

Tesis Doctoral

Rol del sistema GDNF/GFR α 1 en el desarrollo y maduración de precursores neuronales

Bonafina, Antonela

2017

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bonafina, Antonela. (2017). Rol del sistema GDNF/GFR α 1 en el desarrollo y maduración de precursores neuronales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6210_Bonafina

Cita tipo Chicago:

Bonafina, Antonela. "Rol del sistema GDNF/GFR α 1 en el desarrollo y maduración de precursores neuronales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6210_Bonafina

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Rol del sistema GDNF/GFR α 1 en el desarrollo y maduración de precursores neuronales

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Antonela Bonafina

Director de tesis: Dra. Maria Fernanda Ledda

Consejero de Estudios: Dr. Osvaldo D. Uchitel

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Profesor E. de Robertis" (IBCN-UBA-CONICET)

Fecha de Defensa: 15 de Marzo de 2017

A mi mamá

*“Terminar etapas,
abandonar lugares,
significa dolor,
pero también triunfo.”*

Mural de Colegio San Agustín,
9 de Julio, Bs.As.

Agradecimientos

Es muy loco después de tanto tiempo y después de tanto soñarlo encontrarse con esta página en blanco. Es el momento en que uno cae en cuenta que para lograr sus metas necesita el apoyo de mucha gente, y es el momento que uno entiende cuánto hay para agradecer...

A Fernanda y a Gustavo por abrirme las puertas de su laboratorio hace unos años. Y me abrieron las puertas cuando yo solo encontraba puertas cerradas, así que les voy a estar agradecida siempre por eso. Gracias Fer por enseñarme a tener pensamiento crítico, a hacerme preguntas y a intentar buscar las respuestas. Y gracias por estar atrás de los pasos que damos, es increíble sentir ese respaldo. Gracias Gustavo por estar siempre dispuesto a enseñar y a discutir experimentos. Y gracias especialmente por contagiar esa pasión con la que viví la ciencia.

A los chicos del laboratorio que me acompañaron durante estos cuatro años y pico. Gracias Pau, Fer, Lola, Facu, Ana y Anto. ¡Son un grupo de contención genial!!!! Gracias por bancar los caprichos, los nervios, las lágrimas y contagiar las risas. Pau y Fer, gracias por ser, además de compañeros de la facu hace mil años y del labo hace otros tantos, ya como hermanos de la vida. Es increíble que desde hace como diez años son más los días que estuvimos juntos que los que no, o sea que bancarme tanto tiempo tienen que tener algún mérito. Gracias Pau por dar una mano siempre, por esos mates dulces, por leerme la mirada antes que nadie. Gracias Fer por el apoyo, por la motivación y estar ahí firme en todo momento. Por las risas juntos..¡Ah! y los fernets. No olvidemos los fernets. Gracias Loleta por ser un gran apoyo sobre todo en tiempos de crisis... por alentarme, por los consejos miles y por ser de esas personas que iluminan el lugar donde están. Gracias Facu por las risas, por las discusiones eternas, por prestar la oreja siempre...y, además, ¡por la paciencia que me tenés! ¡Anilla!! Gracias por contagiar alegría, por estar atenta a cualquier cosa que necesitaba y por esas noches de estudios que fueron lo más divertido en tiempos turbulentos. ¡Antito!!! Gracias por estar siempre dispuesta a dar una mano, y ponerle onda a cada día en el labo.

A Maru por ser un apoyo contante... ¡aún a muchos kilómetros de distancia! Por ser mi gurú de libros, de comportamiento y de muchas cosas más. Gracias amiga.

A Trini por las salidas con cerveza de por medio, por las charlas eternas. Gracias amiga por los consejos científicos y de otras índoles.

A Lucas por transitar juntos estos momentos pretesis de tanto estrés y locura. Fueron muchísimos más divertidos con vos.

Al resto del laboratorio Falzone, Mati y Tomas, que siempre me brindaron una ayuda cuando lo necesité.

A la gente del IBCN que siempre me brindó su ayuda y sus consejos. En especial a Manu, gracias por estar siempre dispuesto a darme una mano, y siempre con una sonrisa; y a Pedro Bekinschtein, por la buena onda en darme consejos de comportamiento que usé en la tesis.

A mi alma máter, la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

A la ANPCyT y a CONICET por financiar mi doctorado.

A Seba Giusti, por ser el mejor guía que alguien puede aspirar a tener cuando transita sus primeros pasos en un laboratorio.

A Euge y Victorio por las risas y las charlas eternas en aquellas épocas.

A la Dra. Fiszer, por empujarme a aprender cuáles son mis propios límites.

A mis amigos. Gracias por ser mi segunda familia y mi red de contención. Haberlos encontrado es de las mejores cosas de mi vida. Gracias por bancarse mis ausencias por los tiempos del laboratorio.

A Nadu por estar siempre firme al pie del cañón.

A mis toquetones queridos por las risas durante todo este tiempo: Ale, Days, Eli, Flor, Male, Pame, Mati, Nadu, Nati, Sabri, Pau y Romi.

Al grupo Calzas por 11.25 y el aguante durante este último tiempo.

A Mariel y Pauli. Por seguirme queriendo aun cuando pasamos tanto tiempo sin vernos.

A mis amigas del 9: Celi, Mari, Gor, Eli, Gua, Ceu, Sarasa. Gracias Eli por el apoyo en estos tiempos difíciles que corren. Gracias Gor y Mari por estar ahí desde el momento cero, cuando esta tesis ni siquiera estaba en planes.

A Kike, por enseñarme lo bueno que son los fracasos.

A Ax, por interiorizarse siempre en lo que hago y por nuestras juntadas con vinito.

A mi familia.

Gracias Abue por ser la mejor abuela del mundo. No tenes competencia ni cerca.

Gracias viejo por estar siempre ahí ante cualquier cosa.

Gracias Fran y Mari por ser los mejores. No hay otra descripción. Son los mejores. Los amo.

Gracias Chris por ser la mejor compañía durante todo este proceso. Gracias por hacerme reír en días tristes, o en esos días que sentía que no iba a poder. Por motivarme siempre. Por ayudarme a ver siempre la solución más fácil. Sos el mejor compañero que pude haber elegido. Te amo.

Y el gracias más especial es a vos má. Por alentarme siempre. Cada logro, cada paso, es por vos. Sos todo. Te amo.

Resumen / abstract.....	8
Publicaciones.....	12
Hipótesis y objetivos.....	13
Glosario.....	14
Introducción general	
<i>Ligandos de la Familia de GDNF</i>	16
<i>Funciones biológicas del sistema GDNF/GFRα1</i>	19
Capítulo I: GDNF/GFR α 1 son reguladores clave de los progenitores neurales en la corteza cerebral en desarrollo	
<i>I-Introducción</i>	23
<i>I-Resultados</i>	37
<i>I-Discusión</i>	68
Capítulo II: GDNF/GFR α 1 en el cerebro adulto: rol en la neurogénesis hipocampal	
<i>II-Introducción</i>	75
<i>II-Resultados</i>	84
<i>II-Discusión</i>	100
Discusión general.....	106
Conclusiones generales.....	112
Materiales y métodos.....	114
Bibliografía.....	123

Rol del sistema GDNF/GFR α 1 en el desarrollo y maduración de precursores neuronales

Los progenitores neurales generan todas las neuronas del sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario -proceso conocido como neurogénesis-, manteniéndose algunos nichos neurogénicos activos en el cerebro adulto. Es necesaria una regulación precisa de la neurogénesis, para el correcto funcionamiento del sistema nervioso, debido a que fallas en este proceso están asociadas al desarrollo de diversas patologías. La transición desde un estado multipotente y proliferativo de los progenitores a un estado de diferenciación neuronal, está estrictamente regulada por diferentes programas moleculares intrínsecos y factores extrínsecos. Entre estos últimos, los factores neurotróficos cumplen roles cruciales para el desarrollo, el mantenimiento y la supervivencia de diferentes poblaciones neuronales. El factor neurotrófico derivado de la glía, GDNF (del inglés, Glial Derived Neurotrophic Factor), fue originalmente descrito por su capacidad de promover la supervivencia de neuronas dopaminérgicas, aquellas afectadas en la enfermedad de Parkinson. GDNF señala a través de GFR α 1, una proteína anclada a membrana por un dominio glicosil-fosfatidilinositol, en complejo con el receptor canónico Ret, o la molécula de adhesión neural, NCAM.

El objetivo general de la presente tesis consistió en identificar y analizar nuevas funciones de GDNF y sus receptores durante la proliferación y diferenciación de progenitores neuronales, tanto embrionarios como adultos.

En la primera sección de la tesis se estudió el rol del sistema GDNF y su receptor GFR α 1 durante el desarrollo de la corteza cerebral. El análisis de la expresión de GFR α 1 durante el desarrollo indicó que GFR α 1 se expresa desde edades tempranas en la corteza, incrementando sus niveles en forma inversamente proporcional a los niveles de expresión del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos básico, bFGF (del inglés, basic fibroblast growth factor), un factor que promueve la proliferación de los precursores corticales. Se observó que los niveles de expresión de GFR α 1 se correlacionan con la diferenciación neuronal. Ensayos utilizando precursores corticales aislados en cultivo demostraron que GDNF inhibe la respuesta de los precursores a bFGF, reduciendo los niveles de expresión de su receptor. De acuerdo con estos resultados, el análisis de animales transgénicos en los cuales la expresión de GFR α 1 fue suprimida en precursores neuronales,

presentaron una reducción en la complejidad neurítica de neuronas corticales y un aumento durante el desarrollo del número de precursores en proliferación.

En su conjunto, estos resultados evidenciaron que el sistema GDNF/ GFR α 1 cumple un rol fisiológico clave durante el desarrollo cortical, permitiendo una correcta sincronización entre los eventos de proliferación y diferenciación celular de los progenitores neurales.

Por otro lado, se estudió la función del sistema GDNF/GFR α 1 en la neurogénesis adulta. Estudios de la expresión de GFR α 1 demostraron que éste se encuentra altamente expresado en el giro dentado del hipocampo, un nicho neurogénico en el cerebro adulto. Utilizando ratones transgénicos en los cuales la expresión de GFR α 1 fue suprimida en progenitores neurales del hipocampo adulto, se observó que aquellas neuronas deficientes para este receptor presentaron una complejidad neurítica menor que aquellas neuronas generadas en animales control. Estos animales presentaron además defectos en su comportamiento, evidenciando un rol fisiológico del sistema GDNF/ GFR α 1 en el desarrollo, diferenciación e integración de las neuronas generadas en el hipocampo adulto.

De esta manera, en este trabajo de tesis doctoral se han identificado nuevas funciones para GDNF y su receptor, GFR α 1, relevantes en la regulación de la fisiología de los precursores neurales tanto embrionarios como adultos. Si bien existen diferencias entre ambas poblaciones celulares, el sistema GDNF/GFR α 1 emergería como un sistema de regulación general involucrado en procesos de diferenciación neuronal.

Palabras clave: GDNF, GFR α 1, bFGF, progenitores corticales, diferenciación celular, proliferación, neurogénesis adulta.

Role of GDNF / GFR α 1 in the development and maturation of neural precursors

During development, neural stem cells (NSCs) and their derivative progenitor cells give rise to all the neurons of the central nervous system, with only a few neurogenic zones remaining active in the adult. Because impaired regulation of progenitors causes many developmental disorders, it is crucial to understand the mechanisms underlying the behavior of progenitors including migration, proliferation, and differentiation. The transition of proliferative progenitor cells to fully differentiated neurons is controlled by an intrinsic cellular program, as well as extrinsic environmental cues, such as neurotrophic factors. Neurotrophic factors play key roles in the maintenance and survival of different neuronal populations in the peripheral and central nervous system. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) was originally discovered because of its ability to promote the survival of ventral midbrain dopaminergic neurons, those affected in Parkinson's disease. GDNF signals by binding to the glycosylphosphatidylinositol-anchored receptor GFR α 1 in complex with the canonic receptor tyrosine kinase Ret or the neural cell adhesion molecule (NCAM).

The aim of this thesis was to identify and analyze new roles of GDNF and its receptors during the proliferation and differentiation of neural progenitors both in the developing as in the adult nervous system.

To start analyzing the role of GDNF and its receptor GFR α 1 in cortical neurogenesis, GFR α 1 expression was analyzed in the forebrain during development. It was found that GFR α 1 is expressed from an early developmental stage, increasing its levels in inverse proportion to the levels of the mitogenic factor, bFGF. Furthermore, it was observed that the expression levels of GFR α 1 correlated with neuronal differentiation of cortical precursors. The addition of GDNF to cultures of neuronal precursors decreased the proliferation rate of the progenitors and increased morphological differentiation of postmitotic neurons. Analysis of animals deficient for GFR α 1 in neuronal precursors show lower neuritic complexity of cortical neurons, and an increase in proliferation rate of progenitors *in vivo*. Taken together, these results show that GDNF may be playing an antagonistic role to bFGF on cortical precursors. This would indicate that the GDNF /

GFR α 1 system plays an essential role in regulating the proliferative condition and the differentiation of cortical progenitors.

On the other hand, the role of the GDNF/GFR α 1 system in adult neurogenesis was analyzed. It was found that GFR α 1 is highly expressed in the dentate gyrus of the hippocampus, a neurogenic zone. Adult born granule neurons derived from mice deficient in GFR α 1 in neuronal progenitors of the adult hippocampus showed lower neuritic complexity than those observed in control mice neurons. Ablation of GFR α 1 in adult hippocampal progenitors was associated with behavioral deficits, providing new insights into its physiological importance.

In conclusion, in this manuscript new physiological roles of GDNF and its receptor, GFR α 1, were identified. Cortical and adult progenitors share certain characteristics and differ in others, however the GDNF/GFR α 1 system may act as a general regulator coordinating neuronal differentiation.

Key words: GDNF, GFR α 1, bFGF, cortical progenitors, cell differentiation, proliferation, adult neurogenesis.

- GDNF/GFR α 1 complex regulates proliferation and differentiation of cortical progenitor cells during development. **Antonela Bonafina**, Paula Fontanet, Fernando Alsina, Dolores Irala, Gustavo Paratcha, Fernanda Ledda. Manuscrito en preparación.
- GDNF/GFR α 1 complex promotes development of hippocampal dendritic arbors and spines via NCAM. Dolores Irala, **Antonela Bonafina**, Paula A. Fontanet, Fernando C. Alsina, Gustavo Paratcha and Fernanda Ledda. Development. 2016 Nov 15;143(22):4224-4235

El objetivo general de este proyecto fue encontrar nuevos roles fisiológicos de GDNF durante el desarrollo del sistema nervioso. Debido a que los procesos de regeneración que ocurren luego de una lesión en el tejido nervioso, comparten muchos de los procesos celulares y moleculares que controlan la formación y consolidación de las conexiones neuronales durante el desarrollo, la capacidad para desarrollar tratamientos efectivos para enfermedades neurodegenerativas dependerá en gran medida de los conocimientos sobre los principios que gobiernan el desarrollo normal de las distintas subpoblaciones neuronales. En particular, este proyecto se centró en elucidar el rol de GDNF y sus receptores durante la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales, las células que darán origen a neuronas tanto durante en el desarrollo embrionario como en el cerebro adulto.

Para alcanzar el objetivo general se propuso investigar los siguientes objetivos específicos:

- (i) Analizar el rol del sistema GDNF/GFR α 1 en la proliferación y diferenciación de progenitores corticales durante el desarrollo embrionario temprano, tanto *in vitro* como *in vivo*.
- (ii) Analizar el rol del sistema GDNF/GFR α 1 en la neurogénesis hipocampal adulta.

La hipótesis que se pretendió testear en este trabajo fue que el sistema GDNF/GFR α 1 cumple un rol fundamental en el desarrollo, proliferación y diferenciación de los precursores neuronales tanto embrionarios como adultos.

- ARNm** (Ácido Ribonucleico mensajero)
- ARTN** (*Artemin*; Artemina)
- BDNF** (*Brain Derived Growth Factor*; Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro)
- bFGF** (*basic-Fibroblast Growth Factor*, Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico)
- CAMs** (*Cell Adhesion Molecules*; Moléculas de Adhesión Celular)
- CDKs** (*Cyclin-Dependent Kinase*; Quinasa dependiente de Ciclinas)
- CKI** (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*; Inhibidor de Quinasas dependientes de Ciclinas)
- DRG** (*Dorsal Root Ganglia*, Ganglio de la Raíz Dorsal)
- cC-R** (Células de Cajal-Retzius)
- CGs** (Células Granulares del Giro Dentado)
- cGR** (Célula de la Glía Radial)
- cNE** (Células Neuroepiteliales)
- cPI** (Células Progenitoras Intermedias)
- EGF** (*Epidermal Growth Factor*; Factor de Crecimiento Epidérmico)
- FAK** (*Focal Adhesion Kinase*)
- Fyn** (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*)
- GABA** (ácido γ -aminobutírico)
- GD** (Giro Dentado)
- GDNF** (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*; Factor Neurotrófico Derivado de la Glía)
- GFAP** (*Glial fibrillary Acidic Protein*)
- GFR α 1** (*GDNF family receptors alpha1*; Receptor de la familia de GDNF alfa1)
- GFR α 2** (*GDNF family receptors alpha2*; Receptor de la familia de GDNF alfa2)
- GFR α 3** (*GDNF family receptors alpha3*; Receptor de la familia de GDNF alfa3)
- GFR α 4** (*GDNF family receptors alpha4*; Receptor de la familia de GDNF alfa4)
- GFP** (*Green fluorescent protein*; Proteína verde fluorescente)
- GLAST** (*Glutamate Aspartate Transporter*)
- HEK** (*Human Embryonic Kidney cell line*; Línea celular derivada de riñón embrionario humano)
- IGF-1** (*Insulin-like Growth Factor-1*; factor de crecimiento insulínico tipo 1)
- MAPK** (*Mitogen Activated Protein Kinase*; Proteína quinasa activada por mitógenos)
- NCAM** (*Neural Cell Adhesion Molecule*; Molécula de adhesión neuronal)

NE (Neuroesferas)

NGF (*Nerve Growth Factor*; Factor de Crecimiento Nervioso)

NRTN (*Neurturin*; Neurturina)

NT-3 (*Neurotrophin 3*; Neurotrofina 3)

NT-4 (*Neurotrophin 4*; Neurotrofina 4)

LICAM (*Ligand Induced Cell Adhesion Molecule*; Molécula de Adhesión Inducida por Ligando)

LTP (*Long-Term Potentiation*; Potenciación a Largo Plazo)

oRG (*outer Radial Glia*)

PC (Placa Cortical)

PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*; Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas)

PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*; Fosfoinositol 3-kinasa)

PLC γ (*Phospholipases C-gamma*; Fosfolipasa C-gamma)

PSPN (*Persephin*; Persefina)

Ras (*Rat Sarcoma*; Sarcoma de Rata)

Ret (*Rearranged during transfection proto-oncogene*)

RT-PCR (*Reverse Transcription PCR*; PCR reversa)

RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*; Receptor Tirosina-quinasa)

SNC (Sistema Nervioso Central)

SNP (Sistema nervioso Periférico)

Sox2 (*Sex determining Region Y-box 2*)

Src (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*)

Tbp (*TATA binding protein*; Proteína de Unión a TATA)

TGF β (*Transforming growth factor beta 1*)

TrkB (*Tropomyosin receptor kinase B*; Receptor Quinasa B de Tropomiosina)

VGAT (*Vesicular GABA Transporter*; Transportador Vesicular de GABA)

VGLUT (*Vesicular Glutamate Transporter*; Transportador Vesicular de Glutamato)

ZI (Zona intermedia)

ZM (Zona molecular)

ZV (Zona ventricular)

ZSG (Zona Sub Granular)

ZSV (Zona Sub Ventricular)

Ligandos de la familia de GDNF

Desde el descubrimiento del factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés: *Nerve Growth Factor*) [1] y su capacidad de promover la sobrevivencia de las neuronas, se hicieron numerosas investigaciones para identificar otros factores capaces de rescatar de la muerte celular a neuronas en cultivo, durante el desarrollo, o en modelos de injuria. Esto resultó en la identificación de un numeroso grupo de proteínas solubles, la gran mayoría denominados factores neurotróficos, capaces de promover la sobrevivencia neuronal en numerosos paradigmas experimentales. Además de promover la sobrevivencia celular, los factores neurotróficos pueden regular el número de neuronas en una población determinada, la extensión del árbol dendrítico, la sinaptogénesis, la maduración y la plasticidad neuronal [2, 3]. Entre ellos, el factor neurotrófico derivado de la glía, GDNF (del inglés, *Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor*), fue originalmente purificado del sobrenadante de una línea celular de un glioma de rata, y fue descrito inicialmente como un factor que promueve la sobrevivencia de neuronas dopaminérgicas, aquellas que degeneran en la enfermedad de Parkinson [4]. GDNF no solo actúa como neuroprotector para las neuronas dopaminérgicas en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (EP), sino que también se ha demostrado que rescata de la muerte celular a diferentes tipos neuronales como motoneuronas, neuronas noradrenérgicas y neuronas del sistema nervioso periférico [5, 6].

GDNF pertenece a la familia de proteínas GFL (Ligandos de la Familia de GDNF, o *GDNF Family Ligands*, en inglés), que a su vez pertenecen a la superfamilia de TGF β , (del inglés *Transforming growth factor beta 1*). La familia GFL consta de cuatro miembros: GDNF, NRTN (neurturina), ARTN (artemina) y PSPN (persefina). Los GFLs son proteínas solubles que pueden unirse a sus receptores en células blanco específicas, influenciando el desarrollo celular, su sobrevivencia, o su diferenciación [2]. Cada uno de estos ligandos de la familia de GDNF se unen con alta afinidad a uno de los Receptores de la Familia de GDNF, denominado GFR α (del inglés *GDNF Family Receptor alpha*): GDNF se une con alta afinidad a GFR α 1, Neurturina a GFR α 2, Artemina a GFR α 3 y Persefina a GFR α 4. Estos receptores se encuentran mayormente enriquecidos en balsas lipídicas anclados a la membrana plasmática mediante dominios glicosil fosfatidil inositol (GPI). Cuando un receptor GFR α interactúa con su ligando se generan cambios conformacionales en el

receptor que permiten la interacción homofílica en *cis* de dos moléculas de GFR α con sus respectivos ligandos. **(Figura 1)**

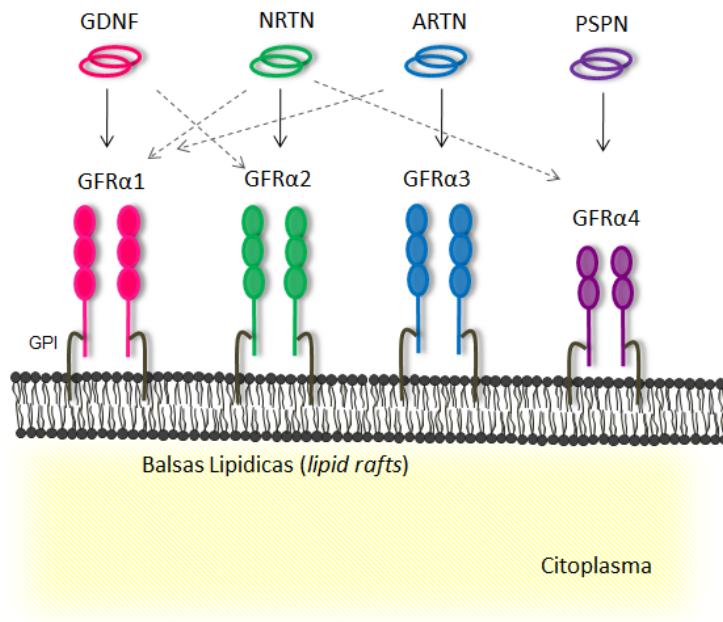


Figura 1: Esquema de los miembros de la familia de GDNF y sus receptores.. Los receptores de la familia de GDNF (GFR α s) están anclados a la membrana plasmática en microdominios lipídicos denominados balsas lipídicas (*lipid rafts*) por uniones de tipo GPI. Cada receptor presenta una mayor afinidad por su ligando específico (marcado en flechas continuas), sin embargo, pueden existir uniones cruzadas que se han identificado en ensayos *in vitro* (marcado en flechas punteadas) entre estos ligandos y receptores. [7]

Debido a que los GFR α s no presentan dominio intracelular, el complejo ligando-receptor requiere un co-receptor que pueda señalizar intracelularmente. La vía canónica por la que señaliza GDNF es a través del receptor tirosina quinasa (RTK, del inglés *Receptor Tyrosine Kinase*), Ret (del inglés, *Rearranged During Transfection*). Cuando GDNF o alguno de los miembros de la familia se une al receptor GFR α , el complejo recluta al receptor Ret hacia las balsas lipídicas, en donde se dimeriza, autofosforila y gatilla la activación de diversas vías de señalización subyacentes similares a las gatilladas por otros receptores RTK, como la vía de señalización de MAPK [8, 9], la vía de PI3K-Akt [10] y PLC γ . **(Figura 2, panel de la izquierda)**

Durante muchos años se restringió el estudio del sistema GDNF/GFR α 1 en aquellas estructuras donde se observaba expresión de Ret. Sin embargo, ensayos de hibridación *in situ* en el sistema nervioso central, mostraron que existía expresión de GFR α 1 en lugares donde el receptor Ret estaba ausente [11], evidenciando una función de GDNF independiente de Ret y

mediante algún otro receptor de membrana. En el año 2003 se identificó a NCAM (del inglés, *Neural Cell Adhesion Molecule*) como un receptor de membrana alternativo capaz de unirse a GFR α 1 en presencia de GDNF y gatillar una respuesta celular [12]. NCAM es una glicoproteína de adhesión celular altamente distribuida en el sistema nervioso, que participa en procesos de migración celular, proliferación, apoptosis, crecimiento neurítico y plasticidad sináptica [13]. El ARN mensajero de NCAM sufre empalme o *splicing* alternativo, resultando en la expresión de tres isoformas de NCAM que difieren en su asociación a la membrana plasmática y en sus dominios intracelulares: la isoforma NCAM¹²⁰, que es anclada a membrana a través de un dominio GPI, y las isoformas NCAM¹⁴⁰ y NCAM¹⁸⁰ que presentan un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático de diferente longitud. En particular, la isoforma NCAM¹⁴⁰ está asociada constitutivamente a Fyn, una tirosin-quinasa citoplasmática perteneciente a la familia de las Src-quinasas. La rápida activación de Fyn recluta a la proteína FAK (del inglés, *focal adhesion kinase*), gatillando vías de señalización intracelulares involucradas en varias respuestas como el reordenamiento del citoesqueleto para la migración celular [14] (**Figura 2**)

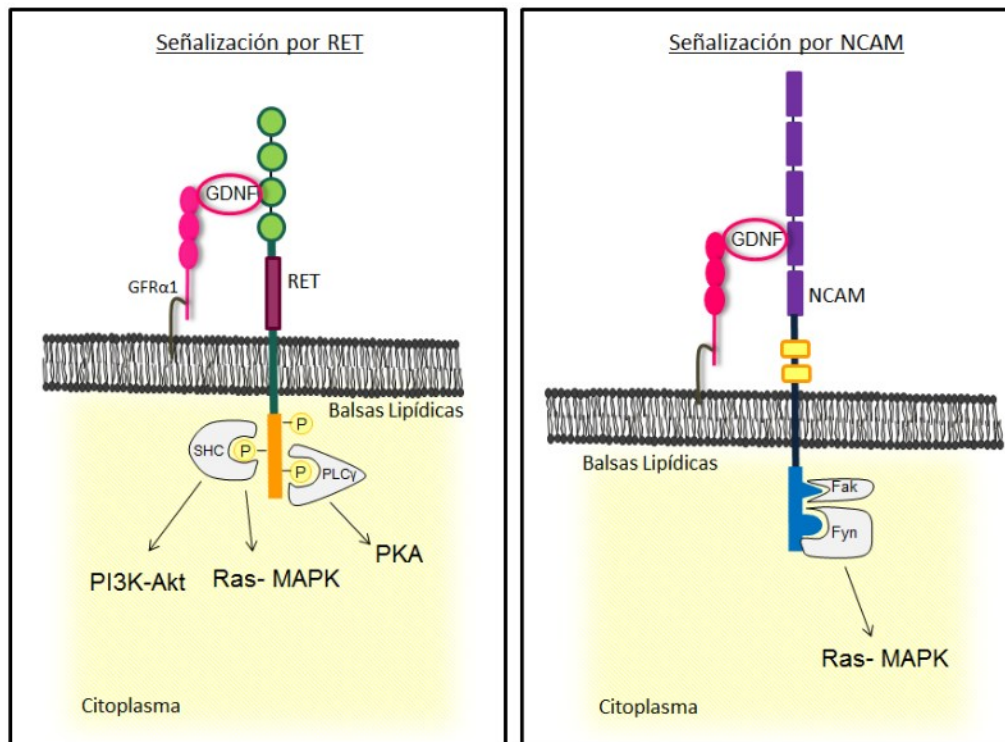


Figura 2: Señalización intracelular inducida a través de los receptores Ret o NCAM. El receptor GFR α 1 señala intracelularmente a través del receptor Ret o NCAM. En el panel de la izquierda se resume la señalización por Ret. Ret es un RTK que al asociarse con GDNF/GFR α 1 se recluta a las balsas lipídicas, se

dimeriza, se autofosforila y activa las vías intracelulares representadas en el esquema. En el panel de la derecha se resume la señalización por NCAM. En presencia de GDNF GFR α 1 recluta a la isoforma NCAM¹⁴⁰ a los raft, donde es activado y se dimeriza, e induce la vía de señalización Fyn/FAK/MAPK como indica el esquema. Para simplificar, las moléculas están representadas en su forma monomérica. *(Ilustración modificada de Paratcha G. y Ledda F. Cell 2008 [6])*

NCAM y Ret no son los únicos correceptores transmembrana del sistema GDNF /GFR α 1. Por ejemplo, GDNF es capaz de interactuar con Syndecan-3, un proteoglicano que presenta un dominio extracelular con uniones de heparán-sulfato, un dominio proteico transmembrana y otro intracelular que se asocia a varias vías de señalización intracelulares, activando por ejemplo a la quinasa Src. [15]. Existen poblaciones celulares como las neuronas de la eminencia ganglionar media, en las cuales se ha descrito recientemente que GDNF señala y cumple una función a través de GFR α 1, pero sin interactuar con ninguno de los receptores transmembrana reportados hasta el momento [16]. Es probable entonces, que existan otras proteínas de membrana capaces de interactuar con el sistema GDNF/GFR α 1 que aún no han sido elucidadas.

Funciones biológicas del sistema GDNF/GFR α 1

Luego del descubrimiento de GDNF como un promotor de la sobrevivencia de neuronas dopaminérgicas, se realizaron numerosos intentos de utilizar al ligando como terapia de la EP, con resultados variables. Curiosamente, animales deficientes para GDNF, GFR α 1 o Ret durante el desarrollo embrionario mostraron un correcto desarrollo de esta población neuronal, indicando que este sistema no es esencial para el desarrollo de estas neuronas o que existen compensaciones genéticas con otras moléculas. Dado que estos animales mueren al nacer, debido a una falla en el desarrollo renal, la relevancia fisiológica de este sistema permaneció sin analizar durante muchos años. Con el desarrollo de nuevas técnicas de manipulación genética, se realizaron estudios con ratones condicionales para GDNF y Ret que permitieron deletar estas moléculas en el sistema nigroestriatal. Sin embargo, se encontraron evidencias contradictorias acerca del rol fisiológico de este sistema en la sobrevivencia y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas. [17, 18].

Debido a que GDNF y sus receptores están ampliamente distribuido en otras regiones tanto fuera como dentro del sistema nervioso, se han descrito numerosas funciones de este sistema. GDNF funciona como un factor de sobrevivencia importante de motoneuronas. Es por esto

que se ha probado como un tratamiento para la esclerosis lateral amiotrófica (ALS, *Amyotrophic Lateral Sclerosis*), con buenos resultados [19]. Además, GDNF promueve la diferenciación de estas células, participa en el guiado axonal y en la conectividad neuromuscular. Las alteraciones en la barrera hematoencefálica (BHE) están implicadas en diversas neuropatías como la demencia y los accidentes cerebro-vasculares. Estudios recientes indican que GDNF está involucrado en el mantenimiento de los componentes celulares de la BHE, como los pericitos o las células endoteliales. GDNF es un potente factor de supervivencia de neuronas del sistema nervioso periférico. En neuronas del ganglio de la raíz dorsal, Ret se expresa en una subpoblación de neuronas que median la sensación de dolor. Trabajos recientes han demostrado que los ligandos de la familia de GDNF pueden regular esta respuesta al dolor [20]. La ablación de GFR α 1 en neuronas entéricas del tracto digestivo conlleva la degeneración de estas células y el desarrollo del fenotipo de la enfermedad de Hirschsprung's [21]. En la retina, GDNF estimula la supervivencia de los fotorreceptores durante la degeneración retiniana y previene de la muerte celular a las células ganglionares en modelos de glaucoma [22]. Por fuera del sistema nervioso, GDNF actúa como un morfógeno crucial en el desarrollo renal [23] y tiene un rol clave como regulador de la espermatogénesis [24].

Rol de GDNF y GFR α 1 en el hipocampo

El hipocampo es una estructura presente en el cerebro de los mamíferos, altamente estudiada debido a que cumple un rol fundamental en la decodificación de memoria de corto y largo término. GDNF, GFR α 1 y NCAM presentan altos niveles de expresión en neuronas hipocámpales durante su desarrollo y en etapas postnatales, a diferencia de Ret que no es detectable [6, 25]. GFR α 1 se expresa tanto en la membrana presináptica como postsináptica y es capaz de alterar el comportamiento celular debido a que puede funcionar como una molécula de adhesión celular mediada por ligando, un concepto denominado LICAM (del inglés, *Ligand Induced Cell Adhesion Molecule*). Este mecanismo de adhesión mediada por ligando representa un proceso de regulación de la adhesión celular ya que cambios en los niveles de receptor o ligando pueden resultar en cambios en la fuerza de adhesión de la unión homofílica en *trans* de los receptores en las membranas sinápticas [25, 26]. Es decir, que GFR α 1 promueve la adhesión entre las neuronas solamente en presencia de GDNF, describiendo un mecanismo novedoso de contacto célula-célula, regulada por factores externos.

En cultivos de neuronas hipocámpales, GDNF aumenta el número de sinapsis actuando sobre los compartimentos pre y postsinápticos. Estos efectos son dependientes de la expresión de

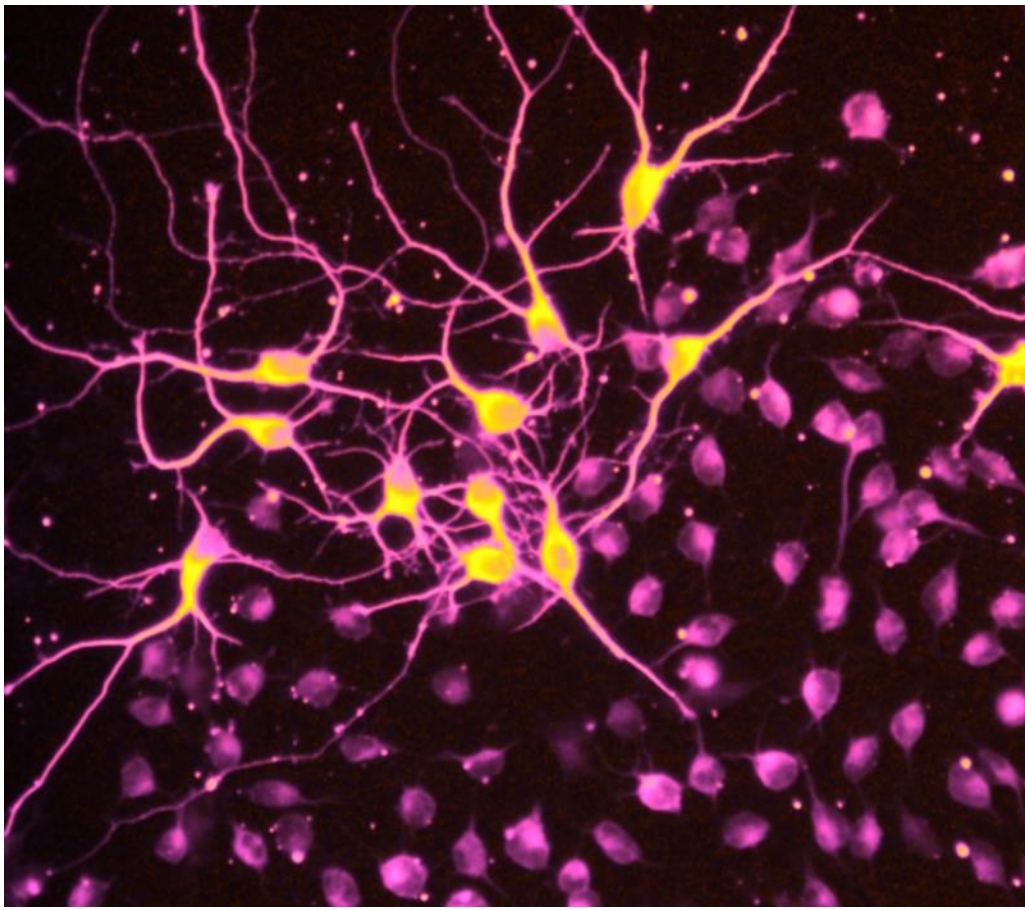
la isoforma de NCAM-140 en la membrana presináptica y de la isoforma de NCAM-180 en la post-sinapsis. Recientemente, [25] se evidenció que GDNF cumple un rol fundamental en el establecimiento de los patrones de conectividad sináptica en el hipocampo ya que regula el crecimiento y complejidad dendrítica de neuronas piramidales tanto *in vitro* como *in vivo*. Más aun, favorece la formación de espinas dendríticas y promueve la maduración de los terminales postsinápticos reclutando proteínas clave de las sinapsis excitatorias. Animales deficientes condicionales para el receptor GFR α 1 presentan una reducción en la densidad de espinas dendríticas *in vivo* así como cambios en los parámetros sinápticos con respecto a los animales control.

Estos resultados evidenciaron que GDNF es un factor neurotrófico esencial en procesos de conectividad sináptica y armado de los circuitos neuronales críticos durante el desarrollo del sistema nervioso, actuando en forma independiente del receptor transmembrana canónico, Ret.

Capítulo I

SNC en desarrollo

GDNF/GFR α 1 son reguladores clave de los progenitores neurales en la corteza cerebral en desarrollo



El desarrollo de la corteza cerebral

La corteza cerebral es una región del cerebro altamente especializada, derivada del telencéfalo dorsal, responsable de las capacidades cognitivas superiores de los mamíferos, como la conciencia, la memoria, la percepción de los sentidos y la coordinación motora. Es una estructura compleja, organizada en seis capas o láminas que contienen diferentes tipos neuronales y diversos tipos de células gliales [27]. Dentro de cada capa, las neuronas presentan identidades específicas, aunque comparten características similares como la morfología, el momento en el cual se generan y los patrones de conectividad. [28]. Dos tipos neuronales pueblan mayoritariamente la corteza: interneuronas, que presentan conexiones locales y son inhibitorias; y neuronas de proyección. Las neuronas de proyección son neuronas glutamatérgicas excitatorias caracterizadas por su típica morfología piramidal y que transmiten información entre diferentes áreas de la corteza y otras regiones del cerebro. Durante el desarrollo embrionario, son generadas a partir de progenitores de la zona germinal cortical, ubicada en la pared dorsolateral del telencéfalo (palio), y migran de manera radial hasta situarse en su localización final [29]. Por otra parte, las interneuronas utilizan principalmente ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor y durante el desarrollo son generadas a partir de progenitores localizados en la pared ventral del telencéfalo (subpalio), por lo que deben migrar largas distancias (migración tangencial) para poder ubicarse en su localización final en la corteza cerebral. [30]. **(Figura 3).**

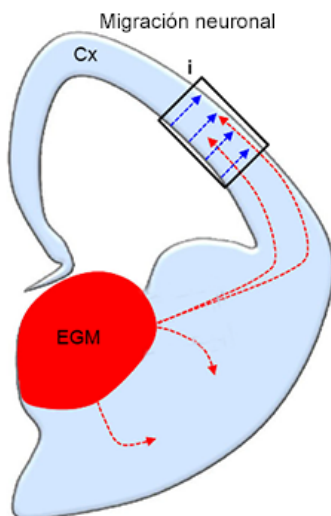


Figura 3: Migración neuronal durante el desarrollo cortical. Esquema de una hemisferia de ratón, señalando con flechas la dirección de la migración radial (azul) y tangencial (rojo). En contraste a la migración radial de células piramidales (en azul), las interneuronas corticales (en rojo) migran tangencialmente (C) largas distancias a través del cerebro en desarrollo, siguiendo señales extracelulares del medio ambiente neuronal. EGM: Eminencia ganglionar media, Cx: Corteza embrionaria de ratón en E13,5. (Ilustración modificada de Tyson y col., *Trends. Neurosc.*, 2014[31]).

El desarrollo normal del sistema nervioso central está orquestado por eventos moleculares y celulares precisamente sincronizados. Es necesario una correcta regulación de este proceso, dado que cualquier inconveniente puede resultar en eventuales desórdenes nerviosos, malformaciones cerebrales o enfermedades psiquiátricas [32]. Una vez que las neuronas llegan a su destino final, terminan su migración, y se produce la maduración de dendritas y axones, formación de sinapsis maduras y el establecimiento de una correcta red neuronal [33]. La corteza cerebral madura contiene diferentes tipos neuronales y gliales generados durante el desarrollo, ensamblados en diversos circuitos neuronales. Tanto las neuronas de proyección como los astrocitos -que constituyen la mayoría de las células presentes en la corteza- son generadas localmente. Además de estas poblaciones celulares, la corteza cerebral madura cuenta con interneuronas y con otras células gliales, los oligodendrocitos, generados en diversas regiones del cerebro ventral [34]. De esta manera, múltiples zonas progenitoras contribuyen a la gran variedad de tipos neuronales encontrados en la corteza cerebral [27].

Neurogénesis de neuronas de proyección durante el desarrollo cortical

Las neuronas corticales en la corteza cerebral de mamíferos se generan durante un período limitado, involucrando desde días hasta meses dependiendo de la especie. En humanos, la neurogénesis cortical empieza en la quinta semana gestacional y finaliza alrededor de la veinteva semana de gestación. [35, 36]. En roedores, los intervalos neurogénicos son menores, durando desde el día embrionario (E) 12,5 hasta E20,5 en ratas [37] y de E10,5 a E18,5 en ratones [38].

