL<sup>+</sup> con respecto al total) era 63,73 veces mayor en los cultivos +/Sey<sup>DeY</sup> que en los control a los 2 DIV (+/+ :  $0,22 \pm 0,39$  % células TUNEL<sup>+</sup>; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $14,02 \pm 1,91$  % células TUNEL<sup>+</sup>; p-valor: 0,000) y 21,55 veces más a los 4 DIV (+/+ :  $0,22 \pm 0,07$  % células TUNEL<sup>+</sup> +/Sey<sup>DeY</sup>:  $4,74 \pm 5,25$  % células TUNEL<sup>+</sup>; p-valor: 0,049) (Figura 28 C), siendo la tasa de muerte en los cultivos control estable. Teniendo en cuenta estos datos, podemos deducir que los fenómenos que conducen a la muerte masiva de los precursores proliferativos en los heterocigotos +/Sey<sup>DeY</sup> son relativamente tempranos.

### Supervivencia de las células en condiciones de diferenciación a tipos celulares neurales

Durante el desarrollo embrionario, Pax6 influye en la capacidad de diferenciación de las células. Para conocer si en la neurogénesis adulta Pax6 podría estar regulando el número de células que se generan, además de la proporción de cada tipo celular, actuando sobre la capacidad de supervivencia de las células en diferenciación, realizamos la técnica de TUNEL en cultivos de CMBOPa sembrados en condiciones de diferenciación que favorecen la formación de tipos celulares neurales: astrocitos, oligodendrocitos y neuronas.

A los 2 DIV, no existen diferencias significativas en el número de células en cultivo entre animales +/+ y /Sey<sup>DeY</sup> (+/+ :  $246 \pm 45,32$  células en 10 campos; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $175,67 \pm 23,35$  células en 10 campos; p-valor: 0,240) aunque sí existe un incremento altamente significativo tanto del número de cuerpos apoptóticos (+/+ :  $43 \pm 9,87$  células TUNEL<sup>+</sup> en 10 campos; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $124,3 \pm 17,32$  células TUNEL<sup>+</sup> en 10 campos; p-valor: 0,015) como de la tasa de muerte (+/+ :  $17,20 \pm 0,82\%$  TUNEL<sup>+</sup>; +/Sey<sup>DeY</sup> :  $71,67 \pm 7,63\%$  TUNEL<sup>+</sup>; p-valor: 0,002) (Figura 29 C y D). Es decir, el proceso de muerte en los cultivos de los animales heterocigotos está incrementado, pero aún no se traduce en un descenso celular significativo.

A los 4 DIV el descenso de células en los cultivos +/Sey<sup>DeY</sup> es ya muy notable (+/+ :  $488,67 \pm 37,89$  células en 10 campos; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $40,67 \pm 1,86$  células en 10 campos, p-valor: 0,049) (Figura 29 A-C). Esta drástica reducción en el número de células totales se traduce en que el número de cuerpos apoptóticos se ve también reducido (+/+ :  $257 \pm 15,71$  células TUNEL<sup>+</sup>; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $40,67 \pm 1,86$  células TUNEL<sup>+</sup>; p-valor: 0,049) (Figura 29 A-C). Pese a ello, el porcentaje de células TUNEL<sup>+</sup> respecto al total alcanza el 100% en los cultivos +/Sey<sup>DeY</sup> (+/+ :  $52,74 \pm 1,35\%$  TUNEL<sup>+</sup>; +/Sey<sup>DeY</sup>:  $100 \pm 0$  % TUNEL<sup>+</sup>; p-valor: 0,037) (Figura 29 A, B y D).

Al igual que ocurría en los cultivos sembrados en proliferación, las condiciones de diferenciación a tipos celulares neurales, en las que las células se siembran en ausencia de factores de crecimiento, son altamente letales para los precursores haploinsuficientes para Pax6 desde etapas muy tempranas del proceso de diferenciación.

## Supervivencia de las células en condiciones de diferenciación a neuronas

Con el objetivo de analizar la supervivencia de las CMBOPa expuestas a condiciones que favorecen la diferenciación neuronal (presencia de suero fetal bovino y baja concentración de FGF2), realizamos un recuento de las células totales en los cultivos a los 7 DIV. Así, encontramos diferencias altamente significativas respecto a los cultivos +/+, ya que los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> presentan una reducción del número de células en cultivo (+/+ : 391,25 ± 21,64 células en 10 campos; +/Sey<sup>Dey</sup> : 284,2 ± 23,25 células en 10 campos; p-valor: 0,005). Sin embargo, la técnica de TUNEL no mostró un incremento en la tasa de muerte (+/+ : 14,86 ± 2,16% TUNEL<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup> : 6,44 ± 0,52 % TUNEL<sup>+</sup>; p-valor: 0,215), por lo que la muerte celular que da lugar a la pérdida de células debe producirse en etapas más tempranas del proceso de diferenciación, o no tiene lugar mediante apoptosis.

Los resultados obtenidos al evaluar la muerte celular y la supervivencia a corto plazo de las células en ausencia de un alelo para Pax6 demuestran una muerte de los precursores durante las fases proliferativa y de diferenciación temprana que no se continúa en los procesos de diferenciación más tardía.

## Supervivencia a largo plazo *in vivo*

### Muerte celular *in vivo*

Para evaluar la muerte celular en la región neurogénica ZSV-CMR-BOP realizamos un recuento del número de cuerpos apoptóticos en cada una de las secciones y en cada una de las regiones de interés (ZSV, CMR, CMR-BOP, CI, CPE, CGL, CNO). Nuestros resultados indican que el número de cuerpos apoptóticos es similar entre ambos genotipos, excepto en la CMR (+/+ : 0,66 ± 0,36 cuerpos apoptóticos por sección; +/Sey<sup>Dey</sup> : 0,125 ± 0,25 cuerpos apoptóticos por sección; p-valor: 0,04) y la CG del BOP (+/+ : 0,78 ± 0,15 cuerpos apoptóticos por sección; +/Sey<sup>Dey</sup> : 0,26 ± 0,09 cuerpos apoptóticos por sección; p-valor: 0,028), donde la muerte celular en los animales +/Sey<sup>Dey</sup> se ve reducida significativamente.

## Análisis *in vivo* de la supervivencia de las células generadas

La estimación de células BrdU<sup>+</sup> a los 60 días en las regiones neurogénicas de los animales +/Sey<sup>Dey</sup>, que pondría de manifiesto defectos en la migración o autorrenovación de la población de células madre, no presenta diferencias significativas respecto a los animales control. Así mismo, tampoco existen diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> del BOP ni en el de cada una de sus capas (Tabla XII). Teniendo en cuenta que, a los 15 días post-inyección, encontramos una reducción significativa en la incorporación de células de nueva generación en el BOP de animales +/Sey<sup>Dey</sup>, podemos afirmar que la supervivencia tardía de las células de nueva generación está favorecida en los animales mutantes, lo que concuerda con los resultados obtenidos *in vitro*.

<b>Tabla XII: Estimación de células de nueva generación en el BOP y sus capas a los 60 días de supervivencia tras la inyección de BrdU.</b>			
	<b>+/+ (Células BrdU<sup>+</sup>)</b>	<b>+/Sey<sup>Dey</sup> (Células BrdU<sup>+</sup>)</b>	<b>p-valor</b>
<b>BOP</b>	19.466,24 ± 4023,43	19.031,36 ± 3448,39	0,941
<b>CG</b>	2370,27 ± 894,27	684,25 ± 209,18	0,174
<b>CPE</b>	1054,29 ± 296,27	512,88 ± 123,39	0,195
<b>CI</b>	12.599,84 ± 1195,11	14.886,18 ± 3056,02	0,522

## Expresión de moléculas relacionadas con la proliferación y la supervivencia de las células

En los análisis *in vitro* hemos encontrado cambios muy significativos en la capacidad de proliferación, diferenciación y supervivencia de las CMBOPa. Por ello, y debido a que por la literatura, la carencia de Pax6 podría estar alterando numerosas rutas de señalización y mecanismos moleculares, decidimos analizar mediante WB la expresión de moléculas importantes tanto en la regulación del ciclo celular y la apoptosis/supervivencia, como en la respuesta de las células a distintas señales extracelulares (cuyo resultado es también la proliferación y/o la supervivencia). Para ello, utilizamos cultivos de CMBOPa sembrados en condiciones de proliferación y diferenciación.

## Expresión de moléculas en condiciones proliferativas

Para analizar la expresión de distintas moléculas en las neurosféricas, recogimos muestras proteicas de los cultivos proliferativos cuando estaban confluentes (7 DIV), y realizamos la técnica de Western Blot para comprobar si existían variaciones en la expresión

de diferentes moléculas de interés en los cultivos +/Sey<sup>DeY</sup> respecto a los control. Hemos dividido nuestro análisis en 2 grupos de moléculas: las implicadas en señalización en respuesta a distintos estímulos y las implicadas en la regulación del ciclo celular.

### Moléculas implicadas en la respuesta a estímulos externos

Dentro de este apartado hemos englobado el análisis de la expresión de las kinasas Akt, fosfo-Akt, PTEN (fosfatasa de Akt) y fosfo-Erk. No se encontraron diferencias significativas ni en la expresión ni en el nivel de fosforilación de estas proteínas entre cultivos +/+ y +/Sey<sup>DeY</sup> en condiciones proliferativas (Tabla XIII, Figura 30 A y C).

<b>Tabla XIII: Niveles relativos de expresión de moléculas implicadas en la señalización en respuesta a estímulos externos en células proliferativas.</b>			
	<b>+/+ (Intensidad Relativa)</b>	<b>+/Sey<sup>DeY</sup> (Intensidad Relativa)</b>	<b>p-valor</b>
Akt	0,80 ± 0,10	0,84 ± 0,05	0,675
Fosfo-Akt	1,4 ± 0,6	1,77 ± 0,41	0,628
PTEN	0,75 ± 0,06	0,82 ± 0,04	0,385
Fosfo-Erk	3,75 ± 0,63	3,73 ± 1,425	0,992

### Moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular

En este apartado hemos incluido el análisis de la expresión de inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas, como p27<sup>Kip1</sup> y p21<sup>Cip1</sup>, y de la proteína p53. Los resultados muestran un incremento del 271% en la expresión de p27<sup>Kip1</sup>, del 303% en la expresión de p21<sup>Cip1</sup> y un descenso del 57,3% en la expresión de p53 en células proliferativas +/Sey<sup>DeY</sup> respecto a las +/+ (Tabla XIV, Figura 30 E y G).

<b>Tabla XIV: Niveles relativos de expresión de moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular y la supervivencia de células proliferativas.</b>			
	<b>+/+ (Intensidad Relativa)</b>	<b>+/Sey<sup>DeY</sup> (Intensidad Relativa)</b>	<b>p-valor</b>
<b>p27<sup>Kip1</sup></b>	0,55 ± 0,21	1,49 ± 0,08	0,006
<b>p21<sup>Cip1</sup></b>	0,10 ± 0,04	0,30 ± 0,05	0,010
<b>p53</b>	1,16 ± 0,11	0,66 ± 0,07	0,011

## Expresión de moléculas en condiciones de diferenciación

Analizamos la expresión de estas mismas moléculas en muestras proteicas de células en diferenciación a los 2 DIV de la siembra. La elección de este tiempo de recogida se fundamenta en que en ese momento encontramos diferencias en el número de cuerpos apoptóticos, pero no en el número de células en cultivo, por lo que podíamos analizar el mecanismo molecular que conduce a la muerte de los precursores +/Sey<sup>Dey</sup> durante la diferenciación.

### Moléculas implicadas en señalización en respuesta a estímulos externos

Al igual que sucede en las condiciones proliferativas, ni el nivel de expresión ni el de fosforilación de las proteínas analizadas presentan variaciones entre ambos genotipos (Tabla XV, Figura 30 B y D).

<b>Tabla XV: Niveles relativos de expresión de moléculas implicadas en la señalización en respuesta a estímulos externos en células en diferenciación.</b>			
	<b>+/+ (Intensidad Relativa)</b>	<b>+/Sey<sup>Dey</sup> (Intensidad Relativa)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Akt</b>	5,05 ± 0,66	3,29 ± 1,10	0,220
<b>Fosfo-Akt</b>	1,59 ± 0,50	0,85 ± 0,63	0,390
<b>PTEN</b>	5,50 ± 1,03	3,86 ± 1,19	0,336
<b>Fosfo-Erk</b>	22,96 ± 9,79	21,09 ± 11,19	0,904

### Moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular

El análisis de expresión de p27<sup>Kip1</sup> en las células en diferenciación no muestra diferencias significativas (+/+ : 1,54 ± 0,88 intensidad relativa; +/Sey<sup>Dey</sup>: 1,28 ± 0,34; p-valor: 0,792) (Figura 30 F y H). Por otra parte, las muestras analizadas no presentaron expresión de p21<sup>Cip1</sup> (Figura 30 F).

## 2. Generación de nuevas células en regiones no neurogénicas

Como se ha expuesto anteriormente, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es analizar el papel del factor de transcripción Pax6 en la regulación de la formación de nuevas células en regiones no neurogénicas. Los precursores localizados en ellas son progenitores gliales que se localizan por todo el encéfalo, son proliferativos, y, en condiciones fisiológicas, dan lugar preferentemente a oligodendrocitos. Para estudiar su biología, decidimos centrarnos en los precursores NG2<sup>+</sup> localizados en la corteza, al ser un área de clara localización anatómica y fácilmente diferenciable de las regiones neurogénicas. Estas áreas corresponden a la corteza motora primaria y secundaria, corteza somato sensorial, corteza piriforme, corteza gustativa, corteza agranular insular, corteza cingulada anterior, corteza orbital, polo frontal, área visceral, área frontal de asociación y área prelímbica, según la correspondencia de nuestros niveles de estudio con neuroanatomía del cerebro de ratones de la misma estirpe (C57BL/6) que encontramos en el atlas "*Comparative cytoarchitectonic atlas of the C57BL/6 and 129/Sv mouse brains*" (Hof et al., 2000).

Para abordar este objetivo utilizamos ratones control y heterocigotos Sey<sup>Dey</sup> adultos. La aproximación experimental elegida para identificar los precursores proliferativos y su progenie fueron, al igual que en el estudio de la región neurogénica de la ZSV-CMR-BOP, inyecciones de BrdU con supervivencias de 30 minutos, 15 días y 60 días. Además, se utilizó una línea celular de progenitores gliales de corteza para el análisis de la regulación de Pax6 por el factor de crecimiento PDGF, esencial para múltiples aspectos de la modulación de estos progenitores.

### Proliferación y distribución *in vivo* de precursores NG2<sup>+</sup>

Para conocer si el número y localización de los precursores NG2<sup>+</sup> proliferativos en la corteza está alterado en ratones haploinsuficientes para Pax6 realizamos una estimación estereológica del número de células BrdU<sup>+</sup> (30 minutos de supervivencia tras la inyección) en la corteza de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>.

Previo a este análisis realizamos una cuantificación del volumen de la corteza en ambos grupos de animales, para conocer si estaba reducido por los efectos de la mutación Sey<sup>Dey</sup>, no encontrándose diferencias significativas (+/+ :  $21 \pm 1,966 \text{ mm}^3$ ; +/Sey<sup>Dey</sup> :  $18,81 \pm 0,86 \text{ mm}^3$ ; p-valor: 0,179), por lo que consideramos que el tamaño de la corteza no se ve alterado por la falta de Pax6.

El recuento de células BrdU<sup>+</sup> 30 minutos post-inyección demostró que el número de células en fase S del ciclo celular en la corteza de los animales +/Sey<sup>Dey</sup> es

## RESULTADOS

significativamente mayor que en los animales +/+ (+/+ :  $826,14 \pm 86,92$  células BrdU<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $3253,08 \pm 833,86$  células BrdU<sup>+</sup>; significación asintótica bilateral: 0,034). Esta diferencia significativa se debe a una mayor cantidad de células BrdU<sup>+</sup> en las áreas corticales que se encuentran en los niveles rostro-caudales con ventrículos laterales (+/+ :  $463,19 \pm 30,76$  células BrdU<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $2627,51 \pm 882,84$  células BrdU<sup>+</sup>; significación asintótica bilateral: 0,034) y en los niveles con BOP caudal (+/+ :  $27,16 \pm 0,96$  células BrdU<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $78,84 \pm 17,90$  células BrdU<sup>+</sup>; significación asintótica bilateral: 0,034) (Figura 31 A). Para conocer si la distribución rostro-caudal de las células proliferativas en cada región de corteza analizada está alterada, determinamos la densidad de células BrdU<sup>+</sup> en cada nivel de interés y comparamos estas densidades entre animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>, encontrando un incremento de la densidad en los niveles ZSV-III (+/+ :  $1,54 \pm 0,20$  células BrdU<sup>+</sup>/ mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $12,07 \pm 7,62$  células BrdU<sup>+</sup>/ mm<sup>2</sup>; significación asintótica bilateral: 0,034) y ZSV-I (+/+ :  $1,71 \pm 0,09$  células BrdU<sup>+</sup>/ mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $29,73 \pm 12,60$  células BrdU<sup>+</sup>/ mm<sup>2</sup>; significación asintótica bilateral: 0,034) (Figura 31 B). Al igual que lo que sucedía en las regiones neurogénicas, los cambios significativos en la proliferación tienen lugar en las regiones rostrales de la zona analizada.

Una vez conocido que la corteza de los animales +/Sey<sup>Dey</sup> contiene un mayor número de células en fase S que la de los animales control, procedimos a identificar la naturaleza de estos precursores proliferativos, realizando dobles marcajes de BrdU con distintos marcadores de progenitores gliales: NG2, el receptor  $\alpha$  de PDGF (PDGFR $\alpha$ ) y Pax2 (proteínas expresadas por OPCs). Tanto en animales +/+ como +/Sey<sup>Dey</sup> encontramos colocalización total de los marcadores analizados con BrdU (Figura 31 C-E), por lo que los animales haploinsuficientes para Pax6 presentan un mayor número de progenitores NG2<sup>+</sup> proliferativos que los animales control.

## Diferenciación *in vivo* de precursores NG2<sup>+</sup>

Para conocer el potencial de diferenciación de estos precursores, realizamos una estimación del número de células de nueva generación en la corteza, utilizando animales con un tiempo de supervivencia de 15 días tras las inyecciones de BrdU. Así, encontramos que la corteza de los animales +/Sey<sup>Dey</sup> presenta un mayor número de células de nueva generación que los animales control (+/+ :  $1625,43 \pm 139,48$  células BrdU<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $2049,67 \pm 75,75$  células BrdU<sup>+</sup>; p-valor: 0,014) (Figura 32 A). Esta diferencia significativa se debe a una mayor presencia de células BrdU<sup>+</sup> en las áreas corticales que se encuentran en los niveles con ventrículos laterales (+/+ :  $1128,28 \pm 140,8$  células BrdU<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>:  $1582,45 \pm 60,63$  células BrdU<sup>+</sup>; p-valor: 0,007) (Figura 32 B).

Para conocer si la distribución rostro-caudal de las células de nueva generación en la corteza está alterada, analizamos la densidad de células BrdU<sup>+</sup> en cada nivel de interés y comparamos estas densidades entre animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>, encontrando un incremento en la densidad de los animales mutantes en los niveles rostro-caudales ZSV-IV (+/+ : 2,32 ± 0,47 células BrdU<sup>+</sup>/ mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 4,02 ± 0,42 células BrdU<sup>+</sup>/ mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,029), CMR medial (+/+ : 2,30 ± 0,26 células BrdU<sup>+</sup>/ mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 5,4 ± 0,75 células BrdU<sup>+</sup>/ mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,004) y CMR rostral (+/+ : 2,38 ± 0,34 células BrdU<sup>+</sup>/ mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 5,17 ± 0,62 células BrdU<sup>+</sup>/ mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,004) de animales +/Sey<sup>Dey</sup> (Figura 32 B).

Una vez conocido que, a los 15 días de la inyección de BrdU, los animales +/Sey<sup>Dey</sup> presentaban un mayor número de células de nueva generación que los animales +/+, decidimos analizar qué tipo de células eran. Para ello, realizamos análisis de colocalización de marcadores de astrocitos (GFAP), neuronas (NeuN) y oligodendrocitos (Sox10) con BrdU. Los resultados de diferenciación de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> son similares y las células BrdU<sup>+</sup> únicamente presentan coexpresión de Sox10 (Figura 32 C y Figura 33). Además, en numerosas ocasiones sus núcleos se sitúan al lado de somas neuronales NeuN<sup>+</sup>, rodeándolos (Figura 33). Todos estos datos muestran que los ratones heterocigotos +/Sey<sup>Dey</sup> presentan un mayor número de oligodendrocitos de nueva generación en la corteza rostral.

## Supervivencia *in vivo* de las células de nueva generación en la corteza

### Supervivencia de las células de nueva generación

Para analizar la supervivencia de las células de nueva generación en la corteza utilizamos aquellos animales que se sacrificaron 60 días después de la inyección de BrdU y realizamos una estimación del número total de células BrdU<sup>+</sup> en la corteza. Las cortezas +/+ y las +/Sey<sup>Dey</sup> no tienen diferencias significativas en el número estimado de células de nueva generación (+/+ : 1796,156 ± 499,96 células BrdU<sup>+</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup>: 1282,40 ± 494,27 células BrdU<sup>+</sup>; p-valor: 0,506) (Figura 34 A) y tampoco presentan diferencias significativas en la densidad de cada uno de los niveles de estudio, por lo que la distribución rostro-caudal de las células es similar en ambos genotipos. Por lo tanto, y a pesar de que la proliferación celular y la incorporación de nuevos oligodendrocitos en la corteza de animales +/Sey<sup>Dey</sup> es superior (datos de 15 días postinyección), tras 60 días el número de células es similar en animales control y heterocigotos. De hecho, comparando la cantidad de células en fase S, la de células de nueva generación presentes con 15 días de supervivencia a las inyecciones de BrdU y las presentes a los 60 días (Figura 34 B), vemos que la tendencia de la línea en las

corteza control es positiva, es decir, a medida que pasa el tiempo la población aumenta, mientras que en la corteza de los animales +/Sey<sup>Dey</sup> la tendencia se invierte, por lo que debe existir una mayor muerte celular que en los animales control.

### Muerte celular en la corteza

Para comprobar si estaba ocurriendo una mayor muerte por apoptosis en las cortezas +/Sey<sup>Dey</sup> realizamos una cuantificación del número de cuerpos apoptóticos TUNEL<sup>+</sup> por sección, encontrando un número significativamente mayor en los animales +/Sey<sup>Dey</sup> que en los control (+/+ :  $1,61 \pm 0,24$  células TUNEL<sup>+</sup>/sección; +/Sey<sup>Dey</sup> :  $3,16 \pm 0,87$  células TUNEL<sup>+</sup>/sección; significación asintótica bilateral: 0,049) (Figura 34 C).

Para comprobar si, además de muerte por apoptosis pudiera existir necrosis debido a una sobre-activación microglial, analizamos la densidad de células de microglía (Iba1<sup>+</sup>) y la morfología de estas células, indicativa de su grado de activación. No se encontraron diferencias significativas en la densidad de microglía (+/+ :  $174,92 \pm 9,28$  células Iba1<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; +/Sey<sup>Dey</sup> :  $165,51 \pm 10,01$  células Iba1<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>; p-valor: 0,506) y tampoco se encontró, morfológicamente, una mayor activación microglial en la corteza de animales +/Sey<sup>Dey</sup> (Figura 34 D y E). Por lo tanto, el incremento de muerte celular en la corteza de animales haploinsuficientes para Pax6 no está causado ni provoca una respuesta de activación microglial y la muerte está ocurriendo principalmente por apoptosis.

### Regulación de Pax6 por PDGF en progenitores gliales

Debido al incremento de OPCs proliferativos que presentan los animales +/SeyDey tanto en la corteza como en el BOP, y a que PDGF es el principal factor de crecimiento que regula los parámetros que encontramos alterados en dichos animales, decidimos estudiar si existía una relación regulatoria entre PDGF y Pax6. Es decir, si la exposición de los OPCs a PDGF producía variaciones en la expresión de esta proteína, y si estas variaciones pueden estar relacionadas con la proliferación de los progenitores gliales.

### Análisis informático de secuencias susceptibles de fosforilación en la proteína Pax6

Como paso previo al estudio de la regulación de la proteína Pax6 por el factor de crecimiento PDGF, realizamos un análisis de la secuencia proteica de Pax6, para conocer su posibilidad teórica de fosforilación por diversas kinasas. Aquellas kinasas capaces de

fosforilar Pax6 e importantes en la ruta de señalización de los factores de crecimiento se muestran en la Tabla XVI. Los resultados completos del análisis se detallan en el Anexo I.

Además, el análisis de la secuencia proteica de Pax6 muestra que ésta presenta múltiples sitios de unión, situados principalmente en la región PST, para proteínas con dominios SH2 y SH3 (Anexo I). Estos son dominios no catalíticos presentes en proteínas citoplasmáticas de señalización, reguladas por receptores tirosina kinasa (familia de receptores a la que pertenecen los PDGFR). La función de estos dos tipos de dominios sería, por lo tanto, la de servir de vínculo entre las tirosina kinasas y sus proteínas diana (Koch *et al.*, 1991).

Todos estos datos nos permiten concluir que la proteína Pax6 presenta en su secuencia los sitios consenso necesarios para ser susceptible de regulación por factores de crecimiento y sus rutas de señalización subyacentes.

**Tabla XVI: Fosforilación teórica de la proteína Pax6 por kinasas implicadas en la ruta de señalización de PDGF. Se detalla, para cada uno de las kinasas, la secuencia de Pax6 susceptible de ser fosforilada, el aminoácido de fosforilación y su localización dentro de los diferentes dominios de la proteína Pax6.**

Kinasa	Secuencia	Sitio de fosforilación	Dominio dentro de Pax6
<b>Akt</b>	EIRDRL <b>L</b> SEG <b>V</b> CTN SMLGRTD <b>T</b> ALTNTY	Ser 122 Thr 334	Dominio paired (PD) PST
<b>CaM II</b>	RNQR <b>R</b> QAS <b>N</b> T <b>P</b> SHI	Ser 293	PST
<b>Erk 1</b>	QPI <b>P</b> Q <b>T</b> TP <b>V</b> SS <b>F</b> T QRRQAS <b>N</b> T <b>P</b> SHI <b>P</b> I TT <b>S</b> T <b>G</b> L <b>I</b> SP <b>G</b> V <b>S</b> V <b>P</b>	Thr 318 Thr 295 Ser 412	PST PST PST
<b>PDGFR</b>	SS <b>F</b> ST <b>S</b> V <b>Y</b> Q <b>P</b> IP <b>Q</b> P	Tyr 310	PST
<b>PKC <math>\alpha/\beta/\gamma</math></b>	G <b>R</b> Y <b>Y</b> ET <b>G</b> S <b>I</b> R <b>P</b> RA <b>I</b> V <b>S</b> S <b>F</b> T <b>S</b> G <b>S</b> M <b>L</b> G <b>R</b> T <b>D</b>	Ser 79 Ser 327	PD PST
<b>PKC <math>\epsilon</math></b>	Q <b>Y</b> K <b>R</b> E <b>C</b> P <b>S</b> I <b>F</b> A <b>W</b> E <b>I</b> K <b>L</b> Q <b>R</b> N <b>R</b> T <b>S</b> F <b>T</b> Q <b>E</b> Q <b>I</b>	Ser 110 Ser 79	PD PD
<b>PKC <math>\zeta</math></b>	R <b>K</b> L <b>Q</b> R <b>N</b> R <b>T</b> S <b>F</b> T <b>Q</b> E <b>Q</b> G <b>R</b> Y <b>Y</b> ET <b>G</b> S <b>I</b> R <b>P</b> RA <b>I</b>	Thr 229 Ser 79	Homeodominio (HD) PD
<b>PKC <math>\mu</math></b>	PP <b>V</b> PS <b>Q</b> T <b>S</b> S <b>Y</b> SC <b>M</b> L R <b>K</b> L <b>Q</b> R <b>N</b> R <b>T</b> S <b>F</b> T <b>Q</b> E <b>Q</b> T <b>A</b> L <b>T</b> N <b>T</b> Y <b>S</b> A <b>L</b> PP <b>M</b> P	Ser 366 Thr 229 Ser 341	PST HD PST

## Regulación de la proliferación de progenitores gliales por PDGF

PDGF tiene numerosos efectos en la biología de los progenitores gliales, pero debido a nuestros resultados *in vivo*, nuestro interés se centró en conocer si PDGF es capaz de promover la proliferación de los progenitores gliales de la corteza. Por ello, utilizamos líneas celulares inmortalizadas de progenitores gliales de corteza de ratones de edad perinatal. En nuestro estudio, utilizamos 3 grupos distintos de progenitores gliales (NTvA-Z, utilizados como control y que no sufrieron ningún tratamiento; NTvA-Z tratados con PDGF una hora y NTvA-PDGF, que sobre-expresan PDGF y por lo tanto están en continuo contacto con el factor de crecimiento), a los que se añadió BrdU durante una hora. El porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> respecto al total fue significativamente mayor respecto a los progenitores control (NTvA-Z: 23,27 ± 0,77 % BrdU<sup>+</sup>) tanto en los progenitores tratados durante una hora con PDGF (NTvA-Z + 1 h PDGF: 29,58 ± 0,13 % BrdU<sup>+</sup>; p-valor NTvA-Z vs NTvA-Z + PDGF: 0,001) como en los progenitores NTvA-PDGF (NTvA-PDGF: 37,54 ± 0,92 % BrdU<sup>+</sup>; p-valor NTvA-Z vs NTvA-PDGF: 0,000) (Figura 35 A). Estos datos demuestran que el tratamiento de nuestra línea celular de progenitores gliales con PDGF promueve la proliferación.

## Regulación de la proteína Pax6 por PDGF

Para comprobar si PDGF produce algún efecto en la cantidad de proteína Pax6, tratamos progenitores gliales NTvA-Z control con PDGF a diferentes tiempos (10, 20, 60 y 180 minutos y 24 horas), recogimos muestras proteicas de cada uno de ellos y detectamos en ellas la cantidad de Pax6 presente.

Los niveles de proteína Pax6 caen rápidamente tras la adición de PDGF (10 min). Posteriormente, el nivel de Pax6 va recuperando valores normales (Figura 35 B). Además, comprobamos la cantidad de proteína Pax6 presente en la línea celular de progenitores gliales que sobre-expresan PDGF (NTvA-PDGF), resultando ser prácticamente nula (Figura 35 C). A la vista de estos resultados, podemos afirmar que PDGF regula la cantidad de proteína Pax6 presente en los progenitores gliales. Teniendo en cuenta las predicciones de fosforilación de la proteína Pax6, las rutas de señalización de Akt y Erk, principales vías activadas por factores de crecimiento y con un papel importante en la regulación de progenitores gliales, podrían ser responsables de esta modulación. Para comprobar esta hipótesis, utilizamos inhibidores de su activación y líneas celulares de progenitores gliales con esas rutas constitutivamente activas.

Cuando utilizamos un inhibidor de la ruta de la Akt (LY294002), los resultados obtenidos fueron variables pero continuaba observándose una caída en la cantidad de Pax6 total en las células tratadas con PDGF (Figura 35 D). Tras realizar estos experimentos, comprobamos el nivel de expresión de Pax6 en progenitores gliales con una forma de Akt

constitutivamente activa. Estos progenitores gliales presentaron un nivel de expresión de Pax6 elevado (Figura 35 E), y si Akt estuviera implicada en la regulación estos progenitores gliales no presentarían expresión de Pax6.

Para comprobar si era Erk la kinasa implicada utilizamos U0129 (inhibidor de la activación de Erk). Al inhibir Erk, no se producía la caída en la cantidad de Pax6 total tras el tratamiento con el factor de crecimiento PDGF (Figura 35 F). Comprobamos también el nivel de expresión de Pax6 en progenitores gliales con Ras, una kinasa aguas arriba de Erk, constitutivamente activa, y encontramos niveles de Pax6 comparables a los progenitores gliales sin tratamiento (Figura 35 G). Por otra parte, para comprobar si Erk era la única kinasa responsable de esta regulación de Pax6, inhibimos su activación con U0129 en la línea celular NTvA-PDGF. La inhibición de Erk no produjo efectos en la expresión de Pax6 en los progenitores NTvA-PDGF, que era prácticamente inexistente (Figura 35 H). Estos resultados nos permiten concluir que, aunque Erk está implicada en el descenso del nivel de proteína Pax6 en progenitores gliales tratados con PDGF, no es la única kinasa responsable.

Debido a los resultados obtenidos en el análisis de la implicación de Akt y a que Erk no es la única kinasa implicada en el proceso, decidimos comprobar el nivel de expresión de Pax6 en una línea de progenitores gliales con formas constitutivamente activas tanto de Akt como de Ras. El empleo de esta línea celular nos permitió comprobar si la combinación de la activación de ambas rutas de señalización estaba detrás de la regulación de Pax6 por PDGF. Encontramos expresión de Pax6 (Figura 35 I) en estos progenitores, por lo que descartamos la participación de Akt en este proceso.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral nos permiten afirmar que, durante la neurogénesis adulta dirigida al BOP, el factor de transcripción Pax6 se expresa en una gran parte de las células madre, precursores altamente proliferativos, neuroblastos y células de generación reciente en el BOP. Durante este proceso, Pax6 regula fenómenos tales como la proliferación, la autorrenovación de las células madre, la diferenciación a oligodendrocitos, a neuronas y a diferentes subtipos neuroquímicos de interneuronas bulbares. Además, también está implicado en la supervivencia de las células proliferativas y en el proceso de diferenciación. La supervivencia celular a largo plazo se ve favorecida y, aunque la llegada de nuevas células al BOP es menor en los heterocigotos  $+/\text{Sey}^{\text{DeY}}$  adultos, a los dos meses sus BOPs presentan un número equivalente de células de nueva generación. Además, hemos comprobado que las diferentes poblaciones de PGs del BOP  $+/\text{Sey}^{\text{DeY}}$  realizan contactos sinápticos similares a los de las PGs de animales control. A la vista de nuestros análisis de Western Blot realizados en células proliferativas y en diferenciación, el mecanismo responsable de estos cambios podría deberse a alteraciones en la expresión de reguladores del ciclo celular.

Los análisis realizados en los progenitores gliales no neurogénicos de la corteza demuestran que su proliferación y diferenciación también están reguladas por Pax6. Los animales heterocigotos  $+/\text{Sey}^{\text{DeY}}$  adultos presentan un mayor número de progenitores gliales proliferativos y oligodendrocitos de nueva generación, pero éstos mueren con mayor frecuencia que las células control, y la población de nuevos oligodendrocitos a los 2 meses de las inyecciones de BrdU es similar a la de los animales  $+/+$ . Hemos comprobado también que PDGF, un regulador esencial de los precursores de oligodendrocitos que induce, entre otras cosas, su proliferación, provoca un rápido descenso de la expresión de Pax6 en los progenitores. Esta relación regulatoria entre PDGF y Pax6 está mediada, al menos en parte, por la kinasa Erk.

Anexo



<b>Predicción de unión de proteínas con grupo de unión a FosfoSerina/Treonina (pST_bind) a la proteína Pax6.</b>				
<b>PROTEÍNA</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>SITIO DE UNIÓN</b>	<b>DOMINIO DE PAX6</b>
<b>14-3-3</b>	Regulación del ciclo celular y la apoptosis	RKLQRNRTSFTQEQ EIRDRLLESEGICTN SMLGRDTALTNTY RNQRRQASNTPSHI	Thr 229 Ser 122 Thr 334 Ser 293	HD PD PST PST
<b>Predicción de fosforilación de la proteína Pax6 por Tirosina kinasas.</b>				
<b>KINASA</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>SITIO DE UNIÓN</b>	<b>DOMINIO DE PAX6</b>
<b>Abl</b>	Respuesta a factores de crecimiento. Proliferación y migración	NGRSYDITYTPPHMQ	Tyr 386	PST
<b>EGFR</b>	Receptor de EGF	SSFSTSVYQPIQP	Tyr 310	PST
<b>PDGFR</b>	Receptor de PDGF	SSFSTSVYQPIQP	Tyr 310	PST
<b>Predicción de fosforilación de la proteína Pax6 por kinasas de respuesta a daño en el ADN.</b>				
<b>KINASA</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>SITIO DE UNIÓN</b>	<b>DOMINIO DENTRO DE PAX6</b>
<b>ATM</b>	Respuesta al daño en el ADN. Punto de control del ciclo celular G2/M	QRNRTSFTQEQIEA TSVPGQPTQDGCQQ	Thr 232 Thr 187	HD PD-HD
<b>DNA PK</b>	Respuesta al daño en el ADN. Punto de control del ciclo celular G2/M	QRNRTSFTQEQIEA GGGENTN <del>S</del> ISSNGE TSVPGQPTQDGCQQ PMQPPVPSQTSSYS PGSEPDMSQYWPRL	Thr 232 Ser 203 Thr 187 Ser 363 Ser 429	HD PD-HD PD-HD PST PST

<b>Predicción de fosforilación de la proteína Pax6 por Serina/Treonina kinasas basófilas.</b>				
<b>KINASA</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>SITIO DE UNIÓN</b>	<b>DOMINIO DE PAX6</b>
<b>Akt</b>	Respuesta a factores de crecimiento. Supervivencia	EIRDRLLESGVCTND SMLGRTDTALTNTY	Ser 122 Thr 334	PD PST
<b>CaMK-II</b>	Plasticidad sináptica	RNQRQASNTPSHI	Ser 293	PST
<b>PKA</b>	Regulación del ciclo celular	KLQRNRTSFTQEQI RKLQRNRTSFTQEQ	Ser 230 Thr 229	HD HD
<b>PKC <math>\alpha/\beta/\gamma</math></b>	Crecimiento celular	GRYYETGSIRPRAI VSSFTSGSMLGRTD	Ser 79 Ser 327	PD PST
<b>PKC <math>\epsilon</math></b>	Crecimiento celular	QYKRECP SIFAWEI KLQRNRTSFTQEQI	Ser 110 Ser 230	PD HD
<b>PKC <math>\zeta</math></b>	Crecimiento celular	RKLQRNRTSFTQEQ GRYYETGSIRPRAI	Thr 229 Ser 79	HD PD
<b>PKC <math>\mu</math></b>	Crecimiento celular	PPVPSQTSYSCLM RKLQRNRTSFTQEQ TALTNTYSALPPMP	Ser 366 Thr 229 Ser 341	PST HD PST
<b>Predicción de fosforilación de la proteína Pax6 por Serina/Treonina kinasas acidófilas.</b>				
<b>KINASA</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>SITIO DE UNIÓN</b>	<b>DOMINIO DENTRO DE PAX6</b>
<b>Caseína Kinasa 1</b>	Señalización de Wnts y Shh	VSSFTSGSMLGRTD QPMGTSGTTSTGLI GRTDTALTNTYSAL GTS GTTSTGLISPG GQTGSWGTRPGWYP GRYYETGSIRPRAI GRSYDTYTPPHMQT	Ser 327 Thr 405 Thr 337 Thr 408 Thr 172 Ser 79 Thr 387	PST PST PST PST PD-HD PD PST
<b>Caseína Kinasa 2</b>	Ciclo celular y reparación del ADN	ISSNGEDSDEAQMR ENTNSISSNGEDSD	Ser 211 Ser 206	PD-HD PD-HD
<b>GSK3</b>	Reparación del ADN y señalización por Wnts	PMQPPVPSQTSYS QPIQPQTPVSSFT YQPIQPQTPVSSF PQPTTPVSSFTSGS	Ser 363 Thr 318 Thr 317 Ser 321	PST PST PST PST

<b>Predicción de fosforilación de la proteína Pax6 por Serina/Treonina kinasas dependientes de prolina.</b>				
<b>KINASA</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>SITIO DE UNIÓN</b>	<b>DOMINIO DENTRO DE PAX6</b>
<b>Cdc2</b>	Ciclo celular. Transiciones G1-S y G2-M	GRSYD <b>T</b> Y <b>T</b> PPHM <b>Q</b> T YSCML <b>P</b> <b>T</b> <b>S</b> PSV <b>N</b> GR Q <b>I</b> P <b>I</b> Q <b>P</b> <b>T</b> <b>T</b> PV <b>S</b> S <b>F</b> T QRRQ <b>A</b> S <b>N</b> <b>T</b> PS <b>H</b> I <b>P</b> I	Thr 387 Ser 375 Thr 318 Thr 295	PST PST PST PST
<b>Cdk5</b>	Maduración neuronal, migración, señalización de Reelina	GRSYD <b>T</b> Y <b>T</b> PPHM <b>Q</b> T QRRQ <b>A</b> S <b>N</b> <b>T</b> PS <b>H</b> I <b>P</b> I YSCML <b>P</b> <b>T</b> <b>S</b> PSV <b>N</b> GR Q <b>I</b> P <b>I</b> Q <b>P</b> <b>T</b> <b>T</b> PV <b>S</b> S <b>F</b> T	Thr 387 Thr 295 Ser 375 Thr 318	PST PST PST PST
<b>Erk 1</b>	Respuesta a factores de crecimiento. Ciclo celular, crecimiento, diferenciación	TTST <b>G</b> L <b>I</b> <b>S</b> PGV <b>S</b> V <b>P</b> Q <b>I</b> P <b>I</b> Q <b>P</b> <b>T</b> <b>T</b> PV <b>S</b> S <b>F</b> T QRRQ <b>A</b> S <b>N</b> <b>T</b> PS <b>H</b> I <b>P</b> I	Ser 412 Thr 218 Thr 295	PST PD-HD PST
<b>P38 MAPK</b>	Apoptosis, crecimiento, diferenciación	Q <b>I</b> P <b>I</b> Q <b>P</b> <b>T</b> <b>T</b> PV <b>S</b> S <b>F</b> T YSCML <b>P</b> <b>T</b> <b>S</b> PSV <b>N</b> GR TTST <b>G</b> L <b>I</b> <b>S</b> PGV <b>S</b> V <b>P</b>	Thr 318 Ser 375 Ser 412	PST PST PST

<b>Proteínas con dominio SH2 capaces de unirse de forma teórica a la proteína Pax6.</b>			
<b>PROTEÍNA</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>SITIO DE UNIÓN</b>	<b>DOMINIO DENTRO DE PAX6</b>
<b>Abl</b>	NGRSYDTYTPPHMQ DTALTNTYSALPPM SSFSTSVYQIPQP PSVNGRSYDTYTPP	Tyr 386 Tyr 340 Tyr 310 Tyr 383	PST PST PST PST
<b>Crk</b>	NGRSYDTYTPPHMQ SSFSTSVYQIPQP DTALTNTYSALPPM	Tyr 386 Tyr 310 Tyr 340	PST PST PST
<b>Fgr</b>	SSFSTSVYQIPQP	Tyr 310	PST
<b>Fyn</b>	SSFSTSVYQIPQP	Tyr 310	PST
<b>Itk</b>	SSFSTSVYQIPQP DTALTNTYSALPPM	Tyr 310 Tyr 340	PST PST
<b>Lck</b>	SSFSTSVYQIPQP NGRSYDTYTPPHMQ	Tyr 310 Tyr 386	PST PST
<b>Nck</b>	PSVNGRSYDTYTPP NGRSYDTYTPPHMQ DTALTNTYSALPPM	Tyr 383 Tyr 386 Tyr 340	PST PST PST
<b>p85</b>	VPSQTSSYSCMLPT	Tyr 368	PST
<b>PLC <math>\gamma</math></b>	DTALTNTYSALPPM	Tyr 340	PST
<b>Shc</b>	DTALTNTYSALPPM SSFSTSVYQIPQP VPSQTSSYSCMLPT SKILGRYYETGSIR	Tyr 340 Tyr 310 Tyr 368 Tyr 75	PST PST PST PD
<b>SHIP</b>	DTALTNTYSALPPM SSFSTSVYQIPQP	Tyr 340 Tyr 310	PST PST
<b>Src</b>	DTALTNTYSALPPM SSFSTSVYQIPQP	Tyr 340 Tyr 310	PST PST

