



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN Y MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS
CAJAL RETZIUS DURANTE EL DESARROLLO CORTICAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
M. EN C. MARÍA DANIELA FRADE PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:
DR. LUIS F. COVARRUBIAS ROBLES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DR. JUAN R. RIESGO ESCOVAR
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

JURIQUILLA, QUERÉTARO, JUNIO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a las mujeres de mi vida. Mi mamá, Adelina Pérez Arreguín y a mi hermana Ana Gabriela Frade Pérez. Sin ellas no sería...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, Adelina y Octavio, por su gran esfuerzo y dedicación para sacar adelante a su familia, por las palabras de aliento, los valores inculcados y las vivencias que me llevaron a ser una persona que lucha por sus objetivos. A mis hermanos Raúl, Omar y Gabi por el apoyo, las experiencias y el cariño, los quiero mucho.

A mi compañero de vida y mejor amigo José Manuel por estos excelentes años en los que ha compartido su tiempo conmigo y hemos vivido tantas cosas, por su compañía, por sus consejos, por todo el apoyo durante el doctorado y por quererme tanto siempre. ¡Igualmente Pepe!

Al Dr. Alfredo Varela por darme la oportunidad de integrarme a su equipo, por la invaluable experiencia en la investigación, por todo el aprendizaje compartido y el apoyo que me otorgó durante esta importante etapa de mi vida. A la Dra. Amaya Miquelajauregui por todo el tiempo y conocimiento que compartió conmigo, y por su ayuda y aportación para la publicación del artículo.

A la Dra. Ofelia Mora y el Dr. Armando Shimada por su gran apoyo, consejos y amistad durante toda mi estadía en el laboratorio. A Claudia García-Peña por todo su apoyo, ayuda y buenas experiencias que compartimos. Al Dr. Tonatiuh Ayala, a Carlos Lozano y Laura González por su apoyo y ayuda técnica.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio A-03 e INB con los que viví grandes momentos e hicieron del doctorado una experiencia inolvidable. Sergio, Rosita, Tania, Denisse, Chivis, Yumi, Nataly, Cris, Adri, Elisa, Chava, Mario, Pati, Magda, Espe, Jonathan, Mariana, Sócrates, Daniela, Ariadna, Alex, Elías, etc.

A mi incondicional Evangelina Delgado y a Arafat Angulo por su gran amistad, apoyo, pláticas motivadoras, cafés, etc. A las HMs, Jime, Rebe y Didis con las que pasé excelentes momentos. A Jimena Castillo por esa risa contagiosa.

Al apoyo recibido por Leonor Casanova Rico (Unidad de posgrado), Carlos Lozano Flores y María Laura González Dávalos (Laboratorio A-03), Martín García Servín y Alejandra Castilla León (Bioterio INB), Nidia Hernández Ríos y Lourdes Palma Tirado (Unidad de Microscopía), Adriana González Gallardo y Anaid Antaramian Salas (Unidad de Proteogenómica), Adrián H. Oskam Voorduin (CFATA), Lourdes Lara Ayala (Unidad de Posgrado).

A los Drs. Brenda Anguiano, Pavel Rueda y Aurea Orozco, de la coordinación del Doctorado en Ciencias Biomédicas por su gran apoyo para poder completar el Doctorado.

Al mi comité tutor por su ayuda y aportaciones durante el Doctorado y a mi jurado evaluador por su tiempo y valiosos comentarios a la tesis.

Al Programa de Doctorado en Ciencia Biomédicas por todo el apoyo otorgado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca de doctorado con número 33077. A los proyectos CONACYT 282779 y 249744, y DGAPA-UNAM IN203713.

RESUMEN

El desarrollo de la corteza cerebral en los mamíferos depende de la presencia de las células Cajal Retzius (CR) ya que estas secretan a la glicoproteína Reelina capaz de dirigir la migración de las células corticales. Sin embargo, las propias células CR, antes de posicionarse por la totalidad de la corteza en desarrollo, deben efectuar significativos éxodos migratorios desde sus sitios de origen bajo un complejo control genético. Existen algunos marcadores genéticos de grandes grupos de células CR, pero muy pocos que puedan seguir pequeñas subpoblaciones celulares que permitan comprender más sobre la diferenciación de dichas células. Las Células CR se originan principalmente en el Hem Cortical, una región del telencéfalo medial, así como en el Septum y la región caudal medial, y lateralmente en la región rostral y en el palio ventral (VP). En este último, se genera un diverso grupo de células que expresan Reelina. Sin embargo, la ruta de migración de dichas células ha sido blanco de contradicciones. Nosotros mediante el marcaje con el trazador fluorescente CFDA seguimos la ruta de migración que presentan las células que se originan en la cara lateral de la vesícula telencefálica de embriones de ratón en los estadios E10.5 a E12.5. Concluimos que desde el VP las células que expresan Reelina migran en dirección ventral caudal y carecen de migración dorsal, como algunos autores proponen. También identificamos una subpoblación celular no caracterizada que se origina en la parte más rostral de la cara lateral de la vesícula, el dominio rostral lateral (Rld) en la cercanía de los bulbos olfativos. También que las células del Rld presentan características de células CR ya que expresan Reelina y migran en dirección a la corteza olfativa. Por lo tanto, nuestro trabajo revela el hallazgo de una nueva población celular CR que es parte de la población celular de la corteza olfativa.

ABSTRACT

The development of the cerebral cortex in mammals depends on the presence of Cajal Retzius (CR) cells since they secrete the Reelin glycoprotein capable of directing the migration of cortical cells. However, the CR cells, before positioning themselves in the entire developing cortex, must migrate from their sites of origin under a complex genetic control. There are some genetic markers for large groups of CR cells but very few that can follow small cell subpopulations, in principle allowing us to characterize the differentiation of these cells. CR cells originated mainly in the Cortical Hem, a region of the medial telencephalon, as well as in the Septum, the caudal medial region, and laterally in the rostral region and the ventral pallium (VP). In this last site there are conflicting results in the literature regarding the migration path followed by these cells. We, by means of CFDA fluorescence labeling, followed the migration of the cells originating in the lateral face of the telencephalic vesicle of mouse embryos from E10.5 to E12.5. We conclude that VP cells that expressing Reelin present a migratory path in a caudal ventral direction, without dorsal migration, as some authors propose. We also identified an uncharacterized cell subpopulation originating in the most rostral part of the lateral aspect of the telencephalon, the rostral lateral domain (Rld), in the vicinity of the olfactory bulbs. These Rld cells have CR characteristics, since they express Reelin. Also, these cells migrate towards the olfactory cortex. Therefore, our work uncovers a new cell population that contributes to the cellular population of the olfactory cortex.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	X
INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Desarrollo del Sistema Nervioso Central	3
1.2. Corteza cerebral	5
1.2.1. Regionalización cortical	5
1.2.2. Migración cortical	8
1.2.3. Laminación cortical	9
1.3. Células Cajal Retzius	13
1.3.1. Sitios de origen de las células CR	14
1.3.2. Migración de las células CR	14
1.3.3. Marcadores genéticos de las células CR	17
Marcadores generales de células CR	18
Marcadores específicos de células CR	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
2.1. Hipótesis	23
2.2. Objetivos	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS	24
3.1. Modelo animal de investigación	24
3.2. Preparación de embriones y tejidos	24
3.3. Ribosondas	24

3.4. Hibridación <i>in situ</i> (ISH)	27
3.5. Inyección exo-útero y cultivo embrionario	28
3.6. Inmunohistoquímica (IHQ) o Inmunotinción	29
3.7. Obtención y análisis de imágenes	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Búsqueda de candidatos para marcadores moleculares de células CR mediante hibridación <i>in situ</i>	30
4.2. Acción del gen <i>Lhx5</i> sobre las subpoblaciones identificadas con los marcadores moleculares	33
4.3. Identificación de las rutas de migración mediante marcaje Exo-útero y cultivo embrionario	40
4.3.1. Migración desde el palio ventral (VP) y el límite palio-subpalio (PSB)	40
4.3.2. Migración desde la Zona Rostral	45
4.4. Caracterización de las poblaciones celulares marcadas con CFDA	47
4.4.1. Caracterización de células migratorias del VP/PSB	48
4.4.2. Caracterización de la Población del Dominio Rostral-Lateral	51
4.5. Caracterización de una nueva población de células de origen rostral que expresan Reelina	54
4.5.1. Inhibición farmacológica de la población Er81 de células CR de origen rostral	54
4.5.2. Efecto de la ausencia del gen <i>Lhx5</i> sobre la población de células que expresan Reelina de origen rostral-lateral	56
4. 6. Expresión del gen <i>Dbx1</i> en el Hem cortical	58
5. DISCUSIÓN	60
5.1. Selección de marcadores moleculares de subpoblaciones de células CR	60
5.2. Análisis del efecto de la ausencia del gen <i>Lhx5</i> sobre las poblaciones celulares identificadas mediante moléculas candidatas a marcadores moleculares de subpoblaciones de células CR	62
5.3. Rutas de migración que siguen las células marcadas con CFDA que nacen	

en la ZV del VP y del Rld	63
5.3.1. Identificación de una población celular originada en el dominio rostral lateral (Rld)	64
5.3.2. Las células originadas en el VP y el patrón de migración inesperado	65
5.4. La corteza piriforme y su diversidad celular	68
6. CONCLUSIONES	70
7. BIBLIOGRAFÍA	72
8. ANEXOS	81
8.1. SOLUCIONES	81
8.2. LISTA DE ABREVIATURAS	82
8.3. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo del desarrollo temprano del SNC de mamíferos.	4
Figura 2. Esquema representativo de centros organizadores, estructuración y migración de la corteza cerebral en desarrollo.	12
Figura 3. Esquema de los sitios de origen y rutas de migración propuestos para las células Cajal-Retzius.	16
Figura 4. Hibridación <i>in situ</i> para los genes <i>Scn3b</i> , <i>Stmn4</i> , <i>Mab2111</i> y <i>Rspo2</i> .	31
Figura 5. Hibridación <i>in situ</i> para los genes <i>Sulf2</i> , <i>6330Rik</i> , <i>Acaa1b</i> y <i>Hdac11</i> .	32
Figura 6. Hibridación <i>in situ</i> para los genes <i>Tcf4</i> , <i>C6300</i> y <i>Er81</i> .	34
Figura 7. Hibridación <i>in situ</i> para los genes <i>Scn3b</i> , <i>Stmn4</i> , <i>Mab2111</i> y <i>Rspo2</i> en embriones <i>Lhx5</i> ^{-/-} .	38
Figura 8. Hibridación <i>in situ</i> para el gen <i>Er81</i> en embriones <i>Lhx5</i> ^{-/-} .	39
Figura 9. Marcajes con CFDA en la región del VP/PSB.	43
Figura 10. Marcajes con CFDA en la región lateral-dorsal de las vesículas telencefálicas.	44
Figura 11. Marcajes con CFDA en la zona rostral.	46
Figura 12. Inmunohistoquímica en marcajes con CFDA del VP/PSB.	49
Figura 13. Inmunohistoquímica doble en vesículas marcadas con CFDA en el VP/PSB.	50
Figura 14. Inmunohistoquímica en marcajes con CFDA del Rld.	52
Figura 15. Inmunohistoquímica doble en vesículas marcadas con CFDA en Rld.	53
Figura 16. Análisis de las células Rld por Hibridación <i>In situ</i> y marcajes con CFDA en presencia de SU5202.	55
Figura 17. Análisis de la usencia del gen <i>Lhx5</i> en las células Rld.	57
Figura 18. ISH con el gen <i>Dbx1</i> en cerebros embrionarios de E10.5 a E12.5.	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes seleccionados para este estudio.	25
Tabla 2. Expresión de genes candidatos a marcadores moleculares de células CR.	35

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo embrionario del Sistema Nervioso Central complejas redes de regulación de la expresión genética inducen procesos de proliferación, diferenciación y migración celular. El telencéfalo, su región más dorsal, también llamada palio, da lugar a la corteza cerebral que se caracteriza por su estructura laminada y especialización en regiones funcionales cuya identidad inicia durante el desarrollo embrionario (Marin and Rubenstein 2001; Marin and Rubenstein 2003). Una vez generadas en el estrato germinativo ventricular, células de cada región se desplazan mediante migración radial y migración tangencial. En la migración radial las células se producen en la zona ventricular del palio estableciendo su grosor, mientras que en la migración tangencial las células se producen en la zona ventricular de diversos sitios del palio y subpalio y migran grandes distancias hasta alcanzar la corteza (Rakic 1995; de Carlos, Lopez-Mascaraque et al. 1996; Rubenstein, Shimamura et al. 1998; Hatten 1999; Parnavelas 2000; Marin and Rubenstein 2001; Marin and Rubenstein 2003). En los mamíferos, el establecimiento de la corteza obedece un patrón muy característico denominado en inglés *inside-out* en el que las células recién generadas en la zona ventricular, migran radialmente atravesando capas previamente formadas y se posicionan en las capas más externas (Angevine and Sidman 1961; Rakic 1974; McConnell 1988). Esto lleva a que las células que se generan en las etapas iniciales de la corticogénesis ocupan capas más profundas cercanas a la zona ventricular y las que se generan en etapas tardías se ubican en capas más superficiales cercanas a la zona pial. Una excepción a este patrón es la capa I, que es la primera en generarse permaneciendo adyacente a la zona marginal y sus células controlan la ejecución del patrón *inside-out* (Marín-Padilla M 1998; Miguel 1998; Soriano and Del Rio 2005; Chowdhury, Jimenez et al. 2010).

Las células de la capa I corresponden al tipo celular llamado Cajal-Retzius (CR), que son indispensables para la laminación *inside-out* ya que secretan una proteína llamada Reelina que induce la migración radial de las células corticales y cuya carencia produce alteraciones del desarrollo como la inversión de las capas corticales lo que conlleva a defectos neurológicos importantes (D'Arcangelo, Miao et al. 1995; Alcantara, Ruiz et al. 1998)

(Ogawa, Miyata et al. 1995; Hevner, Shi et al. 2001; Tissir and Goffinet 2003; Soriano and Del Rio 2005; Guillemot, Molnar et al. 2006). La expresión de esta proteína, Reelina, es uno de los principales marcadores de las células CR.

Las células CR se originan en zonas como el Hem Cortical (HC), el Septum, y zonas caudo-mediales (Meyer, Cabrera Socorro et al. 2004; Takiguchi-Hayashi, Sekiguchi et al. 2004; Bielle, Griveau et al. 2005; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007; Ceci, Pedraza et al. 2012). Se ha propuesto que estas células se generan también a partir de regiones laterales del telencéfalo como el Palió Ventral (Bielle, Griveau et al. 2005) aunque esto no ha sido confirmado en estudios independientes.

Desde los sitios de origen, las células CR se distribuyen por toda la corteza (Hevner, Neogi et al. 2003; Soriano and Del Rio 2005). En diversos trabajos se han estudiado las características de las células CR, que parecen tener una importante heterogeneidad en relación con sus regiones de origen y destino en la neocorteza. Se ha propuesto la expresión de algunos genes en subpoblaciones de células CR, pero generalmente se trata de grandes poblaciones celulares que no han permitido hacer análisis específicos de pequeñas poblaciones (Hevner, Neogi et al. 2003; Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004). Sus rutas de migración son también un tema que no ha sido fácil de abordar. En algunos estudios se ha hecho marcaje y seguimiento de diversas rutas de migración, principalmente del HC (Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007; Ceci, Lopez-Mascaraque et al. 2010). Incluso se ha propuesto que el HC podría ser el sitio de mayor producción de células CR (Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007; Ceci, Lopez-Mascaraque et al. 2010). Entonces, aunque existe información acerca del origen de las células CR, subsiste aún un conocimiento fragmentado acerca de la contribución relativa de las diferentes fuentes propuestas y sus rutas de migración.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Desarrollo del Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso central es uno de los primeros sistemas en formarse durante el desarrollo embrionario de los mamíferos y después del nacimiento su desarrollo continúa al refinarse los complejos circuitos neuronales que permiten el funcionamiento normal de dicho sistema. Dicho desarrollo involucra complejos procesos de expresión genética, proliferación y migración celular que dan lugar a la morfogénesis de cada región funcional.

Para el establecimiento del primordio del SNC, durante la neurulación, el mesodermo señala al ectodermo mediante noggina, cordina y folistatina, induciendo la formación de la placa neural, al competir con proteínas de la familia BMP, que posteriormente se plegará en dirección dorsal para establecer al tubo neural (Rubenstein, Shimamura et al. 1998; Gilbert 2005; Puelles, Martínez de la Torre et al. 2008). El tubo neural inicialmente está dividido en tres vesículas primarias que posteriormente se dividirán en cinco (Fig.1 vista lateral) y de la parte anterior a la posterior se identifican como 1) el prosencéfalo o cerebro anterior que formará al telencéfalo (hemisferios cerebrales) y el diencefalo (estructuras talámicas), 2) el mesencéfalo o cerebro medio, 3) el rombencéfalo o cerebro posterior, que es el primordio del puente y el cerebelo (Fig.1 vista corte coronal) (Rubenstein, Shimamura et al. 1998; Gilbert 2005; Puelles, Martínez de la Torre et al. 2008; Moore and Persaud 2013).

El telencéfalo lo podemos dividir en dos partes principales, el palio, que es la parte superior de donde se originará la corteza y el hipocampo, y el subpalio, que es la parte inferior o base del telencéfalo de donde se originarán la eminencias ganglionares medial y lateral que son los primordios de los núcleos basales, pálido y estriado (Fig.2 C) (Rubenstein, Shimamura et al. 1998; Marin and Rubenstein 2003; Puelles, Martínez de la Torre et al. 2008). La parte principal del telencéfalo es la corteza cerebral, la estructura más extensa y compleja del cerebro de mamíferos (Rubenstein, Shimamura et al. 1998; O'Leary, Chou et al. 2007). Dicha complejidad ha sido asociada a una interacción genética múltiple y compleja espacial y temporalmente así como a la participación de factores celulares ambientales (Krubitzer and Kaas 2005). Dicho patrón de complejidad e interacción de diversos factores ha sido relacionado con el nivel evolutivo de la corteza cerebral.

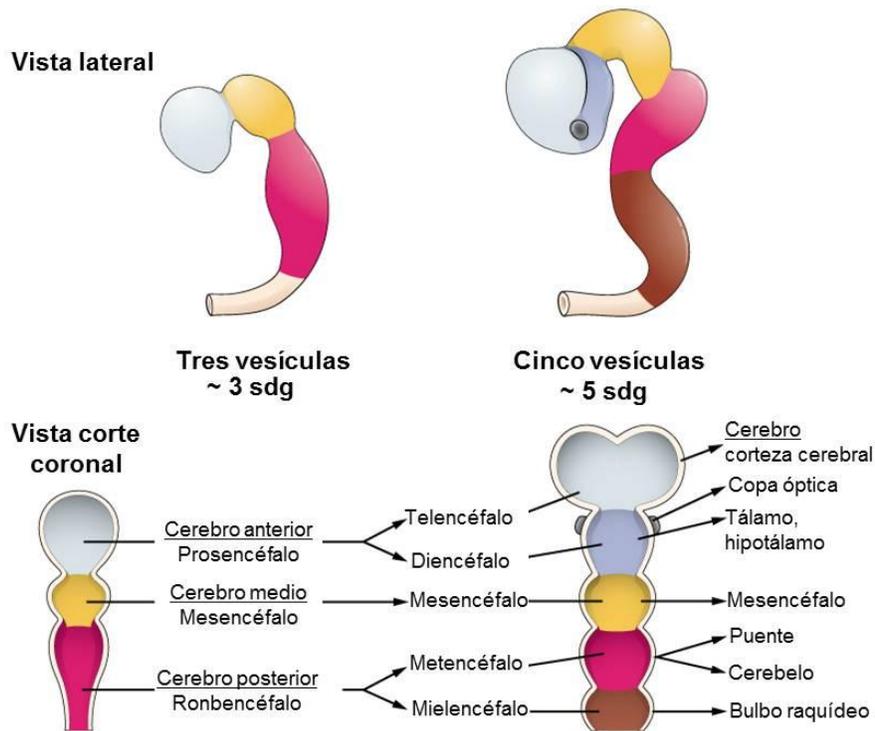


Figura 1. Esquema representativo del tubo neural en el desarrollo temprano del SNC de mamíferos. La figura muestra el desarrollo del tubo neural en los estadios de tres y cinco vesículas. En humanos dichos estadios se presentan entre la semana 3 a 5 de la gestación (sdg). Cada vesícula muestra su respectivo nombre y los derivados adultos. Modificado de <http://library.open.oregonstate.edu/aandp/chapter/14-1-embryonic-development>.

De esa manera que se han establecido tres regiones de las cuales la de mayor complejidad es la neocorteza, localizada en la parte más dorsal del telencéfalo que se caracteriza por presentar un patrón de seis capas celulares, cada una de las cuales tiene un repertorio celular, patrones de conectividad y funciones específicas.

Otras regiones del telencéfalo son la arquiocorteza que incluye al hipocampo en la región medial y la paleocorteza que contiene a la corteza olfatoria en la región lateral (Krubitzer and Kaas 2005; O'Leary, Chou et al. 2007; O'Leary and Sahara 2008).

1.2. Corteza cerebral

La corteza cerebral consta de varias regiones que desempeñan alguna de las tres funciones nerviosas básicas. La función sensorial por la que se recibe información del exterior del SNC, incluye áreas como la corteza somatosensorial primaria, visual primaria y auditiva primaria. La función motora, encargada de enviar respuestas a los efectores fuera del SNC controlando los movimientos voluntarios, por ejemplo, incluye a la corteza motora primaria. Finalmente, la función integradora, encargada del procesamiento de la información para generar una respuesta, incluye las áreas de asociación de todas las regiones primarias. Para el correcto funcionamiento de todas las regiones corticales es necesarios que éstas adquieran especificidad durante el desarrollo embrionario, así como el establecimiento de los ejes anatómicos.

1.2.1. Regionalización cortical

Para la especificación de las áreas corticales se ha establecido que es necesaria la combinación de mecanismos tanto intrínsecos (morfógenos y moléculas de señalización provenientes de centros organizadores), como extrínsecos (la periferia sensorial y la integración de la información en la corteza) (Sur and Rubenstein 2005; O'Leary and Sahara 2008). Los centros organizadores son sitios en zonas específicas del telencéfalo en desarrollo que inducen identidades específicas en cada región cortical (Sur and Rubenstein 2005; O'Leary, Chou et al. 2007; O'Leary and Sahara 2008). Existen varios sitios organizadores considerados como indispensables para el correcto establecimiento de la corteza. La placa comisural (CoP) (Fig.2 A) es la parte más anterior en la cara medial del prosencéfalo, la cual expresa a varios miembros de la familia de factores de crecimiento

fibroblástico (Fgfs) como *Fgf8*, *Fgf17* y *Fgf18* (Crossley and Martin 1995; Cholfin and Rubenstein 2007; O'Leary, Chou et al. 2007; O'Leary and Sahara 2008), estando los dos primeros involucrados en la regulación del tamaño de la corteza dorso-frontal (Crossley and Martin 1995; Storm, Garel et al. 2006). También participa como centro regulador la región adyacente a la línea media dorsal de cada vesícula telencefálica, denominada el Hem Cortical (HC) (Fig.2 A), el cual expresa proteínas morfogénicas óseas (BMPs) como *BMP2*, *BMP4*, *BMP5* y *BMP7*, y varios miembros de la familia Wnt como *Wnt3a*, *Wnt5a* y *Wnt2b*, relacionados con el establecimiento de regiones dorsales de la corteza mediante mecanismos de inducción e inhibición celular (Segkilia, Seuntjens et al.; Furuta, Piston et al. 1997; Crossley, Martinez et al. 2001; O'Leary, Chou et al. 2007; O'Leary and Sahara 2008). Desde el HC también ha sido importante el papel de las proteínas Lim homeodominio como *Lhx5* y *Lhx2*, ya que su ausencia lleva al acortamiento o expansión del HC, respectivamente (Zhao, Sheng et al. 1999; Zhao, Hermes et al. 2000; Bulchand, Grove et al. 2001; Monuki, Porter et al. 2001; Abellan, Vernier et al. 2010; Miquelajauregui, Varela-Echavarría et al. 2010). Por otra parte, otro centro organizador es el denominado antiHem (Fig.2 A) localizado en el neuroepitelio lateral del telencéfalo, a lo largo del eje antero-posterior, cercano a la región límite entre el palio dorsal y ventral, también nombrado PSB por las siglas en inglés de "pallial-subpallial boundary" (O'Leary, Chou et al. 2007; O'Leary and Sahara 2008; Borello and Pierani 2010). Dicho sitio produce $Tgf\alpha$, Neuregulin1 y Neuregulin3, así como el antagonista de Wnt *Sfrp2* que junto con el HC y la CoP definen y establecen identidades de regiones a lo largo de los ejes A-P y M-L (Assimacopoulos, Grove et al. 2003; O'Leary, Chou et al. 2007). Finalmente hay una región adyacente al telencéfalo ventral y el hipotálamo, en el diencefalo, que produce Sonic hedgehog (*Shh*) (Fig.2 A), el cuál ha sido implicado en establecimiento muy temprano del prosencéfalo pero no directamente con la posterior regionalización del palio dorsal (Crossley, Martinez et al. 2001; O'Leary, Chou et al. 2007; Rash and Grove 2007; O'Leary and Sahara 2008).

Desde los centros organizadores son secretados morfógenos los cuales inducen la expresión de factores de transcripción y moléculas señalizadoras que en ciertas combinaciones a través de los ejes Antero-Posterior (A-P) y Medio-Lateral (M-L) generan zonas corticales específicas (Sur and Rubenstein 2005; O'Leary, Chou et al. 2007; O'Leary and Sahara 2008). Algunas moléculas de señalización, como *Emx2*, *Pax6*, *Sp8* y *COUP-*

TFI, se expresan en gradientes de concentración, lo cual se ha relacionado con la posición, tamaño e identidad funcional de regiones corticales motoras y sensoriales. Además, parecen tener cierta influencia en el control de la proliferación y/o diferenciación de progenitores celulares (O'Leary, Chou et al. 2007; O'Leary and Sahara 2008; Borello and Pierani 2010).

