



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**PAPEL DE LA PROTEÍNA DOBLECORTINA EN
LOS PROCESOS DE NEUROGÉNESIS Y
MIGRACIÓN NEURONAL EN EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL ADULTO**

-TESIS DOCTORAL-

MARÍA VIDAL GARCÍA

Salamanca, Octubre 2009



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

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



**PAPEL DE LA PROTEÍNA DOBLECORTINA EN
LOS PROCESOS DE NEUROGÉNESIS Y
MIGRACIÓN NEURONAL EN EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL ADULTO**

Memoria presentada por *María Vidal García* para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Salamanca

Director:

Prof. Dr. D. Jesús María García Briñón

Octubre 2009



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

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

**PAPEL DE LA PROTEÍNA DOBLECORTINA EN
LOS PROCESOS DE NEUROGÉNESIS Y
MIGRACIÓN NEURONAL EN EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL ADULTO**

María Vidal García

Octubre 2009

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que quiero dar las gracias por participar, de un modo u otro, en la realización de este trabajo. Me gustaría dedicar las primeras líneas a las que son las personas más importantes en mi vida, a mis padres y a David. Quiero agradecer a mis padres su apoyo incondicional y su fuerza, soy lo que soy gracias a ellos y, de la forma más sincera, creo que nadie lo podría haber hecho mejor. Me gustaría dar las gracias a David por su paciencia, sus consejos, su confianza, por hacerme sentir segura y hacer que camine siempre hacia delante.

Quiero agradecer a mi Director de Tesis, el Dr. Jesús García Briñón, todo el esfuerzo, el trabajo y el empeño que ha dedicado durante estos años a la realización de este proyecto, especialmente en los últimos meses, en los que ha trabajado a contrarreloj.

Me gustaría agradecer al Dr. Jordi Alberch y al Dr. Josep Canals por abrirme las puertas de su laboratorio y tratarme como un miembro más del grupo. Quiero además, dar las gracias a todo su equipo, pero de forma especial a Raquel, Miriam, Cris y a Noelia... os echo de menos chicas!

Gracias a la Dra. Tabernero, al Dr. Medina y a todo su equipo, especialmente a André y a Vega, por ayudarme en mis inicios con los cultivos primarios y con las transfecciones.

Gracias al Dr. Didier Trono y al Dr. Antonio Bernad por su amabilidad a la hora de cederme los plásmidos necesarios para que el proyecto despegara.

Gracias al Dr. Juan Pedro Bolaños y a todo su equipo por su ayuda con algunas de las construcciones vectoriales.

Gracias a Ana, Lorena y Lau por ser mi apoyo, por ser como son, por encontrar siempre la palabra de ánimo, o porque a veces vale sin hablar... gracias por estar ahí. Gracias también a toda mi familia por su confianza, y por no tener en cuenta las horas que nos ha "robado" esta Tesis.

He querido reservar estas últimas líneas para dar las gracias a todos y cada uno de los miembros del Dpto. de Biología Celular y a todo el Instituto de Neurociencias de Castilla y León, donde he podido aprender y desarrollarme en todos los aspectos. Quiero agradecer de forma especial el apoyo, personal y profesional, de mis compañeros de laboratorio. En mi opinión no hace falta nombrar a nadie, creo que se reconocerán en mis palabras. Lo mejor de todos estos años ha sido poder venir a trabajar con una sonrisa. Las personas no podemos elegir la gente con la vamos a trabajar, pero si pudiera elegir, nadie mejor que vosotros.

Gracias a todos los que en este trabajo habéis puesto manos, cabeza y corazón.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
NEUROGÉNESIS EN EL SNC ADULTO	3
Nichos neurogénicos	4
Regulación de la neurogénesis	5
Hormonas.....	5
Neurotransmisores.....	6
Factores de crecimiento o neurotrofinas	6
Moléculas de adhesión celular	8
SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LA NEUROGÉNESIS	9
SISTEMA ZSV-BO.....	11
ZSV adulta: estructura y tipos celulares.	11
Bulbo olfatorio principal: estructura y función.....	15
Células de nueva generación del bulbo olfatorio	19
MECANISMOS DE MIGRACIÓN CELULAR.....	23
Migración radial.....	23
Migración tangencial	25
MIGRACIÓN CELULAR EN LA CMR Y BO	25
Desarrollo embrionario vs. Desarrollo postnatal.....	28
ALTERACIONES EN LA MIGRACIÓN CELULAR: LISENCEFALIAS	30
Doblecortina.....	32
RNA DE INTERFERENCIA	35
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	39
MATERIAL Y MÉTODOS	43
ANÁLISIS <i>IN VITRO</i>	45
Cultivos primarios de neuronas corticales	45
Transfección con siRNA	46
Western-blot	46
Preparación de los geles	47
Electroforesis y transferencia.....	47
Inmunodetección.....	48
Inmunofluorescencia para cultivos primarios	49
Construcciones vectoriales	50
Diseño de los oligonucleótidos DCX-shRNA y <i>scramble</i> DCX-shRNA	50
Modificación del ADN plasmídico	52
Reacción de ligación.....	53
Transformación bacteriana	53
Obtención de ADN plasmídico	53
Northern blot.....	53
Extracción de RNA enriquecido en RNA de pequeño tamaño.....	54
Preparación de los geles de acrilamida y electroforesis	54
Transferencia.....	55
Marcaje de la sonda e hibridación.....	55
Producción de partículas lentivirales	56
Cultivo de la línea celular 293FT.....	57
Cotransfección de las células 293FT con plásmidos virales.....	58
Concentración.....	58
Titulación viral.....	59
Cultivos de progenitores embrionarios de LGE de ratón.....	60
Mantenimiento	60
Análisis de diferenciación	61
Inmunofluorescencia y western-blot	63

Extracción de RNA.....	63
Transducción lentiviral de los progenitores embrionarios.....	63
Ensayo de PCR cuantitativa	64
ANÁLISIS <i>IN VIVO</i>	65
Inyecciones estereotáxicas	65
Obtención y preparación del tejido	66
Sacrificio y disección.....	66
Seccionamiento.....	67
Inmunohistoquímica convencional	67
Controles de la técnica inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia	68
Cuantificación.....	69
Análisis cuantitativos de GFP.....	69
Análisis estadísticos.....	70
Documentación y tratamiento de imágenes.....	70
RESULTADOS	71
SILENCIAMIENTO <i>IN VITRO</i> MEDIANTE siRNA.....	73
CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE shRNA	
.....	73
Determinación de la expresión de shRNA mediante norther-blot.....	74
GENERACIÓN DE LENTIVIRUS RECOMBINANTES	74
SILENCIAMIENTO <i>IN VITRO</i> MEDIANTE shRNA.....	79
Determinación de la expresión de doblecortina	80
Infección con lentivirus recombinantes	83
Determinación del grado de silenciamiento	83
Efecto del silenciamiento sobre la expresión de otros genes	83
SILENCIAMIENTO <i>IN VIVO</i> MEDIANTE shRNA.....	84
Determinación del grado de silenciamiento.....	89
Efectos producidos por el silenciamiento de doblecortina.....	89
Análisis de migración tangencial	89
Tipos morfológicos de células de nueva generación	90
Análisis de migración radial.....	97
Efectos sobre la diferenciación	105
DISCUSIÓN	119
iRNA COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO.....	121
Consideraciones técnicas	122
Lentivirus como vehículos de expresión	123
EXPRESIÓN DE DOBLECORTINA EN PROGENITORES EMBRIONARIOS DE	
LGE.....	126
El silenciamiento <i>in vitro</i> de doblecortina reduce los niveles del mRNA de Tuj1.....	127
SILENCIAMIENTO DE DOBLECORTINA EN PROGENITORES DE LA SVZ	
ADULTA	129
Grado de silenciamiento de doblecortina	130
Migración tangencial a través de la CMR en roedores adultos.	131
El silenciamiento de doblecortina provoca la aparición de células multipolares.	134
Migración radial a través del BO en roedores adultos.....	136
Diferenciación temprana de los granos de nueva generación del BO	138
CONCLUSIONES.....	141
BIBLIOGRAFÍA.....	145

INTRODUCCIÓN

NEUROGÉNESIS EN EL SNC ADULTO

Clásicamente se consideraba que los centros del SNC adulto y las vías nerviosas eran algo fijo, órganos estáticos cuya organización quedaba definida estructural y funcionalmente una vez finalizado el desarrollo embrionario (Ramón y Cajal, 1914), aunque, ya a principios del siglo XX, Santiago Ramón y Cajal plasmó de forma implícita el concepto de plasticidad neuronal en su hipótesis referente al enriquecimiento de los circuitos neuronales como sustrato material potencial del “perfeccionamiento de las aptitudes psíquicas” (Ramón y Cajal, 1909). Posteriormente se acuñó el término plasticidad cerebral (Hebb, 1949) como la capacidad del cerebro para adaptarse a una nueva situación, sin importar la causa originaria (maduración, aprendizaje, cambios ambientales o enfermedad). De hecho, se ha demostrado que el sistema nervioso es capaz de responder a estas situaciones mediante mecanismos que permiten la reorganización estructural y/o funcional, para minimizar los efectos de dichas alteraciones (Aguilar-Rebolledo y Mateos-Gómez, 1989; Wang y Feuerstein, 1995; Jokeit et al., 1996; Aguilar-Rebolledo, 2002).

En un principio, la comunidad científica relacionaba los procesos de plasticidad en el cerebro adulto exclusivamente con sutiles modificaciones funcionales y anatómicas. La ausencia de figuras mitóticas en las neuronas y la irreversibilidad de las lesiones cerebrales reforzaban el poder dogmático que poseía la creencia inicial de que la neurogénesis estaba limitada al periodo embrionario. Sin embargo, este concepto ha cambiado desde los trabajos de Altman a nuestros días (Altman, 1969; Lledó et al., 2006). Si bien es cierto que cuando comparamos la neurogénesis que tiene lugar en el Sistema Nervioso Central (SNC) adulto con el extensísimo proceso neurogénico que ocurre durante los procesos de desarrollo embrionario, la neurogénesis adulta parece un proceso secundario; también es cierto que existen determinadas áreas del cerebro donde, por así decirlo, el desarrollo nunca termina. Además, el hecho de que exista neurogénesis en diversos grupos animales indica que no se trata de un fenómeno excepcional y que la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto es un fenómeno conservado a lo largo de la evolución (Altman, 1963; Gueneau et al., 1982; Eriksson et al., 1998; Martínez-Marcos et al., 2001).

Nichos neurogénicos

Los precursores primarios del SNC adulto se han identificado en zonas especializadas denominadas “nichos neurogénicos”, que parecen ser vestigios del programa de desarrollo que inicia la formación del cerebro (Corotto et al., 1993; Luskin, 1993; Lois and Álvarez-Buylla, 1994; Kuhn et al., 1996; van Praag et al., 2002). Hasta el momento solamente se han descrito dos áreas neurogénicas donde se ha documentado la existencia de neurogénesis en el cerebro adulto: la zona subventricular/sistema olfatorio y el giro dentado del hipocampo (Altman y Das, 1965; Altman, 1969; Eriksson et al., 1998; Hastings y Gould, 1999; van Praag et al., 2002; Carleton et al., 2003). Además, se han aislado células con propiedades de células madre *in vitro* en áreas no neurogénicas tales como el septo, el estriado, la corteza cerebral, el cuerpo caloso y el nervio óptico (Palmer et al., 1995; Shihabuddin et al., 1997; Palmer et al., 1999; Tropepe et al., 2000). Sin embargo, estas regiones son consideradas no neuronogénicas por carecer de un ambiente permisivo para que la neurogénesis tenga lugar, de modo que si se implanta un progenitor neural dentro de estas regiones, esta célula nunca dará lugar a células de estirpe neuronal, si no que originará una célula glial o morirá (Ortega-Pérez et al., 2007).

Los nichos neurogénicos dentro del SNC adulto poseen características anatómicas e histológicas que son esenciales, tanto para el mantenimiento como para la regulación de la neurogénesis. Entre éstas cabe destacar el hecho de que las células progenitoras neurales estén próximas a los capilares, los endimocitos y los astrocitos, lo cual les proporciona unas características especiales que hacen posible la generación de nuevas células (Arias-Carrión y Druker-Colín, 2007). En este sentido se ha comprobado que las células endoteliales liberan factores solubles que estimulan la auto-renovación de las células madre neurales, inhibiendo su diferenciación (Shen et al., 2004). Además los capilares sanguíneos aportan un soporte trófico y metabólico y, de hecho, se cree que existe una estrecha relación entre la regulación de los procesos de neurogénesis y de angiogénesis (Palmer et al., 2000). Las células endimarias localizadas en la zona subventricular (ZSV) bloquean la señalización endógena mediada por la proteína BMP (del inglés, *bone morphogenetic protein*) mediante la liberación de su antagonista *Noggin*. La proteína BMP bloquearía la producción de neuronas mientras que potenciaría la diferenciación hacia estirpes gliales, por lo que los endimocitos estarían, de algún modo, favoreciendo la existencia de un ambiente neuronogénico en las zonas adyacentes a la ZSV (Lim et al., 2000). Por otra parte, las células gliales en general, y los

astrocitos en particular, cumplen un papel esencial en la formación del nicho neurogénico, de modo que se ha comprobado que son capaces de controlar múltiples pasos de la neurogénesis adulta; desde la proliferación, especificación y migración hasta la integración en los circuitos preexistentes (Ma et al., 2005).

Como hemos apuntado, en el SNC adulto existen microambientes neurogénicos que comparten los mecanismos de señalización presentes en el embrión. No obstante, la capacidad de integración celular, de comunicación y las propiedades de la matriz extracelular del SNC adulto dificultan la integración sináptica de las células de nueva generación en los circuitos ya establecidos. Deberemos, por tanto, comprender de forma integral las características de estas regiones para desentrañar los mecanismos de regulación endógenos y así poder desarrollar estrategias que nos permitan la posibilidad de modulación de los mismos.