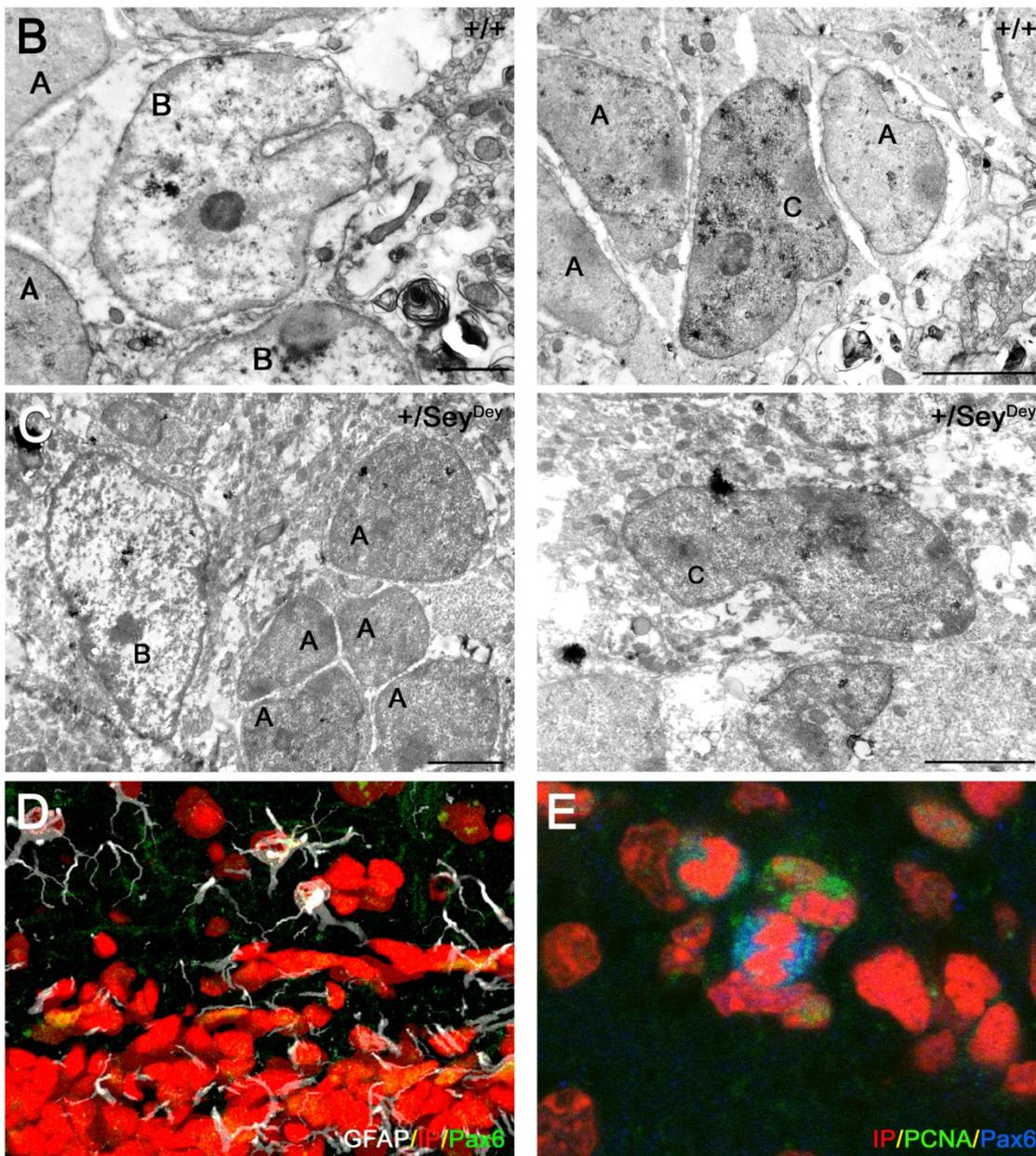
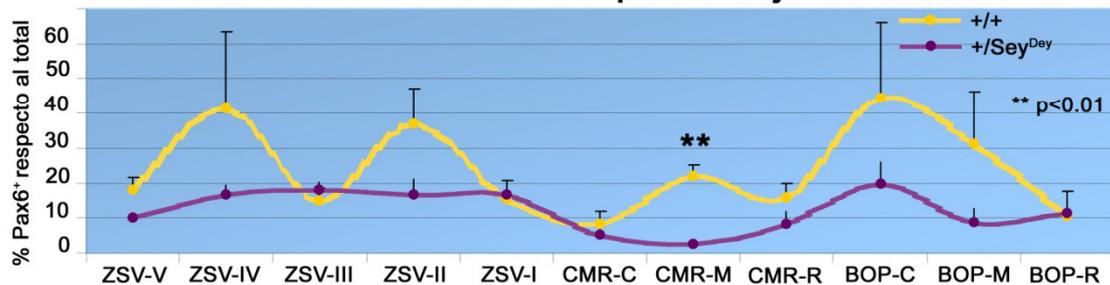
<b>Proteínas con dominio SH3 capaces de unirse de forma teórica a la proteína Pax6.</b>			
<b>PROTEÍNA</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>SITIO DE UNIÓN</b>	<b>DOMINIO DENTRO DE PAX6</b>
<b>Abl</b>	WYPGTSV <b>P</b> GGQPTQD TNTYSAL <b>P</b> PPMSFT	Pro 183 Pro 344	PD-HD PST
<b>Amphiphysin</b>	FTMANNL <b>P</b> MQPPVP	Pro 356	PST
<b>Cbl AP</b>	LPMQPP <b>V</b> PSQTSSY ANNL <b>P</b> MQPPVPSQT	Pro 362 Pro 359	PST PST
<b>Cortactin</b>	TNTYSAL <b>P</b> PPMSFT ANNL <b>P</b> MQPPVPSQT SSYSCML <b>P</b> TSPSVN LPMQPP <b>V</b> PSQTSSY WYPGTSV <b>P</b> GGQPTQD	Pro 344 Pro 359 Pro 373 Pro 362 Pro 183	PST PST PST PST PD-HD
<b>Crk</b>	ANNL <b>P</b> MQPPVPSQT TNTYSAL <b>P</b> PPMSFT	Pro 359 Pro 344	PST PST
<b>Grb2</b>	TNTYSAL <b>P</b> PPMSFT SSYSCML <b>P</b> TSPSVN VYQIP <b>Q</b> PTTPVSS FTMANNL <b>P</b> MQPPVP WYPGTSV <b>P</b> GGQPTQD ANNL <b>P</b> MQPPVPSQT	Pro 344 Pro 373 Pro 316 Pro 356 Pro 183 Pro 359	PST PST PST PST PD-HD PST
<b>Intersectin</b>	LPMQPP <b>V</b> PSQTSSY YSAL <b>P</b> PP <b>P</b> SFTMAN ANNL <b>P</b> MQPPVPSQT	Pro 362 Pro 347 Pro 359	PST PST PST
<b>Itk</b>	NTYSAL <b>P</b> PPMSFTM	Pro 345	PST
<b>PLC <math>\gamma</math></b>	NNL <b>P</b> MQPPVPSQTS NTYSAL <b>P</b> PPMSFTM PI <b>P</b> QPTT <b>P</b> VSSFTS	Pro 360 Pro 345 Pro 319	PST PST PST
<b>Src</b>	TNTYSAL <b>P</b> PPMSFT VYQIP <b>Q</b> PTTPVSS FVNGR <b>P</b> L <b>P</b> DSTRQK SSYSCML <b>P</b> TSPSVN	Pro 344 Pro 316 Pro 22 Pro 373	PST PST PD PST



Iconografía

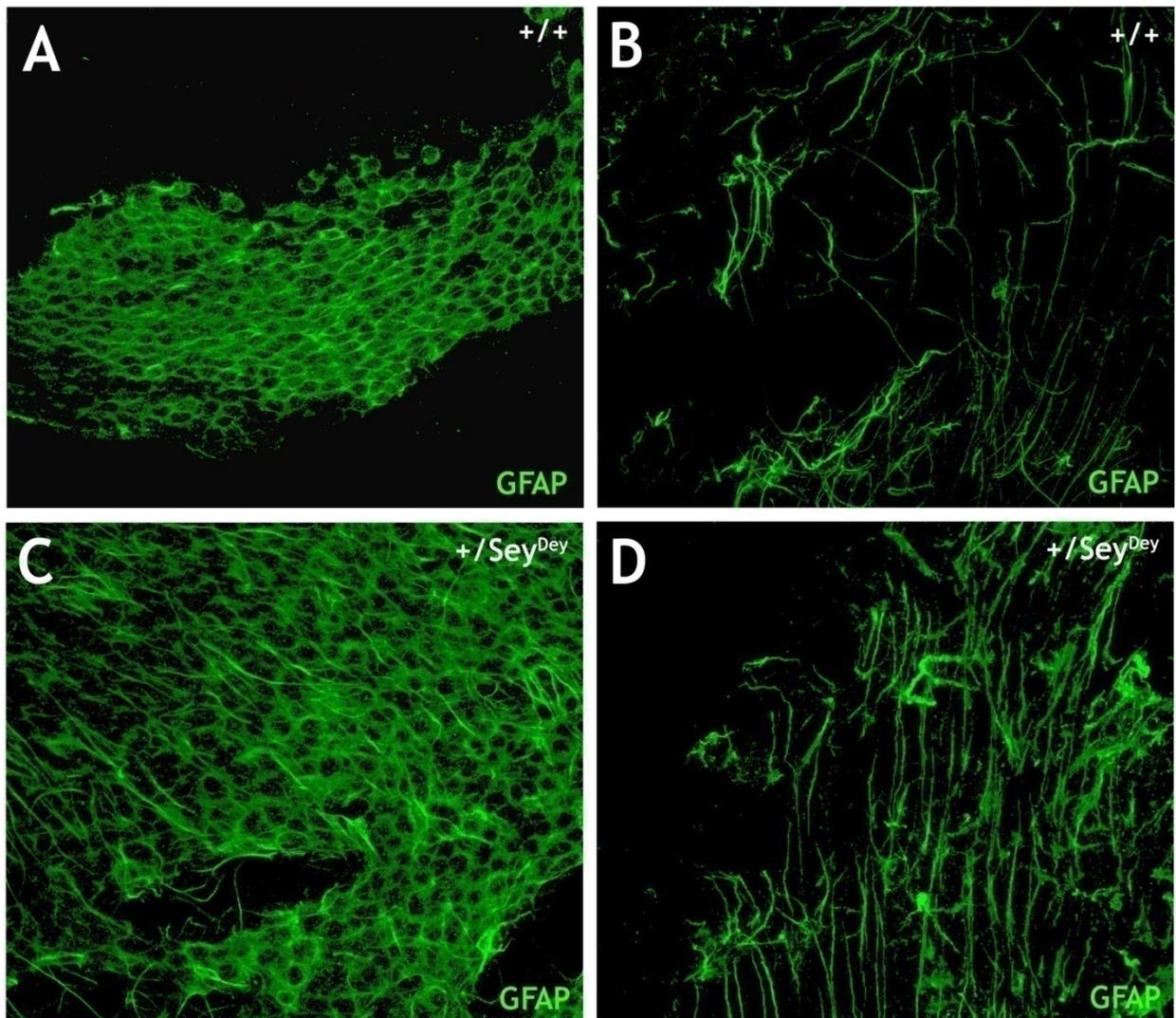


# A Distribución rostrocaudal del porcentaje de células Pax6



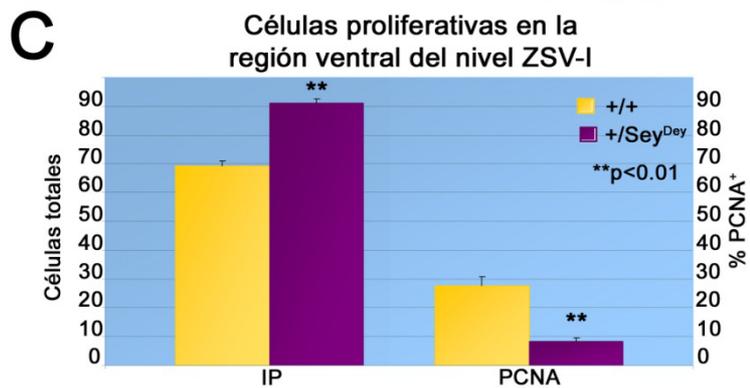
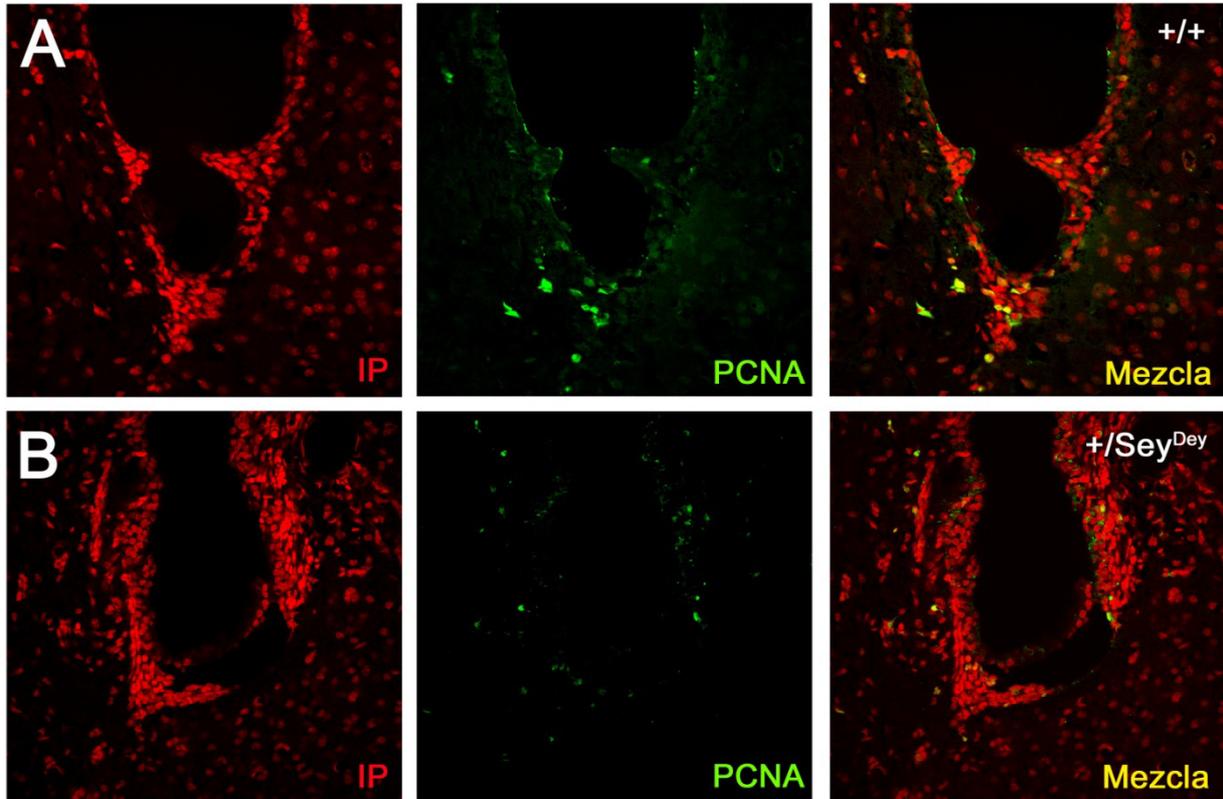
**Figura 1:** Expresión de Pax6 en la región neurogénica ZSV-CMR-BOP. **(A)** Porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> en los distintos niveles de estudio de ratones +/+ (amarillo) y +/Sev<sup>Dey</sup> (morado). **(B)** Inmunohistoquímica para Pax6 a microscopía electrónica de transmisión. Observamos expresión de Pax6 en los tres tipos celulares del linaje neurogénico (tipos A, B y C) en animales control. **(C)** Los animales +/Sev<sup>Dey</sup> también presentan expresión de Pax6 en todos los tipos de precursores, aunque ésta es menor. **(D)** IF doble frente a GFAP (gris) y Pax6 (verde) con los núcleos contrateñidos con IP (rojo) en la que se observa los bajos niveles de Pax6 en astrocitos neurogénicos. **(E)** IF frente a PCNA (verde) y Pax6 (azul) con contrateñimiento de IP (rojo) en la que observamos la presencia de Pax6 en células en división. Barra de escala: 2  $\mu$ m.





**Figura 2:** Análisis de la estructura de la ZSV en función de la disposición de las células de tipo B. IF frente a GFAP (verde) de la ZSV *in toto* de animales control (**A y B**) y +/Sey<sup>Dey</sup> (**C y D**) en la que observamos los somas de las células tipo B (GFAP<sup>+</sup>) (**A y C**) y sus procesos orientados longitudinalmente en la pared ventricular (**B y D**). En las imágenes se observa que la heterocigosis para Pax6 no parece afectar a la estructura de la ZSV.

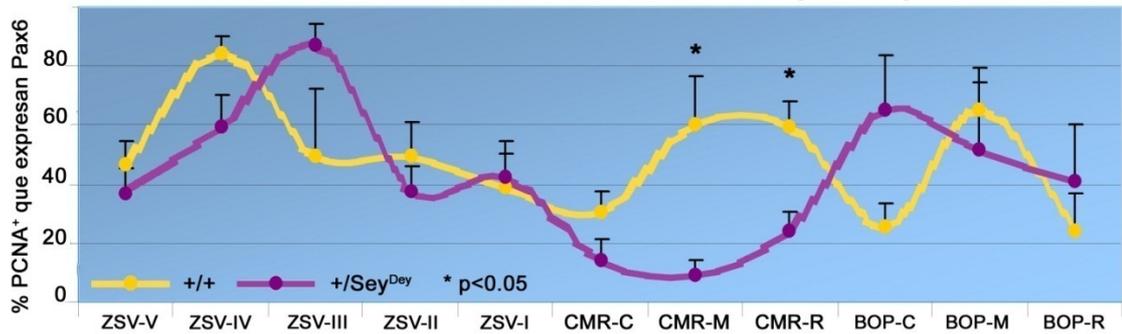




**Figura 3:** Distribución rostro-caudal de células proliferativas (PCNA<sup>+</sup>). **(A y B)** IF frente a PCNA (verde) e IP (rojo) de la región ventral del nivel ZSV-I de un animal control **(A)** y de un animal +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)**. Se observa que la pérdida de un alelo de Pax6 provoca la disminución de células PCNA<sup>+</sup> (verde) y la presencia de un mayor número de células totales (IP; rojo). **(C)** Comparación del número de células totales de la región ventral del nivel ZSV-I y del porcentaje de células PCNA<sup>+</sup> entre animales control (amarillo) y heterocigotos (morado).



## A Distribución rostrocaudal de células PCNA<sup>+</sup> que expresan Pax6



## B Distribución rostro-caudal de las células Pax6<sup>+</sup> en ciclo

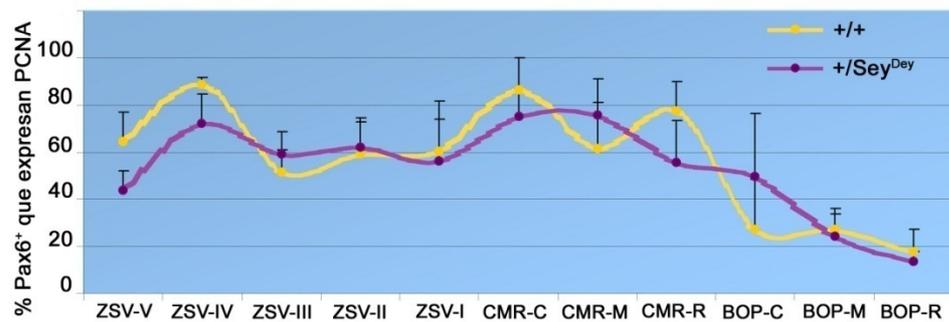


Figura 4: Distribución rostro-caudal de células proliferativas (PCNA<sup>+</sup>) y su coexpresión con Pax6. **(A)** Distribución rostro-caudal del porcentaje de células PCNA<sup>+</sup> que coexpresan Pax6 en animales control y heterocigotos. La única región donde se aprecian diferencias en este parámetro es la CMR. **(B)** La distribución rostro-caudal del porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> que coexpresan PCNA y, por tanto, están en ciclo, es similar en los animales control y +/Sey<sup>Dey</sup>.



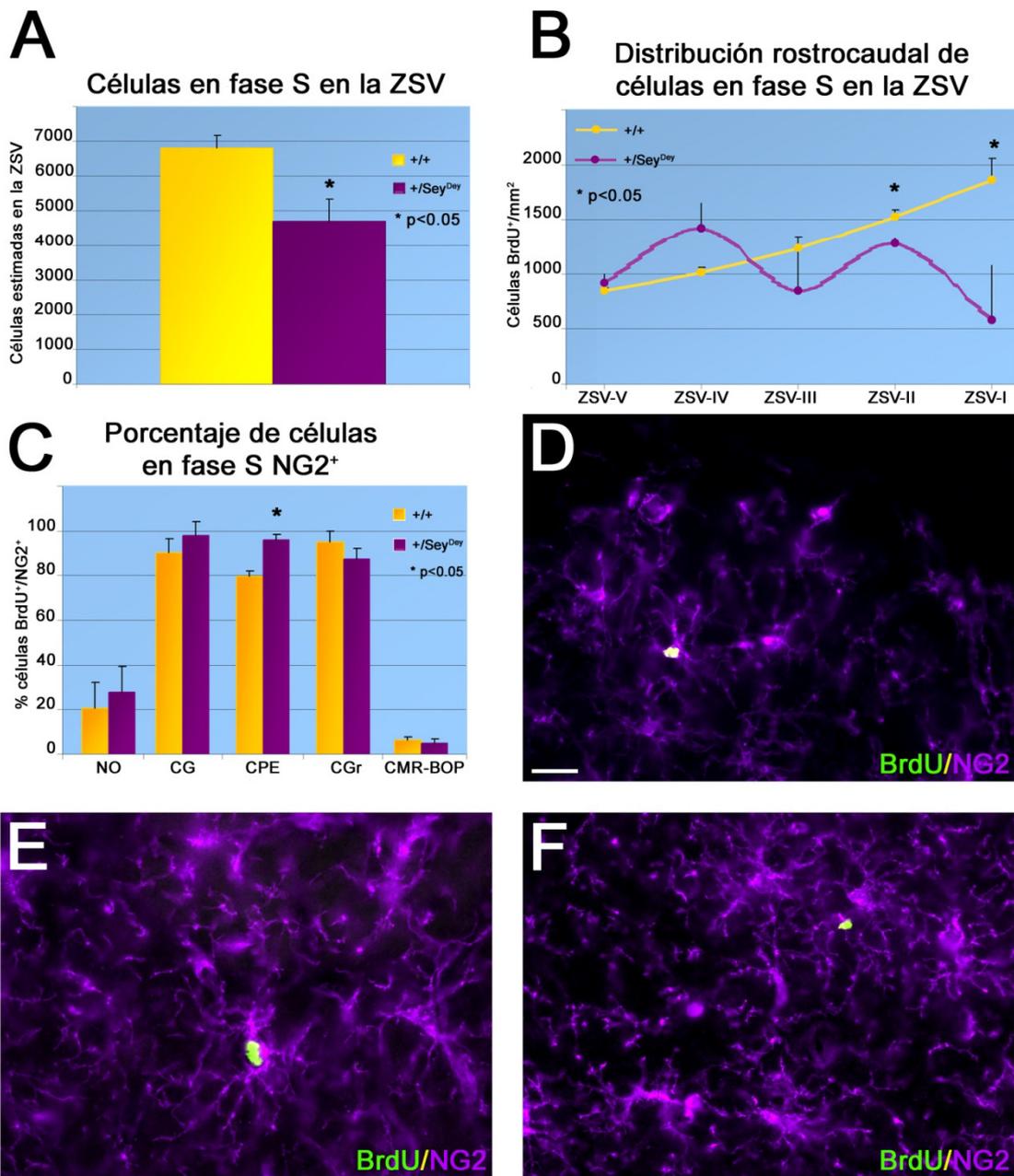
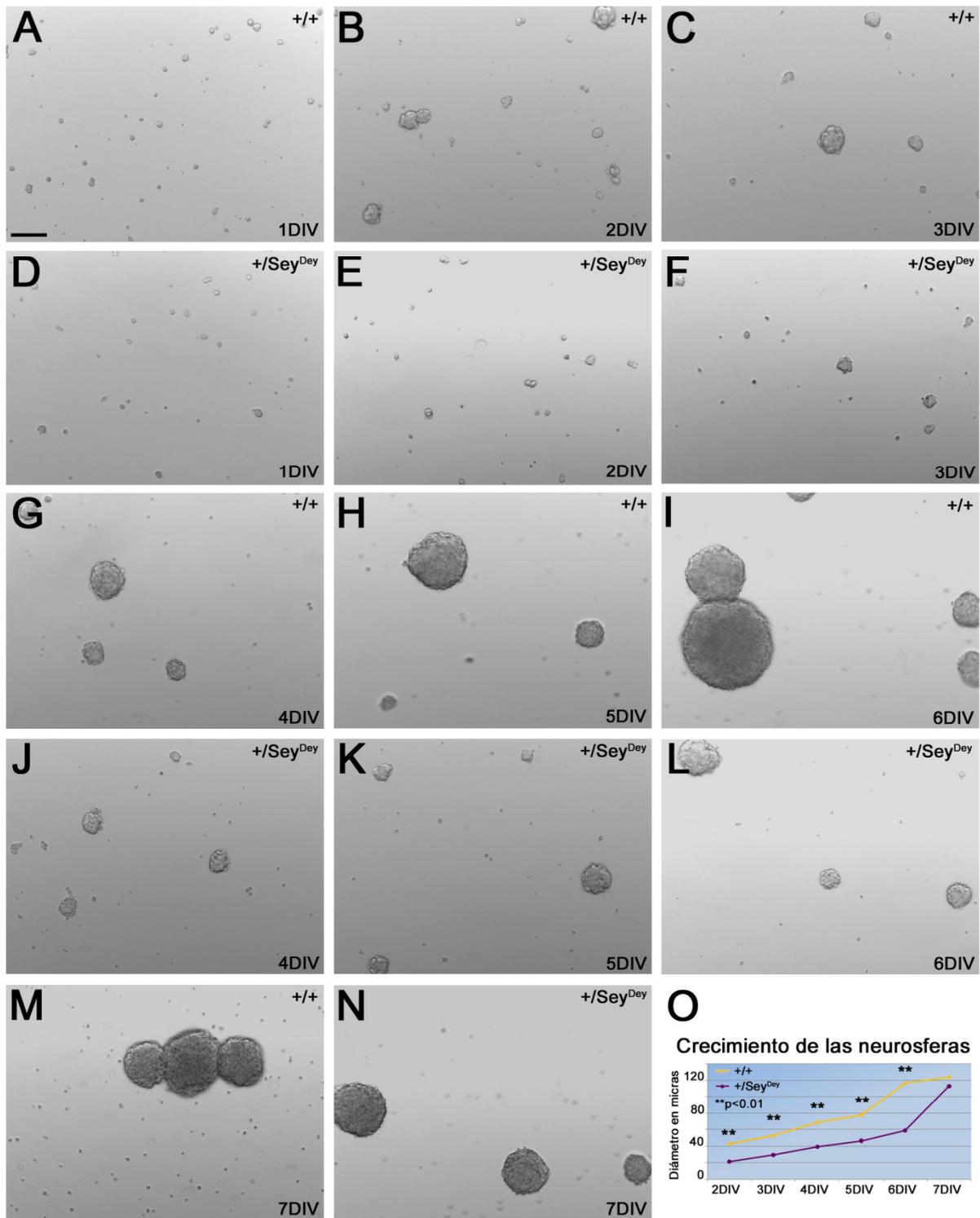


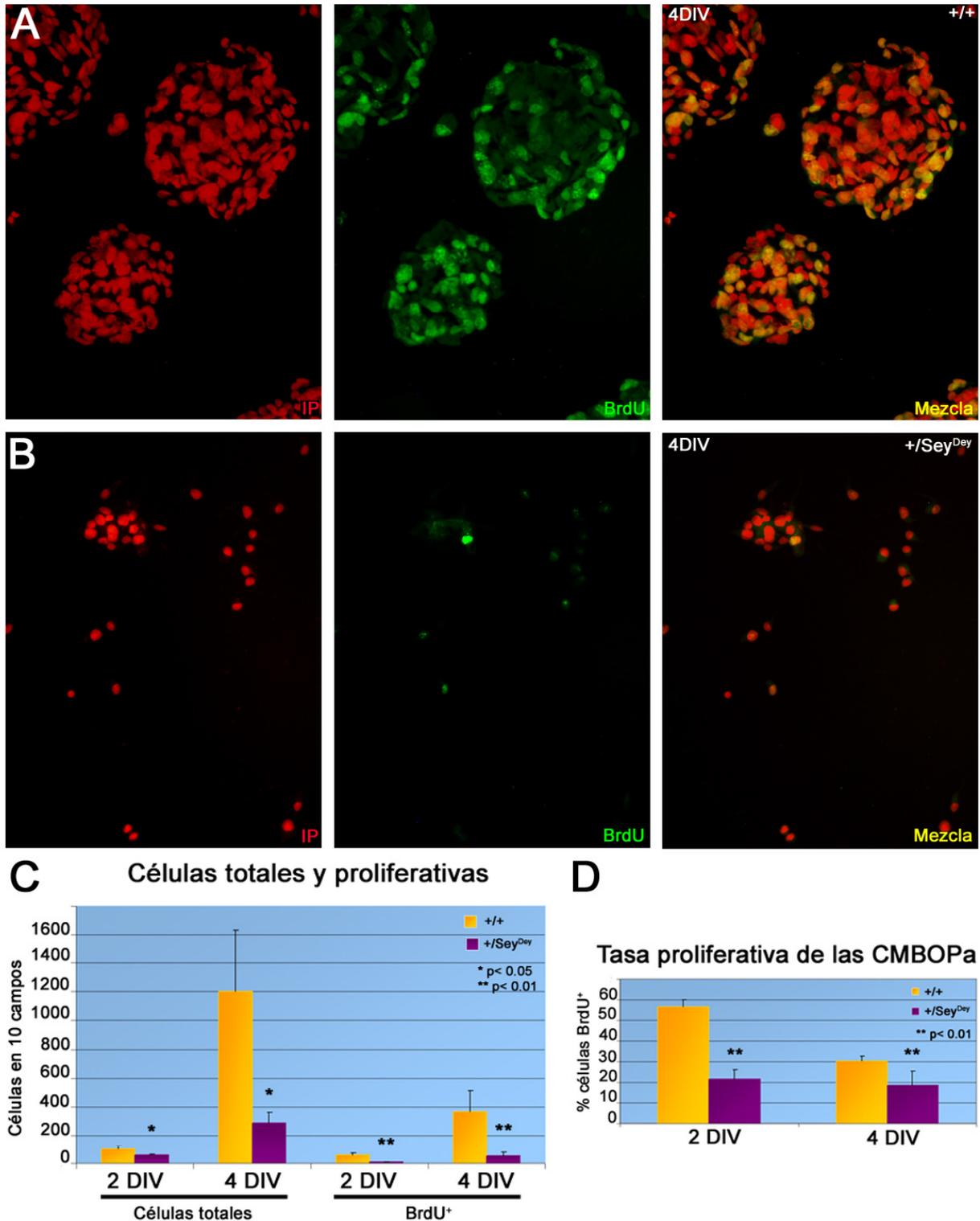
Figura 5: Análisis de las células en fase S (BrdU<sup>+</sup>) de la región neurogénica ZSV-CMR-BOP. **(A)** Número estimado de células en fase S en la ZSV de animales control (amarillo) y +/Sey<sup>Dey</sup> (morado). Los animales +/Sey<sup>Dey</sup> tienen una ZSV significativamente menos proliferativa que los animales +/+. **(B)** Distribución rostrocaudal de las células en fase S en los niveles de estudio de la ZSV de animales control (amarillo) y +/Sey<sup>Dey</sup> (morado). Las diferencias observadas en los animales +/Sey<sup>Dey</sup> son debidas a alteraciones proliferativas en los niveles más rostrales (ZSV-I y ZSV-II). **(C)** La proporción de células en fase S que son progenitores gliales NG2<sup>+</sup> es mayor en la CPE del BOP de los animales +/Sey<sup>Dey</sup> que en la de los animales +/+. **(D-F)** Células en fase S (BrdU<sup>+</sup>; verde) que colocalizan con NG2<sup>+</sup> (morado) en la CG **(D)**, CPE **(E)** y CIM **(F)** del BOP de animales +/+. Barra de escala: 20  $\mu$ m.





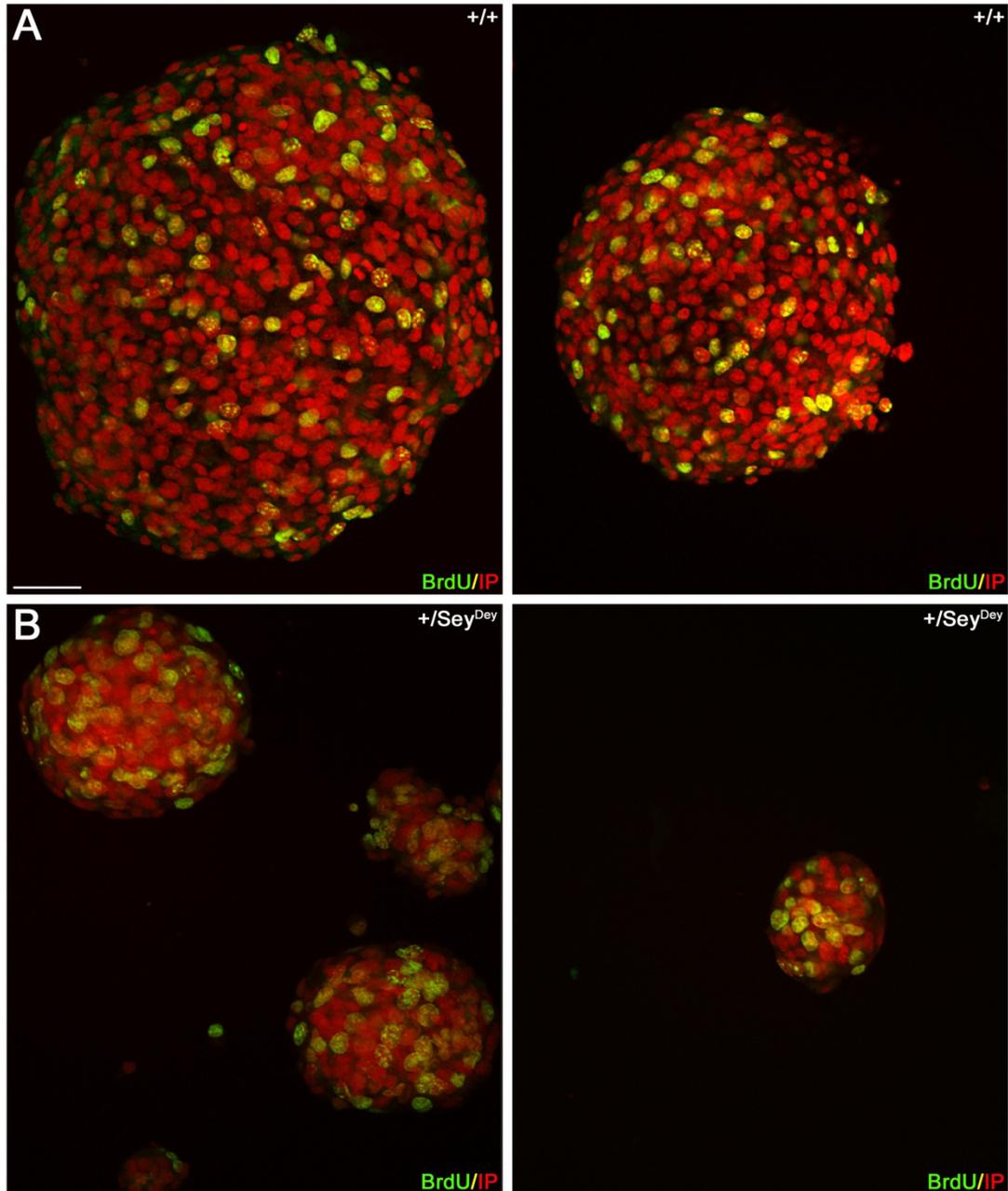
**Figura 6:** Análisis de la tasa de crecimiento de las CMBOPa en flotación. Fotografías de neuroesferas de 1 a 7 días en cultivo de CMBOPa control (**A-C, G-I y M**) y  $+/Sey^{Dey}$  (**D-F, J-L y N**) en las que se observa el menor tamaño de las neuroesferas  $+/Sey^{Dey}$  en comparación con las  $+/+$ . (**O**) Las medidas de diámetro de las neuroesferas  $+/+$  y  $+/Sey^{Dey}$  muestran que las esferas  $+/Sey^{Dey}$  presentan un diámetro significativamente menor que las control en los días 2 a 6 de cultivo. Barra de escala: 100  $\mu m$ .





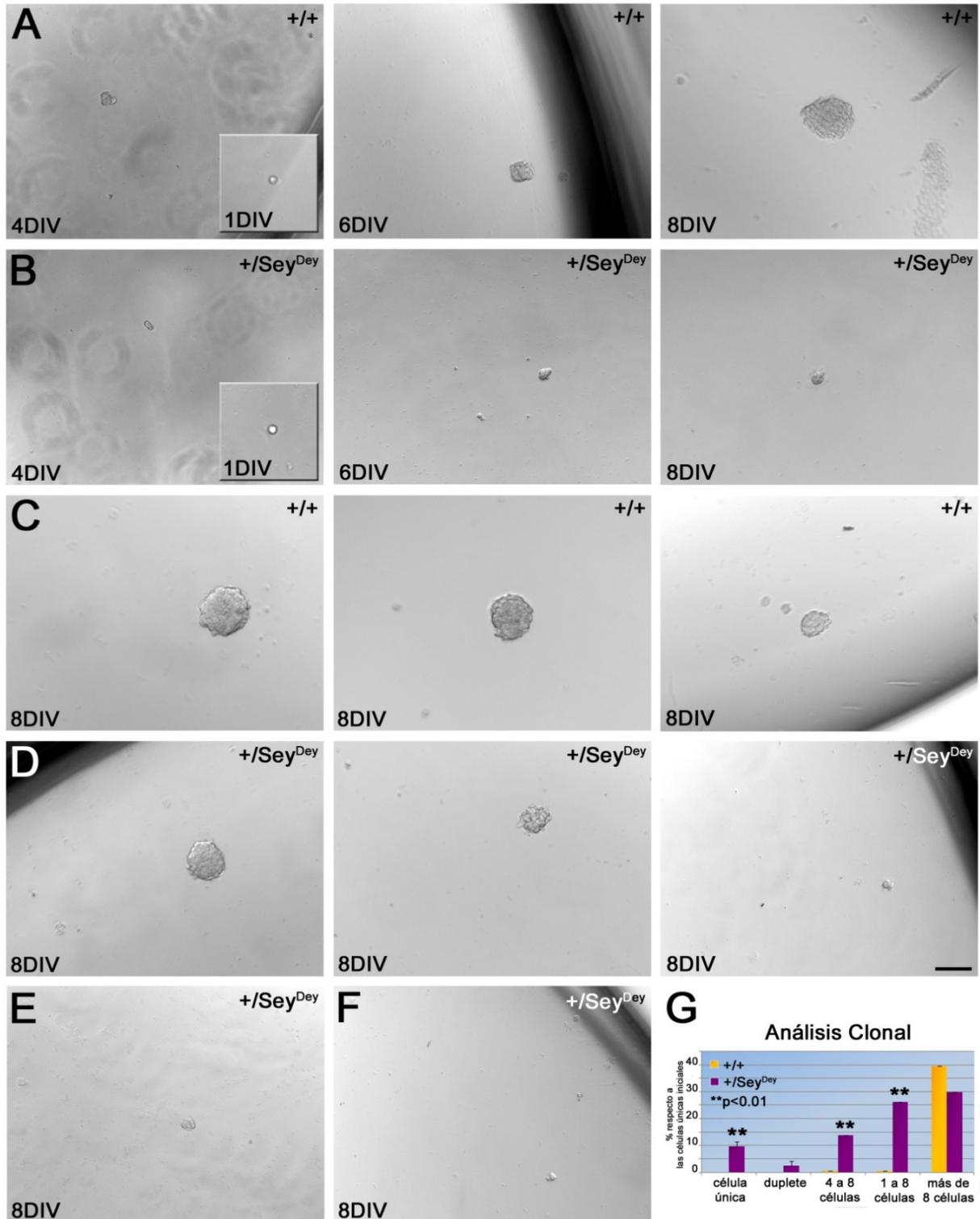
**Figura 7:** Análisis de la capacidad proliferativa de las CMBOPa adheridas a sustrato. **(A y B)** IF frente a BrdU (verde) e IP (rojo) de cultivos de CMBOPa a los 4 DIV de un animal control **(A)** y de un  $+/Sev^{Dey}$  **(B)**. En estas imágenes observamos que las neurosféricas  $+/Sev^{Dey}$  no solo presentan un menor número de células totales (IP; rojo) y células proliferativas (BrdU; verde) sino que además, la mayoría de las células se encuentran aisladas o formando pequeños grupos. **(C)** Cuantificación del número de células totales (IP) y proliferativas (BrdU<sup>+</sup>) en cultivos de CMBOPa  $+/+$  y  $+/Sev^{Dey}$  a los 2 y 4 DIV. Ambos parámetros disminuyen significativamente en los cultivos procedentes de animales  $+/Sev^{Dey}$ . **(D)** Tasa proliferativa (representada como porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> respecto al total) de los cultivos  $+/+$  y  $+/Sev^{Dey}$  a los 2 y 4 DIV. A ambos tiempos de supervivencia, las células  $+/Sev^{Dey}$  presentan una tasa proliferativa significativamente menor que las  $+/+$ . Barra de escala: 50  $\mu$ m.





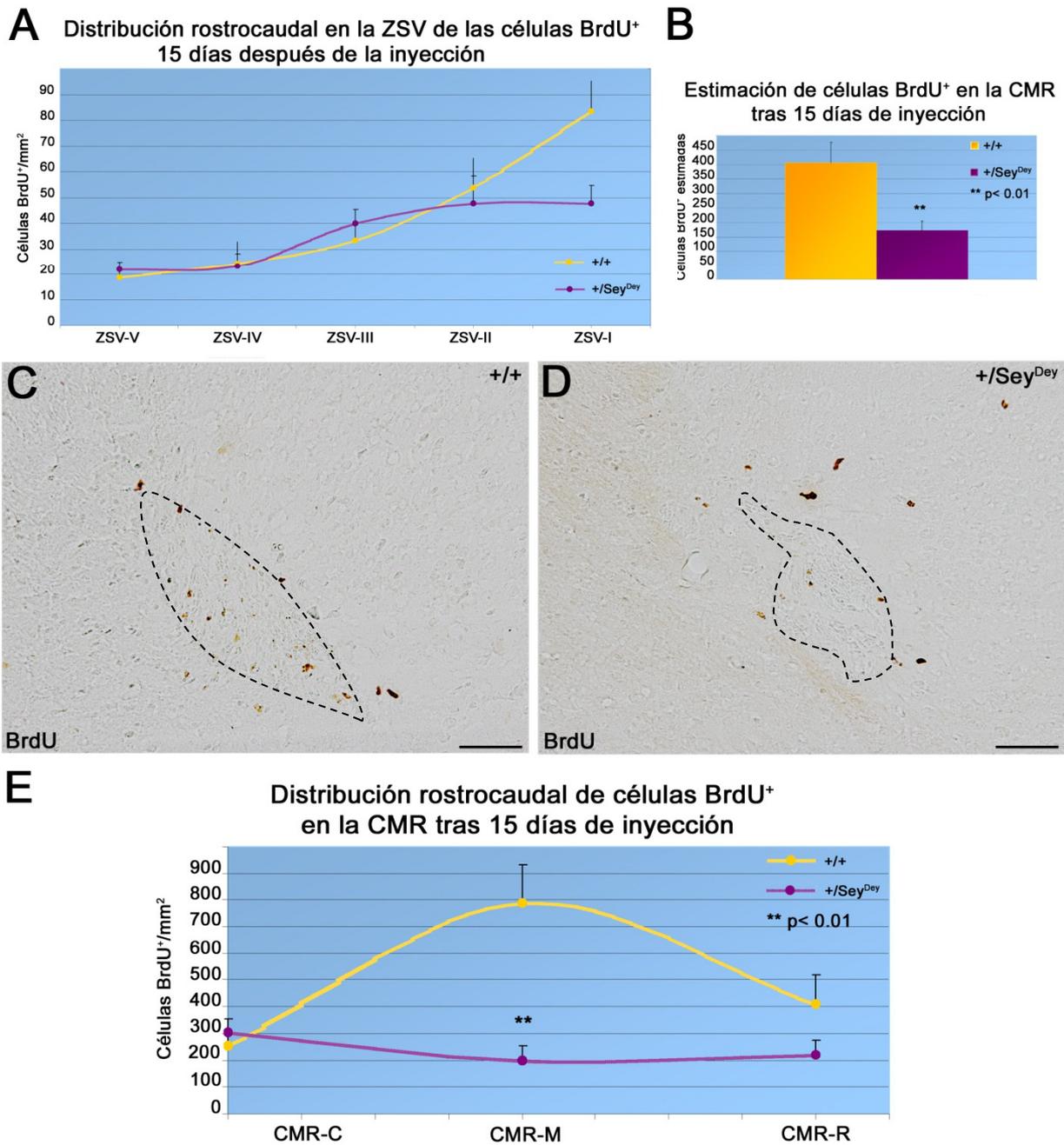
**Figura 8:** Análisis de la capacidad proliferativa de las CMBOPa en flotación. **(A y B)** Neurosferas  $+/+$  **(A)** y  $+/Sey^{Dey}$  **(B)** donde se han marcado las células proliferativas con BrdU (verde) y se han contrateñido con IP (rojo). En el día de pase, las neurosferas  $+/Sey^{Dey}$  presentan tanto un menor número de células totales como proliferativas. **(C)** Cuantificación de la media de células BrdU<sup>+</sup> y de células totales por plano focal de neurosferas  $+/+$  (amarillo) y  $+/Sey^{Dey}$  (morado). **(D)** Porcentaje de células proliferativas en neurosferas  $+/+$  y  $+/Sey^{Dey}$ . Las neurosferas de CMBOPa  $+/Sey^{Dey}$ , pese a estar formadas por un menor número de células, presentan una tasa proliferativa mayor que las  $+/+$ . Barra de escala: 40  $\mu$ m.





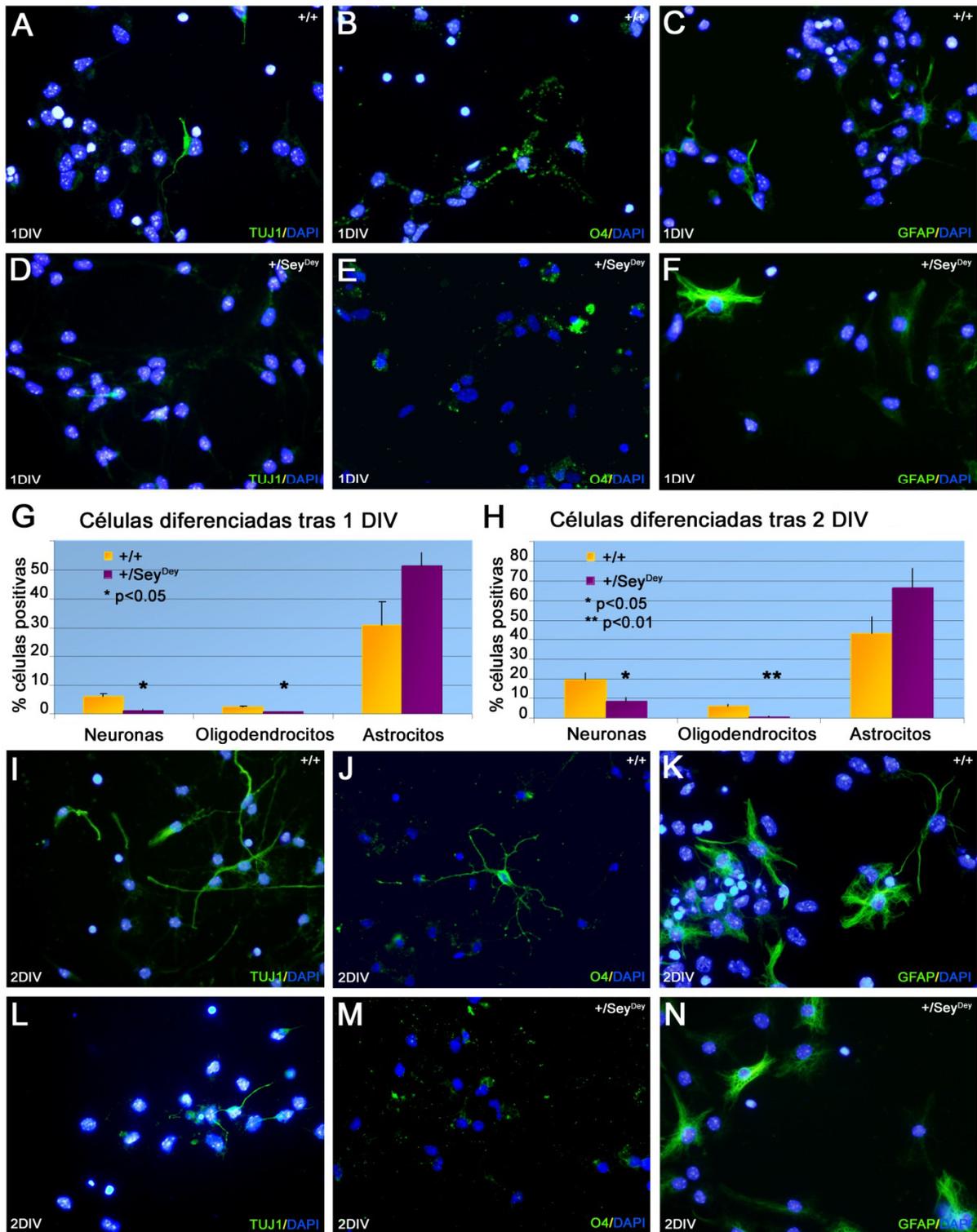
**Figura 9:** Análisis de la capacidad de autorrenovación de las CMBOPa. **(A y B)** Seguimiento de un pocillo de análisis clonal desde el día *in vitro* 1 hasta el DIV 8 en un cultivo +/+ **(A)** y en un cultivo +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)**. **(C y D)** Tras 8 DIV las neuroesferas +/+ **(C)** tienen un tamaño similar a las neuroesferas +/Sey<sup>Dey</sup> **(D)**. **(E-F)** Ejemplos de grupo de 4 a 8 células formado a partir de una célula única **(E)** y de célula aislada viva **(F)** en un cultivo +/Sey<sup>Dey</sup>. **(G)** Porcentaje de generación de células aisladas, dupletes, grupos de 4 a 8 células, total de células únicas que generan grupos de 1 a 8 células y neuroesferas con más de 8 células a partir de células únicas +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. Los precursores +/Sey<sup>Dey</sup> generan una mayor proporción de grupos con menos de 8 células, debida a una mayor generación de células aisladas y de grupos de 4 a 8 células que los +/+. Barra de escala 100 µm.