Durante el desarrollo temprano del sistema nervioso, hay una expansión dramática del neuroepitelio en la pared dorso lateral del tubo neural rostral que dará origen a las neuronas de proyección corticales. La capa adyacente al ventrículo se denomina como zona ventricular (ZV). A medida que la neurogénesis transcurre, una capa adicional proliferativa, llamada zona subventricular (ZSV) se forma por encima de la ZV [27, 37]. Los progenitores neurales que se ubican tanto en la ZV como en la ZSV producen las neuronas de proyección de las diferentes capas corticales en un orden temporal estrictamente controlado, y luego, las neuronas postmitóticas se posicionan en la corteza siguiendo patrones de migración radial. Las primeras neuronas aparecen alrededor del día E10.5 en el ratón y forman una estructura en forma de capa o lámina llamada pre placa (PP). La PP se divide más adelante en el desarrollo en una zona marginal (ZM) superficial y una sub placa (SP) profunda, con una placa cortical (PC) que se desarrolla entre ambas [39] (**Figura 4**). Dentro de las primeras neuronas que aparecen en la corteza cerebral se encuentran las

células de Cajal-Retzius (cC-R), que se ubican en la PP y la MZ durante la corticogénesis y mueren por apoptosis en las primeras semanas postnatales. Se originan en la zona ventricular del palio, aunque se han propuesto diferentes orígenes para las mismas como el área retrobulbar y la eminencia ganglionar media [40]. Las cC-R sintetizan reelina, una proteína de matriz extracelular, que cumple una función esencial en la organización de la migración radial de las neuronas post mitóticas, orquestando la correcta laminación de la corteza [41]. Las cC-R también regula la neurogénesis, la diferenciación de las neuronas que ocuparán las capas superficiales de la corteza y la invasión de las interneuronas GABA-érgicas [40]. La placa cortical (PC), que dará origen a una corteza madura, comienza a desarrollarse entre la ZM y la SP, de manera tal que las neuronas generadas más tardíamente migran y se ubican en la placa cortical en su zona apical, por encima de neuronas generadas anteriormente, de manera que las neuronas más antiguas quedan ubicadas en las capas más profundas. Es decir, las neuronas se organizan de una forma “de adentro hacia afuera” donde las neuronas generadas temprano en el desarrollo pueblan las capas corticales VI y V, y las neuronas generadas más tarde se ubican en las capas más superficiales (capa VI, III y por último la capa II) [39]. **(Figura 4)**

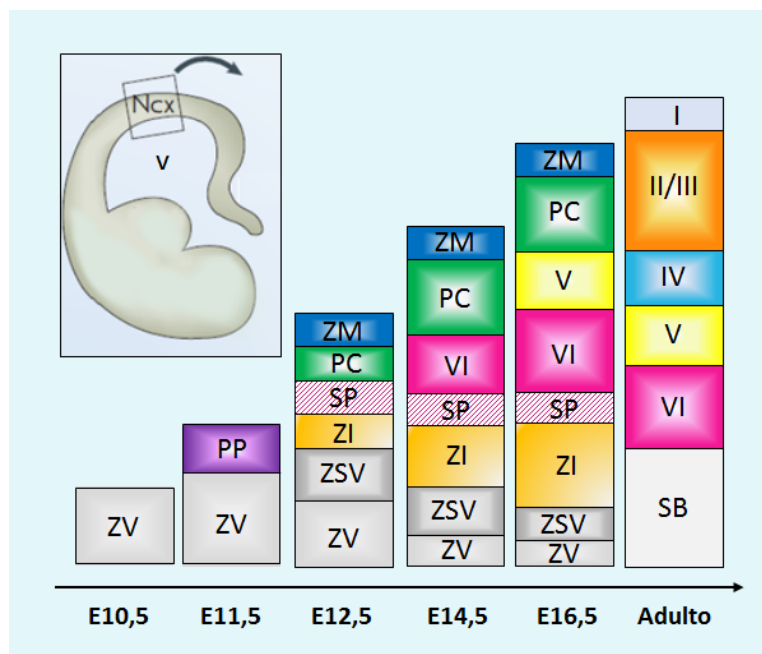


Figura 4: Los progenitores residentes en la VZ y la SVZ dan origen a neuronas de proyección de una manera “de adentro-hacia afuera”. Las primeras neuronas generadas forman la pre placa (PP), que es luego subdividida en una zona marginal superficial (ZM) y una subplaca (SP) profunda. La placa cortical (PC), que dará origen a la corteza multilaminada (capa I a VI), se desarrolla entre estas dos capas, de manera que las

últimas neuronas generadas que llegan a la PC migran y se ubican por encima de neuronas generadas anteriormente. E, día embrionario; Ncx, neocorteza; IZ, zona intermedia; ZV zona ventricular; SVZ, zona subventricular; SB sustancia blanca. Las edades embrionarias corresponden al período de desarrollo en ratón. *(Ilustración modificada de Macklis y col., Nature Reviews, 2007[27]).*

Los diferentes subtipos de neuronas de proyección presentes en la corteza madura se generan en una secuencia temporal precisa y se posicionan en capas específicas en la corteza cerebral. Existen dos modelos alternativos que pueden explicar el mecanismo por el cual este orden temporal es establecido. En un modelo se postula que el destino celular potencial de un progenitor neuronal podría cambiar a través del tiempo para generar los diferentes subtipos de neuronas de proyección en un orden temporal determinado [42]. Alternativamente, otro modelo postula que existirían múltiples tipos de progenitores neuronales coexistiendo, cada uno de los tipos intrínsecamente programados o restringidos en su destino celular [43]. Actualmente no se hay evidencias suficientes para sostener un modelo sobre otro, discutiéndose además la posibilidad de que ambos modelos ocurran, dado que no son mutuamente excluyentes [36].

Las neuronas de proyección generadas pueden clasificarse en tres subtipos: asociativas, comisurales y corticofugales [27]. Las neuronas de proyección asociativas se ubican en las capas I a VI y forman conexiones locales dentro del mismo hemisferio cortical. Por otro lado, las neuronas de proyección comisurales o corticocorticales se localizan principalmente en la capa II/III y, en menor número, en la capa V. Proyectan sus axones a través del cuerpo calloso hacia el hemisferio contra-lateral o hacia el estriado. Finalmente, las neuronas de proyección corticofugales, incluyen las neuronas corticotálamicas (se ubican principalmente en la capa VI y proyectan sus axones hacia distintos puntos del tálamo), y subcerebrales (se ubican en capa V y proyectan sus axones hacia tronco encefálico y médula espinal). [44].

Progenitores neurales

Existen al menos tres tipos de células madre o progenitores neurales en el sistema nervioso en desarrollo: células neuroepiteliales (cNE), células de la glía radial (cGR) y progenitores intermedios (cPI), que dan origen a todas las neuronas del sistema nervioso central [45]. Generalmente se utilizan dos criterios fundamentales para definir a una célula madre como tal: la capacidad de auto-renovación, idealmente durante un número ilimitado de divisiones celulares (división celular simétrica), y la multipotencia, es decir la aptitud para dar origen a diferentes tipos

de células diferenciadas (división celular asimétrica). Las células con una capacidad limitada de proliferación y de progenie son referidas como progenitoras neurales [45]. En el sistema nervioso de mamíferos en desarrollo solo las células neuroepiteliales (cNE) y su progenie directa, las células de la glía radial (cGR), tienen alta tasa de proliferación y son auto-regeneradas por numerosas rondas de división celular. Algunas de las células de la glía radial podrían persistir durante el desarrollo y, dependiendo de su locación, podrían tener un rol en la neurogénesis adulta [46]. Existe, además, otro tipo de progenitores neurales llamados progenitores basales o intermedios (cPI), estos se originan a partir de la mitosis de las cGR o de las cNE, y están más limitados que las anteriores en cuanto a su capacidad proliferativa. Aunque existen marcadores celulares para distinguir entre los diferentes tipos de progenitores neurales, y a pesar los progresos de los últimos años, no se conocen maneras de diferenciar entre las células progenitoras de una misma población capaces de seguir auto-renovándose (células madre) o de generar neuronas solamente (células progenitoras). Es decir, tanto las células neuroepiteliales como las de la glía radial son poblaciones neurales con células individuales mezcladas con diferentes grados de restricción en el destino celular. Es por esto que se usa el termino colectivo de células madre neurales o progenitores neurales para referirse a cualquiera de ambas poblaciones celulares [46]. A continuación, se enumeran las características de cada uno de los progenitores corticales:

i) Células neuroepiteliales (cNE). Al inicio de la neurogénesis cortical, tanto la placa como el tubo neural se componen de una sola capa de epitelio pseudoestratificado de cNE. Las cNE muestran características similares a las células epiteliales: polaridad celular a lo largo de su eje apical-basal, uniones estrechas y adherentes en el dominio latero-apical, expresión de receptores en el dominio basal para componentes de la lámina basal y proteínas transmembrana en el dominio apical. El neuroepitelio parece pseudoestratificado debido a que los núcleos de las cNE migran a través del eje apical-basal durante el ciclo celular (migración nuclear intercinética). Si bien las cNE se dividen mayoritariamente de manera simétrica, proliferativa para expandir la población celular de progenitores multipotentes, un pequeño porcentaje se divide de manera asimétrica, para generar las primeras neuronas post-mitóticas y las cGR [45].

ii) Células de la glía radial (cGR). Las células de la glía radial son progenitores neurales más restringidos en su destino celular que las cNE, y a medida que avanza la neurogénesis, las cGR reemplazan a las cNE. Las cGR fueron inicialmente descritas como células guía para la migración neuronal, dado que poseen largos procesos celulares que se extienden desde la ZV hacia la superficie cortical. Estas prolongaciones celulares tienen un rol crucial como andamios que guían a

las neuronas recién generadas hacia su localización final en la corteza [27, 33]. Debido a que le dan origen, las cGR comparten algunas características con las cNE tempranas: la expresión de la proteína Nestina, la presencia de uniones adherentes y el mantenimiento de una polaridad basal-apical [47]. Además, como las cNE, las cGR presentan migración nuclear intercinética, con su núcleo sufriendo mitosis en la superficie apical de la zona ventricular, y migrando hacia la superficie basal para la fase S del ciclo celular, pero, a diferencia de las cNE, el núcleo no migra atravesando todo el citoplasma celular. En contraste a las cNE, las cGR muestran características similares a las células astrogiales: la acumulación de gránulos de glucógeno en su citoplasma, y la expresión de varias proteínas características como el transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST), la proteína de unión al calcio S100 β , la proteína fibrilar glial ácida (GFAP), vimentina y la proteína cerebral de unión a lípidos (BLBP) [45]. Las cGR sufren división celular simétrica para ampliar la población de progenitores multipotentes, o asimétrica para generar neuronas, cPI o células de la glía. Por lo tanto, en la corteza cerebral las cGR originan neuronas a través de tres mecanismos: i) directamente por división celular asimétrica, ii) indirectamente, generando cPI y en una ronda más de generación estos generarán neuronas, y iii) indirectamente, generando cPI, pero con dos rondas de divisiones y posterior amplificación [48]. Como consecuencia, la gran mayoría de las neuronas en la corteza son generadas directa o indirectamente por cGR [45].

En los últimos años numerosos estudios en diferentes especies han revelado una diversidad de progenitores corticales. Se ha descrito un nuevo tipo de cGR denominadas como células de la glía radial basales (bGR o oGR, del inglés, *outer radial glia*) [49]. Estas células expresan marcadores de la glía radial apical o ventricular, pero carecen de prolongaciones que contacten con la VZ [50]. Las bGR se ubican en la parte basal de la ZSV [49] y se han encontrado en mamíferos con cerebros que presentan alto número de girificaciones, como el cerebro de hurón y el de humano [50]. Aunque las células bGR se encuentran en una pequeña proporción en el cerebro de roedores -comparada con la población encontrada en el humano- se piensa que la variación de la población de estas células contribuye a las diferencias encontradas en la estructura de la corteza cerebral entre mamíferos, como la expansión de la corteza y la girificación del cerebro [32].

iii) Células progenitoras intermedias (cPI). Las cPI o también conocidas como progenitores basales, se originan por mitosis y diferenciación a partir de las cNE y las cGR, y se ubican en la superficie apical de la ZV, formando la ZSV, una capa celular de alta mitosis. A diferencia de las cNE

y las cGR, el núcleo de las cPI durante la mitosis se encuentra en la superficie basal de la VZ, y generalmente emiten neuritas que no contactan con la superficie basal ni apical de la corteza en desarrollo. Las cPI se diferencian además de sus progenitoras por la expresión de ciertos factores de transcripción: tipo cut 1 y 2 (CUX1 y CUX2), y T-box 2 (Tbr2) [28], y contribuyen a la neurogénesis debido que sufren divisiones celulares simétricas que dan origen a dos neuronas postmitóticas. Las cPI constituyen los progenitores más abundantes en las etapas tardías de la neurogénesis, y contribuyen a la expansión de la corteza, generando dos neuronas o dos cPI, pero por cortas rondas de división. De esta manera, las cPI aumentan el número de neuronas generadas a partir de un número dado de cNE/cGR, permitiendo que exista otra ronda de división celular distante de la ZV. De esta manera, animales cuya corteza presenta girificación presentan una ZSV mayor, permitiendo una mayor expansión cortical [45]. **(Figura5)**

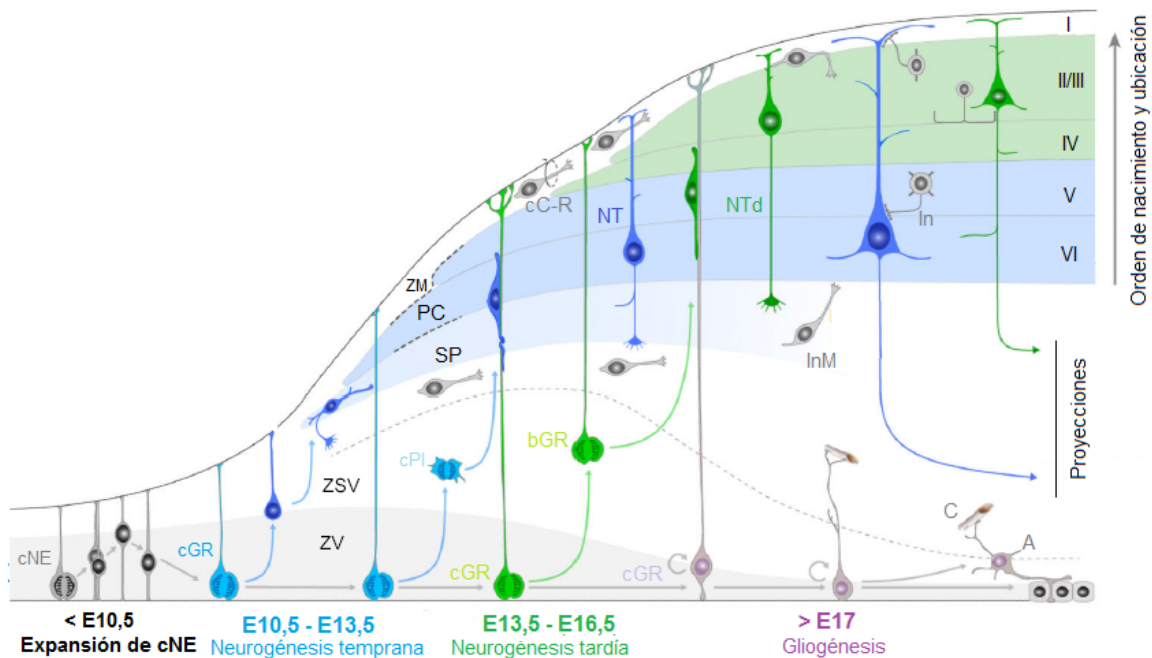


Figura 5: Neurogénesis en la corteza cerebral de mamíferos. Las cNE llevan a cabo división simétrica para producir un pool de progenitores corticales que luego se diferenciarán en cGR. Estas células residen en la ZV desde donde extienden un largo proceso radial hacia la superficie apical, que sirve de andamio para neuronas migrantes. Las cGR sufren divisiones celulares simétricas, generando dos cGR, y asimétricas, generando cGR y neuronas tempranas (NT). Las nuevas neuronas generadas migran radialmente desde la ZV, usando como guía el proceso celular de las cGR. Las primeras neuronas producidas migran para formar la PP, más adelante en el desarrollo embrionario, las siguientes neuronas generadas dividirán a la PP en la ZM y la SP. LA ZM también contiene las células de Cajal-Retzius (cC-R), que se originan de múltiples sitios en el cerebro anterior. A medida que la neurogénesis avanza, diversos subtipos neuronales son generados a partir

de las cGR. Las primeras neuronas generadas se asientan en las capas más profundas de la corteza (VI/V), y las neuronas generadas más tardíamente (NTd) en las capas superiores (IV/III/II). Además, algunas poblaciones de cGR generan cPI y bGR, que se ubicarán en la ZSV. Luego de los estadios neurogénicos, las cGR darán origen a astrocitos (A) y oligodendrocitos, o se transformarán en células endoteliales. La migración tangencial de interneuronas se observa en la ZM, Zona intermedia y la ZSV. Las proyecciones de las neuronas generadas maduran, y se establecen conexiones subcerebrales (con el estriado, tálamo, médula espinal) e intracorticales. (*Ilustración adaptada de Shibata y col. Trends Genet. 2015*[51]).

Neurogénesis de interneuronas corticales

Las interneuronas GABAérgicas juegan un rol fundamental en el funcionamiento de la corteza cerebral. A través de mecanismos mayoritariamente inhibitorios, las interneuronas controlan, entre otras cosas, la hiperexcitabilidad neuronal, la sincronización de respuestas sinápticas y la actividad cortical [52]. Un desequilibrio en el balance excitatorio-inhibitorio entre las neuronas piramidales y las interneuronas podría ser la causa de numerosos desórdenes neurológicos [53].

Durante el desarrollo prenatal, las interneuronas corticales se originan en el subpalio y migran de manera tangencial hacia el palio, donde se posicionan en láminas específicas de la corteza [54]. El subpalio embrionario consta de cinco regiones proliferativas: la eminencia ganglionar lateral (EGL), la eminencia ganglionar media (EGM), la eminencia ganglionar caudal (EGC) y el área preóptica (APO). Las interneuronas corticales en los roedores son generadas en su mayoría en la EGM, algunas en la EGC y muy pocas en el APO, entre E12,5 y hasta los primeros días postnatales [52]).

Existen numerosos subtipos de interneuronas, que se caracterizan según criterios morfológicos, electrofisiológicos y según el perfil de expresión de ciertos marcadores moleculares. [30]. Estos últimos incluyen las proteínas de unión al calcio parvalbúmina (PV), calbindina (CALB) y calretinina (CR); neuropéptidos como somatostatina (SST), péptido intestina vaso-activo (VIP), neuropéptido- γ y colecistoquinina (CCK); canales de potasio, la glucoproteína reelina, la enzima óxido nítrico sintetasa y el receptor de serotonina 5HT3a [55]. Las interneuronas GABAérgicas presentes en la corteza se pueden agrupar en cuatro clases: (I) interneuronas con morfología en cesto y candelabro, que expresan PV, y tienen disparos de potenciales de acción rápidos (*fast-spiking*); (II) interneuronas de axón largo que expresan SST. Esta población es heterogénea debido a que incluye a interneuronas que también pueden expresar CR, reelina y neuropéptido- γ . (III)

interneuronas con morfología bipolar que expresan frecuentemente CR o VIP y (IV) interneuronas de morfología multipolar que expresan neuropéptido- γ y/o reelina, pero nunca SST [52].

Las interneuronas corticales generadas durante el desarrollo tienen una gran capacidad migratoria a través del telencéfalo, una característica común de todas las interneuronas independientemente de su origen. Durante la migración las interneuronas generadas en la EGM, EGC o APO son indistinguibles, debido a que todas presentan una morfología común [55]. Una de las principales características que presentan estas neuronas migrantes es que presentan un proceso celular que se bifurca continuamente durante el ciclo migratorio. Estas bifurcaciones son generadas y modificadas en respuesta a factores del medio extracelular, y constituyen el mecanismo principal que determina la dirección o ruta de la célula migratoria (40). Es decir, que los diferentes tipos de interneuronas utilizan mecanismos celulares similares para dirigirse a la corteza cerebral, respondiendo a diferentes factores extracelulares, según las proteínas de membrana que expresan, un proceso controlado por programas de transcripción región-específicos [56]. Las trayectorias migratorias de las interneuronas presentan, diferentes patrones temporales y espaciales. En estadios tempranos del desarrollo, la primera cohorte de interneuronas migra ventralmente atravesando el estriado en desarrollo, e ingresan al palio por una corriente migratoria superficial, a lo largo de la ZM y la SP. En estadios intermedios y tardíos de la neurogénesis (E13,5-E17,5), las interneuronas circunvalan el manto estriatal y migran por una corriente migratoria profunda, atravesando el palio por la ZSV, mientras que una pequeña proporción de interneuronas continúa migrando por la corriente migratoria superficial [52]. Una vez completa la migración tangencial, las interneuronas invaden la CP por migración radial, y alcanzan su localización laminar final [57].

Rol de factores tróficos durante el desarrollo de la corteza cerebral

La capacidad de auto-renovación o de diferenciación de los precursores neurales está determinada por una interacción entre mecanismos celulares intrínsecos y factores extrínsecos secretados por el microambiente que los rodean. Estos factores son, en parte, factores de crecimiento secretados por células vecinas, por otras células progenitoras, neuronas o se encuentran en circulación por el líquido cefalorraquídeo [58]. Numerosos estudios resaltan la importancia del medio ambiente neural, dado que se ha descrito que regula el mantenimiento de la población de progenitores, la proliferación de los mismos, la supervivencia, y la generación de neuronas o glía de una manera espaciotemporal específica. Como un ejemplo de esto, cuando

progenitores neurales son puestos en cultivo, la proliferación o diferenciación de los mismos puede ser controlada con factores externos en el medio de cultivo.

Una gran parte de los estudios del microambiente neural durante el desarrollo de la corteza se centraron en encontrar factores extrínsecos que regularan el mantenimiento de la población celular progenitora. Es decir, factores que regularan la proliferación, auto-renovación, supervivencia de progenitores y que inhibieran la diferenciación neuronal/glial. Perturbaciones en la señalización de estos factores o sus receptores podrían llevar a una expansión inapropiada de la corteza o alteraciones en el número de neuronas generadas [58]. Entre estos factores, se identificó al receptor Notch como un factor un promotor de la auto-renovación de las cGR y un inhibidor de la neurogénesis [59]. Tres de los cuatro miembros de la familia de Notch se expresan en las zonas progenitoras (ZV/ZSV) de la corteza en desarrollo. Interrupciones en la vía de señalización de Notch revelaron un requerimiento tanto *in vitro* como *in vivo* de la vía canónica de Notch para el mantenimiento de los progenitores corticales [60]. Curiosamente, los ligandos de Notch no son expresados por las cGR, sino que son expresados por las cPI y las neuronas postmitóticas que ellas mismas generan, implicando la existencia de un proceso de retroalimentación negativa para mantener una relación apropiada entre el número de cGR y neuronas generadas [61].

El factor de crecimiento epidérmico EGF (del inglés, *epidermal growth factor*) y las neuregulinas, también favorecen la proliferación de los progenitores neuronales [62]. Es decir, que existen varias señales extrínsecas que cooperan para asegurar el mantenimiento de los precursores neurales.

Existe, además, numerosa evidencia que indica que las claves ambientales pueden regular también la diferenciación de los precursores corticales a neuronas o glía, regulando el momento y el número de neuronas que se generan. Se han descrito dos familias de factores solubles, la del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, del inglés, *platelet-derived growth factor*) y las neurotrofinas como promotores de la neurogénesis [58]. Ambas familias de ligandos inducen la activación de receptores del tipo RTK, al igual que FGF y EGF, pero desencadenando una promoción de la diferenciación celular en vez de la proliferación. Aunque se describe que la duración de la señal, o el contexto celular, puede ser la clave para diferenciar ambas respuestas, aún no se ha elucidado cómo es posible que la activación de vías celulares similares, puedan inducir respuestas celulares diferentes.

La primera pista de que PDGF podría estar regulando la diferenciación de progenitores neuronales, provino de estudios *in vitro* donde la adición al medio de cultivo del ligando promovía la neurogénesis [63]. Además, se reportó que animales deficientes para en uno de los receptores de PDGF, PDGFR α , eran letales embrionarios, y mostraron deficiencias en la formación del tubo neural, y ventrículos cerebrales colapsados [64]. Sin embargo, se necesitan más estudios para terminar de elucidar el rol de este sistema en la corticogénesis.

La segunda clase de factores solubles descrita como una posible promotora de la neurogénesis es la familia de las neurotrofinas. Las neurotrofinas son una familia de factores neurotróficos que incluyen a NGF, al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain derived neurotrophic factor*), y a las neurotrofinas 3 y 4 (NT3 y NT4, respectivamente). Esta familia de ligandos median sus efectos mediante dos tipos de receptores: los receptores RTK del tipo Trk y p75. En la corteza cerebral en desarrollo, los progenitores neuronales expresan BDNF y NT3, además de sus receptores TrkB y TrkC. Estudios en cultivo indicaron que BDNF y NT3 son expresados en cGR en cultivo, y que median la sobrevivencia de estas células [65]. Sin embargo, estudios de pérdida de función *in vivo* de TRkB demostraron que no hubo pérdida de sobrevivencia celular, pero si una disminución tanto en la proliferación como la diferenciación de los precursores. Como contraparte, la sobreexpresión de BDNF o NT3 en esta estructura conllevó a un aumento de las neuronas generadas [65]. Numerosos estudios más serán necesarios para determinar el rol que cumplen las neurotrofinas en esta población celular.

Un estudio reciente [66], que incluye ensayos de proteómica y transcriptómica, identificó a GDNF, NRTN e IFN γ (interferón γ) como los factores necesarios para promover la diferenciación de precursores neuronales *in vivo*.

Rol de bFGF durante el desarrollo de la corteza cerebral

Numerosos estudios indicaron que el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés *fibroblast growth factor*), es un regulador sumamente importante de la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de los precursores corticales. La familia de ligandos de FGF incluye a 22 miembros, algunos de los cuales (como FGF8 y FGF18) cumplen funciones como morfógenos junto a Wnt, Shh en la especificación neural y el desarrollo temprano del sistema nervioso [67]. Los ligandos FGF se unen a uno de los cuatro RTK descritos (FGFR1-4) con diferentes afinidades. La unión de un ligando FGF con alguno de sus receptores, causa la dimerización del receptor, autofosforilación y la subsecuente activación de dos vías intracelulares definidas: la cascada de Ras/MEK/MAPK y la

vía de PI3K/AKT. Como la mayoría de los receptores RTK, la duración de las señales intracelulares determina la respuesta celular, regulando eventos transcripcionales, dinámicas de citoesqueleto, y respuestas celulares como la proliferación celular.

Múltiples ligandos de FGF se encuentran expresados en regiones definidas del tubo neural y el neuroepitelio cortical durante la embriogénesis, sin embargo, muchos de sus roles no se han elucidado. La mayoría de los estudios de los ligandos FGF se centraron en el ligando FGF2 o bFGF (del inglés, *basic-FGF*), que se une con alta afinidad a FGFR1 y a ciertas isoformas de FGFR2, 3 y 4. bFGF es altamente expresado en el sistema nervioso en desarrollo, especialmente en la ZV [68] y además funciona como un mitógeno para los progenitores neurales en cultivo [69]. Los transcritos de bFGF se detectan desde E9 en la corteza embrionaria de ratón, específicamente en la ZV. Tanto los niveles proteicos como los de ARN mensajero de bFGF y de sus receptores FGFR1 y FGFR3 se incrementan dramáticamente desde E9 hasta E18 aproximadamente, donde decaen abruptamente. Es decir, el curso de expresión temporal de bFGF y sus receptores coincide con el período neurogénico en la corteza embrionaria de ratón [70]. Este patrón de expresión indicó que bFGF podría regular la proliferación de precursores o su diferenciación. La mayoría de los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* confirmaron que bFGF tiene un rol fundamental regulando la expansión y, por lo tanto, la proliferación de los progenitores neurales. Por ejemplo, estudios realizados en ratones deficientes para bFGF mostraron una organogénesis normal, excepto que presentaron una población disminuida de precursores neurales al inicio de la neurogénesis, debido a una disminución en la proliferación de estas células [71]. Además, una microinyección de bFGF dentro de los ventrículos cerebrales llevó a un aumento de células en la corteza cerebral, indicando un aumento en la proliferación de los precursores [70]. Es decir, que tanto estudios de ganancia como de pérdida de función indicaron que la señalización de bFGF promueve y regula la proliferación de precursores corticales. Cuando se anula la expresión de FGFR1 o FGFR3, se logra un aumento de la neurogénesis con un decremento de la proliferación [72]. Es decir, el sistema bFGF/FGFR podría funcionar como un sistema promotor de la expansión de la población de precursores neuronales, previniendo una diferenciación neuronal temprana.

Rol de GDNF/GFR α 1 durante el desarrollo de la corteza cerebral

Los primeros estudios de localización de GDNF y sus receptores GFR α 1 y Ret fueron realizados a través de la técnica de hibridación *in situ* [11, 73]. Estos estudios se enfocaron en elucidar las zonas de expresión de estas moléculas durante el desarrollo embrionario y en

cerebros de ratas adultas. Curiosamente se encontraron zonas como la capa glomerular del bulbo olfatorio o algunas zonas del cerebelo donde existía expresión de Ret y no así de GFR α 1, y de la misma manera, se vieron zonas como el hipocampo, donde GFR α 1 se encontraba expresado y no así Ret. Esto evidenció que ambos receptores podrían asociarse a otras moléculas y no necesariamente estar presente juntas para que GDNF pueda cumplir su función [11]. En particular en estos estudios se describió que existe expresión de GDNF y GFR α 1 en la corteza en desarrollo, pero no se ha descrito que exista expresión de Ret [11, 73, 74]. En la corteza madura, se observó una alta expresión generalizada para GFR α 2, mientras que GFR α 1 se expresa solo en algunas poblaciones neuronales corticales como la corteza cingulada [11, 18].

Estudios realizados con animales transgénicos deficientes para GDNF, GFR α 1 y Ret durante el período embrionario mostraron que la falta de estas moléculas alteraba el desarrollo normal de neuronas entéricas y sensoriales [21], pero sin embargo no se observaron anomalías en el desarrollo del cerebro. El estudio del rol de GDNF y sus receptores en el desarrollo postnatal no pudo realizarse durante largo tiempo debido a que animales deficientes para GDNF o GFR α 1 morían luego de nacer debido a una agenesia renal. Sin embargo, un estudio reciente [18], utilizando la estrategia de Cre-loxP para la generación de mutantes condicionales de GFR α 1 o GDNF, logró detectar el patrón de expresión de GFR α 1 y GDNF tanto en el cerebro adulto como durante el desarrollo. Este estudio corroboró en parte lo reportado en hibridaciones *in situ* [11] y encontró nuevas estructuras que expresan este sistema antes no detectadas, como por ejemplo una porción del cuerpo estriado. Es decir, que utilizando técnicas avanzadas de ingeniería genética es posible evidenciar roles de estas moléculas desconocidos hasta el momento.

Durante mucho tiempo no se analizó el rol de GDNF en el telencéfalo ya que numerosos laboratorios describieron la ausencia de Ret en estadios tempranos del desarrollo. Sin embargo, en los últimos años se describió un rol para el sistema GDNF/GFR α 1, independiente de Ret, en la diferenciación de precursores neuronales derivados de la EGM a interneuronas GABAérgicas. Además, se observó que GDNF promueve el desarrollo de los procesos celulares que las interneuronas utilizan para sensar el ambiente extracelular durante su migración a la corteza, promoviendo entonces la migración tangencial de estas células [74]. Recientemente [66], utilizando técnicas de secuenciación de última generación para identificar ligandos pro-neurogénicos, se identificó, entre otros factores, a GDNF. En este trabajo describen que el efecto mediado por GDNF sería de manera Ret dependiente, de manera contradictoria a la extensa bibliografía que demuestra la ausencia de Ret en esta población neuronal. En la presente tesis se

identificó a GDNF como un factor neurogénico, pero de manera Ret independiente, dado que no fue detectada su expresión, mediante las múltiples técnicas utilizadas.

Expresión y localización de GDNF/GFR α 1 durante el desarrollo embrionario cortical

Con el propósito de analizar el rol de GDNF en la neurogénesis cortical, se analizó la expresión del ARN mensajero (ARNm) del ligando GDNF y sus receptores en la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario. Para esto se realizó una extracción de ARNm a partir de cortezas cerebrales de rata de diferentes edades embrionarias, y una posterior PCR semicuantitativa de bajos ciclos de manera de poder analizar los niveles de expresión de GDNF y sus receptores conocidos: GFR α 1, Ret y NCAM. Además, se analizó la expresión de otro receptor de la familia GFR α , GFR α 2, cuya expresión ha sido descrita en la corteza postnatal, y la del receptor de bFGF, FGFR1, uno de los principales reguladores de la proliferación de los progenitores corticales. **(Figura 6, A y B)**. La expresión del ARNm de GDNF se mantuvo en niveles similares a lo largo del período analizado, con un pequeño aumento de expresión hacia la mitad del período neurogénico (E15,5). GFR α 1 aumentó su expresión durante la neurogénesis, disminuyendo notablemente en la corteza de animales neonatos, sugiriendo que podría cumplir un rol durante el período neurogénico del desarrollo cortical. Se observaron niveles de expresión de GDNF aun cuando los niveles de GFR α 1 detectados fueron bajos, indicando que podría ser necesario la presencia de GDNF para la inducción de GFR α 1

En contraste, el receptor GFR α 2 aumentó su expresión en corteza con el desarrollo embrionario, y se mantuvo su expresión hasta estadios postnatales. Estos resultados están de acuerdo a lo descrito en la bibliografía: GFR α 2 se encuentra altamente representado en la corteza cerebral es estadios postnatales, mientras que GFR α 1 se expresa a bajos niveles y en ciertas áreas corticales. Contrariamente, en el hipocampo GFR α 2 se encuentra poco representado y GFR α 1 presenta altos niveles de expresión durante las dos primeras semanas postnatales donde cumple funciones claves en la sinaptogénesis [11, 25]

De acuerdo con un gran número de trabajos previos, no se detectó expresión del receptor canónico de GDNF, Ret en la corteza cerebral en desarrollo [11, 73, 74] **(Figura 6 B)**. Antagónicamente, NCAM presentó niveles de expresión constantes durante todo el período neurogénico analizado **(Figura 6 A)**. Finalmente se analizó la expresión del ARNm de FGFR1, el cual mostró una alta expresión en estadios embrionarios tempranos, disminuyendo su expresión a medida que avanza el desarrollo embrionario.

Con el objeto de determinar la localización específica de GFR α 1 en la corteza en desarrollo, se examinó su expresión por inmunofluorescencia, usando un anticuerpo específico para GFR α 1 en cortes de cerebro de rata de E14,5. Se observó una alta expresión del receptor de GDNF en la placa cortical (PC) donde se encuentran las neuronas postmitóticas recién generadas, y una menor expresión en la zona ventricular (ZV) donde se ubican los precursores corticales en proliferación (**Figura 6 C**). Se observó además una alta colocalización de GFR α 1 con NCAM (**Figura 6 D**). De acuerdo a lo observado por PCR reversa, no hubo niveles detectables de RET por inmunofluorescencia en la corteza embrionaria (**Figura 6 E**).

Para caracterizar la localización de GFR α 1 en la corteza en desarrollo, se examinó el patrón de expresión de GFR α 1, y se comparó su expresión con la de otras proteínas que se expresan en poblaciones celulares específicas durante la corticogénesis. Mediante inmunofluorescencia, se comparó la expresión de GFR α 1 con: (i) Sox2 (de sus siglas en inglés *Sex determining Region Y-box 2*), un factor de transcripción que se expresa altamente en progenitores neurales proliferantes (Gotz 1998) y, por lo tanto, es una proteína altamente expresada en la ZV y la ZSV de la corteza y (ii) β III Tubulina, proteína de citoesqueleto que identifica principalmente neuronas post-mitóticas, presente en la ZI, PC y la ZM de la corteza en desarrollo. Se observó que la expresión de GFR α 1 fue baja en los progenitores de la ZV/ZSV, pero colocalizó fuertemente con el marcador neuronal β III Tubulina en la PC. (**Figura 6 F y G**). Estos resultados indicaron que el receptor de GDNF, GFR α 1 se encuentra expresado durante el desarrollo cortical, junto a NCAM, en las zonas de diferenciación neuronal.

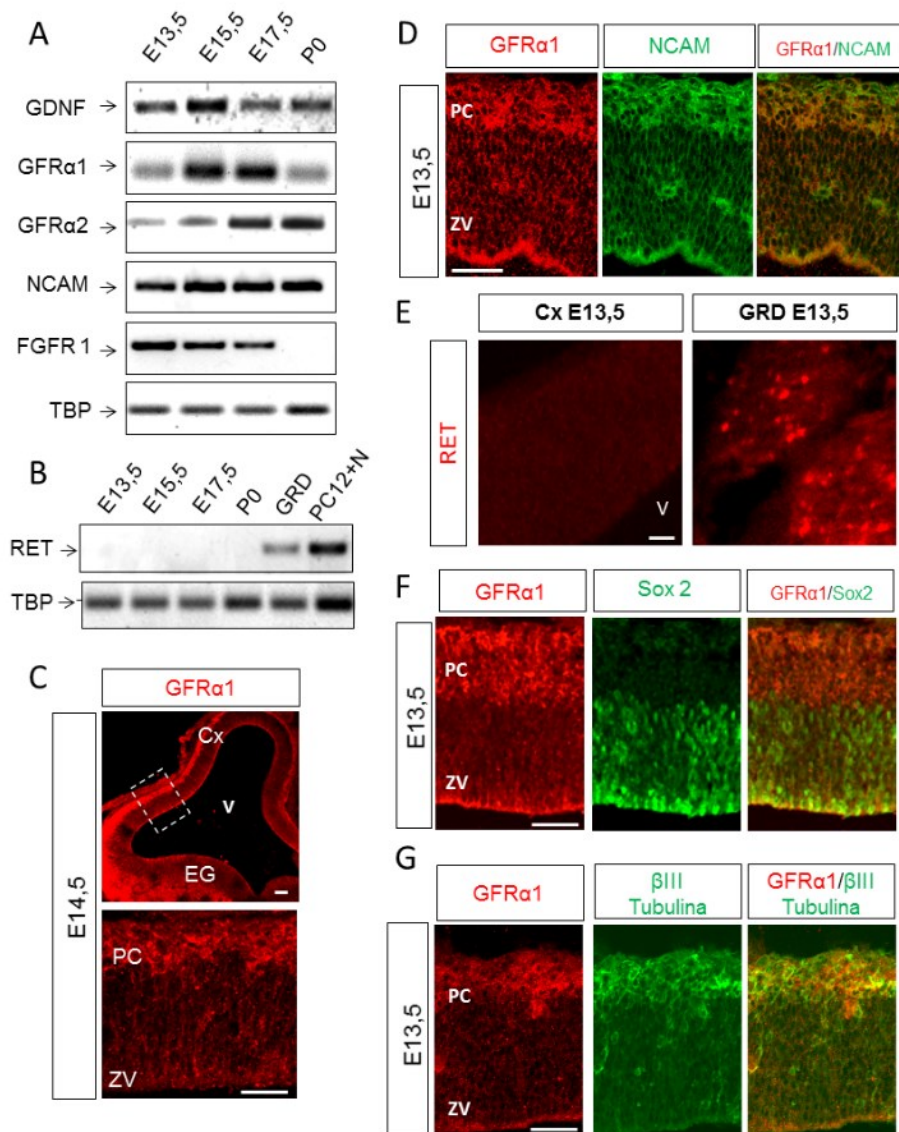


Figura 6: Expresión de GDNF y sus receptores durante el desarrollo cortical. (A) Expresión de GDNF, GFR α 1, GFR α 2, NCAM y FGFR1 analizada por PCR reversa (RT-PCR, del inglés *reverse transcription PCR*) de bajos ciclos (27 ciclos) mostrando los niveles de ARNm durante el desarrollo embrionario de la corteza cerebral de rata. La expresión del ARNm de la proteína de unión a la secuencia TATA (Tbp, del inglés, *TATA binding protein*) se utilizó como control. (B) RT-PCR de 35 ciclos mostrando que no se detectaron niveles significativos de Ret durante la corticogénesis. Se usaron los ARNm de la línea celular PC12 estimuladas con NGF (PC12+N) y de células de ganglios de la raíz dorsal de día embrionario 18 (GRD) como controles positivos de expresión de Ret. (C) Inmunofluorescencia contra GFR α 1 en cortes coronales de cerebro de rata de E14,5. (D) Inmunofluorescencia de GFR α 1 (en rojo) y NCAM (en verde) en cortes embrionarios de corteza de ratón de E13,5. Notar que existe colocalización total entre ambos marcadores. (E) Inmunofluorescencia de Ret en corteza y ganglios cervicales de la raíz dorsal de ratón de E13,5. No se detectó expresión de Ret

por inmunofluorescencia en la corteza. Como control positivo de la reacción se muestra la detección de Ret en ganglios anexos a la raíz dorsal cervicales presentes en los mismos cortes. (F, G) Co-localización por inmunofluorescencia de GFR α 1 con Sox2 (F) y β III Tubulina (G) en secciones coronales de ratón de E13,5. Sox2 se expresa en la zona ZV y la ZSV de la corteza en desarrollo; y β III Tubulina se expresa en la placa cortical donde marca neuronas diferenciadas.; Cx: corteza; EG: eminencia ganglionar; PC: placa cortical; ZV: Zona Ventricular; V: Ventrículo Escalas: 100 μ m.

Para estudiar si el sistema GDNF/ GFR α 1 era importante para la generación de neuronas a partir de precursores corticales, se realizaron cultivos primarios de corteza cerebral de rata, de E14,5 (Neurogénesis media) con especial cuidado de no disecar las eminencias ganglionares (ver Mat y Mét.). En este estadio, las cortezas están compuestas por una población celular heterogénea donde prevalecen los precursores neurales del tipo cGR. Luego de 5 días en cultivo, la mayoría de los precursores corticales se diferencian a neuronas postmitóticas en ausencia de ligando, mientras que los cultivos tratados con concentraciones saturantes del ligando bFGF (40 ng/ml) se componen en su mayoría de precursores en proliferación, positivos para nestina -un filamento intermedio específico de precursores neurales. En condiciones adecuadas de cultivo, estas células progenitoras imitan lo que sucede durante el desarrollo embrionario *in vivo*, es decir que proliferan, diferenciándose primero a neuronas (neurogénesis temprana) y luego, a células de la glía (gliogénesis tardía) [42]. Para determinar si la expresión de GFR α 1 varía en los precursores en proliferación respecto de las neuronas postmitóticas, se realizó una PCR semicuantitativa de bajos ciclos a partir de cultivos tratados o no con bFGF (40 ng/ml) (**Figura 7 A**). Se observó un aumento de la expresión de GFR α 1 en aquellos cultivos que no fueron tratados con bFGF respecto a los cultivos tratados con el ligando. También se analizó por RT-PCR la expresión de Ret en estos cultivos. De acuerdo a los resultados anteriores, no se observó expresión de Ret en cultivos en condiciones proliferativas y tampoco en aquellos mantenidos en ausencia de ligando (**Figura 7 B**).

Para determinar cuál era la composición celular de los cultivos y específicamente qué células estaban expresando el receptor de GDNF, GFR α 1, se realizaron inmunotinciones para GFR α 1 y nestina; y para GFR α 1 y β III Tubulina, en cultivos en las mismas condiciones anteriormente mencionadas (**Figura 7 C y F**). Se observó que los cultivos mantenidos en condiciones proliferativas estaban compuestos por un 65% de células nestina positivas aproximadamente, mientras que en cultivos en ausencia de ligando, las células nestina positivas apenas alcanzaban un 20% del total de células. Las células positivas para GFR α 1, sin embargo, alcanzaron un 40% del total de células en cultivos en ausencia de ligando y un 10%

de las células mantenidas en presencia de bFGF (**Figura 7 D y E**). Se vio, además, que la gran mayoría de las neuronas postmitóticas positivas para β III Tubulina en estos cultivos fueron positivas para GFR α 1 (**Figura 7 F**), mientras que la mayoría de las células que expresaban nestina no eran positivas para GFR α 1 o presentaban niveles muy bajos de expresión. Sin embargo, algunas células positivas para nestina presentaron una tenue tinción para GFR α 1 (**Figura 7 G**), indicando que GFR α 1 está presente en bajos niveles en células progenitoras y su expresión aumenta en neuronas postmitóticas, de acuerdo a los resultados observados *in vivo*.