Regulación de la neurogénesis

En el proceso de neurogénesis se pueden diferenciar distintas etapas: la proliferación, la migración, la diferenciación y la supervivencia. En su conjunto, la neurogénesis está regulada por múltiples factores, tanto moleculares como ambientales, que intervienen en las diferentes etapas del proceso (tabla 1). Entre estos factores destacamos:

Hormonas

Estudios llevados a cabo en la pasada década han demostrado que las hormonas son reguladores potenciales del proceso de neurogénesis. Las fluctuaciones cíclicas que sufren los niveles de hormonas sexuales se corresponden con transiciones, también cíclicas, en los eventos neurogénicos (Lennington et al., 2003). De hecho, se ha observado la existencia de un dimorfismo sexual en las zonas neurogénicas del cerebro adulto de roedores (Peretto et al., 2001). Concretamente, la testosterona y el estradiol modulan la supervivencia y la integración de las células de nueva generación en el núcleo encefálico que controla el canto en los canarios (Nordeen y Nordeen, 1989; Rasika et al., 1994; Hidalgo et al., 1995; Johnson y Bottjer, 1995). Por otro lado, se ha descrito que el estradiol modula la función hipocampal a través de un incremento de la proliferación neuronal en roedores (Tanapat et al., 1999). Este mismo efecto también lo ejercen la prolactina y las hormonas tiroideas en la ZSV (Lennington et al., 2003), mientras que la progesterona y los glucocorticoides tienen el efecto contrario, de modo

que provocan la disminución de la tasa de proliferación en el hipocampo y en la ZSV respectivamente (Sapolsky, 1999; Giachino et al., 2004).

Neurotransmisores

Se ha demostrado que algunos neurotransmisores influyen en la regulación de la neurogénesis adulta. Entre estas moléculas destacan la dopamina, la serotonina, la acetilcolina y el glutamato. Todos ellos inducen un aumento de la tasa proliferativa (Cárdenas et al., 2005; Hagg, 2005; Ming y Song, 2005). El óxido nítrico, sin embargo, parece que ejerce un papel inhibitorio en la regulación de la proliferación celular, presumiblemente a través de un bloqueo de los receptores para el EGF (del inglés, *epidermal growth factor*) (Matarredona et al., 2005; Torroglosa et al., 2007). Por otro lado, algunas de estas moléculas también ejercen su efecto sobre la supervivencia de las células, como es el caso de la serotonina, papel que lleva a cabo a través del BDNF (del inglés, *brain-derived neurotrophic factor*) como mediador (Banasr et al., 2004; Mattson et al., 2004).

Factores de crecimiento o neurotrofinas

De entre los aspectos más importantes en el nicho neurogénico cabe destacar el mantenimiento de una población de células madre en un estado indiferenciado a la vez que se promueve la diferenciación de su progenie. Existen dos moléculas candidatas a las que se les ha atribuido el mantenimiento de esta función: Noggin/BMPs (del inglés, *bone morphogenic proteins*) y Notch (Conover y Allen, 2002). Las cascadas de señales en las que participan estas proteínas determinan que las células madre se mantengan como tales y proliferen, o salgan del ciclo y se diferencien a linaje glial o neuronal (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Lim et al., 2000).

Otros factores influyen directamente en la tasa de proliferación: EGF, FGF (del inglés, *fibroblast growth factor*), CNTF (del inglés, *circulating tumour necrosis factor*), VEGF (del inglés *vascular endothelial growth factor*) y TGF α (del inglés, *transforming growth factor*), que incrementan la tasa proliferativa, mientras que TGF β la disminuye (Craig et al., 1996; Kuhn et al., 1996; Tropepe et al., 1997; Pencea et al., 2001; Doetsch et al., 2002; Jin et al., 2002a; Emsley y Hagg, 2003; Hagg, 2005).

	ZONA SUBVENTRICULAR				HIPOCAMPO			
	P	M	D	S	P	M	D	S
Hormonas	Glucocorticoides	0					0	0
	H. Tiroideas	↑						
	Estrógenos					↑		
	Progesterona					↓		
	Prolactina	↑				0		
	Pregnenolona					↑		
Neurotransmisores	Glutamato				↑			
	Serotonina	↑		0	↑		0	
	Dopamina	↑						
	Acetilcolina	↑			↑			
	NO	↓				↓		
Factores de crecimiento/tróficos	FGF	↑		↑	0	0	0	0
	EFG	↑		↓	0		↓	
	TGF-α	↑						
	IGF-F					↑	↑	
	BDNF	?	?	?	?			?
	CNTF	↑				↑	↑	
	VEGF	↑				↑		
	BMP	↓		↓				
	Noggin	↑		↑				
	Moléculas de adhesión	PSA-NCAM		↑				
Efrinas		↓	↑					
Reelina			↑ (radial)					
Tenascina-R			↑ (radial)					
Proquinetina R			↑ (radial)					

Tabla 1. Factores que influyen en la neurogénesis adulta. Los símbolos utilizados en esta tabla indican: ↓ disminución, ↑ aumento, 0 ausencia de cambios significativos y ? existencia de datos contradictorios. Las celdas en blanco indican que no existen datos publicados al respecto. P, proliferación; M, migración; D, diferenciación; S, supervivencia

El papel de otras neurotrofinas no parece estar tan claro, como es el caso del BDNF. Publicaciones recientes ponen en duda investigaciones llevadas a cabo en la última década que atribuían al BDNF un efecto positivo sobre la proliferación en la neurogénesis adulta. El efecto de esta neurotrofina sobre la neurogénesis ha sido estudiado en distintos aspectos de este proceso y los resultados son contradictorios. Mientras que algunos autores (Lee et al., 2000; Pencea et al., 2001) observan un aumento de las células proliferativas, otros describen una influencia negativa sobre la neurogénesis (Larsson et al., 2002, Galvão et al., 2008)).

En lo que respecta a la supervivencia, algunos autores afirman que el BDNF produce una disminución de la apoptosis (Kirschenbaum y Goldman, 1995; Linnarsson et al., 2000; Benraiss et al., 2001; Chiaramello et al., 2007), mientras que los resultados de otros, (Galvão et al., 2008), demuestran que no tiene efecto sobre la misma y se decantan por un posible papel en la diferenciación de las células altamente proliferativas (Células C) de la ZSV como posible explicación a la disparidad de resultados que han sido publicados hasta el momento.

Moléculas de adhesión celular

Las moléculas de adhesión celular juegan un papel importante tanto en proliferación como en migración. Entre las proteínas que afectan a la tasa proliferativa se encuentran las efrinas (ligandos de los receptores tirosina cinasa Eph) y el carbohidrato LeX/SSEA presente en células madre embrionarias. Estas moléculas actúan favoreciendo la división celular y aumentando la proliferación (Conover et al., 2000; Capela y Temple, 2002). Un efecto opuesto lo tiene la molécula altamente glicosilada mCD23 que se encuentra en endimocitos localizados en la ZSV y en el giro dentado del hipocampo (Belvindrah et al., 2002).

Una de las moléculas de superficie más importantes en los procesos de migración celular es la PSA-NCAM (del inglés *polysialylated isoform of neural cell adhesion molecule*), que se expresa de forma específica en la corriente migratoria rostral (CMR) en el SNC adulto (Bonfanti y Theodosis, 1994). Existen otras moléculas que participan en fenómenos de adhesión y que están implicadas en los procesos de migración como efrinas (Conover et al., 2000; Anton et al., 2004), netrinas (Murase y Horwitz, 2002), integrinas (Murase y Horwitz, 2002), slit y Robo (Wu et al., 1999; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004).

SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LA NEUROGÉNESIS

La neurogénesis adulta comprende toda la serie de procesos que subyacen al desarrollo neuronal, comenzando con la división de un precursor y terminando con la presencia y la supervivencia de una nueva neurona madura, integrada en la circuitería preexistente, y funcional (Doetsch y Hen, 2005). La integración de las nuevas neuronas depende de toda una serie de eventos y de variables complejas. Como ya hemos mencionado anteriormente, el proceso de neurogénesis tiene lugar dentro de unos márgenes de restricción espacial en el adulto, que se encuentran altamente conservados. Por ello, es razonable pensar que la persistencia de neurogénesis durante la vida adulta en estas regiones específicas (hipocampo y sistema olfatorio) sea de especial relevancia para su correcto funcionamiento (Magavi et al., 2005).

En el caso del sistema olfatorio, éste presenta una gran capacidad de renovación celular, de modo que, en el bulbo olfatorio (BO) de roedores adultos, aproximadamente el 1% de las neuronas totales se incorporan cada día (Bayer, 1983; Kaplan et al., 1985; Winner et al., 2002; Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002). De todas las células que llegan al BO, la mitad muere entre los días 15 y 45 después de su generación; incluso después de haber desarrollado una compleja morfología dendrítica y haber llevado a cabo la formación de espinas dendríticas (Winner et al., 2002; Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002). Las neuronas que sobreviven a las oleadas de neurogénesis persisten durante, al menos, un año en el BO (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002). De hecho, se ha demostrado que estas células se integran anatómicamente y funcionalmente en la circuitería del BO, ya que, comienzan a expresar el gen de expresión temprana *c-fos* tras estimulación con odorantes (Carlen et al., 2002). Por otro lado, se ha visto que poseen propiedades eléctricas típicas de neuronas maduras (Belluzzi et al., 2003; Carleton et al., 2003) y que presentan respuestas sinápticas tras estimulación aferente (Belluzzi et al., 2003). Se ha postulado que este mecanismo de renovación celular que tiene lugar en el BO va encaminado a maximizar la capacidad de discriminación entre olores de una forma dependiente de actividad (Cecchi et al., 2001).

Aptitudes tales como la memoria, el aprendizaje y la discriminación olfatoria han sido atribuidos a modificaciones en las sinapsis entre las neuronas de proyección y las interneuronas del BO. La continua adición de interneuronas a los circuitos establecidos podría aportar una especie de sustrato adaptativo a los complejos cambios medioambientales. Se ha sugerido que, probablemente, el BO no sea capaz de asumir, con un circuito inhibitorio estático, el procesamiento de la información que un animal

experimenta a lo largo de su desarrollo y en su vida adulta, por lo que sería necesario construir circuitos inhibidores de acuerdo con las experiencias que va sufriendo a lo largo de su vida (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002).

Las células de nueva generación del hipocampo se originan en el tercio interior de la capa de granular. Estas células, que representan aproximadamente el 10% de la población total de hipocampo, se diferencian y extienden sus dendritas progresivamente hasta la zona más profunda de la capa molecular. Sus propiedades electrofisiológicas son distintas de las de las células inmaduras que se forman durante el desarrollo (Ambrogini et al., 2004). La importancia del proceso de neurogénesis en la vida adulta queda demostrado por el hecho de que su eliminación tiene como consecuencia un déficit en el aprendizaje dependiente de la función hipocampal y en la memoria a largo plazo (Raber et al., 2004). Por tanto, parece que en el caso del hipocampo, al igual que en el BO, la persistencia de la neurogénesis en el individuo adulto permite una adaptación a un ambiente nuevo o enriquecido (Doetsch y Hen, 2005). Estudios recientes sugieren que la neurogénesis hipocampal incrementa la capacidad de aprendizaje de nueva información y, por otro lado, también permite que se olvide información “vieja” o en desuso (Chambers et al., 2004).

Parece improbable que la función del reemplazo neuronal sea la de contribuir a que el cerebro de un animal se recupere después de un daño o una lesión. Los últimos estudios sugieren que la generación constante y la incorporación de estas células posibilitan el mantenimiento de los circuitos funcionalmente jóvenes. En este sentido, determinados pasos irreversibles, como la activación de determinados grupos de genes específicos, conducen a una neurona a la diferenciación (Nottebohm, 2002), y este último acontecimiento en el proceso de diferenciación es lo que marca el paso a la adquisición de memoria a largo plazo. En esta situación la célula es capaz de contener la información, pero, por otro lado, este escenario de irreversibilidad es limitante para el proceso de aprendizaje (Nottebohm, 2002). De ahí que algunas de estas células sean reemplazadas por otras para mantener las condiciones de plasticidad necesarias para poder almacenar nuevas experiencias.

Por todo lo expuesto anteriormente, la percepción más generalizada es que la adición de las neuronas de nueva generación al SNC adulto es claramente beneficiosa. Sin embargo, a lo largo de la evolución, a medida que aumenta la complejidad cerebral, el proceso neurogénico va progresivamente disminuyendo (Kempermann et al., 2004), dato que contrasta claramente con la afirmación anterior. En este contexto, podemos

afirmar que mientras la neurogénesis funcional existe en el cerebro adulto, aún estamos lejos de comprender completamente su significado.

SISTEMA ZSV-BO

Durante el desarrollo embrionario y el desarrollo postnatal temprano los cuerpos celulares de células madre neurales se ordenan formando una capa que delimita el sistema ventricular. En roedores, a las pocas semanas de vida, la mayoría de los progenitores neurales son relegados, por células endimarias postmitóticas, a la ZSV, una capa discontinua de células de diferentes estirpes localizada entre la pared del epéndimo de los ventrículos laterales y el tejido nervioso maduro (Altman, 1969; Lledó et al., 2008). La ZSV persiste en el individuo adulto y conserva su capacidad para generar tanto neuronas como células gliales cuyo destino principal es el bulbo olfatorio (Lois y Álvarez-Buylla, 1993).

ZSV adulta: estructura y tipos celulares.

La ZSV está organizada como una gran red de cadenas de neuroblastos migrantes (células tipo A) que viajan a través de una especie de túneles formados por los procesos de células gliales (células tipo B). Además, existen parches de células, formados por precursores neurales con una alta tasa proliferativa (células C), repartidos entre esa gran red de neuroblastos. Todo ello se encuentra, además, separado de la luz del ventrículo por una monocapa de células endimarias denominadas células de tipo E (Doetsch et al., 1999).