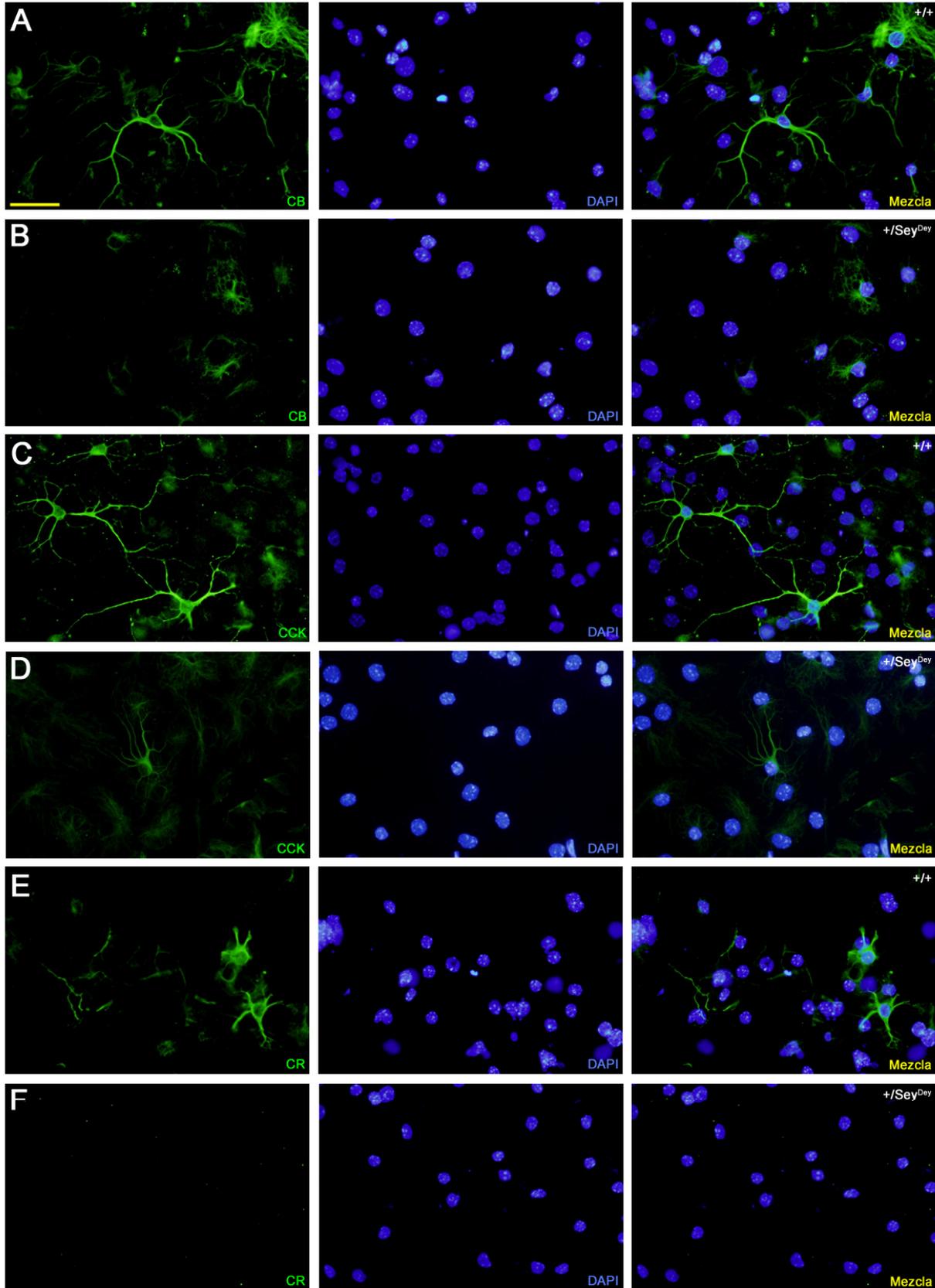
**Figura 10:** Células BrdU<sup>+</sup> en la ZSV y CMR 15 días después de la inyección. **(A)** Gráfica que muestra la distribución rostro-caudal de las células BrdU<sup>+</sup> en los distintos niveles de la ZSV de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. En esta región no se observan diferencias significativas entre los dos grupos experimentales. **(B)** Células BrdU<sup>+</sup> estimadas en la CMR de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. Los animales heterocigotos presentan un número significativamente menor de células BrdU<sup>+</sup> en comparación con los +/+. **(C y D)** Microfotografías de inmunohistoquímicas frente a BrdU del nivel medial de la CMR (línea punteada) de un animal +/+ **(C)** y de un animal +/Sey<sup>Dey</sup> **(D)** en las que se aprecia la disminución del número de células BrdU<sup>+</sup> en el animal +/Sey<sup>Dey</sup> respecto al +/+. **(E)** Distribución rostro-caudal de células BrdU<sup>+</sup> 15 días tras la inyección en los distintos niveles de la CMR. Los animales +/Sey<sup>Dey</sup> tienen una densidad de células positivas significativamente menor que los +/+ en el nivel medial, que no se observa en los otros niveles. **(C-D)** Barra de escala: 50  $\mu$ m.





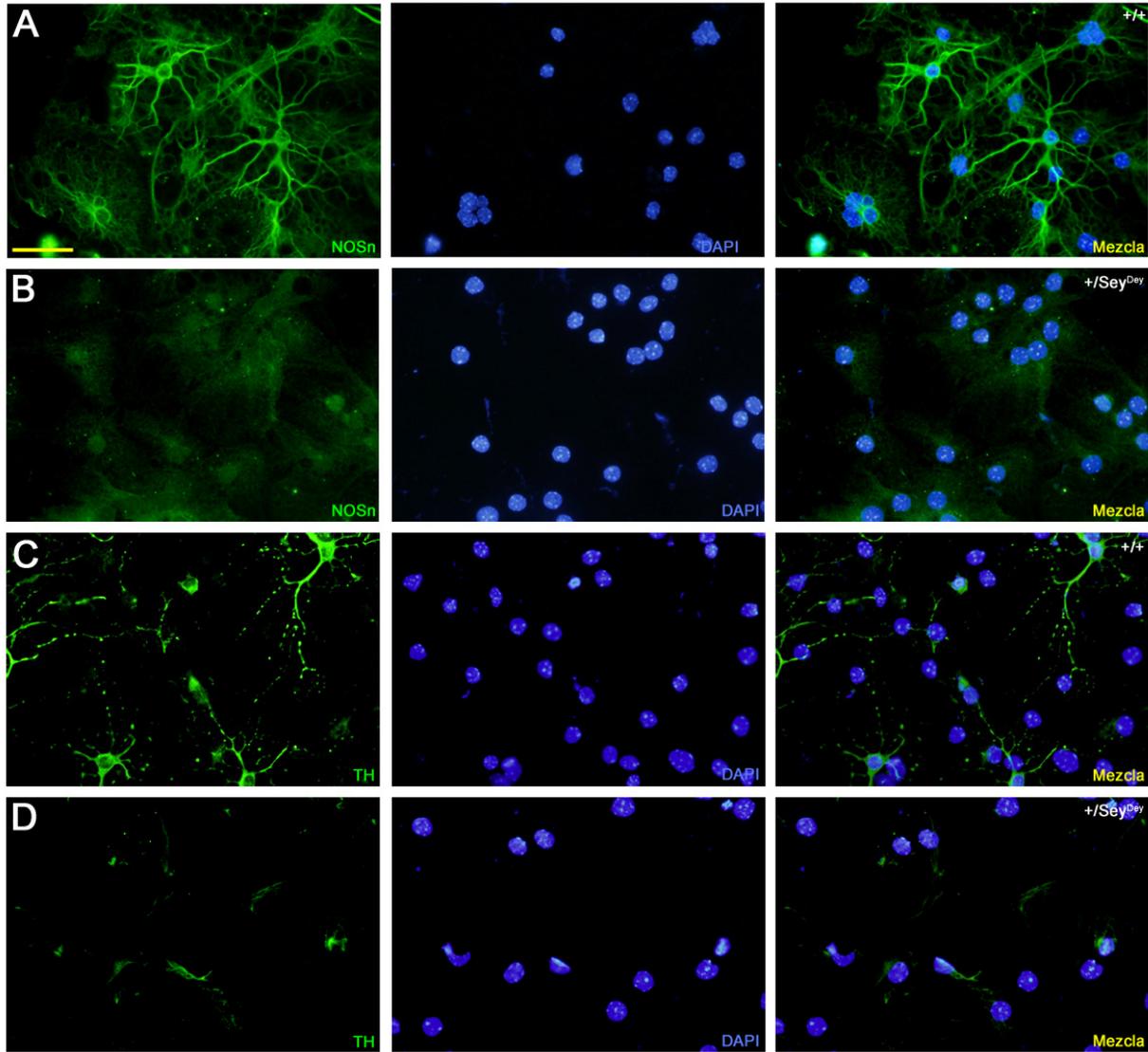
**Figura 11:** Diferenciación de las CMBOPa a neuronas, oligodendrocitos y astrocytos. Diferenciación a neuronas TUJ1<sup>+</sup> (verde) (**A, D, I y L**), oligodendrocitos (O4<sup>+</sup>, verde) (**B, E, J y M**) y astrocytos (GFAP<sup>+</sup>, verde) (**C, F, K y N**) de CMBOPa +/+ (**A-C e I-K**) y +/Sey<sup>Dey</sup> (**D-F y L-N**) tras 1 día en cultivo (**A-F**) ó 2 DIV (**I-N**). (**G-H**) Porcentajes de diferenciación a 1 y 2 DIV representados como número de células positivas para cada marcador respecto a las células totales (DAPI<sup>+</sup>). Nuestros resultados muestran que las CMBOPa de animales +/Sey<sup>Dey</sup> sufren cambios en la diferenciación hacia neuronas y oligodendrocitos.





**Figura 12:** Diferenciación de las CMBOPa a subtipos neuroquímicos de interneuronas del BOP. Diferenciación a neuronas CB<sup>+</sup> (verde) de CMBOPa +/+ (**A**) y +/Sey<sup>Dey</sup> (**B**). Células CCK<sup>+</sup> (verde) formadas a partir de cultivos +/+ (**C**) y +/Sey<sup>Dey</sup> (**D**). Neuronas CR<sup>+</sup> (verde) generadas a partir de células +/+ (**E**) y +/Sey<sup>Dey</sup> (**F**). Barra de escala: 40  $\mu$ m.





### E Diferenciación de subtipos de interneuronas F

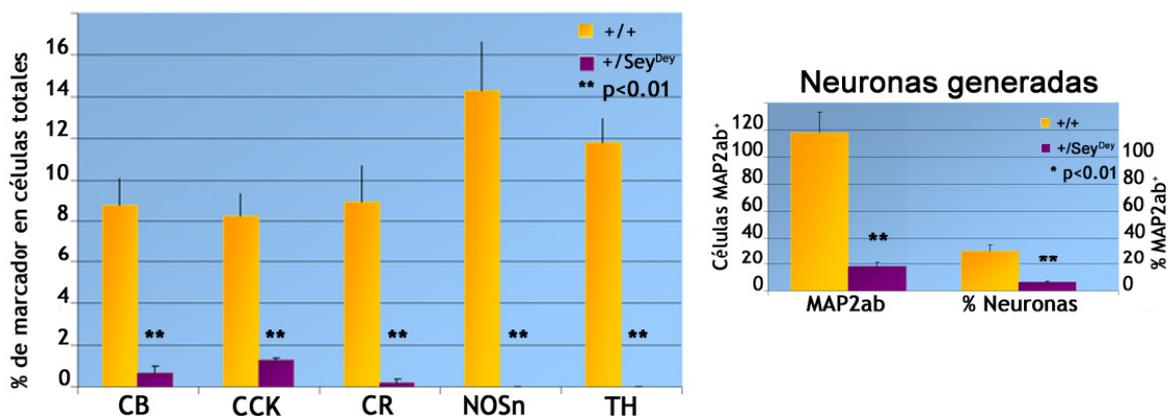


Figura 13: Diferenciación de las CMBOPa a subtipos neuroquímicos de interneuronas del BOP. **(A y B)** Diferenciación a neuronas NOSn<sup>+</sup> (verde) de CMBOPa +/+ **(A)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)**. **(C y D)** Células TH<sup>+</sup> (verde) formadas a partir de cultivos +/+ **(C)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(D)**. **(E)** Cuantificación de la proporción de células de cada subtipo respecto al total en cultivos +/+ (amarillo) y +/Sey<sup>Dey</sup> (morado). **(F)** Cuantificación del número de neuronas (MAP2ab<sup>+</sup>) y de la proporción de neuronas respecto al total de células a partir de células +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. Los resultados muestran que en los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> tanto el porcentaje de neuronas totales como el de cada subtipo neuroquímico está reducido drásticamente respecto a los cultivos control. Barra de escala: 40  $\mu$ m.



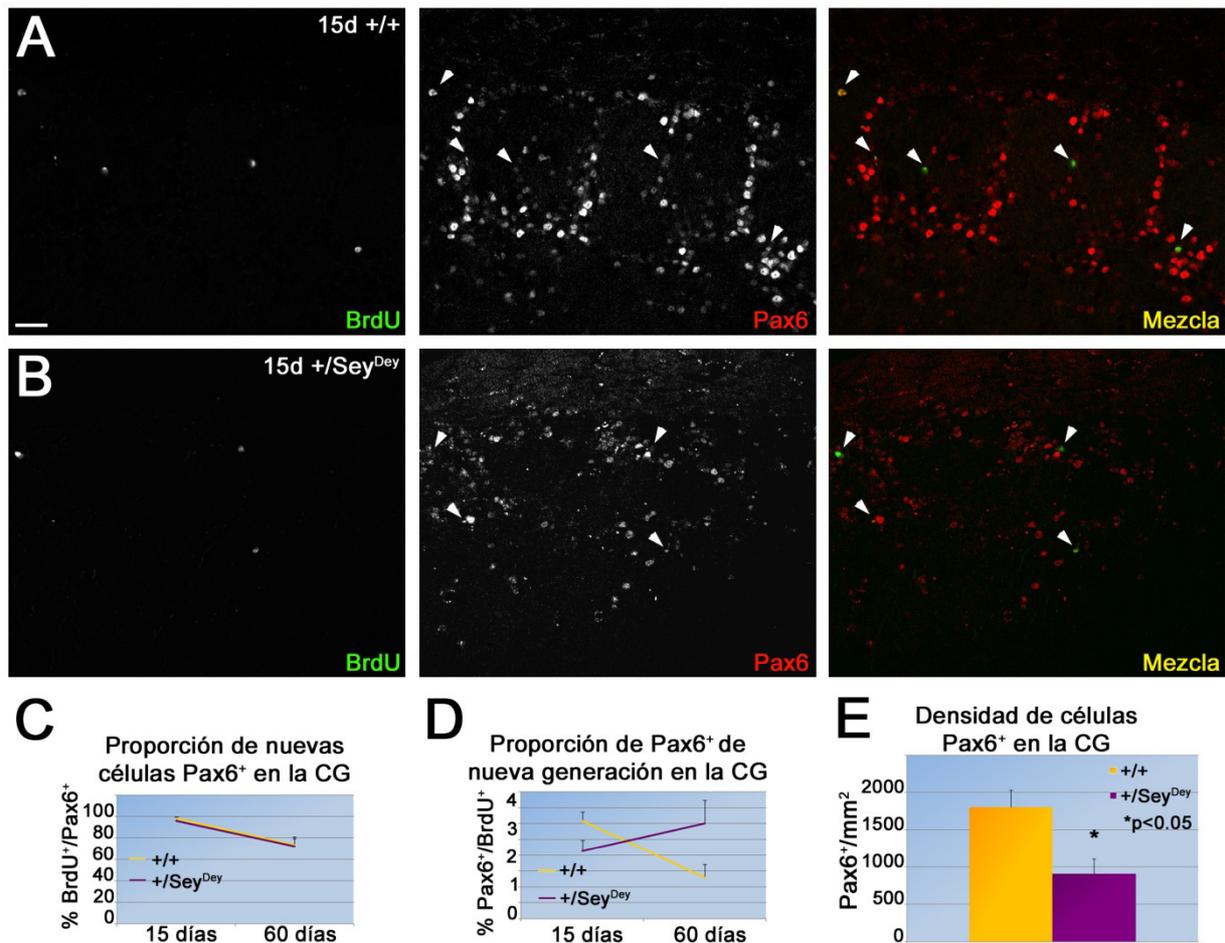
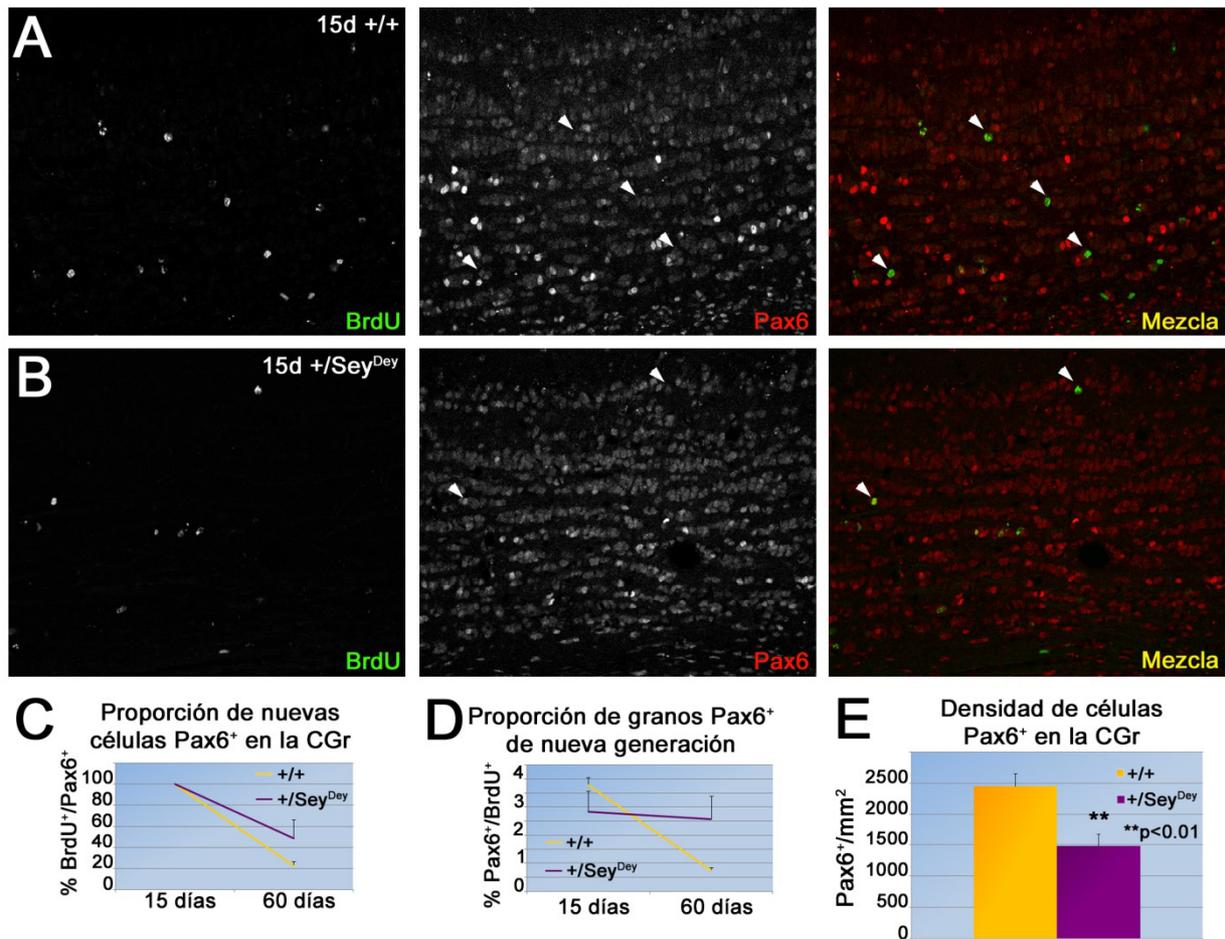


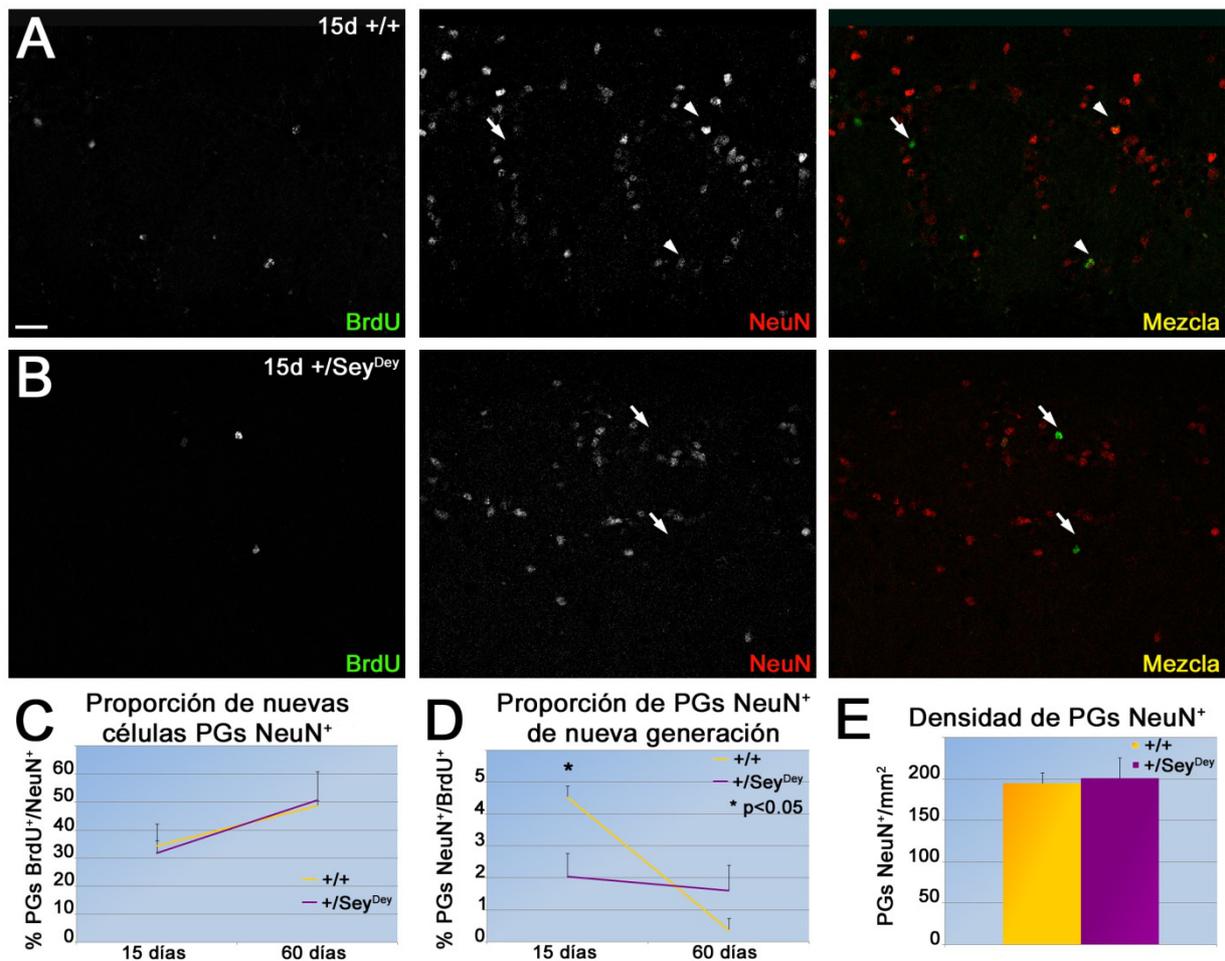
Figura 14: Diferenciación de las células de nueva generación a células Pax6<sup>+</sup> en la CG. **(A y B)** Planos focales de la CG de animales +/+ **(A)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)** de 15 días de supervivencia en los que se detecta BrdU (verde) y Pax6 (rojo). La mayoría de las células de nueva generación colocalizan con Pax6 (puntas de flecha). **(C)** Proporción de nuevas células en la CG de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> a los 15 y 60 días de la inyección de BrdU. **(D)** Proporción de células Pax6<sup>+</sup> de nueva generación en la CG de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> tras 15 y 60 días de inyección. **(E)** Densidad corregida de células Pax6<sup>+</sup> en la CG de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. La densidad de este último grupo es menor. Barra de escala: 40  $\mu$ m.





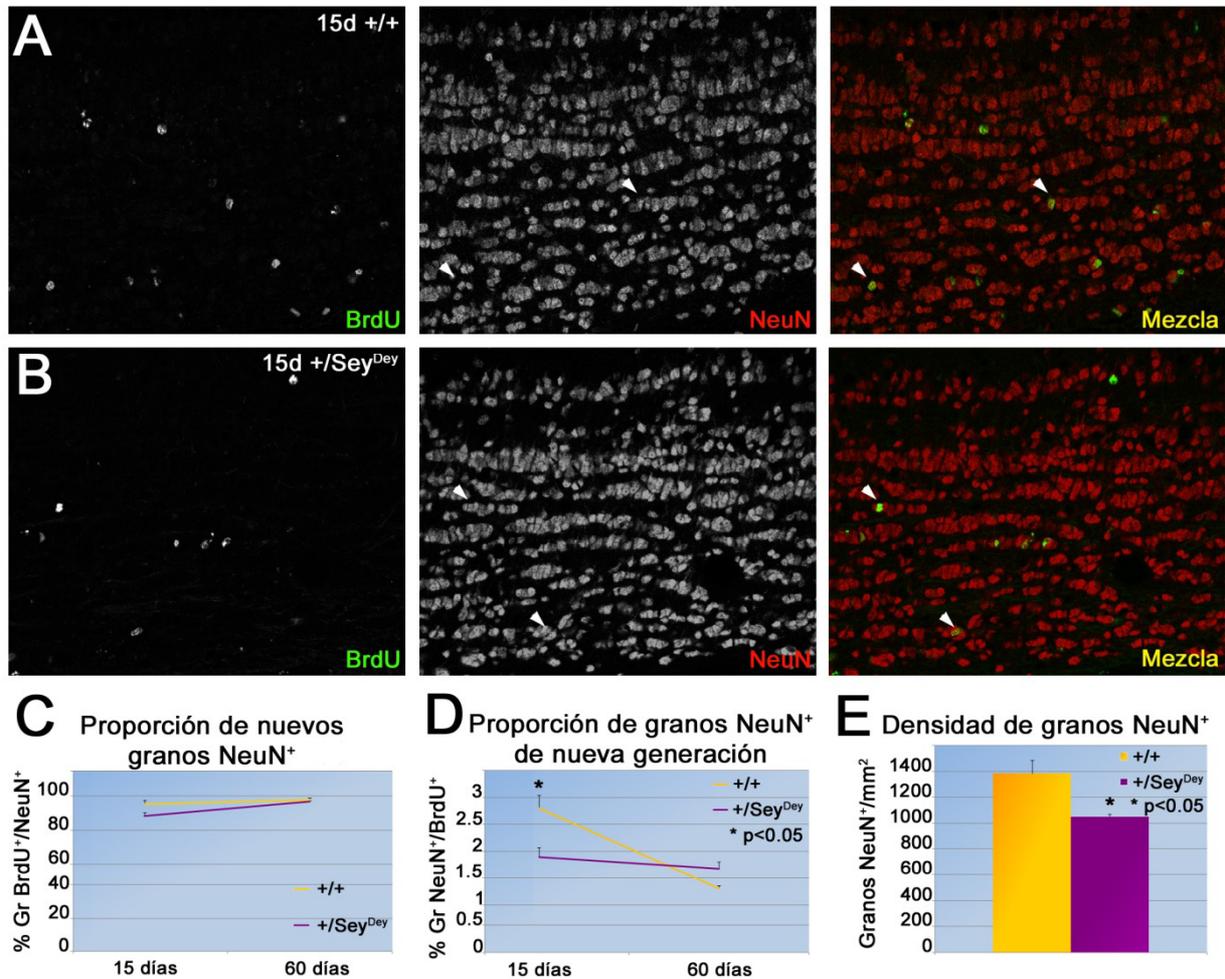
**Figura 15:** Diferenciación de las células de nueva generación a células grano Pax6<sup>+</sup>. **(A y B)** Microfotografías de la capa de los granos de animales +/+ **(A)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)** inyectados con BrdU 15 días antes, en la que se muestran células BrdU<sup>+</sup> (verde) y Pax6<sup>+</sup> (rojo). Puntas de flecha: Células BrdU<sup>+</sup>/Pax6<sup>+</sup>. **(C)** Proporción de nuevas células en la CGr de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> a los 15 y 60 días de la inyección de BrdU. **(D)** Proporción de células Pax6<sup>+</sup> de nueva generación en la CGr de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> tras 15 y 60 días de inyección. **(E)** Densidad corregida de células Pax6<sup>+</sup> en la CGr de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. La densidad de este último grupo es menor.





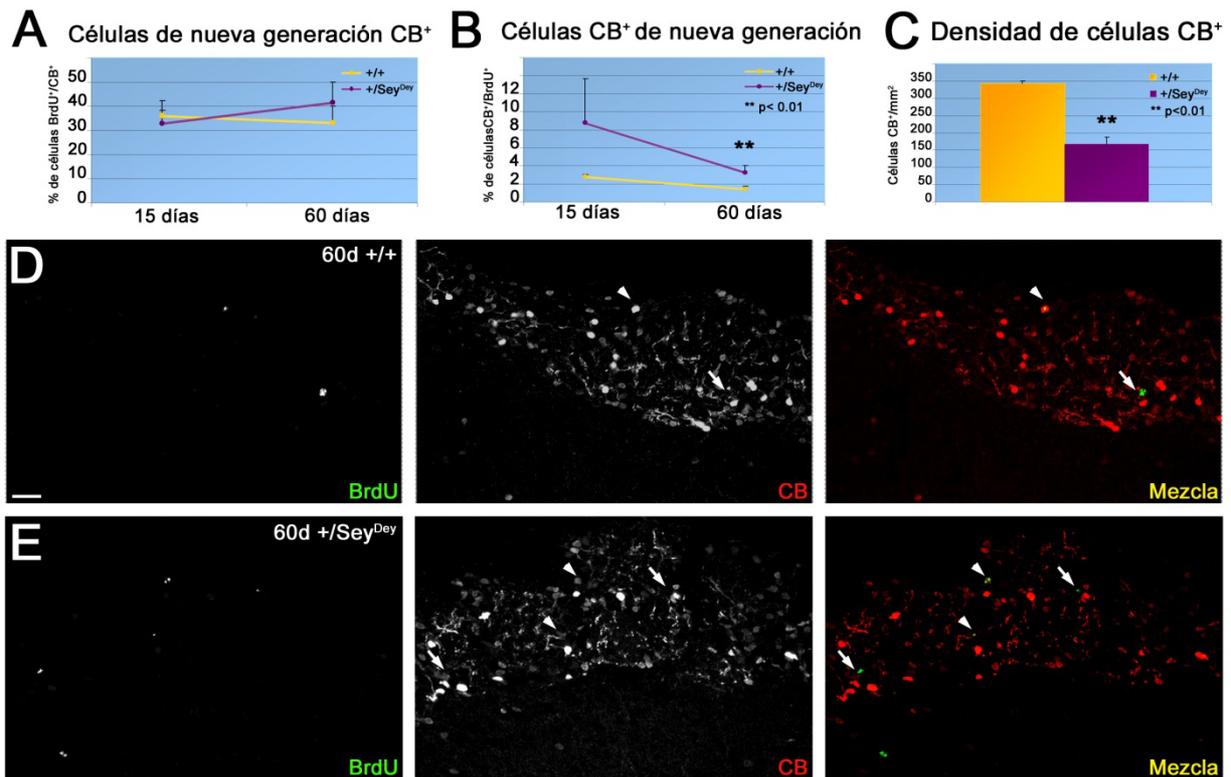
**Figura 16:** Diferenciación de las células de nueva generación a células NeuN<sup>+</sup> del a CG. **(A y B)** Planos focales de la CG de animales +/+ **(A)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)** de 15 días de supervivencia en la que se detectan BrdU (verde, flechas) y NeuN (rojo). El porcentaje de células NeuN<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> (puntas de flecha) a los 15 días es menor en los animales +/Sey<sup>Dey</sup>. **(C)** Proporción de nuevas PGs NeuN<sup>+</sup> en animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> a los 15 y 60 días de la inyección. **(D)** Proporción de PGs NeuN<sup>+</sup> de nueva generación a los 15 y 60 días de la inyección. A los 15 días, los animales +/+ presentan una proporción mayor de PGs NeuN<sup>+</sup> de nueva generación. A los 60 días no hay diferencias significativas. **(E)** Densidad corregida de células NeuN<sup>+</sup> en la CG de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>, que no presenta diferencias significativas. Barra de escala: 40  $\mu$ m.





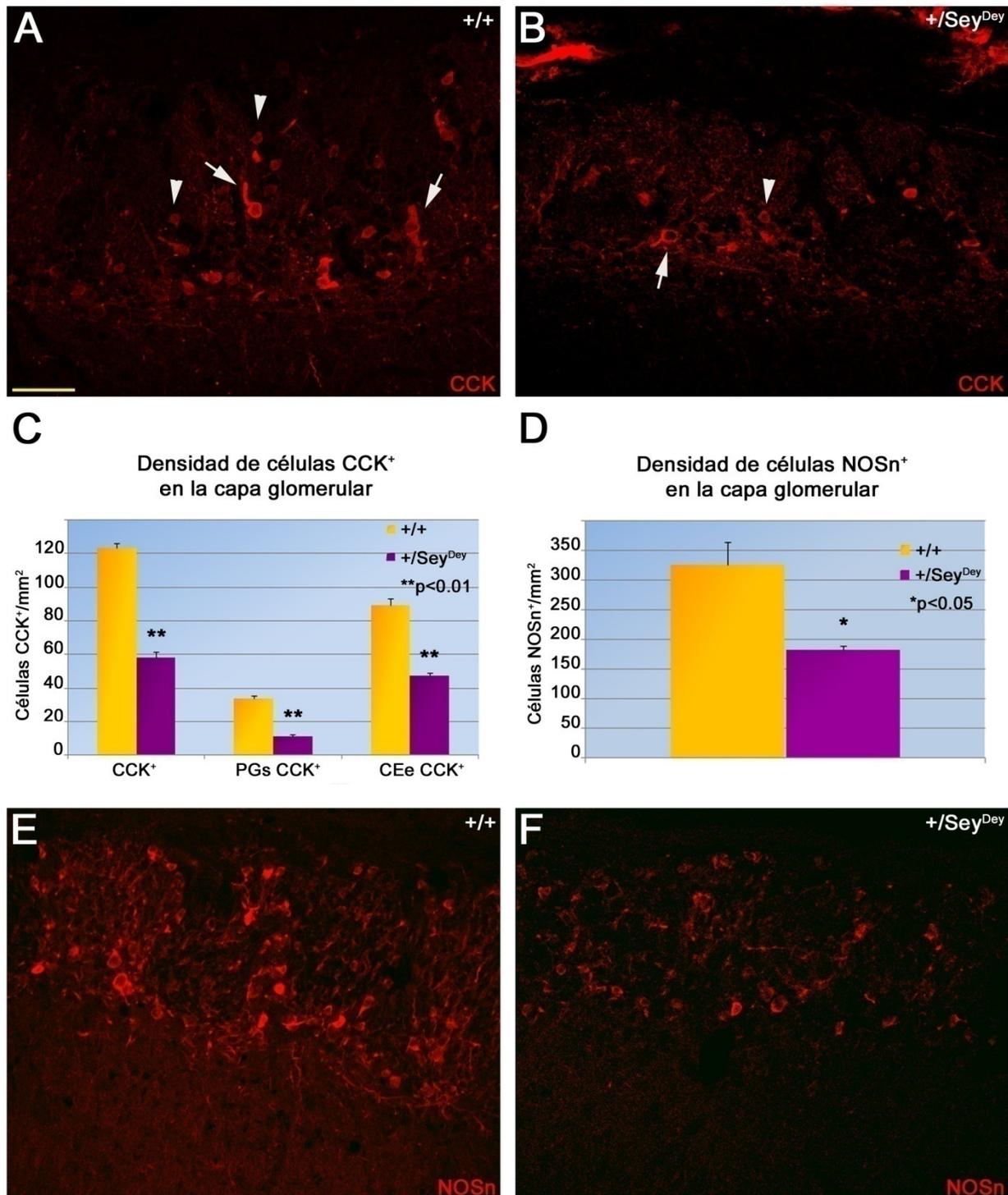
**Figura 17:** Diferenciación de las células de nueva generación a granos NeuN<sup>+</sup>. **(A y B)** Microfotografías de la capa de los granos de animales +/+ **(A)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)** inyectados con BrdU 15 días antes, en la que se muestran células BrdU<sup>+</sup> (verde) y NeuN<sup>+</sup> (rojo) y BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> (puntas de flecha). **(C)** Proporción de nuevos granos NeuN<sup>+</sup> en animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> a los 15 y 60 días de la inyección. **(D)** Proporción de granos NeuN<sup>+</sup> de nueva generación a los 15 y 60 días de la inyección. A los 15 días, los animales +/+ presentan una proporción mayor de células NeuN<sup>+</sup> de nueva generación. A los 60 días no hay diferencias significativas. **(E)** Densidad corregida de células NeuN<sup>+</sup> en la CG de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. La densidad de granos NeuN<sup>+</sup> es menor en los animales +/Sey<sup>Dey</sup> que en los control.





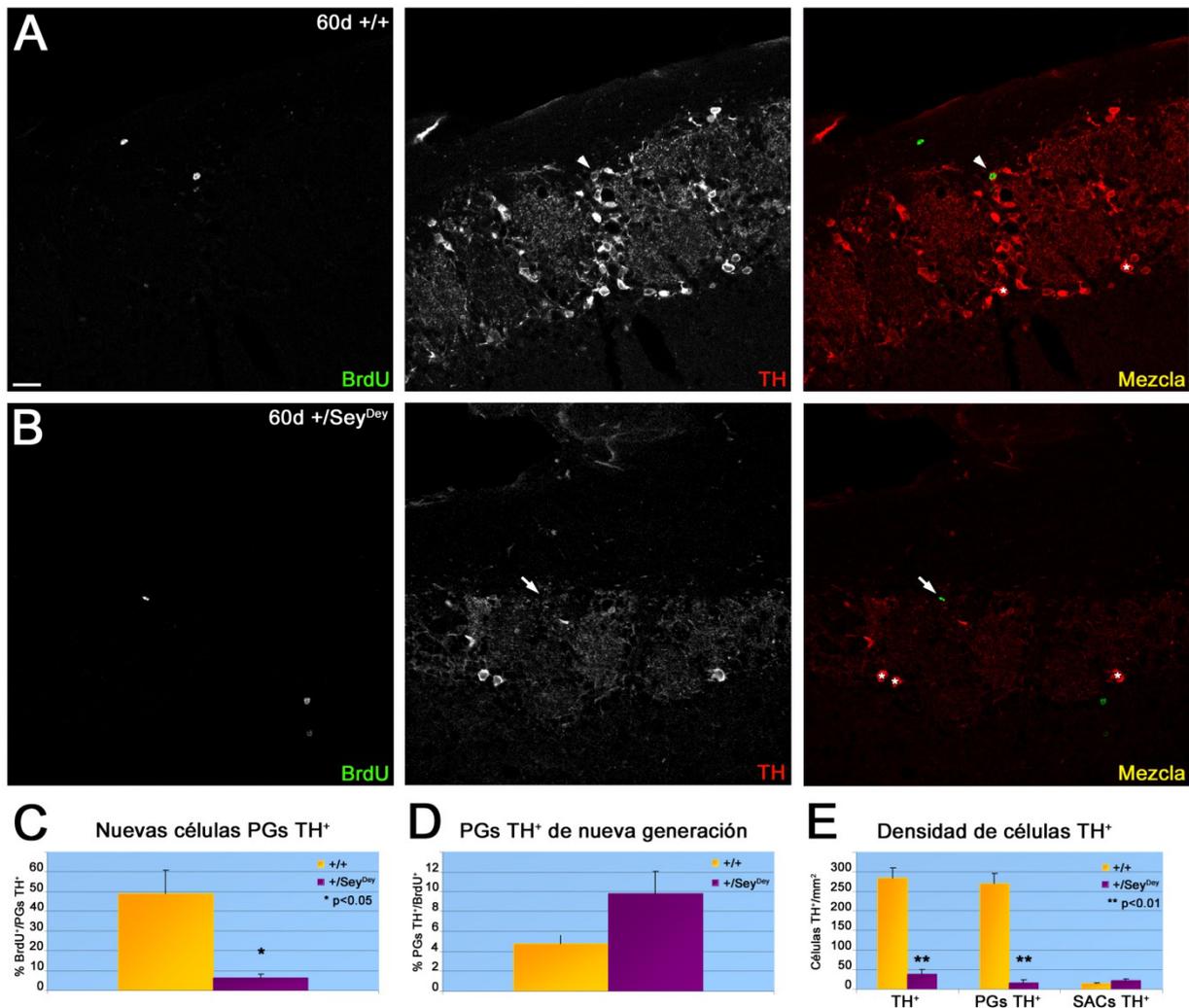
**Figura 18:** Diferenciación de las células de nueva generación a PGs CB<sup>+</sup>. **(A)** Proporción de células BrdU<sup>+</sup> que coexpresan CB 15 y 60 días post-inyección. Los animales +/Sey<sup>Dey</sup> muestran una tendencia hacia el incremento de la colocalización mientras que en los +/+ la proporción se mantiene estable en el tiempo. **(B)** Células CB<sup>+</sup> de nueva generación a los 15 ó 60 días de la inyección de BrdU. Los animales +/Sey<sup>Dey</sup> presentan un mayor porcentaje de células CB<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> a los 60 días de la inyección respecto a los control. **(C)** Densidad de células CB<sup>+</sup> en la CG de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> corregida en función de la pérdida de volumen. En los animales +/Sey<sup>Dey</sup> existe una densidad significativamente menor de PGs CB<sup>+</sup> que en los +/+. **(D y E)** Fotografías obtenidas mediante microscopía laser confocal de la capa glomerular de animales +/+ **(D)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(E)** inyectados con BrdU 60 días antes del sacrificio, en la que se muestran inmunofluorescencias frente a BrdU (verde) y CB (rojo). Algunas células de nueva generación (flechas) son PGs CB<sup>+</sup> (puntas de flecha). Barra de escala: 40  $\mu$ m.





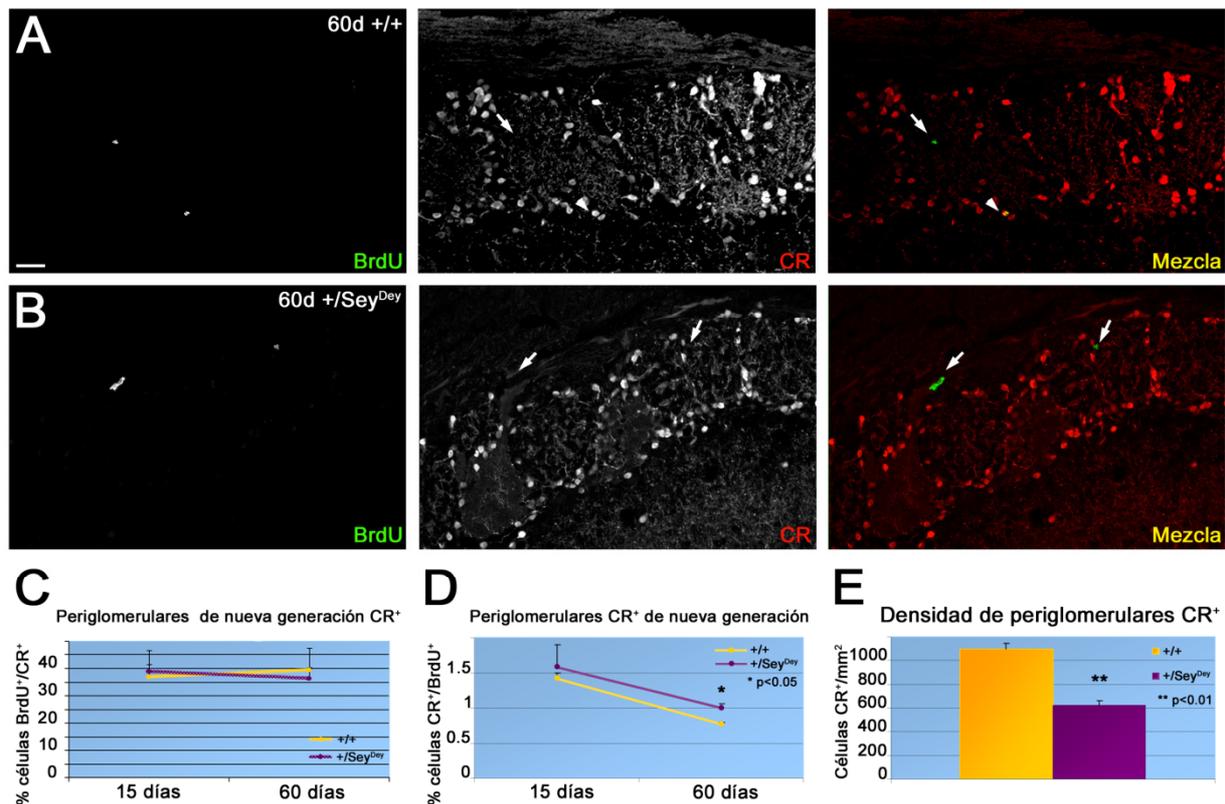
**Figura 19:** Densidad de células CCK<sup>+</sup> y NOSn<sup>+</sup> en la CG. **(A y B)** Inmunofluorescencia para la detección de CCK en la capa glomerular de ratones +/+ **(A)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)**. En las imágenes se observan células periglomerulares (puntas de flecha) y células empenachadas (flechas) CCK<sup>+</sup>. **(C)** Cuantificación de la densidad de células CCK<sup>+</sup> en la CG de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> donde se observa que los animales +/Sey<sup>Dey</sup> presentan una densidad significativamente menor de células CCK<sup>+</sup> respecto a los animales +/+. **(D)** Cuantificación de células NOSn<sup>+</sup> en animales control y heterocigotos, en la que se aprecia una disminución de la densidad de este subtipo neuroquímico de células yuxtglomerulares en los animales heterocigotos en comparación con los control. **(E-F)** Detección de NOSn en la CG de animales +/+ **(E)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(F)**. Barra de escala: 75  $\mu$ m.