Emx2 es un factor de transcripción que genera un gradiente de concentración decreciente desde regiones postero-mediales a regiones antero-laterales de la neocorteza en desarrollo (Fig.2 B). En el adulto, dichas regiones darán lugar a la corteza visual primaria y somatosensorial, y a la corteza motora respectivamente (Simeone, Gulisano et al. 1992; Hamasaki, Leingartner et al. 2004). Estudios en mutantes condicionales para el gen *Emx2* han mostrado la expansión de regiones corticales frontales con identidades motoras y somatosensitivas (Bishop, Goudreau et al. 2000; Mallamaci, Muzio et al. 2000; O'Leary, Chou et al. 2007). Estos datos sugieren que dicho gen especifica preferencialmente áreas de identidad posterior en la corteza (Hamasaki, Leingartner et al. 2004; O'Leary and Sahara 2008).

Pax6 es un factor de transcripción que muestra un gradiente de concentración opuesto a *Emx2*, ya que su concentración es mayor en la zona anterior-lateral y menor en la zona posterior-medial (Fig.2 B) (Bishop, Goudreau et al. 2000). Un mutante que carece de una proteína funcional *Pax6* muestra una reducción en el tamaño de regiones motoras frontales y somatosensitivas, y un aumento en el tamaño de áreas posteriores, además de la pérdida de la especificación del antihem o PSB (Bishop, Goudreau et al. 2000; Bishop, Rubenstein et al. 2002; Muzio, Di Benedetto et al. 2002; O'Leary, Chou et al. 2007)

COUP-TFI es un factor de transcripción que presenta un gradiente de concentración decreciente desde la zona caudo-lateral a la rostro-medial (Fig.2 B) (Liu, Dwyer et al. 2000; O'Leary, Chou et al. 2007; O'Leary and Sahara 2008). La delección del gen *COUP-TFI* resulta en la expansión masiva de áreas frontales motoras que se extienden hasta ocupar zonas que corresponderían a la corteza parietal e incluso parte de la corteza occipital. Esta expansión a su vez genera una importante reducción en el tamaño de las áreas con identidad cortical primaria (somatosensitiva, auditiva y visual) (Armentano, Chou et al. 2007; O'Leary, Chou et al. 2007). Esto indica que *COUP-TFI* participa de manera

importante en la regulación del balance de áreas frontales reprimiendo su expansión hacia áreas caudales y permitiendo el desarrollo tanto de la corteza parietal como la occipital.

SP8: Es un factor de transcripción que es expresado en la placa comisural, CoP, y presenta un gradiente de concentración mayor hacia la zona anterior-medial y menor hacia la zona posterior-lateral (Fig.2 B). La expresión del gen *SP8* coincide con un dominio de expresión de *Fgf8* en dicha zona siendo *Sp8* su activador directo (Sahara, Kawakami et al. 2007). Debido a que ambos genes se expresan recíprocamente y a que se sabe que *Fgf8* controla el grado de expresión de otros genes como *Emx2* y *COUP-TFI* ha sido difícil analizar su función de forma aislada. Sin embargo, un mutante condicional para el gen *Sp8* en estadios tardíos del desarrollo mostró un cambio en la expresión de marcadores corticales frontales sugiriendo que dicho gen especifica preferencialmente identidad asociada con áreas frontales motoras (Sahara, Kawakami et al. 2007; Zembrzycki, Griesel et al. 2007).

Foxg1 es un represor transcripcional con particular importancia en el desarrollo de la corteza y de los ganglios basales (Hanashima, Shen et al. 2002; Hamasaki, Leingartner et al. 2004). Este gen se expresa en un gradiente de concentración mayor en la zona rostro-lateral y menor hacia la zona caudo-medial. Además, se ha sugerido que participa reprimiendo destinos caudo-mediales y que antagoniza tanto a las BMPs, como a su vía de señalización medial (Muzio and Mallamaci 2005). También se ha observado que la delección del gen produce la expansión de centros de señalización de la línea media (BMPs y Wnts) y modifica la especificación de zonas dorsales a HC (Muzio and Mallamaci 2005; Hanashima, Fernandes et al. 2007). Por otra parte, al ser *Foxg1* un represor de la proliferación, en su ausencia existe una sobreproducción de células en la corteza cerebral (Hamasaki, Leingartner et al. 2004; Hanashima, Fernandes et al. 2007).

1.2.2. Migración cortical

Una vez que la regionalización cortical comienza gracias a la interacción de mecanismos genéticos entre las regiones organizadoras, éstas también dan lugar a la migración masiva de diversas poblaciones celulares. Células con identidad de progenitores, así como células postmitóticas comienzan un proceso de migración celular desde sus lugares de origen, dentro o fuera de la corteza, hasta su destino final incluso en sitios muy lejanos en el

telencéfalo (Rakic 1990; Fishell 1995; Rakic 2009). La migración celular es indispensable para el desarrollo y estructuración normal de la corteza. Alteraciones en este proceso pueden generar anomalías nerviosas como retraso mental, desórdenes motores y cognitivos, autismo, esquizofrenia e incluso epilepsia (Marin, Baker et al. 2002; Marin and Rubenstein 2003). Las células del telencéfalo utilizan dos principales formas de migración, la migración radial y la migración tangencial. La migración radial inicialmente requiere de un proceso de translocación somal y posteriormente depende de la glia radial que finalmente permite que las células recorran relativamente cortas distancias dentro del neuroepitelio contiguo (Fig.2 D) (Rakic 1972; Rakic 1990; Hatten 1999; Nadarajah, Brunstrom et al. 2001; Rakic 2009; Rakic, Ayoub et al. 2009). En este tipo de migración las células se producen en la zona ventricular del palio, y principalmente dan lugar a neuronas glutamatérgicas y establecen a las neuronas de proyección o piramidales excitatorias (Rubenstein, Shimamura et al. 1998; Marin and Rubenstein 2001; Marin and Rubenstein 2003; Guillemot 2005; Rakic, Ayoub et al. 2009). Por otra parte, la migración tangencial es un tipo de migración usado por células generadas en el subpalio, es decir, en las eminencias ganglionares, que migran hacia la corteza, que no depende de la glia radial y dan lugar a células GABAérgicas del tipo de interneuronas inhibitorias (Rakic 1995; de Carlos, Lopez-Mascaraque et al. 1996; Hatten 1999; Parnavelas 2000; Marin and Rubenstein 2001; Wichterle, Turnbull et al. 2001; Marin and Rubenstein 2003; Guillemot 2005).

1.2.3. Laminación cortical

En el desarrollo embrionario de la corteza cerebral en mamíferos, diversas poblaciones de células progenitoras producen una gran variedad de neuronas con características morfológicas, fenotipos de neurotransmisores y patrones de proyección diversos que otorgan propiedades y funciones específicas a la corteza (Guillemot, Molnar et al. 2006; Mallamaci and Stoykova 2006). Sin embargo, para lograr lo anterior, esa vasta cantidad de neuronas no toma posiciones azarosas dentro del neuroepitelio; por el contrario, siguen patrones de migración que llevan a la corteza a tener un patrón laminar característico de seis capas (Mallamaci and Stoykova 2006). Cuando el neuroepitelio avanza en su desarrollo (Fig.2 D y E) los precursores celulares ubicados en la zona ventricular (ZV),

adyacente a los ventrículos, comienzan a proliferar produciendo células neuronales y células gliales que se acumularan sobre la ZV dando lugar a la preplaca o placa plexiforme (PP) (Rakic 1988; Marín-Padilla M 1998; Marín-Padilla 1999; Marin and Rubenstein 2003). A medida que la proliferación continúa, entre la ZV y la PP se establece una región llamada zona subventricular (ZSV) que, junto con la ZV son importantes regiones germinativas donde generan células que emergen en oleadas que migraran radialmente utilizando a la glía radial como andamiaje (Parnavelas 2000; Noctor, Martinez-Cerdeno et al. 2004). Las siguientes oleadas celulares, generadas en las regiones germinativas, conforman la placa cortical (PC), la cual atraviesa a la PP separándola en dos porciones, la superior o zona marginal (ZM) y la inferior que establece a la zona intermedia o subplaca (SP) (Super, Soriano et al. 1998). La división de la PP en ZM y SP es un patrón que se encuentra también en aves y reptiles (Marín-Padilla M 1998). La ZM forma la capa I que contiene un tipo celular de particular importancia llamado células Cajal Retzius, mientras que en la SP se establece la capa VII o profunda. La PC establece en sí el grosor de la corteza conteniendo a las capas II a VI (Rakic 1988; Marin-Padilla 1990; Marín-Padilla M 1998; Marín-Padilla 1999; Marin and Rubenstein 2003). En mamíferos, la formación de la PC representa un perfeccionamiento evolutivo y la formación previa de la PP parece ser un prerrequisito indispensable (Marín-Padilla M 1998; Marín-Padilla 1999). En el establecimiento de la PC, las células de las futuras capas II a VI se organizan siguiendo un patrón llamado *inside-outside* (*inside-out*) (Fig.2 D y E) (Angevine and Sidman 1961; Rakic 1974; McConnell 1988) por el cual las células que ocupan las capas más profundas (V y VI) se originan antes que las que ocupan las capas más externas (II, III, IV) (McConnell 1988; Guillemot, Molnar et al. 2006); es decir, las células de capas externas cercanas a la zona marginal son más jóvenes que las células cercanas a la zona ventricular que son más antiguas ya que nacieron primero. A medida que se generan las neuronas corticales bajo este patrón, éstas migran radialmente atravesando las capas ya formadas y se detienen al llegar a la zona marginal o capa I (Marin and Rubenstein 2003) con la participación de células de la ZM en la regulación de la migración radial *inside-out*. Interesantemente, las células de la zona marginal (capa I) no siguen el patrón *inside-out*, ya que aunque son parte de las primeras neuronas corticales en generarse se encuentran situadas por encima del resto de las capas. En esta capa se encuentran las células Cajal-Retzius (Schwob,

Haberly et al. 1984; Marín-Padilla M 1998; Soriano and Del Rio 2005). Un modelo animal utilizado para estudiar defectos en regiones del cerebro con patrones estratificados o laminados fue el ratón llamado *Reeler* el cual presentaba una evidente desorganización en la corteza cerebral y cerebelar. En dicho modelo, se demostró la carencia de una proteína a la que denominaron Reelina, y también, que tal proteína era producida por las células Cajal Retzius (D'Arcangelo, Miao et al. 1995; Ogawa, Miyata et al. 1995). Estos hallazgos mandaron la atención a la presencia de dichas células en la zona marginal y el papel que podrían jugar en la organización de la placa cortical.

1.3. Células Cajal Retzius (CR)

Hace más de un siglo Santiago Ramón y Cajal y Gustaf Retzius, cada uno por su cuenta, describieron unas células localizadas en la superficie de la corteza cerebral que presentaban una morfología caracterizada por tener una forma alargada con un axón horizontal y múltiples procesos radiales que se extienden hacia la superficie pial. En su honor a estas células se les llamó Cajal-Retzius (Marín-Padilla M 1998; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007). Inicialmente no se tenía idea de cuál era su función pero con la aparición de una línea mutante espontánea de ratones llamada Reeler por su fenotipo conductual característico por la carencia de Reelina en células CR fue que comenzó su estudio (Ogawa, Miyata et al. 1995; Alcantara, Ruiz et al. 1998; Soriano and Del Rio 2005; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007). Las células Cajal-Retzius (CR) ahora identificadas por su expresión de Reelina, una glicoproteína con características de proteína de matriz extracelular, son las primeras neuronas en generarse en la corteza en desarrollo, ocupando la zona marginal (ZM) o capa I. Las células CR se dispersan por la totalidad de la neocorteza en desarrollo y además parecen disminuir o desaparecer después del nacimiento (Rice and Curran 2001; Tissir and Goffinet 2003; Soriano and Del Rio 2005; Guillemot, Molnar et al. 2006; Chowdhury, Jimenez et al. 2010). Se ha demostrado que estas células no siguen el patrón *inside-out* pero sí lo controlan al expresar Reelina, en cuya ausencia se altera el desarrollo laminar (Tissir and Goffinet 2003; Soriano and Del Rio 2005; Guillemot, Molnar et al. 2006). En el ratón, su expresión comienza a ser evidente en el estadio E10.0 y perdura aunque a niveles bajos hasta después del nacimiento (D'Arcangelo, Miao et al. 1995; Ogawa, Miyata et al. 1995; Alcantara, Ruiz et al. 1998; Hevner, Shi et al. 2001). Por consenso, varios autores han planteado que para la identificación de las células CR éstas deben presentar características particulares, como expresar marcadores específicos como la Reelina, originarse en estadios específicos del desarrollo y localizarse en la zona marginal de la neocorteza (D'Arcangelo, Miao et al. 1995; Ogawa, Miyata et al. 1995; Grkovic and Anderson 1997; Meyer, Goffinet et al. 1999; Hevner, Shi et al. 2001; Hevner, Neogi et al. 2003)

1.3.1. Sitios de origen de las células CR

Las células CR se originan en sitios específicos del telencéfalo en una ventana de tiempo que inicia aproximadamente en el día 10.5 de gestación del ratón, para el día 11.5 prácticamente la totalidad de las CR han sido generadas y en el día E12.5 estas células están distribuidas en la totalidad de la neocorteza (Hevner, Neogi et al. 2003; Soriano and Del Rio 2005). Algunos de sus sitios de generación están localizados en los centros organizadores descritos anteriormente tales como el Hem Cortical en la parte medial del telencéfalo, ampliamente estudiado y descrito como la principal fuente de células CR (Meyer, Cabrera Socorro et al. 2004; Takiguchi-Hayashi, Sekiguchi et al. 2004; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007). Otros sitios de origen son el dominio palial septal/retrobulbar (Sep/RB, Septum) (Bielle, Griveau et al. 2005), una región en la pared medial rostral (RMTW por las siglas en inglés de *rostromedial telencephalic wall*) (Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008) y un pequeño dominio ventral en la pared telencefálica caudo-medial (vCMTW, por sus siglas en inglés caudomedial telencephalic wall) (Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010). También se ha descrito otro sitio localizado en el telencéfalo rostral en un dominio de la corteza rostro-medial (R-M) que se encuentra cercana al dominio palial del Septum (Fig.3) (Zimmer, Lee et al. 2010) así como el plexo coroideo (Imayoshi, Shimogori et al. 2008; Tissir, Ravi et al. 2009) y las eminencias ganglionares (Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008). Por otro lado, ha sido propuesto como sitio de origen una región del palio ventral lateral (VP) cerca del límite entre el palio y el subpalio (VP/PSB) (Bielle, Griveau et al. 2005), ya que las células originadas en dicho sitio presentan marcadores típicos de células CR. Sin embargo, estudios posteriores contradicen algunos de esos hallazgos (Ceci, Pedraza et al. 2012) por lo cual no se corrobora la identidad de las células originadas en el VP/PSB.

1.3.2. Migración de las células CR

Como se mencionó previamente se han propuesto varios sitios de origen de las CR a partir de los cuales las células migran para cubrir la totalidad de la neocorteza. La migración tangencial es el principal modo de migración usado por las células CR y se ha visto que ocurre en la zona marginal (capa I) (Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007). De esta manera las células CR se distribuyen por la corteza. Estudios en los que se ha usado

marcaje genético o fluorescente han establecido las rutas de migración de algunas poblaciones CR. Las células originadas desde el HC, el sitio mejor analizado, migran en dirección dorsal y desde la región caudal-dorsal hacia a corteza dorsal y dorsal caudal cubriendo la mayor parte del primordio de la corteza en el telencéfalo (Takiguchi-Hayashi, Sekiguchi et al. 2004; Yoshida, Assimacopoulos et al. 2006; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007; Ceci, Lopez-Mascaraque et al. 2010). Las CR generadas en el dominio CMTW migran en una ruta ventral y posteriormente lateral alrededor del polo caudal hacia el telencéfalo lateral hasta posicionarse en el primordio de la corteza piriforme (Fig.3) (Takiguchi-Hayashi, Sekiguchi et al. 2004; Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010). Las poblaciones CR derivadas de progenitores que expresan *Dbx1* derivadas del septum y RMTW migran en dirección rostro-dorsal hacia la corteza medial y ventralmente hacia la corteza piriforme (Bielle, Griveau et al. 2005; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008). Mientras que las células CR originadas en el VP migran hacia la corteza piriforme (Bielle, Griveau et al. 2005; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008; Ceci, Pedraza et al. 2012). Las células originadas en el dominio telencefálico rostro-medial probablemente migran en dirección dorsal caudal y lateral caudal para localizarse en la corteza rostral adyacente a su sitio de origen (Zimmer, Lee et al. 2010). Estos datos muestran que existen diversas poblaciones CR con respecto a sus orígenes sin embargo no es muy clara la contribución relativa de cada dominio ni la ruta exacta de cada una de dichas poblaciones. Por otro lado, se ha propuesto que las células originadas en la región del palio ventral lateral cerca del límite entre el palio y el subpalio (VP/PSB) generan células CR, y que éstas migran en dirección dorsal para posicionarse en la corteza lateral-dorsal (Bielle, Griveau et al. 2005). Sin embargo, existe información que contradice tales hallazgos, ya que no se ha logrado reproducir esa ruta de migración (Ceci, Pedraza et al. 2012)

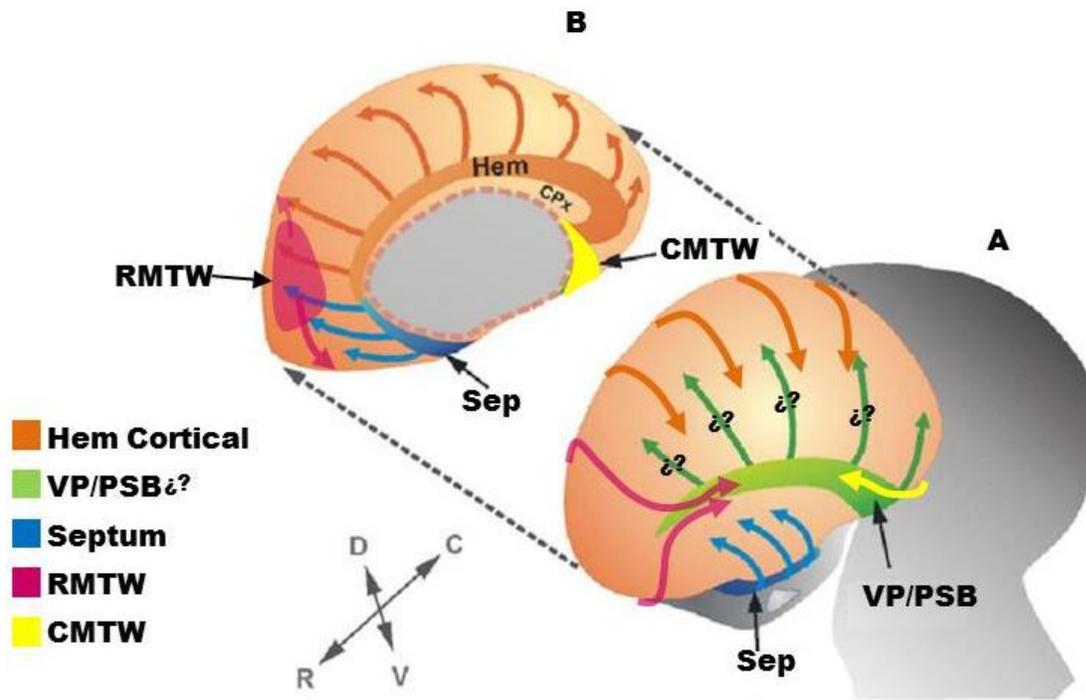


Figura 3. Esquema de los sitios de origen y rutas de migración propuestas para las células Cajal-Retzius. A, esquema de un telencéfalo embrionario en una vista lateral, (B) esquema del telencéfalo donde se ha separado una vesícula mostrando la cara medial de esta. En naranja el Hem cortical localizado en la parte medial del telencéfalo, las células CR generadas en esta zona siguen una ruta de migración (flechas naranjas) en dirección caudo medial a rostral lateral. En azul el septum de donde las células siguen una ruta dorsal y ventral hacia la corteza rostral lateral y piriforme. En amarillo la CMTW de donde las células rodean por la región ventral hacia la región olfativa (piriforme) y en rosa la RMTW donde las células migran en dirección ventral y rostral rodeando la vesícula para dirigirse a la corteza olfativa. En verde el VP/PSB de donde las células migrarían dorsalmente para cubrir la corteza lateral pero dicha migración está en duda ya que no se ha podido corroborar. (CPx; Plexo coroideo). Modificado de Miquelajáuregui et. al. 2008.

1.3.3. Marcadores genéticos de células CR

Diversos trabajos empleando manipulación de la expresión genética y marcadores celulares en ratones han mostrado evidencia de factores genéticos involucrados en la generación y migración de las células CR durante la corticogénesis, algunos de ellos con papeles importantes en la regionalización y laminación cortical.

En dichos trabajos se hizo una construcción en la que el gen reportero GFP junto a la IL-2R α se expresaban bajo el promotor del receptor mGluR2 (Watanabe, Inokawa et al. 1998). Después observaron que las células que expresaban GFP se encontraban ubicadas en la capa I de la corteza cerebral y tenían morfología de células CR (Ohishi, Neki et al. 1998; Watanabe, Inokawa et al. 1998). Esto fue realizado tanto en ratas y ratones adultos (Ohishi, Neki et al. 1998), así como en ratones recién nacidos (Soda, Nakashima et al. 2003) y representó una posibilidad de aislar células CR.

Posteriormente Yamazaki et. al. (2004) aislaron mediante FACS células que consideraron CR en estadios tempranos del desarrollo embrionario (E13.5) y postnatal (P2). Estas células expresaron el gen reportero, GFP, y se distribuían por la zona marginal de toda la corteza de embriones de ratón E13.5. Finalmente mediante microarreglos obtuvieron un perfil de expresión genético en las células aisladas y consideraron que altos niveles de expresión positiva-GFP y negativa-GABA eran características de células CR, a diferencias de las negativas-GFP y positivas-GABA consideradas no CR (Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004). En ese trabajo, comparando células CR con no CR, identificaron más de 3 mil genes de los cuales sólo alrededor de 150 en cada estadio presentaron niveles elevados de genes específicos del contexto CR (Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004). De acuerdo a la función determinada los genes fueron clasificados en ocho categorías: reguladores transcripcionales/proteínas nucleares, moléculas de señalización extracelular, receptores/canales/proteínas transmembranales, proteínas organelares/ tráfico, proteínas de citoesqueleto, moléculas de señalización intracelular, metabolismo y proteínas de función desconocida (Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004). Dentro de los genes identificados en E13.5 además de los marcadores de células CR conocidos como Reelina, Calretinina, *p73* y *p21*, también se expresaron los genes *Lhx5* y *Lhx1* de interés para nuestro grupo de trabajo. Ejemplos de genes importantes y sus funciones son los siguientes.

Marcadores generales de células CR

Para la identificación de células CR la expresión genética es fundamental. A la fecha, varios genes conocidos han sido aceptados y utilizados como marcadores generales de dichas células. Por ejemplo, independientemente del origen, todas las células deben expresar Reelina. Además de ésta, otros genes como el de la Calretinina, *Tbr1*, *Lhx1* y *Lhx5*, son expresados por las células CR.

Reelina es una proteína producida de manera específica por las células CR durante el desarrollo de la corteza cerebral de los mamíferos y fue descubierta, como se describió anteriormente, porque el ratón Reeler carecía de ella (D'Arcangelo, Miao et al. 1995; Ogawa, Miyata et al. 1995). Es una glicoproteína de gran tamaño que regula la migración de las células que alcanzan la placa cortical (PC) ya que éstas expresan a los receptores VLDLR and ApoER2 de los que Reelina es ligando (D'Arcangelo, Miao et al. 1995; D'Arcangelo and Curran 1998; Hevner, Shi et al. 2001). Esta glicoproteína es secretada al medio extracelular, donde actúa tanto en precursores como en neuronas diferenciadas, dirigiendo la migración radial de las neuronas y el correcto posicionamiento celular en regiones organizadas en capas como en la corteza y el hipocampo (Marín-Padilla M 1998; Meyer, Goffinet et al. 1999; Derer, Derer et al. 2001; Tissir, Lambert De Rouvroit et al. 2003). Reelina es expresada en todos los sitios de origen de células CR y en todo el palio en el telencéfalo por lo cual es considerada como el principal marcador de dichas células (Meyer, Goffinet et al. 1999).

Tbr1 (T-box brain gene 1) es un factor de transcripción expresado por todas las células del palio en desarrollo, incluyendo las CR, y por lo tanto se considera un marcador palial (Hevner, Shi et al. 2001; Hevner, Neogi et al. 2003). En E10.5 pocas CR ubicadas en la preplaca expresan Reelina pero todas expresan *Tbr1*; en E11.5 y E12.5 el número de células CR que expresan Reelina aumenta manteniendo la expresión de *Tbr1* (Hevner, Neogi et al. 2003).

Calretinina es una proteína de unión a calcio que también se ha involucrado en la excitabilidad neuronal (Fonseca, del Rio et al. 1995; Fonseca and Soriano 1995). Esta

proteína se expresa en la mayoría de las CR durante el desarrollo de la neocorteza desde E10.5 hasta E16.5, e incluso persiste en algunas células hasta P5 (del Rio, Martinez et al. 1995; Fonseca and Soriano 1995; Del Rio, Heimrich et al. 1997; Alcantara, Ruiz et al. 1998; Hevner, Shi et al. 2001). Por ello, junto con Reelina, Calretinina se considera un marcador de células CR originadas en todos los sitios excepto el Septum (Bielle, Griveau et al. 2005).