Postnatalmente, las células C precursoras, localizadas en la ZSV, se dividen y migran a lo largo de una vía definida, denominada corriente migratoria rostral (CMR) (Altman, 1969). La CMR se origina a partir de la extensión rostral de la ZSV, formando una columna larga y estrecha de células que se extiende desde el extremo rostral de los ventrículos laterales hasta el BO (Peretto et al., 1999). Los neuroblastos (tipo A) migran asociados entre sí, por medio de interacciones homotípicas, formando cadenas, aisladas del tejido nervioso maduro por tubos gliales formados por envueltas astrocitarias de células tipo B (Rousselot et al., 1995; Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1997).

Cada uno de los tipos celulares que componen este sistema ha sido estudiado en detalle (esquema 1). El tipo celular más abundante, tanto en la ZSV como en la CMR, es el **tipo A** o clase I. Estas células, como ya hemos apuntado, son neuroblastos, que,

además, mantienen su capacidad de proliferación mientras se encuentran migrando (Menezes et al., 1995; Wichterle et al., 1997). Éstos poseen una morfología bipolar, con un cuerpo celular alargado y de contorno liso. Ultraestructuralmente poseen un núcleo de gran tamaño, eucromático y ocasionalmente invaginado (Doetsch et al., 1997). Algunas de estas células se encuentran unidas entre sí por contactos de tipo adherente, de 0,5 a 1 μm de diámetro, distribuidos por toda la superficie celular (Doetsch et al., 1997). Los marcadores moleculares más empleados para su detección (tabla 2) son PSA-NCAM, Tuj1 (β III tubulina) y doblecortina (DCX). Las células de tipo A incorporan marcadores de proliferación celular como timidina tritiada o 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), por lo que se sabe que son células mitóticamente activas (Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1999).

Las **células tipo B** o de clase II son consideradas astrocitos protoplasmáticos y son menos abundantes que las células de tipo A. Tienen un contorno irregular, al igual que su núcleo, que presenta numerosas indentaciones (Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1997). Se han descrito dos subtipos de células B atendiendo a su posición y a su apariencia ultraestructural, las de tipo B1 y las de tipo B2. Las células B2 son más electrodensas, más pequeñas y con núcleos más heterocromáticos que las de tipo B1 (Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1997). Por otra parte, las células de tipo B1 se localizan mayoritariamente en la zona adyacente a la monocapa ependimaria donde extienden sus procesos formando una lámina que recubre la capa ependimal, mientras que las células de tipo B2 se localizan en el límite con el parénquima del estriado (Doetsch et al., 1997). Las células de tipo B1 no incorporan marcadores de proliferación celular, mientras que las de tipo B2 si lo hacen, aunque con baja frecuencia (Doetsch et al., 1997). En la CMR no han podido identificarse estos dos subtipos celulares, por lo que en esta localización se habla únicamente de células B (Doetsch et al., 1997). La proporción de células B disminuye siguiendo un gradiente caudo-rostral, de tal modo que los tubos gliales que forman se acaban por desorganizar a la altura del límite caudal del BO (Peretto et al., 1997). Además de lo apuntado anteriormente para esta estirpe celular, algunos autores consideran que una subpoblación de los astrocitos de tipo B1 se corresponde con progenitores primarios del cerebro adulto (Doetsch et al., 1999a; Laywell et al., 2000) y se sabe que derivan directamente de la glía radial embrionaria (Merkle et al., 2004). Las células de tipo B1, al igual que la glía radial durante el desarrollo temprano, tienen su superficie apical en contacto con la luz del ventrículo, del que surge un único cilio corto que llega hasta la cavidad ventricular

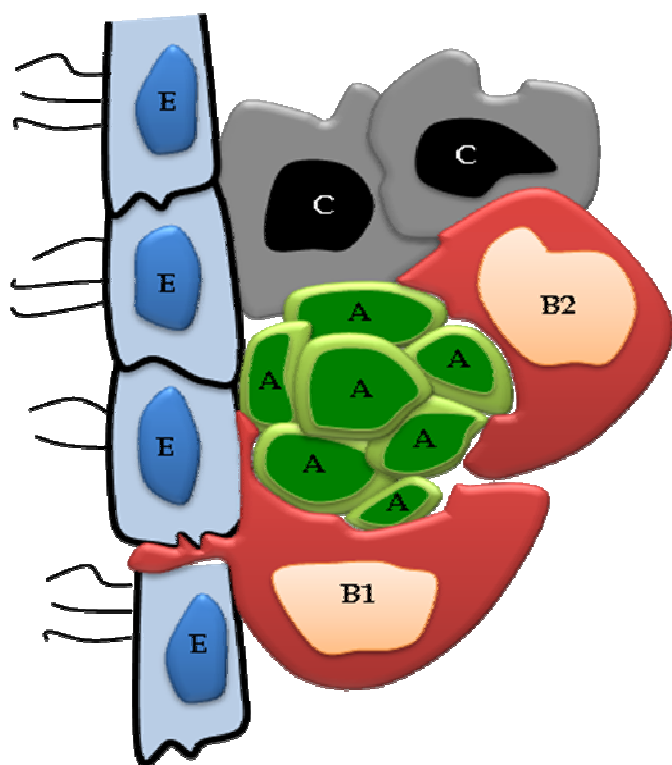
(Mirzadeh et al., 2008). Este contacto entre las células B1 y el líquido cefaloraquídeo puede ser determinante en la regulación de: (1) los procesos de división simétrica y asimétrica de estas células (Chenn y Walsh, 2002; Kosodo et al., 2004) y (2) la exposición a moléculas como *noggin* producida por los endimocitos y que es esencial para el mantenimiento del nicho neurogénico (Lim et al., 2000; Peretto et al., 2004). Estas células presentan como marcadores neuroquímicos característicos, entre otros, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, de glial fibrillary acid protein), S-100 y vimentina (tabla 2) (Doetsch et al., 1997).

El tercer tipo celular son las **células tipo C**, que son los precursores neurales con una alta tasa proliferativa, y son, por ello, las más activas mitóticamente, mostrando una tasa proliferativa diez veces superior a las de tipo A o B (Doetsch et al., 1997). Se ha postulado que estas células son las progenitoras de las células de tipo A (Doetsch et al., 1997). Estas células no migran y se acumulan formando grupos. Se cree que son una población intermedia que se divide rápidamente para dar lugar a numerosos neuroblastos que inician después la migración (García-Verdugo et al., 1998). Ultraestructuralmente son más electrodensas que las de tipo B pero menos que las de tipo A (García-Verdugo et al., 1998). Presentan un contorno celular liso, un núcleo con profundas invaginaciones y contactan frecuente con los neuroblastos en migración. Están presentes en todos los niveles de la ZSV, pero su número es menor en partes más caudales (García-Verdugo et al., 1998). No se ha descrito ningún marcador molecular específico de estas células que permita diferenciarlas de los otros tipos celulares de la ZSV. Se marcan con *nestina* al igual que las células de tipo A, B y E (Doetsch et al., 1997) y con *Dlx2*, que también se encuentra presente en las células de tipo A (tabla 2).

Existen también otros tipos celulares como las células endimales o **células E** que forman una monocapa multiciliada que establece el límite con la cavidad ventricular (Doetsch et al., 1997). Su contribución al linaje postnatal de la ZSV ha sido muy controvertido a lo largo de la historia (Chiasson et al., 1999; Doetsch et al., 1999; Capela y Temple, 2002). Estudios muy recientes han replanteado la idea inicial de que una parte de estas células (identificadas por la expresión del marcador *CD133*) representa una población adicional de células madre neurales en el cerebro adulto (Coskun et al., 2008). Las células de tipo E se pueden observar también ocasionalmente formando grupos aislados en la CMR lo cual se ha considerado como un vestigio de la pared ventricular embrionaria, siendo desconocido su papel en esta zona (Altman, 1969; Peretto et al., 1997).

En la ZSV también aparecen de forma esporádica otros tipos celulares como tanicitos o células de tipo D. Se trata de células no ciliadas que se localizan dispersas entre los endimocitos que limitan la cavidad ventricular (Doetschet et al., 1997). Además, también podemos encontrar células de microglía, algunas neuronas, oligodendrocitos y células de estirpes no identificadas y de aspecto picnótico (Lois et al., 1996; Chazal et al., 2000).

Otra de las características más notables de la ZSV adulta es la presencia de una lámina basal especializada que se extiende desde los vasos sanguíneos hasta el tabique endimario del ventrículo lateral y que contacta con todos los tipos celulares descritos anteriormente (Mercier et al., 2002). La estructura de la lámina basal, junto con la compleja composición de la matriz extracelular del nicho neurogénico, parecen tener gran importancia en la regulación tanto del proceso de proliferación como en el de migración (Mercier et al., 2002; Doetsch, 2003).



Esquema 1. Representación esquemática de la organización de la ZSV. En una sección transversal los progenitores neuronales (verde) dan lugar a agrupaciones de células rodeadas por las células de tipo B (rojo). Las células de tipo C (gris) se organizan en pequeñas agrupaciones asociadas a los *clusters* de neuroblastos. Las células endimiales (azul) forman una monocapa que separa el resto de células de la luz del ventrículo. A, neuroblasto. B1 y B2, subtipos celulares de astrocitos. C, célula precursora. E, endimocito (Modificado de Doetsch et al., 1997).

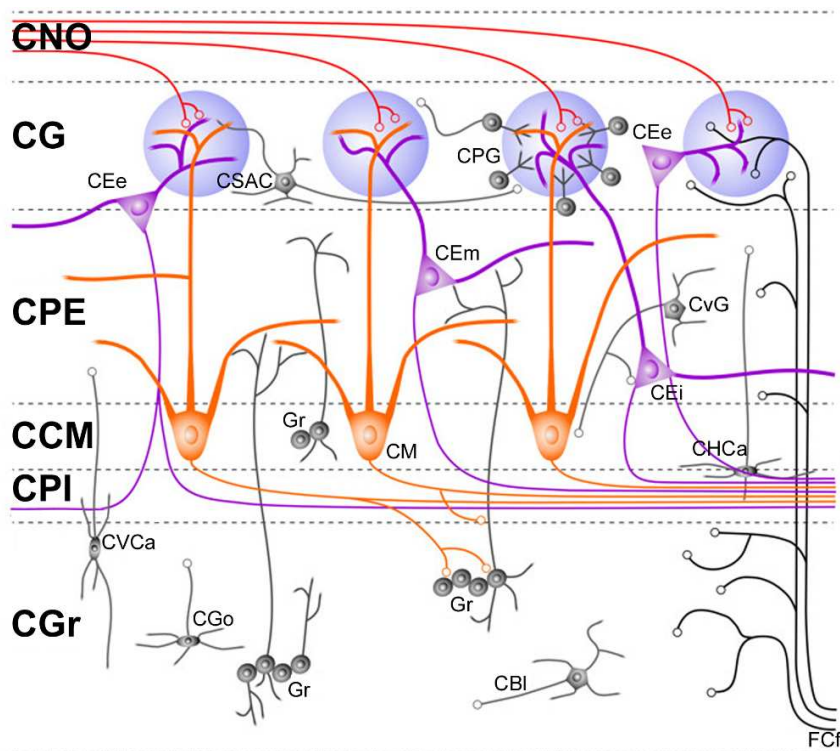
Características	Tipo A	Tipo B	Tipo C
Velocidad proliferación	Alta	Baja	Alta
Migración	Sí	No	No
Tuj1+	Sí	No	No
PSA-NCAM+	Sí	No	No
GFAP+	No	Sí	No
DCX+	Sí	No	No
Nestina+	Sí	Sí	Sí
Dlx2+	Sí	No	Sí
Vimentina+	No	Sí	No
S100+	No	Sí	No
EGF-R+	No	No	Sí
mCD24+	Sí	No	No

Tabla 2. Características de los tipos celulares mayoritarios del sistema ZSV-BO de roedores adultos.

Bulbo olfatorio principal: estructura y función

El BO principal es una estructura allocortical, de forma ovoide, que, en roedores, ocupa la porción más rostral del telencéfalo. Está organizado en capas concéntricas en las que se distribuyen sus tres elementos principales (esquema 2; Shepherd, 1972): fibras aferentes (axones de las neuronas receptoras olfatorias y axones centrifugos procedentes de otras áreas encefálicas), células de proyección (células mitrales y células empenachadas) e interneuronas locales (células periglomerulares, granos y células de axón corto, principalmente).

El BO constituye la primera estación de relevo de la vía olfatoria entre el medio externo y el sistema nervioso central (Ledó et al., 2005). Las moléculas odorantes interaccionan, en la mucosa olfatoria, con los receptores olfatorios, desencadenando un cambio en la frecuencia de descarga de los potenciales de acción de las neuronas receptoras olfatorias (Schild y Restrepo, 1998). Esta señal eléctrica se transmite a lo largo de los axones amielínicos que parten del polo basal de las neuronas receptoras y entran al BO formando la capa del nervio olfatorio (CNO), la capa más superficial (Ramón y Cajal, 1911; Shipley et al., 1996; Kratskin y Belluzzi, 2003).



Esquema 2. Localización y relaciones entre los diferentes tipos neuronales del bulbo olfatorio principal. CBI: célula de Blanes. CCM: capa de células mitrales. CEe: célula empenachada externa. CEm: célula empenachada media. CEi: célula empenachada interna. CNO: capa de fibras del nervio olfatorio. CG: capa glomerular. CGo: célula de Golgi. CGr: capa de los granos. CHCa: célula horizontal de Cajal. CM: célula mitral. CPE: capa plexiforme externa. CPG: célula periglomerular. CPI: capa plexiforme interna. CSAC: célula superficial de axón corto. CvG: célula de van Gehuchten. CVCa: célula vertical de Cajal. FCf: fibras centrifugas. Gr: grano. NO: nervio olfatorio. Esquema modificado de Puche, 2003 (<http://www.apuche.org/OIA/>).