**Figura 20:** Diferenciación de las células de nueva generación a TH<sup>+</sup>. **(A-B)** Detección de BrdU (verde) y TH (rojo) en animales +/+ **(A)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)** 60 días después de la inyección. Algunas células de nueva generación (BrdU<sup>+</sup>) se diferencian a PGs TH<sup>+</sup> (punta de flecha), pero no a SACs TH<sup>+</sup> (asteriscos). Los heterocigotos presentan baja proporción de células diferenciadas a PGs TH<sup>+</sup> y una gran disminución de su densidad. **(C)** Proporción de células BrdU<sup>+</sup> diferenciadas a PGs dopaminérgicas. El porcentaje de diferenciación es mucho menor en los animales /Sey<sup>Dey</sup>. **(D)** Proporción de células PGs TH<sup>+</sup> de nueva generación. No existen diferencias significativas entre los dos tipos de animales. **(E)** Densidad de células dopaminérgicas totales, de PGs TH<sup>+</sup> y de SAC TH<sup>+</sup> en la CG de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. Mientras que la densidad de SACs TH<sup>+</sup> es similar entre los dos grupos de animales, la densidad de células yuxtaglomerulares dopaminérgicas así como la densidad de PGs TH<sup>+</sup> es menor en los animales +/Sey<sup>Dey</sup>. Barra de escala: 40  $\mu$ m.





**Figura 21:** Diferenciación de las células de nueva generación a PGs CR<sup>+</sup>. **(A-B)** Microfotografías de microscopio confocal de la CG de animales +/+ **(A)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)** de 60 días de supervivencia tras la inyección de BrdU en la que se detectan células positivas a BrdU (verde) y CR (rojo). Algunas células de nueva generación (BrdU<sup>+</sup>, flechas) colocalizan con CR (puntas de flecha). Se observa una disminución de la densidad de PGs CR<sup>+</sup> en los heterocigotos. **(C)** Proporción de células BrdU<sup>+</sup> que coexpresan CR en la CG a los 15 y 60 días de la inyección de BrdU. **(D)** Proporción de células PGs CR<sup>+</sup> en animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> a los 15 y 60 días después de la inyección. Los animales heterocigotos presentan una mayor proporción de PGs CR<sup>+</sup> de nueva generación a los 60 días, aunque la tendencia de la supervivencia, es decir, la pendiente de la gráfica, es similar a la de los animales control. **(E)** Densidad corregida en función de la pérdida de volumen de células CR<sup>+</sup> en la CG de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. La densidad en este último grupo es significativamente menor. Barra de escala: 40  $\mu$ m.



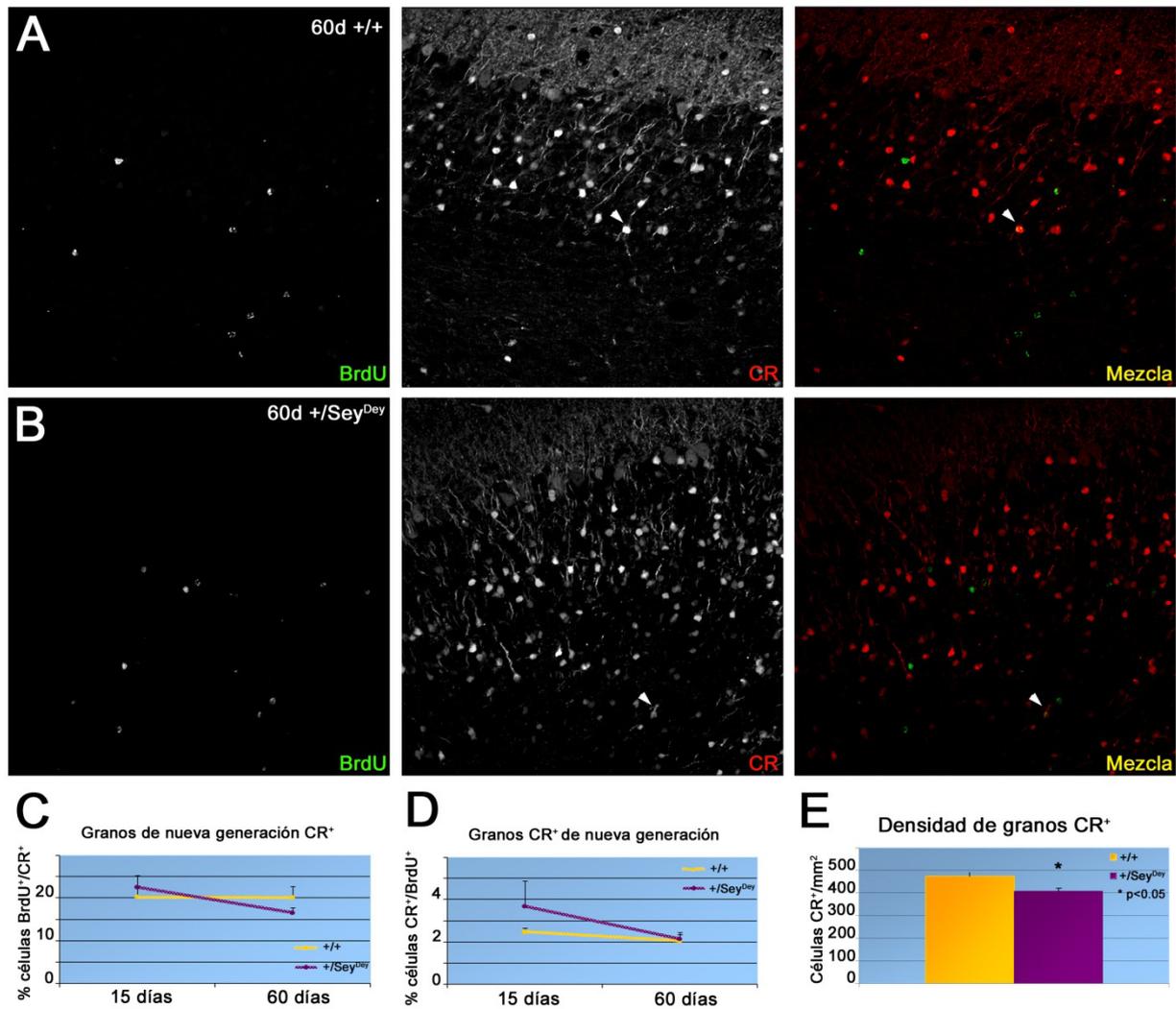
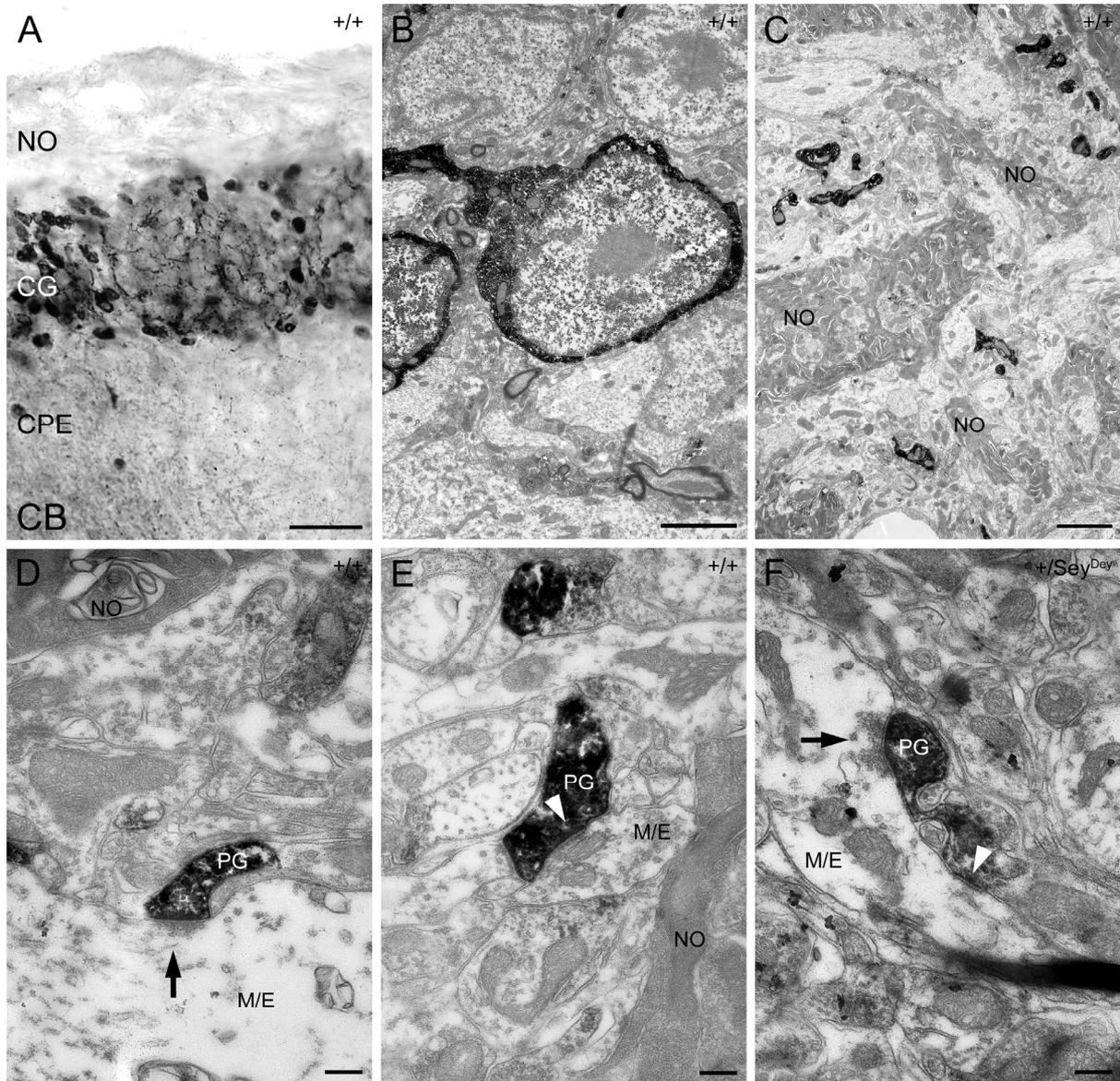


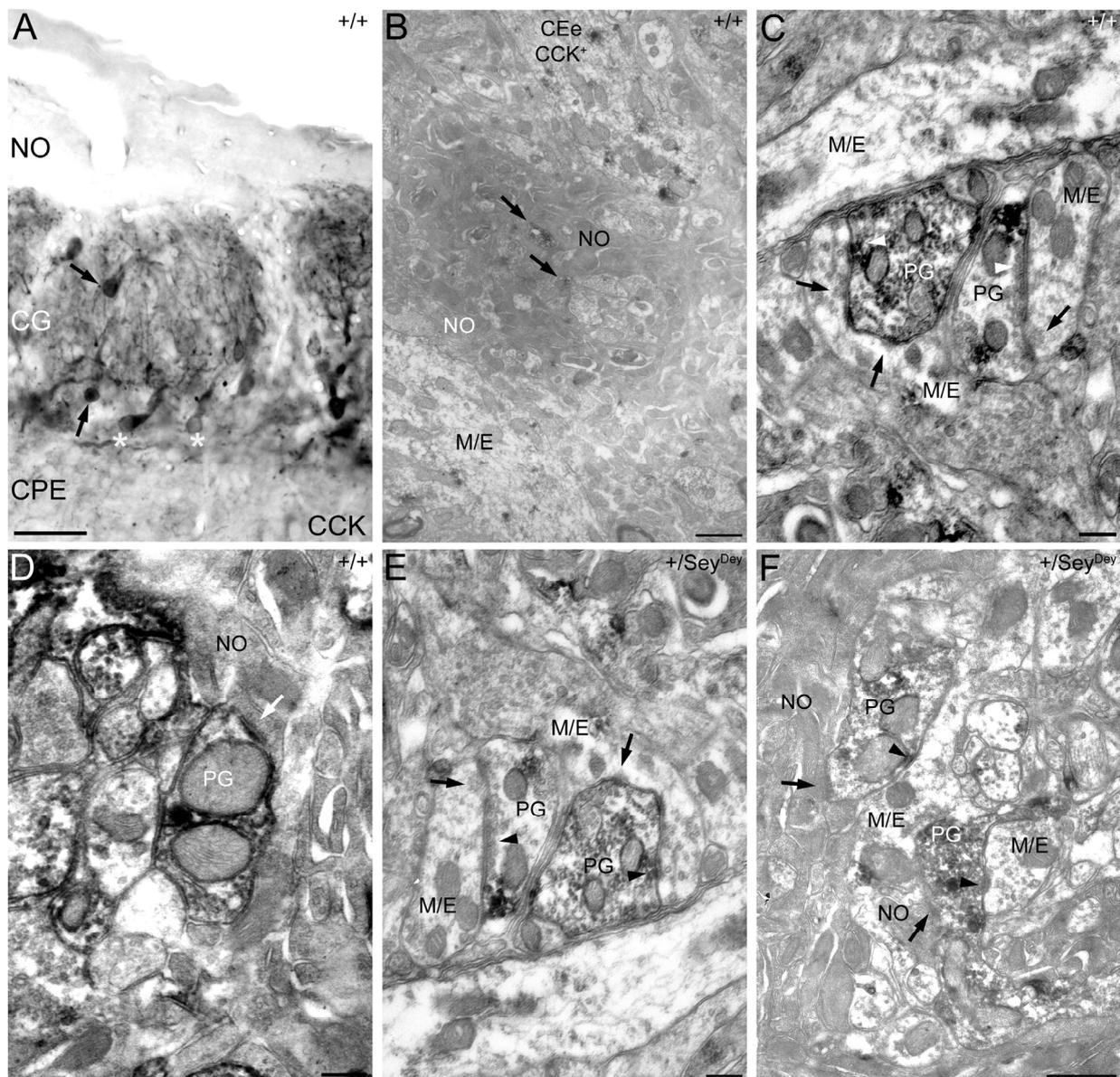
Figura 22: Diferenciación de las células de nueva generación a granos CR<sup>+</sup>. **(A-B)** Microfotografías de la capa de los granos de animales +/+ **(A)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)** inyectados con BrdU 60 días antes del sacrificio, en la que se muestran células BrdU<sup>+</sup> (verde) y CR<sup>+</sup> (rojo) y células BrdU<sup>+</sup>/CR<sup>+</sup> (puntas de flecha). Se observa una menor densidad de granos CR<sup>+</sup> en los animales +/Sey<sup>Dey</sup>. **(C)** Proporción de células de nueva generación en la CGr CR<sup>+</sup> en animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> a los 15 y 60 días después de la inyección. **(D)** Proporción de granos CR<sup>+</sup> de nueva generación. **(E)** Densidad corregida en función de la pérdida de volumen de células CR<sup>+</sup> en la CGr de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. La densidad de los heterocigotos es significativamente menor.





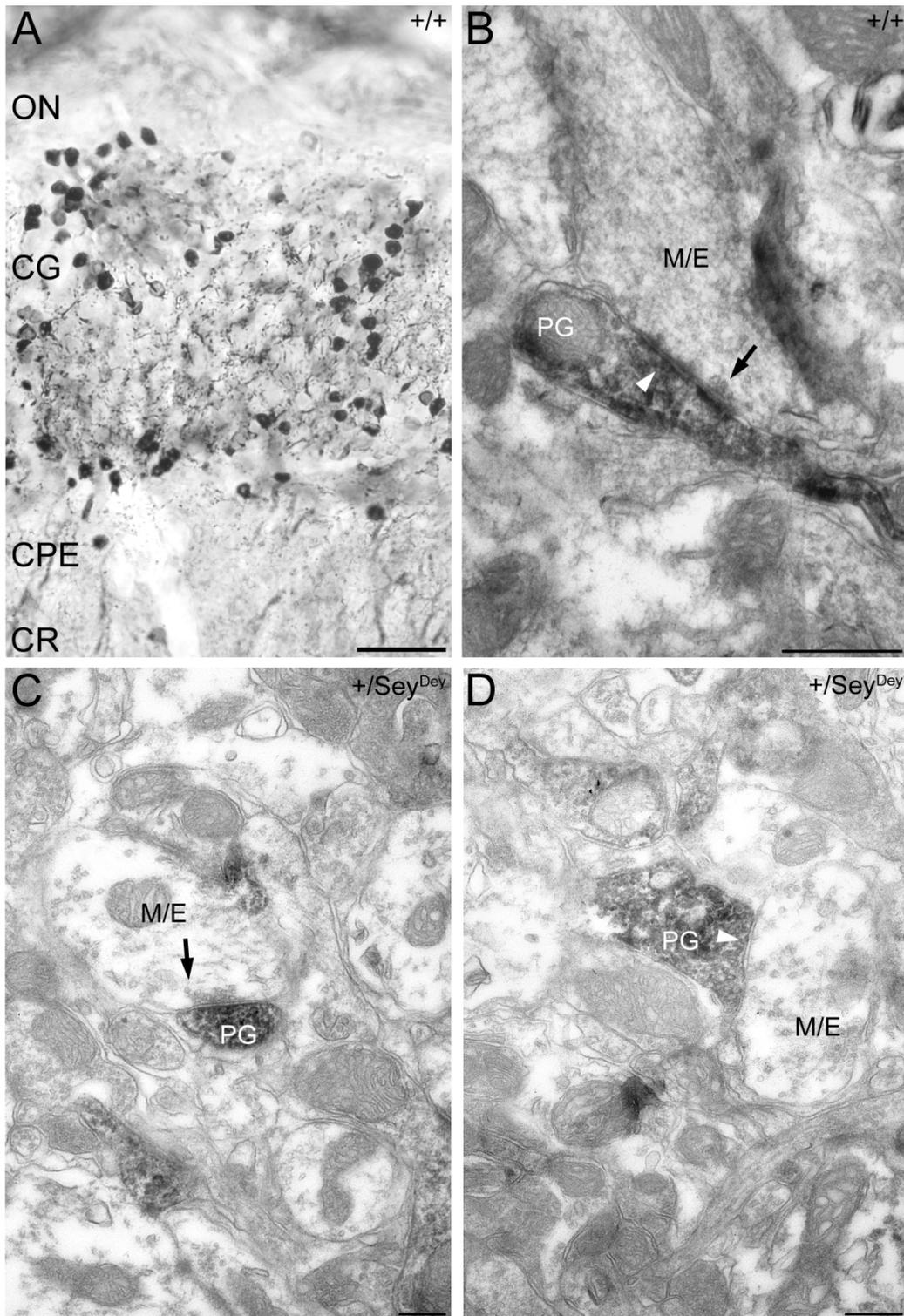
**Figura 23:** Conectividad de las células periglomerulares CB<sup>+</sup>. **(A)** Microfotografía de la CG teñida contra CB. El único tipo celular positivo para este marcador son PGs. **(B)** Ultraestructura de un soma de una PG CB<sup>+</sup>. **(C)** Panorámica a MET del neuropilo glomerular en la que se observa la distribución de los perfiles CB<sup>+</sup> (muy electrodensos) preferentemente fuera de las regiones ocupadas por el NO. **(D)** PG CB<sup>+</sup> recibiendo un contacto asimétrico (flecha) de una M/E en un animal +/+. **(E)** PG CB<sup>+</sup> realizando un contacto simétrico con una M/E (punta de flecha) en un animal +/+. **(F)** PG CB<sup>+</sup> de un animal +/Sey<sup>Dev</sup> recibiendo una sinapsis asimétrica de una M/E (flecha) y haciendo un contacto simétrico con la misma (punta de flecha). **(A)** Barra de escala: 20  $\mu$ m. **(B y C)** Barra de escala: 2  $\mu$ m. **(D-F)** Barra de escala: 200 nm.





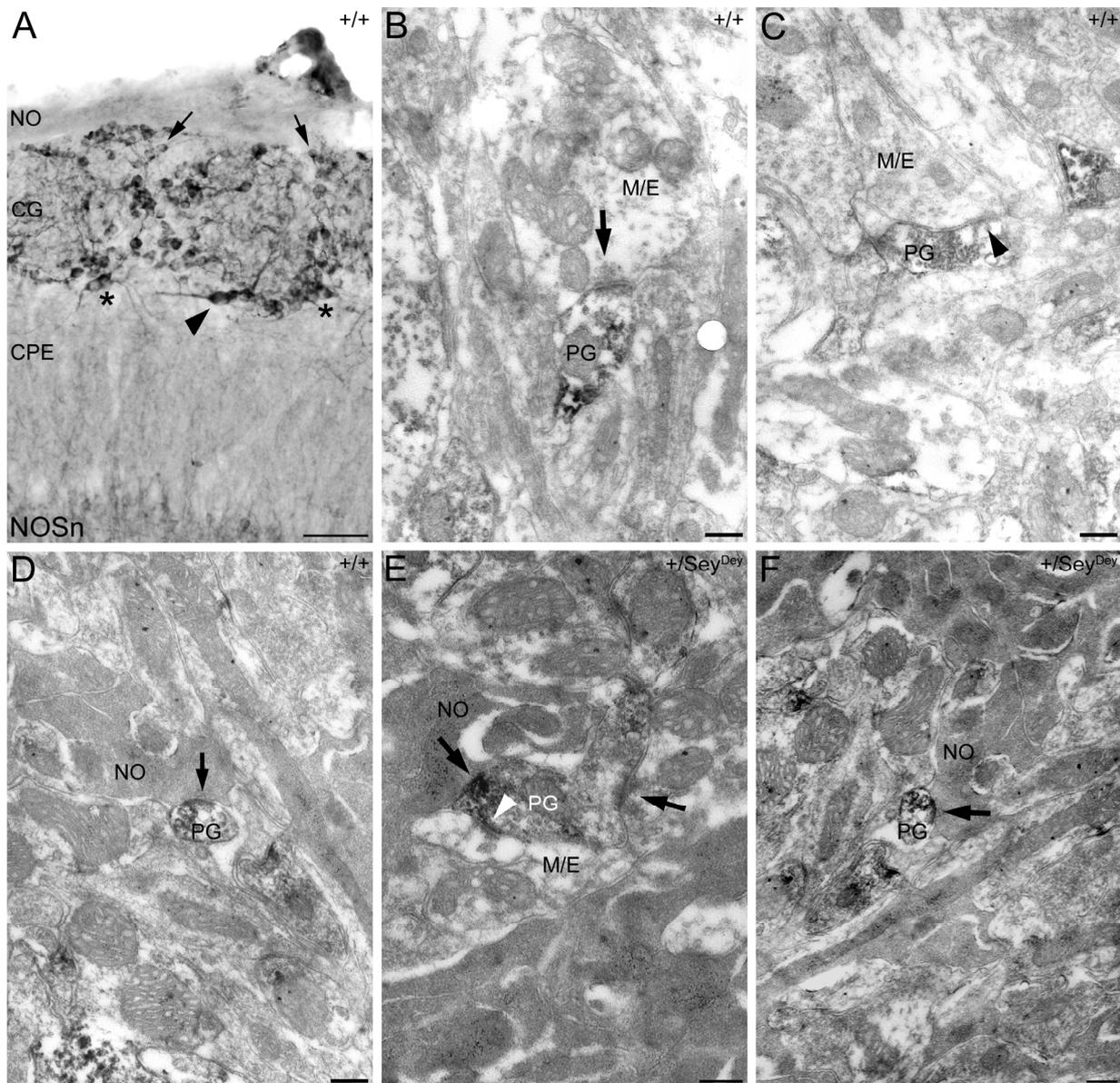
**Figura 24:** Conectividad de las células periglomerulares CCK<sup>+</sup>. **(A)** Microfotografía de un glomérulo +/+ en la que se detecta CCK y se observan células PGs CCK<sup>+</sup> (flechas) y células empenachadas externas (asteriscos). **(B)** Panorámica a MET del neuropilo glomerular en la que se aprecia la distribución de los perfiles CCK<sup>+</sup> tanto en el compartimento del NO (flechas) como en el no-NO. **(C)** PGs CCK<sup>+</sup> de una animal +/+ realizando un contacto simétrico con perfiles de M/Es (punta de flecha) y recibiendo sinapsis asimétricas de las mismas (flechas). Algunos de estos contactos son recíprocos. **(D)** Perfil de PG CCK<sup>+</sup> de un animal +/+ recibiendo sinapsis del NO (flecha). **(E)** Gémulas de PGs CCK<sup>+</sup> de una animal +/Sey<sup>Dev</sup> que son elementos postsinápticos asimétricos de contactos con M/Es (flechas) y realizan contactos simétricos con M/Es (puntas de flecha). Algunas de las sinapsis son recíprocas. **(F)** Dendritas de PGs CCK<sup>+</sup> que reciben sinapsis del NO y realizan contactos simétricos con M/Es en un animal +/Sey<sup>Dev</sup>. **(A)** Barra de escala: 20  $\mu$ m. **(B)** Barra de escala: 1  $\mu$ m. **(C-E)** Barra de escala: 200 nm. **(F)** Barra de escala: 500 nm.





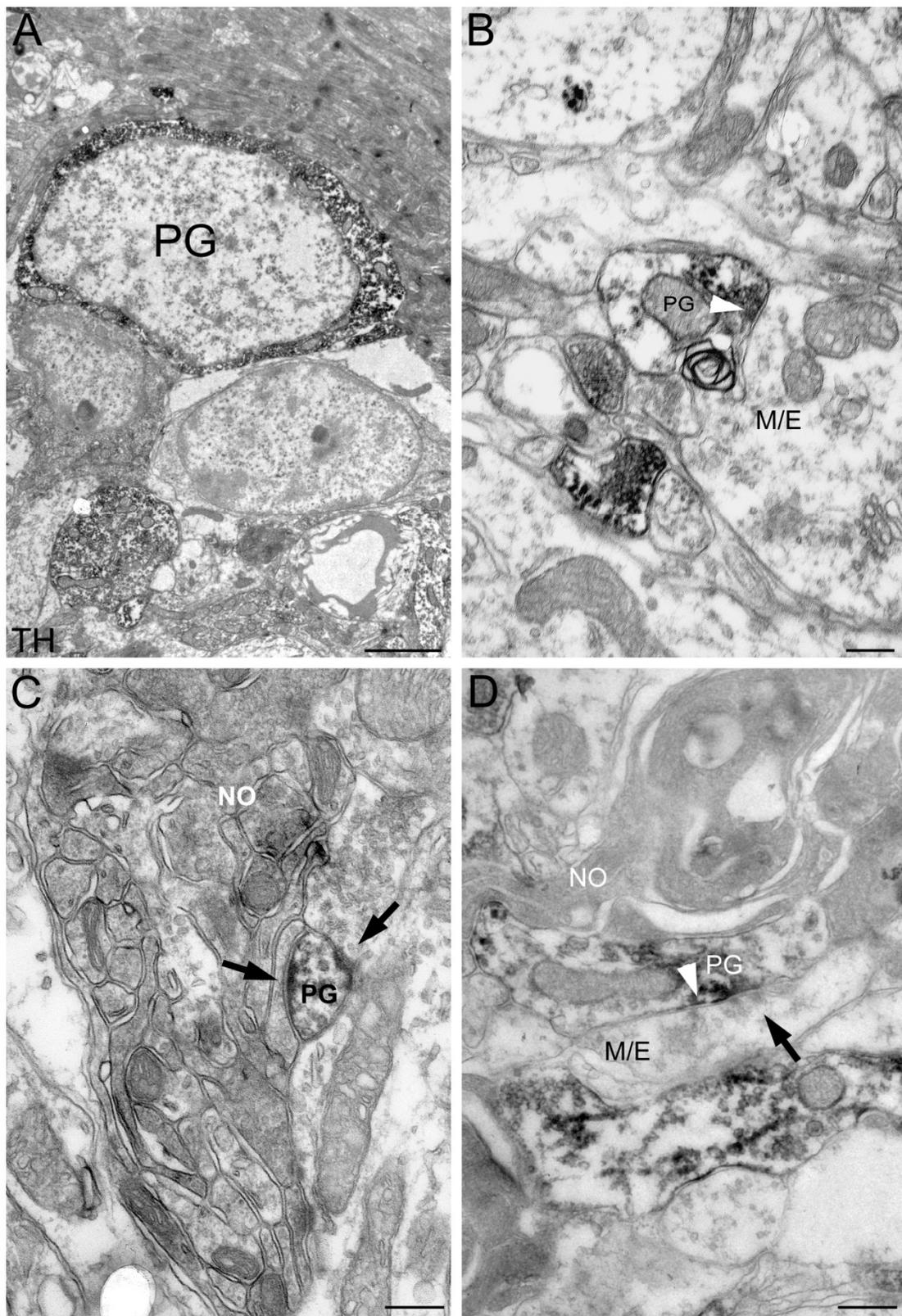
**Figura 25:** Conectividad de las células periglomerulares CR<sup>+</sup>. **(A)** Microfotografía de un glomérulo +/+ teñido contra CR en el que se observan células PGs CR<sup>+</sup>. **(B)** Gémula de PG CR<sup>+</sup> de un animal +/+ realizando una sinapsis recíproca con una M/E (sinapsis simétrica: punta de flecha; sinapsis asimétrica: flecha). **(C)** PG CR<sup>+</sup> de un animal +/Sey<sup>Dey</sup> recibiendo un contacto asimétrico de una M/Es (flecha). **(D)** Dendrita de una PG CR<sup>+</sup> de un animal +/Sey<sup>Dey</sup> que realiza un contacto simétrico con una M/E (punta de flecha). **(A)** Barra de escala: 20  $\mu$ m. **(B)** Barra de escala: 500 nm. **(C y D)** Barra de escala: 200 nm.





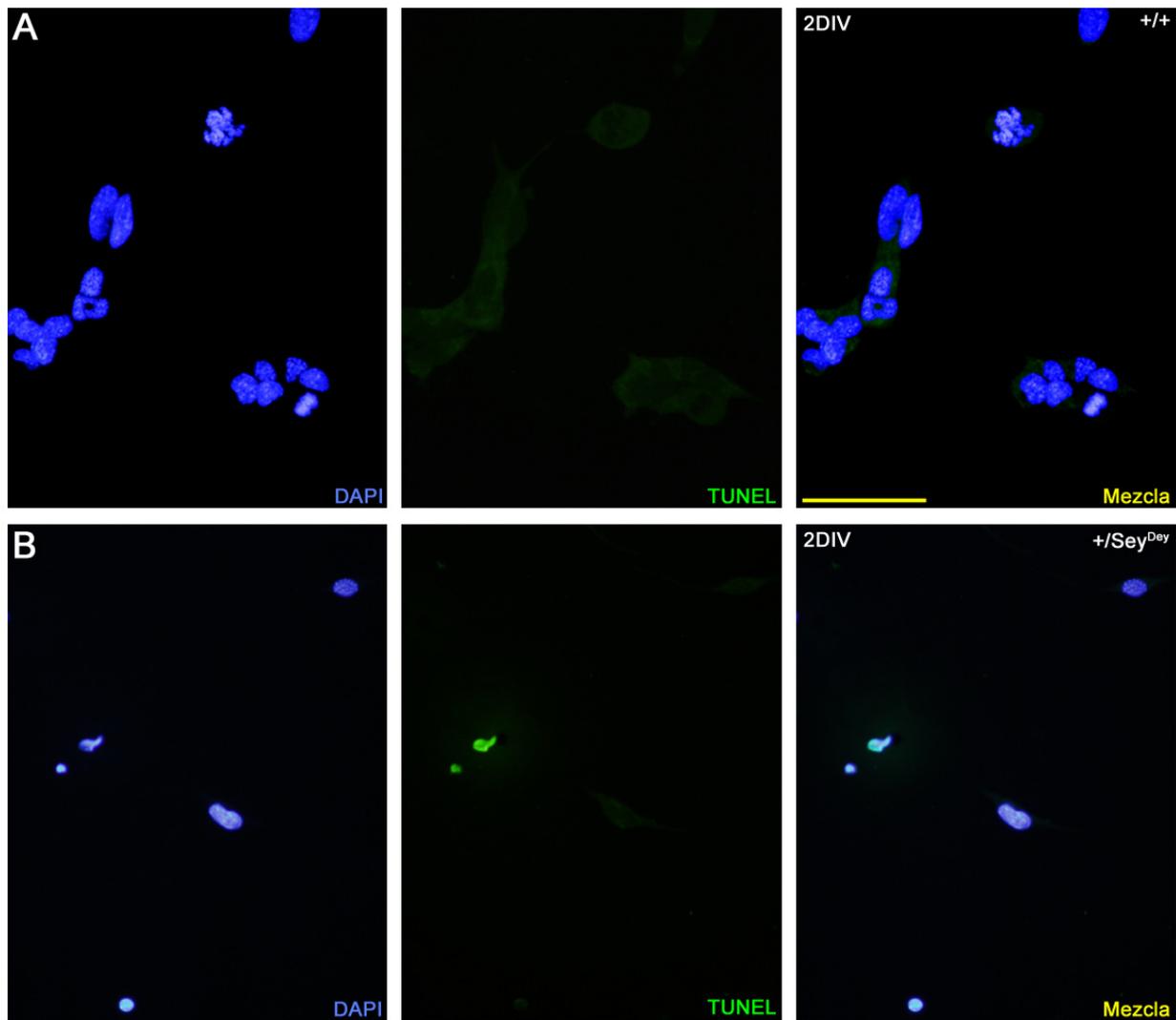
**Figura 26:** Conectividad de las células periglomerulares NOSn<sup>+</sup>. **(A)** Fotografía de microscopía óptica de los elementos positivos para NOSn en la CG de un ratón +/+. Los tipos celulares positivos son células empenachadas externas (puntas de flecha), células superficiales de axón corto (asteriscos) y células periglomerulares (flechas). **(B)** Célula M/E realizando un contacto asimétrico (flecha) sobre una gémula de PG NOSn<sup>+</sup> en un animal +/+. **(C)** Célula PG NOSn<sup>+</sup> de un animal +/+ que hace contacto simétrico con una M/E (punta de flecha). **(D)** Gémula de una PG NOSn<sup>+</sup> de un animal +/+ que recibe una sinapsis de un terminal del NO (flecha). **(E)** Gémula de una PG NOSn<sup>+</sup> de un animal +/Sey<sup>Dey</sup> que recibe sinapsis asimétricas del NO y de una M/E (flechas) y a su vez hace sinapsis sobre una M/E (punta de flecha). **(F)** PG NOSn<sup>+</sup> de un animal +/Sey<sup>Dey</sup> que recibe una sinapsis del NO (flecha). **(A)** Barra de escala: 20  $\mu$ m. **(B-F)** Barra de escala: 200 nm.



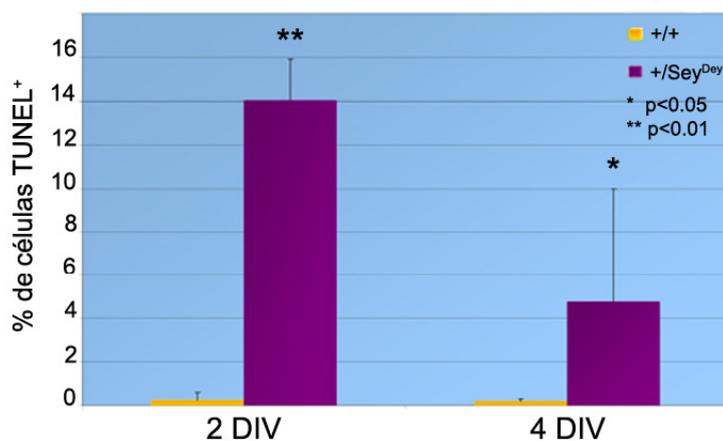


**Figura 27:** Conectividad de las células periglomerulares TH<sup>+</sup> **(A)** Ultraestructura del soma de una PG TH<sup>+</sup>, con el anillo estrecho de citoplasma característico de este tipo celular. **(B)** Gémula de una PG TH<sup>+</sup> realizando un contacto simétrico con una M/E (punta de flecha). **(C)** Terminales del NO realizando contactos asimétricos con una dendrita de PG TH<sup>+</sup> (flechas). **(D)** Perfil de PG TH<sup>+</sup> realizando sinapsis recíproca con una M/E (flecha y punta de flecha). **(A)** Barra de escala: 2  $\mu$ m. **(B-D)** Barra de escala: 200 nm.



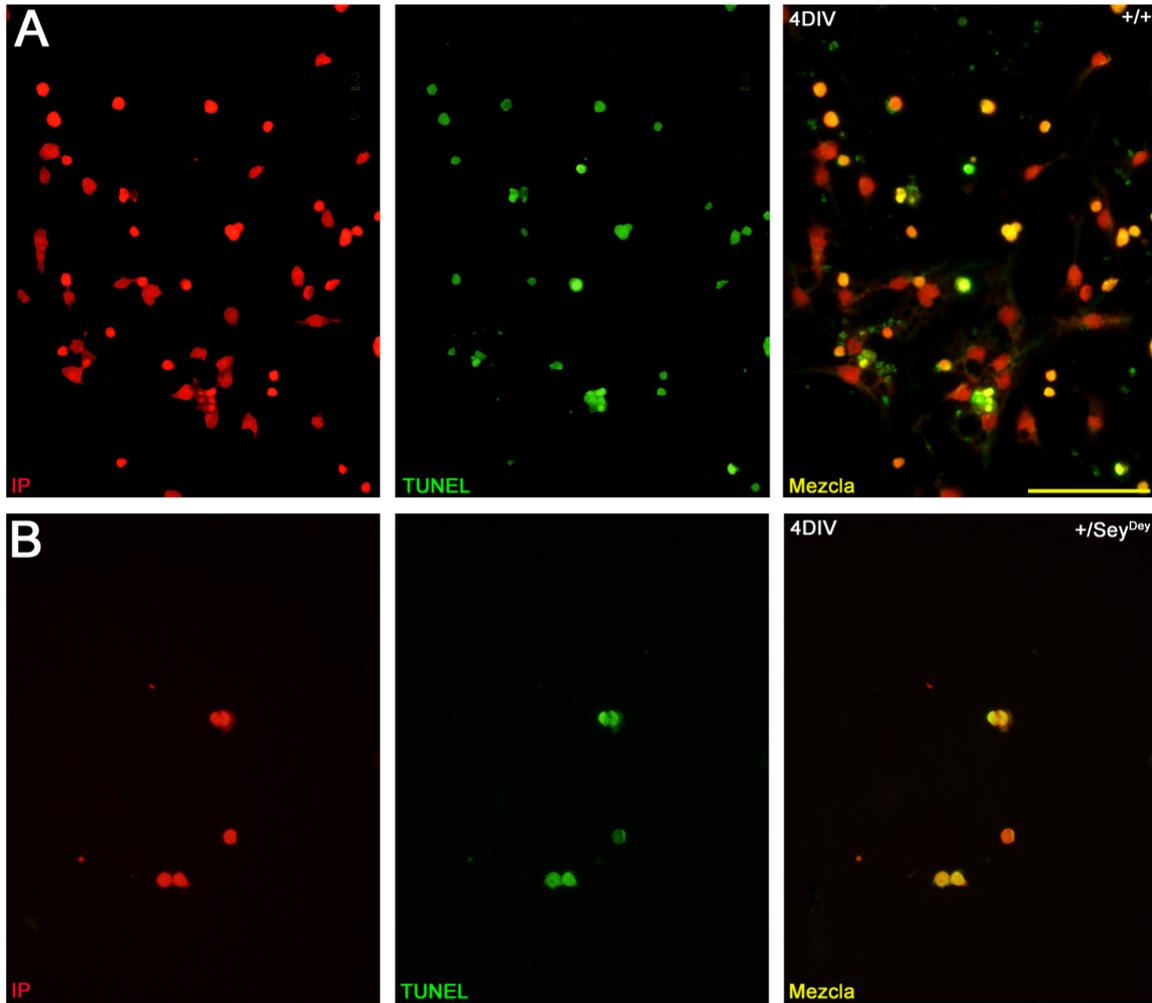


**C** Tasa de muerte en condiciones proliferativas



**Figura 28:** Análisis de la supervivencia de las CMBOPa proliferativas adheridas a sustrato. **(A y B)** Cultivos de CMBOPa +/+ **(A)** y +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)** de 2 DIV con tinción nuclear por DAPI (azul) y de cuerpos apoptóticos TUNEL<sup>+</sup> (verde). Mientras que en el cultivo control no se detectan cuerpos apoptóticos, en el +/Sey<sup>Dey</sup> se observa un incremento significativo de células TUNEL<sup>+</sup>. **(C)** Cuantificación de la tasa de muerte en condiciones proliferativas a los 2 y 4 DIV que demuestra un acusado incremento del porcentaje de células TUNEL<sup>+</sup> en los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> frente a los +/+. **(A-B)** Barra de escala: 20 μm.





**C** Células TUNEL<sup>+</sup> y totales en diferenciación neural **D**

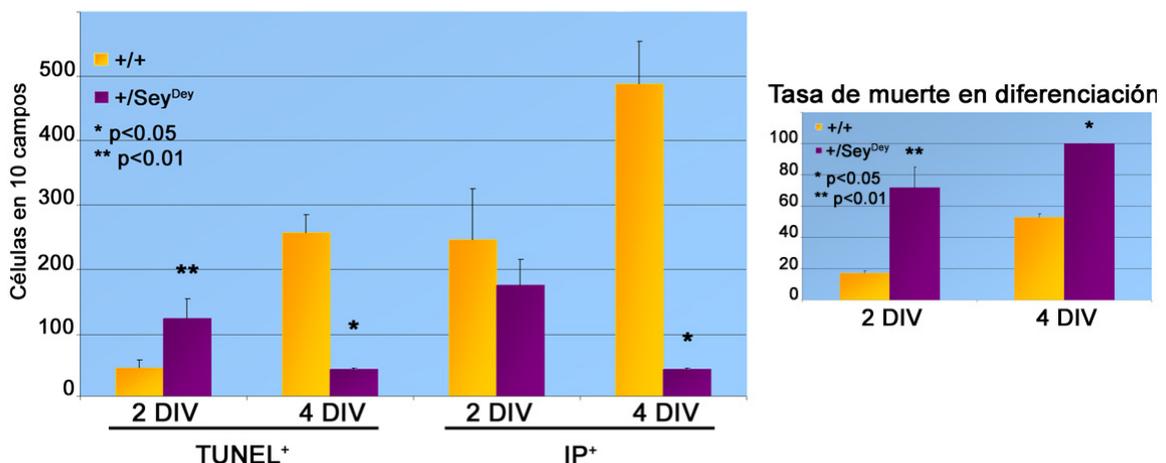
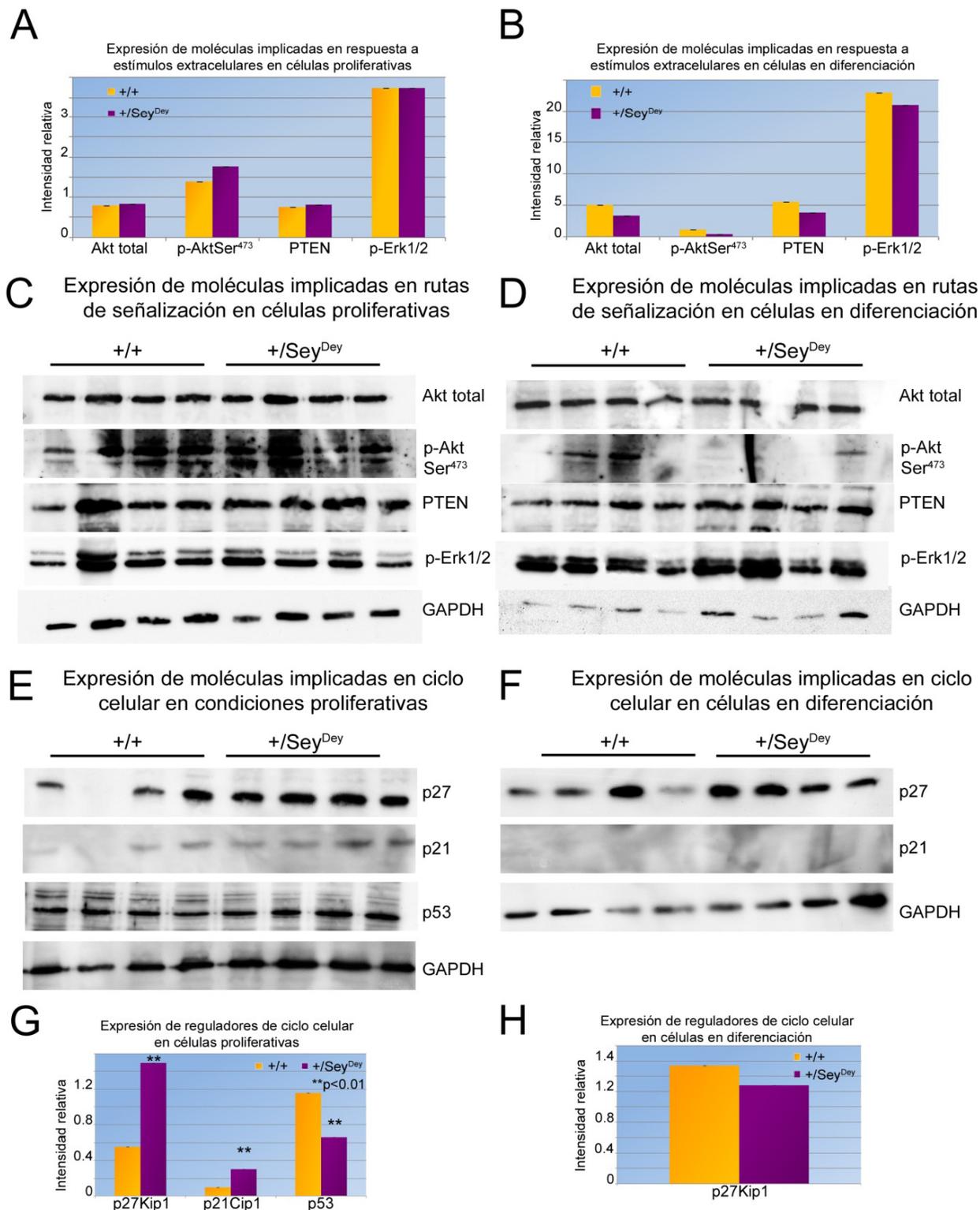


Figura 29: Supervivencia de las CMBOPa en condiciones de diferenciación a tipos celulares neurales. **(A y B)** Técnica de TUNEL (verde) y contratinción con IP (rojo) realizada en un cultivo +/+ **(A)** y en uno +/Sey<sup>Dey</sup> **(B)** en condiciones de diferenciación neural a los 4 DIV. El cultivo +/Sey<sup>Dey</sup> presenta un menor número de células en comparación con el control y además, las pocas células que quedan son apoptóticas (verde). **(C)** Recuento de células TUNEL<sup>+</sup> y de células totales en cultivos +/+ (amarillo) y +/Sey<sup>Dey</sup> (morado) a los 2 y 4 DIV que demuestra la importante muerte por apoptosis que sucede en los cultivos procedentes de animales heterocigotos. **(D)** Análisis de la tasa de muerte medida como el porcentaje de células TUNEL<sup>+</sup> respecto al total en cultivos control (amarillo) y +/Sey<sup>Dey</sup> (morado). La tasa de muerte es mayor en los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup>, tanto a los 2 DIV como a los 4 DIV. De hecho, tras 4 DIV el 100% de las células del cultivo +/Sey<sup>Dey</sup> son TUNEL<sup>+</sup>. **(A y B)** Barra de escala: 20  $\mu$ m.