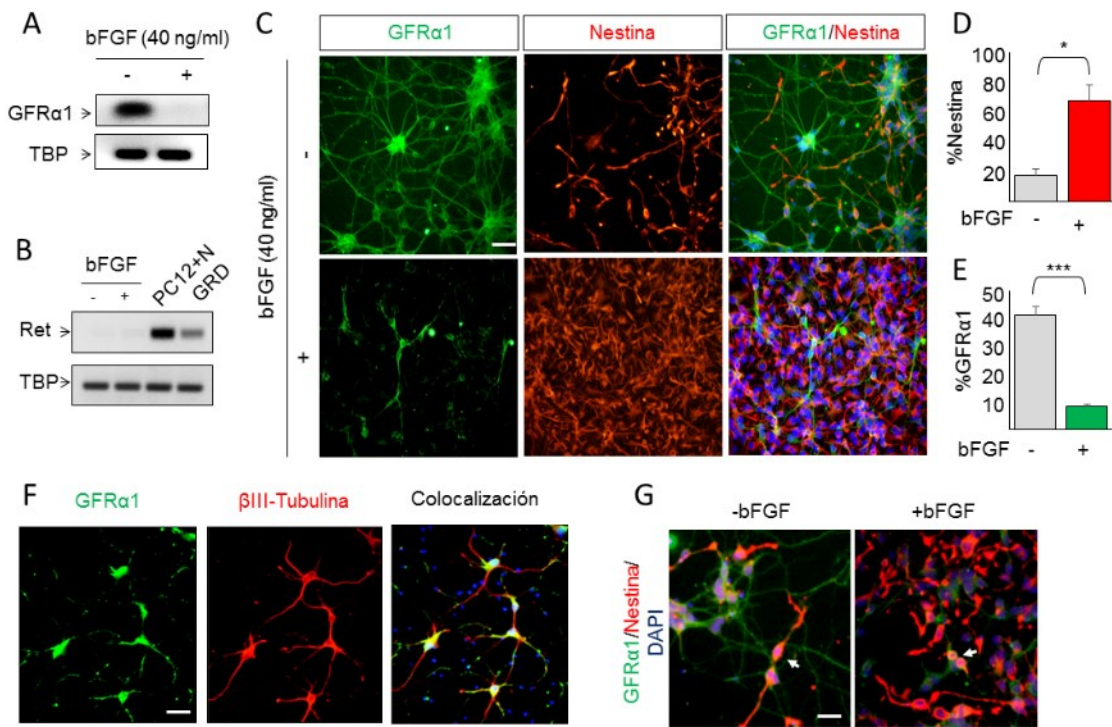


Figura 7: GFR α 1 correlaciona con la diferenciación neuronal en cultivos disociados de cortezas embrionarias de rata en E14,5. (A) Expresión de GFR α 1 analizada por RT-PCR de 27 ciclos en cultivos controles (sin ligando) y tratados con 40 ng/ml de bFGF. Se analizó el ARNm de la proteína de unión a la secuencia TATA (Tbp, del inglés, *TATA binding protein*) como control. (B) RT-PCR de 35 ciclos, mostrando que no se detectaron niveles significativos de Ret en estos cultivos. Se usaron los ARN mensajeros de la línea celular PC12 estimuladas con el factor de crecimiento nervioso (NGF) y de células del ganglio de la raíz dorsal de E18 como controles positivos de expresión de Ret. La concentración de bFGF utilizada fue de 40ng/ml. (C) Imágenes representativas de precursores corticales en cultivo crecidos durante 5 días en ausencia o presencia de bFGF (40 ng/ml) y teñidos con anticuerpos anti -nestina (rojo) o anti-GFR α 1 (verde). Escala: 200 μ m. (D y E) Los gráficos de barra indican la cuantificación del porcentaje de células positivas para nestina (D) y GFR α 1 (E) tanto en presencia como en ausencia de bFGF. Los datos muestran el promedio de tres

experimentos independientes \pm error estándar D: * $p < 0,05$; E: * $p < 0,001$. Test T Student. (F) Imágenes que muestran la colocalización de GFR α 1 y el marcador neuronal β III Tubulina en precursores disociados crecidos en ausencia de bFGF. Escala: 100 μ m (E) Fotografías mostrando la colocalización entre los marcadores nestina y GFR α 1. Escala: 100 μ m.

GDNF no modifica el destino celular de precursores corticales

Se conoce que numerosos factores tróficos además de promover la supervivencia neuronal, pueden comprometer el destino celular de las células madres proliferantes [32]. Con el fin de examinar los efectos de GDNF sobre el destino celular de los progenitores neuronales, se realizaron cultivos primarios de cortezas embrionarias de rata en E14,5. Los precursores fueron cultivados en condiciones control, en presencia de bFGF (40 ng/ml), en presencia de GDNF (100 ng/ml) o en presencia de ambos ligandos. Luego de 5 días en cultivo, se fijaron los cultivos y se procedió a analizar la expresión de distintos marcadores de destino celular. Se analizó la diferenciación glial y neuronal realizando inmunotinciones para la proteína fibrilar ácida de la glía, GFAP (del inglés, *Glial fibrillary acidic protein*), presente en astrocitos; el marcador neuronal, β III Tubulina y el marcador de oligodendrocitos, O4. Todos estos destinos celulares son generados a partir de las cGR. Este análisis reveló que el tratamiento con bFGF resultó en un incremento en la proliferación celular, por lo tanto, un aumento de precursores corticales; y en un bajo número de células diferenciadas. La mayoría de los progenitores cultivados en presencia de bFGF resultaron positivos para nestina y una pequeña proporción de ellos se diferenció, resultando positivos para GFAP (aprox. 10%), para β III Tubulina (aprox. 4%) y para O4 (menos del 7%) (**Figura 8 A, B, C, E**). Se observó que la adición de GDNF a los cultivos en condiciones control, o en presencia de altas concentraciones de bFGF (40 ng/ml), no cambió la proporción de neuronas ni de células gliales generadas en cultivos mantenidos con o sin bFGF, en las condiciones establecidas (**Figura 8**). Es decir, GDNF no modificó el destino celular neuronal ni glial de los precursores corticales. Sin embargo, la presencia de GDNF resultó en un claro efecto morfológico sobre las neuronas postmitóticas, positivas para β III Tubulina, observándose una mayor complejidad neurítica en aquellas neuronas cultivadas en presencia del factor neurotrófico (**Figura 8 A, recuadros**).

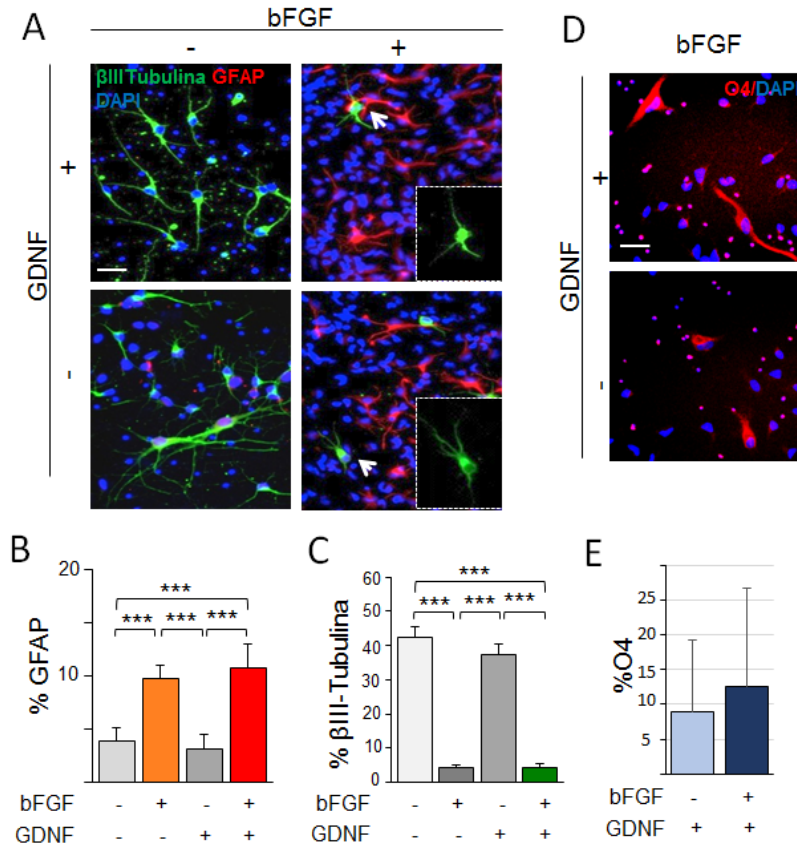


Figura 8: GDNF no modifica el destino celular de los precursores corticales. (A) Imágenes de precursores corticales en cultivo, en condiciones control, en presencia de concentraciones saturantes de bFGF (40 ng/ml), en presencia de GDNF (100 ng/ml) o en presencia de ambos ligandos teñidos con anticuerpos anti-GFAP (rojo) anti-βIII Tubulina (verde). Escala: 100 μm. (B, C) Análisis cuantitativo del efecto de GDNF en la diferenciación glial (B) o neuronal (C). Se cuantificaron células positivas para βIII Tubulina o GFAP sobre el total de células observadas. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes ± error estándar. * $p < 0.001$ (ANOVA de una vía, seguido de un test de comparación múltiple de Bonferroni). (D) Inmunofluorescencia para O4 (rojo). Sólo se muestra tratamiento con bFGF en ausencia o presencia de GDNF, debido a que en situaciones controles no se observaron células positivas para este marcador. Escala: 100 μm. (E) Se cuantificaron células positivas para O4 sobre el total de células observadas. Los resultados muestran el porcentaje ± SEM de un experimento representativo. Este experimento fue realizado por triplicado con resultados similares. No se encontraron diferencias significativas (Test T de Student).

GDNF es capaz de gatillar una respuesta biológica en los precursores corticales, dependiendo de NCAM.

Para confirmar que GDNF era capaz de desatar una respuesta biológica en los precursores corticales, se estudiaron las señales disparadas por GDNF en estas células. Se analizaron vías de

señalización conocidas para el sistema GDNF/GFR α 1. Cuando el sistema GDNF/GFR α 1 actúa independientemente del RTK Ret, y lo hace a través de NCAM, dispara diferentes vías de señalización que resultan en una promoción de la supervivencia neuronal y diferenciación celular. Estas vías de señalización involucran la activación de la cascada de MAPK (del inglés, *mitogen activated protein kinase*), la cascada de FAK/Fyn, y no involucran a la cascada de Akt, ampliamente reconocida por favorecer además de la supervivencia neuronal, la proliferación celular [12]. La cascada de Akt se gatilla generalmente cuando hay una señal que involucra receptores de membrana del tipo RTK, como por ejemplo el FGFR1. Para llevar a cabo este estudio, se mantuvieron cultivos de precursores corticales en proliferación durante 5 días. La noche anterior a la estimulación los cultivos fueron desprovistos de bFGF durante 16-20 horas para reducir al máximo todas las vías intracelulares activas, y posteriormente los cultivos fueron estimulados con GDNF (100 ng/ml) o bFGF (25 ng/ml) a diferentes tiempos. Se observó que la estimulación de cultivos de precursores con bFGF, resultó en un aumento significativo de la fosforilación de Akt, FAK y de MAPK, una respuesta esperable para un receptor de tipo RTK, ya que todas estas vías son necesarias para promover supervivencia, y proliferación de precursores. Cuando estos cultivos fueron estimulados con GDNF, se observó un aumento en la fosforilación de MAPK y FAK-aunque menor que la observada para FGFR1- pero no hubo respuesta de Akt (**Figura 9, A-D**). Estas observaciones indican que los precursores corticales responden a GDNF, pero no de la misma manera que bFGF, activando las vías de señalización descritas para el receptor alternativo NCAM.

Para analizar el receptor asociado a GFR α 1 en la respuesta a GDNF en los precursores corticales, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de NCAM o Ret a partir de cultivos de progenitores corticales en proliferación estimulados con GDNF y luego se estudió la señal asociada a estas moléculas. Para ello, después de crecer los cultivos en condiciones de proliferación durante 5 días, los mismos fueron privados de bFGF por 16-20 horas y estimulados con GDNF. Se realizó una inmunoprecipitación utilizando anticuerpos dirigidos contra la región extracelular de NCAM (NCAM^{ECD}), de manera de enriquecer el lisado de células en este receptor, seguido de un inmunoblot utilizando anticuerpos anti-fosfo-Src quinasa, que detectan a fosfo-Fyn, la cual se asocia y activa rápidamente en respuesta a GDNF a través del receptor NCAM [12]. Se observó un aumento de la fosforilación de Fyn cuando los cultivos fueron tratados con GDNF, indicando no solo que los precursores en proliferación son capaces de responder a GDNF, sino que lo hacen de manera NCAM-dependiente (**Figura 9 E**). Para confirmar que la señal gatillada por GDNF en estas células es a través de NCAM y no del receptor canónico Ret, se realizó una inmunoprecipitación

contra Ret, y un posterior inmunoblot contra fosfo-tirosina, de manera de identificar si este receptor estaba presente y era activado por GDNF. Se utilizó como control positivo de fosforilación de Ret a la línea celular HEK (del inglés, *human embryonic kidney*) transfectada transientemente con una versión mutada de Ret constitutivamente activa, responsable de la neoplasia endócrina múltiple tipo 2A (RM2A = Ret Men 2A). A diferencia de lo reportado en un trabajo reciente [66], no se detectó activación ni presencia de Ret en los precursores corticales aislados en cultivo, indicando que este receptor no media la respuesta de GDNF en esta población celular (**Figura 9 F**).

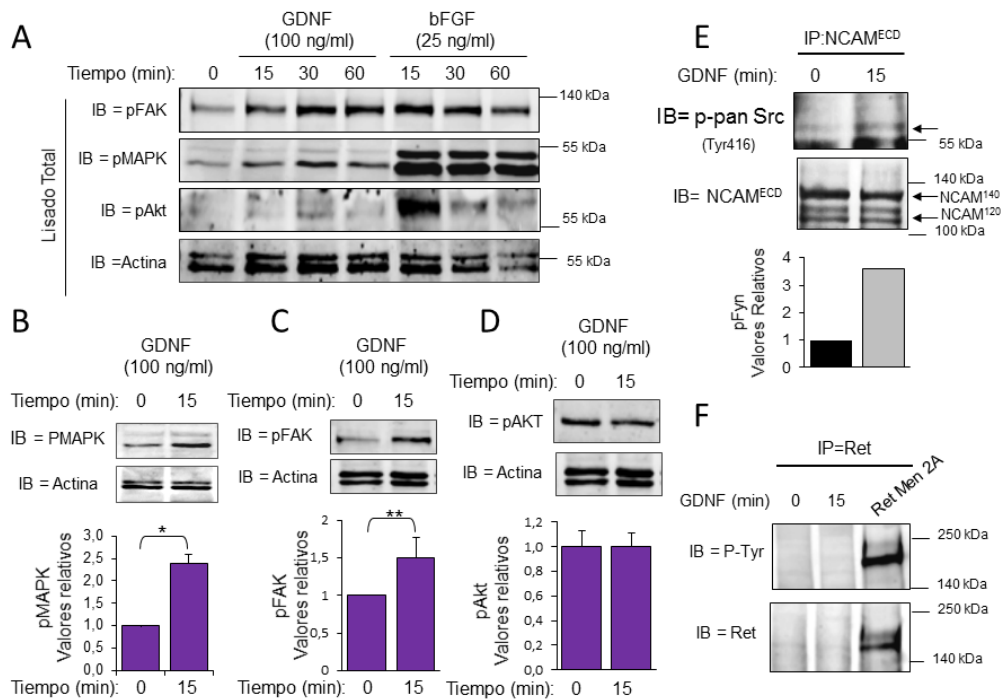


Figura 9: GDNF es capaz de generar una respuesta en precursores en proliferación mediante NCAM. (A) Análisis por inmunoblot (IB) de los niveles de FAK fosforilada (pFAK), MAPK fosforilada (pMAPK), Akt fosforilada (pAkt) en precursores en cultivo en situación control o estimuladas con GDNF (100ng/ml) o bFGF (25ng/ml) a diferentes tiempos. Las membranas fueron re testeados con anticuerpos anti-actina como control de carga. (B, C, D) Análisis por inmunoblot de los niveles de pMAPK (B), pFAK (C), y pAkt (D), en precursores proliferando en cultivo sin estimular o estimulados con GDNF (100ng/ml) durante 15 minutos. Los diagramas de barra indican la cuantificación de la densidad óptica de las bandas obtenidas en estas muestras realizadas por triplicado. Se muestra el promedio +/- SEM B, C: *p<0,05, Test T de Student. (E) Extractos celulares de precursores en cultivo estimulados o no con GDNF (100 ng/ml) fueron analizados por inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular de NCAM (NCAM^{ECD}) seguido de IB con anticuerpo anti pSrc (Tyr 416). Se señala la banda correspondiente al peso molecular de pFyn. Debajo se muestra el mismo blot reprobado con anticuerpo anti-NCAM^{ECD}. El gráfico inferior muestra

la relativización al control de la activación de pFyn. Este experimento se repitió dos veces con resultados similares. (F) Extractos celulares obtenidos de la misma forma que en (E) fueron analizados por inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo anti-Ret seguido de IB con anticuerpo anti-fosfotirosina (P-Tyr). Debajo se muestra el mismo blot reprobado con anticuerpo anti-Ret. Este experimento se repitió dos veces con resultados similares.

GDNF y bFGF regulan procesos celulares opuestos en los progenitores corticales

Es conocido que el factor trófico bFGF se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso en desarrollo [70]. A medida que continua el desarrollo embrionario, su expresión en corteza va decayendo, al igual que la expresión de su receptor FGFR1 (**Figura 6 A**). Asimismo, esta descrito que durante la neurogénesis se genera un gradiente ventrículo-pial de bFGF, siendo su expresión alta en la ZV donde los precursores se encuentran proliferando activamente, y baja en la placa cortical donde se ubican las neuronas recién generadas [75]. Esta expresión del ligando va acompañada de la expresión de FGFR1, que de la misma manera presenta alta expresión en las zonas proliferativas de la corteza en desarrollo y baja en las zonas de diferenciación neuronal. Las inmunolocalizaciones realizadas (**Figura 6C**), indicaron que el patrón de expresión de GFR α 1 correlacionaba negativamente con el patrón de expresión descrito para FGFR1 [70], siendo mayor la expresión de GFR α 1 en las zonas de diferenciación neuronal y menor en las zonas proliferativas. Por otra parte, el patrón temporal de expresión del ARNm de GFR α 1 también correlacionó negativamente con la expresión del ARNm de FGFR1 (**Figura 6A**). Basándose en estas observaciones, se decidió estudiar si podría existir una relación antagonica entre ambos sistemas, donde bFGF regule los niveles de GFR α 1 o GDNF regule los niveles del receptor de FGF.

Para estudiar si existía una regulación de los niveles de GFR α 1 por bFGF durante el desarrollo de la corteza embrionaria, se realizaron cultivos de precursores corticales en presencia de diferentes concentraciones de bFGF. Las concentraciones de uso elegidas fueron concentraciones bFGF que promueven la proliferación de los precursores corticales, y que no varían el destino celular de los mismos [69]. Se realizaron cultivos de precursores corticales con dos concentraciones diferentes de bFGF: 5ng/ml (“concentración baja”) y 25 ng/ml (“concentración alta”), y luego de 5 días de estar en cultivo, se extrajo el ARN de las muestras y se analizó la expresión de distintos ARNm por PCR de bajos ciclos o por PCR en tiempo real. (**Figura 10 A**). Se observó que los cultivos mantenidos con ambas concentraciones de bFGF expresaron bajos niveles de GFR α 1 y altos niveles de FGFR1, mientras que aquellos cultivos control mantenidos en ausencia del ligando mitogénico presentaron altos niveles de expresión de GFR α 1,

y una reducción de la expresión de FGFR1. Tanto a 5 como a 25 ng/ml de bFGF se observó una reducción similar en los niveles del ARN mensajero de GFR α 1. (**Figura 10 A**). También se analizó el efecto de bFGF sobre la expresión de NCAM, observándose una reducción en la expresión del mismo en condiciones proliferativas, aunque no tan marcado como la observada para GFR α 1. Basados en los resultados que indican que durante el desarrollo cortical los niveles de bFGF disminuyen en la corteza con el avance de la neurogénesis, mientras que GDNF se mantiene en niveles aproximadamente similares (**Figura 6 A**), se realizaron cultivos en presencia de las mismas concentraciones de bFGF, y concentraciones saturantes de GDNF (100 ng/ml) para estudiar el efecto de este factor neurotrófico sobre la expresión de los receptores GFR α 1 y FGFR1. A bajas concentraciones de bFGF (5ng/ml), la presencia de GDNF evitó la caída de la expresión de su receptor GFR α 1 y redujo el incremento en la expresión de FGFR1 inducido por bFGF solo. La expresión de NCAM resultó en un aumento con respecto a su control cuando los cultivos fueron estimulados con GDNF, lo cual está de acuerdo con un posible rol de NCAM como receptor de GDNF en estas células (**Figura 10 A y B**).

Basados en estos resultados, se decidió evaluar el efecto de GDNF sobre precursores corticales mantenidos en presencia de las diferentes concentraciones de FGF. Se realizaron cultivos de precursores corticales y se mantuvieron durante 5 días con bajas concentraciones de bFGF (5 ng/ml) o concentraciones altas del ligando (25 ng/ml) y en presencia o ausencia de GDNF. Luego se realizaron inmunotinciones para dos marcadores: β III Tubulina (Tuj1) como marcador neuronal y la proteína Ki67 –una proteína nuclear que se encuentra presente durante todas las fases activas del ciclo celular, pero ausente en G0- como marcador de células en proliferación. Se vio que en aquellos cultivos mantenidos con bajas concentraciones de bFGF (5ng/ml), el agregado de GDNF al medio de cultivo favoreció la diferenciación de precursores a neuronas postmitóticas positivas para β III Tubulina (**Figura 10 C y D**), mientras que, por el contrario, cultivos mantenidos con altas concentraciones de bFGF (25 ng/ml) no presentaron diferencia en el número de neuronas generadas con el agregado de GDNF (**Figura 10 F y G**). Por otra parte, se observó que en cultivos mantenidos con bFGF, en ausencia de GDNF, había una alta proporción de células en proliferación, que disminuían drásticamente con la adición de GDNF (**Figura 10 C y E**). Estos resultados indican que el ligando GDNF y bFGF realizan acciones contrapuestas en los precursores neuronales, y que a bajas concentraciones de bFGF, GDNF es capaz de interrumpir la señalización gatillada por bFGF, disminuyendo la proliferación celular y aumentando la diferenciación a neuronas post-mitóticas.

A continuación, se analizará el rol que cumple GDNF regulando ambos procesos celulares: la proliferación de precursores y la diferenciación de los mismos.

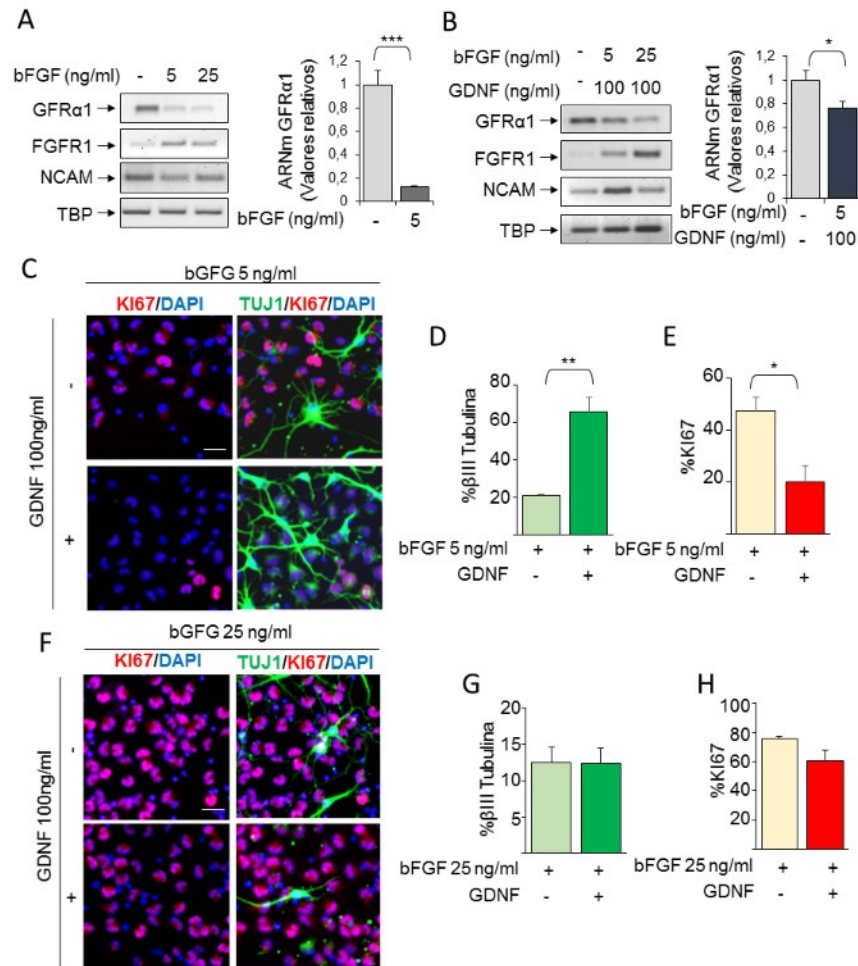


Figura 10: GDNF y bFGF realizan efectos contrapuestos en los precursores corticales. (A) RT-PCR de bajos ciclos (27 ciclos) de precursores en cultivos mantenidos en condiciones control (sin ligando) o concentraciones crecientes de bFGF. Se analizó la expresión de los ARNm de GFRα1, NCAM y FGFR1. Se evaluó la expresión del ARNm de la proteína TBP como gen de referencia, para normalizar los valores. El diagrama de barras muestra la cuantificación de los niveles de GFRα1 en estas muestras analizadas por PCR en tiempo real. Las barras indican valores promedio +/- SD de mediciones realizadas en triplicado *p<0,05. Test de T Student. **(B)** Análisis por RT-PCR de bajos ciclos (27 ciclos) de precursores en cultivos mantenidos en condiciones control (sin ligando) o concentraciones crecientes de bFGF, en presencia de concentraciones saturantes de GDNF (100 ng/ml). Se analizó la expresión de los ARNm de GFRα1, NCAM y FGFR1. El diagrama de barras muestra la cuantificación de los niveles de GFRα1 en estas muestras analizadas por PCR en tiempo real. Nótese una menor caída de la expresión de GFRα1 que en el gráfico de barras en (A). Las barras indican los valores promedio +/-SD de mediciones realizadas en triplicado. *p<0,05. Test de T

de Student (C) Cultivos mantenidos en concentraciones bajas de bFGF (5ng/ml). Luego de 5 días en cultivo se realizó una inmunofluorescencia para el marcador neuronal β III Tubulina (Tuj 1) y el marcador de células activas en su ciclo celular, KI67. Se realizó una contratinción con el marcador nuclear DAPI. (D y E) Se cuantificaron células positivas para β III Tubulina o KI67 sobre el total de células observadas con DAPI. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. D; E: * $p < 0,05$. Test de T de Student. (F) Cultivos mantenidos en concentraciones altas de bFGF (25ng/ml). Luego de 5 días en cultivo se realizó una inmunofluorescencia para el marcador neuronal β III Tubulina y el marcador de células activas en su ciclo celular, KI67. Se realizó una contratinción con el marcador nuclear DAPI. (G y H) Se cuantificaron células positivas para β III Tubulina o KI67 sobre el total de células observadas con DAPI. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. No se observaron diferencias significativas. Test de T de Student. Escala: 100 μ m.

GDNF disminuye la proliferación de progenitores neuronales corticales

Para analizar si el sistema GDNF/GFR α 1 tenía un efecto directo sobre la proliferación de los precursores corticales, se realizaron cultivos de precursores corticales en condiciones control, o mantenidos con concentraciones altas de bFGF (25 ng/ml) -para asegurar un alto número de precursores proliferantes- en presencia o no de GDNF. Si bien se había observado previamente que el número de células KI67 positivas totales no disminuye significativamente con el agregado de GDNF al medio en estas condiciones de cultivo (**Figura 10 F y H**), se observó que GDNF sí era capaz de disminuir el porcentaje de progenitores corticales en proliferación, identificados por una colocalización entre nestina y KI67. Esto indicaría que GDNF disminuye la proliferación específicamente de los precursores corticales en cultivo, aún en presencia de altas concentraciones de bFGF. (**Figura 11, A y B**).

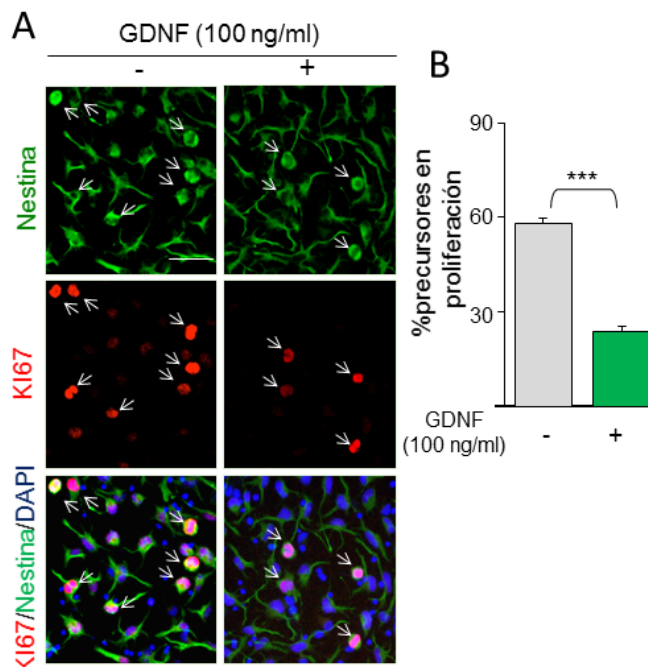


Figura 11: GDNF disminuye la proliferación de precursores corticales en cultivo. (A) Inmunofluorescencia para nestina (verde), KI67 (rojo) y DAPI como contratinción nuclear. Los cultivos fueron crecidos en presencia de bFGF (25 ng/ml) en presencia o ausencia de GDNF. Las flechas indican células que presentan tinción tanto para KI67 como para nestina. Escala: 50 μ m. (B) Diagramas de barras mostrando el porcentaje de precursores corticales que se encuentran en proliferación. Se cuantificó la proporción de células positivas para los marcadores KI67 y nestina sobre el total de células nestina positivas. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. Test de T de Student.

El efecto de GDNF sobre la proliferación se analizó también sobre precursores corticales aislados de la misma manera que anteriormente descrita, crecidos en condiciones no adherentes, formando neuroesferas (NE, Ver Mat y Mét.). El ensayo de NE es una herramienta útil para poder determinar la capacidad proliferativa de una población celular debido a que sólo las células progenitoras con alta capacidad proliferativa, como las cGR, tienen la capacidad de formar NE en presencia de bFGF. Cultivos celulares en ausencia de bFGF, o mantenidos solamente con GDNF, no fueron capaces de formar NE. Se realizaron cultivos de precursores corticales en presencia bFGF (25 ng/ml) y en presencia o no de GDNF (100 ng/ml), de manera de evaluar el efecto de este último sobre la proliferación. Luego de 5 días en cultivo, se cuantificó el número de NE generadas en cada tratamiento, y el diámetro de cada NE como una medida de su tamaño. En contraposición

a las esferas generadas sólo en presencia de bFGF; el número de NE obtenidas en presencia de GDNF fue significativamente menor, y presentaron una reducción significativa en su tamaño (**Figura 12, A-C**). Estos resultados indicaron que GDNF inhibe la proliferación inducida por bFGF. La muerte neuronal fue evaluada con anticuerpos anti-Caspasa3, un marcador de células apoptóticas, pero no se detectaron diferencias en el porcentaje de células expresando caspasa3 por esfera, en presencia de bFGF o de ambos ligandos (dato no mostrado).

Las NE contienen células en distintos estadios de diferenciación, producto de la división celular asimétrica que llevan a cabo las células progenitoras. Al disociar una NE, sólo una pequeña fracción de células mantiene las características proliferativas iniciales. Esta pequeña fracción de células es la que mantiene la capacidad de generar NE secundarias. Para analizar si GDNF arrestaba irreversiblemente a los precursores en cultivo, las NE crecidas en presencia de bFGF y en presencia o no de GDNF, fueron disociadas y cultivadas sólo en presencia de bFGF. Se obtuvo el mismo número de NE secundarias y de un tamaño similar en ambas condiciones (**Figura 12, D-F**). Esto indicó que el tratamiento GDNF inhibe la proliferación de los precursores de manera reversible, de manera que aquellos precursores que no fueron comprometidos a diferenciarse, cuando dejan de estar en contacto con este factor neurotrófico, proliferan normalmente.

Luego se evaluó si la disminución en el número de esferas primarias generadas, y la reducción en su tamaño se debía a que GDNF estaba efectivamente disminuyendo la proliferación de estos precursores corticales. De la misma manera que para células adheridas (**Figura 11, A y B**), se evaluó la proporción de precursores en proliferación, positivos para KI67 y nestina, en cada NE generada en presencia o ausencia de GDNF. Se observó que la adición de GDNF a estos cultivos disminuyó la proporción de células que expresaban KI67 y además disminuyó la proporción de progenitores positivos para nestina que expresaban KI67 por NE, es decir, de precursores en proliferación. (**Figura 12, G-I**). Como se mencionó anteriormente, las NE contienen células en distintos estadios de diferenciación con lo que posible identificar células diferenciadas dentro de las esferas, además de progenitores en proliferación. A medida que aumentan los días en cultivo de las NE, se observará mayor número de células diferenciadas, imitando lo que sucede en el desarrollo cortical embrionario *in vivo*. Para analizar si la proporción de células diferenciadas variaba dentro de las NE al ser tratadas con GDNF, se realizó una inmunofluorescencia contra el marcador neuronal β III Tubulina en NE mantenidas en cultivo durante 5 días. Se observó que la proporción de neuronas generadas a partir de estos precursores corticales aumentó cuando estas fueron cultivadas en presencia de GDNF, evidenciando que el tratamiento no solo disminuye la

proporción de precursores en proliferación, sino que induciría la diferenciación celular. (Figura 12, J e I), de acuerdo a lo descrito previamente.

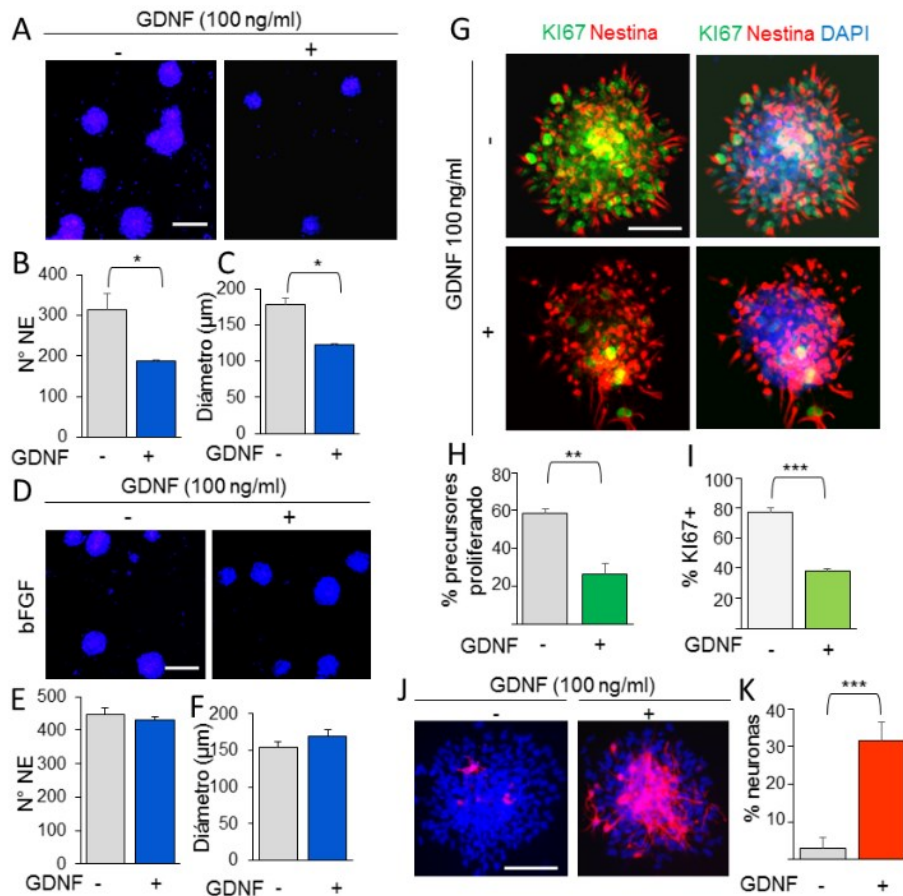


Figura 12: GDNF disminuye la proliferación y aumenta la diferenciación de neuroesferas (NE) derivadas de precursores corticales. (A) Imágenes de NE primarias derivadas de precursores corticales mantenidas en cultivo en suspensión en presencia de bFGF (25 ng/ml); o de ambos ligandos (GDNF, 100ng/ml y bFGF, 25ng/ml). Luego de 5 días las NE fueron precipitadas y sometidas a la tinción nuclear de DAPI. Escala: 200μm (B-C) Diagramas de barras que muestran la cuantificación del número total de NE observadas (B) y su diámetro promedio (C). Los resultados se expresan como el promedio de tres experimentos independientes ± error estándar. * p<0,05. Test de T de Student. (D) Imágenes de NE secundarias, mantenidas en cultivo durante 6 días en suspensión en presencia de bFGF (25 ng/ml). Escala: 200 μm. (E-F) Diagramas de barras que muestran la cuantificación del número total de NE secundarias observadas (E) y su diámetro promedio (F). Los resultados se expresan como el promedio de tres experimentos independientes ± error estándar. *p<0,05. Test de T de Student (G) Inmunofluorescencia de NE para observar el estado proliferativo de las mismas. Se realizó la tinción del marcador de precursores neurales nestina (rojo), KI67(verde) y DAPI como contratinción nuclear. Escala: 200μm. (H-I) Diagrama de barras que muestra el porcentaje de precursores corticales que se encuentran en proliferación. Se cuantificaron las células positivas para KI67 sobre el total

de células observadas por esfera (I) y la proporción de células que eran positivas para los marcadores KI67 y nestina sobre el total de células nestina positivas por esfera (H). Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$ Test de T no pareado. (J) Inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido contra el marcador neuronal β III-Tubulina (rojo) y DAPI como contraindicación nuclear. (K) Histograma que muestra el porcentaje de neuronas postmitóticas presentes por esfera en cada tratamiento. Los resultados muestran el porcentaje promedio \pm SEM de un experimento representativo. Este experimento fue realizado por duplicado con resultados similares. *** $p < 0.0001$. Test de T de Student.

La reducción en el número y el diámetro de las NE mantenidas en presencia de GDNF se correlacionó con un aumento en los niveles de expresión de GFR α 1 (**Figura 13 A y B**), analizados por RT-PCR de bajos ciclos y por PCR en tiempo real. Esto indicaría que la adición de GDNF a estos cultivos podría inducir la expresión de este receptor en los progenitores corticales, de acuerdo a lo observado previamente (**Figura 10 B**).

Para analizar el rol de GDNF sobre los cultivos en proliferación se investigó la influencia de GDNF en moléculas conocidas que regulan el ciclo celular. Dentro de las moléculas que regulan el ciclo celular se encuentran las ciclinas, que forman complejos con quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, del inglés *cyclin-dependent kinase*), siendo esta unión indispensable para que se regule la progresión del ciclo celular. En particular la actividad de la Ciclina D1 es fundamental para el progreso del ciclo celular y el paso de la fase G1 a S. Esta ciclina es activada en respuesta a una señal mitogénica y promueve la expresión de sí misma y además de la ciclina E1, fundamental también para el paso a la fase S del ciclo celular. Existen además reguladores negativos del ciclo celular, como las proteínas inhibitorias de CDks (CKI, del inglés *cycline-dependent kinase inhibitors*). Se han descrito dos familias de proteínas CKI: las *cip/kip*, que incluyen a las proteínas p21, p27 y p57; y las INK4 que comprenden las proteínas p15, p16, p18 y p19. Las proteínas CKI *cip/kip* en particular están caracterizadas por ser reguladores negativos del pasaje de G1 a S [76]. P27, por ejemplo, es una proteína CKI que promueve la diferenciación neuronal dado que inhibe la proliferación de precursores neuronales [77]. Para analizar el rol de GDNF sobre estas proteínas regulatorias del ciclo celular, se realizaron cultivos de NE en presencia o ausencia de GDNF, como se describió anteriormente. Luego, se extrajo el ARN total y se analizaron por PCR de bajos ciclos la expresión de diferentes ciclinas y CKI. Las esferas generadas en cultivos estimulados sólo con bFGF (25 ng/ml) presentaron un aumento de las ciclinas D1 y E1 y una disminución de los CKI *cip/kip* analizados (p27 y p21) con respecto a aquellas NE generadas en presencia de GDNF. (**Figura 13, A**

y C). Estos resultados indican que GDNF regula negativamente la proliferación neuronal, resultando en un aumento de los niveles de las CKI cuando está presente en el medio de cultivo.

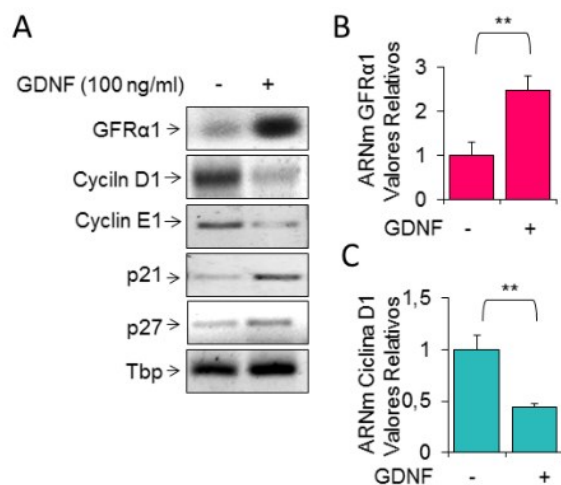


Figura 13: GDNF regula la expresión de GFRα1 y de proteínas que intervienen en el ciclo celular. (A) Análisis de la expresión de los ARNm de GFRα1, de las ciclinas D1 y E1 y de las CKI p27 y p21, por RT-PCR de 27 ciclos a partir de NE mantenidas en ausencia o presencia de GDNF. Se observa una clara disminución de la expresión de las ciclinas y un aumento de la expresión de las CKI en presencia de GDNF. (B) PCR en tiempo real mostrando que en presencia de GDNF se induce significativamente la expresión de GFRα1. **p<0,05. Test de T de Student. (C) PCR en tiempo real para analizar la expresión del ARNm de Ciclina D1. Se observa una disminución significativa del 50% de la expresión del ARNm de Ciclina D1 cuando los cultivos fueron mantenidos en presencia de GDNF. **p<0,05. Test de T de Student.

GFRα1 es requerido para la correcta regulación de la proliferación de precursores corticales tanto *in vitro* como *in vivo*

Con el fin de analizar la contribución de GDNF a través de su receptor GPI, GFRα1, a la proliferación de los precursores corticales, se realizaron ensayos de NE derivadas de cortezas embrionarias de ratones controles o deficientes para GFRα1. Para obtener animales deficientes para GFRα1, se cruzaron animales que contenían el gen de GFRα1 flanqueado por secuencias LoxP (GFRα1^{flox/flox}) [21] con ratones que expresaban Cre bajo el promotor de Emx1, un factor de transcripción fuertemente expresado en el cerebro anterior, y particularmente, en precursores corticales que darán neuronas de proyección [78, 79]. De esta manera se obtuvieron animales transgénicos con genotipo Emx1-Cre:GFRα1^{flox/flox}, en donde GFRα1 fue escindido en precursores

corticales glutamatérgicos. La escisión del transgén, permite la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*) (Ver Mat y Met.). Se utilizaron como control ratones de genotipo heterocigota, $Emx1-Cre: GFR\alpha1^{+/flox}$, que permiten visualizar las neuronas mediante GFP. De acuerdo con resultados previos las NE derivadas de ratones controles presentaron una disminución en su número y en su tamaño cuando fueron crecidas en presencia de GDNF, mientras que los precursores corticales de ratones deficientes en $GFR\alpha1$, generaron un número de esferas significativamente mayor a las generadas a partir de células derivadas de animales controles, y además presentaron un incremento en su diámetro, independientemente de la adición de GDNF al medio (**Figura 14, A-C**). Basándose en estos resultados previos, se decidió analizar la expresión de la ciclina D1 y del CKI, p21 en NE derivadas de animales controles como deficientes para $GFR\alpha1$. El análisis por PCR en tiempo real evidenció un aumento significativo de la expresión de ciclina D1 y una disminución de p21 en las NE derivadas de animales deficientes para el receptor de GDNF. Estos resultados indican que $GFR\alpha1$ estaría jugando un rol clave en la regulación de la proliferación de los progenitores neuronales de la corteza cerebral. Como control de los animales utilizados, se realizó además una inmunofluorescencia para detectar $GFR\alpha1$ en esferas derivadas de ratones controles o mutantes. No se observó ninguna célula positiva para $GFR\alpha1$ en ratones deficientes para $GFR\alpha1$ ($Emx1-Cre:GFR\alpha1^{flox/flox}$), mientras que sí se observaron células GFP positivas indicando que en estos ratones la expresión de $GFR\alpha1$ fue eliminada (**Figura 14, E**).