Dos miembros de la familia Lim homeodominio, ***Lhx5* y *Lhx1***, se expresan en células CR (Zhao, Sheng et al. 1999; Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004; Abellan, Vernier et al. 2010; Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010). *Lhx1* se expresa en todos los sitios de origen menos en el HC. Por otro lado, *Lhx5* se expresa en todos los sitios de origen y su ablación genera importantes malformaciones en el hipocampo adulto y durante el desarrollo resulta en anomalías del telencéfalo en su región medial (HC) y caudal. Además, en mutantes *Lhx5* se observó una marcada reducción en la expresión de Reelina en los tres principales sitios de generación de las CR y del telencéfalo dorsal, lo que sugiere anomalías en su migración (Zhao, Sheng et al. 1999; Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010). Estos datos sugieren que el gen *Lhx5* está involucrado en la diferenciación de las células CR y que podría regular ciertos mecanismos de migración de una o varias subpoblaciones de células CR (Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010).

Marcadores específicos de células CR

Entre las células CR existe una importante diversidad genética. Esta diversidad nos permite identificar algunos genes que son expresados de manera específica por ciertos grupos o subgrupos celulares CR.

p73 es un factor de transcripción perteneciente a la familia de supresores tumorales relacionados con la proteína p53 (Meyer, Perez-Garcia et al. 2002; Meyer 2010). Su expresión está asociada a las células CR provenientes del HC y del Septum (Takiguchi-Hayashi, Sekiguchi et al. 2004) por lo que es utilizado como marcador de dichos sitios.

Wnt3a es una molécula extracelular de la familia de activadores de la vía de señalización Wingless (Grove, Tole et al. 1998). Este gen regula la expansión de la corteza caudo-

medial y es crucial para el desarrollo del hipocampo (Lee, Tole et al. 2000), además de expresarse selectivamente en el HC y en las células producidas en esa región (Yoshida, Assimacopoulos et al. 2006).

p21 es una proteína que induce la salida del ciclo celular de los precursores neurales (Siegenthaler and Miller 2005). Esta proteína se localiza en CR de sitios como el HC, Septum, pero no en el VP/PSB (Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004).

Foxg1 codifica para un factor de transcripción con funciones diversas que generan fenotipos característicos con particular importancia en el desarrollo de la corteza y de los ganglios basales (Hanashima, Shen et al. 2002). Su delección produce la expansión de regiones mediales y caudales y una sobreproducción de CR de dichos sitios (HC y PSB). Estos datos sugieren que *Foxg1* es un represor de la proliferación celular y que en su ausencia se induce una sobreproducción de células por alargamiento del ciclo celular (Hanashima, Li et al. 2004; Hanashima, Fernandes et al. 2007).

Pax6, es un gen importante en y la delimitación entre el palio dorsal y ventral, ya que su ausencia genera una expansión de regiones subpaliales y la pérdida de la región limítrofe entre palio y subpalio. Por ello se observa una disminución de células CR de regiones laterales y marcados de tales células (Stoykova, Hatano et al. 2003).

Ebf2 es un factor de transcripción que se expresa en regiones del VP/PSB y CMTW, por lo cual puede ser marcador de células originadas en tales sitios (Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004; Hanashima, Fernandes et al. 2007; Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010).

Dbx1 es un factor de transcripción expresado en progenitores localizados en el palio ventral en el límite entre el palio y el subpalio (VP/PSB), en el Septum, en el área preoptica pero no en las eminencias ganglionares (Pierani, Moran-Rivard et al. 2001; Bielle, Griveau et al. 2005). También existen evidencias de que las células CR de dichas poblaciones son generadas por los progenitores *Dbx1* y que tales células migran para cubrir la corteza dorsal y lateral (Bielle, Griveau et al. 2005).

Emx1 que se expresa en las células de todo el palio (medial, dorsal y lateral) incluyendo bulbos olfativos y no es detectado en el palio ventral en estados tempranos del desarrollo. (Simeone, Gulisano et al. 1992; Mallamaci, Iannone et al. 1998). *Emx1* se ha asociado a células CR de regiones corticales rostrales (Gorski, Talley et al. 2002; Hevner, Daza et al. 2003).

Er81 es un factor de transcripción de la familia ETS el cual junto con otros dos de sus miembros (*Pea3* y *Erm*) son efectores de la vía de señalización *Fgf8* relacionada con el desarrollo del telencéfalo rostral (Zimmer, Lee et al. 2010). La expresión de *Er81* ha sido observada en el palio rostro-medial (pRM), en una región cercana al Septum palial y en la corteza rostral dorsal, donde se localiza un importante centro organizador que se caracteriza por la expresión de *Fgf8* que de hecho es necesario para la generación de células CR. Por lo tanto, *Er81* es un gen expresado por las células CR originadas en la región rostral medial (pRM) (Zimmer, Lee et al. 2010).

Lo anterior ha llevado a la hipótesis de que las células CR provenientes de los diferentes lugares de origen poseen perfiles genéticos y rutas migratorias particulares que podrían conferir diversas propiedades funcionales a la región cortical donde se establecen. Esto subraya la importancia del conocimiento del comportamiento de las células CR ya que éstas están relacionadas con eventos fundamentales como el desarrollo de la corteza (Ogawa, Miyata et al. 1995; Alcantara, Ruiz et al. 1998; Soriano and Del Rio 2005; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007) y la generación de circuitos eléctricos después del nacimiento (Del Rio, Heimrich et al. 1997; Marín-Padilla M 1998). También se ha demostrado en modelos animales que la carencia de células CR o Reelina producen desorganización en el patrón laminar de la corteza (D'Arcangelo, Miao et al. 1995; Ogawa, Miyata et al. 1995). Por otro lado, concentraciones disminuidas o ectópicas de Reelina han sido identificadas en individuos con trastornos neurológicos como Lisencefalia, Parkinson y Alzheimer. Por ello, resulta de particular importancia el estudio de las células CR ya que el conocimiento específico de éstas podría responder algunas preguntas e incluso establecer las bases para la prevención de patologías o el desarrollo de tratamientos efectivos para de ciertas enfermedades.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células Cajal Retzius fueron descritas hace más de un siglo por Santiago Ramón y Cajal en 1891, así como, por Gustaf Retzius en 1893. Sin embargo, su función comenzó a ser evidente hasta que se demostró que expresan Reelina, una proteína de membrana que controla la formación de la estructura laminada de la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario. Si bien existe información sobre las células CR, ésta no parece ser suficiente para entender a este grupo celular compuesto por diversas subpoblaciones de orígenes y rutas de migración diversas. Para la identificación de las células CR han sido aceptados como parámetros básicos la expresión de Reelina y su ubicación en la zona marginal de la neocorteza. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que en los bordes de la neocorteza existen células que expresan Reelina y que no migran en dirección dorsal para colocarse en la misma. Además, la existencia en el telencéfalo en desarrollo de grupos celulares diversos que comparten marcadores genéticos con las CR origina dificultades para el estudio de sus linajes.

Por lo anterior, el propósito de este estudio es identificar marcadores moleculares para subpoblaciones de células CR, principalmente fuera del HC, que nos permitan obtener información sobre su origen, diferenciación y rutas de migración.

2.1. HIPÓTESIS

Existen subpoblaciones de células CR que no han sido previamente identificadas, que expresan marcadores moleculares distintivos y que siguen rutas de migración particulares contribuyendo así a la diversidad de este tipo celular en la neocorteza.

2.2. OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar subpoblaciones de células CR, sus sitios de origen y patrones migratorios para establecer una relación de su identidad con marcadores moleculares específicos y genes reguladores de la diferenciación cortical.

Objetivos específicos

Identificar marcadores moleculares específicos de subpoblaciones de células CR desde su origen hasta su destino en la corteza embrionaria en desarrollo.

Determinar las rutas migratorias que siguen las subpoblaciones de células CR durante la etapa de generación de esta población celular en el telencéfalo en desarrollo.

Analizar el papel del factor de transcripción *Lhx5* en la diferenciación y migración de las subpoblaciones de células CR identificadas en este trabajo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Modelo animal de investigación

Se emplearon las cepas de ratón silvestre CD-1 y cepa transgénica *Lhx5* nula para dicho gen y bajo un fondo genético CD-1 (Zhao, Sheng et al. 1999). Los experimentos fueron realizados de acuerdo con lo establecido por el comité de bioética en la investigación del Instituto de Neurobiología, UNAM (Protocolo #001), así como a las especificaciones técnicas de la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Para la obtención de embriones de diferentes estadios el día de la detección del tapón vaginal fue considerado como el día 0.5 (E 0.5) de la gestación.

3.2. Preparación de embriones y tejidos

Para la obtención de embriones de ratón las hembras gestantes en estadios de E10.0 a E13.5 fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina (80 mg/Kg) y Xilacina (30 mg/Kg). Cuando estuvieron profundamente dormidas fueron sacrificadas por dislocación cervical y los embriones fueron disectados. Los embriones fueron lavados y colocados en PBS frío (Anexo 1) y posteriormente fijados en paraformaldehído (PFA 3.5 % en PBS) a 4 °C por 16 horas.

Una vez fijados los embriones (cultivados o no) fueron lavados con PBS y sus cerebros fueron disecados. Los cerebros fueron incubados en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% en PBS durante 16 horas a 4°C y después se incluyeron en Tissue-Tek O.C.T. (VWR, 25608-930). Posteriormente se hicieron cortes coronales de 15 a 20 µm de grosor en Criostato (Leica CM3050 S) y se colectaron en laminillas Superfrost Plus (VWR, 8311703), se dejaron secar durante 2 hrs y se guardaron a -20°C hasta su uso.

3.3. Ribosondas

Para la búsqueda de marcadores genéticos se seleccionaron 10 genes (Tabla 1) que se expresan preferentemente en células CR durante el desarrollo embrionario del ratón de acuerdo con Yamazaki et. al. 2004.

Tabla 1. Genes seleccionados para este estudio.

#	Símbolo	Nombre	IMAGE ID	Oligonucleótido Secuenciación	Linearización (enzima)	Síntesis de Sonda
1	Hdac11	Histone deacetylase 11	615767	M13 forward M13 reverse	<i>EcoR I</i>	T7
2	Sulf2	Sulfatase 2	438672	M13 forward M13 reverse	<i>Hind III</i>	T7
3	Rspo2	R-spondin 2 homolog	-	M13 forward M13 reverse	<i>Kpn I</i>	SP6
4	Scn3b	Sodium channel, voltage-gated, type III, beta	6390374	M13 forward M13 reverse	<i>Kpn I</i>	T7
5	C630004H02Rik	RIKEN cDNA C630004H02 gene	5720269	T3 T7	<i>Sal I</i>	T3
6	6330527O06Rik	RIKEN cDNA 6330527O06 gene	6491865	M13 forward M13 reverse	<i>Hind III</i>	SP6
7	Mab2111	Mab-21-like 1	6581674	M13 forward M13 reverse	<i>Kpn I</i>	T7
8	Stmn4	Stathmin-like 4	6818440	T3 T7	<i>Sal I</i>	T3
9	Acaa1b	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1B	5098163	M13 forward M13 reverse	<i>Kpn I</i>	T7
10	Tcf4	Transcription factor 4	6516989	M13 forward M13 reverse	<i>Kpn I</i>	T7

Posteriormente se adquirieron plásmidos con segmentos de cDNA de dichos genes del Repositorio IMAGE (<http://www.imageconsortium.org/> Número de ID en Tabla 1) y mediante secuenciación Sanger se corroboró la identidad empleando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) NCBI, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Por otro lado, para el gen *Dbx1* se llevó a cabo la clonación de un segmento de 800 pb (Primers Anexo 2). Por otro lado, para el gen *Er81* se utilizó un plásmido conteniendo un fragmento de cDNA de 900 pb obtenido previamente en el laboratorio.

El aislamiento del DNA plasmídico se llevó a cabo mediante el kit QIAfilter Plasmid Maxi Kit (QIAGEN). Brevemente, las clonas fueron sembradas en placa de medio LB (Anexo 1). Se seleccionó una colonia que fue inoculada en 5 ml de medio LB líquido, se tomó 1 ml de dicho cultivo y se inoculó a 100 ml de medio LB para la extracción por el método descrito.

Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 18 000 xg durante 10 minutos y la extracción de DNA se realizó según las indicaciones del fabricante. El DNA se analizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % en TBE (Anexo 1). Las muestras fueron mezcladas 1:1 con regulador de carga (Azul de bromofenol 0.01%, Glicerol 5% en TBE) y la electroforesis se llevó a cabo en amortiguador TBE en cámara para electroforesis horizontal Mini-Sub Cell GT (BIO-RAD) a 90 voltios. El DNA se tiñó con bromuro de etidio al 0.01% o con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, 41003) y se observó en un digitalizador de imágenes MiniBIS Pro (Bio-imaging Systems). La síntesis de ribosondas marcadas con digoxigenina fue llevada a cabo mediante transcripción *in vitro* con el DNA plasmídico obtenido de las clonas y con las enzimas indicadas en la tabla 1. Brevemente, se mezcló 1 µg de DNA linearizado y purificado, 2 µl de buffer de transcripción 10X (Roche, 14534500), 1 µl de Inhibidor de RNAsas (40 U, Roche, 13084600), 2 µl de DIG RNA Labeling Mix 10 X (Roche, 12233020), 1 µl de enzima RNA polimerasa SP6, T3 o T7 (Roche, 11996421, 13180821, 13828720) y se llevó a un volumen final de 20 µl con agua libre de RNAsas, la mezcla se incubó a 37 °C durante 2h. Enseguida, las ribosondas fueron purificadas de la siguiente manera: la reacción de síntesis se mezcló con 100 µl de agua DEPC, 10 µl de Cloruro de Litio 4M y 300 µl de etanol absoluto frío seguido de incubación a -70°C durante 1h. La mezcla se centrifugó a 40 000 xg durante 25 min. Posteriormente se lavó con 1 ml de etanol al 70% y fue

resuspendido en 100 µl de agua DEPC. La integridad de la sonda se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

3.4. Hibridación *in situ* (ISH)

La hibridación *in situ* fue realizada en cerebros completos de embriones de ratón en edad gestacional de 10.0 a 12.5 días (E10.0-E12.5) y el protocolo fue llevado a cabo con base en el descrito por Varela-Echavarría (1996), de la siguiente manera:

A temperatura ambiente y con agitación suave los embriones se lavaron 2 veces con PBT (0.1% de Tween 20 en PBS) por 10 min, se deshidrataron con solución de metanol en PBT en serie (25%, 50%, 75%) durante 5 minutos cada uno, después se lavaron dos veces con metanol al 100% durante 10 min. En seguida se hidrataron con solución de metanol en PBT en serie (75%, 50%, 25%) por 10 minutos cada uno y se lavaron dos veces por 10 minutos con PBT. Posteriormente se clarificaron con H₂O₂ al 6% en PBT durante media hora, después se trataron con proteinasa K (10 µg/ml en PBT) por 20 minutos a temperatura ambiente y sin agitación. Esta digestión se detuvo reemplazando la solución con PBT conteniendo 3.5% de PFA, glutaraldehído 0.2% y 0.1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, P9416) durante 20 minutos y sin agitación. Al final se hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBT. Posteriormente los embriones se incubaron en buffer de hibridación (Anexo 1) durante una hora a 70°C. Posteriormente la solución se reemplazó por buffer de hibridación precalentado conteniendo la sonda (1 µg/ml) y se incubó durante 3 días a 70°C.

Después se realizaron lavados post-hibridación a 70°C con las soluciones I (Formamida 50%, SSC 4X pH 4.5, SDS 1% en agua desionizada), II (NaCl 0.5 M, Tris-HCl 10 mM pH 7.5 , Tween-20 0.1 % en agua desionizada) y III (Formamida 50 %, SSC 2X pH 4.5 en agua desionizada) de la siguiente manera: tres lavados con solución I durante 20 minutos cada uno, un lavado de 20 minutos con una mezcla 1:1 de soluciones I y II, tres lavados con solución II por 20 minutos cada uno y por último tres lavados con solución III de 20 minutos cada uno.

Finalmente, para la inmunolocalización de sondas, los embriones se lavaron a temperatura ambiente y con agitación suave tres veces durante 10 minutos con MABT (Anexo 1). Posteriormente se incubaron en solución MABT con suero de cabra al 15% durante una

hora y después se reemplazó la mezcla por la solución, pero conteniendo fragmentos Fab anti digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (1:3000) (Roche, 11093274910) y se incubó por 16 horas a 4°C. Posteriormente se realizaron seis lavados con MABT durante una hora cada uno, seguidos por dos lavados de 10 minutos cada uno con NTMT (Anexo 1). Por último, la sonda se reveló con BM purple solution (Roche, 11442074001) suplementado con Tween-20 al 0.1 % hasta el desarrollo del color. Al obtener la señal adecuada, se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se fijaron en PFA 3.5% en PBS toda la noche para preservan la tinción.

3.5. Inyección exo-útero y cultivo embrionario

Para la inyección exo-útero las hembras de ratón gestantes E10.0-E12.5 fueron anestesiadas con Ketamina-Xilacina, cuando estuvieron profundamente dormidas se realizó la extracción de embriones de acuerdo con De Carlos and Lopez-Mascaraque (1996). Brevemente, los embriones de uno en uno sin separarlos de la placenta y se colocaron en solución de Hanks (HBSS; Gibco) fueron liberados de la pared uterina y la membrana amniocoriónica teniendo cuidado de no dañar los vasos sanguíneos del cordón umbilical ni desprender la placenta.

Posteriormente, con una pipeta de cristal y un inyector de pulsos de aire, se inyectó el marcador fluorescente 5-Carboxifluoresceína diacetato succimidil ester (CFDA-SE, Invitrogen V12883) en la zona ventricular en diversas regiones de la vesícula telencefálica derecha.

En seguida, los embriones inyectados fueron cultivados en viales (3 embriones por vial) con 4 ml de suero fetal bovino (Gibco, 16000044) o suero de rata, previamente inactivado, oxigenado y precalentado, en ambos casos suplementado con glucosa (2 mg/mL) y 1 % Ampicilina-Estrepmicina (2 mg/mL, Gibco, 15070-063). Los embriones se cultivaron en un dispositivo giratorio desarrollado en nuestro laboratorio acoplado a un flujo de gases constante (95% O₂, 5% CO₂) y dentro de una incubadora a 35°C durante 24 hrs (Takahashi, Nomura et al. 2008). Al final de la incubación los embriones se fijaron en PFA 3.5% durante 16 horas a 4°C.

3.6. Inmunohistoquímica (IHQ) o Inmunotinción

Los cortes de criostato se lavaron tres veces con PBS durante cinco minutos y se bloquearon con una solución de suero de cabra al 5% (Gibco 16210072) en PBS durante 30 minutos. Enseguida, se incubaron con los anticuerpos primarios: anti-Reelina 1:3000 (Millipore, MAB5364), anti-Tbr1 1:1000 (ABCAM, AB31940) o anti-Calbindina 1:1000 (Chemicon, AB1778), en una solución de suero de cabra al 5% y Tritón X100 al 0.1% en PBS durante 16 horas a 4 °C. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos y se realizó un segundo bloqueo. Después fueron incubadas con anticuerpos secundarios: dilución 1:1000 Anti-ratón Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 115-166-003), Anti-ratón Cy5 (Jackson ImmunoResearch, 115-175-146) o Anti-conejo Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 111-166-003) en una solución de suero de cabra al 5% y 0.1% de Tritón X100 en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes fueron lavados con PBS y se les colocó medio de montaje Mowiol [Mowiol 4-88 9% (Calbiochem, 475904), Glicerol 25%, 100 mM Tris pH 8.5].

3.7. Obtención y análisis de imágenes

Las imágenes de cerebros completos en campo claro, así como con fluorescencia fueron obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse E-600. Las imágenes de las IHQ en cortes coronales fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal Carl Zeiss LSM510 META obteniendo secciones confocales de 1 μ m). Las imágenes de ISH se obtuvieron con un microscopio Carl Zeiss STEMI 2000-C usando una cámara Optronics. Los análisis de co-localización y el recuento celular se realizaron semiautomáticamente con el software de ImageJ (<https://imagej.net>) mediante el recuento de células individuales (que expresan CFDA y/o marcador molecular) ubicadas en la zona marginal de los cortes coronales de cerebro.

4. RESULTADOS

4.1. Búsqueda de candidatos para marcadores moleculares de células CR mediante hibridación *in situ*

Para la determinación de marcadores genéticos de células Cajal-Retzius (CR) se llevó a cabo una selección de genes que presentan altos niveles de expresión en dichas células. Los genes seleccionados fueron *Rspo2*, *Scn3b*, *Stmn4*, *Mab2111*, *Sulf2*, *Hdac11*, *Tcf4*, *Acaa1b*, *C630004H02Ri* y *6330527O06Rik* (Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004). También se incluyó al gen *Er81* identificado recientemente como marcador de una población de células CR originadas en el telencéfalo rostral-medial (Zimmer, Lee et al. 2010) (Tabla 1).

A partir de cDNA de cada gen fueron sintetizadas ribosondas y se analizó mediante hibridación *In situ* su expresión en vesículas telencefálicas, así como en cerebros embrionarios completos. Los estadios embrionarios analizados fueron de E10.5 a E13.5 ya que éstos representan el período en el que las células CR se generan y migran hacia la corteza cerebral. Específicamente nos interesaba identificar la expresión de los genes en los posibles sitios de origen de las células CR que son el Hem cortical, Septum, VP/PSB y zona rostral, ubicados entre la cara medial y la cara lateral de las vesículas telencefálicas, así como su expresión en la zona dorsal del telencéfalo (primordio de la corteza cerebral), lo que podría indicar una posible migración.

El análisis mediante hibridación *in situ* mostró que el gen *Scn3b* se expresa en el VP/PSB en los estadios E11.5 y 12.5, en el Hem cortical en E13.5 y levemente en el telencéfalo dorso lateral en E11.5 y E12.5, mientras que en el estadio E10.5 no se observó expresión (Fig.4). Para el gen *Stmn4* se observó expresión en el VP/PSB en los estadios E10.5 a 13.5, en el Hem cortical en E13.5 y en el telencéfalo dorso lateral en E11.5 a E13.5 (Fig.4). La expresión del gen *Mab2111* fue observada en el VP/PSB en los estadios E10.5 a 13.5 y en el Septum en E11.5 y E12.5 y no se observa expresión en el telencéfalo dorsal (Fig.4). En el caso del gen *Rspo2* se observó expresión únicamente en el Hem cortical en E10.5 a 13.5 (Fig.4). Para *Sulf2* se observó expresión en el Hem cortical en los estadios E11.5 a 13.5 y además en el septum en E12.5 y 13.5 (Fig.5) y para el gen *6330Rik* se observó poca expresión en el primordio de la corteza medial caudal en E12.5 y E13.5 (Fig.5).

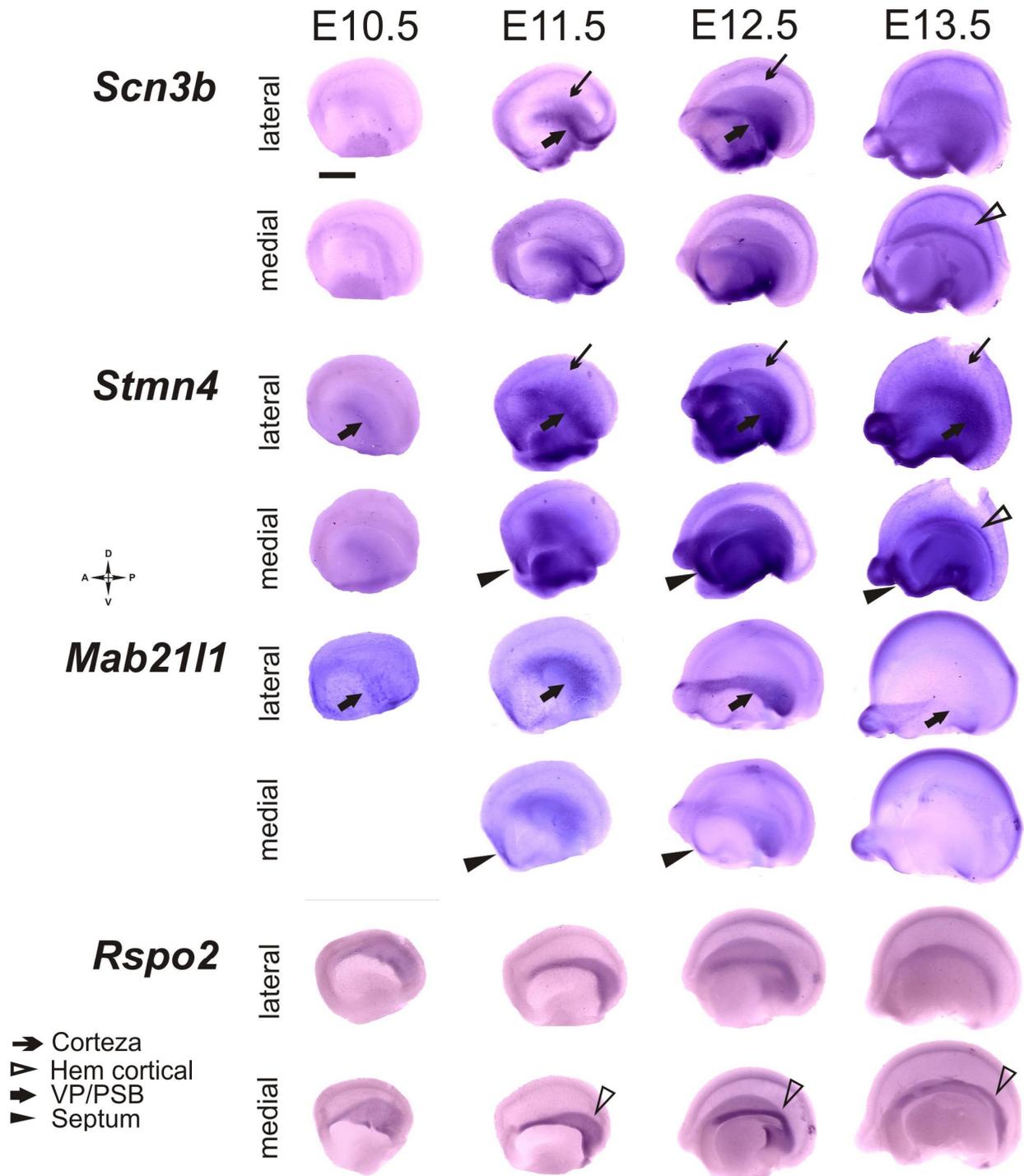


Figura 4. Hibridación *in situ* para los genes *Scn3b*, *Stmn4*, *Mab21l1* y *Rspo2*. La ISH se llevó a cabo en vesículas telencefálicas de ratón silvestre en los estadios E10.5-E13.5, los resultados para cada gen se muestran en tanto en la cara lateral como en la cara medial. Algunas vesículas presentaron una variable tonalidad lila debido a la exposición al reactivo para revelar, sin embargo, la marca de la expresión se aprecia en una coloración morada intensa. Barra de calibración 200 μ m.