**Figura 30:** Nivel de expresión de moléculas relacionadas con la proliferación y la supervivencia de las células. **(A y B)** Cuantificación de la expresión de Akt, fosfo-Akt (p-Akt), PTEN y fosfo-Erk (p-Erk) en células proliferativas **(A)** y células en diferenciación **(B)**. No existen diferencias en la expresión de ninguna de estas proteínas entre animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. **(C y D)** Western Blots frente a Akt, p-Akt, PTEN y p-Erk en células proliferativas **(C)** y en diferenciación **(D)** de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup>. Se ha utilizado GAPDH como control de carga **(E y F)** Expresión de reguladores del ciclo celular (p27Kip1, p21Cip1 y p53) y GAPDH en células proliferativas **(E)** y en células en diferenciación **(F)**. Las células en diferenciación no presentan expresión de p21Cip1. **(G y H)** Intensidad relativa de la expresión de reguladores del ciclo celular en células proliferativas **(G)** y en células en diferenciación **(H)**. Las células proliferativas +/Sey<sup>Dey</sup> presentan alteraciones en la expresión de estos reguladores.



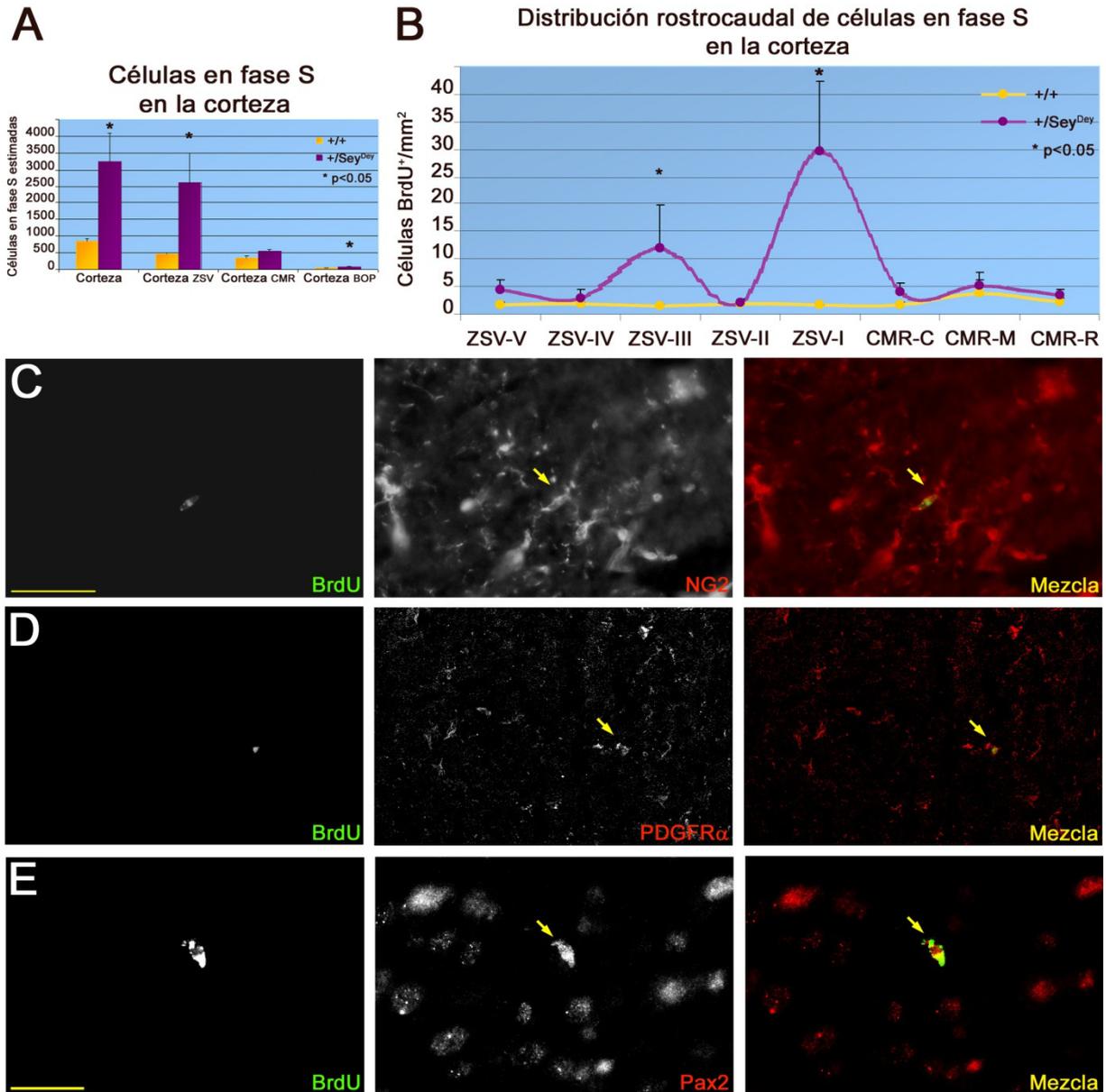
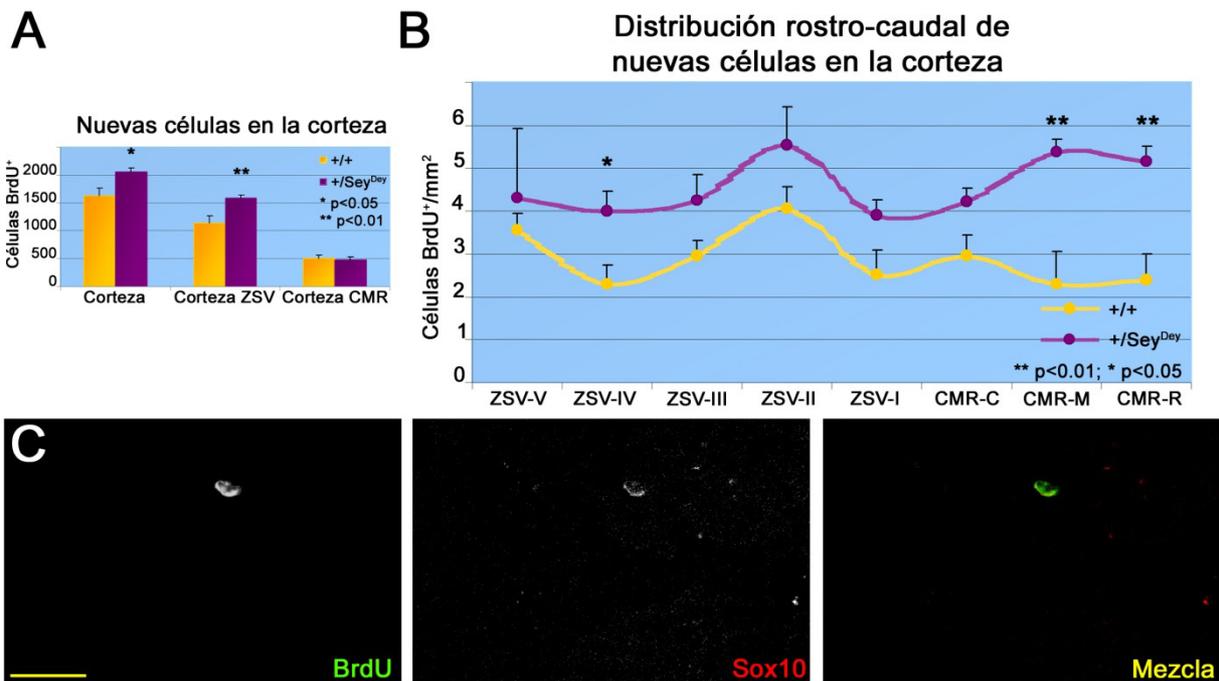


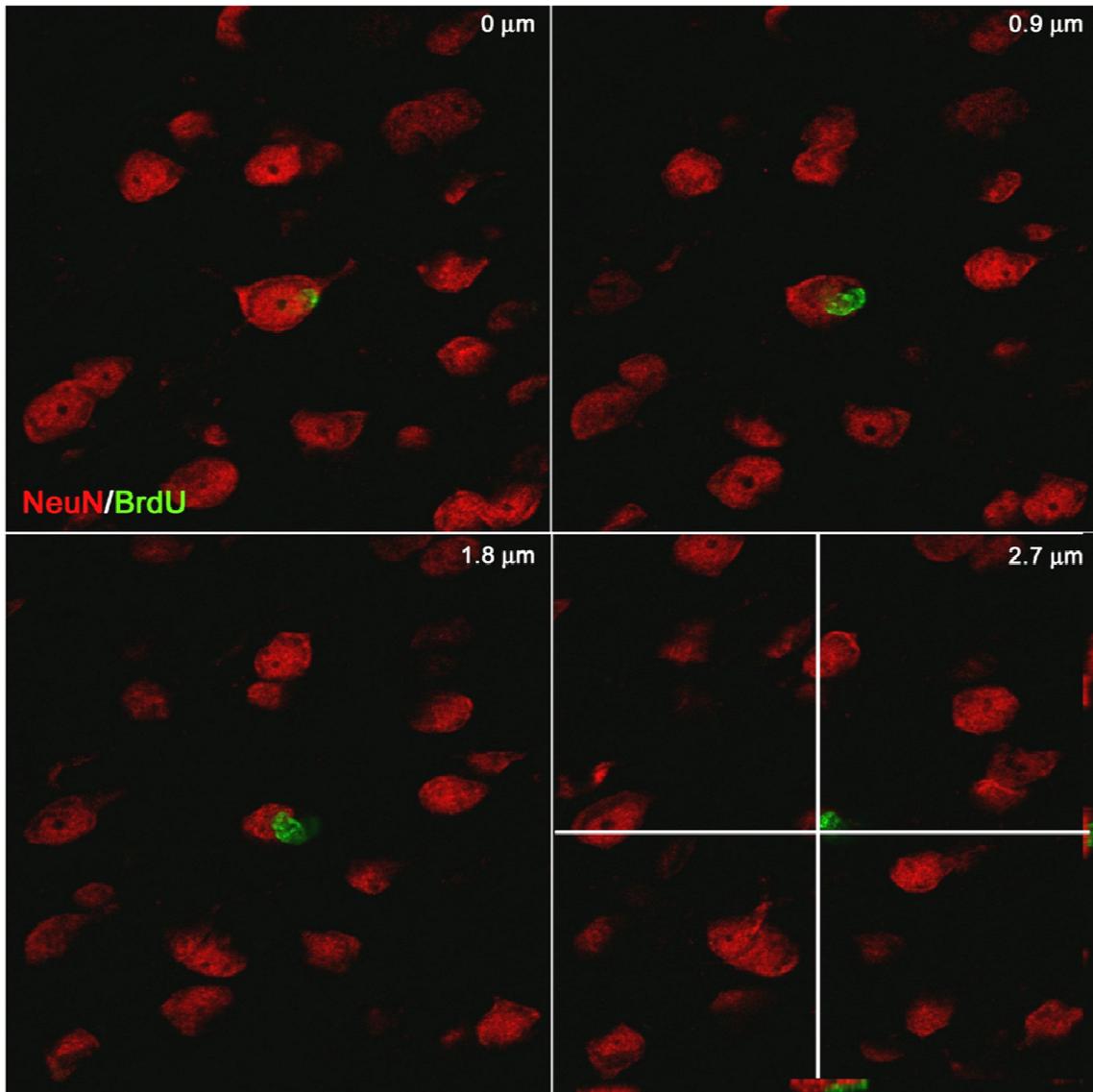
Figura 31: Precusores proliferativos de la corteza. **(A)** Estimación del número de células en fase S (BrdU<sup>+</sup>) en la corteza de animales +/+ y +/Sey<sup>DeY</sup>. Estos últimos presentan un mayor número de células proliferativas en los niveles en los que hay ventrículo lateral y BOP. **(B)** Densidad de células proliferativas a lo largo del eje rostro-caudal de la corteza analizada. Las diferencias significativas se detectan en la corteza correspondiente a los niveles ZSV-III y ZSV-I. **(C -F)** Las células proliferativas de la corteza (BrdU<sup>+</sup>, verde) coexpresan NG2 (rojo) **(C)**, PDGFR $\alpha$  (rojo) **(D)**, y Pax2 (rojo) **(E)**, todos ellos marcadores típicos de precursores de oligodendrocitos. **(C y D)** Barra de escala 50  $\mu$ m. **(E)** Barra de escala 10  $\mu$ m.





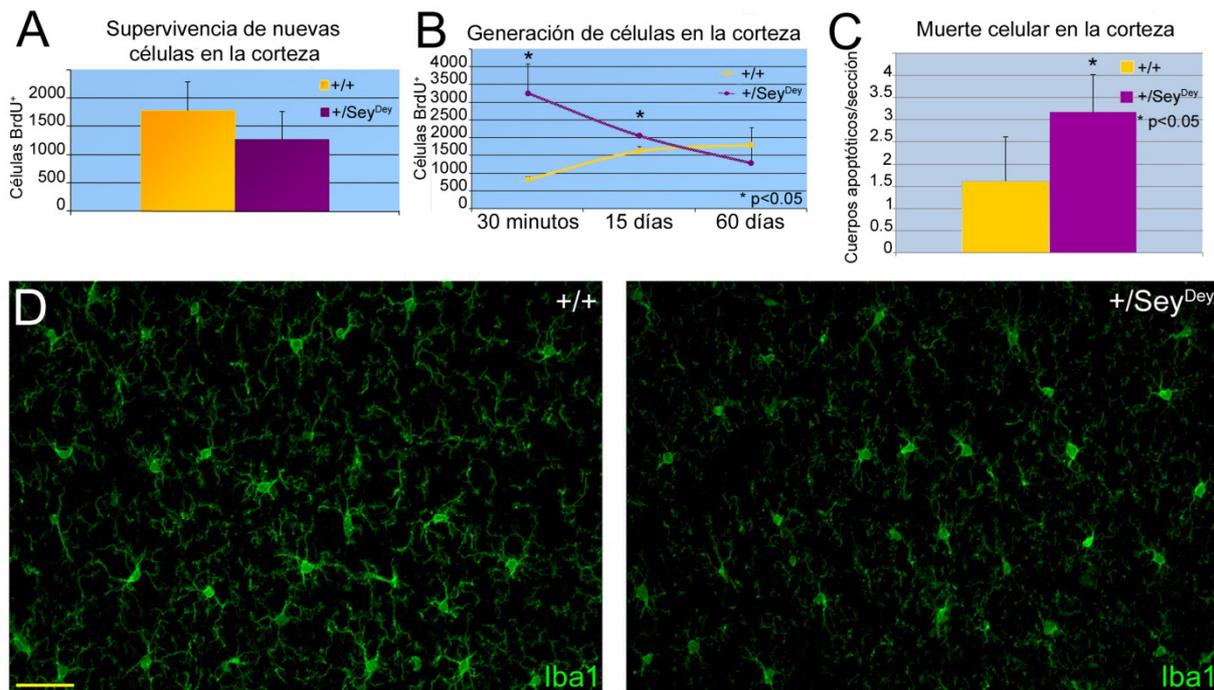
**Figura 32:** Diferenciación de células de nueva generación en la corteza. **(A)** Estimación del número de nuevas células en la corteza de animales +/+ y +/Sey<sup>Dey</sup> 15 después de inyectar BrdU. Estos últimos presentan un mayor número de nuevas células en los niveles en los que hay ventrículo lateral. **(B)** Densidad rostro caudal de las nuevas células 15 días después de las inyecciones de BrdU. Los animales +/Sey<sup>Dey</sup> tienen una mayor densidad de nuevas células en todos los niveles estudiados, siendo estadísticamente significativa en los niveles ZSV-IV, CMR-M y CMR-R. **(C)** Colocalización del marcador de oligodendrocitos Sox10 (rojo) con BrdU (verde). Barra de escala 16  $\mu$ m.





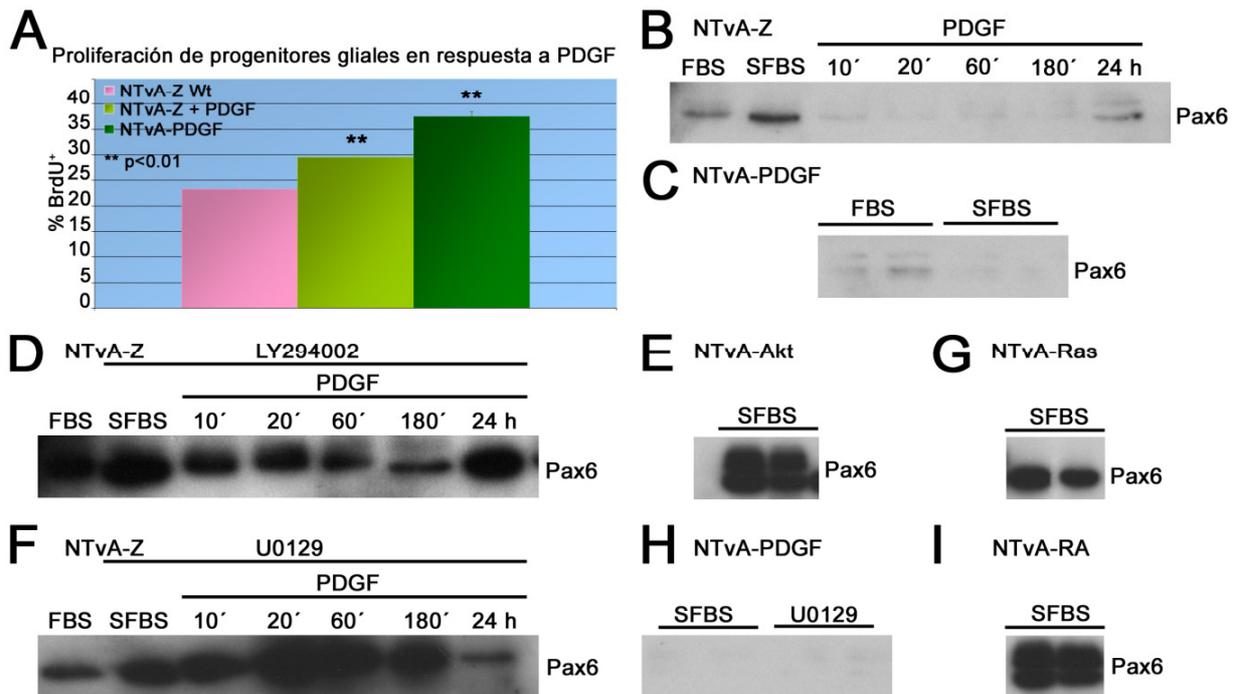
**Figura 33:** Diferenciación de células de nueva generación en la corteza. Núcleo BrdU<sup>+</sup> (verde) que rodea a otro núcleo NeuN<sup>+</sup> (marcador neuronal, rojo). Las distintas imágenes se han tomado, con el microscopio láser confocal, con una diferencia de profundidad de 0.9 μm entre ellas y muestran como la célula de nueva generación (BrdU<sup>+</sup>) rodea el soma de una neurona (NeuN<sup>+</sup>) en una disposición típica de los oligodendrocitos satélite. En la última imagen se representan los píxeles de un único plano focal de la zona señalada por la cruz blanca para poder comprobar a mayor detalle que los píxeles rojos y verdes no colocalizan.





**Figura 34:** Supervivencia de células de nueva generación en la corteza. **(A)** Estimación del número de células de nueva generación en la corteza de animales +/+ y +/-Sey<sup>Dey</sup> 60 días después de la inyección de BrdU. No se observan diferencias significativas entre genotipos. **(B)** Comparación de la estimación de células BrdU<sup>+</sup> tras 30 minutos, 15 y 60 días después de la inyección de BrdU en animales +/+ (amarillo) y +/-Sey<sup>Dey</sup> (morado). La tendencia de los animales +/+ es creciente, mientras que la de los animales +/-Sey<sup>Dey</sup> es negativa, con un número mucho mayor de células proliferativas que diferenciadas. **(C)** Cuerpos apoptóticos por sección en la corteza de animales +/+ (amarillo) y +/-Sey<sup>Dey</sup> (morado). Se observa un incremento significativo de la muerte por apoptosis en células con pérdida de un alelo de Pax6. **(D)** Microglía identificada mediante inmunofluorescencia frente a Iba1 (verde), en la corteza de animales +/+ y +/-Sey<sup>Dey</sup>. La densidad de células de microglía, así como su estado de activación, no se ve alterada en los animales heterocigotos. Barra de escala 40 μm.





**Figura 35:** Regulación de Pax6 por PDGF. **(A)** Porcentaje de progenitores gliales proliferativos (BrdU<sup>+</sup>) en condiciones normales (NTvA-Z; Wt), con una hora de tratamiento con PDGF (NTvA-Z + PDGF) y de progenitores gliales que sobreexpresan PDGF (NTvA-PDGF). PDGF promueve la proliferación de los progenitores gliales. **(B)** Detección de proteína Pax6 total mediante WB en progenitores gliales control con y sin tratar con PDGF a diferentes tiempos. Se observa un descenso rápido en la cantidad de proteína Pax6 tras el tratamiento. **(C)** Expresión de Pax6 en progenitores gliales que sobreexpresan PDGF cultivados con (FBS) y sin suero fetal bovino (SFBS). La expresión de Pax6 es prácticamente nula en estos progenitores. **(D)** Efecto de la inhibición de Akt con LY294002 en la expresión de Pax6 tras tratamiento con PDGF. La inhibición de Akt no impide el efecto del tratamiento con PDGF en la expresión de Pax6. **(E)** Expresión de Pax6 en progenitores gliales con Akt constitutivamente activa cultivados sin suero, que mantienen la expresión de la proteína. **(F)** La inhibición de Erk con U0129 impide el efecto del tratamiento con PDGF sobre la expresión de Pax6, por lo que esta kinasa está implicada en la regulación. **(G y H)** Expresión de Pax6 en progenitores gliales con Ras constitutivamente activa cultivados sin suero (SFBS) **(G)** y expresión casi nula de Pax6 tras la inhibición de Erk (U0129) en progenitores que sobreexpresan PDGF **(H)**. Estos resultados demuestran que Erk no sería la única kinasa implicada en la regulación de Pax6 por PDGF. **(I)** La expresión de Pax6 en progenitores gliales con Ras y Akt constitutivamente activas confirma que Akt no está implicada en la regulación por PDGF.



Discusión



## 1. La haploinsuficiencia, la variabilidad y los estados atractivos

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  sufren alteraciones en distintos procesos de generación de nuevas células en el SNC adulto, tanto en la neurogénesis dirigida al BOP como en la generación de nuevos oligodendrocitos en la corteza. Estas alteraciones provienen de la implicación directa de la proteína Pax6 en la regulación de estos procesos. Sin embargo, la ausencia de cambios en algunos de los procesos analizados (autorrenovación de células madre y sinaptología) no implica que Pax6 no los esté regulando, ya que nuestros análisis han sido realizados con animales haploinsuficientes. El término haploinsuficiencia define un fenotipo asociado a la inactivación de un único alelo en un organismo diploide. El concepto más difundido es que ese fenotipo refleja el requerimiento de más de la mitad del nivel diploide del producto génico, pero este concepto excluye fenómenos de compensación de dosis como por ejemplo, un incremento en la expresión del alelo que queda. Hay algunos autores (Cook *et al.*, 1998; revisión en Nijhout, 2003) con un punto de vista diferente. Éstos consideran que algunos síndromes de haploinsuficiencia pueden ser consecuencia de retrasos o interrupciones en la expresión génica debidos al azar (por ejemplo, activación o inactivación de alelos de un mismo gen). Estos sucesos están atenuados cuando una célula tiene dos copias válidas del mismo gen, y son relativamente insensibles a la compensación de dosis. Cuando un organismo posee una única copia de un gen sería mucho más susceptible a que sus células respondan de manera diferente ante una misma señal. De hecho, esto podría ocurrir incluso cuando el producto génico estuviera en un nivel de equilibrio de partida similar al de un sistema diploide, siempre que se requiriera la expresión *de novo* del gen para la respuesta (McAdams y Arkin, 1997). Este fenómeno podría estar detrás de los resultados obtenidos en el análisis clonal realizado en el presente trabajo, según los cuales algunas células de los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  son capaces de generar una neurosfera, mientras que otras dan lugar a pequeños grupos de menos de 8 células y algunas otras permanecen aisladas, vivas pero quiescentes. Sucesos, estos dos últimos, no observados en cultivos control.

Muchos síndromes de haploinsuficiencia están asociados a mutaciones en genes que codifican para factores de transcripción y/o moléculas de señalización (Ton *et al.*, 1991; Vortkamp *et al.*, 1991; Halford *et al.*, 1993; Reiner *et al.*, 1993; Tommerup *et al.*, 1993; Ederly *et al.*, 1994; Cameron *et al.*, 1996; Nobukuni *et al.*, 1996; Pingault *et al.*, 1998). De hecho, muchos síndromes de haploinsuficiencia provocan alteraciones en el desarrollo embrionario y son muy sensibles al número de copias génicas, entre ellos, aquellos síndromes relacionados con Pax6 (Ton *et al.*, 1991). La haploinsuficiencia de Pax6 estaría alterando la probabilidad de que los promotores de sus genes diana se activen. De este modo, se produciría una activación diferencial de los genes diana en distintos tipos de células. Por ello, las mismas señales podrían producir respuestas de distinto signo o intensidad en células diferentes. Mientras que algunos

factores de transcripción pueden interactuar solo en un sitio del promotor, otros interactúan en muchos sitios de un mismo promotor. En este último caso, el inicio de la transcripción génica puede requerir la ocupación de muchos, si no de todos, los sitios de unión por parte del factor de transcripción. La probabilidad de ocupar un sitio de unión debe ser proporcional a la concentración del factor de transcripción (Seidman y Seidman, 2002). Por ello, cuantos más sitios de unión tenga el promotor de un gen para un factor de transcripción determinado, más sensible será su expresión a la concentración celular de éste. De esta forma, en una mutación que produzca haploinsuficiencia, el cambio en la concentración de un factor de transcripción podría tener efectos en la expresión génica tanto sustanciales (sobre los genes cuyos promotores tengan muchos sitios de unión para él) como casi imperceptibles (sobre los genes con uno o pocos sitios de unión en su promotor) (Seidman y Seidman, 2002). Por este motivo, no todos los genes afectados por la ausencia total de un factor de transcripción son los mismos que se afectan en su haploinsuficiencia y los fenotipos serían diferentes (Davis-Silberman *et al.*, 2005). Este supuesto se cumple en el caso de las diferentes mutaciones del gen Pax6 (Callaerts *et al.*, 1997).

Teniendo en cuenta nuestros resultados, ya que todos los subtipos neuroquímicos de interneuronas del BOP analizados y los oligodendrocitos generados en la región neurogénica de la ZSV-CMR-BOP sufren drásticas reducciones en los animales heterocigotos, los genes que participan en su diferenciación se verían afectados por la haploinsuficiencia, lo que sugiere, según la teoría estocástica de la expresión génica, que podrían tener un número elevado de sitios de unión para Pax6 en su promotor. El caso de la participación de Pax6 en la autorrenovación de las células madre sería diferente. Se ha descrito durante el desarrollo embrionario que la ausencia total de Pax6 provoca cambios en la autorrenovación de diferentes precursores (Duparc *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2007; Sansom *et al.*, 2009). Sin embargo, nosotros no hemos encontrado diferencias en la generación de neuroesferas a partir de células únicas +/Sey<sup>DeV</sup> en comparación con células únicas control. Estos datos indican que los genes regulados por Pax6 implicados en este proceso podrían tener un número bajo de sitios de unión para la proteína Pax6 en su promotor y verse afectados por la haploinsuficiencia de forma variable. Otros resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, como el hecho de que las células madre de la región neurogénica ZSV-CMR-BOP control presenten un bajo nivel de expresión de la proteína Pax6 apoyan esta hipótesis. Además, el mantenimiento de niveles bajos de expresión de la proteína en precursores neurogénicos de la retina durante el desarrollo embrionario son necesarios para su re-entrada en ciclo, y por tanto para su autorrenovación (Hsieh y Yang, 2009), hecho que también apoya esta hipótesis.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten proponer que Pax6 es un regulador esencial de las decisiones de destino a las que se enfrentan las células madre adultas. Una célula madre tiene varias posibilidades de destino enfrentadas: autorrenovación, diferenciación y especificación de linaje, muerte celular programada y quiescencia. Comprender

las decisiones sobre el destino celular de una población de células madre es algo tremendamente importante pero muy complejo de estudiar. Parte de esa complejidad viene dada porque las poblaciones de células madre y progenitores son a menudo muy heterogéneas. Un enfoque basado en la biología de sistemas puede resultar muy útil para comprenderlas. Según este enfoque, los diferentes destinos pueden considerarse como estados estables atractivos en términos matemáticos. El que cada uno de estos destinos sea considerado como un estado estable significa que los destinos celulares no son demasiado sensibles a pequeñas fluctuaciones de la expresión génica pero sí son lo suficientemente flexibles para permitir el cambio de estado en respuesta a señales intrínsecas o extrínsecas (Enver *et al.*, 2009). Las rutas moleculares implicadas en la regulación de estos destinos no son muy conocidas, aunque se acepta de forma general que los factores de transcripción son reguladores clave de esta toma de decisiones, ya que recientemente se ha puesto de manifiesto la gran relevancia de la regulación traduccional y postraduccional en el control de estos procesos (Lu *et al.*, 2009). Además, la regulación mediada por factores de transcripción es uno de los primeros hechos que suceden durante esta toma de decisiones, precediendo a los cambios epigenéticos. Pese a la estabilidad de cada una de las decisiones tomadas, la alteración del nivel de expresión de un único factor de transcripción es suficiente para alterar el destino de la célula (Gurdon y Melton, 2008). Es decir, el desajuste en la expresión de uno de los componentes de la ruta molecular conlleva la pérdida de la estabilidad y provoca un cambio de estado hacia otro que sea estable, también conocido como atractivo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que no suele existir un único estado de equilibrio en los sistemas dinámicos, por lo que cada uno de ellos presenta más de un estado atractivo (Enver *et al.*, 2009). Metafóricamente, se suele comparar un estado atractivo con un valle en un paisaje montañoso y se pone el ejemplo de una bola que rueda a través del paisaje y que acaba por llegar a uno de sus valles, donde se deposita en el fondo. En ese caso, la bola habrá alcanzado uno de los estados estables del sistema. Poniendo estos términos en un contexto celular, un estado atractivo puede ser, por ejemplo, uno de los tipos celulares que constituyen un tejido, que a su vez es la representación de un conjunto de genes y proteínas expresados en ese tipo celular. Así, un estado excesivamente estable haría a una célula imperturbable ante las señales externas que pueda recibir. Por ello, se cree que las células madre y los progenitores se corresponden con un estado atractivo de menor estabilidad que una célula diferenciada (Enver *et al.*, 2009). Nuestros resultados indican que son precisamente las células más indiferenciadas (progenitores proliferativos y células en los primeros estadios de diferenciación), las más sensibles a la haploinsuficiencia de Pax6. Teniendo en cuenta todos estos datos, proponemos que Pax6 es un regulador esencial en la toma de decisiones de destino celular en la neurogénesis adulta, y que un correcto nivel de expresión de Pax6 (que puede ser diferente para cada uno de estos procesos) sería esencial para la estabilidad del sistema. Nuestros resultados *in vitro* indican que, ante la ausencia de un nivel correcto de Pax6, mueren una mayor proporción de progenitores, por lo que la población de células cuyo estado estable fuera un destino de muerte celular estaría incrementada al

producirse este desequilibrio en el sistema. Sin embargo, al utilizar como modelo experimental animales heterocigotos, nos encontramos con una población celular muy heterogénea en la expresión de Pax6, más sensible a las perturbaciones estocásticas de la expresión génica. Debido a ello, algunos de los precursores podrían tener variaciones en la expresión de Pax6 que no fueran suficientes para desestabilizar el sistema (al ser capaces de activar la expresión génica de forma adecuada), y así conseguir llegar al BOP, integrarse como interneuronas y sobrevivir. El caso de los progenitores adultos de oligodendrocitos sería diferente. Las células podrían necesitar la expresión de Pax6 para mantenerse quiescentes, y las señales regulatorias que gobiernan su proliferación y diferenciación, como PDGF, disminuirían esta expresión y como resultado las células entrarían en ciclo. Por tanto, en esta ocasión, el desequilibrio del sistema debido a la haploinsuficiencia de Pax6 estaría incrementando la población de células proliferativas.

## 2. Pax6, el ciclo celular y las decisiones de destino

Muchos autores relacionan aspectos de la regulación del ciclo celular con la dinámica de las poblaciones de células madre y con decisiones celulares del tipo autorrenovación *versus* diferenciación (Coskun y Luskin, 2002; Cremisi *et al.*, 2003; Dehay y Kennedy, 2007; Farkas y Huttner, 2008; Zhong *et al.*, 2008; Boheler, 2009). Además, hay que tener en cuenta que la muerte celular es otro de los destinos posibles de las células. Por ello, y debido a que en los heterocigotos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  observamos variaciones en la autorrenovación, proliferación, diferenciación y supervivencia temprana de los precursores, realizaremos una discusión conjunta de estos resultados, relacionándolos con posibles alteraciones en el ciclo celular. Esta hipótesis de participación de Pax6 en la regulación de la neurogénesis adulta mediante la modulación del ciclo celular se basa, por una parte, en que numerosos estudios de desarrollo embrionario (tanto de corteza como de retina) han puesto de manifiesto alteraciones del ciclo en células carentes de Pax6 (Warren *et al.*, 1999; Estivill-Torres *et al.*, 2002; Maekawa *et al.*, 2005; Berger *et al.*, 2007; Duparc *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2007; Manuel *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007; Sansom *et al.*, 2009), y por otra en nuestros propios resultados. Nuestros análisis mediante Western Blot de la expresión de reguladores del ciclo celular (como p27, p21 y p53) demuestran que existen variaciones en la expresión de estas proteínas en células proliferativas procedentes de animales heterocigotos para Pax6, por lo que estas células presentan una desregulación de su ciclo celular.

La proliferación y la parada de ciclo para el crecimiento celular se regulan mediante el balance de señales extrínsecas e intrínsecas a los precursores, que regulan la entrada en ciclo, su progresión y su salida (Cunningham y Roussel, 2001). Hay dos parámetros relacionados que regulan el balance entre autorrenovación de los precursores y su diferenciación y, por ello, en último término controlan el número de neuronas que se generan. Estos dos parámetros

relacionados son la velocidad de progresión a lo largo del ciclo celular y el balance entre las reentradas en ciclo y la salida (Dehay y Kennedy, 2007; Pilaz *et al.*, 2009). Si se produce una alteración del balance entre reentradas en ciclo y precursores que salen, en el sentido de que se aumenta el número de precursores que salen de ciclo, obtendríamos una mayor producción de neuronas. Sin embargo, este incremento neuronal será a corto plazo, porque el conjunto de progenitores se agotará y no se producirán neuronas más adelante. Este efecto se ha observado durante el desarrollo de la retina y la corteza de ratones homocigotos sin Pax6 (Duparc *et al.*, 2007; Sansom *et al.*, 2009). El aumento de la proporción de precursores que vuelven a entrar en ciclo tras la división inicial producirá el efecto contrario (un descenso inicial en la neurogénesis y un incremento posterior al haberse aumentado el número de progenitores), como sucede durante el desarrollo de ratones que sobreexpresan Pax6 (Sansom *et al.*, 2009). Los mecanismos que regulan este balance entre autorrenovación y diferenciación son, en su mayoría, desconocidos, aunque hay numerosas pruebas que los relacionan con la regulación de la fase G1 y, en particular, con su duración (Dehay y Kennedy 2007; Pilaz *et al.*, 2009). Así, las células madre tienen una fase G1 corta cuando sufren divisiones de autorrenovación (Savatier *et al.*, 1996; Fluckiger *et al.*, 2006), y una mayor duración de la fase G1 se relaciona con un mayor número de precursores que salen de ciclo (una mayor diferenciación) (Lukaszewicz *et al.*, 2002; 2005; Calegari y Huttner, 2003; Hodge *et al.*, 2004; Calegari *et al.*, 2005). Muchos factores que regulan tanto la autorrenovación como la diferenciación de los precursores actúan a través de proteínas implicadas en esta fase del ciclo celular (Burdon *et al.*, 2002; Kioussi *et al.*, 2002; Oliver *et al.*, 2003). Aunque se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que gobiernan esta regulación de la fase G1, los inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas (CDKIs) y el nivel de fosforilación de Retinoblastoma (Rb) parecen estar implicados, al ser reguladores clave del paso por el punto de control de la fase G1/S (Yoshikawa, 2000). Estudios de desarrollo embrionario sugieren que Pax6 regula el balance entre autorrenovación y diferenciación de los precursores mediante el control del ciclo celular de las células y su capacidad para dividirse simétrica o asimétricamente (Estivill-Torres *et al.*, 2002; Heins *et al.*, 2002; Berger *et al.*, 2007; Duparc *et al.*, 2007; Hsieh y Yang, 2009; Sansom *et al.*, 2009). Los mecanismos moleculares por los que Pax6 está implicado en este proceso son en parte desconocidos, aunque algunos de los mecanismos principales de regulación de la transición G1/S están relacionados con Pax6. Así, Pax6 es capaz de interactuar físicamente con fosfoRetinoblastoma (pRb) (Cvelk *et al.*, 1999) y varios CDKIs y otros reguladores del ciclo celular son dianas transcripcionales de Pax6 (Duparc *et al.*, 2007; Sansom *et al.*, 2009).

Rb es una proteína implicada en la regulación del ciclo celular y también en la neurogénesis. Su papel durante la neurogénesis es regular la muerte celular, la salida de ciclo y la diferenciación de los precursores (Ferguson *et al.*, 2002). Pax6 es capaz de unirse a pRb (Cvelk *et al.*, 1999) y, aunque la consecuencia funcional se desconoce, la alteración de la

interacción entre ambas proteínas en los heterocigotos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  podría ser en parte responsable del fenotipo de muerte celular elevada y diferenciación disminuida que presentan los animales heterocigotos en la región neurogénica adulta ZSV-CMR-BOP, mediante dos posibles mecanismos. Ya que para la interacción de ambas proteínas es necesario el HD de Pax6 (Cvelk *et al.*, 1999), esta interacción podría estar variando la capacidad de Pax6 para activar la transcripción de algunos de sus genes diana. Además, hay que tener en cuenta que pRb está implicada en el paso de la fase G1 del ciclo celular a la fase S, mediante la regulación de los factores E2F. Estos factores de transcripción E2F son los encargados de activar los genes necesarios para la entrada en la fase S, regulando así la duración de la fase G1 del ciclo celular. Cuando Rb está unida a ellos, los factores E2F no son capaces de activar la transcripción de dichos genes (Yoshikawa, 2000) y, por tanto, la célula no progresa a la fase S. La unión de Pax6 a pRb podría estar relacionada con la regulación de la duración de esta transición. Así, la unión de Pax6 a pRb podría impedir que ésta última libere los factores de transcripción E2F a los que está unida (Yoshikawa *et al.*, 2000). Así, la fase G1 del precursor se alargaría, promoviéndose la diferenciación. Esta hipótesis de que la interacción de Pax6 con pRb podría estar regulando la duración de la fase G1 concuerda con el hecho de que son necesarios incrementos transitorios en la expresión de Rb al comienzo de la última mitosis de los precursores (Yoshikawa *et al.*, 2000) y podría explicar el hecho de que la sobreexpresión de Pax6 conduce a la diferenciación de los precursores (Götz *et al.*, 1998; Heins *et al.*, 2002; Hack *et al.*, 2004; 2005, Berger *et al.*, 2007). Otros reguladores del ciclo celular también relacionados con Pax6 (Cartier *et al.*, 2006; Duparc *et al.*, 2007) son los CDKIs, entre los que se encuentran p21 y p27. Estas proteínas impiden la proliferación celular, en parte al inhibir la fosforilación de Rb (Weinberg, 1995), y Pax6 es capaz de inducir su expresión (Cartier *et al.*, 2006; Duparc *et al.*, 2007). Así, una elevada cantidad de Pax6 en la célula podría estar favoreciendo la salida del ciclo celular mediante dos mecanismos relacionados: por una parte, impidiendo la fosforilación de Rb al inducir la expresión de CDKIs, y por otra, impidiendo que pRb libere los factores E2F, alargando así la duración de la fase G1. El alargamiento del ciclo celular de precursores que sobreexpresan Pax6 también ha sido propuesto por Sansom y colaboradores (2009). Sin embargo, la relación de Pax6 con el ciclo celular podría no restringirse únicamente a la regulación de la duración de la fase G1, ya que nuestras predicciones de fosforilación de la proteína Pax6 (Anexo) indican la posible regulación del factor de transcripción por numerosas quinasas involucradas en diferentes aspectos del ciclo celular, relacionadas no solo con el punto de control G1/S sino también con la transición entre las fases G2 y M. Además, algunas publicaciones comienzan a resaltar la relación directa de Pax6 con otros reguladores del ciclo celular. Por ejemplo, Pax6 es capaz de unirse al promotor de genes que codifican proteínas relacionadas directamente con el ciclo celular (Sansom *et al.*, 2009) y Pax6 puede fosforilarse por la HIPK2, involucrada en el punto de control G1/S (Kim *et al.*, 2006).

Además, la ausencia de la proteína Rb induce apoptosis durante el desarrollo del SNC. Esta apoptosis está mediada por un incremento de p21, que en ocasiones se correlaciona con un incremento de p53 (capaz de activar la expresión de p21), pero en otras ocasiones no depende de una sobreexpresión de p53 (Macleod *et al.*, 1996). A pesar de que en nuestras células proliferativas +/Sey<sup>Dey</sup> hemos encontrado una expresión menor de p53 en comparación con los animales control, estas células presentan un incremento en los niveles de p21. Esto indica que el fenotipo de muerte celular elevada en los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> podría estar relacionado con el complejo Pax6/pRb, y también que la expresión de p21 en las CMBOPa debe estar regulada por mecanismos diferentes al de la inducción por p53. Aún así, sería interesante comprobar la expresión de estas proteínas en días anteriores al día de pase de los cultivos proliferativos, en los que los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> presentan una reducción de la tasa proliferativa, en comparación con la elevada tasa observada en el día de pase (en el que se tomaron las muestras proteicas). Es posible que existan variaciones en la expresión de Pax6 a lo largo de la progresión del cultivo, que sean más acusadas en los días iniciales, y que se correlacionen con el retraso en el crecimiento de los cultivos de CMBOPa y con la inversión de la tasa proliferativa al inicio del cultivo respecto al día de pase. En cualquier caso, las alteraciones en distintos reguladores del ciclo celular en las células proliferativas +/Sey<sup>Dey</sup> serían la causa de las variaciones en la tasa proliferativa de estos precursores, de la elevada tasa de muerte tanto de las células proliferativas como de las que se encuentran en las etapas tempranas de la diferenciación, y también podrían ser responsables de los déficits de diferenciación hacia neuronas y oligodendrocitos que presentan los animales heterocigotos. La elevada muerte temprana en los precursores +/Sey<sup>Dey</sup> proliferativos podría estar relacionada con una inadecuada salida de ciclo celular (Evan *et al.*, 1995; Evan y Littlewood, 1998; Liu y Greene, 2001) o con la incapacidad de algunos precursores para pasar el punto de control G1/S, lo que los conduciría a la muerte. Numerosos estudios apuntan a que una expresión desregulada de moléculas implicadas en el ciclo celular conduce a la apoptosis (revisado por Liu y Greene, 2001), lo que apoya esta hipótesis.

Hemos demostrado una mayor presencia de p27<sup>Kip1</sup> en nuestros cultivos proliferativos +/Sey<sup>Dey</sup> en comparación con los cultivos control. Ya que p27<sup>Kip1</sup> promueve la generación de neuroblastos a partir de células de tipo C en la región neurogénica ZSV-CMR-BOP (Doetsch *et al.*, 2002), es posible que *in vivo*, si se mantiene esta elevada cantidad de p27<sup>Kip1</sup>, se esté generando un mayor número de neuroblastos a partir de las células C. Esto contribuiría al déficit de proliferación demostrado en los animales heterocigotos mediante las inyecciones de BrdU de 30 min de supervivencia (con el que estaríamos marcando fundamentalmente células de tipo C, debido a su elevada tasa proliferativa). A pesar de ello, ya que los animales +/Sey<sup>Dey</sup> también presentan una menor incorporación de nuevas células en el BOP, Pax6 estaría regulando también algún mecanismo de supervivencia de los neuroblastos que, al desregularse por la haploinsuficiencia, conduciría a su muerte.