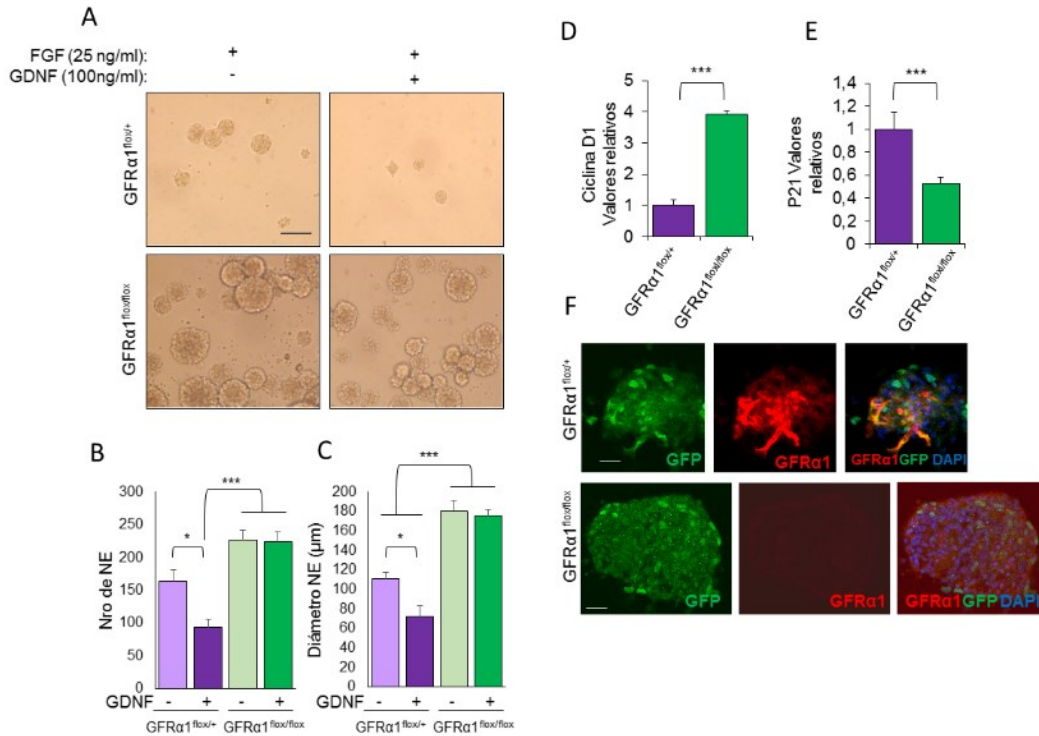


Figura 14: GFRα1 es requerido para la regulación de la proliferación de precursores corticales. (A) Fotografías en campo claro de NE derivadas a partir de ratones controles (Emx1-Cre:GFRα1^{flox/+} o abreviado GFRα1^{flox/+}) o deficientes para GFRα1 (Emx1-Cre:GFRα1^{flox/flox} o abreviado GFRα1^{flox/flox}). Las esferas fueron crecidas en cultivo en presencia de bFGF (25 ng/ml) y en presencia o ausencia de GDNF (100 ng/ml). Escala: 100 µm. (B-C) Diagramas de barras que muestran la cuantificación del número total de NE observadas (B) y su diámetro promedio (C). Los resultados se expresan como el promedio de tres experimentos independientes ± error estándar. * p<0,05. ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. (D, E) PCR en tiempo real para analizar la expresión del ARNm de Ciclina D1 (D) y p21 (E). *<0,0001. Test de T de Student. (F) Inmunofluorescencia para, GFP y GFRα1 de NE derivadas de ratones controles o deficientes. No se observa tinción de GFRα1 en ratones deficientes para este receptor, confirmando el genotipo. Se utiliza DAPI como tinción nuclear. Escala 50µm.

Para evaluar si el aumento en el número y tamaño evidenciado en las esferas derivadas de animales deficientes para GFRα1 se debía a un aumento en la proliferación de los precursores aislados, se cuantificó la proporción de precursores en proliferación en cada NE generada a partir de ratones controles o mutantes, en presencia o ausencia de GDNF. Se observó que la adición de GDNF a esferas controles disminuyó la proporción de progenitores (Nestina⁺) que expresaban KI67 por NE, es decir, disminuyó la proporción de precursores en proliferación. Sin embargo, esferas

provenientes de ratones deficientes para GFR α 1 presentaron un aumento sustancial de precursores en proliferación, tanto en presencia como ausencia de GDNF (**Figura 15**).

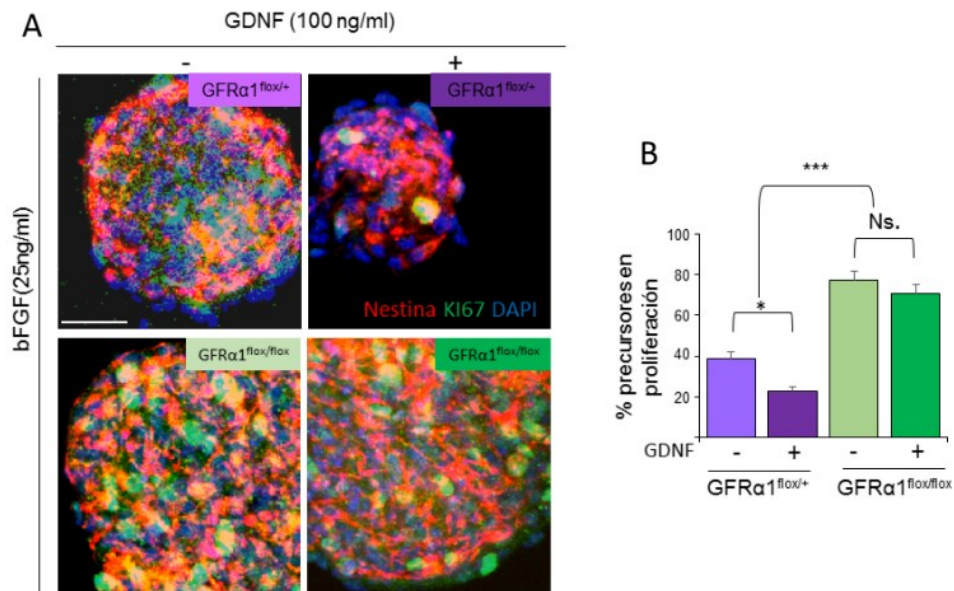


Figura 15: GFR α 1 es requerido para una correcta regulación de la proliferación (A) Inmunofluorescencia de NE derivadas de ratones de E13,5 controles (Emx1-Cre:GFR α 1^{flox/+} o abreviado GFR α 1^{flox/+}) o deficientes en GFR α 1 (Emx1-Cre:GFR α 1^{flox/flox} o abreviado GFR α 1^{flox/flox}), para observar el estado proliferativo de las mismas. Se realizó la tinción del marcador de precursores neurales nestina (rojo), KI67(verde) y DAPI como contratinción nuclear. Escala: 50 μ m (B) Diagrama de barras que muestran el porcentaje de precursores corticales que se encuentran en proliferación. Se cuantificó la proporción de células que eran positivas para ambos marcadores (nestina y KI67) sobre el total de células positivas para nestina por esfera. Los resultados muestran el promedio \pm SEM de un experimento representativo. Este experimento fue realizado por duplicado con resultados similares. * $p < 0.0001$. ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Bonferroni.

Para analizar el requerimiento del sistema GDNF/GFR α 1 en la proliferación de precursores neuronales *in vivo*, se realizaron cortes de cerebro de ratones control o deficientes para GFR α 1 en E13,5, período neurogénico. Luego de la fijación, se realizaron cortes histológicos de los mismos (Ver mat y met), y se realizó una inmunofluorescencia contra la proteína KI67. Se analizó la expresión de este marcador de proliferación en las diferentes capas de la corteza presentes en este estadio: una capa de alta proliferación: ZV/ZSV; una capa intermedia: ZI, y, por último, la capa cortical donde se ubican las neuronas generadas en este período. Se observó un aumento significativo de células que expresaban KI67 en los cortes derivados de animales deficientes para

GFR α 1, tanto en las zonas ZV/ZSV y IZ, evidenciando que GFR α 1 es requerido *in vivo* para una correcta regulación de la proliferación de los precursores neuronales.

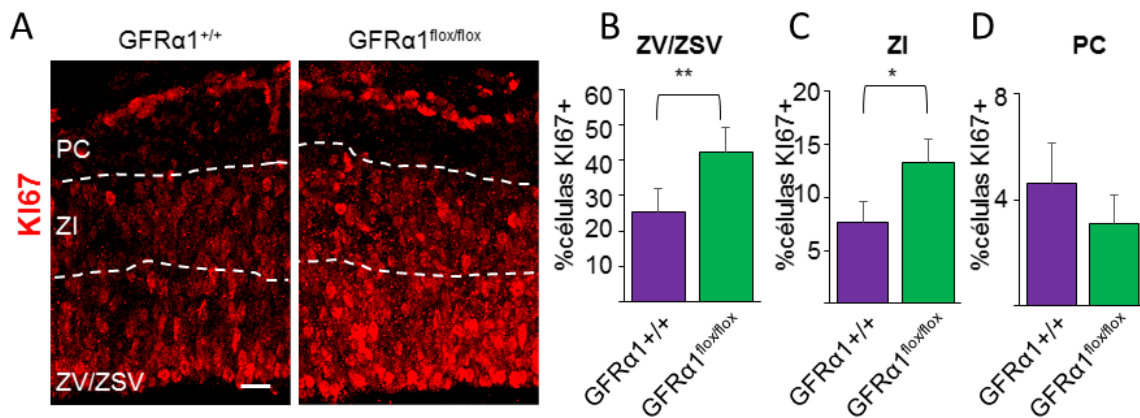


Figura 16: GFR α 1 es requerido para una correcta regulación de la proliferación *in vivo*. (A) Inmunofluorescencia contra Ki67 (en rojo) en cortes embrionarios de corteza de ratón de E13,5. controles (Emx1Cre:GFR α 1^{+/+} o abreviado GFR α 1^{+/+}) o deficientes en GFR α 1 (Emx1Cre:GFR α 1^{flox/flox} o abreviado GFR α 1^{flox/flox}). (B-D) Gráficos de barras que muestran el porcentaje de células positivas para Ki67. Se cuantificaron las células positivas para Ki67 sobre el total de células observadas por capa, por área de 25 mm². Los resultados se expresan como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * p<0,05 Test de T de Student. Escala: 100 μ m.

Todos estos resultados indican que el sistema GDNF/GFR α 1 jugaría un rol esencial regulando la condición proliferativa de los progenitores corticales neuronales, induciendo su salida del ciclo celular.

GDNF promueve la diferenciación de neuronas postmitóticas derivadas de precursores corticales.

Los ensayos de destino celular descritos anteriormente (**Figura 8**) revelaron que las neuronas generadas en los cultivos de precursores corticales crecidos con GDNF, presentaron características morfológicas más complejas que aquellas neuronas generadas en ausencia de GDNF o presencia de altas concentraciones de bFGF. Además, se observó que GDNF regula los niveles de GFR α 1 en presencia de diferentes concentraciones de bFGF, y aumenta el número de neuronas generadas en presencia de bajas concentraciones de bFGF (5ng/ml) (**Figura 10**). Estos resultados indican que GDNF podría tener un efecto sobre la diferenciación neuronal de los

precursores neuronales, aumentando el número de neuronas generadas y, además, su diferenciación morfológica.

Primero, fue importante determinar sobre qué poblaciones neuronales tiene efecto GDNF. La diferenciación neuronal inducida por GDNF en presencia de bajas concentraciones de bFGF (5ng/ml) fue evaluada en cultivos derivados de cortezas embrionarias de rata en E14,5. Dado que en esta edad (neurogénesis intermedia) las interneuronas GABAérgicas se encuentran migrando a través de la corteza (Ver introducción, Figura 5), es posible aislar y plaquear algunas de estas interneuronas. Para evaluar si el efecto de GDNF es sobre neuronas glutamatérgicas generadas a partir de precursores corticales se realizaron cultivos en las mismas condiciones que antes mencionadas (**Figura 10 C**). Al cabo de cinco días se analizó la proporción de neuronas glutamatérgicas -reconocidas por expresar el transportador vesicular de glutamato (VGLUT, del inglés, *Vesicular Glutamate Transporter*), presente en presinapsis excitatorias- y de interneuronas, que expresan el transportador vesicular de GABA (VGAT, del inglés, *vesicular GABA transporter*). Se observó que la adición de GDNF a cultivos con bajas concentraciones de bFGF resulta en un aumento de las neuronas glutamatérgicas, mientras que no modifica el número de neuronas que expresan VGAT. Es decir, GDNF aumenta la diferenciación de las neuronas glutamatérgicas específicamente, aún en presencia de bFGF. (**Figura 17, A-C**).

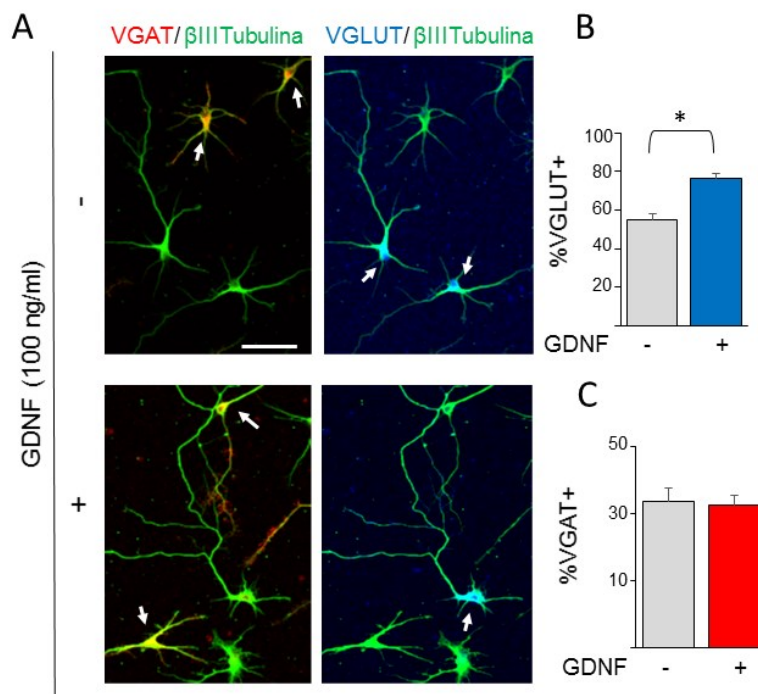


Figura 17: GDNF promueve diferenciación neuronal de neuronas glutamatérgicas. (A) Inmunofluorescencias de neuronas postmitóticas mantenidas en cultivo en presencia de bajas concentraciones de bFGF (5 ng/ml), con o sin la adición de GDNF (100 ng/ml). Luego de 5 días se realizó una co-tinción con VGLUT (azul), VGAT (rojo) y β III Tubulina (verde). Las flechas indican colocalización para los marcadores indicados. Notar que las neuronas glutamatérgicas en presencia de GDNF presentan mayor diferenciación morfológica. Escala: 200 μ m. (B, C) Análisis cuantitativo del efecto de GDNF en la diferenciación de neuronas glutamatérgicas o GABAérgicas. Se cuantificaron células positivas para VGLUT (B) o VGAT (C) sobre el total de neuronas positivas para β III Tubulina. Los resultados se muestran como el porcentaje promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. Test de T de Student.

Para seguir analizando el efecto de GDNF, pero en particular sobre la diferenciación morfológica neuronal, se realizaron cultivos de precursores corticales en condiciones adherentes los cuales fueron mantenidos en presencia de concentraciones altas (25 ng/ml) o bajas (5 ng/ml) de bFGF, con o sin GDNF (100 ng/ml). Luego de 5 días en cultivo, las células fueron fijadas y teñidas con el marcador β III Tubulina, o el marcador dendrítico MAP2, para visualizar las neuronas postmitóticas presentes en el cultivo. Se evaluaron diferentes parámetros morfométricos sobre las neuronas glutamatérgicas, identificadas por su morfología piramidal. Los resultados indicaron que la adición de GDNF solo a cultivos, resultó en un aumento significativo del crecimiento neurítico total y el número de bifurcaciones, pero no en el número de neuritas primarias. El análisis de Sholl evidenció, además, un aumento en la complejidad neurítica (**Figura 18 y 19**). En presencia de altas concentraciones de bFGF (25ng/ml), la adición de GDNF no resultó en un aumento en los parámetros morfológicos medidos (**Figura 18**). Esto indicaría que GDNF juega un rol importante en la diferenciación dendrítica de neuronas postmitóticas, pero este efecto es inhibido en presencia de altas concentraciones de bFGF. Sin embargo, cultivos mantenidos con bajas concentraciones de bFGF (5ng/ml) y GDNF, mostraron un aumento de la diferenciación morfológica neuronal similar a aquellos cultivos tratados solo con GDNF (**Figura 19**). Estos resultados indican que GDNF promueve la diferenciación morfológica de los precursores corticales en proliferación, pero dependiente de los niveles de expresión de GFR α 1 en la población celular.

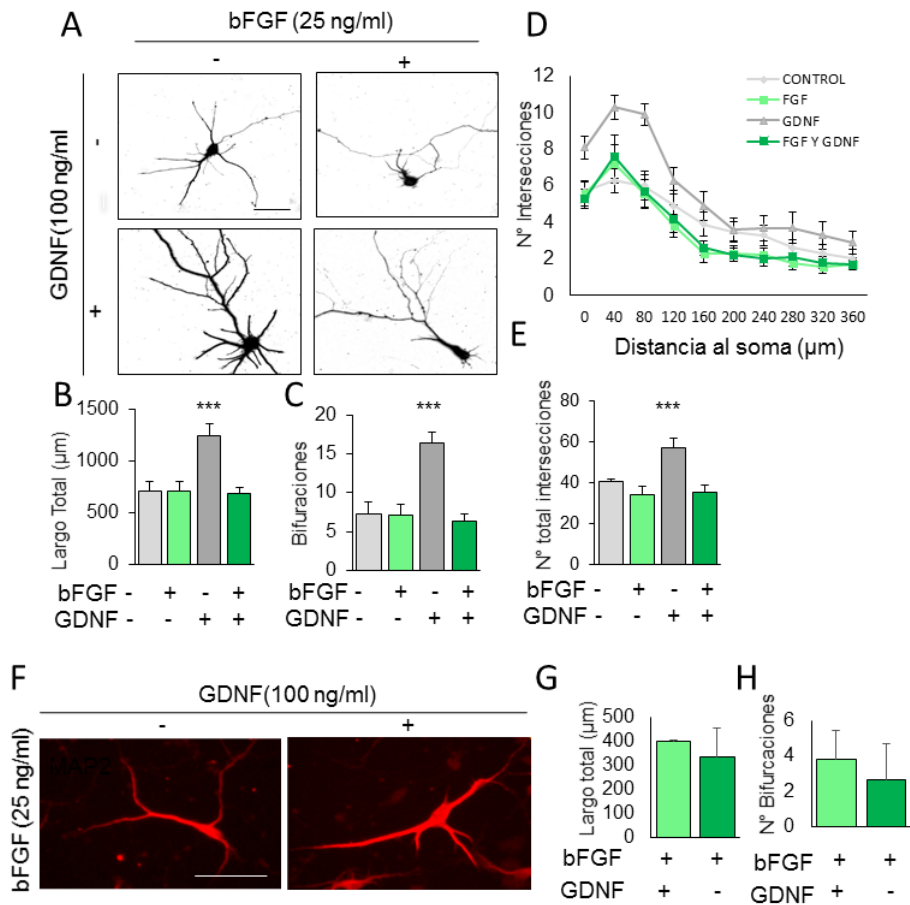


Figura 18: GDNF promueve la diferenciación morfológica de neuronas postmitóticas derivadas de precursores corticales, pero no en presencia de altas concentraciones de bFGF (25ng/ml). (A) Imágenes de neuronas postmitóticas mantenidas en cultivo en situación control o en presencia de FGF (25 ng/ml), con o sin la adición de GDNF (100 ng/ml). Luego de 5 días se realizó una tinción con β III Tubulina. Escala: 100um. (B, C) Diagramas de barras mostrando el análisis cuantitativo de diferentes parámetros morfométricos como el crecimiento total (B) y el número de bifurcaciones de las proyecciones neuríticas (C) de las neuronas mantenidas en las condiciones de cultivo especificadas. Los resultados se expresan como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. ANOVA de una vía, post test de comparación múltiple de Newman-Keuls. (D) Analisis de Sholl mostrando complejidad neurítica para todos los tratamientos especificados. (E) Histograma mostrando el número de intersecciones totales observadas en el análisis de Sholl. El resultado se expresa como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. ANOVA de una vía, post test de comparación múltiple de Newman-Keuls. (F) Inmunofluorescencia para MAP2 de neuronas postmitóticas en presencia de bFGF (25 ng/ml) y en presencia o no de GDNF. Escala: 100um (F) Análisis cuantitativo de parámetros morfométricos de neuronas teñidas

con MAP2. No se observan diferencias significativas para ninguno de los parámetros analizados. Tes de T de Student.

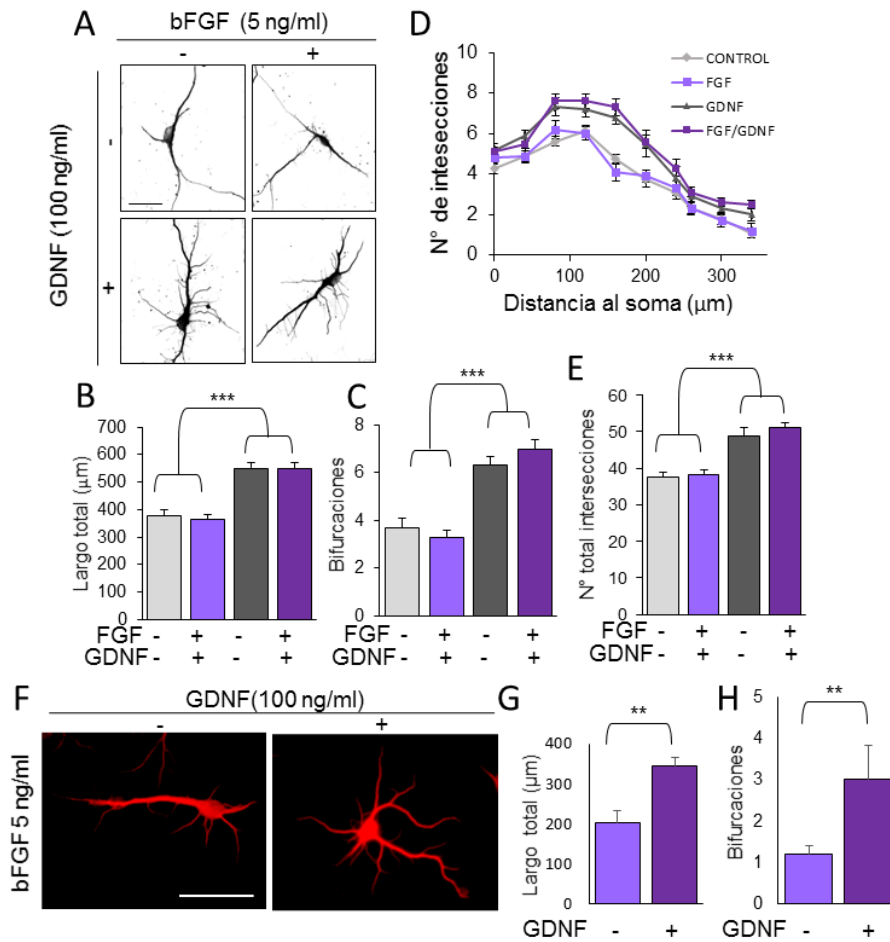


Figura 19: GDNF promueve la diferenciación morfológica de neuronas postmitóticas derivadas de precursores corticales en presencia de bFGF. (A) Imágenes de neuronas postmitóticas mantenidas en cultivo en situación control o en presencia de bajas concentraciones de bFGF (5 ng/ml), con o sin la adición de GDNF (100 ng/ml). Luego de 5 días se realizó una tinción con β III Tubulina. Escala: 200μm. (B,C) Diagramas de barras mostrando el análisis cuantitativo del largo total (B) y del número total de bifurcaciones (C) de las neuronas mantenidas en las condiciones de cultivo especificadas. Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,005$. ANOVA de una vía, post test de comparación múltiple de Newman-Keuls. D) Analisis de Sholl mostrando complejidad neurítica para todos los tratamientos especificados. (E) Histograma mostrando el número de intersecciones totales observadas en el análisis de Sholl. El resultado se expresa como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. ANOVA de una vía, post test de comparación múltiple de Newman-Keuls. (F) Inmunofluorescencia para MAP2 de neuronas postmitóticas en presencia de bFGF (25

ng/ml) y en presencia o no de GDNF. Escala: 100µm. (G, H) Análisis cuantitativo de parámetros morfométricos de neuronas teñidas con MAP2. El resultado se expresa como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. Se observa que la adición de GDNF aumenta complejidad de árbol dendrítico. Test de T de Student* $p < 0,001$.

La diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario implica no solo el crecimiento de árboles neuríticos sino también el establecimiento de correctas conexiones sinápticas. Trabajos anteriores reportaron que GDNF cumple un rol fundamental en el establecimiento de conexiones sinápticas hipocampales [25, 26]. Es por esto que se analizó si GDNF podría afectar la habilidad de neuronas postmitóticas de formar espinas dendríticas. Las espinas dendríticas son protrusiones citoplasmáticas de la membrana de las dendritas que funcionan como centro de recepción para la mayoría de las sinapsis excitatorias en el sistema nervioso central. Las espinas están formadas mayoritariamente de actina, aunque también están presentes los microtúbulos que colaboran en controlar la plasticidad y morfología de las mismas [80]. Se observó un aumento significativo de la densidad de espinas al agregar GDNF a los cultivos mantenidos con bajas concentraciones de bFGF (5 ng/ml), comparado con aquellos cultivos crecidos en ausencia de GDNF. (**Figura 19, D y E**). Este resultado indicaría un rol de GDNF como promotor de la diferenciación neuronal, específicamente de neuronas de proyección y del establecimiento de sinapsis excitatorias.

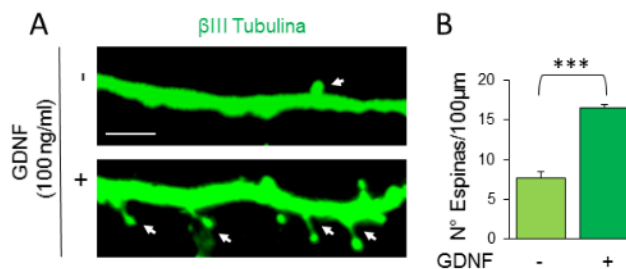


Figura 20: GDNF promueve el desarrollo de espinas dendríticas de neuronas derivadas de precursores corticales. (A) Inmunofluorescencia de β III Tubulina para evidenciar espinas dendríticas de neuronas generadas a partir de precursores corticales en presencia de bFGF (5ng/ml), y en presencia o no de GDNF. (B) Gráfico de barras mostrando la cuantificación del número de espinas cada 100 μ m de árbol dendrítico. Se muestra el número de espinas promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. *** $p < 0.01$ (Test de T de Student). Escala: 5 μ m

El sistema GDNF/GFR α 1 es requerido para una correcta diferenciación neuronal de precursores corticales, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Para determinar la relevancia del sistema GDNF/GFR α 1 durante los procesos de diferenciación neuronal, se realizaron cultivos de progenitores corticales a partir de los animales control o deficientes condicionales para GFR α 1—que se describieron anteriormente (Ver Mat. y Mét.), donde la escisión de GFR α 1 depende de la expresión de una recombinasa Cre (en este caso expresada bajo el promotor de Emx1), convirtiendo el alelo en el cual el transgén es escindido, en un alelo que expresa el gen reportero GFP. De esta manera, se generaron ratones Emx1Cre:GFR α 1^{flox/flox}, en donde GFR α 1 es escindido en precursores corticales glutamatérgicos. Se utilizaron como control ratones de genotipo heterocigota, Emx1Cre:GFR α 1^{flox/+}. Las neuronas positivas para GFP son neuronas que tienen escindido el transgén de GFR α 1 en ambos alelos, o uno solo en animales heterocigotas. Se realizaron cultivos de corteza embrionaria de ratones controles o transgénicos en E13,5 que fueron crecidos con bajas concentraciones de bFGF (5ng/ml), en presencia o ausencia de GDNF (**Figura 20**). Luego, se realizó una inmunofluorescencia contra GFP de manera de cuantificar los parámetros morfométricos solamente en neuronas heterocigotas (controles) o deficientes para GFR α 1. De acuerdo a resultados previos (**Ver Figura 19, A**), se observó que aquellas neuronas generadas a partir de precursores aislados de cortezas cerebrales de ratones control, presentaron un mayor desarrollo neurítico al ser estimuladas con GDNF. Sin embargo, neuronas aisladas a partir de animales deficientes en GFR α 1 presentaron un desarrollo neurítico empobrecido, aun en presencia de GDNF (**Figura 21**), confirmando los resultados anteriores que indicarían que el sistema GDNF/GFR α 1 cumple un rol clave para que las neuronas provenientes de precursores corticales presenten un desarrollo neurítico correcto.

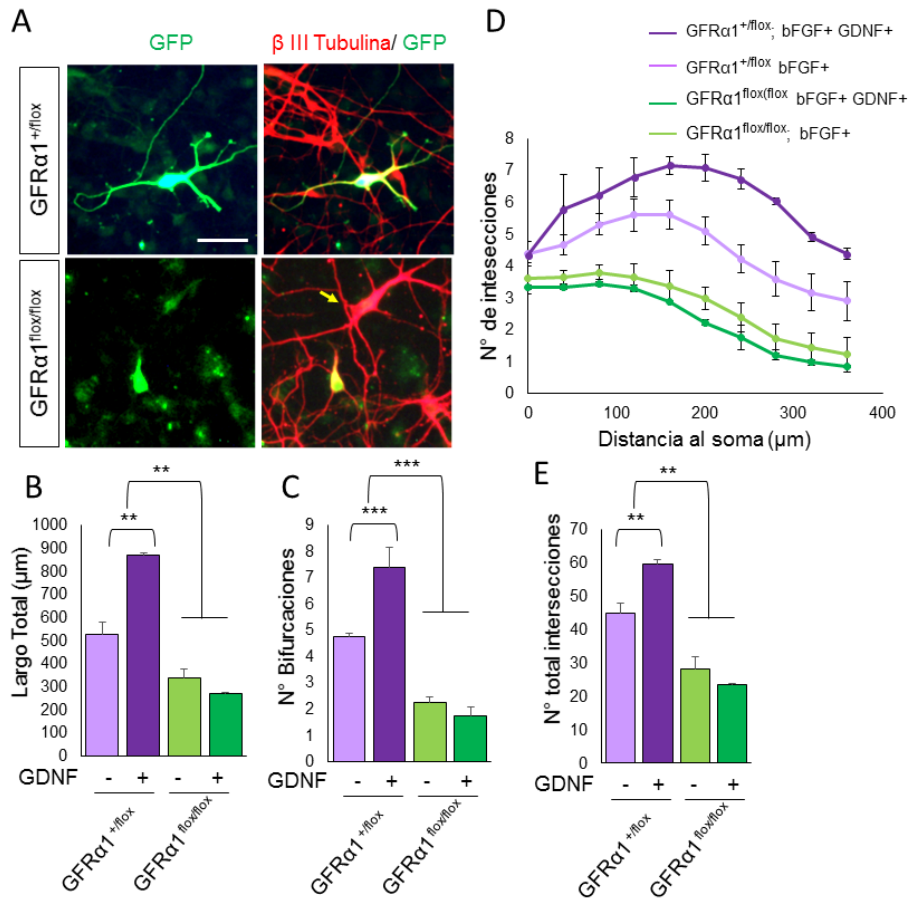


Figura 21: El sistema GDNF/GFR α 1 es necesario para la diferenciación neuronal a partir de precursores corticales. Se realizaron cultivos provenientes de cortezas de ratones heterocigotas para GFR α 1 (Emx1Cre:GFR α 1^{flox/+} o abreviado, GFR α 1^{flox/+}) y ratones deficientes para el mismo (Emx1Cre:GFR α 1^{flox/flox} o abreviado, GFR α 1^{flox/flox}) en E13,5. Luego de 5 días en cultivo, se analizó la morfología neuronal de células que presentaron doble tinción para β III Tubulina (rojo) y GFP (verde). (A) Imágenes de neuronas postmitóticas de animales Emx1Cre:GFR α 1^{flox/+} o Emx1Cre:GFR α 1^{flox/flox}. Solo se muestran neuronas mantenidas en cultivo en presencia de bajas concentraciones de bFGF (5 ng/ml), sin la adición de GDNF (100 ng/ml). Se indica con flecha una neurona post-mitótica no deficiente para GFR α 1 (no teñida con GFP), donde se observa su morfología normal. Escala: 100 μm . (B, C) Histogramas mostrando el análisis cuantitativo del largo total (B) y del número total de bifurcaciones (C) de las neuronas mantenidas en las condiciones de cultivo especificadas. Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * p < 0,005. ANOVA de una vía, post test de comparación múltiple de Newman-Keuls. (D) Analisis de Sholl mostrando complejidad neurítica para todos los tratamientos especificados. (E) Histograma mostrando el número de intersecciones totales observadas en el análisis de Sholl. El resultado se expresa

como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. ANOVA de una vía, post test de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Para analizar el requerimiento del sistema GDNF/GFR α 1 en la diferenciación morfológica *in vivo* de neuronas corticales, se realizaron cortes de cerebro de animales neonatos -al final de la neurogénesis- control o deficientes para GFR α 1. Luego de la fijación, se realizaron cortes histológicos de los mismos (Ver Mat y Mét.), y se realizó una inmunofluorescencia contra la proteína verde fluorescente, GFP. Si bien la expresión de GFR α 1 es baja en la corteza postnatal, se observó una clara expresión de GFR α 1 en la corteza retrosplenial que interviene en procesamientos de memoria dependientes de hipocampo; y la corteza cingulada, que es parte de la corteza límbica a estadios postnatales (o a P0). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado previamente por otros autores [11]. El análisis de esta población de neuronas corticales que expresan GFR α 1 en animales deficientes para GFR α 1 presentaron cambios morfológicos evidenciados en una menor longitud total de las neuritas respecto a animales control (**Figura 22**). Este resultado evidencia que GFR α 1 es requerido *in vivo* para la diferenciación correcta de esta población de neuronas postmitóticas en la corteza cerebral.

En conjunto estos resultados indican que el sistema GDNF/GFR α 1 interviene en la diferenciación neuronal de neuronas glutamatérgicas a partir de precursores corticales.

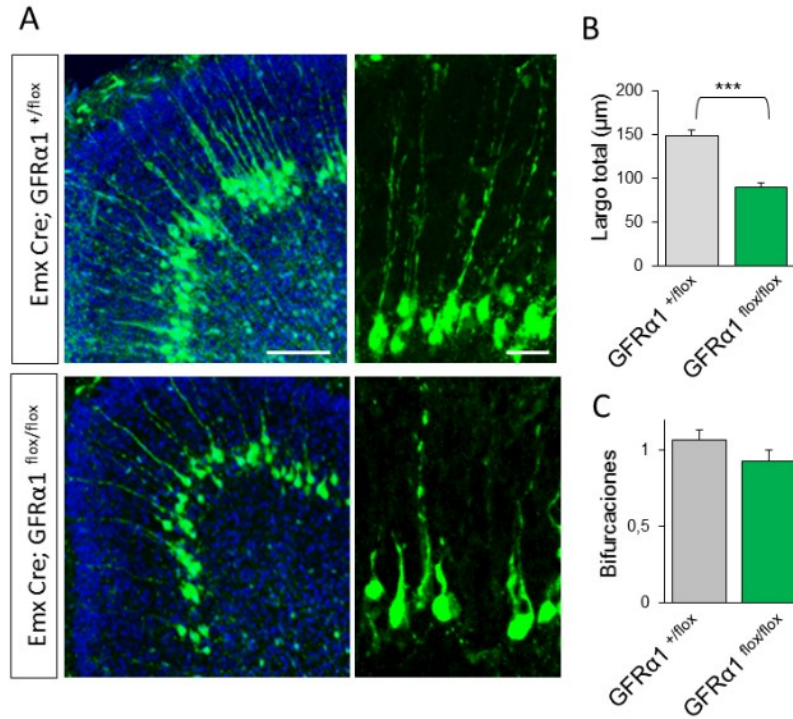


Figura 22: El sistema GDNF/GFRα1 es importante para una correcta diferenciación neuronal *in vivo*. (A) Inmunofluorescencia para GFP de cerebro de ratón en P0 (día postnatal 0, neonatos) muestran expresión del reportero GFP en zonas específicas de corteza de ratones deficientes o heterocigotas para GFRα1. (Paneles de la izquierda, se muestran con la contratinción nuclear de DAPI, escala 500μm; paneles de la derecha, escala 100μm). Se cuantificó el crecimiento total de las neuronas GFP⁺ evidenciadas (B), y el número de bifurcaciones de las mismas (C), observándose una disminución marcada del largo neurítico total en neuronas provenientes de animales deficientes para GFRα1. Este experimento fue realizado por triplicado, con 3 animales diferentes por cada genotipo. El resultado se expresa como el promedio de tres experimentos independientes ± error estándar. ***p<0.01. Test de T de Student. Las barras grises corresponden a animales heterocigotas (GFRα1^{fl/+}) y las verdes a animales homocigotas deficientes para GFRα1 (GFRα1^{fl/fl})

La corteza cerebral de los mamíferos se desarrolla a partir de una población celular denominada precursores o progenitores neurales, ubicados en la zona ventricular adyacente a los ventrículos cerebrales. Estos darán origen a una población heterogénea de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, hasta formar una estructura organizada y altamente conectada entre sí. Cada uno de los tipos celulares neuronales o gliales se generan de una manera espacial y temporal altamente regulada. Luego de una etapa de auto-renovación y proliferación de las células precursoras, se generan neuronas (neurogénesis) y luego se sucede una etapa de generación de células de la glía (gliogénesis). La transición de una división celular simétrica a una división celular asimétrica llevada a cabo por los progenitores, para promover la neurogénesis, y la transición de la neurogénesis a la gliogénesis, son dos etapas claves y altamente reguladas para un correcto desarrollo cortical. Ambos sucesos son el resultado de una interacción entre señales celulares intrínsecas y extrínsecas. Debido a que las señales extrínsecas son provistas por numerosas fuentes en el medioambiente celular, es necesario que todas estas señales converjan para regular estrictamente estas transiciones.

Para que un precursor neural se auto-renueve se debe promover su sobrevivencia celular y la proliferación de los mismos mediante estímulos mitogénicos. Numerosos factores extracelulares cumplen esta función, entre ellos el sistema Notch y el ligando perteneciente a la familia de FGF, bFGF o FGF2 [61, 70]. Sin embargo, para que un precursor se diferencie a una neurona postmitótica deben ocurrir dos cosas: debe dejar de dividirse, salir del ciclo celular permanentemente, y además inducir programas génicos específicos de especificación neuronal. Generalmente, estos dos eventos están acoplados, de manera que si alguno de los dos falla, la neurona generada entra en apoptosis. Dentro de las señales extracelulares que regulan parte de los procesos de diferenciación celular, se encuentran los factores neurotróficos como las neurotrofinas BDNF y NT3 [65, 81]. En este capítulo de la tesis, se propuso evaluar el rol que cumple este factor neurotrófico junto a su receptor, GFR α 1, en la neurogénesis cortical embrionaria, dado que ambos se expresan en la corteza cerebral en desarrollo (**Figura 6**).

Los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis indican que el patrón temporal y espacial de expresión de GFR α 1 es opuesto al descrito para FGF y sus receptores sugiriendo que podría existir una relación antagónica entre ambos sistemas, donde bFGF regule los niveles de GFR α 1 en los precursores corticales o al revés. Esta descripción ampliamente en

la bibliografía que un juego entre varios factores “proliferativos” y “pro-neurogénicos” debe existir para que se los precursores neuronales salgan del ciclo celular y se desencadene una respuesta celular de diferenciación. [58]. En la primera parte de la tesis, se evaluó si GDNF era un factor “pro-neurogénico” y si este era capaz de modificar la respuesta de los precursores corticales al factor promotor de la proliferación bFGF.

Para analizar la respuesta de los precursores corticales a GDNF, se evaluó la señalización disparada por el mismo en estas células. Se analizó por Western Blot la activación de distintas vías intracelulares activadas por este factor, que intervienen en la diferenciación celular como la activación de las vías de MAPK y FAK y también la vía de Akt que ha sido asociada fundamentalmente a procesos de proliferación celular. Los resultados obtenidos indicaron una clara respuesta a la exposición a GDNF, mediante la activación de las vías de MAPK y FAK, pero no de Akt. A diferencia de la respuesta disparada por GDNF, la exposición a bFGF resultó en una activación mayor y más sostenida de las vías de MAPK y FAK; y contrariamente a lo observado para GDNF, bFGF activó la vía de Akt. Será importante analizar en detalle cuáles son las diferencias entre las vías de señalización disparadas por estos factores que llevan a procesos celulares tan diferentes. Se propone que características como el tiempo de duración de la señal y el contexto celular son claves de para diversificar el efecto biológico [58].

Para analizar si GDNF se comportaba como un ligando “pro-neurogénico”, se analizó si era capaz de contrarrestar los efectos generados por bFGF. Esto se analizó en cultivos de precursores corticales mantenidos con bFGF con dos concentraciones distintas: 5ng/ml (“concentración baja”) y 25 ng/ml (“concentración alta”), ambas capaces de inducir la proliferación de los precursores neuronales analizados (**Figura 10**). Se vio que GDNF era capaz de contrarrestar los efectos de bFGF, cuando se utilizaba concentraciones bajas (5 ng/ml) del mismo (**Figura 10 C-E**). Algo similar pasa *in vivo*, donde en el pico de neugénesis cortical (alrededor de E13,5 en ratones), los valores de bFGF y su receptor FGFR1 son menores a días anteriores del desarrollo. De esta manera, la concentración de 5ng/ml de bFGF representa una concentración fisiológica, donde los ligandos pro-neurogénicos pueden generar una mayor respuesta en lo precursores corticales. Estos resultados indican que GDNF se comporta como un factor “pro-neurogénico” afectando la proliferación de los precursores corticales, y promoviendo su diferenciación

Este dato ha sido reportado recientemente, [66], donde a partir del medio condicionado de cultivos de precursores corticales, se aislaron e identificaron varios factores pro-

neurogénicos, como GDNF e INFy. En este trabajo, analizaron que, en cultivo, tanto el medio de cultivo de precursores corticales, como el medio de cultivo de neuronas derivadas de estos precursores, contenían factores extrínsecos que promovían la diferenciación celular. Para identificar estos factores, utilizaron estrategias de transcriptómica, realizando un chip de ARN (microarray) para precursores en cultivo y para neuronas derivadas de estos precursores, de manera de evaluar qué factores se encontraban aumentados en la condición de diferenciación neuronal. Además de corroborar la expresión de varios factores ya descritos como Wnt, PDGF y BMP, se encontró que GDNF y sus receptores serían necesarios para la diferenciación neuronal de los precursores corticales embrionarios. Corroboraron la expresión de GFR α 1 y GFR α 2 en corteza embrionaria, al igual que lo que se hizo en este capítulo de la tesis, y a diferencia de lo que se reportó en este capítulo, también reportaron la expresión de Ret. El rol del sistema GDNF/GFR α 1 para la neurogénesis cortical sólo lo evaluaron realizando una electroporación in útero para el ARN de interferencia de Ret, mostrando que al interferirse Ret, la neurogénesis se veía perjudicada. A diferencia de este trabajo, en la presente tesis doctoral se realizó un estudio más detallado del rol de GDNF y en particular de GFR α 1, y sin encontrar relevancia al receptor Ret.