Estos axones se arborizan en estructuras esféricas, delimitadas por células gliales, denominadas glomérulos, donde realizan contactos sinápticos excitatorios glutamatérgicos con las dendritas apicales de las neuronas de proyección, células mitrales y empenachadas, y con las de interneuronas denominadas genéricamente células yuxtglomerulares: células periglomerulares y empenachadas externas fundamentalmente (Shiplely et al., 1996; Kratskin y Belluzzi, 2003).

Las células periglomerulares constituyen una población de neuronas que interviene en el proceso de inhibición tanto intraglomerular como entre glomérulos próximos (Pinching, 1970; Pinching y Powell, 1971b; Shepherd, 1972; Puopolo y Belluzzi, 1998b; Aungst et al., 2003; Lledó et al., 2005). Estas células son de pequeño tamaño somático (5-8 μm de diámetro), tienen el soma redondeado y una arborización dendrítica muy elaborada, con abundantes gémulas en toda su extensión. Estas células pueden encuadrarse en dos tipos dependiendo de si reciben o no contactos de los

axones aferentes procedentes de las neuronas receptoras olfatorias: las de tipo 1 y las de tipo 2 respectivamente. Además, dentro de esta división hodológica se han descrito distintos subtipos neuroquímicos en función de la expresión de determinados marcadores (Kosaka et al., 1995, 1997, 1998; Kosaka y Kosaka, 2005a y b).

Las células periglomerulares realizan sinapsis recíprocas en los glomérulos con las dendritas apicales de las neuronas proyección, con otras células yuxtglomerulares y con los axones de las neuronas receptoras olfatorias. De esta manera modulan a las células principales, promueven su propia inhibición a través de las sinapsis recíprocas con las neuronas de proyección y reducen la tasa de excitación que conducen los terminales axónicos de las neuronas receptoras olfatorias (Pinching y Powell, 1971; Shipley y Ennis, 1996; Bischofberger y Jonas, 1997; Mori et al., 1999).

Las células superficiales de axón corto son algo mayores que las periglomerulares (8-12 μm de diámetro) y se sitúan en el límite de la capa glomerular (CG) con la capa plexiforme externa (CPE). Su soma presenta generalmente morfología ovoide y poseen varios troncos dendríticos que suelen surgir desde extremos opuestos del soma y que se ramifican en la periferia de varios glomérulos sin penetrar en su interior (Pinching y Powell, 1971a). Las células de axón corto son los principales elementos implicados en la conexión entre glomérulos. Esta modulación permite “limpiar” de ruido la señal olfatoria y aumentar el contraste entre glomérulos. (Aungst et al., 2003).

Por otro lado, las células empenachadas externas son células de mayor tamaño (10-15 μm de diámetro). Poseen de 1-3 dendritas apicales, normalmente una, que se arboriza en uno o varios glomérulos, presentan varicosidades en sus dendritas pero no espinas. Además poseen otras dendritas laterales que surgen desde el extremo opuesto del soma y se extienden por la capa plexiforme externa, localizada inmediatamente por debajo. Algunas de estas células proyectan su axón a glomérulos vecinos, y otras lo hacen a otras regiones bulbares, discurriendo por la capa plexiforme interna hasta llegar a regiones opuestas situadas a diferentes niveles rostro-caudales (Schöenfeld et al., 1985; Liu y Shipley, 1994, Shipley et al., 1995). Estas células empenachadas son las encargadas de activar a las células de axón corto que excitarían a las células periglomerulares de glomérulos vecinos que, por su parte, acabarían inhibiendo a las células de proyección con las que estuvieran en contacto. De esta manera, se impediría la transmisión de la señal en los glomérulos vecinos, estableciéndose un patrón de inhibición glomerular que se ha denominado centro-periferia (Aungst et al., 2003).

Además del proceso modulador que tiene lugar en las capas superficiales del BO, la señal olfatoria sufre otro proceso modulador en las capas más internas del BO que, en este caso, corre a cargo fundamentalmente de los granos. Éstos se disponen en la capa de los granos (CGr) que es la capa más extensa del BO. Son interneuronas inhibitorias de pequeño tamaño (8-10 μm de diámetro) que carecen de axón (Price y Powell, 1970b). La dendrita apical puede dividirse en un segmento sin ramificar, que constituye la parte proximal al soma, y otro segmento, distal, intensamente ramificado. El segmento basal recibe *inputs* axodendríticos glutamatérgicos por parte de colaterales axónicas de las neuronas de proyección, mientras que en el dominio distal tienen lugar sinapsis dendrodendríticas recíprocas con dendritas de las células de proyección. En estas sinapsis, las dendritas de los granos reciben *inputs* glutamatérgicos por parte de las dendritas de las neuronas de proyección y ellas, por su parte, liberan GABA sobre esas neuronas de proyección. La activación de las sinapsis axodendríticas del dominio basal excita de forma global a los granos y facilita la inhibición recurrente dendrodendrítica en el dominio distal (Jahr y Nicoll, 1982; Woolf et al., 1991). En la capa de los granos (CGr) existe una cierta segregación laminar, ya que la mayoría de las células situadas profundamente contactarán sinápticamente con dendritas (de células mitrales y empenachadas) localizadas en la parte más profunda de la CPE, mientras que las localizadas en la parte superficial lo harán con las situadas en las porciones más superficiales de la misma capa (Mori et al., 1983; Orona et al., 1983; Scott, 1987). Este sistema origina mecanismos de inhibición lateral, ya que, las neuronas de proyección también reciben inhibición lateral de granos activados por otras células de proyección vecinas (Rall et al., 1966; Isaacson y Strowbridge, 1998; Margrie et al., 2001). Gracias a esto se consigue incrementar la discriminación entre moléculas odorantes (Finger y Silver, 1987; Halász, 1990; Shipley et al., 1995; Shipley y Ennis, 1996).

En la capa de los granos también se ha descrito la presencia de otros tipos celulares de morfología y localización variables: las células horizontales y verticales de Cajal, cuyas dendritas se extienden por la capa de células mitrales (CCM), capa plexiforme interna (IPL) y EPL, y las células de Blanes y las células de Golgi, cuyas dendritas están restringidas principalmente a la CGr (Schneider y Macrides, 1978). Aunque se trata de una población bastante heterogénea de interneuronas, clásicamente se ha descrito que, en conjunto, promueven la inhibición de los granos (Price y Powell, 1970a).

Además del complejo circuito intrabulbar establecido por interacciones entre los diferentes elementos intrínsecos (Brunjes, 1994), la modulación y posterior transmisión de la señal olfatoria están también reguladas por las interacciones entre aferencias centrífugas, que llegan al BO desde otras regiones del encéfalo, y los distintos elementos bulbares (Shipley et al., 1996). Estas aferencias muestran cierto grado de organización anatómica y de heterogeneidad neuroquímica. Probablemente poseen características tónicas (Paolini y McKenzie, 1997) y podrían influir eficazmente en el procesamiento bulbar, modulando la actividad de las interneuronas locales (Linster y Gervais, 1996; Linster y Hasselmo, 1997).

Una vez que ha tenido lugar el procesado inicial de la sensación olfatoria, ésta se transmite a través de los axones de las células de proyección por el denominado tracto olfatorio lateral (Switzer et al., 1985; Shipley et al., 1995) a diversas regiones del SNC.

Células de nueva generación del bulbo olfatorio

Estudios cuantitativos han determinado una velocidad de producción basal de células de nueva generación de 30.000 células por día y por BO, lo que representa el 1% de la población total de granos del BO (Peterson, 2002). Aunque las estimaciones son mayores de lo que en un principio se pensaba, la velocidad de producción de neuronas en el adulto es notablemente inferior que la que tiene lugar durante el desarrollo.

Si las propiedades de las células de reciente generación fueran similares a las generadas durante el desarrollo embrionario, entonces el proceso neurogénico en estado adulto podría considerarse insignificante, pero estudios recientes apuntan a que las células generadas en el cerebro adulto presentan propiedades únicas. Estas células muestran características especiales de membrana que se traducen en una elevada excitabilidad (Carleton et al., 2003) y una mayor sensibilidad en respuesta a privación sensorial (Saghatelyan et al., 2005). Estas características hacen que aumente el impacto relativo sobre las neuronas preexistentes y por tanto sobre los circuitos funcionales previamente establecidos (Kempermann, 2002). Aunque la neurogénesis es un proceso activo en el adulto, estudios cuantitativos demuestran que solamente la mitad de las células de nueva generación sobrevive. El 50% de estas neuronas muere unas semanas después de haber alcanzado su estado maduro (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002; Winner et al., 2002). Se desconoce si este tiempo de supervivencia es suficiente para que esas células jueguen un papel significativo en la función del BO. Para entender el papel del reemplazo neuronal en el cerebro adulto debemos tener en cuenta que la mitad de las células de nueva generación son

transitorias y estarán llevando a cabo un proceso aun por determinar (Lledo y Lazarini, 2007).

Los dos tipos principales de neuronas a las que dan lugar las células de nueva generación producidas en el adulto son: granos y células periglomerulares (Merkle et al., 2007). De entre las células periglomerulares de nueva generación se pueden distinguir tres subpoblaciones de células diferenciadas: células calretinina (CR) positivas, células calbindina D-28k (CB) positivas y células dopaminérgicas (Kosaka et al., 1995). Entre los granos, la mayor parte de los cuales son GABA positivos, se diferencian granos profundos y granos superficiales (Price y Powell, 1987; Jacobowitz y Winsky, 1991). Estos subtipos celulares se cree que tienen diferentes funciones en el BO y todos ellos se generan de forma continua durante la vida adulta y, aproximadamente, en las mismas proporciones que con respecto al total de células del BO (Whitman y Greer, 2007).

Por otra parte, estudios recientes demuestran la generación de otros tipos interneuronales, principalmente en la CPE pero también en la CGr, como células de axón corto y células de Van Gehuchten (Yang, 2008). Todo parece indicar que las células derivadas de la ZSV pueden dar lugar, virtualmente, a todas las subpoblaciones de interneuronas del BO tanto a edades tempranas como en el adulto. Los datos cuantitativos referidos a las proporciones relativas de cada uno de los tipos celulares generados son muy variables en la bibliografía consultada. Estos datos varían dependiendo de la edad y la especie del animal de experimentación, del tiempo de supervivencia y sobre todo de la localización en la ZSV de los precursores de los neuroblastos que alcanzarán el BO. Se ha comprobado que existe una organización en mosaico de las células madre neurales localizadas en la ZSV. Dependiendo de la situación de estas células, los neuroblastos generados a partir de ellas se diferenciarán a un tipo u otro de población interneuronal (Merkle et al., 2007). Las regiones anteriores y dorsales generan la mayor parte de las células periglomerulares. Los subtipos neuroquímicos de estas células también se producen de forma mayoritaria en lugares específicos de la ZSV. Con los granos ocurre algo similar. Las regiones más dorsales tienden a producir granos superficiales, mientras que las regiones más ventrales producen granos profundos (Merkle et al., 2007). Hasta el momento no se ha determinado la región de procedencia del resto de interneuronas de la CGr y de la EPL.

En la rata, las células generadas en la ZSV tardan aproximadamente de una semana a 10 días en llegar a las diferentes capas del BO. La complejidad morfológica de

estas células aumenta durante las primeras semanas a partir de su generación. Entre la segunda y tercera semana, los granos muestran una estructura morfológica totalmente madura, sin embargo, las células periglomerulares tardan alrededor de cuatro semanas en desarrollar su estructura dendrítica y axonal completa (Belluzzi et al., 2003). En el caso de las células periglomerulares, la capacidad de generar potenciales de acción se desarrolla antes de que estas células establezcan contactos sinápticos. Los granos, sin embargo, establecen primero los contactos sinápticos y después desarrollan la capacidad de generar potenciales de acción (Belluzzi et al., 2003; Carleton et al., 2003).

Estas diferencias sugieren un patrón de integración funcional específico de cada tipo celular cuyo significado es todavía desconocido. Las células grano del BO desarrollan sus sitios pre y postsinápticos de forma secuencial en los diferentes dominios dendríticos. El desarrollo de las sinapsis glutamatérgicas del dominio proximal precede al desarrollo de los *inputs* dendrodendríticos que se encuentran en las porciones dendríticas distales. Esto sugiere que las células de nueva generación primero desarrollan las sinapsis que puedan controlar su excitación antes del desarrollo de las sinapsis que median la inhibición recurrente dentro del BO. La adquisición secuencial de los *inputs* proximales axodendríticos antes de los *inputs* y *outputs* dendrodendríticos distales podría dar lugar a una forma única de plasticidad en los granos generados durante la etapa adulta, no presente durante la formación de los circuitos iniciales.

Algunos autores han caracterizado las neuronas de nueva generación en función de determinados criterios fisiológicos. Dos semanas después de la generación de las nuevas neuronas ya existen subpoblaciones que presentan distintas propiedades eléctricas, lo que sugiere que tienen papeles específicos dentro del BO (Belluzzi et al., 2003). Otros autores han hecho una clasificación morfológica en función de los días transcurridos a partir de la división de la célula madre (tabla 3). Aún así parece existir cierta relación entre ambos criterios, ya que se ha comprobado que las propiedades eléctricas de las células van modificándose en función del tiempo transcurrido desde su generación (Carleton et al., 2003).






TIPO CELULAR	CARACTERÍSTICAS	Tº DE APARICIÓN EN EL BO	MORFOLOGÍA
Clase 1	Presentan un cuerpo celular elongado con un proceso prominente terminado en un gran cono de crecimiento.	5 Días	
Clase 2	Poseen un proceso principal o anterior y otro posterior, ambos más largos que en el caso de las de clase 1. El proceso anterior está frecuentemente ramificado y presentan cono de crecimiento, pero menos prominente que las de clase 1	7 Días	
Clase 3	Presentan un cuerpo celular redondeado con un solo proceso apical que se extiende hacia la EPL. Además, tienen neuritas basales en desarrollo. Poseen formaciones equiparables a espinas tanto en el soma como en las dendritas basales.	9 Días	
Clase 4	Poseen un árbol dendrítico apical más ramificado que las de clase 3 y comienzan a aparecer las primeras espinas	11 Días	
Clase 5	Presentan un árbol dendrítico apical muy elaborado con alta densidad de espinas.	15 Días	

Tabla 3. Estadios de maduración de los granos de nueva generación del BO en función de criterios morfológicos (Modificado de Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002).