Una vez completado el ciclo celular, las células pueden bien volver a entrar en ciclo o bien parar su patrón de multiplicación. Esta fase de parada de ciclo celular se conoce como fase G0. En las neuronas, la fase G0 es permanente, y una vez que la alcanzan, no pueden entrar en ciclo de nuevo (en caso de que entren en ciclo les conducirá a la apoptosis) (Yoshikawa 2000; Chanas-Sacre *et al.*, 2000). Además de la fase G0 permanente que presentan las neuronas, existen otros dos tipos de fase G0: la senescencia y la quiescencia (Liu y Greene, 2001). Al contrario que la senescencia, la quiescencia es una fase G0 reversible y puede ocurrir con relativa frecuencia durante la vida de una célula proliferativa. Las células quiescentes se caracterizan por presentar un exceso de complejos ciclina-kinasa dependiente de ciclina (CDK). En muchos casos, el mecanismo molecular principal que lleva a una célula a entrar en estado quiescente es una acumulación de p27<sup>Kip1</sup> y de otros CDKIs (Reynisdottir *et al.*, 1995; Reynisdottir y Massagué, 1997; Liu y Greene, 2001). Esta acumulación se puede inducir en cultivo privando a las células de factores de crecimiento, o sometiéndolas a una densidad elevada (Polyak *et al.*, 1994). Si, por ejemplo, una célula proliferativa entra en quiescencia por privación de factores de crecimiento, una vez que vuelve a recibir señales mitóticas (vuelve a estar en contacto con factores de crecimiento), p27<sup>Kip1</sup> se fosforila y se degrada, permitiendo la activación de los complejos ciclina-CDK y la reentrada en ciclo (Pagano *et al.*, 1995; Montagnoli *et al.*, 1999). El que hayamos encontrado un exceso de p27<sup>Kip1</sup> en los cultivos proliferativos +/Sey<sup>DeY</sup>, unido al hecho de que la tasa proliferativa es, en general, menor en estas células, y de que los resultados del análisis clonal muestren un porcentaje significativamente mayor de células únicas +/Sey<sup>DeY</sup> que en los experimentos control, nos lleva a proponer que la falta de un alelo de Pax6 podría estar incrementando la probabilidad de que las células proliferativas se vuelvan quiescentes. Relacionando estos resultados con el hecho de que uno de los mecanismos inductores de quiescencia sea la ausencia de contacto con factores de crecimiento mitógenos, proponemos que los animales +/Sey<sup>DeY</sup> podrían tener alterada la respuesta a los factores de crecimiento y que la regulación precisa y diferencial de Pax6 podría ser uno de los mecanismos que conecten las señales extracelulares con la regulación del ciclo celular y los diferentes destinos que puede alcanzar una célula (autorrenovación, diferenciación, apoptosis).

Debido a que las células con deficiencia de p53 son menos capaces de morir por apoptosis que las células con un nivel normal (Lowe *et al.*, 1993), y a que nuestros cultivos +/Sey<sup>DeY</sup> presentan una menor expresión de p53 y una muerte por apoptosis elevada, es posible que esta muerte por apoptosis se produzca por mecanismos no dependientes de p53. Esta posible independencia de p53 en la muerte por apoptosis de las células +/Sey<sup>DeY</sup> se correlaciona con la función propuesta para p53 en la regulación de la neurogénesis adulta y con el incremento en la muerte por apoptosis que presentan los ratones sin p53 en la ZSV (Gil-Perotín *et al.*, 2006). Aún así, sería de interés conocer la expresión de p53 en células proliferativas en días anteriores al día de pase, cuando hemos descrito la elevación de la tasa apoptótica y un descenso en la tasa de proliferación. Si el nivel de p53 en estos días tempranos

en cultivos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  es similar o superior al de los cultivos control, el descenso en la expresión de p53 según avanzan los días en cultivo podría estar directamente relacionado con el incremento en la tasa de proliferación que hemos demostrado, ya que la ausencia de p53 produce la hiperproliferación de los precursores neurales adultos en la ZSV (Gil-Perotín *et al.*, 2006). Durante la neurogénesis en general y en la neurogénesis adulta en particular, p53 parece estar únicamente implicado en la regulación de la proliferación de los precursores, y la muerte celular que ocurre de forma habitual durante este proceso no dependería de esta proteína (Medrano y Scrable, 2005). Por otra parte, el descenso en la expresión de p53 en los animales heterocigotos podría ser también la causa del déficit de diferenciación neuronal y las numerosas alteraciones de destino celular que presentan los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ , debido a que p53 puede desempeñar este tipo funciones durante el desarrollo embrionario, más allá de la regulación del ciclo celular y la apoptosis (revisado por Tedeschi y Giovanni, 2009). Además, en precursores neurales que llevan a cabo mitosis terminal se ha demostrado un descenso en la expresión de p53 (Louis *et al.*, 1988; Schmid *et al.*, 1991). Este hecho podría indicar que se está produciendo una mayor proporción de mitosis terminales en los ratones heterocigotos, que podrían no llevarse a término debido a la elevada expresión de CKIs en las células proliferativas  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ . Esto les produciría bien una parada del ciclo celular, bien un alargamiento de la fase G1, cuyo resultado final sería un incremento en la muerte de estas células. La expresión de p53 es también necesaria para la formación de neuritas y la maduración neuronal (Di Giovanni *et al.*, 2006; Tedeschi *et al.*, 2009). Por ello, las alteraciones en las dendritas de todos los subtipos neuroquímicos de interneuronas  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  analizados en nuestros experimentos *in vitro*, podrían estar relacionadas también con un posible déficit de la expresión de p53. Este hecho apoya la idea de que Pax6 tenga un papel en la maduración neuronal y de que los heterocigotos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  presenten un retraso en la maduración de algunas poblaciones de interneuronas en el BOP (NeuN, CB y CR<sup>+</sup>) *in vivo*.

Varios autores han puesto de manifiesto la relación de Pax6 con la autorrenovación de las células madre durante el desarrollo embrionario (Duparc *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2008; Hsieh y Yang, 2009; Sansom *et al.*, 2009) y en la neurogénesis adulta de la formación hipocampal (Maekawa *et al.*, 2005). Estos análisis permiten concluir que la regulación de la cantidad de Pax6 presente en el precursor durante el transcurso de su ciclo celular está relacionada con la autorrenovación de los precursores (Hsieh y Yang, 2009), y que el mecanismo molecular de autorrenovación inducido por Pax6 está relacionado con la regulación de la expresión de, entre otras moléculas, ciclinas de clase D y Cdk4, proteínas involucradas en el ciclo celular (Sansom *et al.*, 2009). Nuestros resultados al evaluar la capacidad de autorrenovación de las CMBOPa  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ , que muestran un incremento en la proporción de células únicas  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  que se mantienen quiescentes o generan grupos de menos de 8 células, indican que en este sistema, Pax6 también regula la autorrenovación de los precursores, aunque la mayoría de las células contienen el Pax6 necesario para formar una neurosfera. Ya

que el nivel de expresión de Pax6 es un factor limitante en la regulación del balance entre autorrenovación y neurogénesis (Sansom *et al.*, 2009) y que para la autorrenovación parece ser necesario un bajo nivel de expresión de Pax6 (Hsieh y Yang, 2009; Sansom *et al.*, 2009), proponemos que la carencia de un alelo de Pax6 está produciendo un desequilibrio en la regulación de la reentrada en ciclo de algunos precursores de BOPa, aunque otros vayan a ser capaces de generar una neurosfera, probablemente porque estos últimos tengan un nivel de Pax6 suficiente.

En esta relación de Pax6 con la autorrenovación y la neurogénesis también están involucrados otros dos factores de transcripción: Hes1 y Sox2. Hes1 es un conocido regulador de la autorrenovación de los precursores (Kageyama *et al.*, 2008; Imayoshi *et al.*, 2010), que parece tener funciones opuestas a las de Pax6, ya que regula de forma contraria la expresión de un mismo conjunto de genes efectores (Sansom *et al.*, 2009). Por tanto, dado que el balance en la concentración de ambos factores de transcripción es esencial para esta función celular, un posible desequilibrio en este sistema podría estar también detrás del fenotipo de autorrenovación que presentan las CMBOPa  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ . Sin embargo, la naturaleza de la relación con Sox2 es diferente, ya que ambos factores de transcripción regulan la expresión del otro y son capaces de unirse y actuar en cooperación para unirse al ADN (Kamachi *et al.*, 2001; Kondoh *et al.*, 2004; Lengler *et al.*, 2005; Inoue *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2008). Se ha demostrado que Sox2 es necesario para el mantenimiento de las células madre neurales adultas (Ferri *et al.*, 2004; Episkopou, 2005), por lo que posibles alteraciones en la interacción entre ambos factores de transcripción debidas a la falta de un alelo de Pax6 también podrían estar contribuyendo al fenotipo de los ratones heterocigotos.

### 3. Pax6 y la diferenciación

Nuestros resultados indican una gran afectación de la diferenciación en la región neurogénica adulta ZSV-CMR-BOP. Hemos demostrado que los animales heterocigotos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  presentan un déficit general de la generación de neuronas y oligodendrocitos a partir de esta región neurogénica, y una diferenciación deficiente de todos los subtipos neuroquímicos de interneuronas del BOP analizados. En las regiones no neurogénicas también se producen alteraciones en la diferenciación, aunque en este caso los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  presentan un incremento en la generación de ODs, por lo que Pax6 estaría implicado en la formación de este tipo celular de manera diferente en las regiones neurogénicas y no neurogénicas.

Nuestros análisis evidencian que los animales heterocigotos  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  sufren un déficit en la generación de todos los tipos de interneuronas analizados, por lo que proponemos que Pax6 ejerce una función de promoción general de la especificación neuronal durante la neurogénesis adulta. El mecanismo molecular implicado en la especificación neuronal durante

este proceso es desconocido, y la Neurogenina 2, uno de los principales factores de transcripción pro-neurales regulados por Pax6 (Scardigli *et al.*, 2003), no parece estar implicada en la regulación de este proceso en animales adultos, al menos a partir de CMBOPa (Vergaño-Vera *et al.*, 2009). El hecho de que análisis anteriores (Dellovade *et al.*, 1998; Hack *et al.*, 2005; Kohwi *et al.*, 2005) no hubieran encontrado diferencias en la generación de otras poblaciones neuronales más allá de las PGs dopaminérgicas se debe a que estos estudios bien no analizaban en profundidad otras subpoblaciones neuroquímicas, bien no tenían en cuenta la pérdida de volumen del BOP o los defectos de proliferación que influyen en la generación de neuroblastos demostrados en esta Tesis Doctoral. Cabe resaltar que otros estudios han descrito alteraciones en la generación de granos (Kohwi *et al.*, 2005) y de interneuronas de la capa plexiforme externa (Haba *et al.*, 2009) a partir de precursores con deficiencias en la expresión de Pax6, lo que apoyaría los datos obtenidos en este trabajo. Nuestros experimentos *in vitro*, que nos permiten sembrar una cantidad similar de células de partida control y heterocigotas en los experimentos de diferenciación y evitar así los defectos de proliferación, demuestran claramente que Pax6 es necesario para la generación de todos los tipos neuroquímicos estudiados. Además, también hay que tener en cuenta que la llegada de nuevas células al BOP +/Sey<sup>Dey</sup> está disminuida respecto a los animales control, que ninguno de los porcentajes de colocalización de BrdU a los 15 días de la inyección con los distintos marcadores neuroquímicos está incrementado significativamente en los animales heterocigotos y que la densidad de la mayoría de las poblaciones neuroquímicas analizadas está reducida en los animales +/Sey<sup>Dey</sup> y, por tanto, todas las poblaciones neuroquímicas presentan un déficit de generación. Todos estos datos indican que Pax6 ejerce una función general en la especificación neuronal. Sin embargo, en nuestros experimentos *in vitro* de diferenciación a tipos neuroquímicos de interneuronas hay dos poblaciones drásticamente afectadas, la dopaminérgica y la nitrérgica. Debido a esta diferencia entre poblaciones neuroquímicas, proponemos que Pax6 estaría ejerciendo una función dual en el proceso de generación de interneuronas en el BOP adulto. Por una parte, ejercería una función general de especificación de los precursores para la generación de neuronas y por otra, estaría implicado en la especificación de subtipo neuronal, mediante la regulación directa de la expresión de determinados factores de transcripción. Esta segunda función afectaría especialmente a la especificación de las poblaciones de PGs nitrérgicas y dopaminérgicas.

La formación de un determinado tipo neuronal o glial a partir de los precursores multipotentes ha sido analizada en mayor detalle durante el desarrollo embrionario que en la neurogénesis adulta (Guillemot, 2007; Hebert y Fishell, 2008). Durante el desarrollo, el proceso de diferenciación se puede subdividir en varios pasos secuenciales. Lo primero que sucede es que los progenitores adquieren una identidad de posición única, a través de la formación de patrones espaciales en el tubo neural en la que están implicados principalmente factores extrínsecos. Los diferentes gradientes morfogénicos de factores extrínsecos conducen al

establecimiento de combinaciones distintas de factores de transcripción en las células. Estos códigos de factores de transcripción, intrínsecos al precursor, son los encargados de establecer la codificación molecular que determina dónde y cuándo se generan los distintos tipos de células gliales y neuronales (Guillemot, 2007; Hebert y Fishell, 2008). A partir de ese momento, las posibilidades de diferenciación de los progenitores multipotentes quedan restringidas para producir los diferentes tipos celulares neurales primarios (astrocitos, neuronas y oligodendrocitos). Por ejemplo, el potencial de los precursores puede quedar restringido a la producción de neuronas, en un proceso conocido como selección de tipo celular (Guillemot, 2007). Tras este proceso se produce la especificación de tipo neuronal, o especificación de subtipo. Posteriormente, se desarrolla el proceso de diferenciación terminal, una vez que las células han ocupado sus posiciones definitivas en el encéfalo. Estos tres procesos son diferentes conceptualmente pero sus mecanismos moleculares están muy ligados y, por ello, hemos analizado todos ellos en esta Tesis Doctoral. La generación de todos los tipos celulares que componen el encéfalo depende de la codificación que obtienen las células neuroepiteliales y la glía radial durante el desarrollo (Puelles y Rubenstein 1993; Campbell, 2003; Guillemot, 2005; 2007; Flames *et al.*, 2007; Long *et al.*, 2009). Pax6 es un factor de transcripción implicado tanto en la generación de patrones (Carney *et al.*, 2009), como en la de distintos tipos de neuronas (Kriesgein y Álvarez-Buylla, 2009). En particular, Pax6 regula la formación del patrón dorso-ventral, al estar implicado en la formación de la frontera palio (dorsal)-subpalio (ventral) (Toresson *et al.*, 2000; Carney *et al.*, 2009). Desde etapas muy tempranas en el desarrollo embrionario, el palio y el subpalio se identifican por la expresión de los factores de transcripción Pax6 y Gsx2, respectivamente (Yun *et al.*, 2001; Corbin *et al.*, 2003; Carney *et al.*, 2009). Ambos factores de transcripción se reprimen mutuamente (Toresson *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2001; 2003; Corbin *et al.*, 2003). En esta frontera se localizan precursores neurales que generan, entre otras poblaciones, interneuronas que pueblan el BOP (Waclaw *et al.*, 2006; Kohwi *et al.*, 2007) y es también el origen de la región neurogénica de la ZSV-CMR en adultos (Carney *et al.*, 2006; Waclaw *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2007; De Marchis *et al.*, 2007; Kohwi *et al.*, 2007). Debido a la regionalización que sucede durante el desarrollo embrionario, las células madre de la ZSV adulta (células B1) y/o su progenie (células C y A) son heterogéneas y están especificadas regionalmente para generar tipos distintos de interneuronas del BOP (Merkle *et al.*, 2004; Hack *et al.*, 2005; Kohwi *et al.*, 2005; Kelsch *et al.*, 2007; Merkle *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2007). Los diferentes territorios de expresión de factores de transcripción embrionarios (Campbell, 2003, Long *et al.*, 2009) podrían estar preservados de alguna forma postnatalmente (Stuhmer *et al.*, 2002, Stenman *et al.*, 2003, Parras *et al.*, 2004, Waclaw *et al.*, 2006, Kohwi *et al.*, 2007, Young *et al.*, 2007; Merkle *et al.*, 2008) y algunos de ellos se han relacionado con la generación de diferentes tipos de interneuronas bulbares en el animal adulto (Esquema 5; Waclaw *et al.*, 2006; Willaime-Morawek *et al.*, 2006; Kelsch *et al.*, 2007; Kohwi *et al.*, 2007; Merkle *et al.*, 2007; Ventura y Goldman, 2007; Young *et al.*, 2007). Así, al igual que durante el desarrollo embrionario, la expresión diferencial de códigos de factores de transcripción en la

ZSV, CMR y BOP daría lugar a todos los tipos de interneuronas de nueva generación del BOP. Desconocemos hasta qué punto el cerebro de ratones heterocigotos para Pax6 sufre defectos en este tipo de patrones y, por lo tanto, no podemos descartar que parte de nuestros resultados de déficits en la diferenciación de las poblaciones neuroquímicas de interneuronas bulbares estudiadas en este trabajo se deban a defectos en la especificación de las células madre heredados del desarrollo embrionario. Sin embargo, creemos que Pax6 juega un papel determinante en la regulación de este aspecto de la neurogénesis adulta, independientemente de este posible efecto de desarrollo. Esta afirmación se basa en el hecho de que Pax6 participa tanto en la regulación del destino celular, como en la del tiempo de generación de las diferentes poblaciones neuronales y gliales durante el desarrollo, así como en la del tamaño final de esas poblaciones (Guillemot *et al.*, 2007). Los factores de transcripción implicados en la formación de patrones ejercen estas funciones de regulación gracias a que modulan la actividad de factores de transcripción pro-neurales, y factores de transcripción que inhiben la diferenciación neuronal y promueven la diferenciación de astrocitos (Guillemot, 2007; Sugimori *et al.*, 2007). Además, el trasplante de precursores sin Pax6 en cerebros de animales control así como la inyección de vectores virales que inhiben la expresión de Pax6, han demostrado que este factor de transcripción está implicado directamente en la generación de PGs dopaminérgicas y de granos superficiales durante la neurogénesis adulta (Hack *et al.*, 2005; Kohwi *et al.*, 2005). La mayoría de los factores de transcripción que regulan la neurogénesis adulta se expresan en regiones subpaliales durante el desarrollo embrionario (Guillemot, 2005; Lledó *et al.*, 2008). Como en los animales homocigotos sin Pax6 se produce una extensión de estas regiones (Stoykova *et al.*, 2000; Carney *et al.*, 2009), nuestros animales heterocigotos deberían tener una mayor capacidad neurogénica si tuvieran extendida la región ventral y la expresión de estos factores de transcripción. Por lo tanto, estos datos, junto con los obtenidos en este trabajo que indican que los animales heterocigotos presentan una menor capacidad neurogénica, sugieren que Pax6 está ejerciendo por sí mismo una función de promoción de la generación de neuronas también durante la neurogénesis adulta.

En relación con la implicación de Pax6 en la formación de subtipos neuronales específicos, podría ser debida a su relación con otros factores de transcripción. Gsx2 participa en la regionalización de la ZSV adulta (Lledó *et al.*, 2008). Se ha demostrado que hay células TH<sup>+</sup>, CB<sup>+</sup> y CR<sup>+</sup> generadas en animales adultos que derivan de células que expresan Gsx2 durante la etapa embrionaria (Corbin *et al.*, 2000; Toresson *et al.*, 2000; Toresson y Campbell, 2001; Yun *et al.*, 2001, 2003; Stenman *et al.*, 2003). Esto indica que, al carecer nuestro modelo experimental de un alelo del gen Pax6, se podrían estar produciendo alteraciones en la expresión de Gsx2 que llevarían a una desregulación de la expresión de otros factores de transcripción (Meis2, Er81 y de genes Dlx), directamente regulados por Gsx2 y necesarios para la formación de distintos tipos de interneuronas bulbares en el adulto (Waclaw *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2007; Brill *et al.*, 2008). Este dato se apoya en el hecho de que además de la

relación de Pax6 con Gsx2, también se han descrito alteraciones en la expresión de estos otros factores de transcripción (Meis2, Er81 y de genes Dlx) en animales homocigotos sin Pax6 durante el desarrollo embrionario (Carney *et al.*, 2009). Así, la implicación de Pax6 en la especificación de PGs dopaminérgicas podría resultar, bien de la regulación de la expresión de alguno de estos factores de transcripción (aunque no se ha demostrado ninguna relación regulatoria directa más allá de la que existe entre Pax6 y Gsx2), bien de la implicación de Pax6 en la generación de patrones que doten de especificidad a las células madre para la generación de los distintos tipos neuroquímicos.

La población de células PGs NOSn<sup>+</sup>, también muy afectada en los animales +/Sey<sup>Dey</sup>, coexpresa en gran medida CR, aunque aproximadamente un tercio de la población es únicamente positiva para NOSn (Kosaka y Kosaka, 2007). Por ello, a pesar de no haber datos en la literatura al respecto, la generación de la población nitrérgica dependería en gran medida de la expresión de Sp8, Er81 y Meis2, factores que regulan la generación de PGs CR<sup>+</sup> (Waclaw *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2007). Aunque se desconoce el código de factores de transcripción que daría lugar tanto al 30% de PGs NOSn<sup>+</sup> que no expresan CR como a la población de interneuronas glomerulares CCK<sup>+</sup>, también afectadas por la mutación, así como los códigos que conducen a la generación de granos, nuestros resultados indican que la formación de estas poblaciones dependería también de Pax6.

Otros factores de transcripción implicados en la regionalización de la ZSV adulta, además de Gsx2, son Emx1 y Nkx2.1 (Lledó *et al.*, 2008). A pesar de que tanto Pax6 como Emx1 son marcadores característicos del palio durante el desarrollo embrionario, no se han descrito hasta la fecha alteraciones en la expresión de Emx1 en ratones homocigotos sin Pax6 (Schoorjans y Guillemot, 2002; Muzio y Mallamaci, 2003; Kroll y O'Leary, 2005; Tuoc *et al.*, 2009). Sin embargo, sí que se ha descrito la relación entre Nkx2.1 y Pax6. Ambos factores de transcripción cooperan en el establecimiento de la frontera entre la LGE y la MGE (Sussel *et al.*, 1999; Stoykova *et al.*, 2000; Schoorjans y Guillemot, 2002) y los ratones homocigotos sin Pax6 presentan una expansión de la expresión de Nkx2.1 a territorios dorsales (Stoykova *et al.*, 2000), por lo que la región ventral de la ZSV adulta podía presentar cambios en nuestro modelo experimental y contribuir a la alteración en la generación de granos profundos y PGs CB<sup>+</sup> que encontramos en nuestro análisis y que derivan del dominio de expresión de Nkx2.1, situado en el cuadrante ventral de la ZSV (Esquema 5; Lledó *et al.*, 2008). Algunos autores han relacionado la expresión de Nkx2.1 con la generación de interneuronas nitrérgicas durante el desarrollo, ya que los animales mutantes para Nkx2.1 carecen de ellas (Mallamaci *et al.*, 2000; Marin *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2001). Hasta la fecha, se desconoce si el origen de la población de interneuronas NOSn<sup>+</sup> adultas se sitúa en el cuadrante ventral de la ZSV adulta y si su formación depende de Nkx2.1, pero teniendo en cuenta nuestros resultados y los datos expuestos anteriormente, la baja proliferación en la región ventral de la ZSV de nuestros

animales heterocigotos podría estar relacionada con el déficit de interneuronas nitrérgicas que presentan los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ , y puede deberse a cambios en la expresión de *Nkx2.1*.

Al contrario de lo que sucede en la diferenciación de las células de la región neurogénica ZSV-CMR-BOP, nuestros resultados del análisis del papel de *Pax6* en la regulación de los progenitores de oligodendrocitos corticales indican que los ratones carentes de un alelo de *Pax6* poseen un número significativamente mayor de ODs, y estos animales presentan más OPCs proliferativos que los animales control, por lo que, en condiciones normales *Pax6* regula negativamente a los OPCs. Algunos autores han demostrado, al inhibir *Pax6* específicamente en progenitores paliales, que *Pax6* es necesario para la diferenciación de neuronas corticales, astrocitos del parénquima cortical (ambos tipos celulares se reducen en ausencia de *Pax6*) y que regula negativamente la generación de oligodendrocitos a partir de glía radial (la población de ODs aumenta en ausencia de *Pax6*) (Tuoc *et al.*, 2009). La presencia de un mayor número de OPCs proliferativos en nuestros animales heterocigotos podría deberse, bien a defectos en la especificación de la glía radial del palio (Tuoc *et al.*, 2009), bien a una posible ventralización del telencéfalo (Stoykova *et al.*, 2000; Toresson *et al.*, 2000; Carney *et al.*, 2009). Esta última posibilidad deriva de que las regiones ventrales expandidas en los homocigotos sin *Pax6* son uno de los focos de origen de OPCs durante el desarrollo embrionario (Pringle y Richardson, 1993; Spassky *et al.*, 1998; He *et al.*, 2001; Tekki-Kessarar *et al.*, 2001). Aunque no conocemos el mecanismo molecular por el que *Pax6* podría estar regulando la generación de ODs, es posible que *Shh* esté implicado, al ser una molécula importante en la generación de este tipo celular (Orentas *et al.*, 1999; Nery *et al.*, 2001; Tekki-Kessarar *et al.*, 2001) y actuar inhibiendo *Pax6* (Briscoe *et al.*, 2000; Chow y Lang, 2001; Mui *et al.*, 2005; Kim y Lemke, 2006) e induciendo la expresión de *Pax2*, que a su vez puede reprimir *Pax6* (Schwarz *et al.*, 2000; Kim y Lemke, 2006). Otro de los mecanismos moleculares en la especificación de OPCs durante el desarrollo embrionario que podría estar alterado en nuestros heterocigotos sería el mediado por *Ascl1*, un factor de transcripción que regula tanto la neurogénesis como la formación de ODs (Casarosa *et al.*, 1999; Kondo y Raff, 2000; Wang *et al.*, 2001; Parras *et al.*, 2004; Gokhan *et al.*, 2005; Helms *et al.*, 2005). Es de particular interés resaltar que los ratones sin *Ascl1* carecen de algunos de los OPCs y que, en la corteza adulta de animales control el 59% de las células *NG2*<sup>+</sup> expresan *Ascl1* o derivan de células que lo han expresado previamente (Parras *et al.*, 2004, 2007). *Ascl1* ejerce su función en la generación de ODs independientemente de su papel en la generación de neuronas, es decir, no regula el balance entre neurogénesis y oligodendrogénesis y, además, coopera con *Olig2* en la especificación de ODs (Parras *et al.*, 2007). La expresión de *Ascl1* está expandida en embriones de ratones homocigotos sin *Pax6* (Stoykova *et al.*, 2000) y es regulada negativamente por *Pax6* (Sansom *et al.*, 2009), por lo que la expresión de *Ascl1* podría estar expandida o desregulada en nuestro modelo experimental, y

contribuir a la expansión de la población de OPCs que presentan los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  adultos, tanto en la corteza como en el BOP.

No podemos descartar que todos los procesos de desarrollo citados anteriormente estén alterados en los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  al igual que lo están en los ratones homocigotos sin Pax6. Sin embargo, podemos establecer una relación directa entre Pax6 y la proliferación de los OPCs adultos gracias a nuestros resultados sobre la regulación de Pax6 por PDGF y la relación de PDGF con la proliferación de los precursores gliales. El fenotipo observado en los animales  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  se corresponde en gran medida con el descrito en animales transgénicos que sobreexpresan PDGF, que también presentan un elevado número de OPCs proliferativos, pero en los que el número final de ODs generados no presenta diferencias con los animales control, debido a un incremento de la muerte celular (Calver *et al.*, 1998). Todo ello nos lleva a proponer que el descenso en la expresión de Pax6 en los OPCs adultos en respuesta a la exposición a PDGF es necesario para que este factor de crecimiento ejerza su función promotora de la proliferación de este tipo celular, y que la falta de un alelo de Pax6 tendría un efecto en los OPCs comparable a la exposición continua de éstos a PDGF, la hiperproliferación.

Sin embargo, el papel de Pax6 en la generación de ODs es diferente en las regiones neurogénicas. Nuestros resultados de diferenciación a partir de precursores neurogénicos bulbares indican que Pax6 es necesario tanto para la generación de neuronas como para la de ODs, ya que ambas poblaciones se ven reducidas en los experimentos de diferenciación a partir de precursores  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$ , pero no para la de astrocitos. Por lo tanto, el mecanismo molecular que regula la formación de ODs adultos a partir de OPCs situados en regiones no neurogénicas es diferente del que tiene lugar en las regiones neurogénicas. En este momento, se desconoce si los ODs generados en las regiones neurogénicas provienen de precursores diferentes a los que generan neuronas o bien existe un progenitor intermedio bipotente con capacidad para generar tanto interneuronas como ODs, al igual que sucede durante el desarrollo embrionario en la generación de interneuronas corticales GABAérgicas y ODs a partir de precursores ventrales (Monuki *et al.*, 2001). En cualquier caso, la falta de un alelo de Pax6 afectaría bien a la generación de ese precursor bipotente, bien a los precursores de ODs y neuronales independientemente. El mecanismo molecular mediante el cual Pax6 estaría regulando positivamente la generación de estos ODs podría involucrar a la Tenascina-C, proteína de matriz extracelular necesaria para la correcta proliferación de progenitores neurales y su diferenciación a neuronas y oligodendrocitos (Garcion *et al.*, 2001; 2004) y que además está directamente regulada por Pax6 (Götz *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 2007; von Holst *et al.*, 2007). Ya que los animales transgénicos sin Tenascina-C presentan un déficit de generación de ODs a partir de las regiones neurogénicas (Garcion *et al.*, 2001), proponemos que la falta de un alelo del gen Pax6 estaría provocando una disminución en la expresión de Tenascina-C que, a su vez, causaría las anomalías en la generación de ODs demostradas en nuestros experimentos. Otro de los mecanismos que podrían estar involucrados en la menor generación de ODs a partir de

las CMBOPa +/Sey<sup>DeY</sup> podría ser una desregulación del balance entre la formación de astrocitos y la de ODs. En el caso de que existiera un precursor glial bipotente, éste se regularía probablemente por BMPs a través de Olig2 (Cheng *et al.*, 2007). Las BMPs aumentan la expresión de las proteínas Id2 e Id4, proteínas bHLH que carecen de dominios de unión al ADN y que se unen a otras proteínas bHLH que sí los tienen, impidiéndolas actuar. En este caso, Id2 e Id4 se unirían a Olig2, reprimiendo su actividad como factor de transcripción promotor de la generación de ODs (Cheng *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que la expresión de Id2 está aumentada en la corteza de animales sin Pax6 (Piñón *et al.*, 2008) y que Pax6 es capaz de unirse a su promotor (Sansom *et al.*, 2009), este mecanismo molecular también podría estar involucrado en el déficit de generación de ODs a partir de regiones neurogénicas de animales +/Sey<sup>DeY</sup> demostrado en esta Tesis Doctoral, de manera que un posible incremento en la expresión de Id2 en los animales +/Sey<sup>DeY</sup> reprimiría la actividad de Olig2, generándose menos ODs.

Por otra parte, algunos estudios han relacionado a Pax6 con el balance de generación de neuronas *versus* oligodendrocitos en la neurogénesis dirigida al BOP en ratones adultos (Hack *et al.*, 2005; Tuoc *et al.*, 2008). Los autores basan esta afirmación en el hecho de que la sobreexpresión de Pax6 en precursores de la CMR induce una mayor generación de neuronas en detrimento de la formación de ODs (Hack *et al.*, 2005). Este dato difiere de nuestros resultados porque nosotros obtenemos poblaciones reducidas tanto de neuronas como de ODs a partir de precursores +/Sey<sup>DeY</sup>. Sin embargo, y debido a la relación entre el nivel de expresión de Pax6 y la función de este factor de transcripción en un tipo celular concreto, los resultados de Hack y colaboradores (2005) podrían no ser contradictorios con los obtenidos en esta Tesis Doctoral. Numerosos estudios han demostrado que la sobreexpresión de Pax6 en precursores provoca la inducción del destino neuronal (Götz *et al.*, 1998; Heins *et al.*, 2002; Hack *et al.*, 2004, 2005; Berger *et al.*, 2007), incluso a partir de líneas celulares no neurales como las células HeLa (Cartier *et al.*, 2006). Además, estudios recientes han relacionado incrementos en la expresión de Pax6 en los precursores en división con su salida de ciclo y su diferenciación terminal a determinados tipos de neuronas retinianas (Hsieh y Yang, 2009). Es probable que el efecto producido en las células ante una elevada cantidad de Pax6 sea su salida de ciclo para la diferenciación neuronal, pero eso no impide que, con otros niveles de expresión y/o actuando en cooperación con diferentes proteínas, este mismo factor de transcripción tenga otras funciones, como promover la generación de ODs, regular la proliferación o la supervivencia de las células generadas, como apuntan nuestros resultados.

## 4. Pax6 como punto de encuentro entre reguladores extrínsecos e intrínsecos de la neurogénesis

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos han llevado a plantear que la regulación precisa y diferencial de Pax6 podría ser uno de los mecanismos que conecten las señales extracelulares con la regulación del ciclo celular y los diferentes destinos que puede alcanzar una célula durante la neurogénesis adulta. Los factores extrínsecos que regulan este proceso son muy variados y están implicados en la regulación de procesos muy distintos. En este apartado relacionaremos los datos existentes sobre la acción de estos factores extrínsecos con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral y los resultados obtenidos por otros grupos de investigación durante el desarrollo embrionario que relacionan al factor de transcripción Pax6 con estos factores extrínsecos.

Debido a que EGF y FGF2 son necesarios para la expansión de las células madre neurales adultas (CMNa), comenzaremos este apartado hablando sobre ellos. A pesar de que ambos factores actúan como potentes mitógenos sobre las CMNa *in vitro* (Reynolds *et al.*, 1992; Craig *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 1997), su papel *in vivo* no está tan claro y no es tan similar entre ambos factores como el que tienen *in vitro* (Basak y Taylor, 2009). *In vivo*, EGF induce la proliferación y autorrenovación de las CMNa a expensas de la neurogénesis y también se ha comprobado que induce la formación de astrocitos (Craig *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 1997; Gritti *et al.*, 1999). Una respuesta inadecuada a EGF podría estar detrás de la tendencia a una mayor generación de astrocitos que presentan los cultivos de CMBOPa +/Sey<sup>Dey</sup> en comparación con los animales control. Además, siguiendo con la hipótesis de que un nivel bajo de expresión de Pax6 es necesario para la autorrenovación de las CMNa, y teniendo en cuenta que la sobreexposición de éstas a EGF induce su hiperproliferación y reduce la neurogénesis (proceso probablemente inducido por un nivel elevado de Pax6 en los precursores), proponemos que EGF ejerce su función en la neurogénesis adulta, en parte regulando negativamente la expresión y/o la actividad de Pax6. Esta hipótesis se apoya en que la señalización por EGF mediada por Erk conduce a la inhibición de la expresión de Pax6 y tiene un efecto mitogénico sobre las células corneales (Li y Lu, 2005; Wu *et al.*, 2006). Además de esta relación regulatoria con Pax6, nuestras predicciones de fosforilación de este factor de transcripción indican que EGFR puede ser una kinasa que actúa sobre el dominio PST de Pax6. Aún así, la relación de Pax6 con EGF no sería de un único sentido, ya que se ha demostrado que los ratones homocigotos sin Pax6 pierden la señalización por EGF (Assimacopoulos *et al.*, 2003), por lo que Pax6 estaría regulando la expresión de algunos de los componentes de la ruta de señalización de este factor de crecimiento.

La acción de FGF2 *in vivo* sería la de inducir la expansión de neuroblastos y promover la diferenciación neuronal (Craig *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 1997; Gritti *et al.*, 1999), efecto que también se ha demostrado *in vitro* cuando los precursores están en contacto con bajas dosis de

FGF2 (Vergaño-Vera *et al.*, 2006). Por lo tanto, FGF2 podría estar ejerciendo esta función regulando positivamente la expresión o la actividad de Pax6, como se ha demostrado que sucede durante el desarrollo de la retina (Faber *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2004; Spence *et al.*, 2007). La activación de Pax6 por FGF2 podría ser el mecanismo que induce la expresión de la ciclina D2 como respuesta al tratamiento con FGF2 (Lobjois *et al.*, 2004) y que favorece la proliferación y autorrenovación de las CMNa, ya que Pax6 regula la expresión de ciclinas de tipo D (Sansom *et al.*, 2009). Por todo ello, FGF2, en función de su concentración, podría estar ejerciendo una regulación diferente de Pax6 que promoviera la proliferación a través de reguladores del ciclo celular cuando la concentración de FGF2 es elevada, o que indujera la diferenciación cuando la dosis es baja. Es decir, la exposición de las células a diferente concentración de FGF2 produciría cambios en la expresión y/o actividad de Pax6 de forma inversa a la concentración del factor de crecimiento. Debido a que FGF2 promueve tanto la formación de neuronas como la de oligodendrocitos (Gritti *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 1997; Lachapelle *et al.*, 2002), una mala respuesta a este factor de crecimiento por parte de los precursores  $+/\text{Sey}^{\text{Dey}}$  *in vitro* podría estar detrás de los déficits de generación de ambos tipos celulares descritos en el presente trabajo. Además, Pax6 regula la expresión de receptores para FGF como FGFR1, de moléculas relacionadas con la señalización, como FGFBP1, y también es capaz de unirse al promotor del propio FGF2 (Sansom *et al.*, 2009).

Otro de los factores de crecimiento reguladores de la neurogénesis adulta y relacionados con Pax6 es VEGF, que actúa como factor trófico de supervivencia (Schanzer *et al.*, 2004). VEGF regula negativamente la proliferación, reduce la velocidad de la migración de los precursores por la CMR, inhibe la diferenciación de PGs dopaminérgicas y NeuN positivas y favorece la dendritogénesis (Wittko *et al.*, 2009; Licht *et al.*, 2010). Por lo tanto, la acción de VEGF es contraria a la de Pax6 en la neurogénesis adulta, ya que sus funciones son contrarias a las propuestas para Pax6 según los resultados obtenidos en el presente trabajo. La acción de la señalización de VEGF podría conducir a la inhibición de la expresión de Pax6 y/o de su actividad. Ya que Pax6 regula negativamente la expresión de VEGF-A (Zhou *et al.*, 2010), el balance entre ambas actividades podría ser determinante en la regulación precisa de la neurogénesis adulta.

IGFI, la insulina y la proinsulina inducen tanto la proliferación como la diferenciación y son moléculas inductoras del fenotipo neuronal (Anderson *et al.*, 2002; Vicario-Abejón *et al.*, 2003; Otaegi *et al.*, 2006). Además, IGFI participa en la migración tangencial de las células de nueva generación hacia el BOP (Otaegi *et al.*, 2006; Hurtado-Chong *et al.*, 2009) y está implicado en la maduración neuronal (Anderson *et al.*, 2002). Otro de sus efectos es promover la proliferación de los precursores de oligodendrocitos durante el desarrollo embrionario (Ballotti *et al.*, 1987; Jiang *et al.*, 2001). IGFI promueve la expresión de Pax6 (Eivers *et al.*, 2004) y se ha descrito una menor presencia de células Pax6<sup>+</sup>, así como de PGs CB<sup>+</sup>, CR<sup>+</sup> y TH<sup>+</sup> en la CG del BOP de ratones sin IGFI (Hurtado-Chong *et al.*, 2009). Nuestros resultados muestran

también un descenso en estas poblaciones, por lo que es posible que IGF1 actúe, en parte, a través de la inducción o la modificación de la actividad de Pax6, tanto en la especificación neuronal como en la promoción de la maduración de las células de nueva generación. A su vez, Pax6 promueve la expresión de insulina tanto uniéndose al promotor de la proinsulina (Sander *et al.*, 1997) como regulando positivamente la conversión de la proinsulina a insulina, al regular positivamente la expresión de la enzima implicada en la generación de insulina a partir de proinsulina (Wen *et al.*, 2009). Además, Pax6 se une al promotor de IGF1R, IGF1BP1, IGF1BP3 e IGF1BP5 (que modulan la acción de los IGFs) (Sansom *et al.*, 2009). Por todo ello, de nuevo la relación de los IGFs y la insulina con Pax6 sería bidireccional, y estaría implicada en la regulación precisa de la neurogénesis.

PDGF es un factor de crecimiento mitogénico para las CMNa, y promueve la gliogénesis en detrimento de la neurogénesis (Lachapelle *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en el presente trabajo en precursores de regiones no neurogénicas sobre la regulación negativa de Pax6 por PDGF, y el efecto inhibitorio de la neurogénesis que presenta PDGF (Jackson *et al.*, 2006), sugieren que es posible que la acción de PDGF sobre la expresión de Pax6 en las CMNa sea similar a la que hemos demostrado en los progenitores gliales. Es decir, la exposición a PDGF de las CMNa podría disminuir la expresión de Pax6 y, de esta forma, promover su proliferación e inhibir su capacidad de generar neuronas. Además, existe una relación entre exposición excesiva a PDGF de las CMNa de la ZSV y la inducción de tumores cerebrales, normalmente debidos a una proliferación incontrolada (Jackson *et al.*, 2006). Algunos autores están empezando a relacionar la acción de Pax6 con diferentes aspectos del desarrollo tumoral (Yamaoka *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2003; 2005; 2010) y se ha relacionado su nivel de expresión de forma directa con un mejor o peor pronóstico en pacientes con tumores cerebrales, así como el de algunos de sus genes diana (Sansom *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Así, los tumores con mayor expresión de Pax6 tienen un pronóstico mucho más favorable que los que presentan una menor expresión (Zhou *et al.*, 2003). Es decir, la exposición excesiva a PDGF podría conllevar una menor expresión de Pax6 que conduzca a un mayor desarrollo tumoral. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que no se han encontrado mutaciones en el gen Pax6 (ni en las regiones codificantes, ni en las reguladoras), aunque su papel en el desarrollo y evolución tumorales están demostrados (Pinto *et al.*, 2007). Sobre el papel de PDGF y la regulación que ejerce sobre Pax6 en los precursores no neurogénicos, los resultados obtenidos demuestran que está mediada en parte por la acción de la kinasa Erk, aunque sugieren que ésta no es la única kinasa implicada. Teniendo en cuenta nuestras predicciones de fosforilación, proponemos que esta segunda kinasa implicada podría ser, bien alguna de las variadas isoformas de la PKC que son capaces de forma teórica de fosforilar Pax6, bien el propio receptor de PDGF, lo que conferiría especificidad a la respuesta. Nuestras predicciones también sugieren que la proteína Pax6 presenta numerosas regiones de unión a

proteínas adaptadoras que se unen a RTKs, lo que facilitaría la interacción de Pax6 con el receptor de PDGF.

Algunas de las moléculas más importantes en la regulación de la supervivencia neuronal, la formación de conexiones y la promoción de la neurogénesis son las neurotrofinas. Debido a que nuestros resultados demuestran alteraciones graves en la supervivencia de las células generadas, y alteraciones morfológicas en la formación de prolongaciones *in vitro*, ahondaremos en la relación entre las neurotrofinas y el factor de transcripción Pax6. BDNF es la principal neurotrofina implicada en la regulación de la neurogénesis adulta. Promueve la neurogénesis y la supervivencia a largo plazo de las células de nueva generación en el BOP (Kirschenbaum y Goldman, 1995; Zigova *et al.*, 1998; Pencea *et al.*, 2001), y también se ha propuesto que regula la sinaptogénesis de las nuevas interneuronas que se incorporan al BOP (Bath y Lee, 2010). Aún así, la acción de BDNF y otras neurotrofinas depende en gran medida del receptor que presenten las células (Miller y Kaplan, 2001). Clásicamente se ha considerado que la señalización de las neurotrofinas desencadenada por su unión al receptor p75<sup>NTR</sup> conduce a la muerte por apoptosis, mientras que la señalización mediante receptores Trk produce los efectos "positivos" relacionados con las neurotrofinas (Miller y Kaplan, 2001; Kuczewski *et al.*, 2009). Sin embargo, la acción proapoptótica de p75<sup>NTR</sup> en la regulación de la neurogénesis adulta es actualmente objeto de controversia (Bath y Lee, 2010). Los datos en la bibliografía que demuestran una relación entre BDNF, los receptores de neurotrofinas y Pax6 son variados. Por ejemplo, el tratamiento con NGF o BDNF incrementa la expresión de Pax6 *in vitro* (Kioussi y Gruss, 1994). Por ello, es posible que la acción promotora de la neurogénesis de BDNF se pueda estar llevando a cabo mediante la inducción de la expresión de Pax6. Además, se ha demostrado que los ratones homocigotos sin Pax6 presentan una sobreexpresión de p75<sup>NTR</sup> y una carencia de TrkB en algunas interneuronas, que presentan procesos cortos y más delgados en comparación con las células control, y que mueren posteriormente (Nikoletopoulou *et al.*, 2007). Nuestros resultados de diferenciación de distintos tipos neuroquímicos de neuronas en los cultivos +/Sey<sup>Dey</sup> demuestran que las pocas interneuronas generadas en los cultivos heterocigotos presentan un fenotipo con dendritas más cortas y delgadas que las neuronas control, similar al descrito para las neuronas que sobreexpresan p75<sup>NTR</sup> y presentan una carencia en TrkB (Nikoletopoulou *et al.*, 2007). Por todo ello, una desregulación de la respuesta a las neurotrofinas en nuestros animales heterocigotos podría contribuir, en parte, a la elevada tasa de muerte celular y a las alteraciones morfológicas que presentan las neuronas diferenciadas *in vitro*, lo que indicaría una relación del factor de transcripción con la respuesta a las neurotrofinas.