Para testear que un factor es “pro-neurogénico” es importante demostrar que es capaz de promover dos procesos: (i) interrumpir la proliferación de los precursores o, (ii) contribuir a promover la diferenciación neuronal. Esto es lo que decidió analizar en el resto de este capítulo de la presente tesis doctoral.

Para evaluar el efecto anti-proliferativo de GDNF, se realizó un ensayo de neuroesferas (**Figura 12 y 13**) mediante el cual se observó que el agregado de GDNF al medio de cultivo disminuía el número y tamaño de neuroesferas formadas. Además, en estos cultivos se vio que GDNF promovía la expresión de factores inhibitorios del ciclo celular (p21 y p27) y disminuía la expresión de las ciclinas D1 y E1, indicando que GDNF era capaz de frenar la proliferación de los precursores y que promovía la salida del ciclo celular de los mismos. Estudios en ratones condicionales deficientes en GFR α 1, donde se deleta GFR α 1 específicamente en los precursores glutamatérgicos (EmxCre:GFR α 1^{flox/flox}), indicaron que el complejo GDNF/GFR α 1 juega un rol esencial regulando la correcta proliferación de los precursores corticales debido a que en ausencia de GFR α 1 se observaron tamaños desmedidos de NE tanto en presencia como en ausencia de GDNF (**Figura 14 y 15**) y que dentro de las NE, había un aumento en el número de precursores proliferantes. Es decir, que la ausencia de GFR α 1 desregula la proliferación de los progenitores corticales. Además, se observó este efecto *in vivo*, dado que en cortes de corteza de

ratón en E13,5, deficientes para GFR α 1 mostraron un aumento significativo en el número de células en proliferación tanto en la ZV como en la ZI, con respecto a la corteza de animales control (**Figura 16**). Curiosamente, no se observó a ninguna de las edades analizadas (E13,5; animales neonatos o animales adultos) un aumento en el grosor de la corteza. Este fenotipo fue observado en numerosos estudios, cuando la ausencia de un factor que regula la proliferación es escindido de la corteza cerebral [58], o cuando se inyecta o sobreexpresa un factor que aumenta la proliferación celular [70]. Una explicación posible para la ausencia de este fenotipo, es que existan otros factores extrínsecos o algún mecanismo de compensación, que aumente la tasa de neurogénesis, por ejemplo.

El rol del sistema GDNF/GFR α 1 en la generación de neuronas a partir de precursores corticales, fue evaluada mediante cultivos primarios de corteza cerebral de rata, de E14,5, en ausencia de ligando o en presencia de bFGF para promover la proliferación de los progenitores neuronales, observándose que la expresión de GFR α 1 se correlacionaba fuertemente con la diferenciación neuronal (**Figura 7**). La adición de GDNF a estos cultivos no resultó en una modificación del destino celular de los progenitores neuronales. Sin embargo, las neuronas generadas a partir de estos precursores presentaron un aumento en su número y en su morfología neuronal en presencia de GDNF, aún con bajas concentraciones de bFGF, evidenciando que GDNF promueve la diferenciación morfológica de los precursores neuronales, y en particular la de las neuronas glutamatérgicas. (**Figuras 17, 18 y 19**). La diferenciación durante el desarrollo embrionario implica no solo el crecimiento de árboles neuríticos sino también el establecimiento de correctas conexiones sinápticas. Recientemente [25], se ha demostrado que GDNF, induce a través de GFR α 1 el contacto sináptico y la maduración de estos contactos en neuronas hipocampales. En cultivos de precursores corticales, se observó un aumento significativo de la densidad de espinas al agregar GDNF a los cultivos mantenidos con bajas concentraciones de bFGF, comparado con aquellos cultivos crecidos en ausencia de GDNF. (**Figura 19**). Este resultado está de acuerdo con el rol de GDNF como promotor de la sinaptogénesis en neuronas hipocampales [26]. No se estudió la formación del axón en estos cultivos, aunque estudios previos reportan que GDNF es un promotor del crecimiento axonal en cultivo de neuronas hipocampales y de corteza [12], indicando que podría existir un rol de este sistema regulando el crecimiento axonal en esta población neuronal.

Las neuronas postmitóticas derivadas de cortezas de ratones condicionales deficientes en GFR α 1 presentaron un déficit en la diferenciación morfológica, mostrando árboles neuríticos

empobrecidos. (**Figura 20**). Esto se observó *in vivo*, donde neu en la corteza cingulada postnatal presentaron una disminución del crecimiento neurítico total en animales deficientes para GFR α 1 (**Figura 21**). Esta corteza es parte de la corteza límbica, y recibe contactos desde el tálamo y proyecta hacia la corteza entorrinal [82]. Está involucrada en procesos de aprendizaje y memoria, y además está involucrada en procesos como la depresión y la esquizofrenia [82]. Sería interesante analizar si la delección de GFR α 1 en esta zona cortical, conlleva déficits comportamentales en animales deficientes para este receptor.

Debido a que los GFR α s no presentan dominio intracelular, el complejo ligando-receptor requiere un co-receptor que pueda señalizar intracelularmente. La vía canónica por la que señaliza GDNF es a través del RTK, Ret. Numerosos estudios reportaron la ausencia de Ret en la corteza embrionaria en desarrollo [11, 21], prediciendo un rol para GDNF/GFR α 1 independiente de éste. Sin embargo, un estudio reciente reporta que el efecto “pro-neurogénico” de GDNF es mediado por de Ret en precursores corticales [66]. En este trabajo se describe por inmunofluorescencia de la corteza cerebral y por Western Blot, la presencia de este receptor. Utilizando las mismas técnicas que se describen en ese trabajo, y los mismos anticuerpos, no se encontró presencia de Ret en la corteza cerebral durante la neurogénesis, ni por PCR en tiempo final, ni por inmunofluorescencia tanto en cortezas embrionarias como en precursores en cultivo (**Figura 6B, 6E y 7B**). Además, se realizó una inmunoprecipitación contra Ret en cultivos de precursores corticales, de manera de enriquecer la fracción en el receptor Ret y un inmunoblot contra fosfotirosina, de manera de detectar la fosforilación de este RTK. No se observó presencia de Ret ni de Ret fosforilado en estos precursores en cultivo (**Figura 10 F**). Los resultados mostrados en la presente tesis están de acuerdo con la extensa bibliografía donde describe a los precursores neurales como una población independiente de Ret [11, 74]. Sin embargo, un correcto control para despejar dudas del requerimiento y presencia de Ret en esta población celular, sería analizar la corticogénesis en animales deficientes para Ret.

En el año 2003 se describió a NCAM como un receptor alternativo para el sistema GDNF/GFR α 1 [12]. Los datos presentados en esta tesis indican que NCAM está presente durante la neurogénesis cortical, que colocaliza con GFR α 1 en la corteza embrionaria de ratón (**Figura 6A y 6D**) y que las expresiones de los ARNm de ambos receptores son reguladas en forma similar por bFGF (**Figura 10Ay 10B**). Además, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación contra NCAM en precursores corticales en cultivos estimulados o no con GDNF, observándose un aumento en la fosforilación de la quinasa Fyn en presencia de GDNF (**Figura 9E**). En conjunto estas observaciones

indican que NCAM podría ser el co-receptor involucrado en la señalización de GDNF, junto a GFR α 1 en el desarrollo de la corteza cerebral.

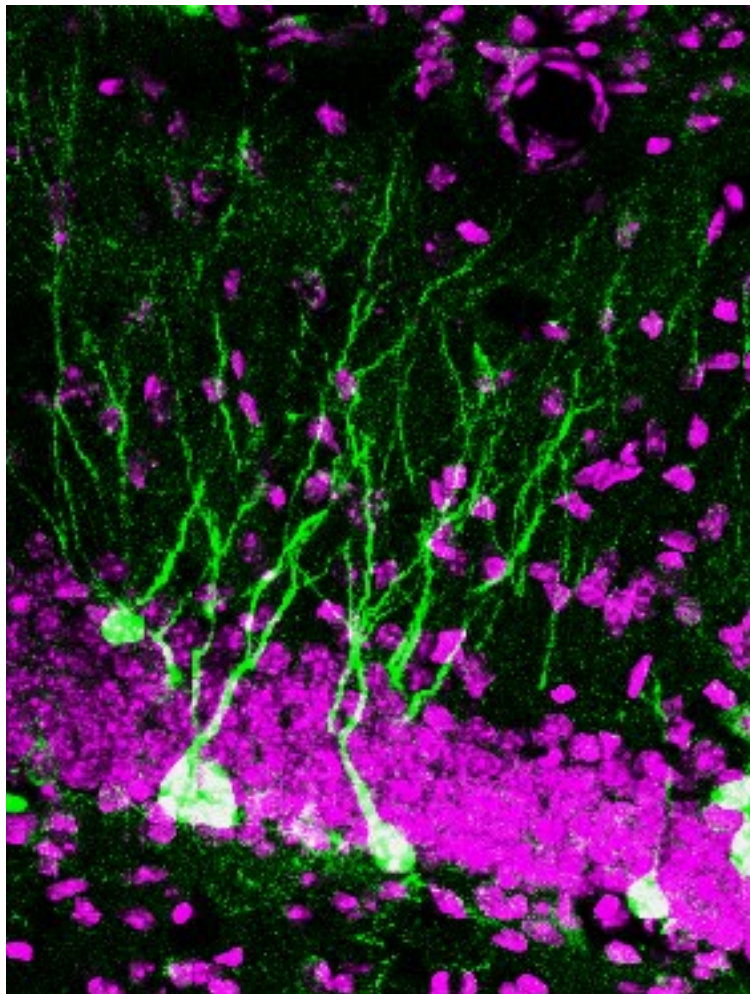
Estos resultados evidencian un nuevo rol para el complejo GDNF/GFR α 1 regulando negativamente la proliferación celular y favoreciendo la diferenciación de precursores corticales. Recientemente se ha descrito un papel esencial de GDNF actuando a través de GFR α 1 y NCAM en los procesos de dendritogénesis y sinaptogénesis de las neuronas piramidales del hipocampo postnatal. En el presente trabajo se describió que GDNF actuando a través de los mismos receptores tiene importantes efectos sobre los precursores embrionarios inhibiendo la proliferación y favoreciendo la diferenciación de los precursores glutamatérgicos que darán origen a estas neuronas. Indicando, que GDNF/GFR α 1 emergería como un sistema clave en la diferenciación de neuronas corticales e hipocámpales. Anteriormente, se había descrito un rol para GDNF/GFR α 1 en la corteza en desarrollo, pero en la diferenciación de precursores neuronales derivados de la EGM a interneuronas GABAérgicas, y en la promoción de la migración tangencial de estas células a la corteza [74]. Este es el primer trabajo en el que se observa un efecto de GDNF sobre precursores glutamatérgicos de la corteza embrionaria.

A modo de conclusión, es importante remarcar que el correcto desarrollo de la corteza cerebral, depende de factores extrínsecos presentes en el medio ambiente neural, y en particular se describe a GDNF como uno de estos factores que controlan el paso desde un estado proliferativo de los precursores a un estado de diferenciación. Perturbaciones en el microambiente neural, podrían cambiar las señales extracelulares liberadas, y esto podría llevar a una predisposición a desórdenes neurodegenerativos, como trastornos del espectro autista [53]. Por ejemplo, se ha reportado que interrupciones en la señalización de Wnt, llevan a una disminución de la diferenciación de precursores corticales, y este hecho se ha relacionado recientemente con esquizofrenia [83]. Además, perturbaciones en el correcto desarrollo de la neurogénesis, pueden ser manifestados en el cerebro adulto, como por ejemplo impactando en el tamaño de la población de los progenitores neurales adultos [58]. Sería interesante conocer si defectos en la señalización de GDNF/GFR α 1 están asociados a patologías, de manera de poder utilizar el factor neurotrófico como un agente terapéutico, al igual que sucede con la enfermedad de Parkinson.

Capítulo II

SNC adulto

GDNF/GFR α 1 en el cerebro adulto: rol en la neurogénesis hipocampal



Neurogénesis en el cerebro adulto

Hasta hace algunos años, un dogma central en las neurociencias era que las neuronas del sistema nervioso se generaban solamente durante el desarrollo embrionario, y no en el cerebro adulto [84]. Las primeras evidencias de que existe neurogénesis en estadios postnatales se obtuvieron utilizando ensayos de timidina tritiada, una molécula capaz de incorporarse al ADN durante la replicación, y que puede ser detectada luego por autorradiografía. Usando esta técnica, se reportó la presencia de varias poblaciones de neuronas marcadas en distintas regiones del cerebro adulto [84, 85]. Sin embargo, un mayor número de estudios, con un despliegue mayor de técnicas, fueron necesarios para romper el dogma existente [84]. Hoy en día está bien establecido que la generación de neuronas nuevas (neurogénesis) en el cerebro adulto es un proceso activo, que incluye la proliferación y especificación celular de progenitores neurales, su subsecuente diferenciación, maduración, migración e integración funcional con los circuitos neuronales existentes.

En el cerebro de mamíferos, la neurogénesis ocurre en dos regiones neurogénicas definidas, en las cuales residen las células progenitoras neurales: en la zona subependimal de los ventrículos laterales, también llamada la zona subventricular (ZSV, o SVZ, en inglés: *subventricular zone*); y en la zona subgranular (ZSG o SGZ, del inglés: *subgranular zone*), una banda estrecha de tejido, entre la capa de células granulares y el hilio del giro dentado en el hipocampo. Las células progenitoras localizadas en la ZSG del giro dentado darán origen a neuronas excitatorias, llamadas células granulares (CGs), que juegan un rol importante en aprendizaje y memoria. Por otro lado, las células progenitoras presentes en la ZSV generan principalmente interneuronas GABAérgicas que migran por la vía rostral migratoria (RMS, del inglés *rostral migrator stream*) hacia el bulbo olfatorio, las cuales juegan un rol en la discriminación de olores [86].

La neurogénesis adulta es un proceso dinámico, finamente regulado y puede modularse por diversos procesos fisiológicos, patológicos y estímulos farmacológicos [87]. Por ejemplo, se ha descrito que, ante un estímulo patológico, es posible encontrar regiones neurogénicas diferentes a las anteriormente mencionadas [88].

Neurogénesis en el hipocampo adulto

La neurogénesis hipocampal adulta tiene como resultado la generación de un único tipo neuronal: las células granulares (CGs) en el giro dentado (GD). Hasta la fecha, no hay evidencia concluyente que se pueda generar otro tipo neuronal en condiciones fisiológicas [89]. Las neuronas granulares son neuronas excitatorias, que reciben inputs de la corteza entorrinal y envían sus proyecciones axonales a través de las fibras musgosas hacia el área CA3 del hipocampo, donde proveen un input excitatorio a las neuronas piramidales presentes en CA3 [89]. Además, la ZSG recibe información de otras regiones cerebrales, como de fibras dopaminérgicas del área tegmental-ventral; proyecciones serotoninérgicas de los núcleos del rafe; inputs acetilcolinérgicos del septum y conexiones GABAérgicas de las interneuronas locales. En particular, el papel de las interneuronas es muy importante debido a que el balance excitatorio-inhibitorio determina la respuesta ante estímulos entrantes de las CGs.

La ZSG provee un microambiente complejo -denominado nicho neurogénico- adecuado para que la neurogénesis pueda ocurrir [90]. Este nicho está compuesto por diversos tipos celulares y estructuras, como a las células precursoras, su progenie inmediata y neuronas inmaduras, astrocitos, proyecciones axonales, vasos sanguíneos y matriz extracelular. Debido a la gran importancia que se cree que cumple la vasculatura en el mantenimiento de la población de precursores, este nicho neurogénico también se denomina “nicho vascular” [89, 91] (**Figura 22**).

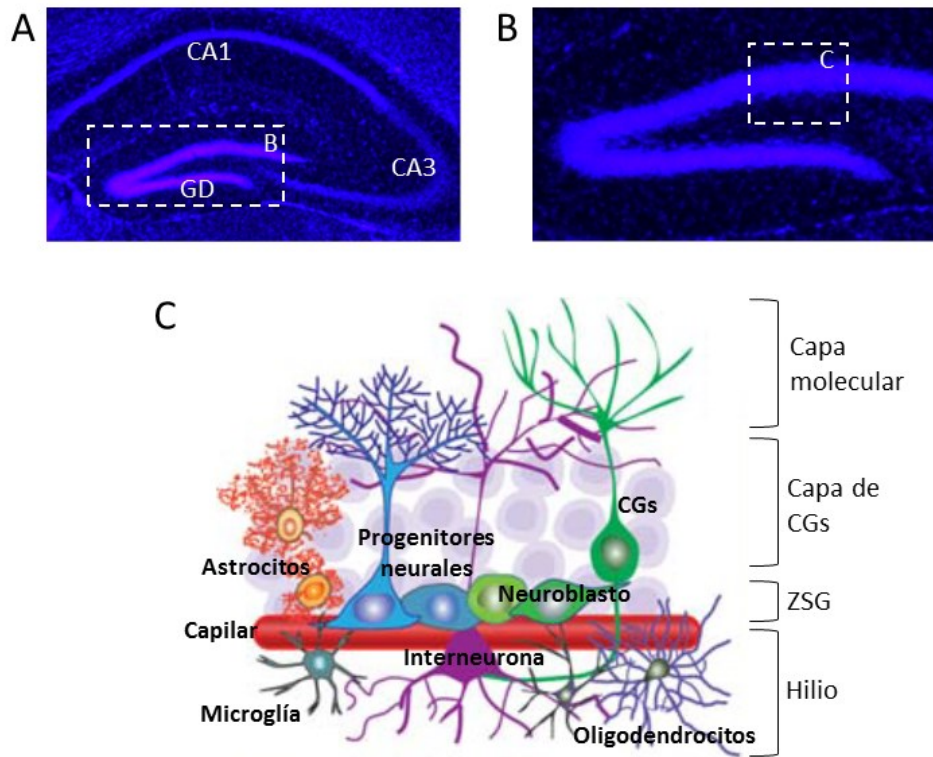


Figura 22: Nicho neurogénico en el giro dentado (GD). (A) Marcación nuclear de DAPI mostrando la estructura del hipocampo adulto de ratón. (B) Magnificación del GD. (C) Dibujo que representa los tipos celulares presentes en el nicho del GD. El linaje neurogénico consiste en progenitores neurales quiescentes y progenitores que entraron en ciclo celular (activos); células progenitoras intermedias, neuroblastos, neuronas granulares y astrocitos. Las células progenitoras se encuentran en la zona subgranular (ZSG), y los neuroblastos y neuronas postmitóticas en la capa de células granulares. Hay presencia de diferentes tipos de interneuronas (en violeta) y astrocitos (en naranja), ubicados en diferentes zonas del GD. Se encuentran además vasos sanguíneos, y otras células de la glía como microglía y oligodendrocitos. *(Ilustración adaptada de Ming & Song, CSHL Perspectives in Biology, 2016)*

En la ZSG del GD, las células tipo 1 (o células similares a la glía radial (también denominadas RGL, del inglés *radial glia-like cells*), actúan como células progenitoras que dan origen a precursores comprometidos en su linaje celular llamados células tipo 2 o progenitores intermedios (CPIs). Estos, a su vez, generan neuroblastos o células tipo 3, que luego maduran a neuronas granulares. Además de CGs en el GD también se generan activamente astrocitos [91]. Este proceso de maduración neuronal sucede en un período que dura alrededor de 8 semanas en el cerebro adulto de ratón. **(Figura 23).**

En particular, las células tipo 1 comparten ciertas similitudes con las células de la glía radial embrionarias: expresan las moléculas GFAP, Nestina, Sox2 y Glast (del inglés, *glial high-affinity glutamate transporter*) y contactan directamente con los vasos sanguíneos. Además, ambas son células multipotentes, presentan divisiones celulares simétricas y asimétricas. Sin embargo, a diferencia de los precursores embrionarios, los progenitores neurales adultos permanecen quiescentes (en G0) largos períodos de tiempo [86]. Se propuso la existencia de otro tipo de célula progenitora, denominadas células no radiales, aunque aún no se conoce su función. Estos precursores expresan Sox2 pero no GFAP [92]. Esto indica que la población de progenitores es una mezcla heterogénea en la ZSG del GD, donde existen distintas células progenitoras, en diferentes estadios del ciclo celular, y, además, con capacidades diferentes de responder a estímulos externos [93].

Los progenitores neurales adultos dan origen a CPIs o células tipo 2, que son positivas para el marcador celular Tbr2, mantienen características de auto-renovación y además realizan divisiones asimétricas que generan neuronas nuevas. Esta población celular está compuesta de dos subpoblaciones: las células tipo 2A que presentan aún marcadores de células progenitoras como nestina y Sox2, y las células tipo 2B, más comprometidas en su destino celular neuronal. [94]. La muerte selectiva de estas células es un mecanismo importante de la regulación de la neurogénesis en el GD: dos tercios de las células CPIs generadas son eliminadas por la microglia [95].

Las células progenitoras intermedias que sobreviven, darán origen a neuroblastos o también llamados, células tipo 3. Estas células presentan muy baja actividad proliferativa, que puede ser revertida en condiciones patológicas [96], y son las que saldrán de ciclo celular para comenzar la diferenciación morfológica de las neuronas inmaduras. Las células tipo 3 presentan marcación para doblecortina (DCX), una proteína asociada a microtúbulos que se expresa desde este estadio proliferativo hasta la salida del ciclo celular y durante el primer período de maduración neuronal que dura alrededor de dos semanas [97]. DCX muestra una colocalización casi completa con PSA-NCAM. Curiosamente, a pesar de su alta expresión, DCX no parece ser requerida para el desarrollo normal del hipocampo adulto [98].

Cuando las células tipo 3 salen del ciclo celular, comienza un período de diferenciación, migración y maduración neuronal. La migración de las células granulares es limitada, dado que se asientan, diferencian e integran en el circuito hipocampal en la capa celular granular del giro dentado, arriba de donde se ubican los progenitores neurales en la SGZ. Alrededor de la segunda

semana de comenzada la neurogénesis, las nuevas neuronas envían sus axones a el área CA3, a través del tracto de fibras musgosas, donde forman sinapsis [89]. El principal input sináptico en este momento de las nuevas neuronas es GABAérgico, que en un principio es excitatorio. (70). Conforme avanza el desarrollo de las CGs, GABA se convierte en un neurotransmisor con una función inhibitoria cuando se forman los suficientes contactos sinápticos glutamatérgicos, y cuando las propias neuronas nuevas son capaces de generar glutamato [99]. Esto sucede durante un periodo crítico que dura desde la cuarta a la sexta semana de comenzada la neurogénesis aproximadamente, donde las CGs son aún inmaduras y comienzan a integrarse a los circuitos existentes. En este momento las CGs exhiben características electrofisiológicas únicas: alta excitabilidad y plasticidad sináptica [100]. Esto significa que dicha población neuronal es mayoritariamente activa en respuesta a diferentes estímulos de una manera menos específica que las CGs maduras [101]. La maduración neuronal depende de la actividad en los circuitos locales, apoyando la idea que la neurogénesis hipocampal adulta es controlada por la actividad en diferentes estadios del desarrollo [102], donde las neuronas recién generadas progresan desde un estado de alta resistencia de inputs a un estado donde presentan las propiedades eléctricas de membrana normales de las CGs maduras [103]. Las nuevas neuronas generadas, se convierten en CGs maduras luego de 8 semanas de comenzada la neurogénesis. Las CGs maduras son estables e integradas persistentemente a las redes sinápticas del GD, por un período largo de tiempo, y no reemplazan a las neuronas generadas con anterioridad. En este estadio expresan calbindina, una proteína de unión al calcio [97]. **(Figura 23).**

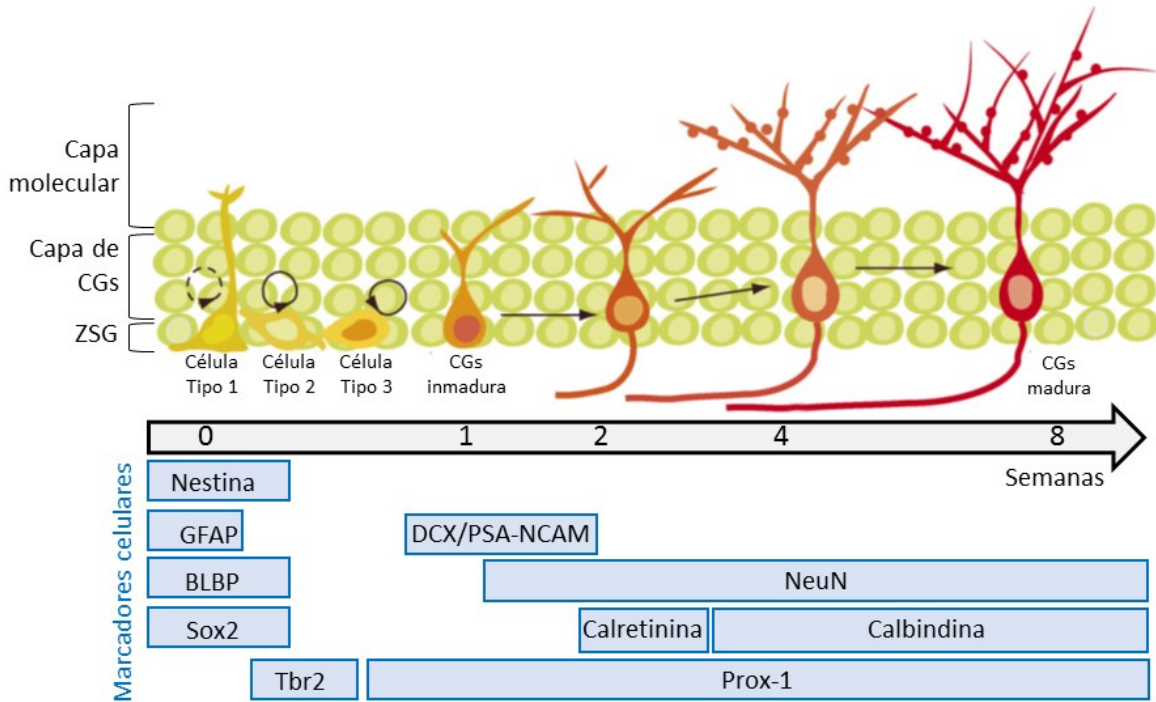


Figura 23: Esquema representado los estadios celulares desde células progenitoras hasta neurona granular madura. Generación y maduración de las CGs. Se ilustran los tiempos (en semanas) más relevantes del desarrollo neuronal. Además, se indican los marcadores celulares para cada tipo celular. (Modificado de Ming y Song 2008).

-Contribución de la neurogénesis adulta a la función del GD

Existen muchas evidencias de que la neurogénesis adulta tiene gran importancia en funciones cognitivas que requieren la actividad del giro dentado y además tiene influencia sobre las memorias dependientes de hipocampo [104]. El número de neuronas generadas puede ser influenciado por numerosos factores externos e internos: el ejercicio físico, la exposición a un ambiente enriquecido, y estímulos patológicos como la isquemia, aumentan el número de neuronas generadas en el GD adulto, asociándose con un mayor rendimiento cognitivo. Por otra parte, el estrés, el envejecimiento y la depresión pueden disminuir la tasa de neurogénesis, perjudicando el comportamiento dependiente de hipocampo. [102, 105]. Es decir, que las neuronas recién generadas son importantes para la función hipocampal. Hasta la fecha, numerosos estudios han intentado vincular la neurogénesis del hipocampo con tareas de aprendizaje y memoria, realizando experimentos de ablación de la neurogénesis, mediante el uso de drogas, irradiación, o estrategias de ingeniería genética. Estos estudios han revelado que ensayos como el laberinto acuático de Morris, [105], de localización de objetos, y de separación de

patrones (“pattern separation”) [106], todos involucrados en la memoria espacial, se encuentran afectados cuando se perjudica la neurogénesis.

En particular, la separación de patrones se define como el proceso computacional por el cual, dado dos representaciones o inputs similares, se transforman en outputs distintos [107]. A nivel comportamental, se define como la capacidad de discriminar memorias derivadas de estímulos similares que se presentan cercanamente en el tiempo o el espacio, y es una característica crítica en la memoria episódica [108]. La primera evidencia del rol del GD en la separación de patrones, fue reportada mediante experimentos de ablación de la neurogénesis por irradiación en roedores [106]. En este estudio se evaluó si los ratones eran capaces de diferenciar la localización de objetos presentados cercanamente en el espacio (condición de similitud) comparado con la capacidad de diferenciar la localización de objetos distanciados (condiciones de disimilitud). Los animales irradiados presentaron dificultades en recordar las localizaciones similares entre sí, pero recordaban y discriminaban correctamente las localizaciones de los objetos presentadas en condiciones de disimilitud. Trabajos recientes en donde se modificó la neurogénesis mediante diferentes técnicas de manipulación genética, llegaron a los mismos resultados, indicando que el GD es requerido para minimizar la interferencia entre la superposición de información espacial o contextual. [106, 108]. Experimentos de pérdida de función de las CGs jóvenes (de 4 a 6 semanas de edad) revelaron que esta población celular es la necesaria para generar este tipo de memoria espacial [109]. Se reportó además que ratones que tenían incrementada la neurogénesis en la ZSG del GD, eran capaces de distinguir mejor entre dos contextos similares que los animales controles. Es decir, que el aumento en la cantidad de neuronas generadas en el GD es suficiente para mejorar el rendimiento en tareas de separación de patrones [110]. El estudio de mecanismos subyacentes a la plasticidad de los progenitores neurales del GD y las CGs, y la identificación de ligandos proneurogénicos podrían llevar al desarrollo de estrategias novedosas para el tratamiento de déficits en la separación de patrones [111].

-Señales extracelulares que regulan la neurogénesis adulta en el GD

La generación, el desarrollo y la integración funcional de las neuronas granulares en el giro dentado adulto están estrechamente regulados por diferentes factores intrínsecos (como la inducción de ciertos factores de transcripción); y factores extrínsecos (como factores neurotróficos secretados localmente), y es fundamental para el correcto funcionamiento del hipocampo dado

que conexiones aberrantes están asociadas a desórdenes del sistema nervioso, como depresión y epilepsia [112]. Debido a la significativa similitud entre la neurogénesis embrionaria y la adulta, se ha reportado que muchos mecanismos intrínsecos están conservados, aunque el origen y la naturaleza de los factores extrínsecos puede ser diferente [87]. Diversos ligandos extracelulares como la proteína morfogénica ósea (BMP, del inglés *Bone Morphogenetic Protein*), ligandos de Notch, Wnt, factores de crecimiento insulínicos, bFGF, BDNF, han sido reportados como reguladores de la neurogénesis en el GD [86]. A continuación, se enumeran los mecanismos de acción de algunos de ellos:

-BMP: BMP es un ligando perteneciente a la superfamilia de proteínas de TGF- β , al igual que GDNF. En el GD adulto, BMP es indispensable para el mantenimiento del estado quiescente de las células progenitoras [113]. Esta proteína es secretada crónicamente por las neuronas granulares y por las células progenitoras mismas; además en el nicho del GD hay presentes varios inhibidores de BMP como nogina y cordina. La pérdida de función del receptor de BMP, BMP-IA, en neuronas granulares, conlleva a una sobreactivación de las células progenitoras, llevándolas a salir de G0 [113]. BMP no es solo necesaria para regular la quiescencia de las células progenitoras, sino que además propicia la diferenciación y maduración de las neuronas granulares [114]. Este rol dual de BMP puede ser explicado por la expresión diferencial de sus receptores de membrana: las células progenitoras expresan el receptor BMP-IA, mientras que las células tipo 3 (neuroblastos) y las neuronas expresan BMP-IB. Es decir, ambos tipos celulares reciben señales de BMP, pero esta funciona como una clave de quiescencia o de diferenciación depende el tipo celular que lo recibe [113]. Es importante entonces, conocer las claves o señales extracelulares y los receptores de las mismas, dado que para un mismo ligando la respuesta celular puede ser diferente.

-Wnt: Los ligandos Wnt son secretados por astrocitos y por los progenitores neurales, y se considera que actuarían de manera autócrina y parácrina [60]. Wnts pueden inducir genes neurogénicos como NeuroD1 en CPls, y además presentan un rol clave en la formación de sinapsis y en la maduración de las CGs generadas [86]. Experimentos de pérdida de función de Wnt en los progenitores neurales del GD produjeron a un bloqueo total de la neurogénesis hipocampal [105].

-Señales mitogénicas: Tanto Notch como bFGF, se encuentran expresados en el GD y funcionan de manera similar a la reportada durante la corticogénesis, promoviendo la proliferación de las células progenitoras [115]. bFGF es capaz de promover, la diferenciación de las CGs [116]. Además, bFGF se utiliza como un factor mitogénico en cultivos celulares provenientes de GD [117].

-BDNF: Dentro de los factores neurotróficos, se ha descrito un rol para BDNF como un factor necesario para la correcta organización del árbol dendrítico y de las conexiones sinápticas de las CGs recién generadas [118]. Se mostró que una alta proporción de las neuronas generadas en animales deficientes para TrkB morían durante su maduración, implicando un rol de BDNF en la supervivencia neuronal. Además, estos animales presentaron una disminución en la formación de espinas sinápticas en el GD, y en un aumento de la ansiedad testeado en diferentes ensayos de comportamiento. Mediante el uso de diferentes técnicas que suprimieron a BDNF del GD, se ha reportado que este factor neurotrófico es requerido para una consolidación exitosa de memorias espaciales similares, sugiriendo un rol de esta molécula en la separación de patrones. Además, la inyección de BDNF recombinante en el GD, mejora este tipo de memorias [107]. Recientemente, se ha descrito que BDNF interactúa específicamente con las CGs inmaduras para promover la consolidación de este tipo de memoria episódica [119].

-GDNF: Poco se sabe del rol de GDNF en el GD, si bien su expresión en esta estructura junto a la de GFR α 1 fue altamente reportada [11, 120]. Recientemente, [25] se ha descrito que el complejo molecular GDNF/GFR α 1 juega un rol crucial en el crecimiento dendrítico y en la formación de sinapsis de neuronas piramidales en el hipocampo, durante el desarrollo temprano postnatal, dependiente del receptor NCAM. Se observó una reducción significativa en la complejidad de los árboles dendríticos apicales y basales de neuronas piramidales en los ratones deficientes para GFR α 1 respecto a los animales controles tanto en el área CA1 como CA3. Además, se vio que animales deficientes para este receptor presentaron déficits en el desarrollo sináptico del área hipocámpal CA1, CA3 y el GD. Esto fue analizado mediante microscopía electrónica. Estos resultados indicaron que GDNF y GFR α 1 son requeridos para la formación de los contactos sinápticos en el hipocampo y que cumplen un rol clave en los procesos de maduración sináptica *in vivo* en esta estructura.

Basados en estos resultados y los descritos en la primera parte de la tesis sobre precursores embrionarios, se decidió profundizar el rol de GDNF/GFR α 1 durante la neurogénesis adulta del hipocampo.

Expresión de GFR α 1 en el Giro Dentado Adulto

Con el objeto de estudiar el rol del sistema GDNF/ GFR α 1 en la neurogénesis adulta, se analizó la expresión y localización de GFR α 1 en el hipocampo adulto. Para esto se realizó una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico para GFR α 1 en cortes de cerebro de ratón de dos meses de edad. Se observó una alta expresión del receptor de GDNF en todas las áreas del hipocampo, incluido el giro dentado (GD). Dentro del GD, la inmunomarcación para GFR α 1 se observó principalmente en la capa de las células granulares (**Figura 25, A**). Acorde a la bibliografía, se detectaron niveles de GFR α 2 en la corteza, pero no en el hipocampo de ratones adultos (**Figura 25, B**).

Para elucidar en qué tipo celular se expresa GFR α 1 *in vivo*, se utilizó el ratón Emx1-Cre:GFR α 1^{flox/+} ya que en los animales heterocigotas, la delección de GFR α 1 en uno de los alelos lo convierte en un alelo reportero para la proteína verde fluorescente, GFP. Esta estrategia permitió visualizar la expresión de GFR α 1 en las CGs [21] (Ver Mat y Met o Capítulo I).

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para GFP, Sox2 -marcador de progenitores del GD-, y calbindina, como marcador de CGs maduras. No se observó colocalización de GFR α 1 en células Sox2 positivas, pero si una fuerte colocalización con calbindina, indicando que su expresión se correlaciona con la diferenciación neuronal (**Figura 25 C**).

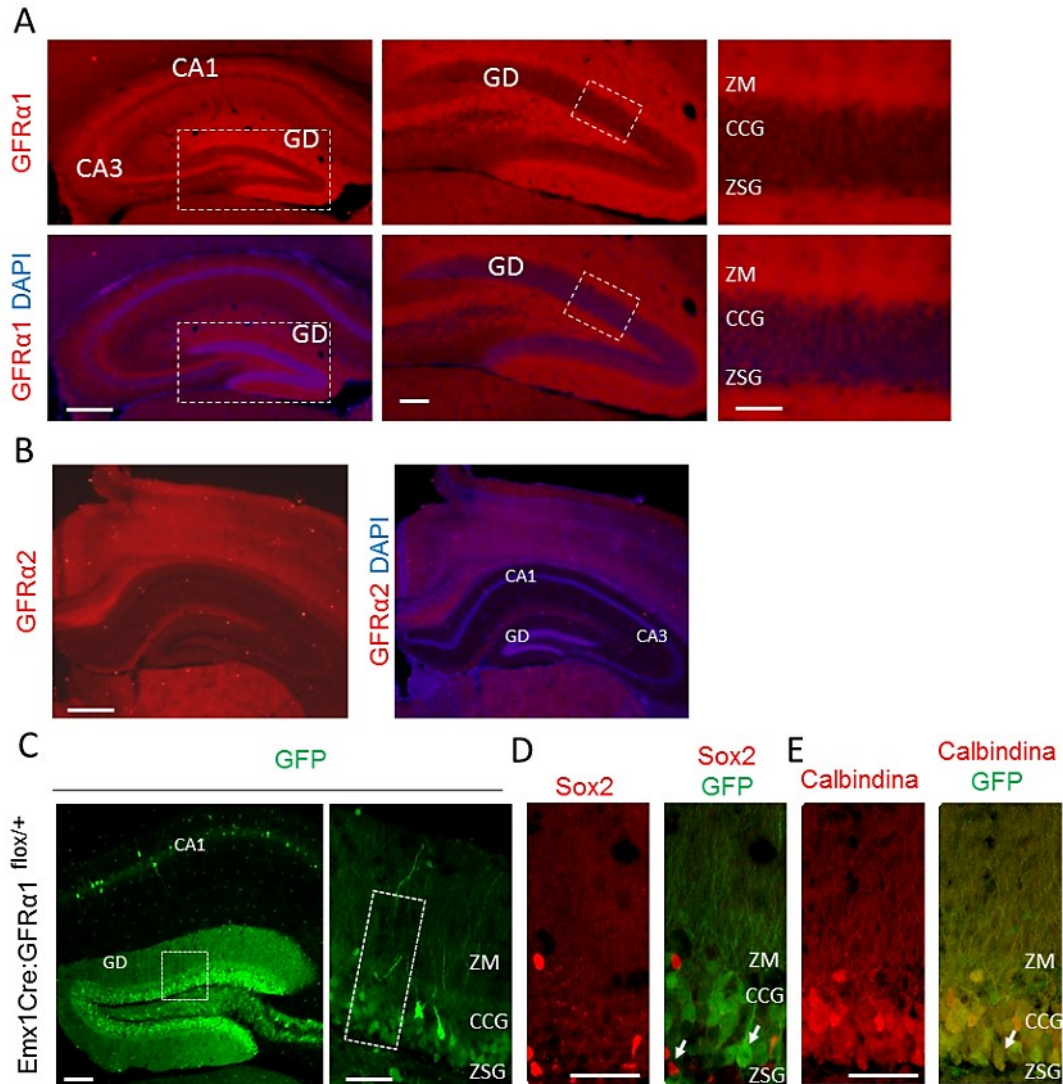


Figura 25: Expresión de GFR α 1 en el giro dentado en estadios postnatales. (A) Inmunofluorescencia contra GFR α 1 en cortes coronales de cerebro de ratón de dos meses de edad. Se utilizó DAPI como contratiñción nuclear. Se señalan las diferentes áreas hipocampales donde se observa expresión de GFR α 1. GD, giro dentado. ZM, zona molecular; CCG, capa de células granulares; ZSG, zona subgranular. Escalas: Panel de izquierda 500 μ m; panel del medio 100 μ m, panel de la derecha 50 μ m. (B) Inmunofluorescencia contra GFR α 2 en cortes coronales de cerebro de ratón de dos meses de edad. Se utilizó DAPI como contratiñción nuclear. Se observa tinción en el área cortical y no así en el hipocampo. Escala: 1mm. (C) Inmunofluorescencia contra GFP en cortes coronales de cerebro de ratón Emx1-Cre:GFR α 1^{flox/+}adulto . Se evidencian aquellas células que tienen delecionado el GFR α 1 en un alelo. Se observa alta expresión de GFP en el DG. Escalas: panel de izquierda 100 μ m, paneles de la derecha, 50 μ m (D). GFP no colocaliza con Sox2 (paneles de la izquierda), pero si muestra colocalización con calbindina (E). Las flechas indican células Sox2+ negativas para GFP y viceversa en (D), y en (E) muestran la colocalización de los marcadores.

GFR α 1 es requerido para una correcta diferenciación de las CGs *in vivo*

Basándose en la expresión de GFR α 1 en las CGs, se analizó el rol del sistema GDNF/GFR α 1 en el proceso de neurogénesis hipocampal adulta *in vivo*. Para esto se utilizaron ratones transgénicos condicionales inducibles por tamoxifeno (TAM, Ver Mat y Mét.). El uso de ratones condicionales inducibles por TAM, es muy útil debido a que permite controlar espacial y temporalmente la delección del transgén de interés. Se cruzaron ratones que expresaban la recombinasa Cre con un dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos (Cre^{ERT2}) bajo el promotor de GLAST, un marcador de células progenitoras del GD [121], con ratones GFR α 1^{flox/flox} [21]. La expresión de Cre fue inducida por inyección de TAM en ratones con genotipo heterocigotas Glast-Cre^{ERT2}:GFR α 1^{flox/+}, o homocigotas Glast-Cre^{ERT2}:GFR α 1^{flox/flox}, de manera de deleccionar a GFR α 1 en progenitores neurales adultos y su progenie inmediata, evitando posibles efectos deletéreos sobre todo el cerebro durante el desarrollo embrionario. En estos animales, la delección de GFR α 1 en el alelo GFR α 1 flanqueado por secuencias LoxP lo convierte en un alelo reportero para la proteína verde fluorescente, GFP, lo cual permite analizar la morfología de estas neuronas.