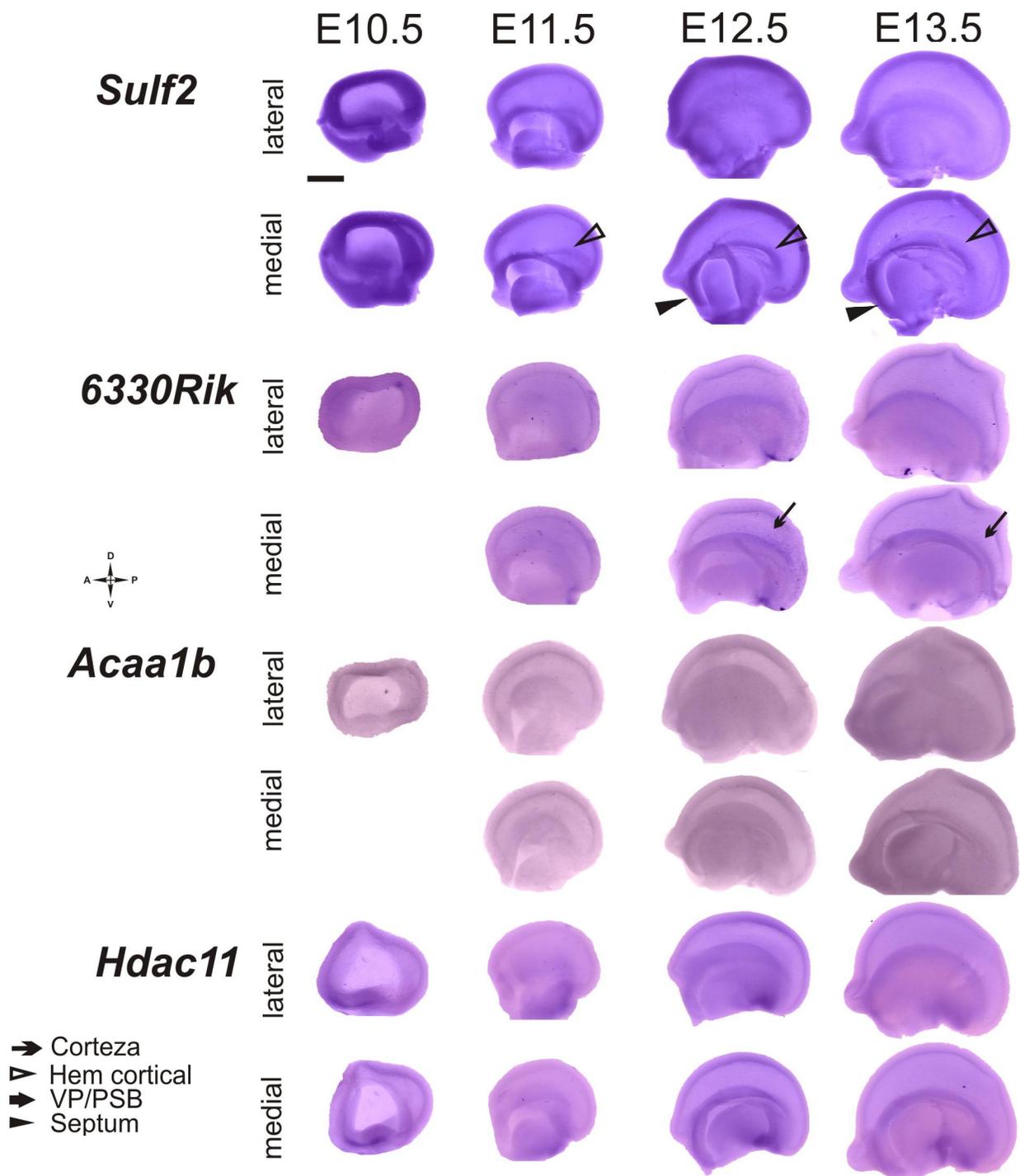


Figura 5. Hibridación *in situ* para los genes *Sulf2*, *6330Rik*, *Acaa1b* y *Hdac11*. La ISH se llevó a cabo en vesículas telencefálicas de ratón silvestre en los estadios E10.5-E13.5, los resultados para cada gen se muestran tanto en la cara lateral como en la cara medial. Barra de calibración 200 μ m.

Por otra parte, para los genes *Acaa1b* (Fig.5), *Hdac11* (Fig.5), *Tcf4* (Fig.6), y *C6300* (Fig.6) no se observó expresión en los sitios de origen de células CR ni en el telencéfalo dorsal. Finalmente, la expresión del gen *Er81*, la cual coincide con lo publicado por Zimmer, Lee et al. 2010, se observó en E10.5 en el VP/PSB y en la región rostral y rostral-dorsal del telencéfalo. En E11.5 se observó una alta expresión tanto en el VP/PSB y Septum, como en la región rostral y rostral-dorsal del telencéfalo, además de un pequeño dominio en la parte anterior del Hem cortical. En E12.5 se observó expresión en los mismos sitios descritos, aunque la expresión disminuyó drásticamente. Finalmente, en E13.5 la expresión muy disminuida fue observada en el VP/PSB y Septum, y prácticamente ausente en el telencéfalo dorsal (Fig.6).

Considerando los resultados anteriores agrupados en la tabla 2 los genes *Er81*, *Scn3b* y *Stmn4* presentaron los dos criterios de inclusión como candidatos para marcadores de células CR: expresión en sitios de origen de este tipo de células y en el telencéfalo dorsal. La expresión del gen *6330Rik* únicamente se observó en el primordio de la corteza, pero por su ubicación dorsal-medial, también podría ser considerado. Dichos genes podrían ser buenos candidatos para marcadores moleculares las subpoblaciones de células CR, particularmente *Stmn4* y *Scn3b* para alguna subpoblación originada en la región caudal del VP/PSB o *6330Rik* para subpoblaciones tempranas del Hem cortical.

4.2. Acción del gen *Lhx5* sobre las subpoblaciones identificadas con los marcadores moleculares

Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que el factor de transcripción homeodominio *Lhx5* juega un papel importante en la diferenciación y migración de subpoblaciones de células CR principalmente las de origen medial y caudal (Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010). Con el objetivo de determinar si el gen *Lhx5* tiene alguna acción sobre la diferenciación o migración de las subpoblaciones de células CR analizadas, llevamos a cabo una serie de hibridaciones *in situ*. Para la ISH fueron sintetizadas las ribosondas de los genes *Scn3b*, *Stmn4*, *Mab2111*, *Rspo2* y *Er81*, y las hibridaciones se realizaron en vesículas telencefálicas de embriones de ratón homocigotos mutantes para *Lhx5* (*Lhx5*^{-/-}) en los estadios E11.5 y E12.5.

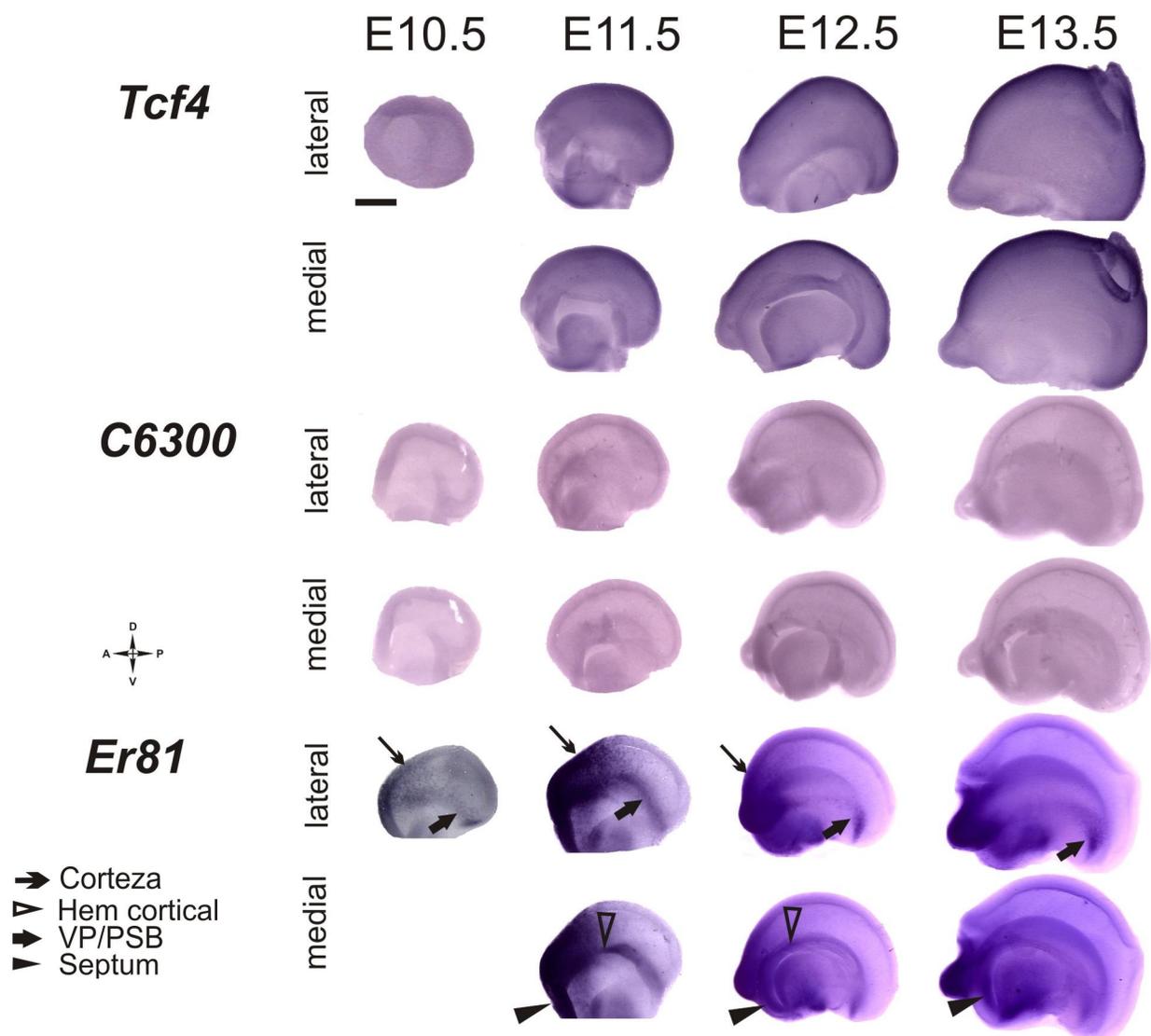


Figura 6. Hibridación *in situ* para los genes *Tcf4*, *C6300* y *Er81*. La ISH se llevó a cabo en vesículas telencefálicas de ratón silvestre en los estadios E10.5-E13.5, los resultados para cada gen se muestran en tanto en la cara lateral como en la cara medial. Barra de calibración 200 μ m.

Tabla 2. Expresión de genes candidatos a marcadores moleculares de células CR. La expresión se analizó en sitios de origen de células CR y corteza cerebral, así como en embriones mutantes para el gen *Lhx5*.

		Región del telencéfalo					
	Gen	ROSTRAL MEDIAL	HEM CORTICAL	VP/PSB	SEPTUM	CORTEZA	DEFECTO <i>Lhx5</i> -/-
1	Scn3b	-	✓ E13.5	✓ E12.5-E12.5	✓ E11.5-E12.5	✓ E11.5-E12.5	✓
2	Stmn4	-	✓ E13.5	✓ E10.5-E13.5	✓ E11.5-E13.5	✓ E11.5-E13.5	✓
3	Mab21l1	-	-	✓ E10.5-E13.5	✓ E11.5-E12.5	-	✓
4	Rspo2	-	✓ E10.5-E13.5	-	-	-	✓
5	Sulf2	-	✓ E11.5-E13.5	-	✓ E12.5-E13.5	-	nd
6	6330527O06Rik	-	-	-	-	✓ med-cau E12.5-E13.5	-
7	C630004H02Rik	-	-	-	-	-	nd
8	Acaa1b	-	-	-	-	-	nd
9	Hdac11	-	?	?	?	?	nd
10	Tcf4	-	?	?	?	?	nd
11	Er81	✓ E11.5-E13.5	✓ E11.5-E12.5	✓ E11.5-E13.5	✓ E11.5-E12.5	✓ E11.5-E12.5	✓

✓ Expresión
 ? Posible expresión inespecífica
 - No expresión
 Nd No determinado

Las vesículas telencefálicas de embriones *Lhx5*^{-/-} mostraron que la expresión de *Scn3b* en E11.5 se mantiene en el VP/PSB, pero se concentró en dicho sitio (Fig.7) y no se dispersa hacia el primordio de la corteza como se observó en el ratón silvestre (WT) (Fig.4). Además, en la parte más caudal de la cara lateral de la vesícula se observó un pequeño dominio que forma una línea en dirección hacia la región dorsal. En E12.5, el VP/PSB siguió manteniendo la expresión y en la parte caudal el dominio lineal se aprecia más evidente. La expresión en la zona dorsal se observó disminuida y en la cara medial del telencéfalo no se apreciaron cambios.

La expresión del gen *Stmn4* (Fig.7) en E11.5 se mantuvo en el VP/PSB, pero parece perder la continuidad del dominio longitudinal de anterior a posterior que se observó en el WT. Además, la expresión en la parte caudal se divide en dos poblaciones, una superior y otra inferior y a partir de la población superior se aprecian dos dominios que forman dos líneas hacia la parte dorsal del telencéfalo; ambos dominios son continuos a través de la región dorsal y hasta la cara medial de la vesícula (Fig.7 *Stmn4*, asterisco). En E12.5, el VP/PSB se mantuvo la expresión, pero dispersa hacia la región caudal-dorsal de la vesícula y no se concentra en dicho sitio como se observó en el ratón WT; la expresión incluso es continua alrededor de la vesícula y hasta la cara medial y caudal de la vesícula. La expresión en la zona dorsal se observó disminuida, así como la expresión en el Septum, principalmente en E11.5.

Para el gen *Mab21l1* la expresión en E11.5 se mantuvo en el VP/PSB, pero ésta parece estar aumentada y dispersa hacia la parte caudal de la cara lateral de la vesícula; además, un dominio se separó del resto en dirección dorsal, ambos dominios parecieran dar la vuelta hacia la cara medial de la vesícula (Fig.7, asterisco). En E12.5 la expresión se mantuvo en el VP/PSB pero se dispersó desde la parte más anterior, incluso alrededor del primordio de los bulbos olfativos, hasta la parte más caudal de la vesícula y el cúmulo caudal que se desprendió en dirección dorsal se observó disminuido (Fig.7, asterisco).

Por otra parte, para el gen *Rspo2* la expresión se observó en la cara medial de la vesícula telencefálica, en la región del Hem cortical. Sin embargo, ésta presentó una marcada disminución en la región caudal (Fig.7, asterisco).

Finalmente, para el gen *6330 Rik*, la expresión no presenta diferencias entre el WT y el mutante (datos no mostrados).

El análisis de la expresión de los genes *Scn3b*, *Stmn4* y *Mab2111* en los mutantes *Lhx5* (Fig.7) reveló que tienen en común defectos en la parte caudal del telencéfalo y todos los genes parecen tener expresión ectópica. Por otro lado, el análisis de la expresión de *Er81* reveló que en E10.5 no parece haber diferencias entre el ratón silvestre y el mutante (Fig. 8, lateral). Sin embargo, en E11.5, la expresión en el primordio de la corteza se extendió caudalmente abarcando una mayor área de la corteza en sus regiones dorsal y lateral e incluso hasta la cara medial (Fig.8, asterisco). La expresión en Septum y Hem cortical no presentó cambios significativos. En E12.5, la expresión en el VP/PSB pareció perder la continuidad anterior-posterior, separándose en dos poblaciones, la más caudal parece incluso dar vuelta hacia la cara medial de la vesícula. En el Hem cortical la expresión parece reducirse y sólo se observó la parte anterior. Estos resultados sugieren que la población *Er81*, de origen rostral-medial (Zimmer, Lee et al. 2010) se afecta por la mutación del gen *Lhx5*.

Los resultados descritos anteriormente y agrupados en la tabla 2 indican que *Scn3b* y *Stmn4* podrían funcionar como marcadores de subpoblacionales de CR ya que ambos marcan las células ectópicas de la parte caudal del telencéfalo. *Scn3b* marca principalmente al grupo pequeño más dorsal, mientras que *Stmn4* marca al grupo grande, lo que nos ayudaría a obtener información más específica de cada grupo celular. Los genes *6330 Rik* y *Mab2111*, al no presentar expresión en la corteza no los podemos considerar como candidatos para estudiar la migración. Con el gen *Er81* podrían diferenciarse poblaciones de origen rostral que se posicionan en partes más caudales de la corteza o bien identificar dominios específicos del VP/PSB de origen rostral-medial.

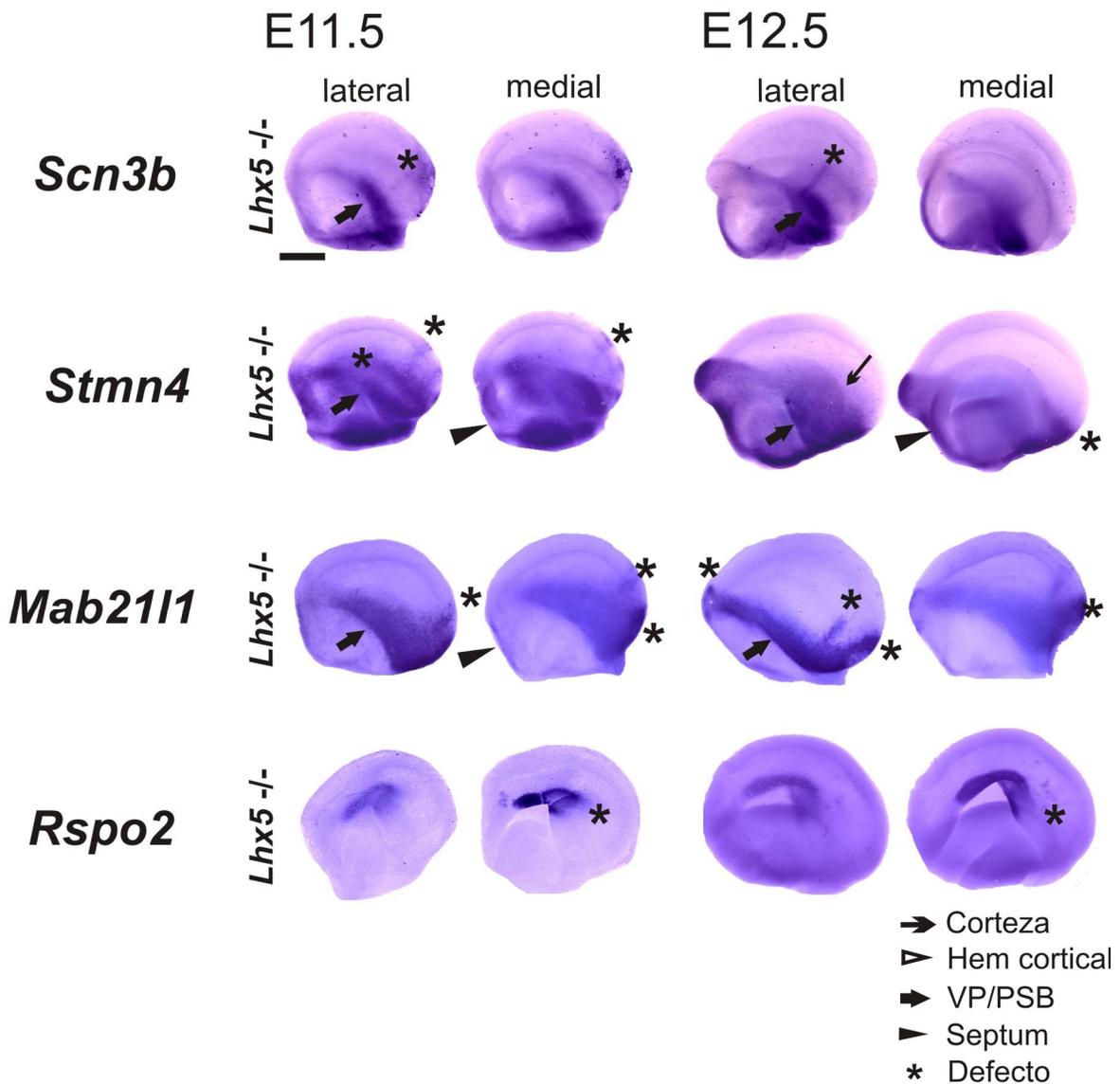


Figura 7. Hibridación *in situ* para los genes *Scn3b*, *Stmn4*, *Mab21l1* y *Rspo2* en embriones *Lhx5*^{-/-}. La ISH se llevó a cabo en vesículas telencefálicas de ratón homocigoto mutante para el gen *Lhx5* en los estadios E11.5 y E12.5, los resultados se muestran en tanto en la cara lateral como en la cara medial. Barra de calibración 200 μ m.

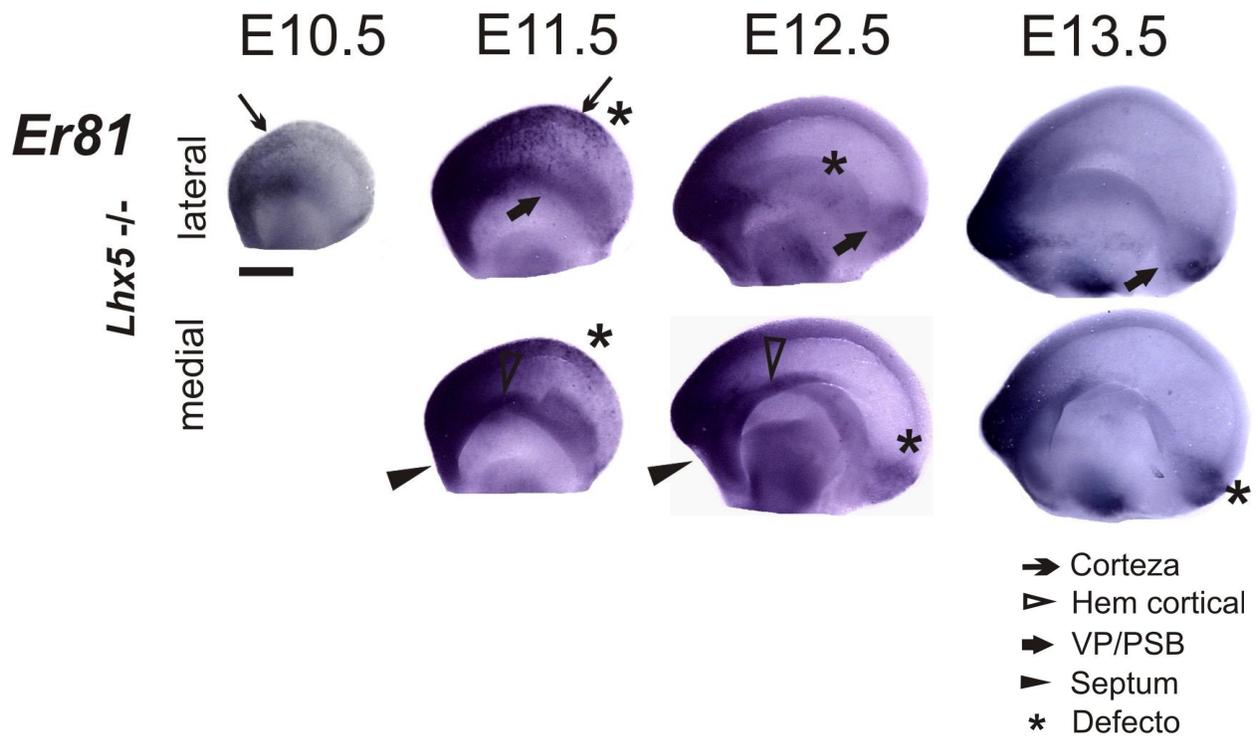


Figura 8. Hibridación *in situ* para el gen *Er81* en embriones *Lhx5*^{-/-}. La ISH se llevó a cabo en vesículas telencefálicas de ratón homocigoto mutante para el gen *Lhx5* en los estadios E10.5-E13.5, los resultados se muestran en tanto en la cara lateral como en la cara medial. Barra de calibración 200 μ m.

4.3. Identificación de las rutas de migración mediante marcaje Exo-útero y cultivo embrionario

Una vez que seleccionados algunos genes como posibles marcadores moleculares de células CR, es indispensable corroborar la migración desde dichos sitios hacia la corteza. Algunos estudios han mostrado que desde el Hem cortical, sitio de abundante generación de células CR, estas migran hacia la parte más dorsal del telencéfalo (Meyer, Cabrera Socorro et al. 2004; Takiguchi-Hayashi, Sekiguchi et al. 2004; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007). También, que las células CR provenientes del Septum y zonas circundantes se desplazan en dirección ventral hacia zonas olfativas (Bielle, Griveau et al. 2005; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008). Además hay evidencias de células generadas del VP migran hacia la corteza piriforme (Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008; Ceci, Pedraza et al. 2012) y que la zona rostral medial produce células que se posicionan en la corteza rostral (Zimmer, Lee et al. 2010). Finalmente, se ha propuesto que progenitores marcados con el gen *Dbx1* originados en el VP/PSB producen células CR que migran en dirección dorsal hacia la corteza lateral (Bielle, Griveau et al. 2005), sin embargo, este hallazgo se encuentra en debate ya que tal migración no ha podido ser replicada por otros grupos de trabajo, que por el contrario, sugieren que tal migración no ocurre (Ceci, Pedraza et al. 2012).