Numerosos artículos relacionan a Pax6 con la ruta de señalización de Wnts (*Wingless type*; proteínas de tipo Wingless) (Osumi *et al.*, 1997; Grinchuk *et al.*, 2005; Maekawa *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Shaham *et al.*, 2009). Esta ruta presenta dos vías de señalización complejas que convergen en la  $\beta$ -Catenina como diana. La señalización mediante Wnt- $\beta$ -

Catenina está implicada en el mantenimiento de las propiedades de autorrenovación y multipotencialidad de las células madre, la regulación del ciclo celular y la supervivencia, además de en la formación de patrones durante el desarrollo, y tiene como dianas, por ejemplo, a diferentes ciclinas (Willert y Nusse, 1998). Por otra parte, las proteínas de la familia Wnt también promueven la diferenciación (Muroyama *et al.*, 2004; Lie *et al.*, 2005). Muchos de los componentes de la señalización mediante Wnts se expresan en la ZSV adulta. Sin embargo, pese a su gran implicación en la regulación de la neurogénesis embrionaria y la neurogénesis adulta en el hipocampo, hasta el momento se desconoce el papel de la señalización canónica Wnt- $\beta$ catenina en la región neurogénica ZSV-CMR-BOP. El único dato al respecto es la expresión de  $\beta$ -Catenina por las células tipo B de esta región (Mirzadeh *et al.*, 2008), y que ésta mantiene a las células en estado proliferativo (Adachi *et al.*, 2007). Se ha demostrado que algunas células homocigotas para Pax6 mueren por apoptosis debido a la desregulación de esta señalización (Shaham *et al.*, 2009) y que los animales homocigotos sin Pax6 muestran una menor expresión de Wnt7a, Wnt7b y Dvl1 (Osumi *et al.*, 1997; Maekawa *et al.*, 2005), proteínas integrantes de esta ruta de señalización. Además, también se sabe que Pax6 regula de manera indirecta la expresión de la  $\beta$ -Catenina (Grinchuk *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2007) y que es capaz de unirse a los promotores de Wnt1, Wnt6, Wnt10b y Wnt 11 (Sansom *et al.*, 2009).

Como hemos venido exponiendo en este apartado, los datos aportados por las publicaciones reseñadas aquí y nuestros propios resultados, apoyan firmemente la idea de que Pax6 es una proteína altamente regulada por los factores extrínsecos que gobiernan la neurogénesis adulta, y que esta regulación variaría su capacidad para unirse al ADN y desencadenar diferentes respuestas en las células relacionadas con las decisiones de destino. Además, esta relación con los factores extrínsecos sería bidireccional, por lo que Pax6 estaría a su vez implicado en la regulación de los reguladores, contribuyendo así a la generación o el mantenimiento del nicho neurogénico. Por lo tanto, conocer las diferentes funciones de Pax6 y como se regulan contribuirá al conocimiento preciso de la modulación de la neurogénesis adulta.

## 5. Regiones neurogénicas y no neurogénicas en el animal adulto y el papel de Pax6

Nuestros resultados muestran un papel diferente de Pax6 en la regulación de la proliferación en precursores gliogénicos y neurogénicos de roedores adultos. Ante un mismo punto de partida, la haploinsuficiencia de Pax6, estos dos tipos de precursores se comportan bien incrementando su proliferación en el caso de los precursores de regiones no neurogénicas,

bien disminuyéndola en el caso de los precursores neurogénicos. Las moléculas de las que hemos hablado en el apartado anterior, y algunas otras más, forman parte del nicho que favorece la neurogénesis. Como hemos visto previamente, Pax6 está altamente relacionado con muchas de estas moléculas y, además de sufrir una posible regulación por sus rutas de señalización, también podría estar controlando la expresión de algunas de ellas. Por ello, Pax6, además de depender del microambiente neurogénico que rodea a las células para su función, también sería uno de sus generadores. La importancia del nicho neurogénico se ha determinado mediante experimentos de trasplante (Suhonen *et al.*, 1996; Herrera *et al.*, 1999; Palmer *et al.*, 1999; Kondo y Raff, 2000; Lim *et al.*, 2000; Shihabuddin *et al.*, 2000; Temple, 2001; Gage, 2002; Horner *et al.*, 2002; Stallcup *et al.*, 2002; Belachew *et al.*, 2003). Así, los precursores de las regiones no neurogénicas pueden generar neuronas *in vitro*, al igual que si se trasplantan en regiones neurogénicas (Suhonen *et al.*, 1996; Shihabuddin *et al.*, 2000; Temple, 2001) o lo llegan a hacer moderadamente tras una lesión (Palmer *et al.*, 1999; Kondo y Raff, 2000; Horner *et al.*, 2002; Stallcup *et al.*, 2002; Belachew *et al.*, 2003). Sin embargo *in vivo*, situados en su lugar original, solo son capaces de producir células gliales (revisado en Gage, 2002). Además, al trasplantar precursores extraídos de regiones neurogénicas en regiones no neurogénicas, éstos únicamente son capaces de producir células gliales (Herrera *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2000; Temple, 2001), por lo que en las regiones no neurogénicas debe existir un microambiente no permisivo para la formación de neuronas. Al ser Pax6 un potente inductor de la diferenciación neuronal (Heins *et al.*, 2002), su acción y regulación son diferentes en las distintas regiones, como hemos demostrado en el presente trabajo.

La composición de la matriz extracelular en estas dos regiones, neurogénica y no neurogénica, parece contribuir enormemente a marcar las diferencias entre ambas (Riquelme *et al.*, 2008). Entre estos componentes se encontrarían las Integrinas, receptores que actúan como puente de unión entre los componentes de la matriz extracelular y el citoesqueleto, y cooperan con los receptores para factores de crecimiento favoreciendo su señalización (Comoglio *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2004). Cabe resaltar que la expresión de algunas integrinas, al igual que la de muchas otras proteínas de matriz extracelular, está bajo control directo o indirecto de Pax6 (Cvelk y Piatigorsky, 1996; Chauhan *et al.*, 2002; Simpson y Price, 2002; Zaniolo *et al.*, 2004; Grinchuk *et al.*, 2005; von Holst *et al.*, 2007). Se ha propuesto que la composición de la matriz extracelular que rodea a los precursores debe ser determinante para su capacidad de generar neuronas, ya que muchos de los factores difusibles que regulan la neurogénesis adulta también actúan de forma fisiológica sobre los precursores no neurogénicos, produciendo efectos similares en ambas regiones. Un ejemplo claro de esto es la acción promotora de la proliferación que desempeñan PDGF, EGF y bFGF tanto sobre las células madre neurogénicas como sobre los progenitores gliales (Bogler *et al.*, 1990; McKinnon *et al.*, 1990; Craig *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 1997; Gritti *et al.*, 1999; van Heyningen *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2006; Canoll y Goldman, 2008). Como demuestran nuestros resultados en el

caso de la regulación por Pax6 por PDGF y como hemos argumentado en el apartado anterior, estos tres factores de crecimiento están relacionados bidireccionalmente con Pax6. El que la acción de estos tres factores de crecimiento sobre Pax6 pueda ser diferente en función del contexto celular, o que las respuestas que regule Pax6 en los diferentes precursores sean distintas al actuar en cooperación con proteínas diferentes es algo que aún no ha sido dilucidado. Por otra parte, la gliogénesis adulta es fundamentalmente un fenómeno local y en la neurogénesis adulta los progenitores migran grandes distancias (Horner y Palmer, 2003). Respecto a esta diferencia en la migración de los precursores, se han detectado diferencias en la composición de la matriz extracelular, debidas a diferentes propiedades de los astrocitos (García-Marqués *et al.*, 2010). Si estas diferencias en la composición de la matriz extracelular dependientes de los astrocitos están relacionadas también con la permisividad neurogénica del nicho es algo que aún no se ha comprobado.

Debido a la carencia de datos en la literatura sobre la presencia o ausencia de moléculas distintas en ambos tipos de microambiente, y a la falta de una exhaustiva caracterización molecular de ambos tipos de precursores, desconocemos él o los mecanismos que conducen a este papel aparentemente dicotómico de Pax6.

Los resultados obtenidos en este trabajo suponen un avance en el conocimiento de la regulación de la neurogénesis adulta, y un paso adelante en la comprensión de las diferencias entre precursores neurogénicos y no neurogénicos. Además, abren la puerta a la relación de dos tipos de mecanismos moleculares regulatorios: las señales extracelulares y los efectores intrínsecos, cuya regulación precisa podría depender de la función de Pax6 en las diferentes células. Como hemos demostrado en esta Tesis Doctoral, este factor de transcripción presenta múltiples funciones en la neurogénesis adulta como el control de la autorrenovación, la proliferación, la determinación y diferenciación de tipos y subtipos celulares y la supervivencia a corto plazo de los precursores. Muchas de las funciones de Pax6 dependerían de su relación con proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, contribuyendo así a la modulación de un parámetro esencial para el desarrollo de la neurogénesis.

**Conclusiones**



De acuerdo con la hipótesis de partida para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, los objetivos planteados para su comprobación, los resultados obtenidos y su discusión, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

**1.-** El factor de transcripción Pax6 participa de forma diferencial en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de los distintos tipos de precursores del encéfalo adulto, tanto en la región neurogénica de la zona subventricular, corriente migratoria rostral y bulbo olfatorio principal, como en la región no neurogénica de la corteza cerebral.

**2.-** Pax6 regula positivamente la proliferación, diferenciación y supervivencia temprana de los precursores de la región neurogénica adulta ZSV-CMR-BOP, según las evidencias disponibles, mediante un mecanismo dependiente del control de su ciclo celular.

**3.-** Durante la diferenciación de los precursores neurogénicos, Pax6 ejerce un doble papel, participando tanto en la decisión de destino neuronal como en la especificación de subtipo neuroquímico, especialmente en el de las células nitrérgicas y dopaminérgicas. Además de estas funciones, Pax6 también regula positivamente la diferenciación de oligodendrocitos a partir de CMBOPa.

**4.-** El factor de crecimiento PDGF regula a la baja el nivel de expresión de Pax6 en progenitores gliales, lo que está relacionado con el incremento de su capacidad proliferativa. El mecanismo molecular que conduce a la posible degradación de la proteína Pax6 involucra la activación de Erk, sin excluir la implicación de otras moléculas.



## Bibliografía



- Adachi K, Mirzadeh Z, Sakaguchi M, Yamashita T, Nikolcheva T, Gotoh Y, Peltz G, Gong L, Kawase T, Álvarez-Buylla A, Okano H, Sawamoto K. 2007. Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells* 25:2827-36
- Agasse F, Roger M, Coronas V. 2004. Neurogenic and intact or apoptotic non-neurogenic areas of adult brain release diffusible molecules that differentially modulate the development of subventricular zone cell cultures. *Eur J Neurosci* 19:1459-68
- Ahmed S. 2009. The culture of neural stem cells. *J Cell Biochem* 106:1-6
- Allen ZJ, Waclaw RR, Colbert MC, Campbell K. 2007. Molecular identity of olfactory bulb interneurons: transcriptional codes of periglomerular neuron subtypes. *J Mol Histol*. 38:517-25
- Altar CA, Fritsche M, Lindsay RM. 1998. Cell body infusions of brain-derived neurotrophic factor increase forebrain dopamine release and serotonin metabolism determined with in vivo microdialysis. *Adv Pharmacol* 42:915-21
- Altman J, Das GD. 1965. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207:953-6
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-35
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-57
- Álvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2:287-93
- Álvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-34
- Álvarez-Buylla A, Lim DA. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-6
- Alves JA, Barone P, Engelender S, Froes MM, Menezes JR. 2002. Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone. *J Neurobiol* 52:251-65
- Anchan RM, Drake DP, Haines CF, Gerwe EA, LaMantia AS. 1997. Disruption of local retinoid-mediated gene expression accompanies abnormal development in the mammalian olfactory pathway. *J Comp Neurol* 379:171-84
- Anderson MF, Aberg MA, Nilsson M, Eriksson PS. 2002. Insulin-like growth factor-I and neurogenesis in the adult mammalian brain. *Dev Brain Res* 134:115-22
- Anderson SA, Marín O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL. 2001. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128:353-63
- Antoniades HN. 1981. Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7314-7
- Anversa P, Kajstura J. 1998. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 83:1-14
- Aota S, Nakajima N, Sakamoto R, Watanabe S, Ibaraki N, Okazaki K. 2003. Pax6 autoregulation mediated by direct interaction of Pax6 protein with the head surface ectoderm-specific enhancer of the mouse Pax6 gene. *Dev Biol* 257:1-13
- Arai Y, Funatsu N, Numayama-Tsuruta K, Nomura T, Nakamura S, Osumi N. 2005. Role of Fabp7, a downstream gene of Pax6, in the maintenance of neuroepithelial cells during early embryonic development of the rat cortex. *J Neurosci* 25:9752-61
- Aroniadou-Anderjaska V, Zhou FM, Priest CA, Ennis M, Shipley MT. 2000. Tonic and synaptically evoked presynaptic inhibition of sensory input to the rat olfactory bulb via GABA(B) heteroreceptors. *J Neurophysiol*. 84:1194-203
- Asano M, Gruss P. 1992. Pax-5 is expressed at the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Mech Dev* 39:29-39
- Assimacopoulos S, Grove EA, Ragsdale CW. 2003. Identification of a Pax6-dependent

epidermal growth factor family signaling source at the lateral edge of the embryonic cerebral cortex. *J Neurosci* 23:6399-403

Aungst JL, Heyward PM, Puche AC, Karnup SV, Hayar A, Szabo G, Shipley MT. 2003. Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426:623-9

**B**allotti R, Nielsen FC, Pringle N, Kowalski A, Richardson WD, Van Obberghen E, Gammeltoft S. 1987. Insulin-like growth factor I in cultured rat astrocytes: expression of the gene, and receptor tyrosine kinase. *EMBO J* 6:3633-9

Baltanás FC, Weruaga E, Murias AR, Gómez C, Curto GG, Alonso JR. 2009. Chemical characterization of Pax6-immunoreactive periglomerular neurons in the mouse olfactory bulb. *Cell Mol Neurobiol* 29:1081-5

Bar-Sagi D, Hall A. 2000. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103:227-38

Baron W, de Jonge JC, de Vries H, Hoekstra D. 1998. Regulation of oligodendrocyte differentiation: protein kinase C activation prevents differentiation of O2A progenitor cells toward oligodendrocytes. *Glia* 22:121-9

Barr FG. 1997. Chromosomal translocations involving paired box transcription factors in human cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1449-61

Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC. 1992. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46

Barres BA, Schmid R, Sendtner M, Raff MC. 1993. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118:283-95

Barrett GL, Bartlett PF. 1994. The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6501-5

Basak O, Taylor V. 2009. Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cell Mol Life Sci* 66:1057-72

Bath KG, Lee FS. 2010. Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Neurobiol* 70:339-49

Batista-Brito R, Close J, Machold R, Fishell G. 2008. The distinct temporal origins of olfactory bulb interneuron subtypes. *J Neurosci* 28:3966-75

Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ. 2006. Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 23:83-93

Baumer N, Marquardt T, Stoykova A, Ashery-Padan R, Chowdhury K, Gruss P. 2002. Pax6 is required for establishing naso-temporal and dorsal characteristics of the optic vesicle. *Development* 129:4535-45

Bayer SA. 1983. <sup>3</sup>H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res* 50:329-40

Belachew S, Chittajallu R, Aguirre AA, Yuan X, Kirby M, Anderson S, Gallo V. 2003. Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol* 161:169-86

Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ. 2003. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 23:10411-8

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbaneck K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114:763-76

Berger J, Berger S, Tuoc TC, D'Amelio M, Ceconi F, Gorski JA, Jones KR, Gruss P, Stoykova A. 2007. Conditional activation of Pax6 in the developing cortex of transgenic mice causes progenitor apoptosis. *Development* 134:1311-22

Berkowicz DA, Trombley PQ. 2000. Dopaminergic modulation at the olfactory nerve synapse. *Brain Res* 855:90-9

Berry M, Hubbard P, Butt AM. 2002. Cytology and lineage of NG2-positive glia. *J Neurocytol* 31:457-67

- Bhat NR. 1991. Phosphorylation of MARCKS (80-kDa) protein, a major substrate for protein kinase C in oligodendroglial progenitors. *J Neurosci Res* 30:447-54
- Bhat NR, Zhang P. 1996. Activation of mitogen-activated protein kinases in oligodendrocytes. *J Neurochem* 66:1986-94
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. 2000. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291:17-20
- Bogler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M. 1990. Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6368-72
- Boheler KR. 2009. Stem cell pluripotency: a cellular trait that depends on transcription factors, chromatin state and a checkpoint deficient cell cycle. *J Cell Physiol* 221:10-7
- Bonni A, Greenberg ME. 1997. Neurotrophin regulation of gene expression. *Can J Neurol Sci* 24:272-83
- Bovetti S, Hsieh YC, Bovolin P, Perroteau I, Kazunori T, Puche AC. 2007. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27:5976-80
- Brill MS, Snapyan M, Wohlfrom H, Ninkovic J, Jawerka M, Mastick GS, Ashery-Padan R, Saghatelian A, Berninger B, Götz M. 2008. A *dlx2*- and *pax6*-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 28:6439-52
- Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascon S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Götz M. 2009. Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci* 12:1524-33
- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J. 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101:435-45
- Burdon T, Smith A, Savatier P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* 12:432-8
- Calegari F, Huttner WB. 2003. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci* 116:4947-55
- Calegari F, Haubensak W, Haffner C, Huttner WB. 2005. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J Neurosci* 25:6533-8
- Caleo M, Menna E, Chierzi S, Cenni MC, Maffei L. 2000. Brain-derived neurotrophic factor is an anterograde survival factor in the rat visual system. *Curr Biol* 10:1155-61
- Callaerts P, Halder G, Gehring WJ. 1997. PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci* 20:483-532
- Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD. 1998. Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 20:869-82
- Cameron FJ, Hageman RM, Cooke-Yarborough C, Kwok C, Goodwin LL, Sillence DO, Sinclair AH. 1996. A novel germ line mutation in *SOX9* causes familial campomelic dysplasia and sex reversal. *Hum Mol Genet* 5:1625-30
- Campbell K, Götz M. 2002. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25:235-8
- Campbell K. 2003. Signaling to and from radial glia. *Glia* 43:44-6
- Cano E, Mahadevan LC. 1995. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 20:117-22
- Canoll P, Goldman JE. 2008. The interface between glial progenitors and gliomas. *Acta Neuropathol* 116:465-77
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, Doring MJ. 2004. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet* 36:827-35
- Capela A, Temple S. 2002. *LeX/ssea-1* is expressed by adult mouse CNS stem cells,

- identifying them as nonependymal. *Neuron* 35:865-75
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Álvarez-Buylla A, Lledó PM. 2003. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507-18
- Carney RS, Alfonso TB, Cohen D, Dai H, Nery S, Stoica B, Slotkin J, Bregman BS, Fishell G, Corbin JG. 2006. Cell migration along the lateral cortical stream to the developing basal telencephalic limbic system. *J Neurosci* 26:11562-74
- Carney RS, Cocas LA, Hirata T, Mansfield K, Corbin JG. 2009. Differential regulation of telencephalic pallial-subpallial boundary patterning by Pax6 and Gsh2. *Cereb Cortex* 19:745-59
- Carriere C, Plaza S, Caboche J, Dozier C, Bailly M, Martin P, Saule S. 1995. Nuclear localization signals, DNA binding, and transactivation properties of quail Pax-6 (Pax-QNR) isoforms. *Cell Growth Differ* 6:1531-40
- Cartier L, Laforge T, Feki A, Arnaudeau S, Dubois-Dauphin M, Krause KH. 2006. Pax6-induced alteration of cell fate: shape changes, expression of neuronal alpha tubulin, postmitotic phenotype, and cell migration. *J Neurobiol* 66:421-36
- Casarosa S, Fode C, Guillemot F. 1999. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126:525-34
- Cesetti T, Obernier K, Bengtson CP, Fila T, Mandl C, Holz-Wenig G, Worner K, Eckstein V, Ciccolini F. 2009. Analysis of stem cell lineage progression in the neonatal subventricular zone identifies EGFR+/NG2-cells as transit-amplifying precursors. *Stem Cells* 27:1443-54
- Chadashvili T, Peterson DA. 2006. Cytoarchitecture of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR-2) immunoreactivity in astrocytes of neurogenic and non-neurogenic regions of the young adult and aged rat brain. *J Comp Neurol* 498:1-15
- Chalepakis G, Tremblay P, Gruss P. 1992. Pax genes, mutants and molecular function. *J Cell Sci Suppl* 16:61-7
- Chalepakis G, Wijnholds J, Giese P, Schachner M, Gruss P. 1994. Characterization of Pax-6 and Hoxa-1 binding to the promoter region of the neural cell adhesion molecule L1. *DNA Cell Biol* 13:891-900
- Chanas-Sacre G, Rogister B, Moonen G, Leprince P. 2000. Radial glia phenotype: origin, regulation, and transdifferentiation. *J Neurosci Res* 61:357-63
- Chauhan BK, Reed NA, Yang Y, Cermak L, Reneker L, Duncan MK, Cvekl A. 2002. A comparative cDNA microarray analysis reveals a spectrum of genes regulated by Pax6 in mouse lens. *Genes Cells* 7:1267-83
- Chazal G, Durbec P, Jankovski A, Rougon G, Cremer H. 2000. Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J Neurosci* 20:1446-57
- Chen HL, Panchision DM. 2007. Concise review: bone morphogenetic protein pleiotropism in neural stem cells and their derivatives--alternative pathways, convergent signals. *Stem Cells* 25:63-8
- Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. 1995. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* 269:529-31
- Cheng X, Wang Y, He Q, Qiu M, Whittemore SR, Cao Q. 2007. Bone morphogenetic protein signaling and olig1/2 interact to regulate the differentiation and maturation of adult oligodendrocyte precursor cells. *Stem Cells* 25:3204-14
- Chenn A, Walsh CA. 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297:365-9
- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der KD. 1999. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 19:4462-71
- Chow RL, Lang RA. 2001. Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:255-96
- Comoglio PM, Boccaccio C, Trusolino L. 2003. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr Opin Cell Biol* 15:565-71
- Cook DL, Gerber AN, Tapscott SJ. 1998. Modeling stochastic gene expression:

- implications for haploinsufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15641-6
- Corbin JG, Gaiano N, Machold RP, Langston A, Fishell G. 2000. The Gsh2 homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development. *Development* 127:5007-20
- Corbin JG, Rutlin M, Gaiano N, Fishell G. 2003. Combinatorial function of the homeodomain proteins Nkx2.1 and Gsh2 in ventral telencephalic patterning. *Development* 130:4895-906
- Coskun V, Luskin MB. 2001. The expression pattern of the cell cycle inhibitor p19(INK4d) by progenitor cells of the rat embryonic telencephalon and neonatal anterior subventricular zone. *J Neurosci* 21:3092-103
- Coskun V, Luskin MB. 2002. Intrinsic and extrinsic regulation of the proliferation and differentiation of cells in the rodent rostral migratory stream. *J Neurosci Res* 69:795-802
- Coskun V, Wu H, Bianchi B, Tsao S, Kim K, Zhao J, Biancotti JC, Hutnick L, Krueger RC, Jr., Fan G, de Vellis J, Sun YE. 2008. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1026-31
- Coulson EJ, Reid K, Shipham KM, Morley S, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. 2004. The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog Brain Res* 146:41-62
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der KD. 1996. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16:2649-58
- Cremisi F, Philpott A, Ohnuma S. 2003. Cell cycle and cell fate interactions in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 13:26-33
- Crespo C, Blasco-Ibanez JM, Marques-Mari AI, Martínez-Guijarro FJ. 2001. Parvalbumin-containing interneurons do not innervate granule cells in the olfactory bulb. *Neuroreport* 12:2553-6
- Crespo C, Gracia-Llanes FJ, Blasco-Ibanez JM, Gutiérrez-Mecinas M, Marques-Mari AI, Martínez-Guijarro FJ. 2003. Nitric oxide synthase containing periglomerular cells are GABAergic in the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett* 349:151-4
- Crespo C, Gracia-Llanes FJ, Gutiérrez-Mecinas M, Blasco-Ibáñez JM, Marqués-Mari AI, Nácher J, Varea E, Martínez-Guijarro FJ. El bulbo olfatorio de los mamíferos: aspectos de su organización anatómica. Alonso, J. R., de Castro, F., and López-Mascaraque, L. 71-95. 2006. Salamanca, SBI. La olfación en España.
- Cunningham JJ, Roussel MF. 2001. Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell Growth Differ* 12:387-96
- Cvekl A, Piatigorsky J. 1996. Lens development and crystallin gene expression: many roles for Pax-6. *Bioessays* 18:621-30
- Cvekl A, Kashanchi F, Brady JN, Piatigorsky J. 1999. Pax-6 interactions with TATA-box-binding protein and retinoblastoma protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1343-50
- Czerny T, Schaffner G, Busslinger M. 1993. DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev* 7:2048-61
- D**ale JK, Vesque C, Lints TJ, Sampath TK, Furley A, Dodd J, Placzek M. 1997. Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell* 90:257-69
- Davis-Silberman N, Kalich T, Oron-Karni V, Marquardt T, Kroeber M, Tamm ER, Ashery-Padan R. 2005. Genetic dissection of Pax6 dosage requirements in the developing mouse eye. *Hum Mol Genet* 14:2265-76
- Davis J, Duncan MK, Robison WG, Jr., Piatigorsky J. 2003. Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: a role in adhesion. *J Cell Sci* 116:2157-67
- Davis JA, Reed RR. 1996. Role of Olf-1 and Pax-6 transcription factors in neurodevelopment. *J Neurosci* 16:5082-94
- Davis RJ. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103:239-52
- De Marchis S, Bovetti S, Carletti B, Hsieh YC, Garzotto D, Peretto P, Fasolo A, Puche AC, Rossi F. 2007. Generation of distinct types of

- periglomerular olfactory bulb interneurons during development and in adult mice: implication for intrinsic properties of the subventricular zone progenitor population. *J Neurosci* 27:657-64
- Dehay C, Kennedy H. 2007. Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci* 8:438-50
- Deleyrolle LP, Reynolds BA. 2009. Identifying and enumerating neural stem cells: application to aging and cancer. *Prog Brain Res* 175:43-51
- Dellovade TL, Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda M. 1998. Olfactory bulb development is altered in small-eye (Sey) mice. *J Comp Neurol* 402:402-18
- Di Giovanni S, Knights CD, Rao M, Yakovlev A, Beers J, Catania J, Avantaggiati ML, Faden AI. 2006. The tumor suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration. *EMBO J* 25:4084-96
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-61
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-16
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 1999. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11619-24
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-34
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Caille I, Álvarez-Buylla A, Chao MV, Casaccia-Bonnel P. 2002. Lack of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 results in selective increase of transit-amplifying cells for adult neurogenesis. *J Neurosci* 22:2255-64
- Dohrmann C, Gruss P, Lemaire L. 2000. Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas. *Mech Dev* 92:47-54
- Downward J. 1996. Control of ras activation. *Cancer Surv* 27:87-100
- Downward J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10:262-7
- Duparc RH, Boutemmine D, Champagne MP, Tetreault N, Bernier G. 2006. Pax6 is required for delta-catenin/neurojugin expression during retinal, cerebellar and cortical development in mice. *Dev Biol* 300:647-55
- Duparc RH, Abdouh M, David J, Lepine M, Tetreault N, Bernier G. 2007. Pax6 controls the proliferation rate of neuroepithelial progenitors from the mouse optic vesicle. *Dev Biol* 301:374-87
- E**cclleston PA, Silberberg DH. 1985. Fibroblast growth factor is a mitogen for oligodendrocytes in vitro. *Brain Res* 353:315-8
- Echelard Y, Epstein DJ, St Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417-30
- Ederly P, Manach Y, Le Merrer M, Till M, Vignal A, Lyonnet S, Munnich A. 1994. Apparent genetic homogeneity of the Treacher Collins-Franceschetti syndrome. *Am J Med Genet* 52:174-7
- Eivers E, McCarthy K, Glynn C, Nolan CM, Byrnes L. 2004. Insulin-like growth factor (IGF) signalling is required for early dorso-anterior development of the zebrafish embryo. *Int J Dev Biol* 48:1131-40
- Engelhardt JF, Schlossberg H, Yankaskas JR, Dudus L. 1995. Progenitor cells of the adult human airway involved in submucosal gland development. *Development* 121:2031-46
- Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF. 2005. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* 25:247-51
- Enver T, Pera M, Peterson C, Andrews PW. 2009. Stem cell states, fates, and the rules of attraction. *Cell Stem Cell* 4:387-97

- Episkopou V. 2005. SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci* 28:219-21
- Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton DS, Maas RL. 1994. Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev* 8:2022-34
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van H, V, Jessell TM, Briscoe J. 1997. Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90:169-80
- Estivill-Torres G, Pearson H, van Heyningen V, Price DJ, Rashbass P. 2002. Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development* 129:455-66
- Evan G, Littlewood T. 1998. A matter of life and cell death. *Science* 281:1317-22
- Evan GI, Brown L, Whyte M, Harrington E. 1995. Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 7:825-34
- F**abel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD. 2003. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18:2803-12
- Faber SC, Dimanlig P, Makarenkova HP, Shirke S, Ko K, Lang RA. 2001. Fgf receptor signaling plays a role in lens induction. *Development* 128:4425-38
- Farkas LM, Huttner WB. 2008. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr Opin Cell Biol* 20:707-15
- Farkas LM, Huttner WB. 2008. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr Opin Cell Biol* 20:707-15
- Favor J, Neuhauser-Klaus A, Ehling UH. 1988. The effect of dose fractionation on the frequency of ethylnitrosourea-induced dominant cataract and recessive specific locus mutations in germ cells of the mouse. *Mutat Res* 198:269-75
- Favor J, Peters H, Hermann T, Schmahl W, Chatterjee B, Neuhauser-Klaus A, Sandulache R. 2001. Molecular characterization of Pax6(2Neu) through Pax6(10Neu): an extension of the Pax6 allelic series and the identification of two possible hypomorph alleles in the mouse *Mus musculus*. *Genetics* 159:1689-700
- Ferguson KL, Vanderluit JL, Hebert JM, McIntosh WC, Tibbo E, MacLaurin JG, Park DS, Wallace VA, Vooijs M, McConnell SK, Slack RS. 2002. Telencephalon-specific Rb knockouts reveal enhanced neurogenesis, survival and abnormal cortical development. *EMBO J* 21:3337-46
- Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S, Nicolis SK. 2004. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131:3805-19
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. 2003. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23:373-82
- Flames N, Pla R, Gelman DM, Rubenstein JL, Puelles L, Marín O. 2007. Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* 27:9682-95
- Fluckiger AC, Marcy G, Marchand M, Negre D, Cosset FL, Mitalipov S, Wolf D, Savatier P, Dehay C. 2006. Cell cycle features of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 24:547-56
- Forster E, Tielsch A, Saum B, Weiss KH, Johanssen C, Graus-Porta D, Muller U, Frotscher M. 2002. Reelin, Disabled 1, and beta 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13178-83
- Foshay KM, Gallicano GI. 2007. Small RNAs, big potential: the role of MicroRNAs in stem cell function. *Curr Stem Cell Res Ther* 2:264-71

- Franklin RJ, Bayley SA, Milner R, Ffrench-Constant C, Blakemore WF. 1995. Differentiation of the O-2A progenitor cell line CG-4 into oligodendrocytes and astrocytes following transplantation into glia-deficient areas of CNS white matter. *Glia* 13:39-44
- Frinchi M, Bonomo A, Trovato-Salinaro A, Condorelli DF, Fuxe K, Spampinato MG, Mudo G. 2008. Fibroblast growth factor-2 and its receptor expression in proliferating precursor cells of the subventricular zone in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 447:20-5
- Frost EE, Zhou Z, Krasnesky K, Armstrong RC. 2009. Initiation of oligodendrocyte progenitor cell migration by a PDGF-A activated extracellular regulated kinase (ERK) signaling pathway. *Neurochem Res* 34:169-81
- Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, Abramsson A, Calver AR, Bostrom H, Willetts K, Bertold CH, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD. 1999. Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 126:457-67
- Fuchs M, Hutzler P, Handschuh G, Hermannstadter C, Brunner I, Hofler H, Lubert B. 2004. Dynamics of cell adhesion and motility in living cells is altered by a single amino acid change in E-cadherin fused to enhanced green fluorescent protein. *Cell Motil Cytoskeleton* 59:50-61
- Fujiwara M, Uchida T, Osumi-Yamashita N, Eto K. 1994. Uchida rat (*rSey*): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant. *Differentiation* 57:31-8
- Fukuda T, Kawano H, Osumi N, Eto K, Kawamura K. 2000. Histogenesis of the cerebral cortex in rat fetuses with a mutation in the Pax-6 gene. *Dev Brain Res* 120:65-75
- G**age FH. 2002. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 22:612-3
- García-Marques J, De Carlos JA, Greer CA, López-Mascaraque L. 2010. Different astroglia permissivity controls the migration of olfactory bulb interneuron precursors. *Glia* 58:218-30
- García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Álvarez-Buylla A. 1998. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* 36:234-48
- Garcion E, Faissner A, Ffrench-Constant C. 2001. Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development* 128:2485-96
- Garcion E, Halilagic A, Faissner A, Ffrench-Constant C. 2004. Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131:3423-32
- Garrington TP, Johnson GL. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11:211-8
- Garwood J, Garcion E, Dobbertin A, Heck N, Calco V, Ffrench-Constant C, Faissner A. 2004. The extracellular matrix glycoprotein Tenascin-C is expressed by oligodendrocyte precursor cells and required for the regulation of maturation rate, survival and responsiveness to platelet-derived growth factor. *Eur J Neurosci* 20:2524-40
- Gascon E, Vutskits L, Zhang H, Barral-Moran MJ, Kiss PJ, Mas C, Kiss JZ. 2005. Sequential activation of p75 and TrkB is involved in dendritic development of subventricular zone-derived neuronal progenitors in vitro. *Eur J Neurosci* 21:69-80
- Gil-Perotin S, Marin-Husstege M, Li J, Soriano-Navarro M, Zindy F, Roussel MF, García-Verdugo JM, Casaccia-Bonnel P. 2006. Loss of p53 induces changes in the behavior of subventricular zone cells: implication for the genesis of glial tumors. *J Neurosci* 26:1107-16
- Glaser T, Lane J, Housman D. 1990. A mouse model of the aniridia-Wilms tumor deletion syndrome. *Science* 250:823-7
- Gokhan S, Marin-Husstege M, Yung SY, Fontanez D, Casaccia-Bonnel P, Mehler MF. 2005. Combinatorial profiles of oligodendrocyte-selective classes of transcriptional regulators differentially modulate myelin basic protein gene expression. *J Neurosci* 25:8311-21
- Gong Q, Shipley MT. 1995. Evidence that pioneer olfactory axons regulate telencephalon cell cycle kinetics to induce the

- formation of the olfactory bulb. *Neuron* 14:91-101
- Götz M, Stoykova A, Gruss P. 1998. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21:1031-44
- Goudreau G, Petrou P, Reneker LW, Graw J, Loster J, Gruss P. 2002. Mutually regulated expression of Pax6 and Six3 and its implications for the Pax6 haploinsufficient lens phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8719-24
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. 1999. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286:548-52
- Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. 2001. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10910-7
- Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR, Gruss P. 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J* 10:1135-47
- Goulding MD, Lumsden A, Gruss P. 1993. Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development* 117:1001-16
- Greer CA. 1987. Golgi analyses of dendritic organization among denervated olfactory bulb granule cells. *J Comp Neurol* 257:442-52
- Gregori N, Proschel C, Noble M, Mayer-Proschel M. 2002. The tripotential glial-restricted precursor (GRP) cell and glial development in the spinal cord: generation of bipotential oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells and dorsal-ventral differences in GRP cell function. *J Neurosci* 22:248-56
- Grinchuk O, Kozmik Z, Wu X, Tomarev S. 2005. The Optimedin gene is a downstream target of Pax6. *J Biol Chem* 280:35228-37
- Grindley JC, Davidson DR, Hill RE. 1995. The role of *Pax-6* in eye and nasal development. *Development* 121:1433-42
- Grindley JC, Hargett LK, Hill RE, Ross A, Hogan BL. 1997. Disruption of PAX6 function in mice homozygous for the *Pax6*<sup>Sey-1Neu</sup> mutation produces abnormalities in the early development and regionalization of the diencephalon. *Mech Dev* 64:111-26
- Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL. 1996. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16:1091-100
- Gritti A, Frolichsthal-Schoeller P, Galli R, Parati EA, Cova L, Pagano SF, Bjornson CR, Vescovi AL. 1999. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* 19:3287-97
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Álvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, García-Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL. 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22:437-45
- Gross RE, Mehler MF, Mabie PC, Zang Z, Santschi L, Kessler JA. 1996. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17:595-606
- Guillemot F. 2005. Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Cell Biol* 17:639-47
- Guillemot F. 2007. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* 134:3771-80
- Gurdon JB, Melton DA. 2008. Nuclear reprogramming in cells. *Science* 322:1811-5
- Gutiérrez-Mecinas M, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Gracia-Llanes FJ, Marques-Mari AI, Martínez-Guijarro FJ. 2005. Soluble guanylyl cyclase appears in a specific subset of periglomerular cells in the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 21:1443-8
- Gutiérrez-Mecinas M, Blasco-Ibáñez JM, Nacher J, Varea E, Martínez-Guijarro FJ, Crespo C. 2008. Distribution of the A3 subunit of the cyclic nucleotide-gated ion channels in the main olfactory bulb of the rat. *Neuroscience* 153:1164-76

- Haba H, Nomura T, Suto F, Osumi N. 2009. Subtype-specific reduction of olfactory bulb interneurons in Pax6 heterozygous mutant mice. *Neurosci Res* 65:116-21
- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. 1991. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9618-22
- Hack MA, Sugimori M, Lundberg C, Nakafuku M, Götz M. 2004. Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Mol Cell Neurosci* 25:664-78
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledó PM, Götz M. 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 8:865-72
- Halász N, Shepherd GM. 1983. Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience* 10:579-619
- Halford S, Wadey R, Roberts C, Daw SC, Whiting JA, O'Donnell H, Dunham I, Bentley D, Lindsay E, Baldini A. 1993. Isolation of a putative transcriptional regulator from the region of 22q11 deleted in DiGeorge syndrome, Shprintzen syndrome and familial congenital heart disease. *Hum Mol Genet* 2:2099-107
- Hamilton KA, Heinbockel T, Ennis M, Szabo G, Erdelyi F, Hayar A. 2005. Properties of external plexiform layer interneurons in mouse olfactory bulb slices. *Neuroscience* 133:819-29
- Hanson IM, Fletcher JM, Jordan T, Brown A, Taylor D, Adams RJ, Punnett HH, van Heyningen V. 1994. Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peters' anomaly. *Nat Genet* 6:168-73
- Hanson I, van Heyningen, V. 1995. Pax6: more than meets the eye. *Trends Genet* 11:268-72
- Hart CE, Forstrom JW, Kelly JD, Seifert RA, Smith RA, Ross R, Murray MJ, Bowen-Pope DF. 1988. Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. *Science* 240:1529-31
- Haubst N, Berger J, Radjendirane V, Graw J, Favor J, Saunders GF, Stoykova A, Götz M. 2004. Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development. *Development* 131:6131-40
- He W, Ingraham C, Rising L, Goderie S, Temple S. 2001. Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis. *J Neurosci* 21:8854-62
- Hebert JM, Fishell G. 2008. The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat Rev Neurosci*
- Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Götz M. 2002. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* 5:308-15
- Heldin CH, Johnsson A, Wennergren S, Wernstedt C, Betsholtz C, Westermark B. 1986. A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature* 319:511-4
- Helms AW, Battiste J, Henke RM, Nakada Y, Simplicio N, Guillemot F, Johnson JE. 2005. Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons. *Development* 132:2709-19
- Herrera DG, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 1999. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol* 46:867-77
- Hevner RF. 2006. From radial glia to pyramidal-projection neuron: transcription factor cascades in cerebral cortex development. *Mol Neurobiol* 33:33-50
- Hewitt SM, Hamada S, Monarres A, Kottical LV, Saunders GF, McDonnell TJ. 1997. Transcriptional activation of the bcl-2 apoptosis suppressor gene by the paired box transcription factor PAX8. *Anticancer Res* 7:3211-5
- Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van H, V. 1991. Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354:522-5

- Hinds JW. 1968. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J Comp Neurol* 134:287-304
- Hirata T, Nomura T, Takagi Y, Sato Y, Tomioka N, Fujisawa H, Osumi N. 2002. Mosaic development of the olfactory cortex with Pax6-dependent and -independent components. *Dev Brain Res* 136:17-26
- Hodge RD, D'Ercole AJ, O'Kusky JR. 2004. Insulin-like growth factor-I accelerates the cell cycle by decreasing G1 phase length and increases cell cycle reentry in the embryonic cerebral cortex. *J Neurosci* 24:10201-10
- Hoey T, Levine M. 1988. Divergent homeobox proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* 332:858-61
- Hof P R, Young W G, Bloom F E, Belichenko P V. 2000. Comparative cytoarchitectonic atlas of the c57bl/6 and 129/sv mouse brains. Elsevier Science
- Hogan BL, Horsburgh G, Cohen J, Hetherington CM, Fisher G, Lyon MF. 1986. Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 97:95-110
- Hogan BL, Hirst EM, Horsburgh G, Hetherington CM. 1988. Small eye (Sey): a mouse model for the genetic analysis of craniofacial abnormalities. *Development* 103 Suppl:115-9
- Holst BD, Wang Y, Jones FS, Edelman GM. 1997. A binding site for Pax proteins regulates expression of the gene for the neural cell adhesion molecule in the embryonic spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1465-70
- Horner PJ, Thallmair M, Gage FH. 2002. Defining the NG2-expressing cell of the adult CNS. *J Neurocytol* 31:469-80
- Horner PJ, Palmer TD. 2003. New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte'. La vida loca! *Trends Neurosci* 26:597-603
- Hsieh YW, Yang XJ. 2009. Dynamic Pax6 expression during the neurogenic cell cycle influences proliferation and cell fate choices of retinal progenitors. *Neural Dev* 4:32
- Hu JG, Fu SL, Wang YX, Li Y, Jiang XY, Wang XF, Qiu MS, Lu PH, Xu XM. 2008. Platelet-derived growth factor-AA mediates oligodendrocyte lineage differentiation through activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Neuroscience* 151:138-47
- Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. 1994. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372:746-54
- Hubbard SR. 1997. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J* 16:5572-81
- Hubbard SR, Miller WT. 2007. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19:117-23
- Hunter MG, Avalos BR. 1998. Phosphatidylinositol 3'-kinase and SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) are recruited by distinct positive and negative growth-regulatory domains in the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J Immunol* 160:4979-87
- Hurtado-Chong A, Yusta-Boyo MJ, Vergaño-Vera E, Bulfone A, de Pablo F, Vicario-Abejón C. 2009. IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *Eur J Neurosci* 30:742-55
- I**mamura K, Mataga N, Mori K. 1992. Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. I. Aliphatic compounds. *J Neurophysiol* 68:1986-2002
- Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R. 2010. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci* 30:3489-98
- Inoue M, Kamachi Y, Matsunami H, Imada K, Uchikawa M, Kondoh H. 2007. PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in embryonic visual system development. *Genes Cells* 12:1049-61
- Isaacson JS, Strowbridge BW. 1998. Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron* 20:749-61

Ishii Y, Matsumoto Y, Watanabe R, Elmi M, Fujimori T, Nissen J, Cao Y, Nabeshima Y, Sasahara M, Funahara K. 2008. Characterization of neuroprogenitor cells expressing the PDGF beta-receptor within the subventricular zone of postnatal mice. *Mol Cell Neurosci* 37:507-18

**J**ackson EL, García-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, Vandenberg S, Álvarez-Buylla A. 2006. PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 51:187-99

Jackson EL, Álvarez-Buylla A. 2008. Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors. *Cells Tissues. Organs* 188:212-24

Jankovski A, Sotelo C. 1996. Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J Comp Neurol* 371:376-96

Jiang F, Frederick TJ, Wood TL. 2001. IGF-I synergizes with FGF-2 to stimulate oligodendrocyte progenitor entry into the cell cycle. *Dev Biol* 232:414-23

Jiang J, McMurtry J, Niedzwiecki D, Goldman SA. 1998. Insulin-like growth factor-1 is a radial cell-associated neurotrophin that promotes neuronal recruitment from the adult songbird edpendyma/subependyma. *J Neurobiol* 36:1-15

Jiménez D, García C, de Castro F, Chédotal A, Sotelo C, De Carlos JA, Valverde F, López-Mascaraque L. 2000. Evidence for intrinsic development of olfactory structures in *Pax-6* mutant mice. *J Comp Neurol* 428:511-26

Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11946-50

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34

Jostes B, Walther C, Gruss P. 1990. The murine paired box gene, *Pax7*, is expressed

specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev* 33:27-37

Jun S, Desplan C. 1996. Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* 122:2639-50

**K**ageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. 2008. Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ* 50 Suppl 1:S97-103

Kamachi Y, Uchikawa M, Tanouchi A, Sekido R, Kondoh H. 2001. Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* 15:1272-86

Kaplan DR, Miller FD. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381-91

Kaplan MS, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-4

Kelsch W, Mosley CP, Lin CW, Lois C. 2007. Distinct mammalian precursors are committed to generate neurons with defined dendritic projection patterns. *PLoS Biol* 5:e300

Kempermann G. Adult Neurogenesis. Stem cells and neuronal development in the adult brain. 2006. Oxford University Press.