Para caracterizar el rol de GFR α 1 en la diferenciación o maduración de las CGs generadas en el hipocampo adulto, estos animales fueron tratados con TAM a los dos meses de edad, y analizados a diferentes tiempos post-inyección: 2, 4 y 8 semanas, de manera de monitorear etapas críticas de la maduración de las CGs. Durante la segunda semana de maduración las CGs, estas establecen las primeras sinapsis, reciben inputs GABAérgicos excitatorios, y envían sus axones a la CA3; luego, en un período crítico en la cuarta semana las sinapsis GABAérgicas se convierten en inhibitorias pero las GCs aún son inmaduras, presentando características electrofisiológicas únicas, comenzando su integración a los circuitos preexistentes, y cerca de la octava semana las CGs presentan características morfológicas y electrofisiológicas indistinguibles de CGs anteriormente formadas [103]. Cortes obtenidos a partir de estos animales fueron teñidos con anticuerpos anti-GFP para visualizar mejor la morfología neuronal y analizar diferentes parámetros morfométricos. Para todos los tratamientos, sólo se analizaron neuronas presentes en la porción septal del GD, debido a que la tasa de maduración de las CGs varía a lo largo del eje septo-temporal del hipocampo [102]. No se observaron diferencias en el número de células positivas para GFP entre los animales controles y deficientes para GFR α 1, para ninguna de las edades analizadas.

Luego de 15 días post inyección (dpi) de TAM, las CGs generadas en ratones heterocigotas (Glast-Cre^{ERT2}:GFR α 1^{flox/+}, en la figura: GFR α 1^{flox/+}) presentaron un árbol dendrítico con una longitud

total de $200\mu\text{m} \pm 60\mu\text{m}$ y aproximadamente 4 ramificaciones, valores levemente menores a los que han sido descritos para el crecimiento de neuronas en animales salvajes [122] (**Figura 26 A-C**). Las dendritas de estas neuronas se extienden hacia la capa molecular donde se ha descrito que recibirán contactos excitatorios de los axones que provienen de la corteza entorrinal. Sin embargo, las neuronas de la misma edad generadas en animales deficientes para $\text{GFR}\alpha 1$ ($\text{Glast-Cre}^{\text{ERT2}}:\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox/flox}}$, abreviado en la figura como $\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox/flox}}$) presentaron un árbol dendrítico significativamente reducido, con una longitud total de aproximada de $80\mu\text{m} \pm 15\mu\text{m}$ y dos ramificaciones promedio por cada neurona. El análisis de Sholl que evalúa la complejidad neuronal mostró una reducción substancial en la complejidad dendrítica comparada con los animales control (**Figura 26 D y E**). La reducción en los parámetros morfométricos analizados reflejó un retraso en la maduración de las neuronas de los animales deficientes para $\text{GFR}\alpha 1$, respecto de los animales control.

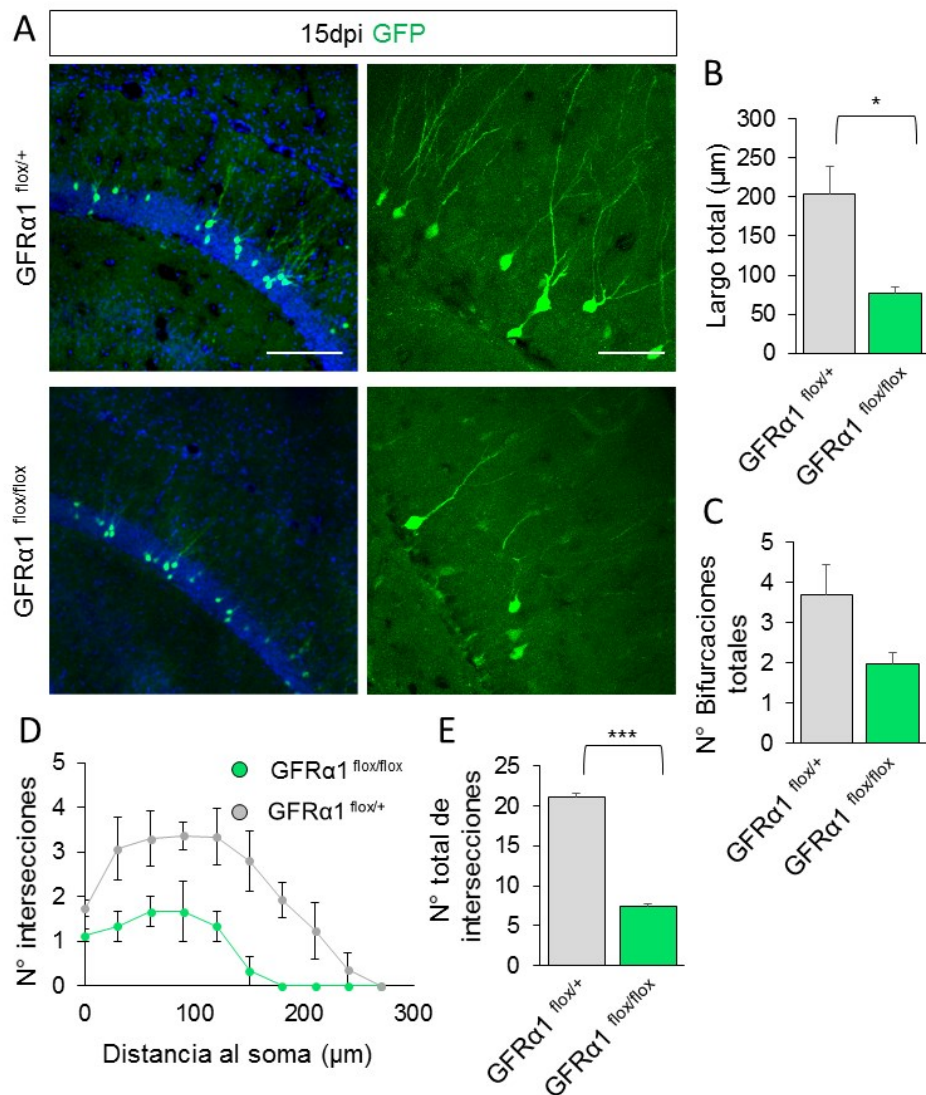


Figura 26: GFR α 1 es requerido para una correcta diferenciación neuronal luego de 15 días post-inyección (dpi) de TAM. (A) Inmunofluorescencia para GFP en cortes de cerebro de ratón adultos de genotipo heterocigota $\text{Glast-Cre}^{\text{ERT2}}:\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/+}$ abreviado, $\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/+}$, o homocigotas $\text{Glast-Cre}^{\text{ERT2}}:\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/\text{flox}}$, abreviado como $\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/\text{flox}}$, luego de 15 dpi TAM. Se utilizó DAPI como control de localización nuclear en los paneles de la izquierda. Escalas: izquierda, 200 μm ; derecha, 100 μm . (B, C) Diagramas de barras mostrando el análisis cuantitativo del largo total (B) y del número total de bifurcaciones (C) de las neuronas positivas para GFP, correspondientes a los genotipos indicados. Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. Test de T de Student D) Analisis de Sholl mostrando complejidad dendrítica para las neuronas derivadas de animales deficientes en GFR α 1 (verde) comparado con el contro (gris). (E) Diagrama de barras mostrando el número de intersecciones totales observadas en el análisis de Sholl. El resultado se expresa como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. Test de T de Student.

Las neuronas de 30 dpi de TAM en animales heterocigotas ($Glast-Cre^{ERT2}:GFR\alpha1^{flox/+}$, en la figura: $GFR\alpha1^{flox/+}$) alcanzaron una longitud final de aproximadamente $400 \mu\text{m} \pm 100 \mu\text{m}$ y 5 ± 2 ramificaciones a partir de una única dendrita primaria, que está de acuerdo con los valores descriptos para neuronas salvajes [122]. En este momento las CGs aún son inmaduras. Por otra parte, las neuronas generadas en animales deficientes en $GFR\alpha1$ ($Glast-Cre^{ERT2}:GFR\alpha1^{flox/flox}$, abreviado en la figura como $GFR\alpha1^{flox/flox}$) presentaron un crecimiento dendrítico significativamente menor, con una longitud total de aproximadamente $190 \mu\text{m} \pm 40 \mu\text{m}$ y 3 ramificaciones en promedio por neurona (**Figura 27 A-C**). El análisis de Sholl de neuronas de 30 dpi evidenció una reducción en la complejidad dendrítica en las neuronas deficientes para $GFR\alpha1$ respecto de las neuronas de los animales control (**Figura 27 D y E**)

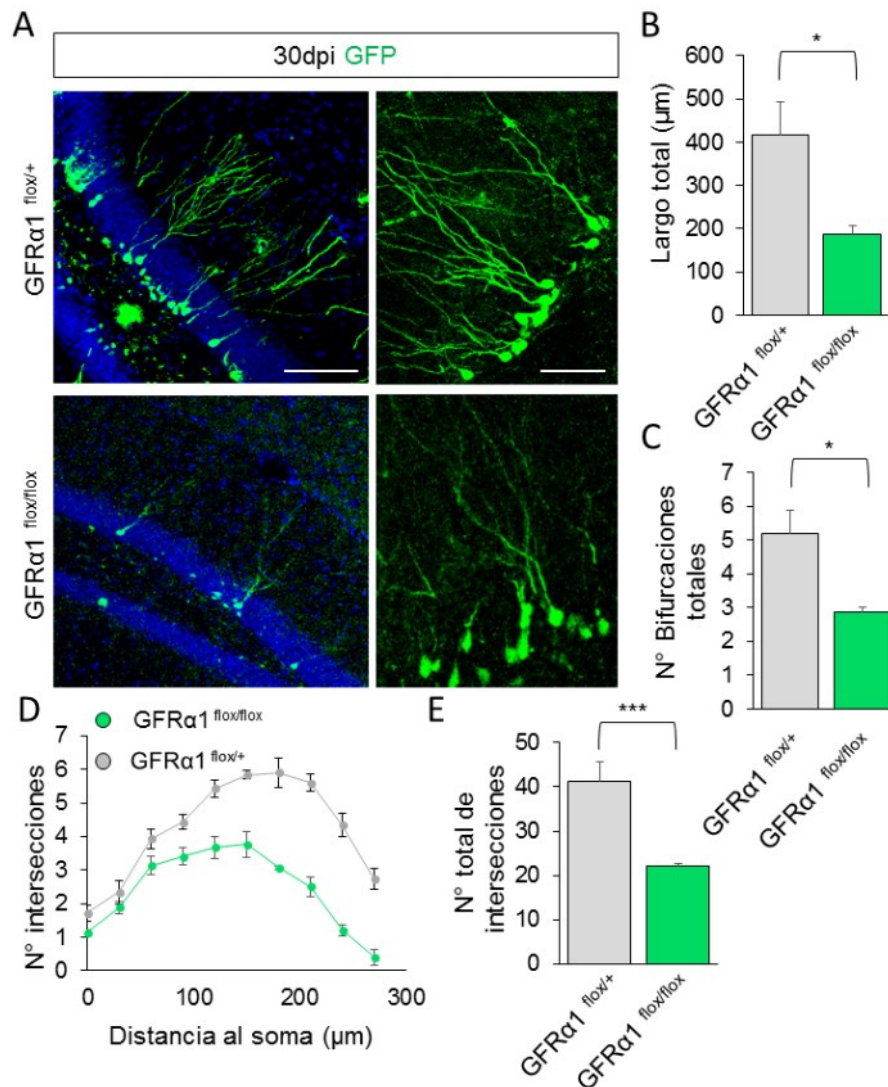


Figura 27: GFR α 1 es requerido para una correcta diferenciación neuronal luego de 30 dpi de TAM. (A) Inmunofluorescencia para GFP en cortes de cerebro de ratón adultos de genotipo heterocigota $\text{GlastCre}^{\text{ERT2}}:\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/+}$ abreviado, $\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/+}$, o homocigotas $\text{GlastCre}^{\text{ERT2}}:\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/\text{flox}}$, abreviado como $\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/\text{flox}}$, luego de 30 dpi TAM. Se utilizó DAPI como control de localización nuclear en los paneles de la izquierda. Escalas: izquierda, 200 μm ; derecha, 100 μm . (B, C) Diagrama de barras mostrando el análisis cuantitativo del largo total (B) y del número total de bifurcaciones (C) de las neuronas positivas para GFP, para ambos genotipos. Los resultados se muestran como el promedio de cuatro experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. Test de T de Student. D) Analisis de Sholl mostrando complejidad neurítica menos para las neuronas derivadas de animales deficientes en GFR α 1 (verde) comparado con el control (gris). (E) Histograma mostrando el número de intersecciones totales observadas en el análisis de Sholl. El resultado se expresa como el promedio de cuatro experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. Test de T de Student.

La diferencia significativa en la complejidad dendrítica entre las GSs de animales deficientes para GFR α 1 y las CGs de animales control, se mantuvo a los 60 dpi de TAM, estadio en el cual estas neuronas se considera que han alcanzado la maduración morfológica y funcional (**Figura 28**). En todas las etapas post inyección de TAM evaluadas, las neuronas derivadas de animales deficientes para GFR α 1 presentaron una disminución significativa en la mayoría de los parámetros medidos, indicando una disminución en su crecimiento dendrítico respecto a las neuronas derivadas de animales control (**Figura 26, 27, 28**).

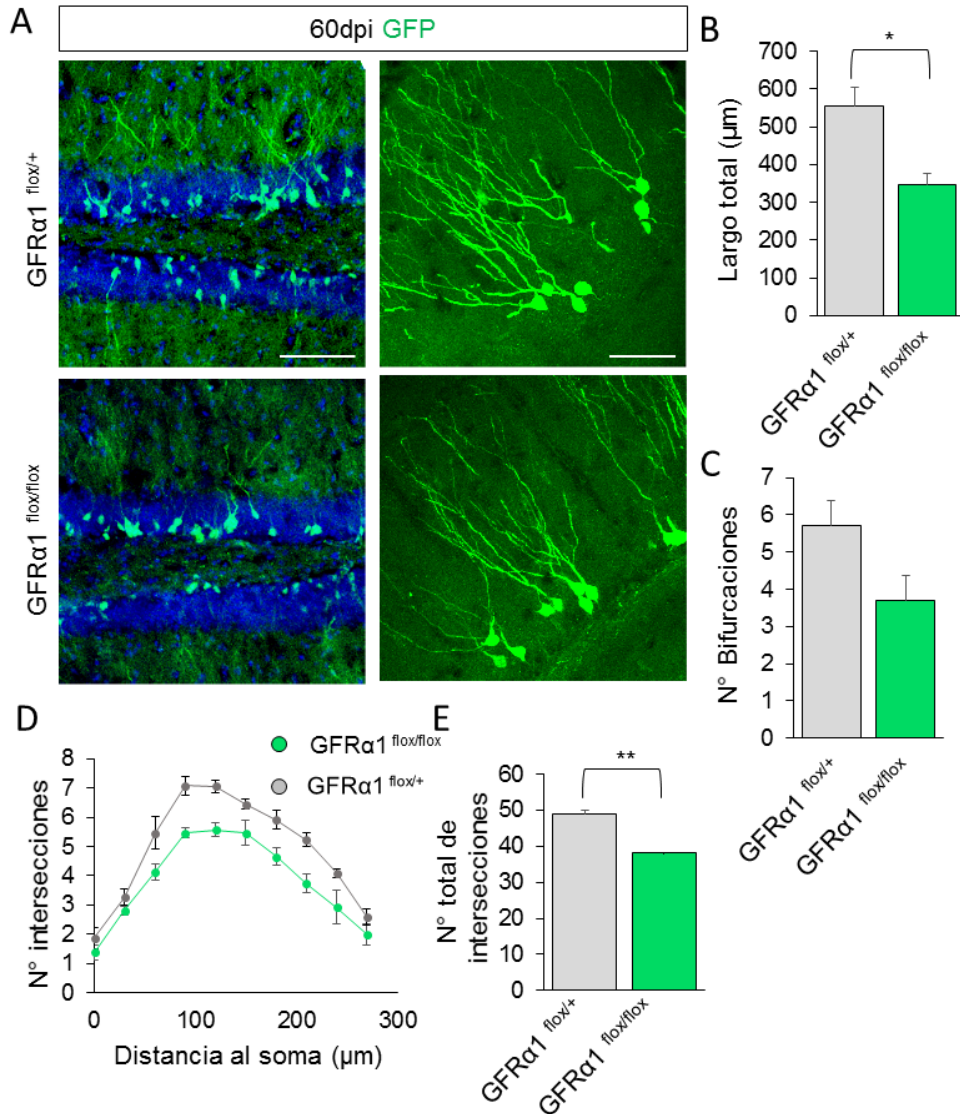


Figura 28: GFR α 1 es requerido para una correcta diferenciación neuronal luego de 60 dpi de TAM. (A) Inmunofluorescencia para GFP en cortes de cerebro de ratón adultos de genotipo heterocigota $\text{GlastCre}^{\text{ERT2}}:\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/+}$ abreviado, $\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/+}$, o homocigotas $\text{GlastCre}^{\text{ERT2}}:\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/\text{flox}}$, abreviado como $\text{GFR}\alpha 1^{\text{flox}/\text{flox}}$, luego de 60 dpi TAM. Se utilizó DAPI como control de localización nuclear en los paneles de la izquierda. Escalas: izquierda, $200\mu\text{m}$; derecha, $100\mu\text{m}$. (B, C) Diagramas de barras mostrando el análisis cuantitativo del largo total (B) y del número total de bifurcaciones (C) de las neuronas positivas para GFP, para ambos genotipos indicados. Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. Test de T de Student. (D) Analisis de Sholl mostrando complejidad neurítica menos para las neuronas derivadas de animales deficientes en GFR α 1 (verde) comparado con el contro (gris). (E) Histograma mostrando el número de intersecciones totales observadas

en el análisis de Sholl. El resultado se expresa como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. Test de T de Student.

A partir de los resultados obtenidos se construyeron curvas comparativas para analizar el crecimiento dendrítico a lo largo del tiempo, en animales control y aquellos deficientes en GFR α 1. El crecimiento total neurítico de los animales deficientes para GFR α 1 fue significativamente menor a el crecimiento total de neuronas control, aun a los 60dpi, como se observó anteriormente. Si bien las neuronas derivadas de animales deficientes para GFR α 1 presentaron una reducción significativa en los parámetros morfológicos analizados respecto a neuronas derivadas de animales control para cada uno de los tiempos analizados, se observó que el árbol dendrítico de estas neuronas mantuvo un crecimiento mas lento a lo largo del tiempo evaluado, sin llegar, al cabo de 60 dpi, a los valores de las neuronas control. Esta reducción en la longitud dendrítica indicaría que la ausencia de GFR α 1 retrasa el crecimiento neuronal. Para concluir si las neuronas generadas en los animales deficientes en GFR α 1 pueden alcanzar un fenotipo neuronal maduro será necesario evaluar tiempos posteriores a 60 dpi. La reducción en el desarrollo dendrítico observada en estos animales sugiere que estas neuronas tendrían un menor grado de maduración neuronal, y por lo tanto, una conectividad sináptica reducida.

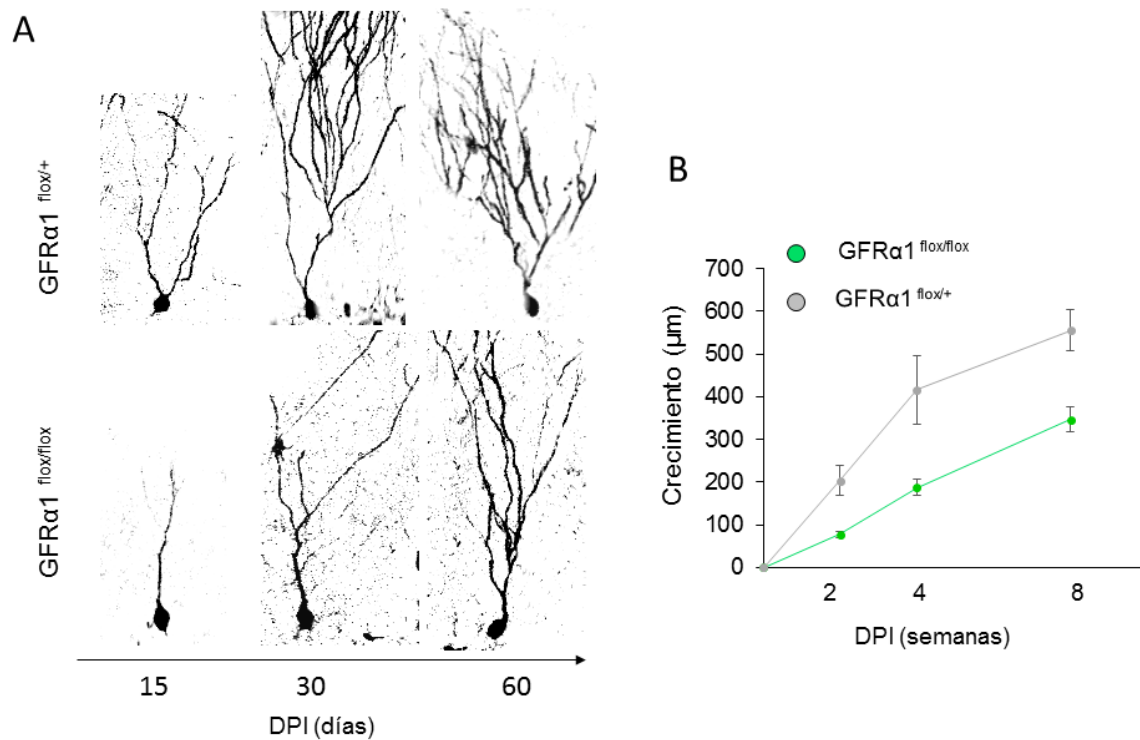


Figura 29: La delección de GFR α 1 en el GD retrasa la maduración de las CGs. (A) Fotomicrografías de neuronas positivas para GFP, derivadas de animales de genotipo heterocigota GlastCre^{ERT2}:GFR α 1^{flox/+} abreviado, GFR α 1^{flox/+}, o homocigotas GlastCre^{ERT2}:GFR α 1^{flox/flox}, abreviado como GFR α 1^{flox/flox}, luego diferentes tiempos de inducción con TAM. (B) Curva comparativa de la longitud del árbol dendrítico de las neuronas nacidas post-inducción de TAM, en ratones adultos en ambos genotipos analizados. Se observa un retraso en el crecimiento de las neuronas derivadas de animales deficientes en GFR α 1. Para cada punto se grafica el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. (N=3)

Para evaluar el grado de madurez de las neuronas controles o deficientes en GFR α 1 a lo largo de su desarrollo, se decidió analizar la colocalización de GFP con dos marcadores de distintos estadios de maduración neuronal: DCX, para marcar CGs inmaduras y calbindina, para marcar CGs en estadios de desarrollo neuronal posteriores (**Ver figura 23**). Se analizaron estos marcadores en animales controles o deficientes para GFR α 1 luego de ocho semanas de inducción de TAM. De acuerdo con el retraso en la maduración morfológica descrita previamente, los animales deficientes para GFR α 1, presentaron un aumento significativo respecto al control del porcentaje de células positivas DCX que expresaban GFP (**Figura 30 A y B**), y una disminución significativa del porcentaje de colocalización de GFP con calbindina (**Figura 30, C y D**). Esto indicaría que la delección de GFR α 1 en los progenitores del GD impide el correcto desarrollo de las neuronas nacidas en el adulto, indicando que el sistema GDNF/GFR α 1 podría ser un sistema clave para promover la diferenciación celular y morfológica de las CGs derivadas de los progenitores del GD.

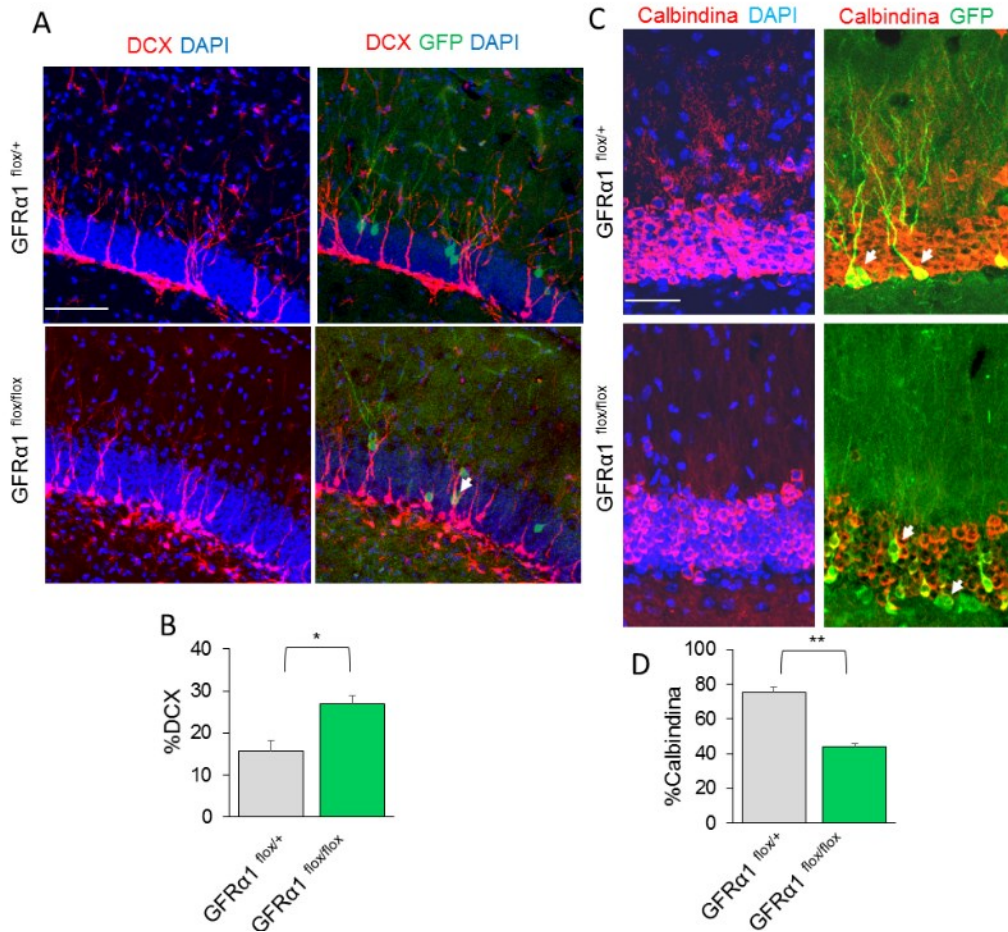


Figura 30: La delección de GFRα1 en el GD retrasa la maduración de las CGs. (A) Imagen confocal de secciones de hipocampo que muestran una inmunotinción contra DCX (rojo), GFP (verde) y DAPI, correspondientes a ratones $GlastCre^{ERT2}:GFR\alpha1^{flox/+}$ abreviado, $GFR\alpha1^{flox/+}$, o homocigotas $GlastCre^{ERT2}:GFR\alpha1^{flox/flox}$, abreviado como $GFR\alpha1^{flox/flox}$, luego de 60 dpi de TAM. La flecha señala colocalización para ambos marcadores. Escala: 200 μ m. (B) Diagrama de barras que muestra el porcentaje de células positivas para GFP, que expresan DCX por cada 25mm² de GD. Se cuantificaron 5 áreas diferentes por corte, de un total de tres cortes por genotipo. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de tres genotipos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. Test de T de Student. (C) Inmunofluorecencia contra calbindina(rojo) y GFP (verde) y DAPI, en cortes de cerebro de ratón de genotipo heterocigota y homocigotas deficientes para GFRα1, luego de 60 dpi TAM. Las flechas indican la colocalización entre ambos marcadores en el panel de arriba y células GFP positivas, donde la marca de calbindina está ausente en el panel de abajo (D) Diagrama de barras que muestra el porcentaje de células que expresan GFP y calbindina por cada 25mm² de GD. Se cuantificaron 5 áreas diferentes por corte, de un total de tres cortes por genotipo. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de tres genotipos independientes \pm error estándar. * $p < 0,05$. Test de T de Student.

Los ratones deficientes en GFR α 1 presentaron déficits en la codificación de información espacial.

Las neuronas inmaduras generadas en el GD exhiben distintas propiedades fisiológicas respecto de las neuronas maduras. Específicamente, durante el período comprendido entre la cuarta y octava de la maduración de las CGs, las neuronas jóvenes presentan alta plasticidad sináptica y un incremento en la excitabilidad [110, 123]. Estas características son críticas para cumplir su rol en un tipo de procesamiento de memoria espacial, conocido como “pattern separation” [106]. Debido a que las CGs inmaduras deficientes para GFR α 1 presentaron una disminución de su diferenciación morfológica durante este período, se decidió evaluar la memoria espacial de separación de patrones en estos animales.

Para realizar estos ensayos, se utilizaron ratones machos jóvenes de genotipo GlastCre^{ERT2}:GFR α 1^{flox/flox} y GlastCre^{ERT2}:GFR α 1^{+/+}, como control que fueron inyectados con TAM y evaluados a los 30 dpi. Lo primero que se analizó fue el comportamiento exploratorio en ensayos de campo abierto. Este ensayo permite evaluar la capacidad de exploración de los animales, su capacidad de habituación y su memoria espacial al contexto (memoria de habituación). Para esto, se registró el movimiento de ratones deficientes para GFR α 1 o controles en un campo abierto circular cubierto con una cama de viruta, durante 5 minutos durante 2 días consecutivos. Se analizó la distancia recorrida para cada genotipo en la primera sesión, sin evidenciar diferencias significativas (**Figura 31 A y B**). Además, los ratones de ambos genotipos presentaron el mismo grado de ansiedad, visualizado como el tiempo transcurrido en el centro del campo abierto (**Figura 31 C**). Ambos genotipos mostraron capacidades similares de habituación al campo abierto (**Figura 31 D-G**), y exhibieron memorias de habituación similares, y coincidentes con lo descrito en la bibliografía (**Figura 31 H**). Todos estos datos indicaron que la delección de GFR α 1 en los progenitores del GD no influye en el comportamiento exploratorio ni en la generación de un tipo de memoria espacial, la memoria de habituación.

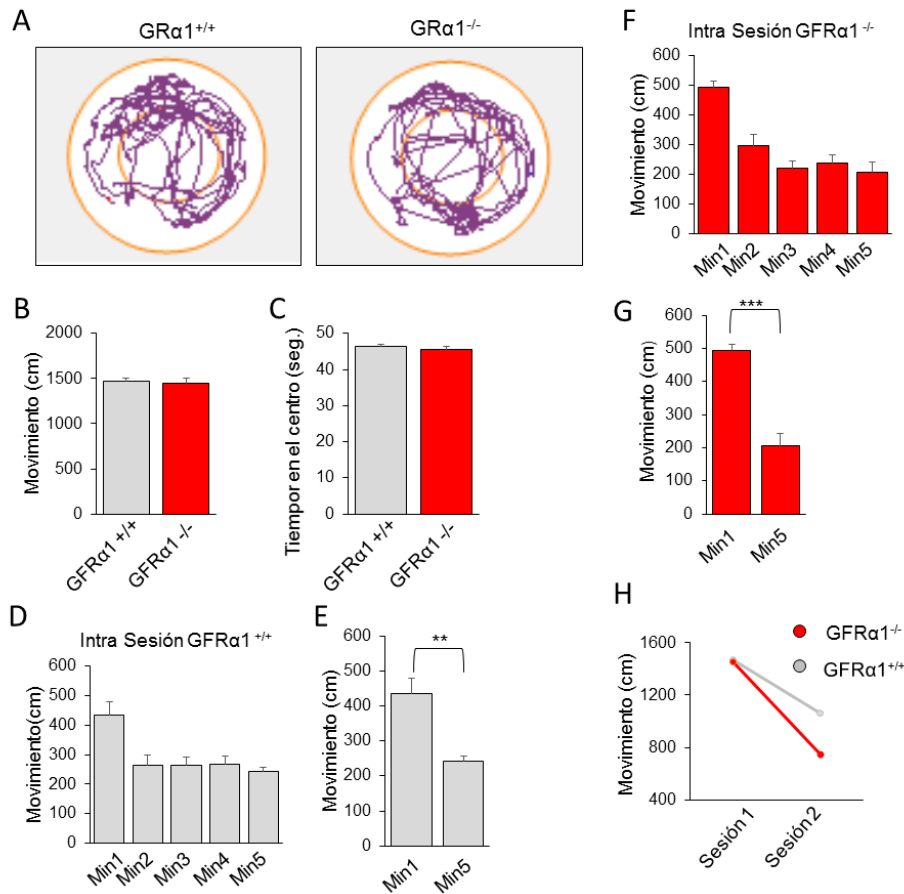


Figura 31: Los animales deficientes en GFR α 1 habitan y forman memoria de habituación normalmente.

(A) Imágenes representativas de las trayectorias de locomoción durante los primeros dos minutos en el campo abierto de animales de genotipo salvaje para GFR α 1: $GlastCre^{ERT2}:GFR\alpha1^{+/+}$ abreviado, $GFR\alpha1^{+/+}$, o deficientes para GFR α 1: $GlastCre^{ERT2}:GFR\alpha1^{flx/flx}$, abreviado como $GFR\alpha1^{flx/flx}$, luego de 30 dpi de TAM. (B) Diagrama de barras mostrando el movimiento o trayectoria total de la primera sesión de campo abierto en animales $GFR\alpha1^{+/+}$ (gris) o $GFR\alpha1^{flx/flx}$ (rojo). No se encontraron diferencias significativas. Test de T de Student. (C) Gráfico de barras mostrando el tiempo total transcurrido en el centro de la arena del campo abierto durante de la primera sesión en animales $GFR\alpha1^{+/+}$ (gris) o $GFR\alpha1^{flx/flx}$ (rojo). No se encontraron diferencias significativas, Test de T de Student. (D, F) Análisis de parámetros locomotores de habituación intra-sesión de animales $GFR\alpha1^{+/+}$ (D), o $GFR\alpha1^{flx/flx}$ (F). (E, G) Diagrama de barras mostrando el movimiento o trayectoria total durante el primer minuto del ensayo de campo abierto, comparado con el último minuto de la misma sesión en animales $GFR\alpha1^{+/+}$ (E), o $GFR\alpha1^{flx/flx}$ (G). * $p < 0,05$. Test de T de Student Pareado. (H) Análisis de la memoria de habituación inter-sesión de animales $GFR\alpha1^{+/+}$ (gris) o $GFR\alpha1^{flx/flx}$ (rojo). $N=8$ $GFR\alpha1^{flx/flx}/9$ $GFR\alpha1^{+/+}$

Luego, se realizó el ensayo de reconocimiento espontáneo de localización de objetos o, ensayo de separación de patrones. El protocolo utilizado es una modificación de la tarea de reconocimiento espontáneo de localización de objetos (SLR, del inglés *spontaneous location recognition*) [107], donde los animales son expuestos a dos objetos idénticos, posicionados en dos locaciones diferentes en la arena. Luego de un tiempo variable, los animales son presentados a una fase de evaluación en la que uno de los objetos fue desplazado a una nueva ubicación. Debido a que los ratones prefieren naturalmente la novedad, pasan mucho más tiempo explorando el objeto en la nueva localización que en la familiar [107]. En el protocolo comportamental testeado se usaron dos condiciones diferentes: una condición de disimilitud (D-SLR, del inglés *spontaneous location recognition*) o similitud (S-SLR, del inglés *spontaneous location recognition*), como está descrito en la sección Mat. y Mét. (**Figura 32, A**). Brevemente, el ensayo consistió de dos secciones con su propia sesión de entrenamiento y evaluación. Cada sección tiene como objetivo evaluar la codificación de memoria espacial dado un contexto similar o disímil al del entrenamiento. Para cada una de las secciones se realizó un entrenamiento en el cual tres objetos idénticos entre sí fueron presentados en el contexto. Para la tarea disímil (D-SLR), estos objetos estaban bien separados entre sí (**Figura 32 A, arriba**), mientras que, para la tarea similar (S-SLR), dos objetos se encontraban próximos entre sí y el otro más alejado (**Figura 32 A, abajo**). Durante la evaluación, se expone al sujeto experimental a dos objetos idénticos: uno en la misma posición en la que se encontró durante el entrenamiento, y el otro, en una posición novedosa, y equidistante a los otros dos objetos presentados anteriormente (**Figura 32 A**). Debido a la preferencia intrínseca de los roedores a la novedad, se espera que, en ambas condiciones, tanto disímil como la similar, los sujetos prefieran y exploren más el objeto en posición novedosa. De esta manera, al elaborar un índice de preferencia (Ver Mat y Mét.), se observe que para ambas tareas éste sea mayor a cero. Si esto sucede, significa que el sujeto experimental fue capaz de recordar la localización espacial de los objetos, y, por lo tanto, capaz de “separar de patrones”.

Tanto en la condición similar como disímil, durante el entrenamiento los animales de ambos genotipos exploraron todos los objetos de manera equitativa (**Figura 32, B-E**), lo cual indica que no tenían una preferencia inicial por ninguna de las posiciones al iniciar la evaluación. En el testeo de la condición disímil tanto los ratones controles, indicados en la figura como $GFR\alpha 1^{+/+}$ como los deficientes para $GFR\alpha 1$, indicados en la figura como $GFR\alpha 1^{flox/flox}$, fueron capaces de resolver la tarea, es decir de recordar los objetos expuestos en el entrenamiento individualmente, y reconocer la posición novedosa expuesta en la evaluación. Sin embargo, durante el testeo de la

condición similar solo los ratones controles fueron capaces de discriminar las ubicaciones espaciales de los objetos presentados en el entrenamiento como diferentes, y reconocer la posición novedosa. Es decir, los animales deficientes en GFR α 1 presentan fallas en el procesamiento de la memoria espacial dependiente de las CGs inmaduras del GD. (**Figura 32, F**).

Estos resultados indican que el sistema GDNF/GFR α 1 está involucrado en la maduración de las CGs generadas en el hipocampo adulto. Las CGs jóvenes, de un mes de edad, presentan características únicas, que las hace necesarias para la codificación de memorias espaciales, en particular de memorias de separación de patrones. Durante este período fallas en el desarrollo neurítico, pueden verse reflejadas en la incapacidad de desarrollar estas memorias. Esto sucede con los animales deficientes en GFR α 1 de genotipo *GlastCre^{ERT2}:GFR α 1^{flox/flox}*, luego de un mes de inducción con TAM, indicando un rol fisiológico para el receptor de GDNF en esta población neuronal.

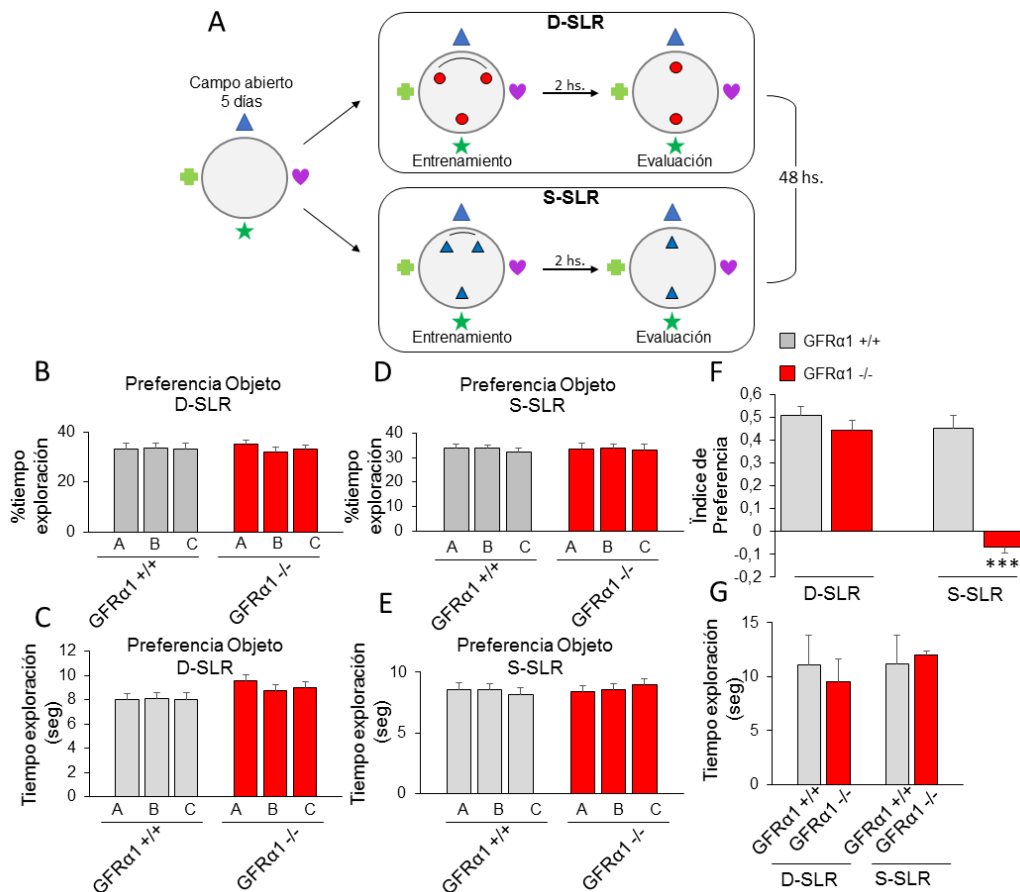


Figura 32: Los animales deficientes en GFR α 1 presentan defectos en la codificación de la información espacial. (A) Esquema del protocolo utilizado para evaluar memorias episódicas de separación de patrones. El círculo indica el campo abierto, y las figuras por fuera de éste las claves espaciales. Las figuras dentro del

campo abierto indican los objetos idénticos presentados durante el entrenamiento y el testeo. (B, D) Análisis de los porcentajes totales de exploración durante la fase de entrenamiento en la condición disímil (B) y similar (D), de ratones de genotipo salvaje para GFR α 1: GlastCre^{ERT2}:GFR α 1^{+/+} abreviado, GFR α 1^{+/+}, o deficientes para GFR α 1 :GlastCre^{ERT2}:GFR α 1^{flox/flox} , abreviado como GFR α 1^{flox/flox}. Los resultados son expresados como el promedio del porcentaje de exploración de 8 animales deficientes para GFR α 1 y 9 controles \pm error estándar. No hubo diferencias significativas entre los parámetros evaluados. Anova de dos vías de medidas repetidas. (C, E) Análisis de los tiempos absolutos de exploración durante la fase de entrenamiento en la condición disímil (C) y similar (E). Los resultados son expresados como el promedio del porcentaje de exploración \pm error estándar. No hubo diferencias significativas entre los parámetros evaluados. Anova de dos vías de medidas repetidas (F) Análisis del índice de preferencia de objetos durante la fase de evaluación tanto para la condición disímil como la similar. Los resultados son expresados como el promedio de los índices de preferencia \pm error estándar. *p<0,001. Anova de dos vías con post-test de Bonferroni (G) Histogramas mostrando el tiempo absoluto de exploración para ambos objetos durante la fase de evaluación para ambas condiciones. Los resultados son expresados como el promedio del tiempo de exploración \pm error estándar. No hubo diferencias significativas entre los parámetros evaluados. Anova de dos vías.

De las dos zonas neurogénicas en el cerebro adulto, la neurogénesis hipocampal fue la mayormente estudiada, debido a que participa en funciones cognitivas superiores, como el procesamiento de memorias. Este proceso se observó que ocurre en mamíferos, incluidos los humanos y contribuye significativamente a la plasticidad hipocampal en toda la vida adulta [124]. La neurogénesis hipocampal está restringida en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado, donde se generan neuronas excitatorias llamadas células granulares (CGs). Los axones de estas células forman parte de las fibras musgosas que contactan la CA3. Se originan a partir de precursores neuronales similares a la glía radial presentes en el cerebro en desarrollo, que expresan marcadores de glía radial y tienen ciclos celulares muy lentos, permaneciendo largos periodos quiescentes. Estos progenitores dan origen a los progenitores intermedios y luego, pasando brevemente por un estadio de neuroblasto, las neuronas recién generadas comienzan un estadio de maduración, donde extienden sus dendritas hacia la capa molecular, y sus axones hacia CA3. Luego de un periodo de 8 semanas aproximadamente, las CGs nacidas en el giro dentado adulto completa su desarrollo y maduración hasta hacerse indistinguibles de CGs preexistentes[89].