Por lo tanto, para el estudio de las rutas de migración se llevó a cabo la inyección del marcador fluorescente 5-Carboxifluoresceína diacetato succimidil ester (CFDA-SE) en la zona ventricular de los sitios de origen propuestos (VP/PSB y zona rostral) en vesículas telencefálicas de embriones de ratón y posteriormente se cultivaron durante 24 horas. Los estadios embrionarios analizados fueron E10.5 ya que en este estadio se genera la mayoría de las células CR y algunas ya se observan en migración, E11.5 en el que aun algunas células CR se generan y la mayoría se encuentra en migración y, finalmente, en E12.5, en el que las primeras células en migrar se encuentran alcanzando su destino final y pocas continúan en migración.

4.3.1. Migración desde el palio ventral (VP) y el límite palio-subpalio (PSB)

Las inyecciones se llevaron a cabo en la cara lateral de la vesícula telencefálica en la región identificada como VP/PSB y regiones cercanas. Los marcajes que se realizaron en

las vesículas fueron sencillos, dobles o triples (Fig.9 A); en la mayoría de los casos se muestran de dos a tres inyecciones en dirección anteroposterior. Las inyecciones no siempre se realizaron exactamente en el mismo sitio debido a que se hicieron de manera manual y también a la leve variación en el desarrollo que se presenta en los embriones de la misma camada de ratones. En todos los casos los sitios de inyección presentaron una marca muy intensa, debido a que es el lugar donde se descarga todo el marcador (Fig.9 s, d, t) y después de 24 horas de cultivo las células marcadas se evidenciaron en la cercanía de dicho sitio (Fig.9 A flecha punteada en s, d, t). Además, para analizar los marcajes triples, los sitios de inyección se llevaron a cabo en las regiones anterior (*a*) y media (*m*) y (*p*) posterior, a lo largo del eje anteroposterior de la vesícula sobre la región del VP/PSB (Fig.9 B). Cortes transversales de la vesícula telencefálica como el que se muestra en la Fig.9B (cc) indicaron que el marcaje se realizó en la zona ventricular.

Las inyecciones en las vesículas telencefálicas de los embriones E10.5 (Fig.9 C) mostraron que las células marcadas en la región *a* y *m* del VP/PSB presentan migración en dirección ventral-caudal (Fig.9 C ampliación flechas punteadas), mientras que las células marcadas en la región *p* presentan migración en dirección ventral. Los marcajes en embriones E11.5 y E12.5 (Fig.9 C) presentan el mismo patrón de migración. Sin embargo, se observa que entre los tres estadios la cantidad de células marcadas que migran fue en decremento cuanto más tardío fue el estadio analizado (Fig.9 C ampliación flechas punteadas). Por otro lado, en ninguno de los marcajes tanto individuales como múltiples de toda la región VP/PSB se observó migración en dirección dorsal, las células marcadas con CFDA migran predominantemente hacia la corteza piriforme (dirección ventral) y parecen distribuirse en dicha región (como formado un camino) (Fig.9 A [d,t], 9 C). Adicionalmente llevamos a cabo inyecciones en diferentes sitios de la cara lateral de la vesícula telencefálica de embriones de ratón E11.5 (Fig.10) con el fin de generar un patrón de migración de dicha área. Las células marcadas con CFDA que se originaron en la región lateral-dorsal de la vesícula migraron en dirección ventral, lo que indica que incluso células originadas en regiones dorsales al VP/PSB no migran en dirección dorsal. Estos datos ponen de manifiesto la ausencia de migración celular en dirección dorsal, en la cara lateral de la vesícula y se contraponen a la propuesta de Bielle et. al. (2005) de que esta región es fuente de células CR.

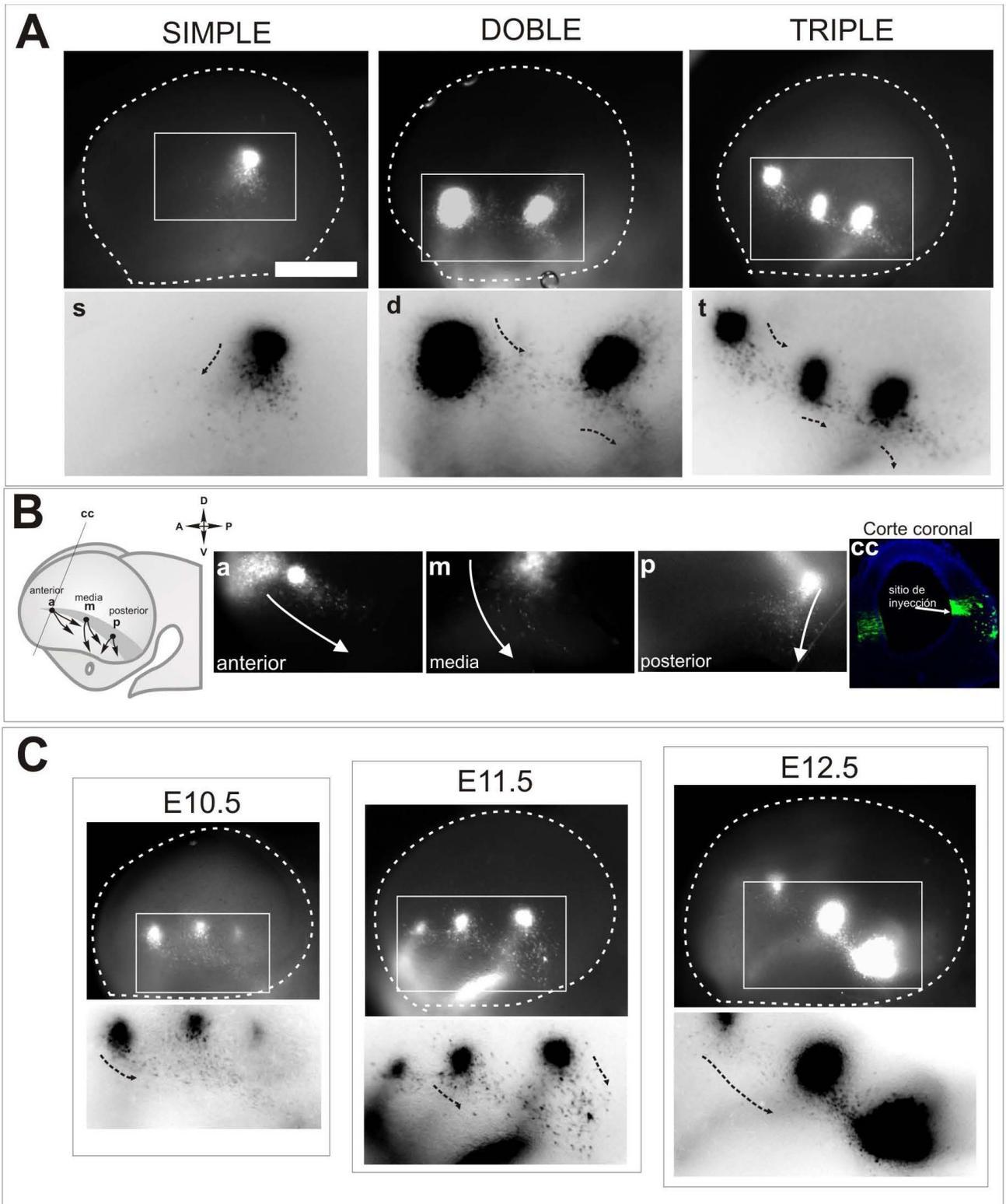


Figura 9. Marcajes con CFDA en la región del VP/PSB. **A**, Los marcajes en la misma vesícula se realizaron simples, dobles o, en su mayoría, triples. **B**, los marcajes múltiples se llevaron a cabo siguiendo el eje anteroposterior de la región del VP/PBS y se denominaron de acuerdo con la zona como; **a** anterior, **m** media y **p** posterior. **C**, los marcajes se llevaron a cabo en vesículas telencefálicas de ratón en los estadios E10.5-E12.5. El contorno de las vesículas se delimitó con una línea punteada. En las ampliaciones los sitios de inyección se aprecian con mayor intensidad mientras que dirección de las células en migración se muestra con una flecha punteada. Barra de calibración 200 μm .

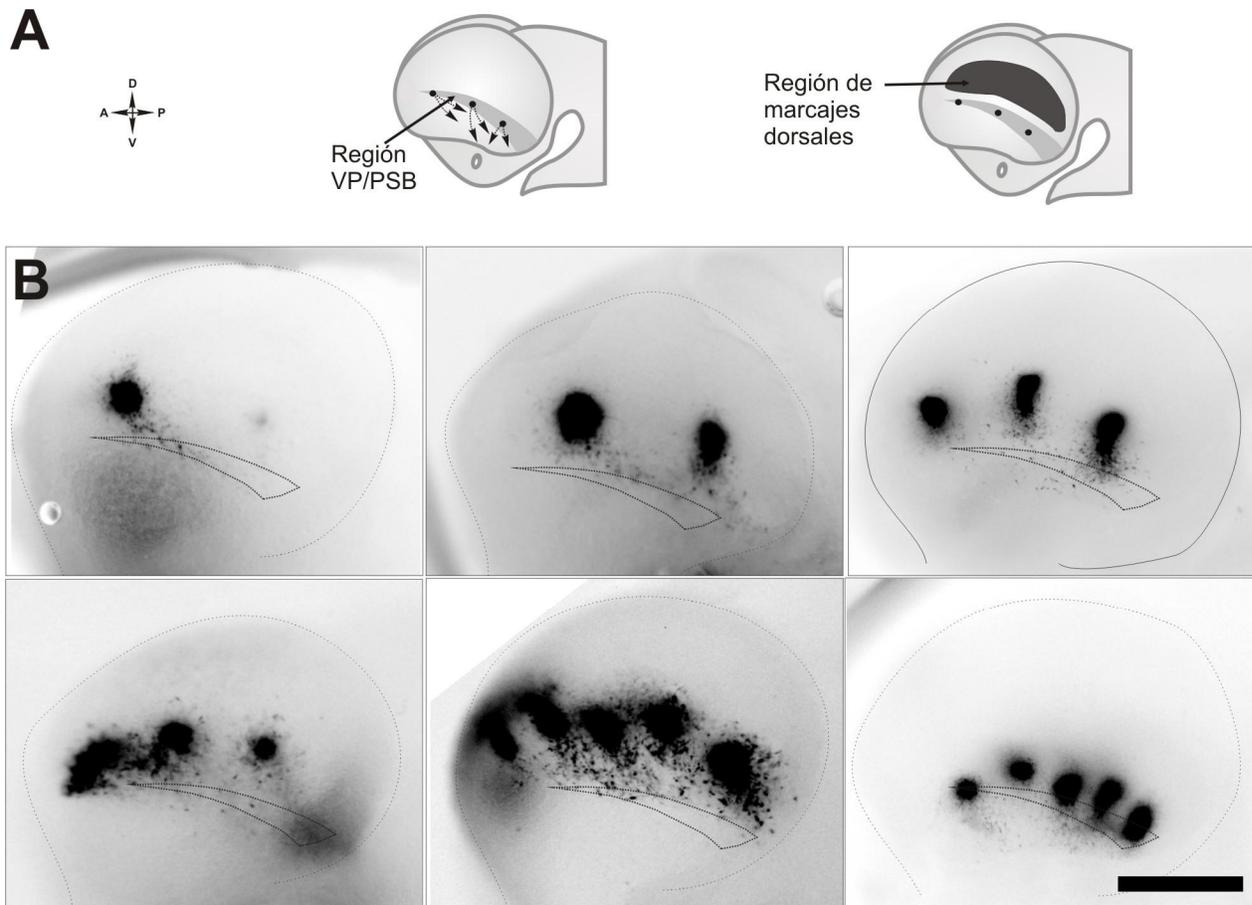


Figura 10. Marcajes con CFDA en la región lateral-dorsal de las vesículas telencefálicas. A, esquema representativo de la ubicación de la región de VP/PSB y la región lateral-dorsal en la que se realizaron los marcajes. **B,** Ejemplos de marcajes que muestran migración en dirección ventral en vesículas telencefálicas en estadios embrionarios E11.5. Barra de calibración 200 μm .

4.3.2. Migración desde la Zona Rostral

También se llevaron a cabo inyecciones en la zona rostral-lateral de las vesículas telencefálicas, en la cercanía con el primordio de los bulbos olfativos. Después de varias pruebas, establecimos que los mejores estadios para el marcaje de la zona rostral fueron E10.5 y E11.0, ya que tanto antes como después, la cantidad de células marcadas con CFDA disminuyó drásticamente. Asimismo, independientemente del estadio de desarrollo, las células marcadas mostraron una ruta de migración en dirección caudal de la vesícula telencefálica (Fig.11 A).

Además, ya que los bulbos olfativos aún no se encuentran desarrollados en estos estadios y que la inyección realizada fue en la zona ventricular de la región más rostral del telencéfalo, observamos que el marcaje comprendió tanto la zona lateral, como la zona medial de la vesícula (Fig.11 A1). Debido a lo anterior, esperábamos observar migración de las células desde la región medial hacia la zona dorsal. Estudios previos han mostrado que las células CR originadas en la zona rostral-medial del telencéfalo, las cuales expresan al gen *Er81*, podrían tener una ruta de migración en dirección dorsal para posicionarse en la zona más dorsal, así como como en la región dorsal-lateral del primordio de la corteza cerebral (Zimmer, Lee et al. 2010). Sin embargo, no observamos migración en dirección dorsal pero sorpresivamente logramos identificar un dominio de células marcadas con CFDA que se originó en la parte rostral-lateral del telencéfalo rostral con migración en dirección caudal hacia la región lateral del telencéfalo (Fig.11 A1-2).

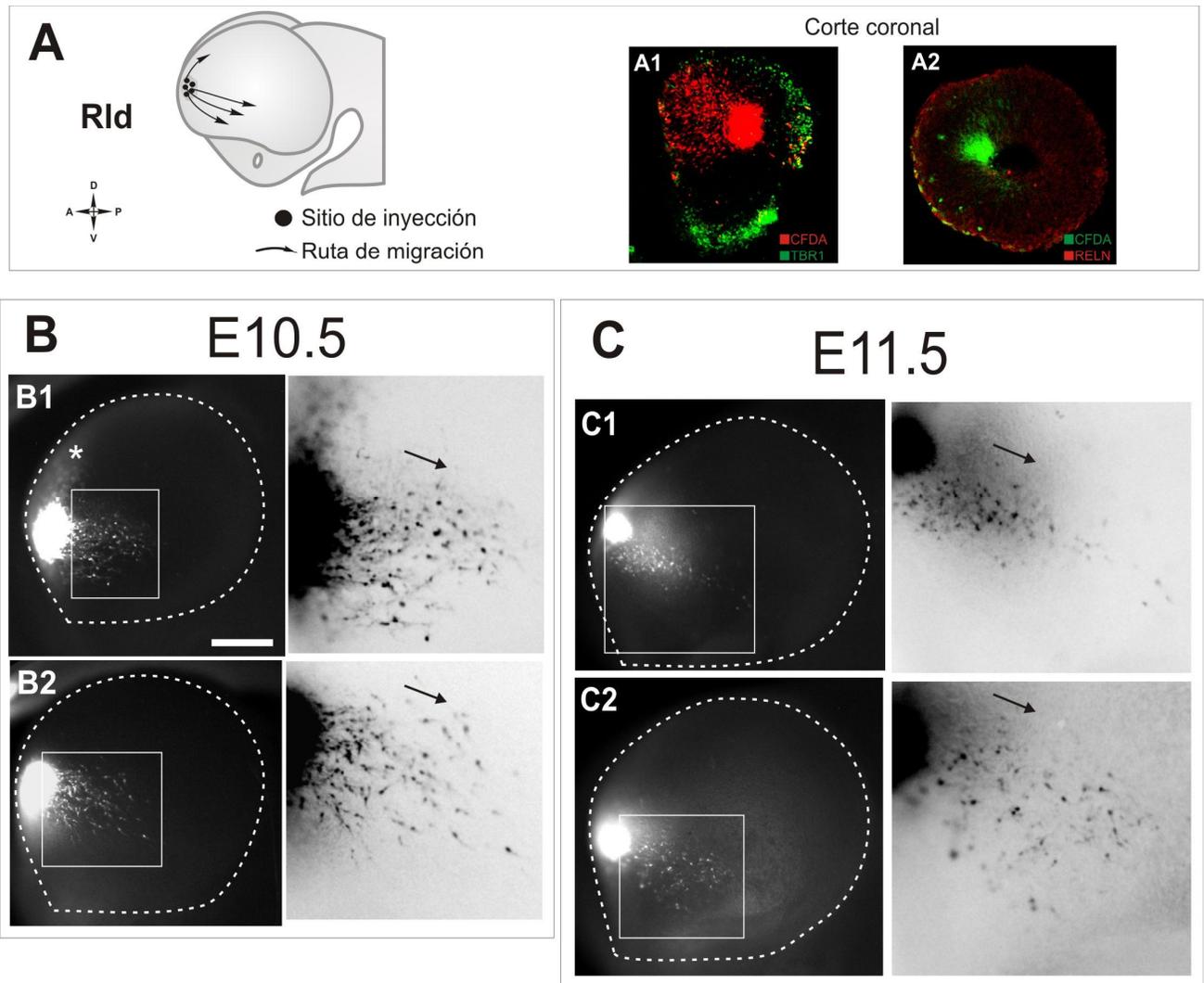


Figura 11. Marcajes con CFDA en la zona rostral. **A**, Esquema do sitio de inyección y la dirección en la que migran las células marcadas. **A1**, corte coronal de una vesícula que muestra un marcaje central de donde emergen células principalmente hacia la zona lateral. **A2**, corte coronal de una vesícula que muestra un marcaje en la zona ventricular del dominio rostral lateral (Rld) de la vesícula. **B** marcaje en el Rld de embriones en estadio E10.5, **B1**, muestra con asterisco lo que parece ser migración en dirección dorsal. **C**, marcajes en el Rld de embriones en estadio E11.5. El contorno de las vesículas se delimitó con una línea punteada. En las ampliaciones los sitios de inyección se aprecian con mayor intensidad mientras que dirección de las células en migración se muestra con una flecha. Barra de calibración 200 μ m.

Posteriormente todas las inyecciones se realizaron en la región rostral-lateral de las vesículas telencefálicas. Los embriones marcados en E10.5 (Fig.11 B) revelaron que las células marcadas migran desde la zona rostral-lateral del telencéfalo en dirección caudal hacia la corteza piriforme y sólo en pocos casos se observó una población muy pequeña que presentaba migración en dirección dorsal (Fig.11 B asterisco). En los marcajes realizados en embriones E11.0, únicamente se aprecia migración en dirección caudal hacia la corteza piriforme y la cantidad de células en migración disminuyó respecto a E10.5 (Fig.11 C). Considerando lo anterior, podemos sugerir que las células originadas en el dominio rostral-lateral (Rld), marcadas con CFDA, representa un grupo celular que no ha sido caracterizado previamente.

4.4. Caracterización de las poblaciones celulares marcadas con CFDA

Para caracterizar a las poblaciones celulares marcadas con CFDA que revelaron rutas de migración nuevas, llevamos a cabo IHQ para marcadores de células CR y marcadores de distintas regiones telencefálicas en embriones marcados con CFDA. Los marcadores analizados fueron los siguientes: Reelina un marcador para la totalidad de las células CR ubicadas en la zona marginal de la corteza; TBR1, un marcador palial, expresado en células ubicadas en la corteza cerebral y Calbindina un marcador que se expresa en células que se ubican en el subpalio (Bulfone, Smiga et al. 1995; Fishell 1995; Grkovic and Anderson 1997; Meyer, Goffinet et al. 1999; Hevner, Shi et al. 2001). Las inmunotinciones se llevaron a cabo en cortes de cerebros embrionarios marcados con CFDA y cultivados durante 24 h. Las células consideradas en el conteo fueron aquellas que se ubican en la zona marginal de los cortes analizados y una consideración importante es que las células CR se identifican por la expresión de Reelina y TBR1, pero no Calbindina.

4.4.1. Caracterización de células migratorias del VP/PSB

Para la IHQ de las células originadas en la zona del VP/PSB se analizaron los estadios E10.5 y E11.5 por ser los que mostraron mayor migración en los estudios previos. Las células marcadas que migraron durante las 24 horas de cultivo se observaron en la zona marginal de la cara lateral de las vesículas en la región del primordio de la corteza olfativa (Fig.12 a). Las IHQ en los embriones E10.5 mostraron que de las células marcadas con CFDA, contabilizadas en los cortes que abarcaron toda la región del VP/PSB (corteza olfativa) (Fig.12, TBR1; A-D, CALB; E-H, RELN; I-L), aproximadamente 3.6% expresó *Tbr1*, 3.1% expresó Calbindina y 28.7% expresó Reelina (Fig.12 M). Por otra parte, de las células marcadas en embriones E11.5, aproximadamente 6% expresó *Tbr1*, 2.8% expresó Calbindina y 26.4% expresó Reelina (Fig.12 N). De manera complementaria se realizó una doble IHQ en las células marcadas con el fin de determinar la región de origen en el palio de las que expresan Reelina. El experimento se llevó a cabo en embriones E11.5 (Fig.13) en el que observamos que de las células marcadas con CFDA 15% expresaron también *Tbr1* y Reelina (Fig.13 A-D, I), mientras que solamente el 2% expresaron Reelina y Calbindina (Fig.13 E-H, I).

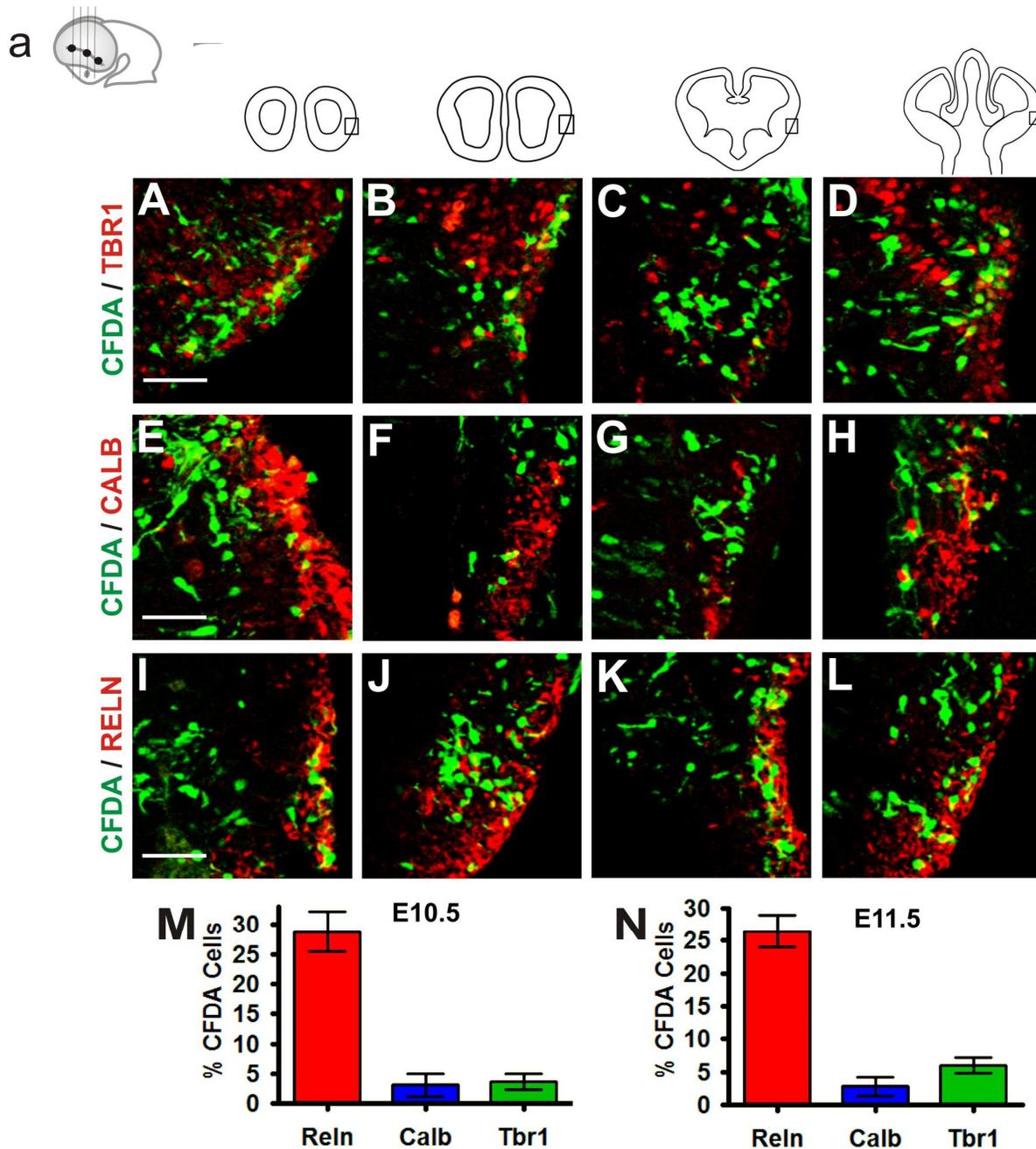


Figura 12. Inmunohistoquímica en marcajes con CFDA del VP/PSB. a, esquema representativo del sitio de inyección y las secciones coronales en las que se llevó a cabo la IHQ. Las imágenes muestran cortes coronales de un cerebro embrionario en estadio E11.5 marcado con CFDA y cultivado durante 24 h. Los anticuerpos utilizados para la IHQ fueron (A-D) Tbr1 como marcador palial, (E-H) Calbindina como marcador subpalial y (I-L) Reelina como marcador específico de células CR. La proporción de células CFDA en las que se expresaron los marcadores muestra que en E10.5 (M) 28.7% expreso Reelina, 3.6% Tbr1 y 3.1% Calbindina, mientras que en E11.5 (N) 26.4% expreso Reelina, 6% Tbr1 y 2.8% Calbindina. Barra de calibración 50 μ m.