MECANISMOS DE MIGRACIÓN CELULAR

Una de las características de las células originadas en los procesos neurogénicos que tienen lugar en el SNC es su habilidad para migrar desde los lugares de origen, en las zonas germinales, hasta sus posiciones finales. La migración celular juega un papel esencial en la formación de tejidos durante el desarrollo embrionario. En organismos multicelulares se requieren elaborados patrones de movimiento celular para llegar a formar sus complejas estructuras. El cerebro es, indudablemente, el órgano más complejo, y su extraordinario grado de organización refleja la complejidad de los movimientos migratorios requeridos para generarlo. Por ello, defectos en la migración neuronal durante el desarrollo del cerebro dan como resultado toda una serie de alteraciones que conducen a déficits de muy diverso tipo y que van desde ligeras dificultades en el aprendizaje hasta malformaciones severas que conducen a la inviabilidad del embrión (Gleeson y Walsh, 2000; Lamber de Rouwroit y Goffinet, 2001; Ross y Walsh, 2001).

En general existen dos tipos de migración atendiendo a la orientación del movimiento de la célula en relación a la superficie pial (Rakic, 1990): migración tangencial y radial; y tres tipos dependiendo de los sustratos requeridos para el movimiento: migración gliofílica, neuronofílica y homofílica (Rakic, 1990; Wichterle et al., 1997; Hatten, 1999; Menezes et al., 2002). En el caso de la migración gliofílica y la neurofílica el sustrato requerido para el movimiento lo forman células gliales y neuronas u axones respectivamente, mientras que en el caso de la migración homofílica los neuroblastos se utilizan unos a otros como sustrato para moverse formando largas cadenas.

Migración radial

La primera noción de organización radial en el SNC se encontró en el hecho de que existe cierta relación entre la zona ventricular del tubo neural y la superficie pial. (Nieuwenhuys et al., 1998). Durante el desarrollo embrionario la glía radial forma una especie de soporte o andamiaje físico que pone en contacto la zona ventricular con la superficie pial, actuando así de guía para aquellos neuroblastos que están migrando hasta sus destinos finales (Rakic, 1972). Cada una de las células de glía radial posee un cuerpo celular localizado en la zona ventricular y un elaborado proceso que se extiende a través de la pared del tubo neural hasta alcanzar la superficie pial donde se ancla a la membrana basal (Ramón y Cajal, 1911; Gadisseux et al., 1989; Schmechel y Rakic, 1979).

Estas células no son sólo meros elementos estáticos de soporte, si no que son componentes dinámicos del desarrollo cortical ya que son capaces de sufrir mitosis y originar neuronas, representando, por tanto, un estadio intermedio en el linaje de células madre del SNC (Heins et al., 2002; Malatesta et al., 2000; Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2001, 2002). Una vez que cesa la producción neuronal, las células de glía radial retraen sus procesos y acaban diferenciándose a astrocitos (Ramón y Cajal, 1911; Schmechel y Rakic, 1979; Gaiano et al., 2000).

La migración radial ha sido extensamente estudiada durante la corticogénesis. En este proceso se han descrito 2 tipos de movimiento que pueden ser dependientes o no de la glía radial (Nadarajah et al., 2001; Tabata y Nakajima, 2003). El primer tipo de movimiento es el que tiene lugar durante los estadios más tempranos del desarrollo cortical, la **translocación nuclear**. En este caso las células emiten un proceso, orientado radialmente hacia la superficie pial, y comienzan a desplazar el soma en esa misma dirección, acortándose el proceso, de forma progresiva e independiente de glía, hasta que el soma alcanza la posición de destino, momento en el que se desconecta de la lámina basal (Nadarajah et al., 2001; Tamamaki et al., 2001). Este movimiento se caracteriza por un avance continuo, lo que resulta en una velocidad de migración relativamente elevada, y en cualquier caso, mayor que en el resto de casos (Nadarajah y Parnavelas, 2002).

El segundo tipo de migración se denomina **locomoción**, en este caso se trata de un movimiento gliofílico. Las células que adoptan este tipo de migración poseen un proceso radial más corto que en el caso anterior, de modo que no llega a alcanzar la superficie pial. Además, muestra patrones saltatorios de locomoción, movimientos rápidos y cortos seguidos de fases estacionarias relativamente largas (Nadarajah et al., 2001). Estos movimientos resultan en velocidades medias más bajas y tiene lugar durante los estadios más tardíos del desarrollo cortical (Nadarajah et al., 2001). Estudios recientes en los que se han usado imágenes a tiempo real de cultivos organotípicos han demostrado que las neuronas que migran radialmente mediante locomoción atraviesan distintas fases caracterizadas por cambios bruscos en la forma celular, la dirección del movimiento y la velocidad de migración (Tabata y Nakajima, 2003; Noctor et al., 2004). Una vez que estas células salen de la zona ventricular sufren una pausa en la que adoptan morfologías multipolares, estado altamente dinámico, durante el cual extienden y retraen sus procesos y se mueven en diversas direcciones, pudiendo incluso a hacerlo tangencialmente (Tabata y Nakajima, 2003). Algunas de

estas células pueden extender incluso, de forma transitoria, un proceso hacia el ventrículo y traslocar el cuerpo celular en esa dirección antes de moverse de forma definitiva, cambiando completamente su polaridad, hacia la superficie pial (Noctor et al., 2004).

Migración tangencial

En algunos casos las células que están migrando se dispersan siguiendo un patrón de movimiento no radial, si no paralelo a la superficie pial (Stensaas, 1967; Altman, 1969; Rakic y Sidman, 1969; Morest, 1970; Shoukimas y Hinds, 1978; Price y Thurlow, 1988; Austin y Cepko, 1990; O'Rourke et al., 1992). La migración tangencial engloba distintos tipos de movimiento dependiendo del sustrato utilizado por los neuroblastos migrantes.

Existen algunas neuronas que, desplazándose tangencialmente, no siguen ningún sustrato celular específico y se dispersan de forma individual, como por ejemplo los neuroblastos que viajan desde el subpallio embrionario a la corteza cerebral y al hipocampo (De Carlos et al, 1996; Corbin et al., 2001; Wichterle et al., 1999; Pleasure et al., 2000; Marín y Rubenstein 2001; Letinic et al., 2002). A pesar de no estar guiadas por ningún sustrato celular, estas células se mueven a través de rutas restringidas de migración (DeDiego et al., 1994; Lavdas et al., 1999; Marín et al., 2001). Otras células son capaces de migrar tangencialmente siguiendo axones en crecimiento hasta llegar hasta sus destinos finales (Wray, 2001). Un ejemplo lo constituyen las neuronas que expresan la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que migran durante el desarrollo embrionario desde la placoda nasal, siguiendo el crecimiento de los axones vomeronasales, hasta llegar al cerebro (Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989; Wray et al., 1989). El último tipo de migración tangencial es la migración homofílica. Este tipo de desplazamiento es el que tiene lugar durante el desarrollo postnatal del BO y será desarrollado de forma más amplia en el siguiente apartado.

MIGRACIÓN CELULAR EN LA CMR Y BO

Durante el desarrollo embrionario, las interneuronas olfatorias no se generan de forma intrínseca en el BO, si no que proceden de progenitores celulares localizados en el subpallio y posteriormente se desplazan tangencialmente hasta alcanzar sus destinos finales (Altman, 1969; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993). Lo mismo ocurre durante el desarrollo postnatal, donde los precursores de las interneuronas olfatorias

se localizan en la ZSV y a continuación migran, primero tangencialmente y después radialmente, hasta alcanzar sus posiciones finales y diferenciarse en el BO (Altman, 1969; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993).

Como ya hemos mencionado anteriormente, la migración tangencial de los precursores interneuronales transcurre a través de una ruta restringida de migración conocida como CMR (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Kornack y Rakic, 2001). Este desplazamiento de los precursores neuronales a través de la CMR se ha denominado migración en cadena y se ha descrito como de tipo tangencial homofílica. En este viaje, los precursores neuronales se mueven estrechamente asociados unos a otros formando una especie de cadenas (figura 1), lo cual sugiere que las interacciones entre los propios neuroblastos son importantes para este tipo de migración. Las cadenas formadas por los neuroblastos están rodeadas por una malla constituida por procesos de astrocitos con características muy peculiares (figura 1; Jankovski y Sotelo, 1996; Lois et al, 1996; Thomas et al., 1996; Peretto et al., 1997). La existencia de estos tubos gliales parece cumplir una función imprescindible *in vivo*, aunque *in vitro* se ha comprobado que los neuroblastos son capaces de migrar en ausencia de estos tubos astrocitarios (Wichterle et al., 1997). Se ha propuesto que la función de estas células gliales sea la de establecer una especie de barrera con el resto de sistema nervioso para proporcionar un medio permisivo con características particulares y, por otra parte, dirigir las células hacia el BO, evitando su dispersión (Lois et al., 1996; Yamashita et al., 1997). Además, se cree que pueden tener la capacidad de inducir la proliferación a través de contactos célula-célula (Menezes et al., 2002) y se piensa que pueden estar implicados en la regulación de la velocidad de migración (Luskin, 1993; Lois et al., 1996).

Las células que se originan en la ZSV adulta son capaces de migrar una larga distancia hacia el BO (Luskin, 1993; Lois y Álvarez-Buylla, 1994). Se ha estimado que, en el ratón, los neuroblastos tardan en alcanzar el BO desde la ZSV entre 5 y 7 días (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002). Además de migrar, los progenitores neuronales se detienen ocasionalmente para dividirse, sufriendo rondas sucesivas de entrada y salida del ciclo celular. El número de células en división parece disminuir desde la ZSV hasta las regiones de la CMR más cercanas al BO (Smith y Luskin, 1998; Coskun y Luskin, 2002).

Aunque los mecanismos de migración tangencial han sido estudiados de forma extensa, los factores que la controlan son todavía, en gran medida, desconocidos. Este tipo de migración parece no ser dependiente del nivel de actividad existente en el BO

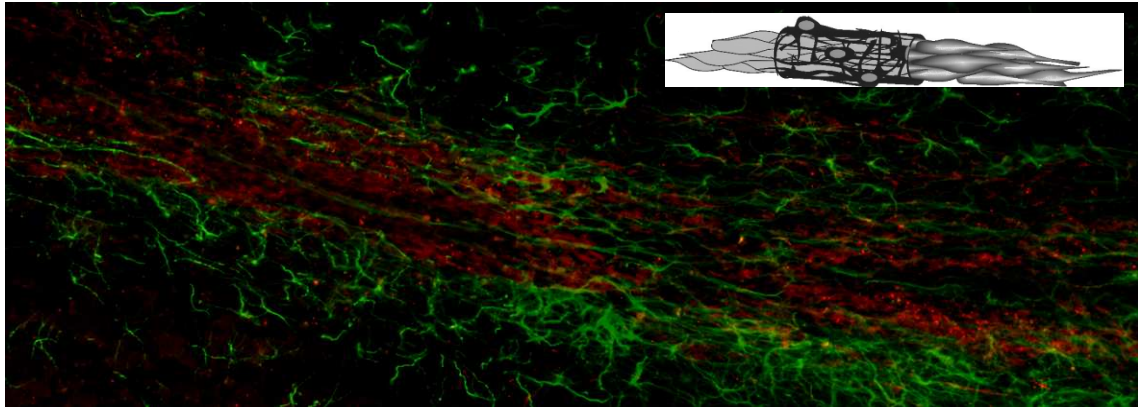


Figura 1. Fotomicrografía de una sección parasagital del cerebro de rata a nivel de la CMR donde se ha llevado a cabo la detección inmunohistoquímica de doblecortina (rojo) y GFAP (verde). Los neuroblastos (rojo) forman largas cadenas que aparecen rodeadas por astrocitos (verdes), tal y como se puede ver en el esquema situado arriba a la derecha. CMR, corriente migratoria rostral; GFAP, proteína ácida fibrilar glial.

ya que la falta de estímulo olfatorio no parece afectarla (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002; Yamaguchi y Mori, 2005). De hecho, aunque se interrumpa la conexión entre el BO y el resto del encéfalo o, incluso, se elimine el BO, los precursores de la CMR siguen realizando la migración tangencial (Jankovski et al., 1998; Kirschenbaum et al., 1999).

Uno de los factores que parece jugar un papel importante en el proceso de migración en cadena es la proteína PSA-NCAM, uno de los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas que media interacciones homo y heterotípicas entre células (Cremer et al., 1994; Hu et al., 1996; Chazal et al., 2000). Sin embargo, aunque importante, no es esencial, ya que si se elimina su expresión la migración desde los ventrículos laterales al BO sigue teniendo lugar. No obstante, en ausencia de PSA-NCAM la migración en cadenas hacia el BO se ve dificultada, apareciendo incluso precursores que migran aislados (Chazal et al., 2000). Existen muchas otras moléculas implicadas en diferentes aspectos del proceso de migración como ciertas efrinas (Conover et al., 2000; Anton et al., 2004), netrinas (Murase y Horwitz, 2002), slit y Robo (Wu et al., 1999; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004).