El desarrollo y la integración funcional de las CGs en el giro dentado adulto están estrechamente regulados por diferentes factores intrínsecos -como la inducción de programas transcripcionales mediados por ejemplo por PAX6, o Sox2, la acción de mecanismos epigenéticos y ARNs no codificantes-; y factores extrínsecos -como factores de crecimiento, morfógenos, neurotransmisores, y factores neurotróficos secretados localmente, como BDNF, IGF-1 y FGF2, [87, 91, 125]. En particular, poco se conoce del rol de GDNF y su receptor, GFR α 1 en la neurogénesis hipocampal adulta, aunque su expresión en el GD fue varias veces reportada [11, 18]. Recientemente, se ha descripto que el complejo molecular GDNF/GFR α 1 juega un rol crucial en el crecimiento dendrítico y en la formación de sinapsis de neuronas piramidales en el hipocampo, durante el desarrollo temprano postnatal. En este trabajo se corroboró que GFR α 1 se expresa fuertemente en el giro dentado, y que ensayos de pérdida de función del mismo conllevan a una reducción en el número de contactos sinápticos en el GD [25]. Además, numerosos trabajos reportan a GDNF como un factor “pro-neurogénico” en numerosos sistemas [66, 126], y en el primer capítulo de la presente tesis se lo describe como un factor promotor de la diferenciación neuronal de los precursores corticales. Basados en estas evidencias, se procedió a analizar si el sistema GDNF/GFR α 1 cumple alguna función en la neurogénesis en el hipocampo adulto.

En la primera parte de este capítulo, se corroboró que GFR α 1 se expresa en el GD, y en particular, en la capa de CGs. Además, se vio que colocaliza fuertemente con el marcador celular calbindina, presente en los estadios más desarrollados de las CGs (**Figura 25**). Para estudiar en detalle su rol en la neurogénesis adulta, se realizaron experimentos de pérdida de función de GFR α 1 en el GD. Para esto, se utilizaron ratones transgénicos condicionales e inducibles con TAM. Ratones de genotipo homocigota (Glast-Cre^{ERT2}: GFR α 1^{fl/fl}) o heterocigota (Glast-Cre^{ERT2}: GFR α 1^{fl/+}) para GFR α 1 fueron inyectados con TAM, y luego de diferentes días post-inyección (15, 30 y 60 días), se analizaron parámetros morfométricos de las neuronas generadas en el GD, mediante la tinción de GFP. Para todas las edades analizadas se observó una disminución significativa del crecimiento dendrítico en aquellas neuronas deficientes para GFR α 1 respecto de neuronas control (**Figuras 26, 27, 28 y 29**). Mediante una curva de crecimiento dendrítico en el tiempo para ambos genotipos, se vio que el árbol neurítico de las neuronas deficientes para GFR α 1 presentaron un crecimiento retrasado en el tiempo sin llegar, al cabo de los dos meses post-inyección de TAM, a los valores de las neuronas control. Esta reducción en la longitud neurítica indicaría que la ausencia de GFR α 1 retrasa el crecimiento neuronal, aún en estadios tempranos del desarrollo neuronal. Sería interesante analizar si las CGs generadas en los animales deficientes en GFR α 1 alcanzan más adelante en el tiempo un fenotipo neuronal maduro. Este retraso madurativo fue corroborado con inmunofluorescencias para DCX, y calbindina (**Figura 30**).

GFR α 1 parecería cumplir un rol en la neurogénesis adulta, regulando una correcta maduración de las CGs y el establecimiento del árbol dendrítico de estas neuronas. Resultados similares se han descrito para CGs generadas en ratones deficientes para el receptor de BDNF, TrkB. [118]. En estos experimentos de pérdida de función de TrkB las neuronas granulares presentaban fallas en el crecimiento de los árboles dendríticos, y estos defectos morfológicos eran rescatados cuando se inyectaba en el GD un retrovirus que transducía una forma funcional de TrkB en las CGs. Sería interesante realizar experimentos de recuperación de fenotipo con los animales deficientes para GFR α 1.

La regulación por parte de GDNF/GFR α 1 en la arborización dendrítica ha sido descrito en varias poblaciones neuronales. Por ejemplo, GDNF a través de GFR α 1 regula el crecimiento de árboles dendríticos de neuronas piramidales en CA1 y CA3 durante el desarrollo hipocampal en las primeras semanas post-natales [25]. Además, en el primer capítulo de la tesis se describió un rol similar en la diferenciación de neuronas glutamatérgicas derivadas de presensores corticales

embrionarios. Esto parecería indicar que la regulación de la diferenciación morfológica sería un rol conservado para el sistema GDNF/GFR α 1 en varias poblaciones neuronales.

Numerosos trabajos reportan que los procesos de crecimiento dendríticos, van de la mano con los procesos que involucran conectividad sináptica, de manera que, mientras que el tamaño y la forma del árbol dendrítico en crecimiento determina el número y el tipo de sinapsis que se forman, los nuevos contactos son responsables de la estabilización de los procesos dendríticos en crecimiento [127, 128]. Recientemente, se observó que CGs deficientes para Cdc42 y Rac1, dos GTPasas de la familia de Rho, presentaban árboles dendríticos disminuidos y además fallas en la maduración de espinas dendríticas respecto a las neuronas control [122]. Sería interesante, analizar qué rol cumple el sistema GDNF/GFR α 1 en la formación de contactos sinápticos o espinas dendríticas durante la maduración de las CGs.

Se ha reportado que la adición de GDNF al medio de cultivos primarios de hipocampo y corteza producía un aumento en el largo de las proyecciones axonales [12]. Sería interesante analizar entonces, si las proyecciones axonales de las CGs deficientes y controles para GFR α 1 que proyectan hacia la CA3, presentan diferencias.

La diferencia observada en el grado de maduración neuronal entre animales deficientes para GFR α 1 o controles podría deberse a que las células progenitoras en los precusores deficientes en GFR α 1 proliferan y salen del ciclo celular más tardíamente que los progenitores del GD de los animales control. Para testear esto, se realizaron inyecciones de BrDU, una semana después de la inducción de TAM. LA inyección de BrDU se realizó durante todo el día de manera de marcar a todos los precusores proliferantes en ese momento. Dos días después se realizaron inmunotinciones contra KI67 de manera de corroborar si había alguna diferencia entre los precusores que seguían proliferando (positivos para KI67 y BrDU) entre ambos genotipos. Resultados preliminares indican que los precusores de GD de animales deficientes para GFR α 1 tardan más en salir del ciclo celular que los precusores controles, sin embargo, es necesario aumentar el número de animales analizados para poder concluir esto.

Si bien en la presente tesis no se ha estudiado el rol de GDNF en la proliferación de los precusores presentes en el GD, en el primer capítulo de la tesis se observó que este factor neurotrófico disminuye la proliferación de progenitores embrionarios. Sería interesante conocer si el sistema GDNF/GFR α 1 cumple un rol similar sobre los precusores adultos. Se ha reportado que diversos sistemas como el ligando IGF-1 y Notch regulan la proliferación de los progenitores

neurales adultos en el GD. En particular, la sobreexpresión de IGF-1 en el GD llevó a un aumento de la proliferación de los precursores adultos en la ZSG [129].

Se ha descrito que no hay expresión de Ret en GD adulto, al menos en condiciones fisiológicas [11]. Debido a que GFR α 1 carece de dominio extracelular, sería interesante conocer con que receptor interactúa para cumplir su función. En particular no se conoce función de NCAM durante la neurogénesis, pero sí que está involucrado en procesos de plasticidad sináptica. Además, es el mediador del efecto observado para GDNF/GFR α 1 en el desarrollo de las neuronas hipocampales en CA1 y CA3. Sería importante analizar si NCAM es el correceptor asociado a GFR α 1 durante la neurogénesis adulta.

Durante los últimos años numerosos trabajos han reportado diferentes funciones para la neurogénesis adulta, si bien su rol biológico aún no está del todo elucidado [112]. Las CGs nuevas están involucradas en numerosas tareas de aprendizaje y procesos cognitivos. Las primeras evidencias de que la neurogénesis adulta está involucrada en procesos de memoria provino de experimentos en los cuales, utilizando una toxina para disminuir el número de CGs generadas en el cerebro de ratas adultas se observó una disminución en la tarea de condicionamiento dependiente de hipocampo [130]. Años después, utilizando estrategias de ingeniería genética para impedir la formación de nuevas CGs en el GD, se reportó que animales con la neurogénesis interrumpida mostraron defectos en la generación de memorias espaciales medidos en múltiples paradigmas comportamentales como ensayos de campo abierto, el laberinto acuático de Morris, y fallas en el condicionamiento al miedo contextual (“contextual fear conditioning”) [106, 131]. Además, se ha demostrado recientemente que la neurogénesis hipocampal está asociada al control emocional, como al estrés y a la depresión [132]. Aunque aún no está completamente claro como las nuevas CGs generadas cumplen estas funciones, numerosos reportes indican que la clave podría estar en la gran excitabilidad de las CGs jóvenes.

Las CGs durante su maduración, presentan un período crítico de mayor excitabilidad y plasticidad que las CGs maduras. Este período, alrededor de la cuarta y sexta semana de edad, es importante para la supervivencia e integración en los circuitos sinápticos preexistentes [133], y puede ser la clave para entender cómo las CGs inmaduras ejercen su impacto funcional en el cerebro adulto. Estas neuronas son más excitables, de manera que estímulos menores son capaces de generar una respuesta celular, como por ejemplo de potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long term potentiation*). Además, se ha reportado que los bajos umbrales de estimulación necesarios para obtener una respuesta en las neuronas de 4-6 semanas de edad es crítico para la

capacidad del GD de distinguir inputs muy similares y luego, con el tiempo, transformar esta información en representaciones altamente específicas y diferentes, concepto conocido como “separación de patrones” [110, 133]. Este proceso, a nivel comportamental, se define como la capacidad de discriminar memorias derivadas de estímulos similares que se presentan cercanamente en el tiempo o el espacio, y es una característica crítica en la memoria episódica. Debido a que las CGs inmaduras de 4 semanas de edad deficientes para GFR α 1 presentaban un árbol dendrítico disminuido, fue interesante analizar si los ratones de esta edad presentaban déficits para discriminar memorias espaciales similares.

Los primeros 2 días de los 5 días de habituación al contexto necesaria para realizar los ensayos de separación de patrones, se aprovecharon para realizar un ensayo de campo abierto. Los ensayos de campo abierto son una medida común del comportamiento de exploración y actividad general en roedores. En estos ensayos se pueden medir numerosos parámetros como la distancia total recorrida, el tiempo dedicado a explorar los límites del campo abierto (tigmotaxis), la distancia recorrida en periodos discretos de tiempo, la capacidad de habituación al contexto y la memoria espacial de habituación. En este caso se utilizó el campo abierto para evaluar parámetros de actividad general de los ratones utilizados y de ansiedad (medida como el tiempo pasado en el centro del campo abierto). Ninguno de los parámetros analizados presentó diferencias significativas entre ambos genotipos analizados. Ambos genotipos son capaces de habituarse al contexto en la primera sesión y de generar de memorias de habituación y no presentan diferencias en el grado de ansiedad (**Figura 31**). Estos resultados difieren a los reportados para animales deficientes en TrkB en el GD, donde la delección del receptor de BDNF en las CGs llevó a un aumento en la ansiedad, analizada en ensayos de campo abierto y en laberinto en cruz, indicando que ambos factores neurotróficos pueden estar involucrados en diferentes comportamientos dependientes del GD [118].

Para analizar si los ratones deficientes para GFR α 1 presentaban déficits para discriminar memorias espaciales similares, se utilizó un paradigma comportamental con dos condiciones: una condición similar del SLR (S-SLR) y una disimilar (D-SLR) [107]. Se observó que animales deficientes para GFR α 1 no fueron capaces de discriminar las ubicaciones espaciales de los objetos presentados en el entrenamiento como diferentes, y reconocer la posición novedosa. Es decir, los animales deficientes en GFR α 1 presentan fallas en el procesamiento de la memoria espacial dependiente de las CGs inmaduras del GD. (**Figura 32, F**). Se ha descrito que factores externos como el ejercicio físico, pueden mejorar el rendimiento en estos ensayos de comportamiento

[134]. Basados en los resultados descritos en esta tesis que indican un rol esencial de GDNF en la maduración de las CGs nacidas en el adulto, resulta interesante analizar si el ejercicio físico aumenta la síntesis de GDNF en esta estructura como ha sido descrito para otros factores neurotróficos como BDNF [135].

Como conclusión general de este capítulo, se identificó un nuevo rol para GFR α 1 en la maduración neuronal de las CGs generadas en el adulto. Este déficit en la maduración fue suficiente para que se presenten trastornos cognitivos, medidos como la falla de evocación de memorias espaciales similares episódicas, conocidas como separación de patrones. Debido a que fallas en la integración neuronal a los circuitos existentes de las neuronas CGs nuevas han sido asociadas con diversas enfermedades neuropsiquiátricas, por ejemplo, depresión y epilepsia [91, 133] sería interesante conocer el rol de GDNF como agente terapéutico ante estos desórdenes neurológicos.

-Ligandos reguladores de la neurogénesis embrionaria y adulta:

La neurogénesis se define como un proceso por el cual se generan neuronas a partir de una célula progenitora. Este proceso se continua con la migración neuronal, la diferenciación, la formación de dendritas y axones, la sinaptogénesis y el establecimiento de la conectividad neuronal [33]. La neurogénesis embrionaria ocurre a lo largo de todo el tubo neural, durante un período acotado de tiempo que se extiende hasta estadios postnatales muy tempranos [45]. Luego, en el cerebro adulto, solo se reconocen dos zonas específicas donde ocurre la neurogénesis a lo largo de toda la vida adulta: la zona sub endodimensional de los ventrículos laterales (conocida como SVZ, del inglés, *subventricular zone*), y en la zona subgranular (SGZ, del inglés *subgranular zone*) en el giro dentado del hipocampo.

Los progenitores neuronales que dan origen a neuronas y células de la glía durante la embriogénesis comparten algunas características con los progenitores neuronales presentes en el adulto. Ambas poblaciones presentan características de glía radial, son positivas para los mismos marcadores celulares como GFAP, Glast o Pax6, son capaces de realizar divisiones celulares asimétricas y simétricas y contactan con vasos sanguíneos. Sin embargo, fuera de las similitudes morfológicas, hay profundas diferencias entre las poblaciones de progenitores, como los programas transcripcionales que activan, su tasa de proliferación y su destino celular [46]. Por ejemplo, mientras que las células de la glía radial presentan un corto ciclo celular que dura entre 10-18 horas, la mayoría de los progenitores adultos tienen un ciclo celular que puede durar numerosas semanas, pudiéndose mantener largos períodos en estado quiescente [113, 136]. Además, los progenitores neurales durante la embriogénesis darán origen a la mayoría de las poblaciones neuronales y gliales que pueblan el cerebro adulto, mientras que los progenitores neurales presentes en los nichos neurogénicos del cerebro adulto, se encuentran más restringidos en su destino celular [86], generalmente generando un solo tipo celular. Otra gran diferencia entre ambas poblaciones celulares es que el microambiente al que están expuestos los precursores neuronales durante el desarrollo y en el cerebro adulto es muy diferente: durante el desarrollo embrionario, los progenitores están íntimamente contactando entre sí, y con las neuronas migrantes recién generadas. En el cerebro adulto, sin embargo, los precursores están en contacto con un gran número de células gliales, en lugares especializados llamados nichos neurogénicos.

Estos nichos están compuestos de numerosos tipos celulares, y proveen de una gran variedad de señales extracelulares que modulan el comportamiento de los progenitores neuronales adultos [136]

Los mecanismos moleculares que controlan la neurogénesis fueron extensamente estudiados durante el desarrollo embrionario. Por lo tanto, existe un conocimiento extenso de factores intrínsecos y vías de señalización desencadenadas por factores extracelulares que llevan a la proliferación y diferenciación de los progenitores neuronales embrionarios, si bien aún quedan mecanismos por conocer. Muchos de estos factores también cumplen funciones en la neurogénesis adulta, pero como existen diferencias sustanciales entre ambas poblaciones de progenitores, las respuestas celulares no siempre son las mismas. En el caso de factores como Wnt, la función que parecería cumplir en la neurogénesis embrionaria y adulta es similar, promoviendo la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales [137, 138]. En el caso de BMP, por el contrario, durante el desarrollo embrionario induce la proliferación activa de precursores neurales [139], sin embargo en el hipocampo adulto, promueve la quiescencia de las células progenitoras adultas [113].

El sistema GDNF/GFR α 1 fue altamente estudiado en diversas estructuras del sistema nervioso, en los cuales promueve la supervivencia neuronal, la diferenciación morfológica, la sinaptogénesis y la proliferación celular [7]. Debido a que, dentro del sistema nervioso central, se ha reportado su expresión en numerosas áreas, incluida la corteza embrionaria y el giro dentado del hipocampo adulto, [11, 18, 74] el objetivo principal de la presente tesis fue evaluar un posible rol de este sistema en la neurogénesis tanto embrionaria como adulta, y, observar si este rol está conservado en ambas poblaciones o no.

-GDNF/GFR α 1 como un regulador de la neurogénesis embrionaria y adulta:

El primer capítulo se centró en elucidar si GDNF era un ligando “pro-neurogénico”, promoviendo la diferenciación neuronal de los precursores corticales, a través de su receptor GFR α 1. En el presente trabajo, se evaluó la expresión de GFR α 1 en la corteza embrionaria y en cultivos de precursores corticales, se observó que GFR α 1 se correlacionaba con los estadios de diferenciación neuronal. Esto es una característica clave de los factores “pro-neurogénicos”, pero no definitoria. En el caso del sistema de Notch, por ejemplo, este es expresado por las neuronas nuevas generadas en la corteza en desarrollo, pero su función es mantener la población de precursores proliferantes, impidiendo que exista diferenciación neuronal prematura [60].

Para que un precursor neuronal durante el desarrollo pueda salir del ciclo celular y comenzar una etapa de diferenciación, debe existir un juego entre factores mitogénicos y factores que promuevan la diferenciación celular [58]. Un factor que promueve la proliferación de esta población celular ampliamente reportado, es el ligando bFGF junto a su receptor FGFR1 o 3 [70]. En la primera parte del primer capítulo se intentó analizar si GDNF era capaz de contrarrestar el efecto mitogénico de bFGF. Se observó que GDNF disminuye la proliferación inducida por bFGF en los precursores corticales, evidenciada de dos maneras: (i) como un menor número de células nestina positivas que expresaban KI67 en cultivos de células adheridas tratadas con GDNF, y (ii) como una reducción en el tamaño y el número de neuroesferas. Para corroborar el rol de GDNF/GFR α 1 en la proliferación de los precursores se llevaron a cabo ensayos de pérdida de función, utilizando ratones transgénicos condicionales para GFR α 1, de genotipo Emx1-Cre:GFR α 1^{flox/flox}, que corroboraron tanto *in vitro* como *in vivo* el requerimiento de GFR α 1 para la regulación de la proliferación de los precursores, dado que en ausencia de GFR α 1 aumentaba significativamente el número de precursores proliferantes. Se han reportado en la bibliografía numerosos experimentos de pérdida de función para ligandos pro-neurogénicos. En el caso de PDGF, la pérdida de función de uno de sus receptores PDGFR α 1, conlleva un aumento de la proliferación de los precursores que termina en el colapso de los ventrículos cerebrales [64]. Por otro lado, la pérdida de función de TrkB en esta población celular llevó a una disminución de la proliferación de los precursores corticales [65]. En el caso de GDNF, la pérdida de GFR α 1 no llevó a un aumento del espesor de la corteza, indicando la presencia de mecanismos compensatorios al desbalance en la proliferación observado.

En este primer capítulo también se evaluó el rol de GDNF/GFR α 1 sobre la diferenciación neuronal. Se observó que GDNF a través de su receptor GFR α 1 promovió la diferenciación de las neuronas glutamatérgicas derivadas de precursores corticales aumentando el número de neuronas generadas, y su diferenciación morfológica. Asimismo, ensayos de pérdida de función utilizando ratones deficientes para GFR α 1 presentaron una disminución de la diferenciación de neuronas corticales de la corteza cingulada de animales neonatos. El rol de GDNF en el establecimiento del crecimiento neurítico fue recientemente reportado para neuronas hipocámpales [25], indicando que el sistema GDNF/GFR α 1 cumplen roles similares en diferentes sistemas. Debido que los procesos que modelan el crecimiento y la conectividad neuronal son mecanismos estrictamente regulados, sería interesante conocer si las neuronas corticales deficientes para GFR α 1 presentaban defectos en la sinaptogénesis o en la formación de circuitos.

En conjunto estos resultados revelaron que el sistema GDNF/GFR α 1 tiene una función sobre la neurogénesis embrionaria, favoreciendo la diferenciación de los precursores corticales, e inhibiendo su proliferación.

Como se comentó anteriormente, muchos ligandos extracelulares que cumplen un rol en la neurogénesis durante el desarrollo, también regulan la neurogénesis adulta. El segundo capítulo de la tesis se centró en elucidar si el sistema GDNF/GFR α 1 presentaba un efecto en la neurogénesis adulta en la ZSG del GD, donde se ha reportado su expresión [11, 120]. Para estos se realizaron ensayos de pérdida de función de GFR α 1 específicamente en los progenitores adultos, mediante el uso de animales transgénicos de genotipo *Glast-Cre^{ERT2}:GFR α 1^{flox/flox}*. Se observó que ratones deficientes para GFR α 1 presentaron un retraso en el crecimiento dendrítico en todas las etapas claves del desarrollo de las células granulares del GD. Es, decir que GDNF es requerido para una correcta diferenciación de las CGs, similar al rol encontrado en la neurogénesis embrionaria. En el adulto, no se estudió aún el rol de la proliferación de los progenitores, pero sería interesantes conocer si disminuye la proliferación de los mismos, de manera concordante a la función observada durante la corticogénesis.

Se han reportado resultados similares a los encontrados para GFR α 1 en para otras moléculas moduladoras de la neurogénesis adulta: experimentos de pérdida de función de TrkB, por ejemplo, resultaron en una disminución de la proliferación de los precursores adultos y de deficiencias en el desarrollo de árboles neuríticos [118], indicando que BDNF cumple un rol similar al de GDNF en esta estructura.

Para evidenciar un rol fisiológico del sistema GDNF/GFR α 1, se realizaron ensayos comportamentales en animales controles y deficientes para GFR α 1, demostrando que los animales deficientes para GFR α 1 eran incapaces de diferenciar memorias espaciales similares, proceso conocido como separación de patrones. Esta es la primera vez que se conoce algún rol en la formación de memorias para el sistema GDNF/GFR α 1, debido a que durante años el estudio de estas moléculas en el cerebro post-natal estuvo restringido porque animales deficientes en estas moléculas morían durante el desarrollo embrionario. Utilizando herramientas de ingeniería genética fue posible sortear este problema, y encontrar un rol para este sistema en el cerebro adulto. En particular, los defectos en la memoria observados, indican que las fallas en el desarrollo morfológico de neuronas deficientes para GFR α 1 presentan una integración a circuitos neuronales preexistentes disminuida. Sería interesante conocer si un aumento de GDNF en el GD produce un

efecto contrario, produciendo una mejora en el desarrollo de tareas de separación de patrones, como se ha observado para BDNF [107].

Es importante conocer los mecanismos que regulan la neurogénesis adulta debido a que un gran número de enfermedades degenerativas como Alzheimer, o enfermedades neuropsiquiátricas como la depresión, fueron asociada con una disminución de la neurogénesis adulta en la ZSG del GD. Por esto, tratamientos futuros capaces de aumentar la neurogénesis en modelos de estas enfermedades podrían ser un punto terapéutico importante para aminorar o frenar procesos patológicos [112].

-GDNF/GFR α 1 como un sistema regulador de procesos de diferenciación neuronal

Debido a los resultados obtenidos en la tesis, se puede concluir que el sistema GDNF a través de su receptor GFR α 1, es un sistema que controla la correcta diferenciación de neuronas corticales y granulares en el GD. Es interesante discutir no sólo que se describieron funciones de este sistema desconocidas hasta el momento en los progenitores neurales embrionarios y adultos, sino que dicha función sería similar en ambos sistemas. Además, se ha descrito que GDNF a través de GFR α 1, regula la formación de una correcta arborización de neuronas hipocampales en CA1 y CA3, y de interneuronas GABA-érgicas de la EGM [25, 74]. Indicando, que el ligando GDNF y su receptor emergerían como un sistema que favorece el correcto desarrollo neurítico y establecimiento de contactos sinápticos en numerosas poblaciones neuronales.

En cuanto a los receptores transmembrana necesarios para que GDNF/GFR α 1 puedan llevar a cabo su función de promotor de la diferenciación neuronal, no se encontraron evidencias de que sea Ret durante el desarrollo embrionario, y aún no se ha evaluado en el giro dentado adulto, aunque no se ha reportado expresión de Ret en esta estructura ([11]. Durante la neurogénesis embrionaria, el receptor transmembrana que colabora con el sistema GDNF/GFR α 1 parecería ser NCAM, debido a que se expresa de igual manera que GFR α 1, responde de igual manera que éste antes estímulos con bFGF y GDNF, y, además, ante un estímulo con GDNF, NCAM gatilla la activación de pFyn. No se estudió aún el receptor transmembrana capaz de unir a GDNF/GFR α 1 en el GD adulto. Recientemente, NCAM fue descrito como el co-receptor del sistema GDNF/GFR α 1 involucrado en procesos de dendritogénesis y sinaptogénesis en neuronas hipocampales de CA1 y CA3 durante el desarrollo postnatal del hipocampo [25]. Además, se ha evidenciado que ratones deficientes en NCAM presentan un deterioro en la memoria espacial [144], por lo cual sería interesante testear a NCAM en el GD adulto.

Debido a que numerosos reportes indicaron que fallas en el crecimiento dendrítico inducen fallas en la formación de sinapsis, sería interesante analizar si tanto las neuronas de la corteza cingulada o las neuronas granulares del giro dentado presentan defectos para formar conexiones sinápticas exitosas. Esto es importante debido a que se ha descrito que cambios o déficits en los ligandos que regulan el establecimiento correcto de circuitos neuronales llevan al desarrollo de numerosas patologías nerviosas como epilepsia o autismo [112, 140].

-Perspectivas:

Si bien se ha avanzado mucho en los últimos años, aún faltan elucidar características claves de la neurogénesis tanto embrionaria como adulta para poder entender su potencial rol en procesos patológicos.

Recientemente se han realizado estudios para poder re-dirigir el destino celular de los progenitores adultos, como una estrategia para aprovechar la capacidad de diferenciación de las células progenitoras adultas [140, 141]. Sin embargo, es necesario conocer los factores que regulan la diferenciación de los progenitores adultos para poder orientar la diferenciación de los mismos por fuera de los nichos neurogénicos, de manera de reemplazar neuronas dañadas en modelos de diversas patologías [136]. Como GDNF promueve la diferenciación neuronal, sería interesante evaluar el efecto de este ligando en este tipo de estrategias de reemplazo neuronal.

Además, será importante explorar si el armado incorrecto de las conexiones sinápticas debido a mutaciones en GDNF o GFR α 1 podrían tener implicancias en trastornos del neurodesarrollo, evidenciado por alteraciones en las funciones cognitivas. Curiosamente, se informó recientemente que las neuronas corticales cultivadas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA) presentan niveles bajos de GFR α 1 respecto a neuronas sanas, lo que imposibilita poder responder a estímulos inducidos por GDNF [142], sugiriendo un rol de este sistema en esta patología.

Conclusiones Generales

En este trabajo de tesis doctoral se ha identificado y caracterizado el rol del factor neurotrófico GDNF y su receptor GFR α 1 en los procesos de neurogénesis embrionaria y adulta. De esta manera se ha ampliado el conocimiento que se tenía hasta el momento en el desarrollo del sistema nervioso central.

En el primer capítulo de esta tesis se ha estudiado el rol de GDNF y su receptor GFR α 1 como un factor “pro-neurogénico” de los precursores corticales, disminuyendo la proliferación celular y aumentando la diferenciación neuronal esta población celular. Se analizaron por ensayos de pérdida de función la relevancia del receptor GFR α 1 en estos procesos inducidos por GDNF. Análisis *in vivo* demostraron el requerimiento de GFR α 1 en la regulación de la tasa de proliferación de los precursores corticales, debido a que presentaban mayor número de células proliferantes la ZV y ZSV de la corteza en desarrollo. Además, se observó una disminución del desarrollo neurítico de neuronas corticales de la corteza cingulada en animales neonatos deficientes para GFR α 1. Este rol de GDNF/GFR α 1 parecería ser mediado por el receptor alternativo de GDNF, NCAM.

En el segundo capítulo de esta tesis se ha demostrado que el complejo GDNF/ GFR α 1 es necesario para el correcto crecimiento de los árboles dendríticos de neuronas granulares del giro dentado *in vivo*. Análisis por pérdida de función de GFR α 1 en neuronas granulares derivadas de precursores en la ZSG deficientes para GFR α 1, mostraron un crecimiento retrasado en el tiempo respecto de neuronas generadas en animales control. Además, este retraso madurativo de las neuronas granulares se correlacionó con déficits en la memoria espacial en condiciones de similitud, conocida como ensayo de separación de patrones en animales deficientes para GFR α 1. Este dato constituye la primera evidencia en la literatura que GFR α 1 es necesario para la formación de algún tipo de memoria, y además es la primera vez que se evalúan datos comportamentales en animales deficientes para GFR α 1.

En conjunto estos resultados demuestran que el complejo GDNF/GFR α 1 cumple una función clave durante el desarrollo y en el cerebro adulto, permitiendo una correcta diferenciación neuronal a partir de precursores neuronales embrionarios y adultos, controlando procesos como

la proliferación de precursores embrionarios y procesos de crecimiento dendrítico en neuronas glutamatérgicas en la corteza y neuronas granulares en el giro dentado.

Los hallazgos obtenidos en este trabajo de tesis han permitido ampliar el conocimiento del espectro de acción de GDNF durante el desarrollo del sistema nervioso central y en el cerebro adulto. Futuros ensayos serán requeridos para comprender si el sistema GDNF/GFR α 1 también está involucrado en los procesos de conectividad sináptica durante el desarrollo y de conectividad a circuitos preexistentes en el adulto. Sería interesante, con este fin el análisis de parámetros electrofisiológicos de las neuronas de la corteza cingulada o de las neuronas granulares, deficientes en GDNF/GFR α 1. Y, además, si la falla en estos procesos está asociada a alguna patología.

Declaración de ética (tratamiento de los animales)

Los experimentos con animales fueron aprobados por Stockholms Norra djurförsöksetiska nämnd (Dnr: 360/06) y por el comité de ética y cuidado animal institucional de la Facultad de Medicina (CICUAL-UBA), número de permiso ético: 25473/2010.

Ratones e inducción por tamoxifeno

El ratón transgénico deficiente para $GFR\alpha 1$ fue gentilmente cedido por el Dr. Jeffrey Milbrandt (Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA), descrito inicialmente en el trabajo de Enomoto y col 2007 [21]. El ratón transgénico fue generado por recombinación homóloga en las células madre embrionarias, donde se insertó el transgén en el primer exón codificante del gen de $GFR\alpha 1$ endógeno. El transgén está compuesto por ADNc (ADN copia) del gen de $GFR\alpha 1$ flanqueado por secuencias cortas del tipo LoxP, seguido de ADNc de la proteína verde fluorescente, GFP (del inglés, *Green Fluorescent Protein*), que solo puede ser transcripta en caso de que exista recombinación y escisión por la recombinasa Cre. Es decir, GFP funciona como un gen reportero de la escisión del gen de interés. Estos ratones serán identificados con la nomenclatura: $GFR\alpha 1^{Flox/Flox}$. Esta estrategia permite la detección fácil de aquellas células que han sufrido recombinación por Cre por microscopía de fluorescencia, debido a que expresarán GFP en aquellas células donde este escindido el transgén de $GFR\alpha 1$.

Para escindir el alelo flanqueado por sitios loxP en progenitores neurales embrionarios, se cruzaron estos ratones $GFR\alpha 1^{Flox/Flox}$ con otros ratones que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor del factor de transcripción *Emx1*. Este factor de transcripción se expresa fuertemente en los progenitores glutamatérgicos del cerebro anterior que darán origen a la corteza e hipocampo adulto. Estos ratones fueron cedidos por la Dra. Noelia Weisstaub (Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires) [78, 79]

Para escindir el alelo flanqueado por sitios LoxP en progenitores neurales adultos, se cruzaron estos ratones $GFR\alpha 1^{Flox/Flox}$ con otros que expresan la variante de la recombinasa Cre inducible por tamoxifeno (CreERT2) bajo el promotor de *Glast*, un marcador de células progenitoras tanto adultas como embrionarias. De esta manera es posible controlar la recombinación mediada por Cre en puntos temporales específicos. [121] Para la inducción con tamoxifeno (TAM, Sigma T-5648), se preparó una solución de 20 mg/ml en aceite de maíz (Sigma).

Para optimizar la inducción de Cre en el cerebro adulto, se inyectó una dosis de 150 µg TAM/gr de ratón durante dos días, en ratones adultos de dos meses de edad. Al cabo de 15 días post inyección se evidenciaron neuronas GFP⁺ en el hipocampo adulto. (**Figura 33, A**)

Todos los ratones utilizados fueron de la cepa C57BL/6, una cepa endocriada de fácil mantenimiento en bioterio.

Se utilizaron los siguientes cebadores o *primers* para el genotipo de GFRα1: 5'-CTTCAGGTTGGGTCGGAAGTGAACCC-3' y 5'-TGGCAGCACGAAGTACAGAGTGGCTAGGAACAT-3'. De esta forma los diferentes genotipos son evidenciables en un gel de agarosa, donde el alelo GFRα1^{flox/flox} presenta un peso mayor al alelo GFRα1^{+/+}. (**Figura 33, B**). Para el genotipo de la recombinasa Cre se utilizaron los siguientes primers :5'-AATGCTTCTGTCCGTTTGC-3' y 5'-TAGCGCCGTAAATCAATCG-3'.

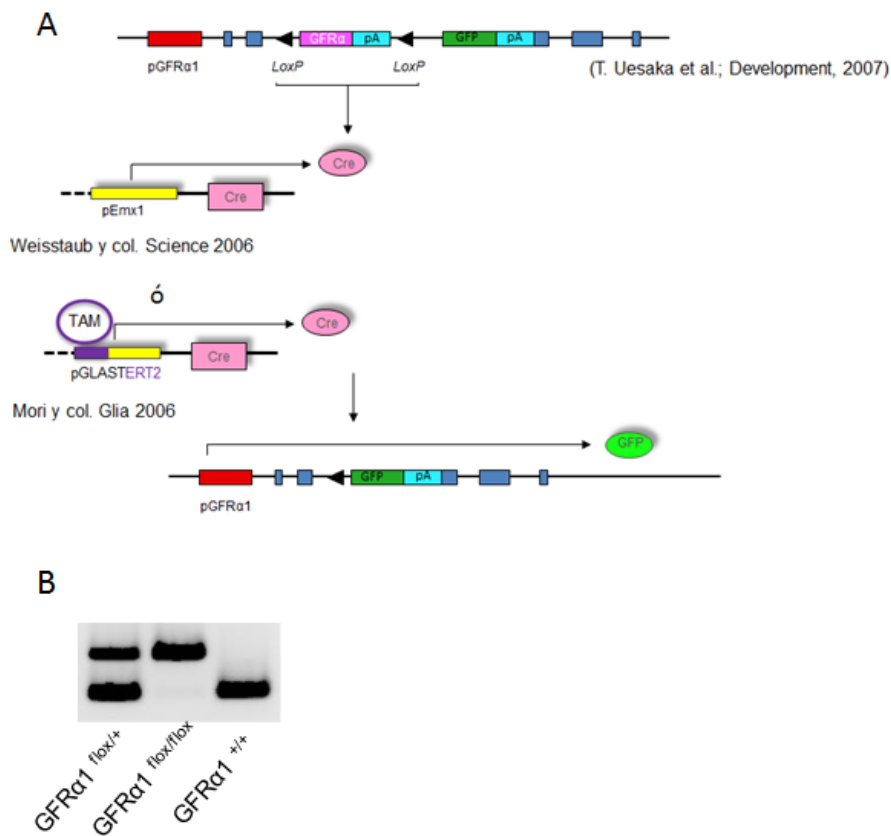


Figura 33: A, Esquema de la recombinación en ratones GFRα^{flox/flox} con las diferentes líneas que expresan Cre. B, Gel de agarosa donde se identifican los diferentes genotipos

RT-PCR y PCR en tiempo real

Se analizó la expresión del ARN mensajero (ARNm) de los genes de GFR α 1, GDNF, FGF-R1, GFR α 2, NCAM, RET y las proteínas reguladoras del ciclo celular: Ciclina D, Ciclina E, p27 y p21; y del gen constitutivo *Tbp* (del inglés, TATA binding protein). El ARN total se aisló a partir de las células indicadas (cortezas cerebrales de ratas de diferentes etapas embrionarias o ratones controles y mutantes, o cultivos primarios) utilizando las columnas de RNA-easy (Quiagen). El ADN copia (ADNc) se sintetizó usando la transcriptasa reversa M-MuLV Multiscribe y hexámeros aleatorios (Applied Biosystems). El ADNc fue amplificado utilizando los siguientes conjuntos de primers: *Tbp*: forward, 5'-GGGGAGCTGTGATGT GAAGT-3'; reverse, 5'-CCAGGAAATAATTCTGGCTCA-3'; GFR α 1: forward, 5'-GACCGTCTGGACTGT GTGAAAG-3'; reverse, 5'-TTAGTGTGCGTACTTGGTGCT-3'; GFR α 2: forward, 5'-CCTATGAGCCTGTGACCTC-3'; reverse, 5'-GTCTGTCCCTGTCCCTGAGA-3'; RET: forward, 5'-ATGATGATGAAGACGACTCCCC-3'; reverse, 5'-CGCTTAACTCCACCACA GCA-3'; GDNF: forward, 5'- ATGCTACTGACTTGGGTTTGGG-3'; reverse, 5'-GCT TCACAGGAACCGCTACAA-3'; NCAM: forward, 5'-TCATGGACATCACCTGCTAC-3'; reverse, 5'-GGGTTCTTTTACTCATCTTTTCG-3'; P27: forward 5'-GCGACCTGCGGCAGAAGATTC-3', reverse, 5'-CTCCACAGTGCCAGCATTTCG-3'; P19: forward 5'-TAGAGCGGGGACATCACGAC-3'; reverse, 5'-AGCAGAAGTTATGCCTGTCCG-3'; Ciclina D1: forward, 5'-TGCAAATGGAAGTCTTCTG-3', reverse, 5'-CTGGCATTTTGGAGAGGAAG-3'; Ciclina E1: forward, 5'- CCTCCAAAGTTGCACCAGTT-3', reverse, 5'-CCACTTAAGGGCCTTCATCA-3'.

La PCR en tiempo real, o qPCR, se realizó utilizando el SYBR Green qPCR Supermix (Invitrogen) en un sistema de detección de secuencias ABI7500 (Applied Biosystems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones se realizaron en un volumen de 25 μ l utilizando la mezcla LightCycler-DNA master SYBR Green mix (Invitrogen).

Proteínas recombinantes y líneas celulares

La línea celular HEK-293T, es una línea celular inmortalizada derivada de riñón humano embrionario. Fue cultivada en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Invitrogen). MN1 es una línea celular inmortalizada derivada de motoneuronas de ratón que expresa GFR α 1 endógenamente. Fue cultivada en Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino y Hepes (Invitrogen).

Las proteínas recombinantes GDNF, bFGF y NRTN fueron adquiridas de R&D Systems (Abingdon, Reino Unido).

Transfección transiente de células y plásmidos utilizados

Las células HEK fueron transfectadas con polietilenimina (PEI, Polyscience) [143]. La transfección de cultivos primarios de precursores corticales se realizó utilizando 2 µl Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 250 µl de medio libre de suero, Neurobasal (Invitrogen), y 1 µg de ADN plasmídico total, por pocillo de una multiplaca de 24 pocillos (AP Biotech). El plásmido de para la variante oncogénica de RET, Ret Men2A) fue gentilmente cedido por el Dr. M. Saarma y el Dr. M Santoro.

Cultivos primarios de precursores corticales

Se prepararon cultivos primarios de precursores neurales corticales de rata en día embrionario E14,5 de ratas Wistar (obtenidas del Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires) o de ratones en E13,5 de la cepa C57/BL6 controles o transgénicos deficientes para GFR α 1. Luego de realizar la disección de las cortezas cerebrales, se procedió a eliminar las meninges de las mismas para evitar contaminación con otro tipo celular en el cultivo primario. Una vez seleccionadas las cortezas (con especial cuidado de no disecar las eminencias ganglionares), se incubaron con 0,5% de Tripsina (Sigma) y 0,05% de ADNasa en solución salina equilibrada de Hank's (Gibco) a 37° C durante 20 minutos. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células fueron disociadas mecánicamente y cuantificadas utilizando cámara de Neubauer. Luego fueron cultivadas a una densidad de 80. 000 células por pocillo de placa de 24 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio revestidos en poli-D-lisina (PDL, Invitrogen; 10 µg/ml) y laminina (10 µg/ml, Sigma). Los precursores fueron crecidos en medio Neurobasal suplementado con 2% B27 (Invitrogen), glutamina 2 mM (Glutamax, Gibco) y Penicilina / Estreptomina (1,2 U / ml, Sigma), y suplementado con los ligandos bFGF, GDNF o NTRN a distintas concentraciones según el experimento, durante 5-7 DIV (días *in vitro*). Los cultivos celulares fueron transfectados como se describió anteriormente, lisados para ensayos de Western Blot o qPCR, o fijados con paraformaldehído 4% (PFA 4%, Sigma), para posteriores inmunofluorescencias.

Ensayo de neuroesferas (NE)

El ensayo de neuroesferas, en el cual las células son crecidas en condiciones no adherentes, es una herramienta importante para poder determinar la capacidad proliferativa de

una población celular. En este caso se aislaron precursores neuronales de cortezas día embrionario E14,5 de rata o de E13,5 de ratón, y se disgregaron siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para los cultivos primarios de precursores corticales crecidos sobre superficie adherente. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos antiadherentes a una densidad de 40.000 células/pocillo. El medio utilizado fue DMEM: F12 (Invitrogen), suplementado con 2% B27 (Invitrogen), glutamina 2 mM (Glutamax, Gibco), Hepes (4,5mM, Gibco), Penicilina / Estreptomina (1,2 U / ml, Sigma) y 25 ng/ml de bFGF (R&D Systems). Los cultivos fueron tratados con distintos factores tróficos (GDNF o NRTN) como se indica en cada experimento. Se dejaron crecer durante 5-7 días, en los cuales las células aisladas proliferaron formando neuroesferas (NE). Estas NE, derivadas de cortezas cerebrales se denominan NE primarias. Para poder visualizarlas y realizar una posterior inmunotinción, se procedió a precipitar las neuroesferas. Para esto se colectaron las NE en DMEM suplementado con 10% SFB y se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio revestidos en PDL. Luego de 2 hs, se procedió a la fijación de las mismas con PFA 4%. Además, se utilizaron NE primarias para extraer su ARN y realizar posteriores PCRs.