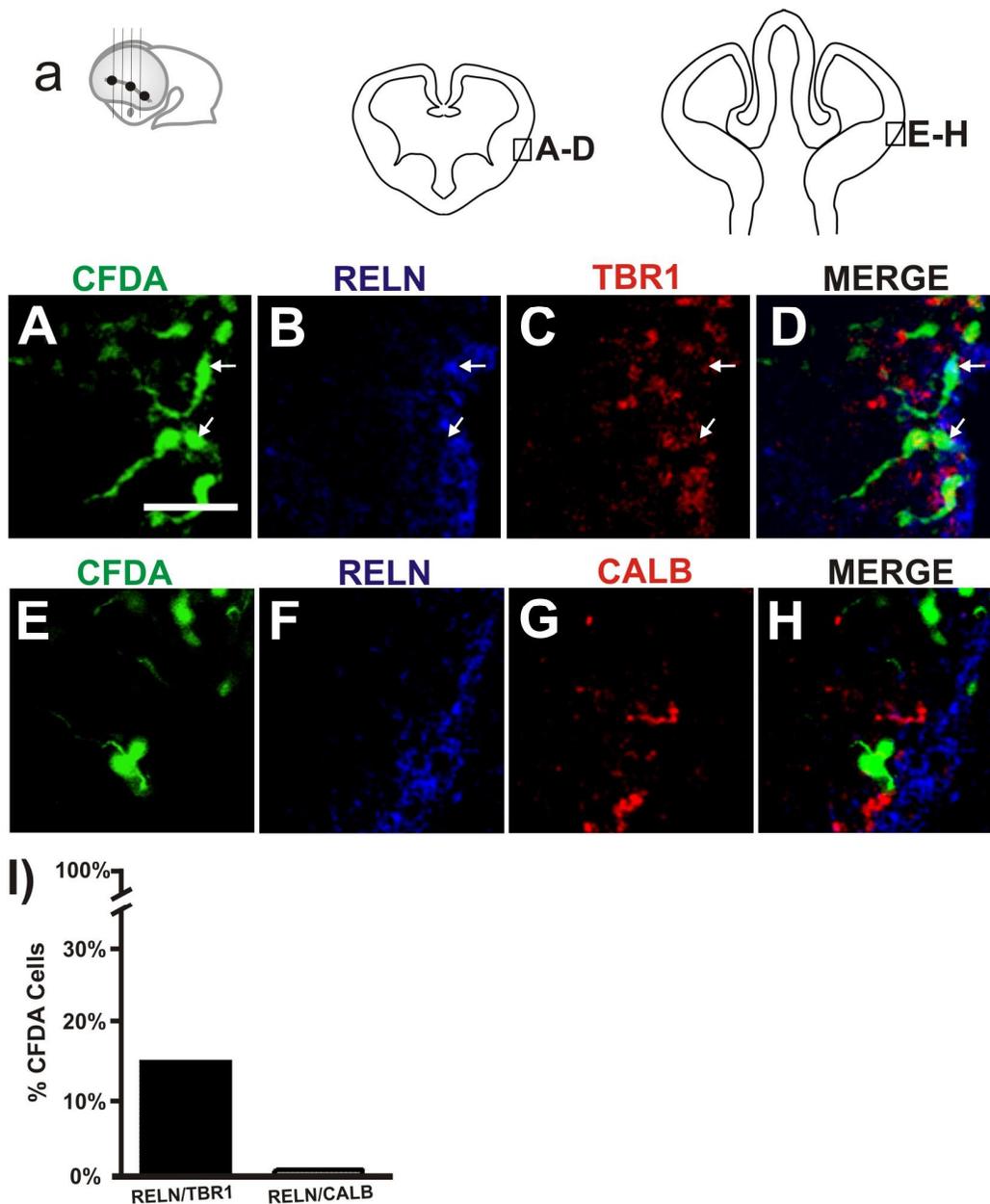


Figura 13. Inmunohistoquímica doble en vesículas marcadas con CFDA en el VP/PSB. a, esquema representativo del sitio de inyección y las secciones coronales. Las imágenes muestran cortes coronales de un cerebro embrionario en estadio E11.5. Las combinaciones de marcajes fueron (A-D) CFDA, Reelin y Tbr1 y (E-H) CFDA, Reelina y Calbindina. De las células marcadas con CFDA (I) observamos que 15% expresaron simultáneamente *Tbr1* y Reelina y 2% expresaron Reelina y Calbindina. Barra de calibración 50 μ m.

4.4.2. Caracterización de la Población del Dominio Rostral-Lateral

Para la IHQ de las células originadas en el dominio rostral-lateral (Rld) se analizaron los marcajes hechos en cerebros embrionarios en estadio E10.5, ya que en éste se observó mayor migración celular de esta región. Después de 24 horas de cultivo, las células marcadas se observaron dispersas por la región del primordio de la corteza olfativa (Fig.14 a). La IHQ mostró que de las células marcadas con CFDA (Fig.14, TBR1; A-D, CALB; E-H, RELN; I-L) aproximadamente 24% expresó *Tbr1*, 15.5% expresó Calbindina y 19.8% expresó Reelina (Fig.14 M). IHQ dobles mostraron que de las células marcadas con CFDA, 30.4% co-expresaron *Tbr1* y Reelina (Fig.15 A-D, I), mientras que menos del 1% co-expresaron Reelina y Calbindina (Fig.15 E-H, I). Estos resultados sugieren que aproximadamente un tercio de las células detectadas se origina en la zona rostral lateral y que podrían corresponder a células CR no caracterizadas previamente.

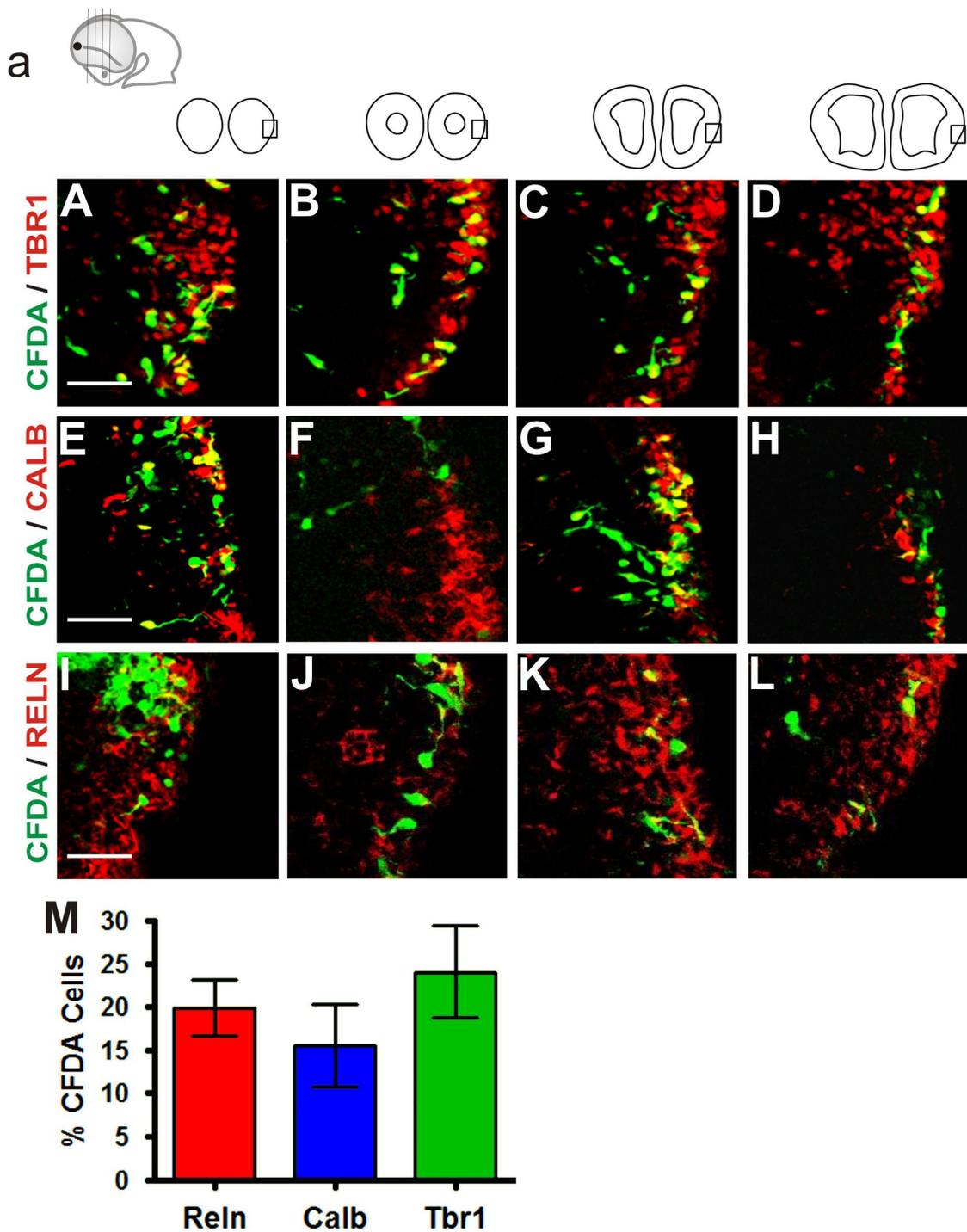


Figura 14. Inmunohistoquímica en marcajes con CFDA del R1d. a, esquema representativo del sitio de inyección y las secciones coronales analizadas. Las imágenes corresponden a cortes coronales de un cerebro embrionario E10.5. marcado con CFDA en el R1d y cultivado por 24 h. Los resultados indican que 24% expresó *Tbr1* (A-D, M), 15.5% expresó Calbindina (E-H, M) y 19.8% expresó Reelina (I-L, M). Barra de calibración 50 μ m.

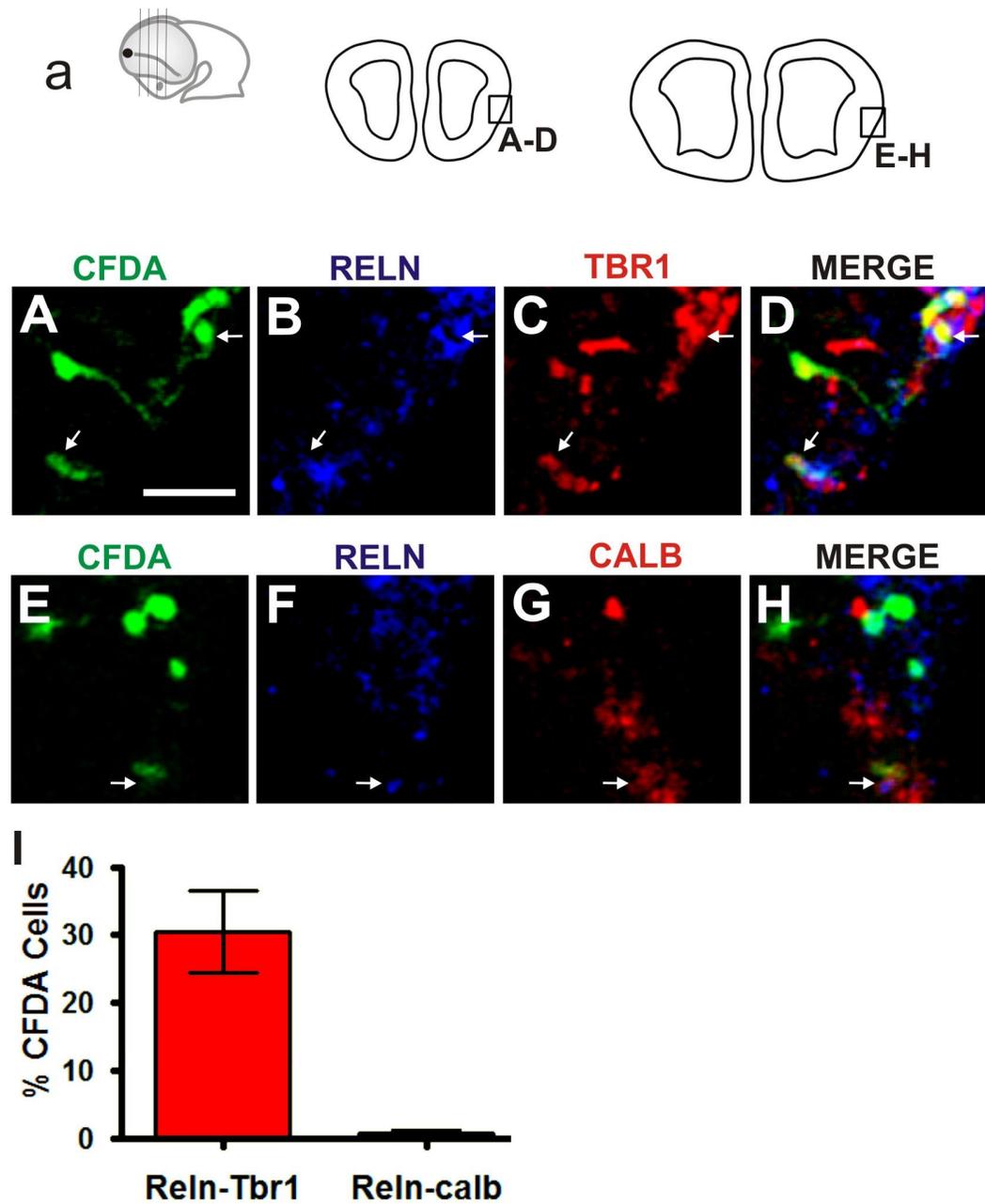


Figura 15. Inmunohistoquímica doble en vesículas marcadas con CFDA en Rld. a, esquema representativo del sitio de inyección y las secciones coronales. Las imágenes corresponden a cortes coronales de un cerebro embrionario E10.5, marcado con CFDA en el Rld y cultivado por 24 h. Los resultados muestran que las células marcadas 30% presentaron CFDA, Reelin y Tbr1 (A-D, I) y 1% CFDA, Reelina y Calbindina (E-H, I). Barra de calibración 50 μ m.

4.5. Caracterización de una nueva población de células de origen rostral que expresan Reelina

Para la caracterización de la nueva población rostral, originada en el Rld, tomamos en consideración evidencia previa que indica que células CR de la cara medial y el septum, en la región rostral del telencéfalo, son sitios de origen de células CR que expresan el gen *Er81* (Zimmer, Lee et al. 2010). Por otra parte, nuestros resultados de ISH revelaron que la expresión de *Er81* se dispersa en la corteza rostral-dorsal y en la región rostral de la corteza piriforme (Fig.6). Dado que hacia esta última región se dirigen las células marcadas con CFDA del Rld identificadas en este estudio se llevaron a cabo estudios para confirmar si dichas células son una subpoblación no caracterizada y si pertenecen a la población *Er81* o alguna otra.

4.5.1. Inhibición farmacológica de la población Er81 de células CR de origen rostral

Estudios previos en cultivo de explantes mostraron que bloqueando farmacológicamente la vía de señalización de *Fgf8* con el inhibidor SU5402 se disminuye drásticamente la población de células CR que expresan *Er81*, ya que este gen se expresa bajo el control de dicha vía de señalización (Zimmer, Lee et al. 2010). Por ello llevamos a cabo ISH con *Er81* o marcaje con CFDA en embriones E10.5 cultivados en medio control o medio suplementado con SU5402.

Estos estudios revelaron que la expresión de *Er81* disminuyó de manera drástica con el tratamiento con SU5402, tanto en la región del VP/PSB como en la corteza rostral en comparación con cultivos control (Fig.16 A, C, E). Con estos resultados corroboramos la disminución de células CR marcadas con *Er81* mostrado por Zimmer et. al. (2010).

Adicionalmente, en los cultivos tratados con SU540 (Fig.16 F) no se detectaron diferencias en comparación con cultivos control (Fig.16 B-D) en el número y patrones de migración de las células marcadas con CFDA que migran de la región rostral-lateral hacia el primordio de la corteza piriforme (Fig.16 b.d.f), Estos resultados indican que las células que expresan Reelina (CR) originadas en el domino rostral lateral no pertenecen a la población *Er81* ya que no se afecta ni su generación ni su patrón de migración en presencia del inhibidor SU5402.

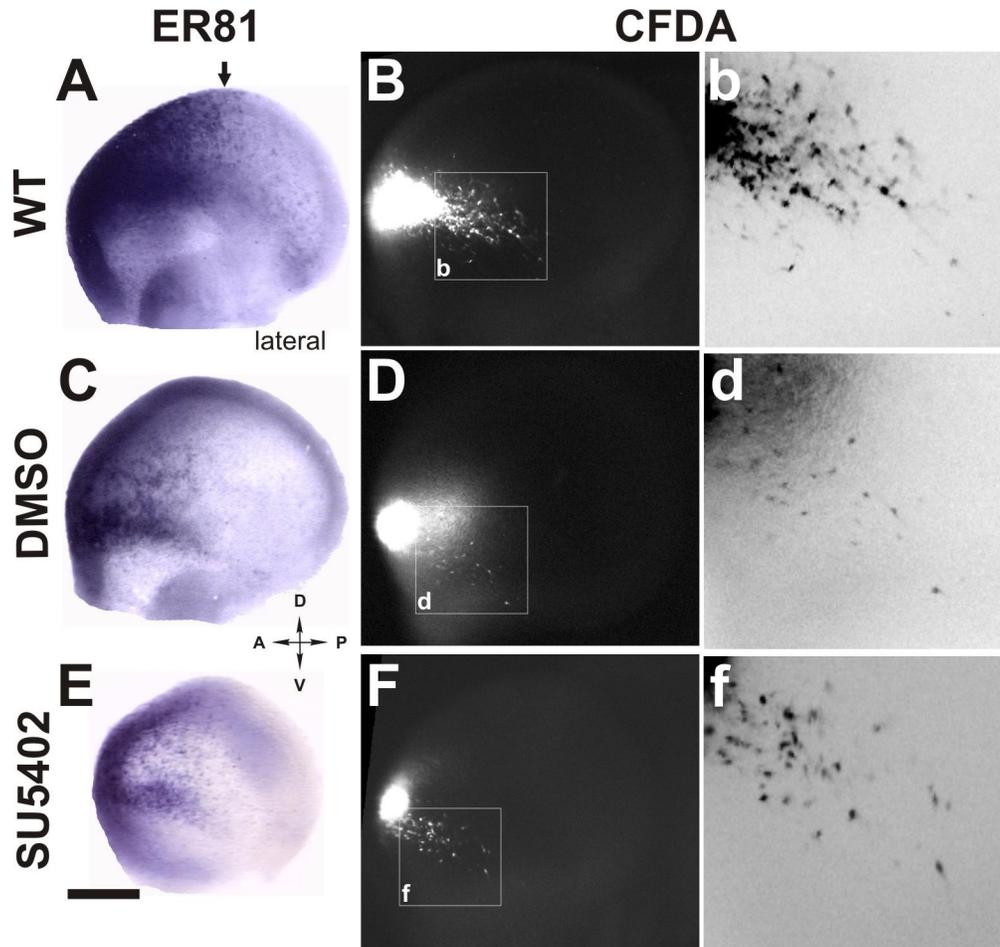


Figura 16. Análisis de las células Rld por Hibridación *In Situ* y marcajes con CFDA en presencia de SU5202. El fármaco SU5402 fue aplicado en cultivo de embriones (10 μ M) como inhibidor de la señalización FGF que afecta la expresión del gen *Er81*. Los cultivos y posterior ISH, así como los marcajes con CFDA en el Rld y posterior cultivo se llevaron a cabo en embriones E10.5, un cultivo con DMSO fue realizado como control. El WT, **A-B,b** mostró expresión *Er81* en VP/PSB y región rostral incluyendo la corteza, así como migración en dirección caudal-ventral. El control DMSO, **C-D,d** mostró una leve disminución en la expresión del gen y la cantidad de células migrando respecto al WT. El inhibidor SU5402, **E-F,f** mostró un drástico descenso en la expresión del gen *Er81* pero la cantidad y dirección de las células en migración presenta diferencias respecto al control DMSO. Barra de calibración 200 μ m

4.5.2. Efecto de la ausencia de *Lhx5* en la población de células que expresan Reelina de origen rostral-lateral

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que el gen *Lhx5* es importante para el desarrollo y migración de células CR; su ausencia genera una disminución en la expresión de Reelina y otros marcadores de células CR en regiones identificadas como sitios de origen de células CR como el Hem cortical, Septum y corteza olfativa, así como en su distribución por el palio dorsal (Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010). Para comprobar si *Lhx5* afecta a la población de origen rostral identificada en este estudio general llevamos a cabo ISH para *Er81* en cerebros de embriones de homocigotos mutantes *Lhx5*^{-/-} y en embriones heterocigotos *Lhx5*^{+/-} como control. En los heterocigotos observamos expresión en todos los sitios previamente descritos en el ratón silvestre (Fig.17 A, C). Sin embargo, en embriones mutantes homocigotos mutantes *Lhx5*^{-/-} observamos que la expresión de *Er81* se extiende por el palio dorsal hasta regiones caudales (Fig.17 E, cabeza de flecha). Para determinar si la ausencia de *Lhx5* afecta la migración del grupo celular originado en el dominio rostral-lateral llevamos a cabo marcaje con CFDA en embriones mutantes en cultivo. Esto reveló que tanto en los embriones heterocigotos como en los homocigotos (Fig.17 D, F), las células marcadas migran de la misma manera en dirección caudal.

Esto revela que, aunque la falta de *Lhx5* afecta algunos sitios de origen y la migración de las células CR, incluyendo a las *Er81*⁺, las células originadas en el dominio rostral-lateral no parecen estar afectadas en su origen o patrón de migración general.

Estos hallazgos refuerzan la visión de que la población de origen rostral-lateral es un grupo de células CR no caracterizado previamente.

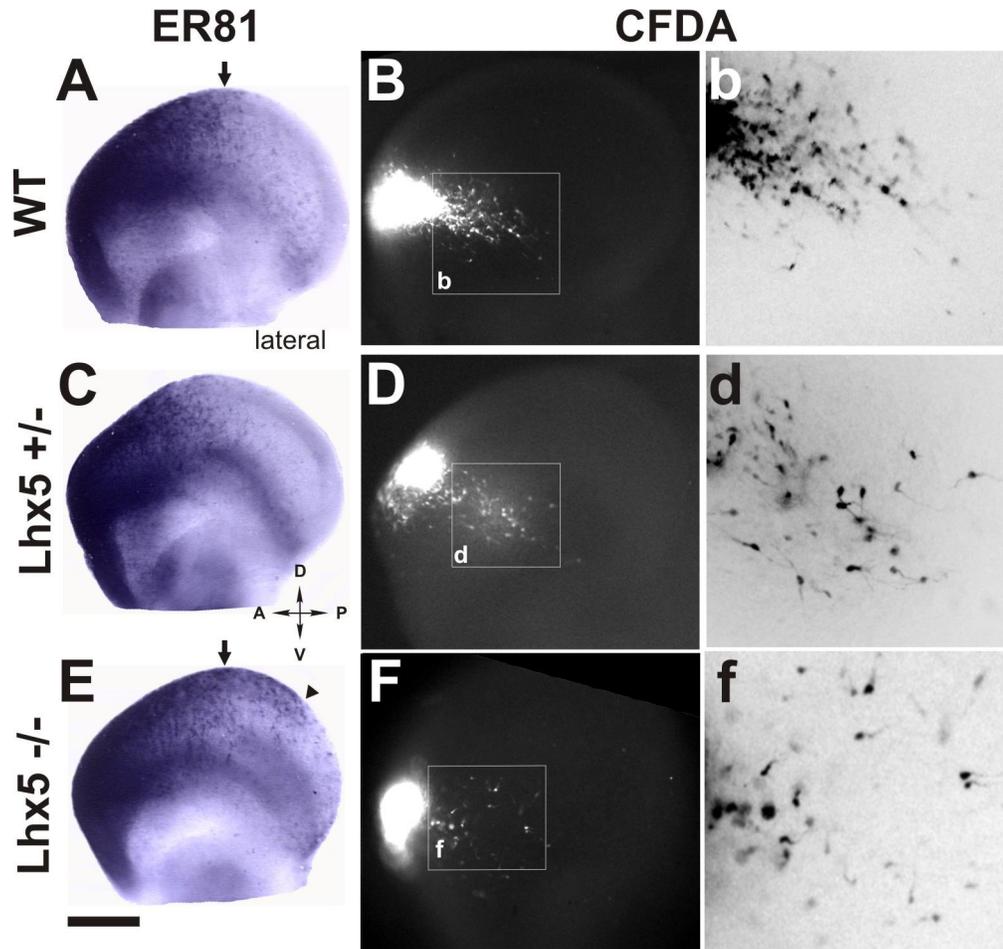


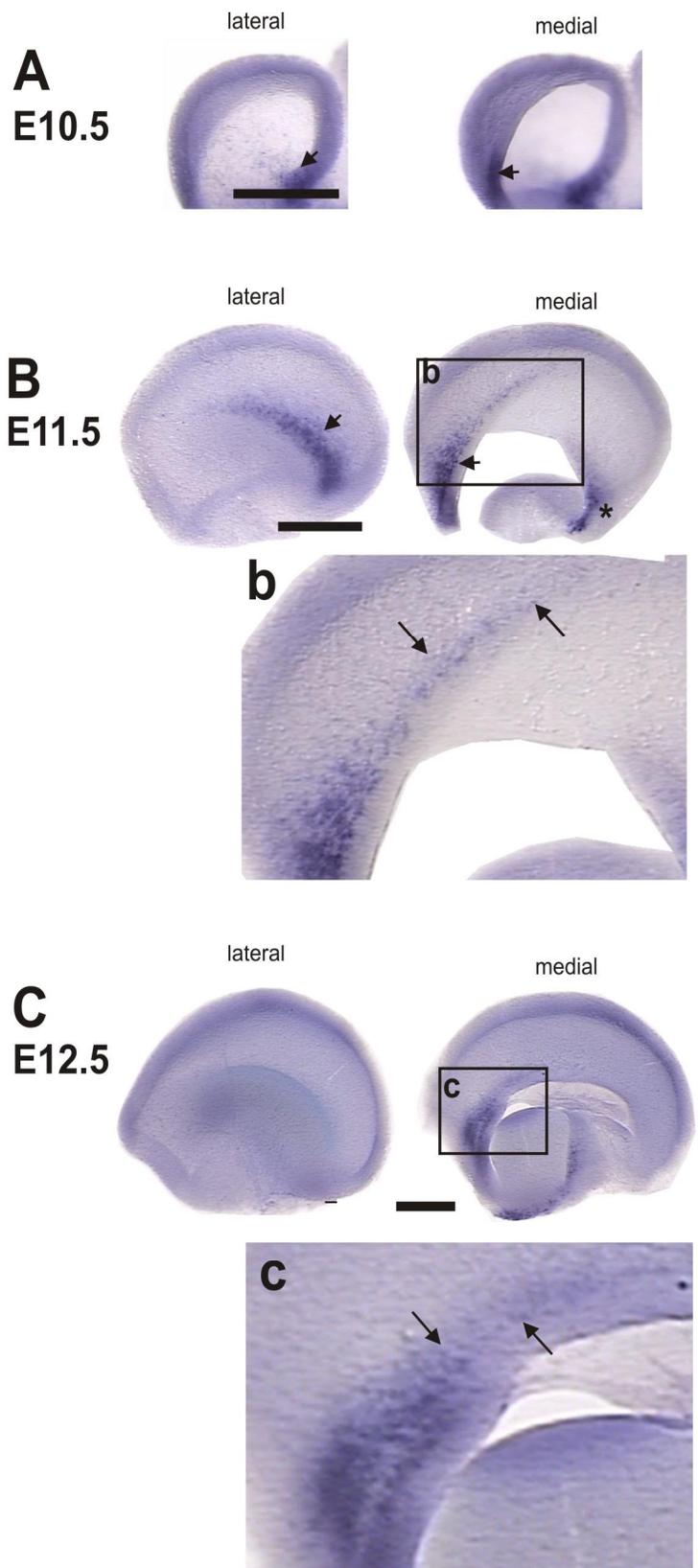
Figura 17. Análisis de la usencia del gen *Lhx5* sobre las células Rld. El gen *Lhx5* ha mostrado afectar a diversos sitios de origen de células que expresan Reelina (CR), incluyendo las marcadas con *Er81*. Los cultivos y posterior ISH con *Er81*, así como los marcajes con CFDA en el Rld y posterior cultivo se llevaron a cabo en embriones E10.5 homocigotos mutantes (*Lhx5*^{-/-}). **A-B,b** mostró expresión *Er81* en VP/PSB y región rostral incluyendo la corteza, así como migración en dirección caudal-ventral. El control Heterocigoto *Lhx5*, **C-D,d** no mostró gran diferencia respecto al WT. El *Lhx5*^{-/-}, **E-F,f** mostró una importante dispersión en la expresión del gen *Er81* sobre la corteza dorsal (cabeza de flecha), la cantidad de células en migración no presenta diferencias significativas pero si la dispersión de éstas respecto al control *Lhx*^{+/-}. Barra de calibración 200 μ m

4.6. Expresión del gen *Dbx1* en el Hem Cortical

En nuestros estudios de migración celular en el telencéfalo embrionario no se detectó migración en dirección dorsal partiendo de la región del VP/PSB. Estos resultados contrastan con lo reportado por Bielle et al. (2005) que propone que esta región da lugar a células CR que migran a la neocorteza en dirección dorsal y coincide con hallazgos de Ceci et al. (2012), quienes tampoco detectaron migración dorsal de esta región.