Se cree que la reorientación de la migración (cambio de migración tangencial a migración radial), que tiene lugar a la llegada de los neuroblastos al centro del BO, está de alguna forma orquestada por un gradiente de señales extracelulares que rodean a la CMR (Saghatelyan et al., 2004). Así se han descrito varias proteínas de matriz extracelular relacionadas con el cambio de orientación sufrido por los neuroblastos al alcanzar el BO. Una de ellas es la reelina, una glicoproteína de elevado peso molecular (400 kDa) sintetizada fundamentalmente por las células mitrales, aunque su expresión

se ha detectado en todas las capas del BO excepto en la Sustancia Blanca Periependimaria (SBPE) (Hack et al., 2002; Pappas et al., 2003). Se cree que esta proteína induce la separación de los progenitores neuronales, que se mueven tangencialmente, de las cadenas por las que vienen migrando (Hack et al., 2002). Este papel de la reelina es compartido por otra proteína de matriz extracelular, la tenascina-R. Esta molécula se expresa en la CGr y la CPI del BO y se ha demostrado que actúa de igual modo en el BO, pero mientras que el papel de la reelina sería únicamente el de provocar la separación de los neuroblastos de la CMR, el de la tenascina-R sería, además, el de actuar como una señal direccional que hace que éstos cambien de orientación e inicien la migración radial (Saghatelian et al., 2004). Existe otra molécula, la proquinetina 2 que tiene efectos similares a la tenascina-R sobre las células de la CMR. Esta molécula se expresa en la CGr y en la CG y su falta de expresión provoca que se acumulen células en la entrada del BO debido a la imposibilidad de realizar la migración radial (Ng et al., 2005).

No se conoce mucho acerca de la migración radial de los precursores de interneuronas en el BO adulto. Estudios recientes indican que los neuroblastos pueden usar los vasos sanguíneos como andamiaje para lograr sus posiciones finales en el BO, por lo que podría tratarse de un nuevo tipo de migración: migración vasofílica (Bovetti et al., 2007). En este tipo de migración parece que las células se mueven de forma saltatoria, con periodos de alta velocidad seguidos de fases con movimientos lentos (Bovetti et al., 2007). Otro de los pocos datos de que disponemos es que se sabe que diversas capas del BO tienen una actividad quimioatractiva sobre las células de la CMR. En concreto, se ha comprobado *in vitro* para la CG, la CCM (con parte de la CPE y CPI) y la CGr (Liu y Rao, 2003). Los resultados sugieren que mientras que la CG y la CCM tienen efectos atrayentes sobre las células de la CMR, la CGr no ejerce este efecto. Sin embargo, no se han identificado las sustancias concretas que, secretadas en estas capas, producen esta atracción.

Desarrollo embrionario vs. Desarrollo postnatal

Existen algunas diferencias entre los procesos neurogénicos que tienen lugar durante etapas embrionarias y etapas postnatales o adultas.

En primer lugar, el número absoluto de células madre en el SNC adulto es relativamente bajo en relación con el número total de células, a diferencia de lo que ocurre durante el desarrollo embrionario. Además, estas células en el cerebro adulto están restringidas a los denominados nichos neurogénicos donde se mantiene un

microambiente separado, especializado y exquisitamente regulado que, bien es cierto, recuerda al ambiente embrionario (Lim et al., 2000; Stump et al., 2002; Conover y Allen, 2002; Lai et al., 2003).

En segundo lugar, la neurogénesis en la etapa adulta presenta un desarrollo temporal más largo que el proceso de maduración neuronal de progenitores embrionarios. Por ejemplo, el desarrollo dendrítico de las células grano del giro dentado del hipocampo se extiende durante 4 semanas y la formación y maduración de espinas dendríticas continúa durante 8 semanas después de la generación de la célula, mientras que estos mismos procesos ocurren en 2 semanas durante el desarrollo embrionario temprano del hipocampo (Ge et al., 2006; Zhao et al., 2006). El significado fisiológico del bajo *tempo* del desarrollo neuronal en el cerebro adulto aun no está suficientemente entendido.

En tercer lugar, los procesos de migración tangencial y radial que tienen lugar en el SNC adulto muestran características que los diferencian de los embrionarios. Las células que migran tangencialmente a través de la CMR migran distancias mucho más largas que las recorridas por progenitores prenatales. Lo hacen gracias a un tipo único de migración que, como ya hemos descrito en apartados anteriores, se denomina homofílica (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Kornack y Rakic, 2001). Estas células se encuentran en estrecha asociación unas con otras a diferencia de lo que ocurre con las interneuronas olfatorias embrionarias. Estas últimas migran menos asociadas unas a otras y no forman las cadenas características que podemos observar durante la migración tangencial adulta (Hu y Rutishauser, 1996; Lois y Álvarez-Buylla, 1996). La migración radial que tiene lugar una vez los neuroblastos alcanzan el BO, a diferencia de lo que ocurre durante el desarrollo embrionario, tiene lugar en ausencia total de glía radial, y como hemos comentado con anterioridad, se especula acerca de si los vasos sanguíneos juegan el papel de andamiaje equivalente al aportado por la glía radial en el estadio embrionario (Bovetti et al., 2007).

Por último, los neuroblastos de la ZSV adulta son capaces de proliferar a la vez que están migrando, sufriendo rondas sucesivas de entrada y salida del ciclo celular durante su desplazamiento (Smith y Luskin, 1998; Coskun y Luskin, 2002), a diferencia de lo que ocurre con el resto de células migrantes que son consideradas, todas ellas, postmitóticas (Thomas et al., 1996).

ALTERACIONES EN LA MIGRACIÓN CELULAR: LISENCEFALIAS

El proceso de migración de los progenitores neuronales está estrechamente regulado ya que es un proceso esencial para la correcta función cerebral. Defectos en la migración neuronal se asocian a un gran número de malformaciones que llevan acarreada desde la inviabilidad del individuo hasta toda una serie de desórdenes cognitivos de muy diversos tipos. En los últimos años ha tenido lugar un notable incremento en el conocimiento de los genes que participan en el proceso de migración neuronal. No obstante, aún quedan muchos aspectos por desentrañar para conocer cómo los productos de esos genes interaccionan para desencadenar los mecanismos de transducción que llevan las señales desde la membrana plasmática hasta el citoesqueleto en el proceso migratorio (Walsh, 2000). El hecho de que estos mecanismos sean compartidos por numerosos grupos animales y que la alteración de esas señales de transducción sean un denominador común entre los desórdenes de la migración neuronal de diversos grupos animales y humanos (Walsh, 2000) ha hecho que en los últimos años se haya incrementado notablemente el estudio de estos genes reguladores de la migración y de sus productos en diferentes grupos animales, fundamentalmente roedores.

Como aproximación al conocimiento de los procesos de migración neuronal se ha estudiado un grupo de desórdenes humanos cuyo sustrato se asienta en determinados tipos de alteraciones de la migración neuronal y que son conocidos de forma genérica con el nombre de lisencefalias. Los pacientes que sufren estas alteraciones presentan una superficie cerebral lisa o prácticamente lisa, sin circunvoluciones. Por otro lado, presentan una corteza cerebral reducida en grosor y/o con anomalías en el patrón de laminación, además de mostrar heterotopía neuronal difusa. Todas estas anomalías cerebrales van asociadas a dificultades en el aprendizaje, grados variables de retraso mental y crisis epilépticas recurrentes y, en muchos casos, intratables (Kato y Dobyns, 2003; Gressens, 2006).

La genética molecular ha permitido la identificación de varios genes que son críticos para el correcto desarrollo del proceso de migración neuronal. Hasta el momento se han descrito cinco, relacionados todos ellos con el desarrollo de estas enfermedades (Kato y Dobyns, 2003). Estos genes codifican proteínas que se cree que están implicadas en las cascadas de señalización que posibilitan la regulación del proceso de migración neuronal. El papel de éstas dista mucho de ser conocido por

completo, pero existen contribuciones que han aportado datos que suponen una mejora en la comprensión de los roles que cumplen en el proceso de migración, fundamentalmente durante el desarrollo embrionario.

El primero de estos genes es el gen *Lis1* o *pafah1b1*. Mutaciones en este gen, localizado en el cromosoma 17, constituyen la causa principal de lisencefalias en humanos (Reiner et al., 1993). La mayor parte de los pacientes afectados poseen deleciones en heterocigosis, causando un síndrome de anomalías múltiples congénitas conocido con el nombre de síndrome de Miller-Dieker (Dobyns et al., 1993). También se han descrito mutaciones puntuales que producen fenotipos similares (Lo Nigro et al., 1997). Anatómicamente estos desórdenes se ven reflejados en la estructura de la corteza cerebral y del hipocampo y, en menor medida, del cerebelo (Dobyns et al., 1993). La proteína producto de este gen, LIS1, se expresa tanto en el cerebro fetal como en el adulto. Es una proteína altamente conservada entre humanos y roedores, incluso conserva el 42% de homología con su proteína ortóloga (NudF) en *Aspergillus nidulans* (Xiang et al., 1995). Se ha descrito que participa en la nucleocinesis mediada por dineína, en la translocación somática, la motilidad celular y la segregación cromosómica que tiene lugar durante la mitosis (Faulkner et al., 2000). Ratones mutantes que pierden uno de los alelos del gen *Lis1* muestran defectos en el desarrollo cortical, pero mucho menos severos que los observados en humanos. La pérdida de los dos alelos es letal en estadios embrionarios tempranos (Hirotsume et al., 1998).

Otro de los genes implicados es *14-3-3ε*, perteneciente a la familia de proteínas 14-3-3 que se unen a motivos de fosfo-serina y fosfo-treonina de otras proteínas. Está localizado en el cromosoma 17 y codifica una proteína altamente conservada. Su función parece ser importante durante el proceso de migración por su relación con la función de la dineína citoplasmática (Kato y Dobyns, 2003).

El gen *Reln* también se encuentra mutado en algunos pacientes que presentan lisencefalias. Este gen codifica la proteína reelina, a la que hemos hecho referencia en apartados anteriores. Mutaciones en este gen se corresponden con el fenotipo que posteriormente se denominó *reeler*, un ratón mutante que presenta un patrón anormal de laminación cortical y defectos en el posicionamiento neuronal en otras regiones encefálicas como el cerebelo (D'arcangelo et al., 1995; Hirotsume et al., 1995). La reelina, es una proteína de más de 3600 aminoácidos secretada al espacio extracelular y, aunque se ha demostrado que cumple un papel importante en la migración celular, su mecanismo de actuación aun no ha sido completamente dilucidado.

Otro de los genes relacionados con estos síndromes es *Arx*. Este gen es el homólogo al gen *al* (*aristalless*) de *Drosophila* (Miura et al., 1997). Está localizado en el cromosoma X y codifica una proteína de más de 550 aminoácidos que se expresa de forma específica en interneuronas cerebrales (Miura et al., 1997; Kitamura et al., 2002). Su función está relacionada con la proliferación y diferenciación de los precursores neurales y la migración tangencial de las interneuronas (Kitamura et al., 2002).

Finalmente, otro gen relacionado con estos síndromes humanos es el gen *Dcx*. Está localizado en el cromosoma X y codifica una proteína de unión a microtúbulos conocida con el nombre de DCX (Des Portes et al., 1998; Gleeson et al., 1998). Dada la alta implicación en los procesos de migración neuronal y el hecho de haber sido profundamente estudiada, en el siguiente apartado desarrollaremos más ampliamente sus características, así como los datos más actuales en relación con sus posibles funciones en diferentes fases de la neurogénesis.

Doblecortina

El gen *Dcx* fue identificado a finales de la década de los noventa por ser el responsable del síndrome humano denominado lisencefalia asociada al cromosoma X (Des Portes et al., 1998; Gleeson et al., 1998). Los machos afectados muestran una forma grave, y letal, de lisencefalia. Las hembras tienen una corteza cerebral aparentemente normal, pero bajo la sustancia gris aparece una banda de sustancia blanca, bajo la cual, a su vez, vuelve a aparecer otra banda de sustancia gris que cubre el resto de sustancia blanca. De ahí que a esta malformación se le haya dado el nombre de heterotopía de la banda subcortical o síndrome de corteza doble (Corbo et al., 2002).

La DCX es una proteína específica de neuronas, no habiéndose detectado en células gliales (Rao y Shetty, 2004). Se expresa en los cuerpos celulares y en los procesos de células que están migrando, tanto en orientación tangencial como en orientación radial, e incluso en células en proceso de diferenciación temprana (Des Portes et al., 1998; Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999; Couillard-Després et al., 2001). Rara vez se ha encontrado en neuronas que presentan morfología de célula diferenciada, esto sólo se ha observado en la corteza piriforme y en la CG y CGr del BO (Nacher et al., 2001). Su expresión comienza en el momento en que son generados los neuroblastos, alcanzando su pico máximo de expresión alrededor de la segunda semana de vida de la célula, para, posteriormente perderse de forma progresiva hasta hacerse prácticamente indetectable a los dos meses (Brown et al., 2003; Couillard-Després et al., 2005).

La DCX es una proteína básica, de 40 kDa de peso molecular, constituida por 361 aminoácidos (Brown et al., 2003; Moores et al., 2003). Es capaz de unirse de forma directa a los microtúbulos, estabilizándolos (Horesh et al., 1999; Moores et al., 2003). Se la considera por ello una MAP (proteína asociada a microtúbulos), aunque no presenta la mayor parte de las secuencias conservadas de unión a microtúbulos características de esta familia de proteínas. En este caso, se sabe que se une a ellos por medio de secuencias cortas repetitivas de aminoácidos situadas en su extremo amino terminal (Horesh et al., 1999). Estos dominios de unión se han denominado dominios DCX y también están presentes en otras proteínas que se unen a microtúbulos (Gönczy et al., 2001). Se considera que su unión está regulada negativamente mediante fosforilación (Horesh et al., 1999). Presenta varios sitios de fosforilación, uno de ellos es un sitio Abl para una tirosina cinasa y existen otros cuatro sitios reconocidos por MAP-cinasas (Gleeson et al., 1998). Análisis bioquímicos han demostrado que la DCX no sólo se encarga de estabilizar los microtúbulos, si no que también participa activamente potenciando tanto la polimerización de la tubulina como el ensamblaje que da lugar al microtúbulo (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999; Horesh et al., 1999; Moores et al., 2003; Tsukada et al., 2005). Se considera una proteína que forma parte de la maquinaria de migración neuronal, por ello se ha sugerido que la disgénesis cortical humana asociada a la pérdida de la función de la DCX es debida a una dinámica anormal del citoesqueleto celular (Francis et al., 1999).