Kent J, Lee M, Schedl A, Boyle S, Fantes J, Powell M, Rushmere N, Abbott C, van H, V, Bickmore WA. 1997. The reticulocalbin gene maps to the WAGR region in human and to the Small eye Harwell deletion in mouse. *Genomics* 42:260-7

Kerever A, Schnack J, Vellinga D, Ichikawa N, Moon C, Arikawa-Hirasawa E, Efrid JT, Mercier F. 2007. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells* 25:2146-57

Kim EA, Noh YT, Ryu MJ, Kim HT, Lee SE, Kim CH, Lee C, Kim YH, Choi CY. 2006. Phosphorylation and transactivation of Pax6 by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J Biol Chem* 281:7489-97

- Kim JW, Lemke G. 2006. Hedgehog-regulated localization of Vax2 controls eye development. *Genes Dev* 20:2833-47
- Kioussi C, Gruss P. 1994. Differential induction of Pax genes by NGF and BDNF in cerebellar primary cultures. *J Cell Biol* 125:417-25
- Kioussi C, O'Connell S, St Onge L, Treier M, Gleiberman AS, Gruss P, Rosenfeld MG. 1999. Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14378-82
- Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, Ohgi KA, Lin C, Gleiberman A, Wang J, Brault V, Ruiz-Lozano P, Nguyen HD, Kemler R, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rosenfeld MG. 2002. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* 111:673-85
- Kirschenbaum B, Goldman SA. 1995. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:210-4
- Kobayashi M, Aita N, Hayashi S, Okada K, Ohta T, Hirose S. 1998. DNA supercoiling factor localizes to puffs on polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 18:6737-44
- Kohler N, Lipton A. 1974. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res* 87:297-301
- Kohtz JD, Baker DP, Corte G, Fishell G. 1998. Regionalization within the mammalian telencephalon is mediated by changes in responsiveness to Sonic Hedgehog. *Development* 125:5079-89
- Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Álvarez-Buylla A. 2005. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:6997-7003
- Kohwi M, Petryniak MA, Long JE, Ekker M, Obata K, Yanagawa Y, Rubenstein JL, Álvarez-Buylla A. 2007. A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci* 27:6878-91
- Koketsu D, Mikami A, Miyamoto Y, Hisatsune T. 2003. Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys. *J Neurosci* 23:937-42
- Kondo T, Raff M. 2000. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289:1754-7
- Kondoh H, Uchikawa M, Kamachi Y. 2004. Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *Int J Dev Biol* 48:819-27
- Kornack DR, Rakic P. 2001. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 294:2127-30
- Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T. 1994. Calcium-binding protein parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat olfactory bulb. 1. Distribution and structural features in adult rat. *Exp Brain Res* 99:191-204
- Kosaka K, Aika Y, Toida K, Heizmann CW, Hunziker W, Jacobowitz DM, Nagatsu I, Streit P, Visser TJ, Kosaka T. 1995. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neurosci Res* 23:73-88
- Kosaka K, Toida K, Margolis FL, Kosaka T. 1997. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience* 76:775-86
- Kosaka K, Kosaka T. 2007. Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 1167:42-55
- Kosodo Y, Roper K, Haubensak W, Marzesco AM, Corbeil D, Huttner WB. 2004. Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J* 23:2314-24
- Kotton DN, Summer R, Fine A. 2004. Lung stem cells: new paradigms. *Exp Hematol* 32:340-3

- Kovacs JJ, Whalen EJ, Liu R, Xiao K, Kim J, Chen M, Wang J, Chen W, Lefkowitz RJ. 2008. Beta-arrestin-mediated localization of smoothened to the primary cilium. *Science* 320:1777-81
- Kozmik Z, Czerny T, Busslinger M. 1997. Alternatively spliced insertions in the paired domain restrict the DNA sequence specificity of Pax6 and Pax8. *EMBO J* 16:6793-803
- Kratskin I L, Belluzzi O. Anatomy and neurochemistry of the olfactory bulb. Marcel Dekker. 139-164. 2003. Nueva York, Doty RL ed. Handbook of olfaction and gestation.
- Kriegstein A, Álvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149-84
- Kriegstein AR, Götz M. 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43:37-43
- Kroll TT, O'Leary DD. 2005. Ventralized dorsal telencephalic progenitors in Pax6 mutant mice generate GABA interneurons of a lateral ganglionic eminence fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7374-9
- Kuczewski N, Porcher C, Lessmann V, Medina I, Gaiarsa JL. 2009. Activity-dependent dendritic release of BDNF and biological consequences. *Mol Neurobiol* 39:37-49
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. 1997. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820-9
- Kuriyan J, Cowburn D. 1997. Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26:259-88
- Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Nait-Oumesmar B, Baron-Van Evercooren A. 2002. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and platelet-derived growth factor AB (PDGF AB) promote adult SVZ-derived oligodendrogenesis in vivo. *Mol Cell Neurosci* 20:390-403
- Lang RA. 2004. Pathways regulating lens induction in the mouse. *Int J Dev Biol* 48:783-91
- Lee HS, Tomarev SI. 2007. Optimeidin induces expression of N-cadherin and stimulates aggregation of NGF-stimulated PC12 cells. *Exp Cell Res* 313:98-108
- Lee JC, Mayer-Proschel M, Rao MS. 2000. Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30:105-21
- Lee SB, Haber DA. 2001. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res* 264:74-99
- Lei Q, Jeong Y, Misra K, Li S, Zelman AK, Epstein DJ, Matisse MP. 2006. Wnt signaling inhibitors regulate the transcriptional response to morphogenetic Shh-Gli signaling in the neural tube. *Dev Cell* 11:325-37
- Lengler J, Bittner T, Munster D, Gawad A, Graw J. 2005. Agonistic and antagonistic action of AP2, Msx2, Pax6, Prox1 AND Six3 in the regulation of Sox2 expression. *Ophthalmic Res* 37:301-9
- Leon M, Johnson BA. 2003. Olfactory coding in the mammalian olfactory bulb. *Brain Res Rev* 42:23-32
- Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA. 1999. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci* 13:450-64
- Levi-Montalcini R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-62
- Li T, Lu L. 2005. Epidermal growth factor-induced proliferation requires down-regulation of Pax6 in corneal epithelial cells. *J Biol Chem* 280:12988-95
- Li X, Zhao X. 2008. Epigenetic regulation of mammalian stem cells. *Stem Cells Dev* 17:1043-52
- Licht T, Eavri R, Goshen I, Shlomain Y, Mizrahi A, Keshet E. 2010. VEGF is required for dendritogenesis of newly born olfactory bulb interneurons. *Development* 137:261-71
- Lichtneckert R, Reichert H. 2008. Anteroposterior regionalization of the brain: genetic and comparative aspects. *Adv Exp Med Biol* 628:32-41
- Lie DC, Dziewczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH. 2002. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22:6639-49

- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH. 2005. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437:1370-5
- Liem KF, Jr., Tremml G, Roelink H, Jessell TM. 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82:969-79
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713-26
- Linster C, Gervais R. 1996. Investigation of the role of interneurons and their modulation by centrifugal fibers in a neural model of the olfactory bulb. *J Comput Neurosci* 3:225-46
- Linster C, Hasselmo M. 1997. Modulation of inhibition in a model of olfactory bulb reduces overlap in the neural representation of olfactory stimuli. *Behav Brain Res* 84:117-27
- Liu CJ, Grandes P, Matute C, Cuenod M, Streit P. 1989. Glutamate-like immunoreactivity revealed in rat olfactory bulb, hippocampus and cerebellum by monoclonal antibody and sensitive staining method. *Histochemistry* 90:427-45
- Liu DX, Greene LA. 2001. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res* 305:217-28
- Liu Z, Brattain MG, Appert H. 1997. Differential display of reticulocalbin in the highly invasive cell line, MDA-MB-435, versus the poorly invasive cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun* 231:283-9
- Liu Z, Martin LJ. 2003. Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *J Comp Neurol* 459:368-91
- Lledó PM, Saghatelian A, Lemasson M. 2004. Inhibitory interneurons in the olfactory bulb: from development to function. *Neuroscientist* 10:292-303
- Lledó PM, Saghatelian A. 2005. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci* 28:248-54
- Lledó PM, Lazarini F. 2007. Neuronal replacement in microcircuits of the adult olfactory system. *C R Biol* 330:510-20
- Lledó PM, Merkle FT, Álvarez-Buylla A. 2008. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 31:392-400
- Lobjois V, Benazeraf B, Bertrand N, Medevielle F, Pituello F. 2004. Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and Shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development. *Dev Biol* 273:195-209
- Lois C, Álvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-8
- Lois C, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-81
- Lokker NA, O'Hare JP, Barsoumian A, Tomlinson JE, Ramakrishnan V, Fretto LJ, Giese NA. 1997. Functional importance of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor extracellular immunoglobulin-like domains. Identification of PDGF binding site and neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 272:33037-44
- Long JE, Cobos I, Potter GB, Rubenstein JL. 2009. Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control MGE and CGE patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *Cereb Cortex* 19 96-106
- López-Mascaraque L, García C, Valverde F, De Carlos JA. 1998. Central olfactory structures in *Pax-6* mutant mice. *Ann N Y Acad Sci* 855:83-94
- López-Mascaraque L, de Castro F. 2002. The olfactory bulb as an independent developmental domain. *Cell Death Differ* 9:1279-86
- López-Mascaraque L, García C, Blanchart A, De Carlos J A. 2005. Olfactory epithelium influences the orientation of mitral cell dendrites during development. *Dev Dyn* 232:325-35

- Louis JM, McFarland VW, May P, Mora PT. 1988. The phosphoprotein p53 is down-regulated post-transcriptionally during embryogenesis in vertebrates. *Biochim Biophys Acta* 950:395-402
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. 1993. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74:957-67
- Lu R, Markowitz F, Unwin RD, Leek JT, Airoidi EM, MacArthur BD, Lachmann A, Rozov R, Ma'ayan A, Boyer LA, Troyanskaya OG, Whetton AD, Lemischka IR. 2009. Systems-level dynamic analyses of fate change in murine embryonic stem cells. *Nature* 462:358-62
- Lukaszewicz A, Savatier P, Cortay V, Kennedy H, Dehay C. 2002. Contrasting effects of basic fibroblast growth factor and neurotrophin 3 on cell cycle kinetics of mouse cortical stem cells. *J Neurosci* 22:6610-22
- Lukaszewicz A, Savatier P, Cortay V, Giroud P, Huissoud C, Berland M, Kennedy H, Dehay C. 2005. G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex. *Neuron* 47:353-64
- M**acdonald R, Xu Q, Barth KA, Mikkola I, Holder N, Fjose A, Krauss S, Wilson SW. 1994. Regulatory gene expression boundaries demarcate sites of neuronal differentiation in the embryonic zebrafish forebrain. *Neuron* 13:1039-53
- Macdonald R, Barth KA, Xu Q, Holder N, Mikkola I, Wilson SW. 1995. Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* 121:3267-78
- Macdonald R, Wilson SW. 1996. Pax proteins and eye development. *Curr Opin Neurobiol* 6:49-56
- Macleod KF, Hu Y, Jacks T. 1996. Loss of Rb activates both p53-dependent and independent cell death pathways in the developing mouse nervous system. *EMBO J* 15:6178-88
- Madhani HD, Fink GR. 1998. The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Genet* 14:151-5
- Maekawa M, Takashima N, Arai Y, Nomura T, Inokuchi K, Yuasa S, Osumi N. 2005. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes Cells* 10:1001-14
- Mallamaci A, Muzio L, Chan CH, Parnavelas J, Boncinelli E. 2000. Area identity shifts in the early cerebral cortex of Emx2<sup>-/-</sup> mutant mice. *Nat Neurosci* 3:679-86
- Manuel M, Price DJ. 2005. Role of Pax6 in forebrain regionalization. *Brain Res Bull* 66:387-93
- Manuel M, Georgala PA, Carr CB, Chanas S, Kleinjan DA, Martynoga B, Mason JO, Molinek M, Pinson J, Pratt T, Quinn JC, Simpson TI, Tyas DA, van H, V, West JD, Price DJ. 2007. Controlled overexpression of Pax6 in vivo negatively autoregulates the Pax6 locus, causing cell-autonomous defects of late cortical progenitor proliferation with little effect on cortical arealization. *Development* 134:545-55
- Margolis B, Borg JP, Straight S, Meyer D. 1999. The function of PTB domain proteins. *Kidney Int* 56:1230-7
- Margrie TW, Sakmann B, Urban NN. 2001. Action potential propagation in mitral cell lateral dendrites is decremental and controls recurrent and lateral inhibition in the mammalian olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:319-24
- Marín O, Anderson SA, Rubenstein JL. 2000. Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20:6063-76
- Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F, Gruss P. 2001. Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105:43-55
- Mathieu C, Sii-Felice K, Fouchet P, Etienne O, Haton C, Mabondzo A, Boussin FD, Mouthon MA. 2008. Endothelial cell-derived bone morphogenetic proteins control proliferation of neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 38:569-77
- Matsunaga E, Araki I, Nakamura H. 2000. Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development* 127:2357-65
- Matsuo T, Osumi-Yamashita N, Noji S, Ohuchi H, Koyama E, Myokai F, Matsuo N, Taniguchi

- S, Doi H, Iseki S, . 1993. A mutation in the *Pax-6* gene in rat *small eye* is associated with impaired migration of midbrain crest cells. *Na. Gene.* 3:299-304
- Mayer M, Bhakoo K, Noble M. 1994. Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro. *Development* 120:143-53
- McAdams HH, Arkin A. 1997. Stochastic mechanisms in gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:814-9
- McGann JP, Pirez N, Gainey MA, Muratore C, Elias AS, Wachowiak M. 2005. Odorant representations are modulated by intra- but not interglomerular presynaptic inhibition of olfactory sensory neurons. *Neuron* 48:1039-53
- McKay R. 1997. Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66-71
- McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA. 1990. FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* 5:603-14
- McKinnon RD, Smith C, Behar T, Smith T, Dubois-Dalcq M. 1993. Distinct effects of bFGF and PDGF on oligodendrocyte progenitor cells. *Glia* 7:245-54
- McKinnon RD, Waldron S, Kiel ME. 2005. PDGF alpha-receptor signal strength controls an RTK rheostat that integrates phosphoinositol 3'-kinase and phospholipase Cgamma pathways during oligodendrocyte maturation. *J Neurosci* 25:3499-508
- McMorris FA, Smith TM, DeSalvo S, Furlanetto RW. 1986. Insulin-like growth factor I/somatomedin C: a potent inducer of oligodendrocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:822-6
- Medrano S, Scrabble H. 2005. Maintaining appearances--the role of p53 in adult neurogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 331:828-33
- Meech R, Kallunki P, Edelman GM, Jones FS. 1999. A binding site for homeodomain and Pax proteins is necessary for L1 cell adhesion molecule gene expression by Pax-6 and bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2420-5
- Mehler MF, Marmur R, Gross R, Mabie PC, Zang Z, Papavasiliou A, Kessler JA. 1995. Cytokines regulate the cellular phenotype of developing neural lineage species. *Int J Dev Neurosci* 13:213-40
- Menezes JR, Smith CM, Nelson KC, Luskin MB. 1995. The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Mol Cell Neurosci* 6:496-508
- Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol* 451:170-88
- Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2004. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17528-32
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Álvarez-Buylla A. 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317:381-4
- Mikkola I, Bruun JA, Bjorkoy G, Holm T, Johansen T. 1999. Phosphorylation of the transactivation domain of Pax6 by extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 274:15115-26
- Mikkola I, Bruun JA, Holm T, Johansen T. 2001. Superactivation of Pax6-mediated transactivation from paired domain-binding sites by dna-independent recruitment of different homeodomain proteins. *J Biol Chem* 276:4109-18
- Miller FD, Kaplan DR. 2001. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 58:1045-53
- Ming GL, Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev Neurosci* 28:223-50
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-78
- Mohammadi M, Dikic I, Sorokin A, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J. 1996. Identification of six novel

- autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol Cell Biol* 16:977-89
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R. 1996. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-86
- Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M. 1999. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13:1181-9
- Monuki ES, Porter FD, Walsh CA. 2001. Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway. *Neuron* 32:591-604
- Morgan R. 2004. Conservation of sequence and function in the Pax6 regulatory elements. *Trends Genet* 20:283-7
- Mori K, Kishi K. 1982. The morphology and physiology of the granule cells in the rabbit olfactory bulb revealed by intracellular recording and HRP injection. *Brain Res* 247:129-33
- Mori K, Yoshihara Y. 1995. Molecular recognition and olfactory processing in the mammalian olfactory system. *Prog Neurobiol* 45:585-619
- Mori K, Nagao H, Yoshihara Y. 1999. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286:711-5
- Moyse E, Segura S, Liard O, Mahaut S, Mechawar N. 2008. Microenvironmental determinants of adult neural stem cell proliferation and lineage commitment in the healthy and injured central nervous system. *Curr Stem Cell Res Ther* 3:163-84
- Mudo G, Bonomo A, Di L, V, Frinchi M, Fuxe K, Belluardo N. 2009. The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain. *J Neural Transm* 116:995-1005
- Mui SH, Kim JW, Lemke G, Bertuzzi S. 2005. Vax genes ventralize the embryonic eye. *Genes Dev* 19:1249-59
- Muroyama Y, Kondoh H, Takada S. 2004. Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochem Biophys Res Commun* 313:915-21
- Muzio L, DiBenedetto B, Stoykova A, Boncinelli E, Gruss P, Mallamaci A. 2002. Emx2 and Pax6 control regionalization of the pre-neuronogenic cortical primordium. *Cereb Cortex* 12:129-39
- Muzio L, Mallamaci A. 2003. Emx1, emx2 and pax6 in specification, regionalization and arealization of the cerebral cortex. *Cereb Cortex* 13:641-7
- N**ácher J, Varea E, Blasco-Ibáñez JM, Castillo-Gómez E, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ, McEwen BS. 2005. Expression of the transcription factor Pax6 in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci Res* 81:753-61
- Nery S, Wichterle H, Fishell G. 2001. Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* 128:527-40
- Nickell WT, Behbehani MM, Shipley MT. 1994. Evidence for GABAB-mediated inhibition of transmission from the olfactory nerve to mitral cells in the rat olfactory bulb. *Brain Res Bull* 35:119-23
- Nijhout HF, Maini PK, Madzvamuse A, Wathen AJ, Sekimura T. 2003. Pigmentation pattern formation in butterflies: experiments and models. *C R Biol* 326:717-27
- Nikoletopoulou V, Plachta N, Allen ND, Pinto L, Götz M, Barde YA. 2007. Neurotrophin receptor-mediated death of misspecified neurons generated from embryonic stem cells lacking Pax6. *Cell Stem Cell* 1:529-40
- Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. 1996. Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *J Neurosci Res* 43:315-30
- Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. 2009. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 10:9-22
- Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD, Riddle P. 1988. Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 333:560-2

- Nobukuni Y, Watanabe A, Takeda K, Skarka H, Tachibana M. 1996. Analyses of loss-of-function mutations of the MITF gene suggest that haploinsufficiency is a cause of Waardenburg syndrome type 2A. *Am J Hum Genet* 59:76-83
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-20
- Noctor SC, Martínez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7:136-44
- Noctor SC, Martínez-Cerdeno V, Kriegstein AR. 2008. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol* 508:28-44
- Nolte C, Rastegar M, Amores A, Bouchard M, Grote D, Maas R, Kovacs EN, Postlethwait J, Rambaldi I, Rowan S, Yan YL, Zhang F, Featherstone M. 2006. Stereospecificity and PAX6 function direct Hoxd4 neural enhancer activity along the antero-posterior axis. *Dev Biol* 299:582-93
- Nomura T, Osumi N. 2004. Misrouting of mitral cell progenitors in the Pax6/small eye rat telencephalon. *Development* 131:787-96
- Nomura T, Holmberg J, Frisen J, Osumi N. 2006. Pax6-dependent boundary defines alignment of migrating olfactory cortex neurons via the repulsive activity of ephrin A5. *Development* 133:1335-45
- Nornes HO, Dressler GR, Knapik EW, Deutsch U, Gruss P. 1990. Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development* 109:797-809
- Novitsch BG, Wichterle H, Jessell TM, Sockanathan S. 2003. A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron* 40:81-95
- Obenaus JC, Cantley LC, Yaffe MB. 2003. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 31:3635-41
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12313-8
- Oliver TG, Grasfeder LL, Carroll AL, Kaiser C, Gillingham CL, Lin SM, Wickramasinghe R, Scott MP, Wechsler-Reya RJ. 2003. Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7331-6
- Omlin FX, Waldmeyer J. 1989. Differentiation of neuron-like cells in cultured rat optic nerves: a neuron or common neuron-glia progenitor? *Dev Biol* 133:247-53
- Ono K, Fujisawa H, Hirano S, Norita M, Tsumori T, Yasui Y. 1997. Early development of the oligodendrocyte in the embryonic chick metencephalon. *J Neurosci Res* 48:212-25
- Onuma Y, Takahashi S, Asashima M, Kurata S, Gehring WJ. 2002. Conservation of Pax 6 function and upstream activation by Notch signaling in eye development of frogs and flies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2020-5
- Orentas DM, Hayes JE, Dyer KL, Miller RH. 1999. Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* 126:2419-29
- Osumi N, Hirota A, Ohuchi H, Nakafuku M, Iimura T, Kuratani S, Fujiwara M, Noji S, Eto K. 1997. Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development* 124:2961-72
- Osumi N. 2001. The role of Pax6 in brain patterning. *Tohoku J Exp Med* 193:163-74
- Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M. 2008. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* 26:1663-72
- Otaegi G, Yusta-Boyo MJ, Vergaño-Vera E, Méndez-Gómez HR, Carrera AC, Abad JL, González M, de la Rosa EJ, Vicario-Abejón C, de Pablo F. 2006. Modulation of the PI 3-

kinase-Akt signalling pathway by IGF-I and PTEN regulates the differentiation of neural stem/precursor cells. *J Cell Sci* 119:2739-48

Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 1984. Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol* 229:374-92

Ouyang J, Shen YC, Yeh LK, Li W, Coyle BM, Liu CY, Fini ME. 2006. Pax6 overexpression suppresses cell proliferation and retards the cell cycle in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:2397-407

Overbeck AF, Brtva TR, Cox AD, Graham SM, Huff SY, Khosravi-Far R, Quilliam LA, Solski PA, Der CJ. 1995. Guanine nucleotide exchange factors: activators of Ras superfamily proteins. *Mol Reprod Dev* 42:468-76

Ozawa M, Muramatsu T. 1993. Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca(2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl-terminal HDEL sequence. *J Biol Chem* 268:699-705

**P**agano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. 1995. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269:682-5

Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. 1999. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19:8487-97

Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-94

Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F. 2004. Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J* 23:4495-505

Parras CM, Hunt C, Sugimori M, Nakafuku M, Rowitch D, Guillemot F. 2007. The proneural gene Mash1 specifies an early population of telencephalic oligodendrocytes. *J Neurosci* 27:4233-42

Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F. 2009. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6387-92

Pawson T. 1994. SH2 and SH3 domains in signal transduction. *Adv Cancer Res* 64:87-110

Pawson T, Scott JD. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278:2075-80

Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. 2001. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21:6706-17

Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L. 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull* 42:9-21

Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L. 1999. The subependymal layer in rodents: a site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain. *Brain Res Bull* 49:221-43

Peretto P, Dati C, De Marchis S, Kim HH, Ukhanova M, Fasolo A, Margolis FL. 2004. Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. *Neuroscience* 128:685-96

Peterson DA. 2002. Stem cells in brain plasticity and repair. *Curr Opin Pharmacol* 2:34-42

Petreanu L, Álvarez-Buylla A. 2002. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106-13

Philips GT, Stair CN, Young LH, Wroblewski E, Berberoglu MA, Brown NL, Mastick GS. 2005. Precocious retinal neurons: Pax6 controls timing of differentiation and determination of cell type. *Dev Biol* 279:308-21

Pilaz LJ, Patti D, Marcy G, Ollier E, Pfister S, Douglas RJ, Betizeau M, Gautier E, Cortay V, Doerflinger N, Kennedy H, Dehay C. 2009. Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar

- phenotype in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21924-9
- Pinching AJ. 1970. Synaptic connexions in the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Physiol* 210:14-5
- Pinching AJ, Powell TP. 1971. The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:305-45
- Pinching AJ, Powell TP. 1971. The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:347-77
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Prehu MO, Puliti A, Herbarth B, Hermans-Borgmeyer I, Legius E, Matthijs G, Amiel J, Lyonnet S, Ceccherini I, Romeo G, Smith JC, Read AP, Wegner M, Goossens M. 1998. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 18:171-3
- Piñón MC, Tuoc TC, Ashery-Padan R, Molnar Z, Stoykova A. 2008. Altered molecular regionalization and normal thalamocortical connections in cortex-specific Pax6 knock-out mice. *J Neurosci* 28:8724-34
- Pinto GR, Clara CA, Santos MJ, Almeida JR, Burbano RR, Rey JA, Casartelli C. 2007. Mutation analysis of gene PAX6 in human gliomas. *Genet Mol Res* 6:1019-25
- Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P. 1990. Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* 110:643-51
- Planque N, Leconte L, Coquelle FM, Martin P, Saule S. 2001. Specific Pax-6/microphthalmia transcription factor interactions involve their DNA-binding domains and inhibit transcriptional properties of both proteins. *J Biol Chem* 276:29330-7
- Plaza S, Dozier C, Saule S. 1993. Quail Pax-6 (*Pax-QNR*) encodes a transcription factor able to bind and trans-activate its own promoter. *Cell Growth Differ.* 4:1041-50
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. 1994. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8:9-22
- Price JL, Powell TP. 1970. The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7:125-55
- Price JL, Sprich WW. 1975. Observations on the lateral olfactory tract of the rat. *J Comp Neurol* 162:321-36
- Pringle N, Collarini EJ, Mosley MJ, Heldin CH, Westermark B, Richardson WD. 1989. PDGF A chain homodimers drive proliferation of bipotential (O-2A) glial progenitor cells in the developing rat optic nerve. *EMBO J* 8:1049-56
- Pringle NP, Mudhar HS, Collarini EJ, Richardson WD. 1992. PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Development* 115:535-51
- Pringle NP, Richardson WD. 1993. A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* 117:525-33
- Pringle NP, Yu WP, Guthrie S, Roelink H, Lumsden A, Peterson AC, Richardson WD. 1996. Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev Biol* 177:30-42
- Puelles L, Rubenstein JL. 1993. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16:472-9
- Puopolo M, Belluzzi O. 1998. Functional heterogeneity of periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 10:1073-83
- Puopolo M, Belluzzi O. 1998. Inhibitory synapses among interneurons in the glomerular layer of rat and frog olfactory bulbs. *J Neurophysiol* 80:344-9
- Quinn JC, Molinek M, Martynoga BS, Zaki PA, Faedo A, Bulfone A, Hevner RF, West JD, Price DJ. 2007. Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism. *Dev Biol* 302:50-65

- Raff MC, Miller RH, Noble M. 1983. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303:390-6
- Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD. 1988. Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* 333:562-5
- Rakic P. 2002. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci* 3:65-71
- Rall W, Shepherd GM, Reese TS, Brightman MW. 1966. Dendrodendritic synaptic pathway for inhibition in the olfactory bulb. *Exp Neurol* 14:44-56
- Rall W, Shepherd GM. 1968. Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb. *J Neurophysiol* 31:884-915
- Ramaesh T, Collinson JM, Ramaesh K, Kaufman MH, West JD, Dhillon B. 2003. Corneal abnormalities in Pax6<sup>+/-</sup> small eye mice mimic human aniridia-related keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1871-8
- Ramaesh T, Ramaesh K, Martin CJ, Chanas SA, Dhillon B, West JD. 2005. Developmental and cellular factors underlying corneal epithelial dysgenesis in the Pax6<sup>+/-</sup> mouse model of aniridia. *Exp Eye Res* 81:224-35
- Ramón y Cajal S. Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertèbres. 1911. Paris, Maloine A. Ed.
- Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH. 1993. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364:717-21
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. 1994. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79:1245-55
- Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J. 1995. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 9:1831-45
- Reynisdottir I, Massagué J. 1997. The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev* 11:492-503
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12:4565-74
- Reynolds BA, Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-10
- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. 1992. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8591-5
- Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermark B, Dubois-Dalcq M. 1988. A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* 53:309-19
- Richardson WD, Pringle NP, Yu WP, Hall AC. 1997. Origins of spinal cord oligodendrocytes: possible developmental and evolutionary relationships with motor neurons. *Dev Neurosci* 19:58-68
- Rinaldo C, Prodosmo A, Siepi F, Soddu S. 2007. HIPK2: a multitasking partner for transcription factors in DNA damage response and development. *Biochem Cell Biol* 85:411-8
- Riquelme PA, Drapeau E, Doetsch F. 2008. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:123-37
- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessar N, Richardson WD. 2008. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 11:1392-401
- Rodríguez-Viciano P, Marte BM, Warne PH, Downward J. 1996. Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351:225-31
- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. 1974. A platelet-dependent serum factor that

- stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:1207-10
- Rousselot P, Lois C, Álvarez-Buylla A. 1995. Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol* 351:51-61
- S**akai M, Serria MS, Ikeda H, Yoshida K, Imaki J, Nishi S. 2001. Regulation of c-maf gene expression by Pax6 in cultured cells. *Nucleic Acids Res* 29:1228-37
- Sakurai K, Osumi N. 2008. The neurogenesis-controlling factor, Pax6, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes. *J Neurosci* 28:4604-12
- Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. 1997. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 11:1662-73
- Saneto RP, de Vellis J. 1985. Effect of mitogens in various organs and cell culture conditioned media on rat oligodendrocytes. *Dev Neurosci* 7:340-50
- Sansom SN, Griffiths DS, Faedo A, Kleinjan DJ, Ruan Y, Smith J, van H, V, Rubenstein JL, Livesey FJ. 2009. The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet* 5:e1000511
- Savatier P, Lapillonne H, van Grunsven LA, Rudkin BB, Samarut J. 1996. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* 12:309-22
- Sawamoto K, Wichterle H, González-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, García-Verdugo JM, Marín O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Álvarez-Buylla A. 2006. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-32
- Scardigli R, Baumer N, Gruss P, Guillemot F, Le R, I. 2003. Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by Pax6. *Development* 130:3269-81
- Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, Winkler J, Aigner L, Plate KH, Kuhn HG. 2004. Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 14:237-48
- Schedl A, Ross A, Lee M, Engelkamp D, Rashbass P, van H, V, Hastie ND. 1996. Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* 86:71-82
- Schlessinger J. 1994. SH2/SH3 signaling proteins. *Curr Opin Genet Dev* 4:25-30
- Schlessinger J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-25
- Schmahl W, Knoedlseder M, Favor J, Davidson D. 1993. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations are associated with Small eye (Sey) in the mouse, a point mutation at the Pax-6-locus. *Acta Neuropathol* 86:126-35
- Schmid P, Lorenz A, Hameister H, Montenarh M. 1991. Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development* 113:857-65
- Schneider SP, Macrides F. 1978. Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. *Brain Res Bull* 3:73-82
- Schuermans C, Guillemot F. 2002. Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* 12:26-34
- Schwarz M, Cecconi F, Bernier G, Andrejewski N, Kammandel B, Wagner M, Gruss P. 2000. Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development* 127:4325-34
- Scott JW. 1986. The olfactory bulb and central pathways. *Experientia* 42:223-32
- Seidman JG, Seidman C. 2002. Transcription factor haploinsufficiency: when half a loaf is not enough. *J Clin Invest* 109:451-5
- Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Álvarez-Buylla A. 2001. Astrocytes give rise to

- new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-60
- Shaham O, Smith AN, Robinson ML, Taketo MM, Lang RA, Ashery-Padan R. 2009. Pax6 is essential for lens fiber cell differentiation. *Development* 136:2567-78
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S. 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304:1338-40
- Sheng G, Thouvenot E, Schmucker D, Wilson DS, Desplan C. 1997. Direct regulation of rhodopsin 1 by Pax-6/eyeless in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes Dev* 11:1122-31
- Shepherd GM. 1972. Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 52:864-917
- Shi Y, Sun G, Zhao C, Stewart R. 2008. Neural stem cell self-renewal. *Crit Rev Oncol Hematol* 65:43-53
- Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. 2000. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20:8727-35
- Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. 2001. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 21:9733-43
- Shiple MT, Ennis M. 1996. Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* 30:123-76
- Shiple MT, McLean JH, Zimmer LA, Ennis M. The olfactory system. Swanson LW, Björklund A, and Hökfelt T. 469-573. 1996. Amsterdam, Elsevier. Handbook of chemical neuroanatomy. Integrated systems of the CNS.
- Simpson TI, Price DJ. 2002. Pax6; a pleiotropic player in development. *Bioessays* 24:1041-51
- Singh S, Stellrecht CM, Tang HK, Saunders GF. 2000. Modulation of PAX6 homeodomain function by the paired domain. *J Biol Chem* 275:17306-13
- Smith CM, Luskin MB. 1998. Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream. *Dev Dyn* 213:220-7
- Snaryan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Götz M, Barker PA, Parent A, Saghatelian A. 2009. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 29:4172-88
- Song H, Stevens CF, Gage FH. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44
- Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, . 1993. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72:767-78
- Spassky N, Goujet-Zalc C, Parmantier E, Olivier C, Martínez S, Ivanova A, Ikenaka K, Macklin W, Cerruti I, Zalc B, Thomas JL. 1998. Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J Neurosci* 18:8331-43
- Spassky N, Heydon K, Mangatal A, Jankovski A, Olivier C, Queraud-Lesaux F, Goujet-Zalc C, Thomas JL, Zalc B. 2001. Sonic hedgehog-dependent emergence of oligodendrocytes in the telencephalon: evidence for a source of oligodendrocytes in the olfactory bulb that is independent of PDGFRalpha signaling. *Development* 128:4993-5004
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25:10-8
- Spence JR, Madhavan M, Aycinena JC, Rio-Tsonis K. 2007. Retina regeneration in the chick embryo is not induced by spontaneous *Mitf* downregulation but requires FGF/FGFR/MEK/Erk dependent upregulation of Pax6. *Mol Vis* 13:57-65
- Stallcup WB. 2002. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J Neurocytol* 31:423-35
- Stariha RL, Kikuchi S, Siow YL, Pelech SL, Kim M, Kim SU. 1997. Role of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in oligodendroglial process extension. *J Neurochem* 68:945-53

- Stastna M, Abraham MR, Van Eyk JE. 2009. Cardiac stem/progenitor cells, secreted proteins, and proteomics. *FEBS Lett* 583:1800-7
- Stenman J, Toresson H, Campbell K. 2003. Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *J Neurosci* 23:167-74
- Stoykova A, Gruss P. 1994. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 14:1395-412
- Stoykova A, Fritsch R, Walther C, Gruss P. 1996. Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice. *Development* 122:3453-65
- Stoykova A, Treichel D, Hallonet M, Gruss P. 2000. Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J Neurosci* 20:8042-50
- Stuart ET, Haffner R, Oren M, Gruss P. 1995. Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *EMBO J* 14:5638-45
- Stuhmer T, Anderson SA, Ekker M, Rubenstein JL. 2002. Ectopic expression of the Dlx genes induces glutamic acid decarboxylase and Dlx expression. *Development* 129:245-52
- Sugimori M, Nagao M, Bertrand N, Parras CM, Guillemot F, Nakafuku M. 2007. Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord. *Development* 134:1617-29
- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. 1996. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-7
- Sussel L, Marín O, Kimura S, Rubenstein JL. 1999. Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126:3359-70
- Suzuki Y, Takeda M, Obara N, Suzuki N, Takeichi N. 2000. Olfactory epithelium consisting of supporting cells and horizontal basal cells in the posterior nasal cavity of mice. *Cell Tissue Res* 299:313-25
- Takahashi H, Liu FC. 2006. Genetic patterning of the mammalian telencephalon by morphogenetic molecules and transcription factors. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78:256-66
- Tamai H, Shinohara H, Miyata T, Saito K, Nishizawa Y, Nomura T, Osumi N. 2007. Pax6 transcription factor is required for the interkinetic nuclear movement of neuroepithelial cells. *Genes Cells* 12:983-96
- Tedeschi A, Di Giovanni S. 2009. The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon. *EMBO Rep* 10:576-83
- Tedeschi A, Nguyen T, Puttagunta R, Gaub P, Di Giovanni S. 2009. A p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration. *Cell Death Differ* 16:543-54
- Tekki-Kessarlis N, Woodruff R, Hall AC, Gaffield W, Kimura S, Stiles CD, Rowitch DH, Richardson WD. 2001. Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* 128:2545-54
- Temple S. 2001. Stem cell plasticity--building the brain of our dreams. *Nat Rev Neurosci* 2:513-20
- Theiler K, Varnum DS, Stevens LC. 1978. Development of Dickie's small eye, a mutation in the house mouse. *Anat Embryol* 155:81-6
- Theiler K, Varnum DS, Stevens LC. 1980. Development of Dickie's small eye: an early lethal mutation in the house mouse. *Anat Embryol* 161:115-20
- Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T. 1994. Synaptic contacts between mitral/tufted cells and GABAergic neurons containing calcium-binding protein parvalbumin in the rat olfactory bulb, with special reference to reciprocal synapses between them. *Brain Res* 650:347-52
- Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T. 1998. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural

features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. *J Comp Neurol* 392:179-98

Toida K, Kosaka K, Aika Y, Kosaka T. 2000. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. *Neuroscience* 101:11-7

Tommerup N, Aagaard L, Lund CL, Boel E, Baxendale S, Bates GP, Lehrach H, Vissing H. 1993. A zinc-finger gene ZNF141 mapping at 4p16.3/D4S90 is a candidate gene for the Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome. *Hum Mol Genet* 2:1571-5

Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van H, V, Hastie ND, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, . 1991. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67:1059-74

Toresson H, Potter SS, Campbell K. 2000. Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for Pax6 and Gsh2. *Development* 127:4361-71

Toresson H, Campbell K. 2001. A role for Gsh1 in the developing striatum and olfactory bulb of Gsh2 mutant mice. *Development* 128:4769-80

Treisman J, Harris E, Desplan C. 1991. The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev* 5:594-604

Tuoc TC, Stoykova A. 2008. Trim11 modulates the function of neurogenic transcription factor Pax6 through ubiquitin-proteasome system. *Genes Dev* 22:1972-86

Tuoc TC, Radyushkin K, Tonchev AB, Piñón MC, Ashery-Padan R, Molnar Z, Davidoff MS, Stoykova A. 2009. Selective cortical layering abnormalities and behavioral deficits in cortex-specific Pax6 knock-out mice. *J Neurosci* 29:8335-49

**U**rbach R, Technau GM. 2008. Dorsoventral patterning of the brain: a comparative approach. *Adv. Exp Med Biol* 628:42-56

**V**allieres L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE. 2002. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci* 22:486-92

van der Koy D, Weiss S. 2000. Why stem cells? *Science* 287:1439-41

van Heyningen P, Calver AR, Richardson WD. 2001. Control of progenitor cell number by mitogen supply and demand. *Curr Biol* 11:232-41

Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB, Axel R. 1994. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79:981-91

Vemuri GS, McMorris FA. 1996. Oligodendrocytes and their precursors require phosphatidylinositol 3-kinase signaling for survival. *Development* 122:2529-37

Ventura RE, Goldman JE. 2007. Dorsal radial glia generate olfactory bulb interneurons in the postnatal murine brain. *J Neurosci* 27:4297-302

Vergaño-Vera E, Yusta-Boyo MJ, de Castro F, Bernad A, de Pablo F, Vicario-Abejón C. 2006. Generation of GABAergic and dopaminergic interneurons from endogenous embryonic olfactory bulb precursor cells. *Development* 133:4367-79

Vergaño-Vera E, Méndez-Gómez HR, Hurtado-Chong A, Cigudosa JC, Vicario-Abejón C. 2009. Fibroblast growth factor-2 increases the expression of neurogenic genes and promotes the migration and differentiation of neurons derived from transplanted neural stem/progenitor cells. *Neuroscience* 162:39-54

Verstappen J, Katsaros C, Torensma R, Von den Hoff JW. 2009. A functional model for adult stem cells in epithelial tissues. *Wound Repair Regen* 17:296-305

Vicario-Abejón C, Yusta-Boyo MJ, Fernández-Moreno C, de Pablo F. 2003. Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci* 23:895-906

- Vogan KJ, Underhill DA, Gros P. 1996. An alternative splicing event in the Pax-3 paired domain identifies the linker region as a key determinant of paired domain DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* 16:6677-86
- Voigt T. 1989. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol* 289:74-88
- von Holst A, Egbers U, Prochiantz A, Faissner A. 2007. Neural stem/progenitor cells express 20 tenascin C isoforms that are differentially regulated by Pax6. *J Biol Chem* 282:9172-81
- Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik KH. 1991. GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352:539-40
- Vorum H, Hager H, Christensen BM, Nielsen S, Honore B. 1999. Human calumenin localizes to the secretory pathway and is secreted to the medium. *Exp Cell Res* 248:473-81
- W**aclaw RR, Allen ZJ, Bell SM, Erdelyi F, Szabo G, Potter SS, Campbell K. 2006. The zinc finger transcription factor Sp8 regulates the generation and diversity of olfactory bulb interneurons. *Neuron* 49:503-16
- Wagner KD, Wagner N, Vidal VP, Schley G, Wilhelm D, Schedl A, Englert C, Scholz H. 2002. The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. *EMBO J* 21:1398-405
- Wagner KD, Wagner N, Schedl A. 2003. The complex life of WT1. *J Cell Sci* 116:1653-8
- Wagner N, Wagner KD, Hammes A, Kirschner KM, Vidal VP, Schedl A, Scholz H. 2005. A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system. *Development* 132:1327-36
- Walther C, Guenet JL, Simon D, Deutsch U, Jostes B, Goulding MD, Plachov D, Balling R, Gruss P. 1991. Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* 11:424-34
- Walther C, Gruss P. 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113:1435-49
- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP, Scheffler B, Steindler DA. 2006. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54:815-25
- Wang S, Sdrulla A, Johnson JE, Yokota Y, Barres BA. 2001. A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development. *Neuron* 29:603-14
- Warren N, Caric D, Pratt T, Clausen JA, Asavaritikrai P, Mason JO, Hill RE, Price DJ. 1999. The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex* 9:627-35
- Warren N, Caric D, Pratt T, Clausen JA, Asavaritikrai P, Mason JO, Hill RE, Price DJ. 1999. The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex* 9:627-35
- Waskiewicz AJ, Cooper JA. 1995. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol* 7:798-805
- Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-30
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:387-403
- Wen J, Hu Q, Li M, Wang S, Zhang L, Chen Y, Li L. 2008. Pax6 directly modulate Sox2 expression in the neural progenitor cells. *Neuroreport* 19:413-7
- Wen JH, Chen YY, Song SJ, Ding J, Gao Y, Hu QK, Feng RP, Liu YZ, Ren GC, Zhang CY, Hong TP, Gao X, Li LS. 2009. Paired box 6 (PAX6) regulates glucose metabolism via proinsulin processing mediated by prohormone convertase 1/3 (PC1/3). *Diabetologia* 52:504-13
- Weruaga E, Briñón JG, Barbado V, Aijón J, Alonso JR. 1999. A standardized model for the anatomical division of the rodent olfactory bulb. *European Journal of Anatomy* 3:27-34

- Whitman MC, Greer CA. 2007. Adult-generated neurons exhibit diverse developmental fates. *Dev Neurobiol* 67:1079-93
- Wichterle H, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 1997. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18:779-91
- Wick MJ, Dong LQ, Riojas RA, Ramos FJ, Liu F. 2000. Mechanism of phosphorylation of protein kinase B/Akt by a constitutively active 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J Biol Chem* 275:40400-6
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79:143-80
- Willaime-Morawek S, Seaberg RM, Batista C, Labbe E, Attisano L, Gorski JA, Jones KR, Kam A, Morshead CM, van der KD. 2006. Embryonic cortical neural stem cells migrate ventrally and persist as postnatal striatal stem cells. *J Cell Biol* 175:159-68
- Willert K, Nusse R. 1998. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8:95-102
- Willey TJ, Maeda G, Schultz RL, Seibly WS, Horowitz JM. 1983. The principal projection pathway between the olfactory bulb and the prepyriform cortex in the cat. *J Neurosci Res* 9:253-77
- Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A. 1997. Vertebrate neural induction: inducers, inhibitors, and a new synthesis. *Neuron* 18:699-710
- Windrem MS, Nunes MC, Rashbaum WK, Schwartz TH, Goodman RA, Mckhann G, Roy NS, Goldman SA. 2004. Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med* 10:93-7
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG. 2002. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681-9
- Wittko IM, Schanzer A, Kuzmichev A, Schneider FT, Shibuya M, Raab S, Plate KH. 2009. VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J Neurosci* 29:8704-14
- Woodruff RH, Tekki-Kessarlis N, Stiles CD, Rowitch DH, Richardson WD. 2001. Oligodendrocyte development in the spinal cord and telencephalon: common themes and new perspectives. *Int J Dev Neurosci* 19:379-85
- Wright EM, Vogel KS, Davies AM. 1992. Neurotrophic factors promote the maturation of developing sensory neurons before they become dependent on these factors for survival. *Neuron* 9:139-50
- Wu D, Li T, Lu Z, Dai W, Xu M, Lu L. 2006. Effect of CTCF-binding motif on regulation of PAX6 transcription. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:2422-9
- X**u S, Sunderland ME, Coles BL, Kam A, Holowacz T, Ashery-Padan R, Marquardt T, McInnes RR, van der KD. 2007. The proliferation and expansion of retinal stem cells require functional Pax6. *Dev Biol* 304:713-21
- Y**amaoka T, Yano M, Yamada T, Matsushita T, Moritani M, Ii S, Yoshimoto K, Hata J, Itakura M. 2000. Diabetes and pancreatic tumours in transgenic mice expressing Pa x 6. *Diabetologia* 43:332-9
- Yan Q, Liu WB, Qin J, Liu J, Chen HG, Huang X, Chen L, Sun S, Deng M, Gong L, Li Y, Zhang L, Liu Y, Feng H, Xiao Y, Liu Y, Li DW. 2007. Protein phosphatase-1 modulates the function of Pax-6, a transcription factor controlling brain and eye development. *J Biol Chem* 282:13954-65
- Yang Z. 2008. Postnatal subventricular zone progenitors give rise not only to granular and periglomerular interneurons but also to interneurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 506:347-58
- Yoshikawa K. 2000. Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci Res* 37:1-14
- Young KM, Fogarty M, Kessarlis N, Richardson WD. 2007. Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27:8286-96

Yun K, Potter S, Rubenstein JL. 2001. Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128:193-205

Yun K, Garel S, Fischman S, Rubenstein JL. 2003. Patterning of the lateral ganglionic eminence by the Gsh1 and Gsh2 homeobox genes regulates striatal and olfactory bulb histogenesis and the growth of axons through the basal ganglia. *J Comp Neurol* 461:151-65

**Z**aniolo K, Leclerc S, Cvekl A, Vallieres L, Bazin R, Larouche K, Guerin SL. 2004. Expression of the alpha4 integrin subunit gene promoter is modulated by the transcription factor Pax-6 in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1692-704

Zhong W, Chia W. 2008. Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr Opin Neurobiol* 18:4-11

Zhou YH, Tan F, Hess KR, Yung WK. 2003. The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clin Cancer Res* 9:3369-75

Zhou YH, Wu X, Tan F, Shi YX, Glass T, Liu TJ, Wathen K, Hess KR, Gumin J, Lang F, Yung WK. 2005. PAX6 suppresses growth of human glioblastoma cells. *J Neurooncol* 71:223-9

Zhou YH, Hu Y, Mayes D, Siegel E, Kim JG, Mathews MS, Hsu N, Eskander D, Yu O, Tromberg BJ, Linskey ME. 2010. PAX6 suppression of glioma angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor A. *J Neurooncol* 96:191-200

Zhu X, Bergles DE, Nishiyama A. 2008. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* 135:145-57

Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. 1998. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 11:234-45





En esta Tesis Doctoral hemos analizado la regulación ejercida por el factor de transcripción Pax6 en la generación de células que tiene lugar en el encéfalo de ratones adultos, tanto su contribución a la regulación de la neurogénesis adulta dirigida al bulbo olfatorio como a la formación de células a partir de precursores localizados en la corteza. Este factor de transcripción regula procesos tan importantes como la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células generadas, así como el potencial de autorrenovación de las células madre. Los resultados obtenidos contribuyen al entendimiento global de los mecanismos moleculares que gobiernan la neurogénesis y gliogénesis en el cerebro adulto, lo que podría tener implicaciones futuras tanto en el desarrollo de terapias celulares como en la biología de algunos tumores cerebrales.