La propuesta de Bielle et al. (2005) se basa en el marcaje genético del VP/PSB dependiente de la expresión de *Dbx1* y análisis del destino de las células marcadas en la neocorteza en desarrollo. Con base en nuestros hallazgos contradictorios a esta propuesta, hipotetizamos que las células CR supuestamente derivadas del VP/PSB y marcadas por la expresión de *Dbx1*, podrían derivar de otra región de origen de células CR que expresan *Dbx1*. Para explorar esta posibilidad analizamos la expresión de *Dbx1* por ISH en embriones de E10.5 a E12.5. En E10.5 y observamos poca expresión en la región del Septum y en la región del VP/PSB tal y como lo reportaron en Bielle et al. (2005) (Fig.18 A). En E11.5 se detectó expresión en la cara lateral de la vesícula telencefálica, en la región de la corteza piriforme y el VP, así como en la cara medial en el Septum (Fig.185 B). Además, observamos un pequeño dominio adicional en la región caudal-ventral de la vesícula (Fig.18 B, asterisco). Sorpresivamente, identificamos expresión también en la región anterior del Hem Cortical (Fig.18 b, flechas). En E12.5 la expresión de *Dbx1* disminuye drásticamente en la región lateral y únicamente se mantiene en la región del Septum (Fig.18 C), e incluso se mantiene en la parte anterior del Hem cortical (Fig.18 c, flechas). Esto indica que *Dbx1* se expresa en lugares que se han descrito como sitios de origen de células que expresan Reelina y adicionalmente en el Hem cortical que ha sido establecido como el principal generador de células CR.

Figura 18. ISH con el gen *Dbx1* en cerebros embrionarios de E10.5 a E12.5. *Dbx1* es un gen que se expresa en precursores de células CR de regiones como el Septum y el VP/PSB. Los resultados de la ISH mostraron que en E10.5 (A), *Dbx1* se expresa débilmente en el VP/PSB y Septum. En E11.5 (B), el gen se expresó en el VP/PSB, CMTW (asterisco), Septum y en la parte anterior de Hem cortical (b, flechas). En E12.5 (C) la expresión se observó solamente en la parte superior de Septum y en la parte anterior del Hem cortical (c, flechas). Barra de calibración 200 μ m.



5. DISCUSIÓN

La formación de la corteza cerebral de los mamíferos ocurre en un periodo de tiempo y un espacio específico altamente regulado durante el desarrollo embrionario. La regulación de estos complejos procesos sucede mediante expresión genética, la cual permite la generación, induce la migración, así como, el posicionamiento de cada célula en sitios específicos de la corteza.

Las células Cajal Retzius, un grupo celular relacionado con la organización laminar de la corteza cerebral en mamíferos, se generan en diversas regiones en los bordes de la corteza en desarrollo y se dispersan por toda la superficie del telencéfalo (Tissir and Goffinet 2003; Soriano and Del Rio 2005; Guillemot, Molnar et al. 2006). Desde su ubicación son capaces de señalar, mediante la proteína Reelina, la migración radial de las células que formarán las capas de la corteza (Marin and Rubenstein 2003), mediante el patrón de migración celular *inside-out* (Rakic 1974; McConnell 1988). La ausencia de Reelina induce la inversión en el orden de las capas de la placa cortical en el ratón mutante Reeler (Ogawa, Miyata et al. 1995; D'Arcangelo and Curran 1998). Las células CR emergen de diversas zonas del telencéfalo, pero no de la propia corteza (Hevner, Neogi et al. 2003; Soriano and Del Rio 2005). Además, grandes grupos de células CR provenientes de diversos sitios de origen coinciden en patrones de expresión genética lo que dificulta la identificación de genes específicos de subpoblaciones. En este contexto es probable que el análisis de pequeñas subpoblaciones, y no grandes grupos, se pueda obtener información más específica que amplíe el conocimiento sobre las células CR. Por ello, nos dimos a la tarea de abordar la expresión genética relacionada con las células CR, tratando de identificar marcadores genéticos de subpoblaciones específicas de ciertos sitios de origen. Además, estudiamos las rutas de migración que esas subpoblaciones de células siguen hacia el palio.

5.1. Selección de marcadores moleculares de subpoblaciones de células CR

Para el análisis y selección de marcadores moleculares para subpoblaciones de células CR tomamos en cuenta una serie de factores.

Primero, que los genes candidatos se expresaran en las células CR. Para esto, en primer lugar consideramos un grupo de trabajos en los que se logró aislar células con características de CR en un ratón transgénico que expresa a la proteína GFP en la capa I de la corteza (Ohishi, Neki et al. 1998; Watanabe, Inokawa et al. 1998; Soda, Nakashima et al. 2003; Takiguchi-Hayashi, Sekiguchi et al. 2004). Posteriormente mediante microarreglos obtuvieron un perfil de expresión genético (Soda, Nakashima et al. 2003; Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004) del que seleccionamos a los genes *Rspo2*, *Scn3b*, *Stmn4*, *Mab2111*, *Sulf2*, *Hdac11*, *Tcf4*, *Acaa1b*, *Er81*, *C630004H02Ri* y *6330527O06Rik* como candidatos ya que mostraban, en las células aisladas, altos niveles de expresión positiva-GFP y negativa-GABA consideradas CR a diferencias de las negativas-GFP y positivas-GABA consideradas no CR (Soda, Nakashima et al. 2003; Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004).

En segundo lugar, consideramos el estadio y el sitio de expresión. Buscamos expresión de los genes en vesículas telencefálicas de embriones en estadios en los que las células CR se originan y migran, es decir, E10.5 a E12.5 (Hevner, Neogi et al. 2003; Soriano and Del Rio 2005). Además buscamos la expresión en sitios asociados a ellas, es decir, en los sitios de origen conocidos o propuestos como sitios de origen en el palio (Hevner, Neogi et al. 2003; Takiguchi-Hayashi, Sekiguchi et al. 2004; Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004; Bielle, Griveau et al. 2005; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008; Ceci, Lopez-Mascaraque et al. 2010; Zimmer, Lee et al. 2010).

La tabla 2 muestra que únicamente tres de ellos *Scn3b*, *Stmn4*, y *Er81* se expresaron en uno o más sitios de origen y también en la corteza. Considerando los datos de la expresión de los genes, los dos primeros podrían pertenecer a una población del VP, *Stmn4* también para el Septum y *Er81* en una población rostral. Sin embargo, el resto de los genes no fueron considerados ya que no se detectó su expresión en la corteza embrionaria (*Rspo2*, *Mab2111*, *Sulf2*, *Acaa1b* y *C630004H02R*), la expresión parecía inespecífica (*Hdac11* y *Tcf4*) o la expresión se detectó en la corteza sólo en estadios avanzados.

Cabe mencionar que las células usadas para obtener el perfil genético (Yamazaki, Sekiguchi et al. 2004) se aislaron de cortezas cerebrales embrionarias completas en E13.5. En dicho estadio ya se ha establecido la subplaca con sus células profundas y las células CR ya están distribuidas por toda la corteza pero también ha comenzado una importante migración celular desde las eminencias ganglionares hacia la placa cortical (Lavdas,

Grigoriou et al. 1999; Anderson, Marin et al. 2001; Nery, Fishell et al. 2002) y en dirección a la corteza olfativa (piriforme y entorrinal) donde se ha demostrado que es un sitio de una significativa conjunción celular proveniente tanto del palio como del subpalio (de Carlos, Lopez-Mascaraque et al. 1996; Anderson, Marin et al. 2001; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008). Entonces es importante considerar que en el estadio E13.5 las células CR no son las únicas encontradas en la corteza y esto puede ser la causa de que los perfiles genéticos no sean específicos de las CR sino que es una mezcla de varias poblaciones celulares. Esto podría ser la causa de que varios de los genes elegidos no mostraran expresión en las vesículas telencefálicas de los estadios analizados en este trabajo.

5.2. Análisis del efecto de la usencia del gen *Lhx5* sobre las poblaciones células identificadas con candidatos a marcadores moleculares de subpoblaciones de células CR

En el control genético del desarrollo del Sistema Nervioso Central el gen *Lhx5* tiene un papel fundamental en la regulación de la diferenciación y migración celular y su ausencia puede producir severas anomalías morfológicas (Zhao, Hermes et al. 2000; Abellan, Menuet et al. 2009; Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010). Además, considerando que las células CR son de las primeras en aparecer durante la corticogénesis, muchos genes de diferenciación nerviosa temprana como *Lhx5* también influyen en su establecimiento (Abellan, Menuet et al. 2009; Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010).

Por otra parte, tomando en cuenta nuestros resultados de los marcajes en VP/PSB, así como los obtenidos por Ceci *et. al.* 2012 en los cuales no se presenta migración en dirección dorsal, las células marcadas por los genes *Stmn4* y *Scn3b*, que, si se expresan en la corteza lateral-dorsal, podrían estar siendo originadas en sitios diferentes al VP/PSB y éste, más bien, se trataría de su destino. Además, el análisis de la expresión de los genes candidatos en el mutante *Lhx5* muestra que en zonas caudales de las vesículas los genes candidatos se expresan bajo un patrón de dispersión o separación de la señal originalmente concentrada en un sitio, es decir, una expresión ectópica por células, a manera de subpoblaciones afectadas por la usencia de *Lhx5* (Fig.7). Por otra parte,

resultados de nuestro laboratorio revelaron que el gen *Lhx5* modifica la ruta de migración de células CR que se originan en la CMTW y se dirigen hacia la corteza piriforme (Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010). En este caso las células en lugar de migrar en dirección ventral rodeando a la vesícula telencefálica, en dicha dirección, toman una ruta aberrante en la que migran en dirección caudo lateral, rodean el polo caudal de la vesícula y se dirigen a su destino (Takiguchi-Hayashi, Sekiguchi et al. 2004; Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010). Asimismo, mediante diversos marcadores genéticos de células CR, como *Reelina*, *p73* y *Ebf2*, (Miquelajauregui, Varela-Echavarria et al. 2010) se evidenciaron las subpoblaciones ectópicas en la región caudal de la vesícula telencefálica. Dichas observaciones sugirieron que la pérdida del gen *Lhx5* produce importantes alteraciones morfológicas que afectan algunos sitios de origen de las células CR, como el HC, VP/PSB, Septum y la CMTW, lo que perjudica directa o indirectamente la diferenciación de las células CR. Interesantemente dichas poblaciones aberrantes tienen patrones de expresión comparables con los presentados por *Stmn4* y *Scn3b*. Basados en los datos anteriores, consideramos que los genes candidatos, *Stmn4* y *Scn3b*, no son expresados por células CR de origen en el VP/PSB. También, podemos sugerir que son expresados por células de la CMTW, aunque se requieren experimentos confirmatorios. De tal manera que, *Stmn4* y *Scn3b*, no se consideran más como marcadores de poblaciones del VP/PSB.

Estos datos también pueden explicar lo observado con la expresión de *Er81*, en el que la principal alteración es una mayor dispersión de la expresión hacia zonas caudales. Entonces, si consideramos que es muy evidente que la ausencia de *Lhx5* afecta la parte caudal es probable que los defectos morfológicos inicien desde regiones mediales, que es la zona hasta donde se expresa *Er81* en condiciones WT. Por lo tanto, *Lhx5* también afecta a la población de células CR marcadas con *Er81* de origen rostro medial y cercanía con el Septum.

5.3. Rutas de migración que siguen las células marcadas con CFDA que nacen en la ZV del VP y Rld

Una parte fundamental de este trabajo fue identificar la ruta de migración que siguen las subpoblaciones celulares originadas en los sitios de nuestro interés. Para esto llevamos a

cabo marcajes con CFDA en vesículas telencefálicas de embriones en estadios E10.5 y E11.5, estadios donde se ha sugerido a mayor migración de estas células. Los sitios de origen en los que realizamos los marcajes fueron el VP y la región rostral lateral del telencéfalo en la cercanía con los bulbos olfatorios. Trabajos previos sobre células CR de regiones similares han sugerido ya algunas rutas de migración. Por ejemplo, desde el VP/PSB la migración indicada comienza por la zona subventricular y después por la zona marginal en dirección a la corteza olfativa (corteza piriforme) (Bielle, Griveau et al. 2005; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008; Ceci, Lopez-Mascaraque et al. 2010; Ceci, Pedraza et al. 2012). Desde el mismo sitio de origen, también se ha sugerido que un grupo de células migra en dirección dorsal para alcanzar la corteza dorsal y establecerse en dicho sitio (Bielle, Griveau et al. 2005; Ceci, Lopez-Mascaraque et al. 2010). Además, otro grupo de investigación identificó una población de células CR que se originan en la zona rostral medial del telencéfalo. Dichas células, de acuerdo con la expresión del gen marcador específico, *Er81*, parecen migrar en dirección dorsal caudal para colocarse en la corteza rostral. Esta información demuestra que, así como existen diversas subpoblaciones de células CR, estas mismas siguen patrones de migración individuales.

5.3.1. Identificación de una población celular originada en el dominio rostral lateral (Rld)

La región rostral del telencéfalo es una zona de nuestro interés ya que en ella observamos la generación de células que expresan Reelina. Además hay pocos trabajos en que analicen a todas las subpoblaciones de células CR y éstos se han enfocado únicamente en zonas mediales del telencéfalo como la RMTW (Rostromedial telencephalic Wall) (Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008), el septum (Bielle, Griveau et al. 2005; Ceci, Pedraza et al. 2012) y el surco septoeminencial (SES) (Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008). También Zimmer et al. (2010) describieron la identificación de un grupo de células CR de origen rostral medial que expresa de manera específica al gen *Er81*, el cual se encuentra bajo el control de la vía de señalización *Fgf8*. C. Esta población parece ser afectada por la carencia del gen *Lhx5*, en el cual presenta una expansión hacia la corteza dorsal caudal (Fig.8), lo que indica una posible afectación a las rutas de migración.

Los marcajes realizados en la zona ventricular de la parte anterior del telencéfalo en la cercanía con los bulbos olfativos inicialmente abarcaron el lado lateral y el medial. Sin embargo, posteriormente nos enfocamos únicamente en el marcaje del dominio rostral lateral ya que las células originadas en tal sitio migraron desde ahí en dirección caudo ventral a una gran área donde se ubicará la corteza piriforme y en dirección caudal probablemente hacía una zona del tubérculo olfatorio. Asimismo, pocos casos únicamente en el estadio E11.0 logramos observar un pequeño grupo en dirección dorsal. El hallazgo de esta población celular llamó nuestra atención ya que no hay trabajos previos que mencionen una población originada de esta región con este patrón migratorio. Únicamente se ha sugerido migración desde zonas mediales; específicamente, de regiones anteriores o adyacentes al Septum que rodean tanto por la región dorsal como ventral al telencéfalo hasta alcanzar la corteza piriforme (Bielle, Griveau et al. 2005; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008; Ceci, Pedraza et al. 2012). Estos hallazgos nos permiten proponer que esta población que migra desde el Rld no ha sido identificada previamente ya que su origen es lateral, y no medial como en algunos mencionados previamente.

Por otro lado, en esta tesis demostramos que las células que identificamos por marcajes provenientes del Rld no pertenecen a la población *Er81* ya que el inhibidor de la señalización *Fgf8* no afecta la cantidad de células originadas. También demostramos que la falta del gen *Lhx5* tampoco afecta en gran medida la cantidad y distribución de células que se originan ni la ruta de migración que éstas siguen, a diferencia de la población *Er81* que si se ve afectada.

5.3.2. Las células originadas en el VP/PSB no migran en dirección dorsal y no generan células CR

Considerando que la región lateral de las vesículas telencefálicas presenta una gran abundancia de células, tanto las que se originan en su propia vecindad como las provenientes de otros sitios, consideramos una serie de datos para el análisis de dicha región. Dos líneas de evidencia principales fueron usadas como base para proponer que el VP/PSB es un sitio de origen de células CR. En primer lugar, se identificó un numeroso grupo celular proveniente de células precursoras neuronales que expresan el gen *Dbx1* el cual también se aplica como su marcador principal (Pierani, Moran-Rivard et al. 2001; Bielle, Griveau et

al. 2005). Este gen fue observado en sitios de origen de células CR (VP, PSB, Septum, área preóptica), y en la corteza cerebral embrionaria. También, estas células presentan características de células CR, es decir, expresan Reelina, se encuentran ubicadas en la zona marginal o capa I de la corteza cerebral y aparecen en los estadios del desarrollo conocidos de las células CR. Además, mediante marcaje genético y trazadores fluorescentes (Dil) se propusieron las rutas migratorias de dichas células (Bielle, Griveau et al. 2005). Particularmente para las células originadas en el VP/PSB se propuso una ruta de migración en dirección dorsal (Bielle, Griveau et al. 2005).

Una vez que nosotros realizamos varios marcajes con CFDA en el VP/PSB a diferentes alturas en el eje antero-posterior (*a*, *m*, *p*) los resultados siempre mostraron que del VP la migración celular tiene un patrón ventral-caudal. Además, también observamos que, en ambos estadios, menos de la tercera parte de las células marcadas con CFDA expresaron Reelina. Adicionalmente, una parte de dichas células también presentó la expresión de un marcador palial *Tbr1* lo que indica que podrían ser células CR. Sin embargo, el resto de las células expresa otros marcadores, como calbindina, o no es posible caracterizarlas con los marcadores utilizados en nuestros estudios. Estas diferencias podrían ser el resultado de discrepancias técnicas tanto en la etapa de desarrollo del embrión como en los sitios del marcaje. Por lo tanto, estos resultados sugieren que en la zona del VP/PSB se origina una importante cantidad de células de diferentes identidades y que podrían pertenecer a poblaciones tanto del palio como del subpalio. Nuestros resultados coinciden con los hallazgos de otros autores que han propuesto que aproximadamente la tercera parte de las células generadas en regiones similares (VP) son células que expresan Reelina (Ceci, Pedraza et al. 2012). Esto nos hace pensar que las células que hemos identificado corresponden a dicho grupo celular. Es muy interesante analizar la cantidad de células marcadas con CFDA que expresan Reelina, ya que muchas de ellas se encuentran en la ZM, pero un buen número se localiza en migración dispersas por la zona su ventricular. Esto sugiere que podrían ser células CR en diferenciación que aún no expresan marcadores.

Por otro lado, las células que marcamos migran tangencialmente desde el VP/PSB en dirección a la corteza la zona adyacente, es decir, la corteza olfativa (piriforme y entorrinal). Dicho resultado coincide con trabajos previos que mencionan rutas de migración similares

(Bielle, Griveau et al. 2005; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008). Sin embargo, Bielle, Griveau et al. 2005, sugirieron la existencia de una subpoblación más de células CR la cual presenta migración en dirección dorsal. Sin embargo, esto no ha sido confirmado por ningún otro grupo y, por el contrario, nuestros resultados son similares y confirman los hallazgos de (Ceci, Pedraza et al. 2012) en los que se demostró que en el VP no se generan células CR que migran en dirección dorsal.

Es probable que la migración en dirección dorsal observada por Bielle et al. (2005) sea originada por la técnica utilizada para llevar a cabo los experimentos de migración. Ellos realizaron cortes coronales gruesos de telencéfalos embrionarios, marcaron con el trazador retrogrado Dil (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate) y cultivaron en placas. Es posible que la carencia del territorio completo en su eje longitudinal indujera que las células marcadas tomaran rutas anormales a lo largo del eje dorsoventral. Resulta aceptable que cuando se modifica el territorio morfológico ya sea mecánicamente, como los cortes coronales (Bielle, Griveau et al. 2005), o por mutaciones genéticas, como el caso de *Lhx5* (Zhao, Sheng et al. 1999), dicho territorio no proporcione los factores adecuados para que ocurra normalmente el evento de migración. Además, en dicho trabajo, identificaron células CR provenientes de precursores celulares que expresan el gen *Dbx1* y mediante marcaje genético observaron que las células surgen de diferentes regiones identificadas como sitios de origen de las CR. Específicamente en la cara lateral del telencéfalo se menciona al VP/PSB y en la cara medial el Septum e incluso mencionan el área preóptica. También mediante la misma técnica se observa que dichas células ocupan una gran parte de la corteza dorsal principalmente de la cara lateral (Bielle, Griveau et al. 2005).

Con el fin de identificar el posible origen de dicha discrepancia, nos dimos a la tarea de analizar minuciosamente la expresión del gen *Dbx1*. Además, nos planteamos la hipótesis de que dicho gen también es expresado por precursores del CH. Por ello, mediante hibridación *In situ* demostramos (Fig.18 b,c) que la expresión de *Dbx1* no sólo se limita al Septum sino que se extiende hasta la parte anterior del HC. Es muy importante recordar que el HC es una región esencial en cuanto al origen de las células CR ya que mediante marcajes fluorescentes, marcajes genéticos y ablación genética de dicha región se ha demostrado que es la fuente de la mayor parte de las células CR de la corteza en

desarrollo (Takiguchi-Hayashi, Sekiguchi et al. 2004; Yoshida, Assimacopoulos et al. 2006; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2007; Ceci, Lopez-Mascaraque et al. 2010). Considerando las evidencias observadas mediante marcaje con CFDA y la expresión del gen *Dbx1*, sugerimos que el VP produce células que expresan Reelina (CR) y que su patrón de migración es únicamente en dirección ventral caudal y no dorsal. También que existe un grupo de precursores que expresan *Dbx1* los cuales se extienden hasta la región anterior del HC y probablemente producen células CR que migran hasta la corteza lateral-dorsal. Con los datos anteriores nuestro trabajo confirma que el VP/PSB genera células que expresan Reelina que migran en dirección ventral hacia la corteza piriforme y carece de células que presenten migración dorsal. También, que en el HC se expresa el gen *Dbx1* lo que explicaría la presencia de células CR de precursores *Dbx1* en la corteza ya que dichas células migrarían dorsalmente desde el HC y no desde el VP/PSB.