Corbo y colaboradores, en el 2002, intentaron crear un modelo murino de lisencefalia mediante la generación de ratones knockout (KO) para DCX. Tanto los machos hemizigóticos (-/Y) como las hembras heterocigóticas (-/+) mostraban una anatomía cerebral aparentemente normal. La estructura cortical cerebral y cerebelar de los ratones KO era indistinguible de la de los ratones control. En un principio sólo registraron una pequeña alteración en el desarrollo de la formación hipocampal que se tradujo en anomalías en la capacidad de adquisición de memoria y en el aprendizaje de estos ratones (Corbo et al., 2002). Posteriormente, se describieron defectos morfológicos en la estructura de la CMR y alteraciones en el BO (Koizumi et al., 2006). En cualquier caso, estos hallazgos apuntaban a que, al menos en el ratón, la DCX podía no ser tan determinante en los procesos de migración como lo era en humanos.

Sin embargo, un año más tarde, Bai y colaboradores (2003), comprobaron que los resultados negativos encontrados al estudiar el KO para la DCX podrían ser debidos a

mecanismos de compensación que aparecen en el desarrollo embrionario mediados por otras proteínas con funciones afines, como la DCLK (del inglés, *doublecortin-like kinase*; Sheen et al., 2002; Deuel et al., 2006). Estos autores utilizaron la tecnología del RNA de interferencia, la cual será descrita ampliamente en el siguiente apartado, combinada con la técnica de electroporación *in útero*, para determinar el papel de esta proteína en el desarrollo cortical tanto en ratones como en ratas. Tras la realización de estos experimentos observaron que la pérdida de expresión de DCX se traducía en una disrupción del proceso de migración cortical. Por un lado existe un retraso en la velocidad de migración, que se acompaña de un fallo en el posicionamiento de los somas neuronales, lo que da lugar a un fenotipo cortical similar al observado en humanos afectados por lisencefalia asociada al cromosoma X (heterotopías subcorticales). Por otro lado, las células adoptan una morfología multipolar anormal que sugiere un defecto en el desarrollo de las neuritas radiales. Además, se ha demostrado un efecto no autónomo de la pérdida de expresión de DCX. Esto quiere decir que la pérdida de expresión de la proteína no sólo influye en la propia célula afectada, sino que también produce alteraciones en la migración de las células de alrededor en las que los niveles de expresión de la proteína son normales (Bai et al., 2003).

La tecnología de la interferencia mediada por RNA dirigida contra DCX ha sido aplicada *in vitro* sobre neuroesferas procedentes de la ZSV adulta (Ocbina et al., 2006), e *in vivo* en la corriente cortical lateral (LCS) durante el desarrollo embrionario (Bai et al., 2008). En el primer caso, la pérdida de expresión de DCX parece afectar a la capacidad y la velocidad de emigración o salida radial de progenitores celulares desde explantes de neuroesferas de ZSV adulta. En el segundo caso, los resultados obtenidos en la LCS son similares a los ya descritos en el desarrollo cortical por Bai y colaboradores en el 2003.

El mecanismo de acción de la DCX es desconocido, se cree que participa junto con otras proteínas en el acoplamiento núcleo-centrosoma que tiene lugar durante la translocación nuclear en el proceso migratorio. Se cree que forma un complejo con otras proteínas que es capaz de sellar la membrana del núcleo para después poder desplazarlo a través de los microtúbulos (Tanaka et al., 2004). Además, se la ha relacionado con el tráfico de vesículas que tiene lugar en el interior celular, otorgándole un papel adicional en la migración, ya que contribuiría al aporte de membrana que

tiene lugar durante el crecimiento de las neuritas, y en la formación y reorganización de nuevas sinapsis (Friocourt et al., 2001, 2003).

RNA DE INTERFERENCIA

El desarrollo de esta técnica tiene su origen en un descubrimiento ocasional, sin relación directa con su aplicación posterior. La primera documentación de que se dispone sobre este fenómeno se recogió en 1990 y fue llevado a cabo en plantas (Napoli et al., 1990). Estos autores, con el fin de obtener petunias de color violeta, intentaron sobreexpresar una de las enzimas limitantes en la biosíntesis del pigmento *antocianina*. Aunque detectaron niveles de expresión del gen 50 veces superiores a lo normal, obtuvieron petunias blancas. Esto era debido a que la introducción del transgen en las células producía una supresión endógena de la expresión del gen. Después de este trabajo se sucedieron otros en los que se describían fenómenos similares y diversos grupos de investigadores comenzaron a replantearse el mecanismo de regulación génica. En el año 1998, Fire y Mello publicaron un trabajo llevado a cabo en *Caenorhabditis elegans* en el que daban explicación a estos hechos. Demostraban que el silenciamiento génico se producía como respuesta a la introducción de un RNA de doble cadena (dsRNA) en la célula (Fire et al., 1998).

En principio los mecanismos de silenciamiento mediante RNA de interferencia (iRNA) fueron reconocidos, o bien como mecanismos antivirales, protegiendo a los organismos de virus de RNA (Waterhouse et al., 2001), o como mecanismo de prevención de la integración al azar de elementos trasponibles (Meister y Tuschl, 2004). Esto es cierto en parte, ya que, esta técnica está basada en la respuesta biológica que tiene lugar como consecuencia de la presencia de un dsRNA en la célula. La degradación del dsRNA pone en marcha la maquinaria celular encargada de regular la expresión génica a través de genes específicos que codifican formas pequeñas de dsRNA en horquilla (shRNA, del inglés *short hairpin RNA*) denominados micro-RNAs (miRNA). La función de estas pequeñas moléculas es la de inhibir la traducción de mRNAs diana (Bartel, 2004). Esto es lo que se conoce como mecanismo de silenciamiento post-transcripcional (figura 2).

En humanos se han identificado más de 300 genes que codifican miRNAs (Carthew, 2006). Estos genes son transcritos por la RNA polimerasa II en forma de moléculas denominadas transcritos primarios o pri-miRNA. Los transcritos primarios

contienen dominios en horquilla que forman estructuras en dúplex de RNA. El núcleo de cada región en horquilla es cortado por la RNAsa III o Drosha en fragmentos denominados pre-miRNA que son exportados desde el núcleo al citoplasma por medio de la exportina 5 (figura 2).

Ya en el citoplasma, estas moléculas (pre-miRNA) son reconocidas por una enzima denominada Dicer. Se trata de una proteína altamente conservada que se encuentra en la mayoría de organismos eucariotas. Dicer es una enzima citoplásmica de la familia RNAsa III, que procesa los dúplex de RNA en fragmentos de RNA con extremos 5' fosfato y con dos nucleótidos libres en cada extremo 3'-OH (Bernstein et al., 2001). A estos pequeños fragmentos se les denomina pequeños RNAs de interferencia (siRNA, del inglés *small interference RNA*). Los siRNA generados son reconocidos por una helicasa que separa las dos hebras y solamente la hebra codificante es incorporada al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, del inglés *RNA induced silencing complex*) al ser reconocida por la proteína Ago, de la superfamilia Argonauta, que se encuentra formando parte del complejo de silenciamiento inducido por RNA (Aza-Blanc et al., 2003; Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). La hebra no codificante del siRNA es degradada y RISC, que contiene la hebra codificante, dirige el reconocimiento del mRNA diana mediante apareamiento de bases Watson-Crick (Meister and Tuschl, 2004; Tomari y Zamore, 2005). Aun es un misterio como RISC es capaz de determinar cuál de las dos hebras debe ser degradada y cuál utiliza como "molde" para encontrar el mRNA diana, al igual que hay incertidumbre con respecto a si RISC es capaz también de actuar a nivel génico impidiendo la transcripción del mRNA.

Por todo ello, la introducción de dsRNA para eliminar la expresión de un gen diana específico se ha erigido como una técnica muy eficaz en células de invertebrados, sobre todo en *Caenorhabditis elegans* y en *Drosophila melanogaster*. Inicialmente, se pensaba que esta técnica no tendría aplicación en mamíferos, ya que éstos presentan un mecanismo innato de defensa contra los dsRNA (virus de doble cadena de RNA). Al introducir un dsRNA en una célula de mamífero, se produce una supresión global, no específica, de la expresión génica mediante la activación de la vía del interferón (Sledz y Williams, 2004). Sin embargo, en 2001, Tuschl y colaboradores idearon una estrategia para su aplicación en células de mamíferos, desarrollando un sistema que ponía en marcha el mecanismo de interferencia basado en la introducción, en la célula,

de moléculas artificiales que mimetizaban los productos de Dicer, los siRNAs (Elbashir et al., 2001a y b).

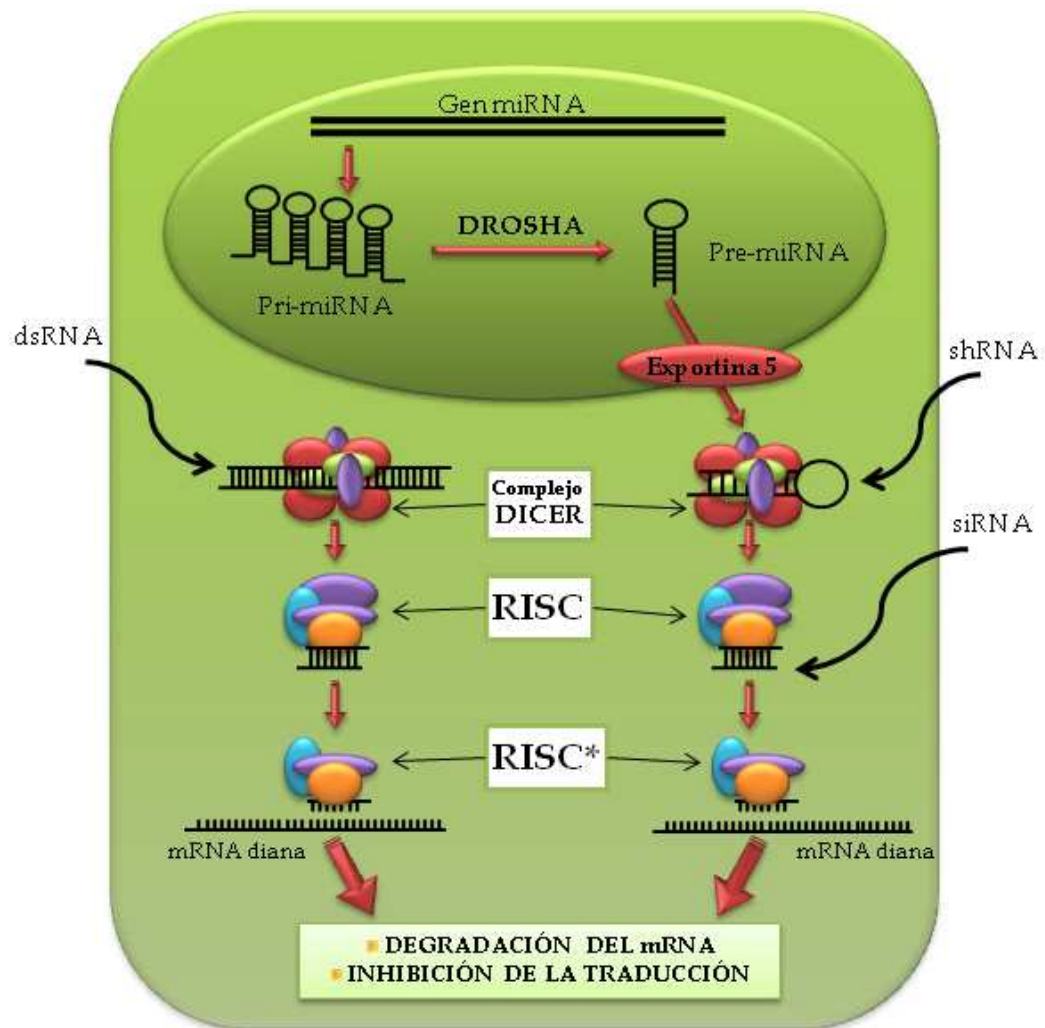


Figura 2. Las moléculas de dsRNA son reconocidas por la ribonucleasa Dicer, que es capaz de cortar la doble cadena en pequeños fragmentos de 21-23 pares de bases, que se conocen como RNAs interferentes pequeños o siRNA (del inglés *small interfering RNA*). Estos fragmentos son reconocidos por el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, del inglés *RNA induced silencing complex*), que está formado por alrededor de 12 proteínas, una de las cuales, conocida como argonauata, reconoce a la molécula siRNA. Una vez RISC ha reconocido el siRNA, es capaz de reconocer al mRNA de forma específica y unirse a él mediante el apareamiento entre bases. Una vez que lo ha reconocido lo corta y el mRNA es digerido por nucleasas.

De forma endógena, la célula sintetiza miRNA, moléculas pequeñas de doble cadena de RNA con forma de horquilla que son cortadas por el complejo RISC y siguen el mismo proceso para regular la síntesis de proteínas específicas.

Esta maquinaria endógena puede ser aprovechada para inhibir, de forma exógena, la expresión de una proteína diana mediante la introducción de moléculas de shRNA o moléculas siRNA con secuencias específicas.

La aplicación de la técnica del iRNA en mamíferos se puede llevar a cabo a través de dos métodos: (1) mediante síntesis química de siRNA con las características de los producidos por Dicer y (2) mediante la creación de un vector de expresión capaz de sintetizar, en el interior celular, una moléculas de shRNA con las características de los pre-miRNA (figura 2).