Las NE están constituidas de una población de precursores neurales con alta tasa de proliferación, es decir alta tasa de división celular simétrica (generando más precursores) y asimétrica (generando una célula diferenciada, por ejemplo). Es por esto que se pueden identificar células diferenciadas dentro de las NE. A medida que aumentan los días en cultivo de las NE, se observa mayor número de células diferenciadas, imitando lo que sucede en el desarrollo cortical embrionario *in vivo*. Luego de 7 días en cultivo, se colectaron las NE primarias, se disgregaron mecánicamente, y se contó en cámara de Neubauer el número de células obtenido. Estas se cultivaron en condiciones no adherentes a una densidad de 40.000 células/pocillo de placa de 24 pocillos, con el medio de cultivo anteriormente descrito. Luego de 5-7 días en cultivo se colectaron las NE para extraer su ARN o se precipitaron las NE secundarias para inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia y microscopía

Secciones de crióstato de 35 µm de cerebro de rata de E14,5 y secciones de ratón E13,5 fueron sembradas sobre vidrios positivizados (VWR). Para inmunofluorescencias de cerebro de ratón adulto, se realizaron secciones de 60 µm en criostato y se mantuvieron en condiciones no adherentes, en flotación. Luego de lavarlas en PBS (Buffer Fosfato, Ph 7,4), las secciones fueron permeabilizadas usando 0,1% Tritón en PBS y bloqueadas con 10% de suero de burro durante una

hora a temperatura ambiente. Luego las secciones se incubaron con anticuerpo primario durante toda la noche a 4° C. Según cada experimento, los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-GFR α 1 (R&D, 1/200, cabra), anti-GFR α 2 (R&D, 1/200, cabra), anti-NCAM (BD, 1/100, ratón), anti β III Tubulina (Promega, 1/4500, ratón), anti-Sox2 (Cell Signaling, 1/100, conejo), anti-doblecortina (Santa Cruz, 1/500, cabra), anti-GFP (RnD, 1/1000, conejo), anti-nestina (Millipore, 1/200, ratón), anti-RET (R&D, 1/1000, cabra), anti-calbindina (Cell Signaling, 1/1000, conejo), anti-KI67 (Millipore, 1/1000, conejo), anti-BrDU (Dako, 1/100, ratón).

Las células disociadas y las neuroesferas precipitadas se bloquearon con 10% de suero de burro y luego fueron incubadas con los anticuerpos que se indican en cada ensayo: anti- GFR α 1 (dilución 1/500, R&D), anti-Nestina (dilución 1/100, Millipore), anti-KI67 (Millipore, 1/1000, conejo), anti-GFP (RnD, 1/1000, conejo), anti-MAP2 (dilución 1/1000, Sigma, ratón), anti-GFAP (1/1000, Sigma, conejo), anti- β III Tubulina (dilución 1/5000, Promega, ratón), anti-O4 (sin diluir, Hybridoma Bank), anti-Vglut (dilución 1/5000, conejillo de indias, Chemicon), anti-VGAT (dilución 1/1000, conejo, Sigma). Se utilizó el marcador nuclear DAPI como contraindicación nuclear. Los anticuerpos secundarios fueron de Jackson ImmunoResearch. Las fotografías obtenidas a partir de cultivos celulares se obtuvieron usando un microscopio invertido Olympus IX-81 y las fotografías obtenidas a partir de cortes de cerebro embrionario o adulto, de NE o de espinas dendríticas se obtuvieron usando un microscopio confocal Olympus VF-1000.

Evaluación de la morfología neurítica y la densidad de las espinas dendríticas

Los ensayos de crecimiento neurítico para neuronas derivadas de precursores corticales se realizaron en cultivos disociados primarios de rata E14,5. Los cultivos primarios se prepararon como se ha descrito anteriormente (véase más arriba). Luego, las células fueron fijadas con PFA al 4% y se tiñeron con anti- β III tubulina o MAP2 para identificar células neuronales. Las imágenes de neuronas disociadas para realizar los análisis morfológicos se obtuvieron utilizando un microscopio Olympus IX-81. Sobre estas imágenes se realizaron medidas de complejidad neurítica en células neuronales que mostraban una morfología de tipo piramidal, conteniendo una dendrita principal gruesa y varias dendritas finas. La complejidad del árbol neurítico se analizó mediante el plug-in del análisis de Sholl para el programa NeuronJ. El análisis de Sholl se realizó con anillos de intervalos de 10 μ m entre sí a partir del soma. Las dendritas de menos de 3 μ m de longitud no se evaluaron. La densidad de espinas dendríticas, fue analizada a partir de imágenes obtenidas en un microscopio confocal Olympus FV1000, utilizando un objetivo de 60X. Se realizó una proyección de

varios planos para cada neurona y luego se contó el número de espinas en segmentos de 100 μm de longitud de dendrita por cada neurona.

Lisados totales de células, inmunoprecipitación y Western Blot

Las células se lisaron a 4°C durante treinta minutos en un buffer de lisis que contiene 0,5% de Triton X-100, 1% octilglucósido, e inhibidores de proteasas (Roche) y fosfatasas (Ortovanadato 100mM y Fluoruro de Sodio 50mM, Sigma). Los lisados fueron centrifugados y los sobrenadantes se analizaron mediante inmunoprecipitación y Western blot [12]. Los blots fueron escaneados en un Storm 845 PhosphorImager (GE Healthcare Life Sciences) y las cuantificaciones se realizaron con el software ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences). Los números debajo de las bandas indican la tasa de inducción relativa a los niveles control normalizado a los niveles totales de la proteína analizada. Los anticuerpos se obtuvieron de diversas fuentes como se detalla a continuación: anti-fosfoMAPK (Thr-202/Tyr-204 P-MAPK) y anti-fosfoAkt (Ser 473 P-Akt) de Cell Signaling; anti-fosfoFAK y anti- β III-tubulina de Promega; anti-SRC family de Cell Signaling, anti-NCAM (dominio extracelular) BD Pharmacology; anti-actina, anti-fosfotirosina (P-Tyr) y anti-cRET de Santa Cruz Technologies.

Ensayo de campo abierto

Este ensayo se llevó a cabo en una arena circular de 35 cm de diámetro con paredes de 15 cm de altura. La arena fue cubierta por una cama de viruta autoclavada. Cuatro claves espaciales externas fueron colocadas a 10 cm por fuera y por encima de la arena; separadas entre sí por una diferencia angular de 90 grados. El procedimiento experimental constó de cinco sesiones de diez minutos cada una, una vez por día durante cinco días. Los ratones fueron colocados en distintas posiciones a lo largo del ensayo a fin de evitar preferencia por un área específica de la arena. El procedimiento fue grabado con una cámara digital colocada a 60 cm por encima de la arena. El análisis del comportamiento fue realizado sobre los primeros cinco minutos de grabación. El programa de captura locomotora utilizado fue Logitech Webcam Software.

Ensayo de reconocimiento espontáneo de localización de objetos en condiciones de similitud o “pattern separation”

En esta tarea se utilizó la misma arena que en los ensayos de campo abierto. La tarea constó de dos secciones con su propia sesión de entrenamiento y evaluación. Cada sección tiene

como objetivo evaluar la codificación de memoria espacial dado un contexto similar o disímil al del entrenamiento. Para el esquema del contexto disímil, durante el entrenamiento tres objetos idénticos fueron colocados en la arena con una distancia angular de 120°. Se permitió que el animal explore la superficie y los objetos durante diez minutos. Luego, uno de los objetos es retirado de la arena, otro es desplazado a una posición novedosa e intermedia entre su posición original y la posición del objeto retirado, y el otro objeto permanece en su posición inicial. Al cabo de dos horas de finalizado el entrenamiento, se dio comienzo a la etapa de evaluación que consistió en permitir al animal explorar la superficie y los objetos durante cinco minutos.

Para el esquema del contexto similar, durante el entrenamiento los animales son expuestos a tres objetos idénticos durante diez minutos. Dos de los objetos están próximos entre sí, a una distancia angular de 54°, y el tercero más alejado y en posición opuesta. Luego de dos horas, los animales son sometidos a una evaluación de cinco minutos, en la cual se presentaron dos objetos idénticos, uno en una posición novedosa e intermedia a los dos objetos próximos en el entrenamiento, y otro en una posición familiar. (Ver figura 32)

Cada animal evaluado fue presentado a ambos contextos, con una separación de 24 horas para permitir el descanso de los sujetos experimentales. Para cada contexto se utilizó un set de objetos diferentes. Cada set de objetos fue ubicado al azar para cada animal manteniéndose sus coordenadas relativas, para contrabalancear cualquier efecto posible de preferencias de espacios. Además, la presentación de los esquemas para un mismo animal también fue aleatoria (es decir, si pasaban primero por un esquema similar o disímil) para evitar artificios técnicos.

Tanto el entrenamiento como la evaluación para ambos esquemas fueron grabados con una cámara digital colocada a 60 cm por encima de la arena. El análisis se realizó sobre el total del tiempo grabado. Se analizó el tiempo de exploración para cada objeto durante el entrenamiento y la evaluación. Los tiempos de exploración menores de 1 segundo y mayores a el 10% del tiempo total de exploración no fueron tenidos en cuenta. El índice de preferencia para la sesión de evaluación se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Índice de Preferencia} = \frac{\text{tiempo total en objeto de posición novedosa} - \text{tiempo total en objeto de posición familiar}}{\text{tiempo total en objeto de posición novedosa} + \text{tiempo total en objeto de posición familiar}}$$

Estadística

Los datos se presentaron como promedio \pm error estándar, y los valores p de significancia se indican en cada caso. El análisis estadístico se realizó en GraphPad Prism 5.0. En los casos señalados se realizó test de Student o el análisis de ANOVA seguido del post-test Bonferroni o Newman Keuls. Para los datos de *pattern separation* se compararon los tiempos de exploración de los objetos en el entrenamiento utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, y para la comparación de los índices de preferencia se utilizó un ANOVA de dos vías con un post test de Bonferroni.

1. R. Levi-Montalcini, B. Booker, Destruction of the Sympathetic Ganglia in Mammals by an Antiserum to a Nerve-Growth Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **46**, 384-391 (1960); published online EpubMar (
2. M. M. Bernal, M. Saarma, GDNF family receptor complexes are emerging drug targets. *Trends in pharmacological sciences* **28**, 68-74 (2007); published online EpubFeb (10.1016/j.tips.2006.12.005).
3. L. F. Reichardt, Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **361**, 1545-1564 (2006); published online EpubSep 29 (10.1098/rstb.2006.1894).
4. L. F. Lin, D. H. Doherty, J. D. Lile, S. Bektesh, F. Collins, GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* **260**, 1130-1132 (1993); published online EpubMay 21 (
5. M. S. Airaksinen, A. Titievsky, M. Saarma, GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Molecular and cellular neurosciences* **13**, 313-325 (1999); published online EpubMay (10.1006/mcne.1999.0754).
6. G. Paratcha, F. Ledda, GDNF and GFR α : a versatile molecular complex for developing neurons. *Trends in neurosciences* **31**, 384-391 (2008); published online EpubAug (10.1016/j.tins.2008.05.003).
7. M. S. Airaksinen, M. Saarma, The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature reviews. Neuroscience* **3**, 383-394 (2002); published online EpubMay (10.1038/nrn812).
8. A. Markus, T. D. Patel, W. D. Snider, Neurotrophic factors and axonal growth. *Current opinion in neurobiology* **12**, 523-531 (2002); published online EpubOct (
9. J. Zhong, X. Li, C. McNamee, A. P. Chen, M. Baccharini, W. D. Snider, Raf kinase signaling functions in sensory neuron differentiation and axon growth in vivo. *Nature neuroscience* **10**, 598-607 (2007); published online EpubMay (10.1038/nn1898).
10. E. J. Huang, L. F. Reichardt, Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry* **72**, 609-642 (2003)10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629).
11. M. Trupp, N. Belluardo, H. Funakoshi, C. F. Ibanez, Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor- α indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 3554-3567 (1997); published online EpubMay 15 (
12. G. Paratcha, F. Ledda, C. F. Ibanez, The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* **113**, 867-879 (2003); published online EpubJun 27 (
13. S. Gattenlohner, T. Stuhmer, E. Leich, M. Reinhard, B. Etschmann, H. U. Volker, A. Rosenwald, E. Serfling, R. C. Bargou, G. Ertl, H. Einsele, H. K. Muller-Hermelink, Specific detection of CD56 (NCAM) isoforms for the identification of aggressive malignant neoplasms with progressive development. *The American journal of pathology* **174**, 1160-1171 (2009); published online EpubApr (10.2353/ajpath.2009.080647).
14. H. E. Beggs, S. C. Baragona, J. J. Hemperly, P. F. Maness, NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn). *The Journal of biological chemistry* **272**, 8310-8319 (1997); published online EpubMar 28 (

15. M. M. Bernalov, Y. A. Sidorova, S. Tumova, A. Ahonen-Bishopp, A. C. Magalhaes, E. Kuleskiy, M. Paveliev, C. Rivera, H. Rauvala, M. Saarma, Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *The Journal of cell biology* **192**, 153-169 (2011); published online EpubJan 10 (10.1083/jcb.201009136).
16. M. Perrinjaquet, D. Sjostrand, A. Moliner, S. Zechel, F. Lamballe, F. Maina, C. F. Ibanez, MET signaling in GABAergic neuronal precursors of the medial ganglionic eminence restricts GDNF activity in cells that express GFRalpha1 and a new transmembrane receptor partner. *Journal of cell science* **124**, 2797-2805 (2011); published online EpubAug 15 (10.1242/jcs.083717).
17. A. Kumar, J. Kopra, K. Varendi, L. L. Porokuokka, A. Panhelainen, S. Kuure, P. Marshall, N. Karalija, M. A. Harma, C. Vilenius, K. Lillevali, T. Tekko, J. Mijatovic, N. Pulkkinen, M. Jakobson, M. Jakobson, R. Ola, E. Palm, M. Lindahl, I. Stromberg, V. Voikar, T. P. Piepponen, M. Saarma, J. O. Andressoo, GDNF Overexpression from the Native Locus Reveals its Role in the Nigrostriatal Dopaminergic System Function. *PLoS genetics* **11**, e1005710 (2015); published online EpubDec (10.1371/journal.pgen.1005710).
18. C. Ortega-de San Luis, A. Pascual, Simultaneous Detection of Both GDNF and GFRalpha1 Expression Patterns in the Mouse Central Nervous System. *Frontiers in neuroanatomy* **10**, 73 (2016)10.3389/fnana.2016.00073).
19. D. Krakora, P. Mulcrone, M. Meyer, C. Lewis, K. Bernau, G. Gowing, C. Zimprich, P. Aebischer, C. N. Svendsen, M. Suzuki, Synergistic effects of GDNF and VEGF on lifespan and disease progression in a familial ALS rat model. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **21**, 1602-1610 (2013); published online EpubAug (10.1038/mt.2013.108).
20. P. Alvarez, X. Chen, O. Bogen, P. G. Green, J. D. Levine, IB4(+) nociceptors mediate persistent muscle pain induced by GDNF. *Journal of neurophysiology* **108**, 2545-2553 (2012); published online EpubNov (10.1152/jn.00576.2012).
21. T. Uesaka, S. Jain, S. Yonemura, Y. Uchiyama, J. Milbrandt, H. Enomoto, Conditional ablation of GFRalpha1 in postmigratory enteric neurons triggers unconventional neuronal death in the colon and causes a Hirschsprung's disease phenotype. *Development* **134**, 2171-2181 (2007); published online EpubJun (10.1242/dev.001388).
22. A. Kimura, K. Namekata, X. Guo, C. Harada, T. Harada, Neuroprotection, Growth Factors and BDNF-TrkB Signalling in Retinal Degeneration. *International journal of molecular sciences* **17**, (2016); published online EpubSep 20 (10.3390/ijms17091584).
23. R. Shakya, E. H. Jho, P. Kotka, Z. Wu, N. Kholodilov, R. Burke, V. D'Agati, F. Costantini, The role of GDNF in patterning the excretory system. *Developmental biology* **283**, 70-84 (2005); published online EpubJul 01 (10.1016/j.ydbio.2005.04.008).
24. X. Meng, M. Lindahl, M. E. Hyvonen, M. Parvinen, D. G. de Rooij, M. W. Hess, A. Raatikainen-Ahokas, K. Sainio, H. Rauvala, M. Lakso, J. G. Pichel, H. Westphal, M. Saarma, H. Sariola, Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* **287**, 1489-1493 (2000); published online EpubFeb 25 (
25. D. Irala, A. Bonafina, P. A. Fontanet, F. C. Alsina, G. Paratcha, F. Ledda, The GDNF-GFRalpha1 complex promotes the development of hippocampal dendritic arbors and spines via NCAM. *Development* **143**, 4224-4235 (2016); published online EpubNov 15 (10.1242/dev.140350).
26. F. Ledda, G. Paratcha, T. Sandoval-Guzman, C. F. Ibanez, GDNF and GFRalpha1 promote formation of neuronal synapses by ligand-induced cell adhesion. *Nature neuroscience* **10**, 293-300 (2007); published online EpubMar (10.1038/nn1855).

27. B. J. Molyneaux, P. Arlotta, J. R. Menezes, J. D. Macklis, Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 427-437 (2007); published online EpubJun (10.1038/nrn2151).
28. R. F. Hevner, R. A. Daza, J. L. Rubenstein, H. Stunnenberg, J. F. Olavarria, C. Englund, Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons. *Developmental neuroscience* **25**, 139-151 (2003); published online EpubMar-Aug (72263).
29. S. A. Anderson, C. E. Kaznowski, C. Horn, J. L. Rubenstein, S. K. McConnell, Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo. *Cerebral cortex* **12**, 702-709 (2002); published online EpubJul (
30. G. Petilla Interneuron Nomenclature, G. A. Ascoli, L. Alonso-Nanclares, S. A. Anderson, G. Barrionuevo, R. Benavides-Piccione, A. Burkhalter, G. Buzsaki, B. Cauli, J. Defelipe, A. Fairen, D. Feldmeyer, G. Fishell, Y. Fregnac, T. F. Freund, D. Gardner, E. P. Gardner, J. H. Goldberg, M. Helmstaedter, S. Hestrin, F. Karube, Z. F. Kisvarday, B. Lambolez, D. A. Lewis, O. Marin, H. Markram, A. Munoz, A. Packer, C. C. Petersen, K. S. Rockland, J. Rossier, B. Rudy, P. Somogyi, J. F. Staiger, G. Tamas, A. M. Thomson, M. Toledo-Rodriguez, Y. Wang, D. C. West, R. Yuste, Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience* **9**, 557-568 (2008); published online EpubJul (10.1038/nrn2402).
31. J. A. Tyson, S. A. Anderson, GABAergic interneuron transplants to study development and treat disease. *Trends in neurosciences* **37**, 169-177 (2014); published online EpubMar (10.1016/j.tins.2014.01.003).
32. C. Ohtaka-Maruyama, H. Okado, Molecular Pathways Underlying Projection Neuron Production and Migration during Cerebral Cortical Development. *Frontiers in neuroscience* **9**, 447 (2015)10.3389/fnins.2015.00447).
33. H. Komuro, P. Rakic, Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 1478-1490 (1998); published online EpubFeb 15 (
34. N. Kessaris, M. Fogarty, P. Iannarelli, M. Grist, M. Wegner, W. D. Richardson, Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature neuroscience* **9**, 173-179 (2006); published online EpubFeb (10.1038/nn1620).
35. I. Bystron, C. Blakemore, P. Rakic, Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nature reviews. Neuroscience* **9**, 110-122 (2008); published online EpubFeb (10.1038/nrn2252).
36. M. R. Costa, U. Muller, Specification of excitatory neurons in the developing cerebral cortex: progenitor diversity and environmental influences. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**, 449 (2014)10.3389/fncel.2014.00449).
37. S. A. Bayer, J. Altman, Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Experimental neurology* **107**, 48-62 (1990); published online EpubJan (
38. T. Takahashi, R. S. Nowakowski, V. S. Caviness, Jr., Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **13**, 820-833 (1993); published online EpubFeb (
39. R. M. F. J.L. MacDonald*, E. Azim, S.J. Shnider,, P. A. B.J. Molyneaux, J.D. Macklis, Specification of Cortical Projection Neurons. *ELSEVIER*, (2013).

40. F. Bielle, A. Griveau, N. Narboux-Neme, S. Vigneau, M. Sigrist, S. Arber, M. Wassef, A. Pierani, Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nature neuroscience* **8**, 1002-1012 (2005); published online EpubAug (10.1038/nn1511).
41. Z. Huang, Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. *Molecular and cellular neurosciences* **42**, 11-22 (2009); published online EpubSep (10.1016/j.mcn.2009.06.003).
42. Q. Shen, Y. Wang, J. T. Dimos, C. A. Fasano, T. N. Phoenix, I. R. Lemischka, N. B. Ivanova, S. Stifani, E. E. Morrisey, S. Temple, The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nature neuroscience* **9**, 743-751 (2006); published online EpubJun (10.1038/nn1694).
43. S. J. Franco, C. Gil-Sanz, I. Martinez-Garay, A. Espinosa, S. R. Harkins-Perry, C. Ramos, U. Muller, Fate-restricted neural progenitors in the mammalian cerebral cortex. *Science* **337**, 746-749 (2012); published online EpubAug 10 (10.1126/science.1223616).
44. S. J. Franco, U. Muller, Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron* **77**, 19-34 (2013); published online EpubJan 09 (10.1016/j.neuron.2012.12.022).
45. M. Gotz, W. B. Huttner, The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 777-788 (2005); published online EpubOct (10.1038/nrm1739).
46. E. Taverna, M. Gotz, W. B. Huttner, The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annual review of cell and developmental biology* **30**, 465-502 (2014)10.1146/annurev-cellbio-101011-155801).
47. E. Hartfuss, R. Galli, N. Heins, M. Gotz, Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Developmental biology* **229**, 15-30 (2001); published online EpubJan 01 (10.1006/dbio.2000.9962).
48. A. Kriegstein, A. Alvarez-Buylla, The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* **32**, 149-184 (2009)10.1146/annurev.neuro.051508.135600).
49. I. H. Smart, C. Dehay, P. Giroud, M. Berland, H. Kennedy, Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cerebral cortex* **12**, 37-53 (2002); published online EpubJan (
50. C. C. Gertz, J. H. Lui, B. E. LaMonica, X. Wang, A. R. Kriegstein, Diverse behaviors of outer radial glia in developing ferret and human cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**, 2559-2570 (2014); published online EpubFeb 12 (10.1523/JNEUROSCI.2645-13.2014).
51. M. Shibata, F. O. Gulden, N. Sestan, From trans to cis: transcriptional regulatory networks in neocortical development. *Trends in genetics : TIG* **31**, 77-87 (2015); published online EpubFeb (10.1016/j.tig.2014.12.004).
52. D. M. Gelman, O. Marin, Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *The European journal of neuroscience* **31**, 2136-2141 (2010); published online EpubJun (10.1111/j.1460-9568.2010.07267.x).
53. J. L. Rubenstein, M. M. Merzenich, Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, brain, and behavior* **2**, 255-267 (2003); published online EpubOct (
54. T. J. Petros, R. S. Bultje, M. E. Ross, G. Fishell, S. A. Anderson, Apical versus Basal Neurogenesis Directs Cortical Interneuron Subclass Fate. *Cell reports* **13**, 1090-1095 (2015); published online EpubNov 10 (10.1016/j.celrep.2015.09.079).

55. O. Marin, Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *The European journal of neuroscience* **38**, 2019-2029 (2013); published online EpubJul (10.1111/ejn.12225).
56. S. Nobrega-Pereira, O. Marin, Transcriptional control of neuronal migration in the developing mouse brain. *Cerebral cortex* **19 Suppl 1**, i107-113 (2009); published online EpubJul (10.1093/cercor/bhp044).
57. M. Gotz, A. Stoykova, P. Gruss, Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* **21**, 1031-1044 (1998); published online EpubNov (
58. F. D. M. A. Gauthier-Fisher, Environmental Cues and Signaling Pathways that Regulate Neural Precursor Development. *ELSEVIER*, (2013).
59. S. Chiba, Notch signaling in stem cell systems. *Stem cells* **24**, 2437-2447 (2006); published online EpubNov (10.1634/stemcells.2005-0661).
60. K. Yoon, N. Gaiano, Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nature neuroscience* **8**, 709-715 (2005); published online EpubJun (10.1038/nn1475).
61. L. S. Campos, A. J. Duarte, T. Branco, D. Henrique, mDII1 and mDII3 expression in the developing mouse brain: role in the establishment of the early cortex. *Journal of neuroscience research* **64**, 590-598 (2001); published online EpubJun 15 (10.1002/jnr.1111).
62. B. A. Reynolds, W. Tetzlaff, S. Weiss, A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**, 4565-4574 (1992); published online EpubNov (
63. J. K. Park, B. P. Williams, J. A. Alberta, C. D. Stiles, Bipotent cortical progenitor cells process conflicting cues for neurons and glia in a hierarchical manner. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**, 10383-10389 (1999); published online EpubDec 01 (
64. P. Soriano, The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* **124**, 2691-2700 (1997); published online EpubJul (
65. K. Bartkowska, A. Paquin, A. S. Gauthier, D. R. Kaplan, F. D. Miller, Trk signaling regulates neural precursor cell proliferation and differentiation during cortical development. *Development* **134**, 4369-4380 (2007); published online EpubDec (10.1242/dev.008227).
66. S. A. Yuzwa, G. Yang, M. J. Borrett, G. Clarke, G. I. Cancino, S. K. Zahr, P. W. Zandstra, D. R. Kaplan, F. D. Miller, Proneurogenic Ligands Defined by Modeling Developing Cortex Growth Factor Communication Networks. *Neuron* **91**, 988-1004 (2016); published online EpubSep 07 (10.1016/j.neuron.2016.07.037).
67. C. Zimmer, J. Lee, A. Griveau, S. Arber, A. Pierani, S. Garel, F. Guillemot, Role of Fgf8 signalling in the specification of rostral Cajal-Retzius cells. *Development* **137**, 293-302 (2010); published online EpubJan (10.1242/dev.041178).
68. B. Weise, T. Janet, C. Grothe, Localization of bFGF and FGF-receptor in the developing nervous system of the embryonic and newborn rat. *Journal of neuroscience research* **34**, 442-453 (1993); published online EpubMar 01 (10.1002/jnr.490340409).
69. X. Qian, A. A. Davis, S. K. Goderie, S. Temple, FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* **18**, 81-93 (1997); published online EpubJan (
70. F. M. Vaccarino, M. L. Schwartz, R. Raballo, J. Nilsen, J. Rhee, M. Zhou, T. Doetschman, J. D. Coffin, J. J. Wyland, Y. T. Hung, Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast

- growth factor during embryogenesis. *Nature neuroscience* **2**, 246-253 (1999); published online EpubMar (10.1038/6350).
71. S. Ortega, M. Ittmann, S. H. Tsang, M. Ehrlich, C. Basilico, Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5672-5677 (1998); published online EpubMay 12 (
 72. D. Maric, A. Fiorio Pla, Y. H. Chang, J. L. Barker, Self-renewing and differentiating properties of cortical neural stem cells are selectively regulated by basic fibroblast growth factor (FGF) signaling via specific FGF receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 1836-1852 (2007); published online EpubFeb 21 (10.1523/JNEUROSCI.5141-06.2007).
 73. R. H. Baloh, H. Enomoto, E. M. Johnson, Jr., J. Milbrandt, The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Current opinion in neurobiology* **10**, 103-110 (2000); published online EpubFeb (
 74. E. Pozas, C. F. Ibanez, GDNF and GFRA1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. *Neuron* **45**, 701-713 (2005); published online EpubMar 03 (10.1016/j.neuron.2005.01.043).
 75. I. Mason, Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 583-596 (2007); published online EpubAug (10.1038/nrn2189).
 76. T. Taniguchi, K. Okamoto, A. E. Reeve, Human p57(KIP2) defines a new imprinted domain on chromosome 11p but is not a tumour suppressor gene in Wilms tumour. *Oncogene* **14**, 1201-1206 (1997); published online EpubMar 13 (10.1038/sj.onc.1200934).
 77. L. Nguyen, A. Besson, J. M. Roberts, F. Guillemot, Coupling cell cycle exit, neuronal differentiation and migration in cortical neurogenesis. *Cell cycle* **5**, 2314-2318 (2006); published online EpubOct (10.4161/cc.5.20.3381).
 78. N. V. Weisstaub, M. Zhou, A. Lira, E. Lambe, J. Gonzalez-Maeso, J. P. Hornung, E. Sibille, M. Underwood, S. Itohara, W. T. Dauer, M. S. Ansorge, E. Morelli, J. J. Mann, M. Toth, G. Aghajanian, S. C. Sealton, R. Hen, J. A. Gingrich, Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science* **313**, 536-540 (2006); published online EpubJul 28 (10.1126/science.1123432).
 79. T. Iwasato, R. Nomura, R. Ando, T. Ikeda, M. Tanaka, S. Itohara, Dorsal telencephalon-specific expression of Cre recombinase in PAC transgenic mice. *Genesis* **38**, 130-138 (2004); published online EpubMar (10.1002/gene.20009).
 80. J. Gu, B. L. Firestein, J. Q. Zheng, Microtubules in dendritic spine development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 12120-12124 (2008); published online EpubNov 12 (10.1523/JNEUROSCI.2509-08.2008).
 81. A. Lukaszewicz, P. Savatier, V. Cortay, H. Kennedy, C. Dehay, Contrasting effects of basic fibroblast growth factor and neurotrophin 3 on cell cycle kinetics of mouse cortical stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 6610-6622 (2002); published online EpubAug 01 (20026666).
 82. R. Adams, A. S. David, Patterns of anterior cingulate activation in schizophrenia: a selective review. *Neuropsychiatric disease and treatment* **3**, 87-101 (2007); published online EpubFeb (
 83. Y. Mao, X. Ge, C. L. Frank, J. M. Madison, A. N. Koehler, M. K. Doud, C. Tassa, E. M. Berry, T. Soda, K. K. Singh, T. Biechele, T. L. Petryshen, R. T. Moon, S. J. Haggarty, L. H. Tsai, Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of

- GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell* **136**, 1017-1031 (2009); published online EpubMar 20 (10.1016/j.cell.2008.12.044).
84. C. G. Gross, Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature reviews. Neuroscience* **1**, 67-73 (2000); published online EpubOct (10.1038/35036235).
 85. J. A. A. S. A. BAYER, Migration and Distribution of Two Populations of Hippocampal Granule Cell Precursors During the Perinatal and Postnatal Periods. *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* **301**, (1990).
 86. N. Urban, F. Guillemot, Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**, 396 (2014)10.3389/fncel.2014.00396).
 87. G. L. Ming, H. Song, Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* **70**, 687-702 (2011); published online EpubMay 26 (10.1016/j.neuron.2011.05.001).
 88. E. Gould, How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 481-488 (2007); published online EpubJun (10.1038/nrn2147).
 89. G. Kempermann, H. Song, F. H. Gage, Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **7**, a018812 (2015); published online EpubSep 01 (10.1101/cshperspect.a018812).
 90. T. D. Palmer, A. R. Willhoite, F. H. Gage, Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* **425**, 479-494 (2000); published online EpubOct 02 (
 91. J. Song, R. H. Olsen, J. Sun, G. L. Ming, H. Song, Neuronal Circuitry Mechanisms Regulating Adult Mammalian Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **8**, (2016); published online EpubAug 01 (10.1101/cshperspect.a018937).
 92. H. Suh, A. Consiglio, J. Ray, T. Sawai, K. A. D'Amour, F. H. Gage, In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell stem cell* **1**, 515-528 (2007); published online EpubNov (10.1016/j.stem.2007.09.002).
 93. M. A. Bonaguidi, J. Song, G. L. Ming, H. Song, A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Current opinion in neurobiology* **22**, 754-761 (2012); published online EpubOct (10.1016/j.conb.2012.03.013).
 94. L. P. Wang, G. Kempermann, H. Kettenmann, A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Molecular and cellular neurosciences* **29**, 181-189 (2005); published online EpubJun (10.1016/j.mcn.2005.02.002).
 95. A. Sierra, S. Beccari, I. Diaz-Aparicio, J. M. Encinas, S. Comeau, M. E. Tremblay, Surveillance, phagocytosis, and inflammation: how never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. *Neural plasticity* **2014**, 610343 (2014)10.1155/2014/610343).
 96. S. Jessberger, B. Romer, H. Babu, G. Kempermann, Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. *Experimental neurology* **196**, 342-351 (2005); published online EpubDec (10.1016/j.expneurol.2005.08.010).
 97. M. D. Brandt, S. Jessberger, B. Steiner, G. Kronenberg, K. Reuter, A. Bick-Sander, W. von der Behrens, G. Kempermann, Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Molecular and cellular neurosciences* **24**, 603-613 (2003); published online EpubNov (
 98. K. Merz, D. C. Lie, Evidence that Doublecortin is dispensable for the development of adult born neurons in mice. *PLoS one* **8**, e62693 (2013)10.1371/journal.pone.0062693).
 99. J. H. Chancey, E. W. Adlaf, M. C. Sapp, P. C. Pugh, J. I. Wadiche, L. S. Overstreet-Wadiche, GABA depolarization is required for experience-dependent synapse unsilencing in adult-born neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for*

- Neuroscience* **33**, 6614-6622 (2013); published online EpubApr 10 (10.1523/JNEUROSCI.0781-13.2013).
100. S. Ge, C. H. Yang, K. S. Hsu, G. L. Ming, H. Song, A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* **54**, 559-566 (2007); published online EpubMay 24 (10.1016/j.neuron.2007.05.002).
 101. A. Marin-Burgin, A. F. Schinder, Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behavioural brain research* **227**, 391-399 (2012); published online EpubFeb 14 (10.1016/j.bbr.2011.07.001).
 102. V. C. Piatti, M. G. Davies-Sala, M. S. Esposito, L. A. Mongiat, M. F. Trincherro, A. F. Schinder, The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 7715-7728 (2011); published online EpubMay 25 (10.1523/JNEUROSCI.1380-11.2011).
 103. N. Toni, A. F. Schinder, Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **8**, a018903 (2015); published online EpubDec 04 (10.1101/cshperspect.a018903).
 104. G. Lepousez, A. Nissant, P. M. Lledo, Adult neurogenesis and the future of the rejuvenating brain circuits. *Neuron* **86**, 387-401 (2015); published online EpubApr 22 (10.1016/j.neuron.2015.01.002).
 105. S. Jessberger, R. E. Clark, N. J. Broadbent, G. D. Clemenson, Jr., A. Consiglio, D. C. Lie, L. R. Squire, F. H. Gage, Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learning & memory* **16**, 147-154 (2009); published online EpubFeb (10.1101/lm.1172609).
 106. C. D. Clelland, M. Choi, C. Romberg, G. D. Clemenson, Jr., A. Fragniere, P. Tyers, S. Jessberger, L. M. Saksida, R. A. Barker, F. H. Gage, T. J. Bussey, A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* **325**, 210-213 (2009); published online EpubJul 10 (10.1126/science.1173215).
 107. P. Bekinschtein, B. A. Kent, C. A. Oomen, G. D. Clemenson, F. H. Gage, L. M. Saksida, T. J. Bussey, BDNF in the dentate gyrus is required for consolidation of "pattern-separated" memories. *Cell reports* **5**, 759-768 (2013); published online EpubNov 14 (10.1016/j.celrep.2013.09.027).
 108. M. A. Yassa, C. E. Stark, Pattern separation in the hippocampus. *Trends in neurosciences* **34**, 515-525 (2011); published online EpubOct (10.1016/j.tins.2011.06.006).
 109. T. Nakashiba, J. D. Cushman, K. A. Pelkey, S. Renaudineau, D. L. Buhl, T. J. McHugh, V. Rodriguez Barrera, R. Chittajallu, K. S. Iwamoto, C. J. McBain, M. S. Fanselow, S. Tonegawa, Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* **149**, 188-201 (2012); published online EpubMar 30 (10.1016/j.cell.2012.01.046).
 110. A. Sahay, K. N. Scobie, A. S. Hill, C. M. O'Carroll, M. A. Kheirbek, N. S. Burghardt, A. A. Fenton, A. Dranovsky, R. Hen, Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* **472**, 466-470 (2011); published online EpubApr 28 (10.1038/nature09817).
 111. H. Wurdak, S. Zhu, K. H. Min, L. Aimone, L. L. Lairson, J. Watson, G. Chopiuk, J. Demas, B. Charette, R. Halder, E. Weerapana, B. F. Cravatt, H. T. Cline, E. C. Peters, J. Zhang, J. R. Walker, C. Wu, J. Chang, T. Tuntland, C. Y. Cho, P. G. Schultz, A small molecule accelerates neuronal differentiation in the adult rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16542-16547 (2010); published online EpubSep 21 (10.1073/pnas.1010300107).

112. S. Jessberger, Neural repair in the adult brain. *F1000Research* **5**, (2016)10.12688/f1000research.7459.1).
113. H. Mira, Z. Andreu, H. Suh, D. C. Lie, S. Jessberger, A. Consiglio, J. San Emeterio, R. Hortiguera, M. A. Marques-Torrejon, K. Nakashima, D. Colak, M. Gotz, I. Farinas, F. H. Gage, Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell stem cell* **7**, 78-89 (2010); published online EpubJul 02 (10.1016/j.stem.2010.04.016).
114. A. M. Bond, C. Y. Peng, E. A. Meyers, T. McGuire, O. Ewaleifoh, J. A. Kessler, BMP signaling regulates the tempo of adult hippocampal progenitor maturation at multiple stages of the lineage. *Stem cells* **32**, 2201-2214 (2014); published online EpubAug (10.1002/stem.1688).
115. A. Lavado, G. Oliver, Jagged1 is necessary for postnatal and adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Developmental biology* **388**, 11-21 (2014); published online EpubApr 01 (10.1016/j.ydbio.2014.02.004).
116. W. Kang, J. M. Hebert, FGF Signaling Is Necessary for Neurogenesis in Young Mice and Sufficient to Reverse Its Decline in Old Mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**, 10217-10223 (2015); published online EpubJul 15 (10.1523/JNEUROSCI.1469-15.2015).
117. M. E. Woodbury, T. Ikezu, Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* **9**, 92-101 (2014); published online EpubMar (10.1007/s11481-013-9501-5).
118. M. Bergami, R. Rimondini, S. Santi, R. Blum, M. Gotz, M. Canossa, Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15570-15575 (2008); published online EpubOct 07 (10.1073/pnas.0803702105).
119. P. Bekinschtein, B. A. Kent, C. A. Oomen, G. D. Clemenson, F. H. Gage, L. M. Saksida, T. J. Bussey, Brain-derived neurotrophic factor interacts with adult-born immature cells in the dentate gyrus during consolidation of overlapping memories. *Hippocampus* **24**, 905-911 (2014); published online EpubAug (10.1002/hipo.22304).
120. A. Pascual, M. Hidalgo-Figueroa, J. I. Piruat, C. O. Pintado, R. Gomez-Diaz, J. Lopez-Barneo, Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nature neuroscience* **11**, 755-761 (2008); published online EpubJul (10.1038/nn.2136).
121. T. Mori, K. Tanaka, A. Buffo, W. Wurst, R. Kuhn, M. Gotz, Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* **54**, 21-34 (2006); published online EpubJul (10.1002/glia.20350).
122. K. C. Vadodaria, C. Brakebusch, U. Suter, S. Jessberger, Stage-specific functions of the small Rho GTPases Cdc42 and Rac1 for adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**, 1179-1189 (2013); published online EpubJan 16 (10.1523/JNEUROSCI.2103-12.2013).
123. X. Duan, E. Kang, C. Y. Liu, G. L. Ming, H. Song, Development of neural stem cell in the adult brain. *Current opinion in neurobiology* **18**, 108-115 (2008); published online EpubFeb (10.1016/j.conb.2008.04.001).
124. K. L. Spalding, O. Bergmann, K. Alkass, S. Bernard, M. Salehpour, H. B. Huttner, E. Bostrom, I. Westerlund, C. Vial, B. A. Buchholz, G. Possnert, D. C. Mash, H. Druid, J. Frisen, Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* **153**, 1219-1227 (2013); published online EpubJun 06 (10.1016/j.cell.2013.05.002).

125. L. Pinto, M. Gotz, Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Progress in neurobiology* **83**, 2-23 (2007); published online EpubSep (10.1016/j.pneurobio.2007.02.010).
126. C. F. Ibanez, J. O. Andressoo, Biology of GDNF and its receptors - Relevance for disorders of the central nervous system. *Neurobiology of disease* **97**, 80-89 (2017); published online EpubJan (10.1016/j.nbd.2016.01.021).
127. H. Cline, K. Haas, The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: a review of the synaptotrophic hypothesis. *The Journal of physiology* **586**, 1509-1517 (2008); published online EpubMar 15 (10.1113/jphysiol.2007.150029).
128. R. O. Wong, A. Ghosh, Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nature reviews. Neuroscience* **3**, 803-812 (2002); published online EpubOct (10.1038/nrn941).
129. H. Yuan, R. Chen, L. Wu, Q. Chen, A. Hu, T. Zhang, Z. Wang, X. Zhu, The regulatory mechanism of neurogenesis by IGF-1 in adult mice. *Molecular neurobiology* **51**, 512-522 (2015); published online EpubApr (10.1007/s12035-014-8717-6).
130. T. J. Shors, G. Miesegaes, A. Beylin, M. Zhao, T. Rydel, E. Gould, Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* **410**, 372-376 (2001); published online EpubMar 15 (10.1038/35066584).
131. D. Dupret, J. M. Revest, M. Koehl, F. Ichas, F. De Giorgi, P. Costet, D. N. Abrous, P. V. Piazza, Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PloS one* **3**, e1959 (2008); published online EpubApr 09 (10.1371/journal.pone.0001959).
132. J. S. Snyder, A. Soumier, M. Brewer, J. Pickel, H. A. Cameron, Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* **476**, 458-461 (2011); published online EpubAug 03 (10.1038/nature10287).
133. S. Jessberger, F. H. Gage, Adult neurogenesis: bridging the gap between mice and humans. *Trends in cell biology* **24**, 558-563 (2014); published online EpubOct (10.1016/j.tcb.2014.07.003).
134. D. J. Creer, C. Romberg, L. M. Saksida, H. van Praag, T. J. Bussey, Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 2367-2372 (2010); published online EpubFeb 02 (10.1073/pnas.0911725107).
135. S. A. Neeper, F. Gomez-Pinilla, J. Choi, C. Cotman, Exercise and brain neurotrophins. *Nature* **373**, 109 (1995); published online EpubJan 12 (10.1038/373109a0).
136. M. Gotz, M. Nakafuku, D. Petrik, Neurogenesis in the Developing and Adult Brain-Similarities and Key Differences. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **8**, (2016); published online EpubJul 01 (10.1101/cshperspect.a018853).
137. J. Zhang, J. Jiao, Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *BioMed research international* **2015**, 727542 (2015)10.1155/2015/727542).
138. Y. Z. Wang, T. Yamagami, Q. Gan, Y. Wang, T. Zhao, S. Hamad, P. Lott, N. Schnittke, J. E. Schwob, C. J. Zhou, Canonical Wnt signaling promotes the proliferation and neurogenesis of peripheral olfactory stem cells during postnatal development and adult regeneration. *Journal of cell science* **124**, 1553-1563 (2011); published online EpubMay 01 (10.1242/jcs.080580).
139. D. M. Panchision, J. M. Pickel, L. Studer, S. H. Lee, P. A. Turner, T. G. Hazel, R. D. McKay, Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes & development* **15**, 2094-2110 (2001); published online EpubAug 15 (10.1101/gad.894701).

140. B. Berninger, S. Jessberger, Engineering of Adult Neurogenesis and Gliogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **8**, (2016); published online EpubMay 02 (10.1101/cshperspect.a018861).
141. S. Jessberger, N. Toni, G. D. Clemenson, Jr., J. Ray, F. H. Gage, Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nature neuroscience* **11**, 888-893 (2008); published online EpubAug (10.1038/nn.2148).
142. Y. Konishi, L. B. Yang, P. He, K. Lindholm, B. Lu, R. Li, Y. Shen, Deficiency of GDNF Receptor GFRalpha1 in Alzheimer's Neurons Results in Neuronal Death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**, 13127-13138 (2014); published online EpubSep 24 (10.1523/JNEUROSCI.2582-13.2014).
143. F. Ledda, O. Bieraugel, S. S. Fard, M. Vilar, G. Paratcha, Lrig1 is an endogenous inhibitor of Ret receptor tyrosine kinase activation, downstream signaling, and biological responses to GDNF. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 39-49 (2008); published online EpubJan 02 (10.1523/JNEUROSCI.2196-07.2008).
144. H. Cremer, R. Lange, A. Christoph, M. Plomann, G. Vopper, J. Roes, R. Brown, S. Baldwin, P. Kraemer, S. Scheff, D. Barthels, K. Rajewsky & W. Wille, Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*. 367(6462):455-9.(1994).