5.4. La corteza piriforme y su diversidad celular

La corteza olfativa es una de las cuatro áreas corticales primarias donde se lleva a cabo un importante procesamiento de información sensitiva, información proveniente de los bulbos olfativos. A diferencia de la neocorteza, que está compuesta de seis capas, la corteza olfativa contiene tres capas y su región más prominente es la corteza piriforme. Además de la olfacción en animales no humanos como los roedores, tiene importantes funciones de comportamiento instintivo como reconocimiento de las crías, de amenazas y comportamiento sexual. Durante el desarrollo de la región olfativa ha sido consistente la observación de varios autores de que células de diversas poblaciones (Septum, VP, PSB eminencias ganglionares y de la región rostral medial) migran hacia dicha región, primordio de la corteza piriforme (de Carlos, Lopez-Mascaraque et al. 1996; Lavdas, Grigoriou et al. 1999; Anderson, Marin et al. 2001; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008; Huilgol and Tole 2016; Ruiz-Reig, Andres et al. 2017). Algunos autores han sugerido que la concentración de dichas células tiene funciones particulares como el correcto establecimiento de la misma o bien como sitios de preparación para otras regiones (Carceller, Rovira-Esteban et al. 2016; Huilgol and Tole 2016) y además que las células ubicadas en la corteza piriforme no son similares a las que conforman regiones como la neocorteza (Brunjes and Osterberg 2015). Nuestros hallazgos corroboran datos previos

que han mostrado que la corteza piriforme es un sitio de convergencia de varias poblaciones migratorias (Bielle, Griveau et al. 2005; Garcia-Moreno, Lopez-Mascaraque et al. 2008; Zimmer, Lee et al. 2010; Ceci, Pedraza et al. 2012). Al respecto, nosotros observamos que las células que analizamos, tanto las del VP, del telencéfalo dorsal y del Rld, tienen en común su dirección hacia la corteza piriforme. Las células originadas en el VP/PSB migran ventralmente y alcanzan la corteza piriforme y las células del Rld migraron en dirección ventral caudal hasta llegar al mismo sitio. También, las células originadas en la región dorsal del telencéfalo migran en dirección ventral hacia la corteza piriforme. Además, recientemente se sugirió que en la región olfativa existe una población celular que expresa Reelina la cual parece formar parte del tracto olfativo lateral que pasada la gestación presentan una segunda oleada de migración dirigiéndose a la neocorteza (de Frutos, Bouvier et al. 2016). Entonces, nuestros datos sugieren que la población celular proveniente del VP parece formar parte del complejo patrón de organización de la neocorteza mencionado previamente y que las células originadas en el Rld también contribuyen a establecimiento de la corteza olfativa. Estos hallazgos ponen de manifiesto la complejidad que existe durante el desarrollo del SNC.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados generados en este trabajo y a su análisis con base en la literatura se concluye lo siguiente.

Identificamos tres posibles marcadores de células CR. Después del análisis de 11 genes como posibles marcadores moleculares de células CR, únicamente *Scn3b*, *Stmn4* y *Er81* cumplieron los criterios de selección que establecimos al expresarse en sitios de origen para células CR y en la zona marginal de corteza. *Scn3b* y *Stmn4* fueron propuestos como posibles candidatos de subpoblaciones del VP/PSB. Sin embargo, nuestro análisis sugiere un origen diferente y la migración esperada desde el VP/PSB no pudo ser replicada de tal manera que los posibles marcadores fueron descartados. *Er81* se propuso como marcador de una población de origen rostral pero previo a finalizar este trabajo fueron publicados datos sobre este gen en la región rostral medial de tal manera que sólo fue utilizado para distinguir la población identificada por dichos autores de la identificada en este trabajo.

Identificamos las rutas de migración de células originadas en tres regiones diferentes del telencéfalo por marcaje fluorescente y cultivo de embriones completos durante 24 hrs. En la primera, identificamos el origen y la ruta migratoria de una población desconocida de células que incluyen células CR. Para esto, determinamos que un dominio rostral lateral (Rld) del telencéfalo origina células que siguen rutas de migración hacía la región caudal ventral en dirección hacia la corteza olfativa. Aproximadamente una tercera parte de estas células expresan marcadores de neuronas CR como *Reelina* y *Tbr1*. Por otra parte, corroboramos las rutas de migración que siguen dos poblaciones celulares previamente observadas. En este respecto, las células originadas en el palio lateral-dorsal siguen una ruta de migración en dirección ventral y las células originadas desde el palio ventral toman una ruta de migración en dirección ventral caudal, rutas migratorias originadas en sitios similares también han sido observadas por otros grupos de trabajo. Cabe mencionar que similar a lo propuesto en la literatura aproximadamente el 30% de las células originadas en el VP expresan marcadores de células CR como *Reelina* y *Tbr1*.

Examinamos el efecto de la ausencia del gen *Lhx5* sobre las poblaciones celulares analizadas en este trabajo. *Lhx5* afecta el patrón de expresión de *Stmn4* y *Scn3b* ya que estudios previos de nuestro laboratorio muestran que parece influir de manera importante sobre las células originadas en regiones caudales del telencéfalo como el CMTW, sitio probable de origen de las células marcadas por *Stmn4* y *Scn3b*. También, la carencia de *Lhx5* altera el patrón de migración de las células de origen rostral medial, así como, la expresión del gen *Er81*. Por otra parte, *Lhx5* no parece afectar la población rostral lateral ya que las rutas de migración de las células originadas en dicho sitio, en embriones *Lhx5*^{-/-}, no presentan importantes diferencias. Sin embargo, faltan evidencias para determinar específicamente si el gen *Lhx5* afecta la diferenciación o únicamente la migración a causa de anomalías morfológicas en el telencéfalo. Demostramos la existencia de una población celular no caracterizada que expresa Reelina y se ubica en la zona marginal de la corteza olfativa, es originada en un dominio rostral lateral en el telencéfalo y migra en dirección a la corteza olfativa, además su diferenciación y migración no parecen estar relacionadas con el gen de diferenciación cortical *Lhx5*.

Comprobamos que desde el VP/PSB no existe migración en dirección dorsal. Corroboramos que la región conocida como VP/PSB produce células y que algunas expresan Reelina pero éstas no migran en dirección dorsal, por el contrario, la ruta migratoria que presentan es en dirección ventral.

Comprobamos la presencia de un marcador genético de progenitores del VP/PSB y Septum en el Hem Cortical. Identificamos la expresión del gen *Dbx1* en la región anterior del Hem Cortical lo que podría explicar la expresión de dicho gen en el telencéfalo dorsal

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abellan, A., A. Menuet, et al. (2009). "Differential expression of LIM-homeodomain factors in Cajal-Retzius cells of primates, rodents, and birds." Cereb Cortex **20**(8): 1788-98.
- Abellan, A., B. Vernier, et al. (2010). "Similarities and differences in the forebrain expression of Lhx1 and Lhx5 between chicken and mouse: Insights for understanding telencephalic development and evolution." J Comp Neurol **518**(17): 3512-28.
- Alcantara, S., M. Ruiz, et al. (1998). "Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse." J Neurosci **18**(19): 7779-99.
- Anderson, S. A., O. Marin, et al. (2001). "Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences." Development **128**(3): 353-63.
- Angevine, J. B., Jr. and R. L. Sidman (1961). "Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse." Nature **192**: 766-8.
- Armentano, M., S. J. Chou, et al. (2007). "COUP-TFI regulates the balance of cortical patterning between frontal/motor and sensory areas." Nat Neurosci **10**(10): 1277-86.
- Assimacopoulos, S., E. A. Grove, et al. (2003). "Identification of a Pax6-dependent epidermal growth factor family signaling source at the lateral edge of the embryonic cerebral cortex." J Neurosci **23**(16): 6399-403.
- Bielle, F., A. Griveau, et al. (2005). "Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium." Nat Neurosci **8**(8): 1002-12.
- Bishop, K. M., G. Goudreau, et al. (2000). "Regulation of area identity in the mammalian neocortex by Emx2 and Pax6." Science **288**(5464): 344-9.
- Bishop, K. M., J. L. Rubenstein, et al. (2002). "Distinct actions of Emx1, Emx2, and Pax6 in regulating the specification of areas in the developing neocortex." J Neurosci **22**(17): 7627-38.
- Borello, U. and A. Pierani (2010). "Patterning the cerebral cortex: traveling with morphogens." Curr Opin Genet Dev **20**(4): 408-15.
- Brunjes, P. C. and S. K. Osterberg (2015). "Developmental Markers Expressed in Neocortical Layers Are Differentially Exhibited in Olfactory Cortex." PLoS One **10**(9): e0138541.

- Bulchand, S., E. A. Grove, et al. (2001). "LIM-homeodomain gene Lhx2 regulates the formation of the cortical hem." Mech Dev **100**(2): 165-75.
- Bulfone, A., S. M. Smiga, et al. (1995). "T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex." Neuron **15**(1): 63-78.
- Carceller, H., L. Rovira-Esteban, et al. (2016). "Neurochemical Phenotype of Reelin Immunoreactive Cells in the Piriform Cortex Layer II." Front Cell Neurosci **10**: 65.
- Ceci, M. L., L. Lopez-Mascaraque, et al. (2010). "The influence of the environment on Cajal-Retzius cell migration." Cereb Cortex **20**(10): 2348-60.
- Ceci, M. L., M. Pedraza, et al. (2012). "The embryonic septum and ventral pallium, new sources of olfactory cortex cells." PLoS One **7**(9): e44716.
- Crossley, P. H. and G. R. Martin (1995). "The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo." Development **121**(2): 439-51.
- Crossley, P. H., S. Martinez, et al. (2001). "Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles." Neuroscience **108**(2): 183-206.
- Cholfin, J. A. and J. L. Rubenstein (2007). "Patterning of frontal cortex subdivisions by Fgf17." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7652-7.
- Chowdhury, T. G., J. C. Jimenez, et al. (2010). "Fate of cajal-retzius neurons in the postnatal mouse neocortex." Front Neuroanat **4**: 10.
- D'Arcangelo, G. and T. Curran (1998). "Reeler: new tales on an old mutant mouse." Bioessays **20**(3): 235-44.
- D'Arcangelo, G., G. G. Miao, et al. (1995). "A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler." Nature **374**(6524): 719-23.
- de Carlos, J. A., L. Lopez-Mascaraque, et al. (1996). "Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat." J Neurosci **16**(19): 6146-56.
- de Frutos, C. A., G. Bouvier, et al. (2016). "Reallocation of Olfactory Cajal-Retzius Cells Shapes Neocortex Architecture." Neuron **92**(2): 435-448.
- Del Rio, J. A., B. Heimrich, et al. (1997). "A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections." Nature **385**(6611): 70-4.

- del Rio, J. A., A. Martinez, et al. (1995). "Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody." Cereb Cortex **5**(1): 13-21.
- Derer, P., M. Derer, et al. (2001). "Axonal secretion of Reelin by Cajal-Retzius cells: evidence from comparison of normal and Reln(Orl) mutant mice." J Comp Neurol **440**(2): 136-43.
- Fishell, G. (1995). "Striatal precursors adopt cortical identities in response to local cues." Development **121**(3): 803-12.
- Fonseca, M., J. A. del Rio, et al. (1995). "Development of calretinin immunoreactivity in the neocortex of the rat." J Comp Neurol **361**(1): 177-92.
- Fonseca, M. and E. Soriano (1995). "Calretinin-immunoreactive neurons in the normal human temporal cortex and in Alzheimer's disease." Brain Res **691**(1-2): 83-91.
- Furuta, Y., D. W. Piston, et al. (1997). "Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development." Development **124**(11): 2203-12.
- Garcia-Moreno, F., L. Lopez-Mascaraque, et al. (2007). "Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells." J Comp Neurol **500**(3): 419-32.
- Garcia-Moreno, F., L. Lopez-Mascaraque, et al. (2008). "Early telencephalic migration topographically converging in the olfactory cortex." Cereb Cortex **18**(6): 1239-52.
- Gilbert, S. F. (2005). Biología del desarrollo.
- Gorski, J. A., T. Talley, et al. (2002). "Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage." J Neurosci **22**(15): 6309-14.
- Grkovic, I. and C. R. Anderson (1997). "Calbindin D28K-immunoreactivity identifies distinct subpopulations of sympathetic pre- and postganglionic neurons in the rat." J Comp Neurol **386**(2): 245-59.
- Grove, E. A., S. Tole, et al. (1998). "The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice." Development **125**(12): 2315-25.
- Guillemot, F. (2005). "Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 639-47.

- Guillemot, F., Z. Molnar, et al. (2006). "Molecular mechanisms of cortical differentiation." Eur J Neurosci **23**(4): 857-68.
- Hamasaki, T., A. Leingartner, et al. (2004). "EMX2 regulates sizes and positioning of the primary sensory and motor areas in neocortex by direct specification of cortical progenitors." Neuron **43**(3): 359-72.
- Hanashima, C., M. Fernandes, et al. (2007). "The role of Foxg1 and dorsal midline signaling in the generation of Cajal-Retzius subtypes." J Neurosci **27**(41): 11103-11.
- Hanashima, C., S. C. Li, et al. (2004). "Foxg1 suppresses early cortical cell fate." Science **303**(5654): 56-9.
- Hanashima, C., L. Shen, et al. (2002). "Brain factor-1 controls the proliferation and differentiation of neocortical progenitor cells through independent mechanisms." J Neurosci **22**(15): 6526-36.
- Hatten, M. E. (1999). "Central nervous system neuronal migration." Annu Rev Neurosci **22**: 511-39.
- Hevner, R. F., R. A. Daza, et al. (2003). "Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons." Dev Neurosci **25**(2-4): 139-51.
- Hevner, R. F., T. Neogi, et al. (2003). "Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin." Brain Res Dev Brain Res **141**(1-2): 39-53.
- Hevner, R. F., L. Shi, et al. (2001). "Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6." Neuron **29**(2): 353-66.
- Huilgol, D. and S. Tole (2016). "Cell migration in the developing rodent olfactory system." Cell Mol Life Sci **73**(13): 2467-90.
- Imayoshi, I., T. Shimogori, et al. (2008). "Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline." Development **135**(15): 2531-41.
- Krubitzer, L. and J. Kaas (2005). "The evolution of the neocortex in mammals: how is phenotypic diversity generated?" Curr Opin Neurobiol **15**(4): 444-53.

- Lavdas, A. A., M. Grigoriou, et al. (1999). "The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex." J Neurosci **19**(18): 7881-8.
- Lee, S. M., S. Tole, et al. (2000). "A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus." Development **127**(3): 457-67.
- Liu, Q., N. D. Dwyer, et al. (2000). "Differential expression of COUP-TFI, CHL1, and two novel genes in developing neocortex identified by differential display PCR." J Neurosci **20**(20): 7682-90.
- Mallamaci, A., R. Iannone, et al. (1998). "EMX2 protein in the developing mouse brain and olfactory area." Mech Dev **77**(2): 165-72.
- Mallamaci, A., L. Muzio, et al. (2000). "Area identity shifts in the early cerebral cortex of Emx2^{-/-} mutant mice." Nat Neurosci **3**(7): 679-86.
- Mallamaci, A. and A. Stoykova (2006). "Gene networks controlling early cerebral cortex arealization." Eur J Neurosci **23**(4): 847-56.
- Marin-Padilla, M. (1990). "Origin, formation, and prenatal maturation of the human cerebral cortex: an overview." J Craniofac Genet Dev Biol **10**(2): 137-46.
- Marín-Padilla, M. (1999). "Desarrollo de la corteza cerebral humana. Teoría citoarquitectónica." Rev Neurol **29**(3): 208-16.
- Marín-Padilla M (1998). "Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex." Trends in neuroscience **21**(2): 64-71.
- Marin, O., J. Baker, et al. (2002). "Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections." Development **129**(3): 761-73.
- Marin, O. and J. L. Rubenstein (2001). "A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon." Nat Rev Neurosci **2**(11): 780-90.
- Marin, O. and J. L. Rubenstein (2003). "Cell migration in the forebrain." Annu Rev Neurosci **26**: 441-83.
- McConnell, S. K. (1988). "Fates of visual cortical neurons in the ferret after isochronic and heterochronic transplantation." J Neurosci **8**(3): 945-74.
- Meyer, G. (2010). "Building a human cortex: the evolutionary differentiation of Cajal-Retzius cells and the cortical hem." J Anat **217**(4): 334-43.

- Meyer, G., A. Cabrera Socorro, et al. (2004). "Developmental roles of p73 in Cajal-Retzius cells and cortical patterning." J Neurosci **24**(44): 9878-87.
- Meyer, G., A. M. Goffinet, et al. (1999). "What is a Cajal-Retzius cell? A reassessment of a classical cell type based on recent observations in the developing neocortex." Cereb Cortex **9**(8): 765-75.
- Meyer, G., C. G. Perez-Garcia, et al. (2002). "Expression of p73 and Reelin in the developing human cortex." J Neurosci **22**(12): 4973-86.
- Miguel, M.-P. (1998). "Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex." Trends in neuroscience **21**(2): 64-71.
- Miquelajauregui, A., A. Varela-Echavarria, et al. (2010). "LIM-homeobox gene Lhx5 is required for normal development of Cajal-Retzius cells." J Neurosci **30**(31): 10551-62.
- Monuki, E. S., F. D. Porter, et al. (2001). "Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway." Neuron **32**(4): 591-604.
- Moore, K. and T. V. Persaud (2013). Embriología clínica.
- Muzio, L., B. Di Benedetto, et al. (2002). "Emx2 and Pax6 control regionalization of the pre-neuronogenic cortical primordium." Cereb Cortex **12**(2): 129-39.
- Muzio, L. and A. Mallamaci (2005). "Foxg1 confines Cajal-Retzius neuronogenesis and hippocampal morphogenesis to the dorsomedial pallium." J Neurosci **25**(17): 4435-41.
- Nadarajah, B., J. E. Brunstrom, et al. (2001). "Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex." Nat Neurosci **4**(2): 143-50.
- Nery, S., G. Fishell, et al. (2002). "The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations." Nat Neurosci **5**(12): 1279-87.
- Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno, et al. (2004). "Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases." Nat Neurosci **7**(2): 136-44.
- O'Leary, D. D., S. J. Chou, et al. (2007). "Area patterning of the mammalian cortex." Neuron **56**(2): 252-69.
- O'Leary, D. D. and S. Sahara (2008). "Genetic regulation of arealization of the neocortex." Curr Opin Neurobiol **18**(1): 90-100.

- Ogawa, M., T. Miyata, et al. (1995). "The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons." Neuron **14**(5): 899-912.
- Ohishi, H., A. Neki, et al. (1998). "Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody." Neurosci Res **30**(1): 65-82.
- Parnavelas, J. G. (2000). "The origin and migration of cortical neurones: new vistas." Trends Neurosci **23**(3): 126-31.
- Pierani, A., L. Moran-Rivard, et al. (2001). "Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1." Neuron **29**(2): 367-84.
- Puelles, L., M. Martínez de la Torre, et al. (2008). Neuroanatomía.
- Rakic, P. (1972). "Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex." J Comp Neurol **145**(1): 61-83.
- Rakic, P. (1974). "Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition." Science **183**(4123): 425-7.
- Rakic, P. (1988). "Specification of cerebral cortical areas." Science **241**(4862): 170-6.
- Rakic, P. (1990). "Principles of neural cell migration." Experientia **46**(9): 882-91.
- Rakic, P. (1995). "Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11323-7.
- Rakic, P. (2009). "Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology." Nat Rev Neurosci **10**(10): 724-35.
- Rakic, P., A. E. Ayoub, et al. (2009). "Decision by division: making cortical maps." Trends Neurosci **32**(5): 291-301.
- Rash, B. G. and E. A. Grove (2007). "Patterning the dorsal telencephalon: a role for sonic hedgehog?" J Neurosci **27**(43): 11595-603.
- Rice, D. S. and T. Curran (2001). "Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development." Annu Rev Neurosci **24**: 1005-39.
- Rubenstein, J. L., K. Shimamura, et al. (1998). "Regionalization of the prosencephalic neural plate." Annu Rev Neurosci **21**: 445-77.
- Ruiz-Reig, N., B. Andres, et al. (2017). "Lateral Thalamic Eminence: A Novel Origin for mGluR1/Lot Cells." Cereb Cortex **27**(5): 2841-2856.

- Sahara, S., Y. Kawakami, et al. (2007). "Sp8 exhibits reciprocal induction with Fgf8 but has an opposing effect on anterior-posterior cortical area patterning." Neural Dev **2**: 10.
- Schwob, J. E., L. B. Haberly, et al. (1984). "The development of physiological responses of the piriform cortex in rats to stimulation of the lateral olfactory tract." J Comp Neurol **223**(2): 223-37.
- Segkilia, A., E. Seuntjens, et al. "Bmp7 regulates the survival, proliferation, and neurogenic properties of neural progenitor cells during corticogenesis in the mouse." PLoS One **7**(3): e34088.
- Siegenthaler, J. A. and M. W. Miller (2005). "Transforming growth factor beta 1 promotes cell cycle exit through the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in the developing cerebral cortex." J Neurosci **25**(38): 8627-36.
- Simeone, A., M. Gulisano, et al. (1992). "Two vertebrate homeobox genes related to the Drosophila empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex." EMBO J **11**(7): 2541-50.
- Soda, T., R. Nakashima, et al. (2003). "Segregation and coactivation of developing neocortical layer 1 neurons." J Neurosci **23**(15): 6272-9.
- Soriano, E. and J. A. Del Rio (2005). "The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after." Neuron **46**(3): 389-94.
- Storm, E. E., S. Garel, et al. (2006). "Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers." Development **133**(9): 1831-44.
- Stoykova, A., O. Hatano, et al. (2003). "Increase in reelin-positive cells in the marginal zone of Pax6 mutant mouse cortex." Cereb Cortex **13**(6): 560-71.
- Super, H., E. Soriano, et al. (1998). "The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus." Brain Res Brain Res Rev **27**(1): 40-64.
- Sur, M. and J. L. Rubenstein (2005). "Patterning and plasticity of the cerebral cortex." Science **310**(5749): 805-10.
- Takiguchi-Hayashi, K., M. Sekiguchi, et al. (2004). "Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles." J Neurosci **24**(9): 2286-95.

- Tissir, F. and A. M. Goffinet (2003). "Reelin and brain development." Nat Rev Neurosci **4**(6): 496-505.
- Tissir, F., C. Lambert De Rouvroit, et al. (2003). "Reelin expression during embryonic brain development in *Crocodylus niloticus*." J Comp Neurol **457**(3): 250-62.
- Tissir, F., A. Ravni, et al. (2009). "DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(39): 16871-6.
- Watanabe, D., H. Inokawa, et al. (1998). "Ablation of cerebellar Golgi cells disrupts synaptic integration involving GABA inhibition and NMDA receptor activation in motor coordination." Cell **95**(1): 17-27.
- Wichterle, H., D. H. Turnbull, et al. (2001). "In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain." Development **128**(19): 3759-71.
- Yamazaki, H., M. Sekiguchi, et al. (2004). "Distinct ontogenic and regional expressions of newly identified Cajal-Retzius cell-specific genes during neocortico-genesis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(40): 14509-14.
- Yoshida, M., S. Assimacopoulos, et al. (2006). "Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order." Development **133**(3): 537-45.
- Zembrzycki, A., G. Griesel, et al. (2007). "Genetic interplay between the transcription factors Sp8 and Emx2 in the patterning of the forebrain." Neural Dev **2**: 8.
- Zhao, Y., E. Hermesz, et al. (2000). "Genomic structure, chromosomal localization and expression of the human LIM-homeobox gene LHX5." Gene **260**(1-2): 95-101.
- Zhao, Y., H. Z. Sheng, et al. (1999). "Control of hippocampal morphogenesis and neuronal differentiation by the LIM homeobox gene Lhx5." Science **284**(5417): 1155-8.
- Zimmer, C., J. Lee, et al. (2010). "Role of Fgf8 signalling in the specification of rostral Cajal-Retzius cells." Development **137**(2): 293-302.

8. ANEXOS

8.1. SOLUCIONES

1. Solución de buffer de fosfatos (PBS)

NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH a 7.4 con HCl.

2. Medio de cultivo Luria-Bertani (LB)

Peptona 1%, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.1 %, para medio sólido se adicionó agar al 2%, ambos adicionados de Ampicilina 100 µg/ml, a un pH final de 7.0.

3. Solución de buffer TBE

Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3.

4. SSC 20X

NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M y se ajusta el pH a 4.5 con HCl diluido.

5. Buffer de hibridación

Formamida 50%, SSC 5X (pH 4.5), Heparina 50 µg/ml, Tween 20 0.1%, Yeast RNA 50 µg/ml, Salmon sperm DNA 50 µg/ml en agua DEPC.

6. Solución MABT

Ácido Maleico 0.1 M, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1 %, pH 7.5 con NaOH.

7. Solución NTMT

NaCl 0.1 M, Tris-HCl 0.2 M pH 9.5, MgCl₂ 50 mM y Tween-20 al 10% en agua desionizada estéril.

8. SOLUCIÓN SSC 20X

NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M y se ajusta el pH a 4.5 con HCl diluido.

9. PRIMERS *Dbx1* (cuarto exón):

Dbx1-FOR: CTGCAAAGCTGGGTGAAACG

Dbx1-REV: GATGTAGGCCAGAAGGGACC

8.2. LISTA DE ABREVIATURAS

A-P	Antero-posterior
BMP	Proteínas morfogénicas óseas
CFDA	Carboxy-fluorescein diacetate succinimydyl ester
CMTW	Pared telencefálica caudo-medial / Caudomedial telencephalic wall
CoP	Placa comisural
CPx	Plexo coroideo
CR	Células Cajal Retzius
DEPC	Dietil pirocarbonato
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia / Fluorescence-Activated Cell Sorting
Fgfs	Factor de crecimiento fibroblástico
GABA	Acido gama-aminobutírico
GFP	Proteína verde fluorescente
HC	Hem Cortical
IHQ	Inmunohistoquímica
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
MABT	Buffer de ácido maleico y Tween
M-L	Medio-lateral
PBS	Buffer de fosfatos
PBT	Buffet de fosfatos y Tween
PC	Placa cortical
PFA	Paraformaldehído
PP	Placa plexiforme / Preplaca
pRM	Palio rostro-medial
PSB	Límite entre el palio-subpalio
Rld	Dominio rostral lateral
RM	Rostro-medial
RMTW	Pared telencefálica medial rostral / Rostromedial telencephalic wall
SNC	Sistema Nervioso Central
SP	Subplaca
TBE	Buffer de Tris, borato y EDTA
VP	Palio ventral
WT	Wild type / Silvestre
ZM	Zona marginal
ZSV	Zona subventricular
ZV	Zona ventricular