En los primeros estudios que demostraban la efectividad del iRNA en mamíferos se utilizaron siRNA *in vitro*. En cultivos celulares se ha conseguido realizar, con gran efectividad, el silenciamiento de un gran número de proteínas. En este tipo de estudios la metodología se ha optimizado de tal modo que la efectividad, tanto en la transfección (mecanismo de introducción de material genético externo en células eucariotas) como en el silenciamiento génico, es muy elevada. A pesar de que estos estudios han sido de vital importancia para desentrañar, en muchos casos, la participación de una proteína concreta en un determinado proceso, el desarrollo de nuevos sistemas vectoriales está impulsando su utilización en *in vivo*. El desarrollo de vectores virales recombinantes que expresan moléculas de shRNA proporciona una transducción y una expresión estable de la secuencia interferente en células de mamíferos (Wadhwa et al., 2004). Entre estos vectores destacan los vectores lentivirales, que, a diferencia de otros vectores retrovirales, pueden transfectar tanto células en división como células que han salido del ciclo celular (Naldini et al., 1996). A estos vectores se les han incorporado promotores de la RNA polimerasa III, los más comunes son H1 y U6, para lograr una expresión estable del RNA de interferencia. De hecho se ha demostrado que los vectores lentivirales pueden ser usados para transferir genes cuya expresión es estable durante meses en el SNC de ratones adultos (Geraerts et al., 2006).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El sistema olfatorio, debido, entre otras razones, a su elevado grado de desarrollo postnatal, representa un modelo perfecto para el estudio de los mecanismos de plasticidad en el SNC adulto. En el desarrollo postnatal del sistema olfatorio, a medida que se van produciendo los progenitores interneuronales en la ZSV, las neuronas de nueva generación migran primero tangencialmente a lo largo de la pared del ventrículo lateral, siguiendo después la denominada corriente migratoria rostral (Luskin, 1993). Cuando los neuroblastos alcanzan el bulbo olfatorio cambian de orientación y comienzan a desplazarse radialmente (Menezes et al., 2002). Finalmente, estos neuroblastos concluyen su proceso de diferenciación y posicionamiento definitivo, integrándose en los circuitos bulbares preexistentes. Todos estos procesos neurogénicos (proliferación, migración, diferenciación y supervivencia) tienen lugar tanto en etapas embrionarias como en etapas postnatales. No obstante, como hemos indicado en la sección “Introducción”, existen evidencias de que los mecanismos moleculares encargados de orquestar el proceso de migración en cada caso son diferentes. En el presente trabajo de Tesis Doctoral queremos dilucidar el papel ejercido por la proteína DCX, implicada en el proceso de migración celular que tiene lugar durante la corticogénesis, en los mecanismos de migración y diferenciación que tienen lugar durante el desarrollo postnatal del sistema olfatorio, para conocer si existen diferencias entre los procesos neurogénicos en el SNC adulto frente a los que tienen lugar durante el desarrollo embrionario. Pensamos que nuestro trabajo puede proporcionar un marco básico que permitirá profundizar en el conocimiento de la neurogénesis adulta. Conocer las bases moleculares que rigen estos procesos abrirá interesantes retos entre los que se incluyen la posibilidad de influir y/o manipular algunas de las capacidades presentes en el SNC adulto, de forma que se constituyan como base del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Los objetivos concretos de este trabajo de tesis doctoral son los siguientes:

1. Aplicar la técnica de RNA de interferencia para silenciar la expresión de DCX *in vitro*. Con ello, determinaremos la funcionalidad de la secuencia del siRNA publicado por Bai y colaboradores (2003) y los efectos producidos por la reducción de la expresión de esta proteína sobre neuronas en cultivo.

2. Construir un sistema de expresión constitutiva de cassettes shRNA mediante la clonación de secuencias específicas en vectores lentivirales. Las partículas serán utilizadas como vehículo para infectar roedores adultos mediante inyección estereotáxica en la ZSV. Esto nos permitirá llevar a cabo el silenciamiento proteico *in vivo* en los progenitores endógenos que dan lugar a las interneuronas de nueva generación del BO.
3. Analizar morfológicamente los encéfalos de los ratones infectados y llevar un seguimiento de las células modificadas en cada caso.
4. Llevar a cabo un análisis comparativo de la migración en las distintas condiciones experimentales, para poder conocer el papel de DCX en las cascadas de señalización que tienen lugar en estos procesos durante la neurogénesis en el SNC adulto.
5. Analizar los efectos ocasionados por la reducción de DCX sobre la diferenciación temprana de las células de nueva generación del BO.
6. Establecer una comparativa entre los antecedentes ya publicados, que definen la función de DCX durante la corticogénesis durante el desarrollo embrionario, y nuestros resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos primarios de neuronas corticales

Los cultivos primarios de neuronas se utilizaron para interferir en estas células la expresión de la proteína DCX y así comprobar el funcionamiento de la secuencia publicada por Bai y colaboradores (2003). Para ello se empleó el protocolo que detallamos a continuación.

Las ratas gestantes se sacrificaron por esguince cervical en el día de gestación 17.5 y los fetos se extirparon del útero mediante cesárea. Se extrajeron los dos hemisferios cerebrales de cada uno de los fetos, desechando el cerebelo, se retiraron cuidadosamente las meninges y el tejido limpio se trituró con ayuda de una lanceta estéril en una placa Petri que contenía solución A (tabla 4). La suspensión resultante se pasó a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó a 500 x g durante 2 min a temperatura ambiente (TA). Se descartó el sobrenadante y se añadió la misma cantidad en mililitros de solución B (tabla 4) que de cerebros extraídos. Se resuspendió la muestra varias veces con una pipeta y se incubó durante 15 min a 37 °C. A continuación se añadió medio DMEM (Gibco-BRL, Renfrewshire, Escocia) complementado con un 10% de suero bovino fetal (Gibco-BRL), añadiendo, en total, los mismos mililitros que en el paso anterior. Se homogenizó la muestra con ayuda de una pipeta y se centrifugó de nuevo a 500 x g durante 5 minutos a TA. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 12 ml de solución A para homogeneizar de nuevo con ayuda de una pipeta. Se dejó reposar durante 4 min a TA y se recogió el sobrenadante pasándolo a un tubo Falcon estéril. Este paso se repitió tres veces. Posteriormente, durante 5 min a TA, se centrifugaron a 500 x g todos los sobrenadantes recogidos y, por último, se resuspendió

Tabla 4. Composición de las soluciones A y B

Solución A

- ✦ 700 µl de Albúmina (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) 3.23 mM (en agua)
- ✦ 500 µl de DNAsa (Roche) 2.4 mg/ml (en agua)
- ✦ 48.8 ml EBSS (del inglés: *Earle's buffered salt solution*; Sigma, St Louis, MO, EE.UU.)

Solución B

- ✦ 300 µl de albúmina (Roche) 3.23 mM (en agua)
- ✦ 500 µl de DNAsa (Roche) 2.4 mg/ml (en agua)
- ✦ 500 µl de tripsina (Roche) 0.4 mM

Tabla 5. Composición del medio definido

Medio definido (volumen final de 50 ml)

- ✦ 47.65 ml DMEM-HF12 (Gibco-BRL)
- ✦ 1.25 ml de L-Glutamina 100 mM (Sigma)
- ✦ 500 μ l de Apo-transferrina (Sigma) 100 mg/ml (en TFS, tampón fosfato salino)
- ✦ 50 μ l de insulina (Sigma) 5 mg/ml (en agua)

el precipitado (que contiene las células) en medio definido (MD, tabla 5). La siembra se realizó sobre placas P-35 tratadas con poli-L-lisina (1 μ g/cm²), para facilitar la adherencia celular, a una densidad de 1,25x10⁶ células/ml.

Transfección con siRNA

Existen diferentes estrategias para introducir ácidos nucleicos en células eucariotas: transfección por métodos químicos, transfección por métodos físicos o transducción viral. En este caso realizamos transfección química utilizando liposomas.

La transfección se llevó a cabo inmediatamente después de sembrar las células, tal como se detalla en el protocolo anterior (80-90 % de confluencia), sin necesidad de esperar a que las células se adhirieran a la superficie. Se utilizó el reactivo Lipofectamina (lipofectamina 2000 reagent, Gibco-BRL) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando en todos los casos 2,5 μ l del reactivo de transfección por ml de volumen final. Se transfectó un siRNA contra la proteína DCX (Applied Biosystem, Madrid, España) cuya secuencia era igual a la publicada por Bai y colaboradores (2003) y un siRNA control que carece de mRNA diana, llamado NT-RNA (del inglés *non-target RNA*; Applied Biosystem). Los siRNA de cadena doble se resuspendieron en agua libre de nucleasas a una concentración inicial de 30 μ M y se utilizaron a una concentración final de 75 nM.

Para comprobar la efectividad del silenciamiento se llevó a cabo, bien la extracción de proteína celular para realizar Western blot, o la fijación de las células, en su caso, para aplicar técnicas de inmunofluorescencia, 24 h después de la transfección como se detalla en los apartados de western-blot y de inmunofluorescencia para cultivo primario.

Western-blot

Utilizamos la técnica de Western blot para evaluar el grado de silenciamiento producido por el DCX-siRNA. Para ello utilizamos cultivos primarios de neuronas

corticales que se realizaron como se describe en el apartado anterior y que posteriormente fueron procesados para realizar sobre ellos esta técnica.

Las células se recogieron directamente sobre las placas P-35 con 30 μl de solución de extracción (tabla 6) y se trasvasaron a eppendorfs estériles. A continuación, las muestras se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron a 12000 x g durante 10 min. Por último se recogió el sobrenadante, donde se encuentran los extractos celulares, y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

La valoración de la cantidad de proteínas total obtenida se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976). Para ello, primero se elaboró una recta patrón utilizando diluciones de albúmina de suero bovino (Sigma) de concentración conocida, valorando su absorbancia en el espectrofotómetro tras la adición del reactivo de Bradford (BioRad, GmbH, Munich, Alemania). Los extractos proteicos obtenidos de nuestras muestras fueron diluidos 1:1.000 en H₂O Milli-Q. De estas diluciones, se tomaron 800 μl y se añadieron 200 μl del reactivo de Bradford, se mezclaron y se dejaron reposar durante 10 min a TA. A continuación se midió su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. El traslado de los resultados de absorbancia a la recta patrón nos permitió calcular la cantidad de proteína total presente en cada muestra.

Preparación de los geles

Los geles utilizados para la separación de proteínas fueron de un grosor 1,5 mm, con un porcentaje de poliacrilamida del 4% en el caso del empaquetador y del 10% en el caso del separador (composición en tabla 6).

El montaje de los geles se llevó a cabo en una célula de electroforesis (mini-PROTEAN, BioRad). El gel de separación se depositó entre los cristales de electroforesis hasta dos tercios de su altura. El resto se recubrió con H₂O Milli-Q y se esperó hasta la polimerización del gel. Posteriormente, se eliminó el H₂O y se añadió el gel empaquetador, insertando rápidamente el peine para la formación de los pocillos de carga de muestra. Una vez polimerizado el gel de concentración se retiró el peine para comenzar la electroforesis.

Electroforesis y transferencia

Cada muestra sometida a electroforesis contenía 90 μg de proteína total en un volumen de 15 μl de cada una de las muestras, a las que se añadieron otros 15 μl de tampón de carga (tabla 6). A continuación, éstas se hirvieron de nuevo durante 5 min y, posteriormente, se mantuvieron en hielo hasta que fueron cargadas en el gel. En cada gel uno de los pocillos se reservó para la carga del marcador de peso molecular

Tabla 6. Composición de las soluciones utilizadas en el western blot

Tampón de extracción	Composición Geles		
	Running	Stacking	
<ul style="list-style-type: none"> ✦ Antipapaína 25 ng/ml ✦ Amastatina 25 ng/ml ✦ Leupeptina 25 ng/ml ✦ Bestatina 25 ng/ml ✦ Tripsina 25 ng/ml ✦ Apoprotinina 0,15 U/ml ✦ PMSF 1mM ✦ SDS 2% ✦ EDTA 2mM ✦ EGTA 2mM ✦ Tris 5mM 	Agua milli-Q	2.72 ml	3.6 ml
	Tris-HCl 1M pH 8.8	3.75 ml	
	Tris-HCl 1M pH 6.8		630 µl
	Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 30% (Applichem, GmbH, Alemania)	3.33 ml	664 µl
	SDS 10% (Sigma)	100 µl	50 µl
	AMPS 10% (BioRad)	50 µl	25 µl
	TEMED (BioRad)	5 µl	5 µl

Tampón de carga	Solución de anticuerpos
<ul style="list-style-type: none"> ✦ SDS 4% ✦ Glicerol (PanReac) 40% ✦ Azul de bromofenol (BioRad) 0.1 mg/ml ✦ B-Mercaptoetanol (BioRad) 6 mM ✦ Tris 0.5 mM pH 6.8 	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Suero fetal 10% ✦ Azida sódica 0.02% ✦ Lisina 0.1M ✦ PBS pH 7.4

(BioRad). Una vez cargado el gel se separaron las proteínas mediante la aplicación de una diferencia de potencial de 100V durante aproximadamente 90 min. Mientras tenía lugar la electroforesis, los geles estuvieron sumergidos en un tampón que contenía Tris-glicina 10% (p/v) pH 8,3 y SDS 10% en H₂O Milli-Q. Una vez finalizada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA). Durante este proceso se utilizó tampón de transferencia (Glicina 0,1M, Tris base 0,025M, metanol 20% en H₂O Milli-Q) y se aplicó una corriente de 200 mA durante 2 h a 4 °C.

Antes de comenzar con la inmunodetección se comprobó la efectividad de la transferencia tiñendo la membrana con rojo Ponceau al 0,1% diluido en ácido acético al 5%. Posteriormente ésta se lava varias veces con H₂O Milli-Q hasta que pierde completamente la coloración.

Inmunodetección

Una vez realizada la transferencia, la membrana se bloqueó, con objeto de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, mediante incubación durante 1 hora a TA con una solución de tampón Tris-HCl salino con el detergente Tween-20 (TBS-T: NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, Tween-20 0,05%) y leche en polvo libre de grasas al 5%. Una vez bloqueadas, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en un

medio que contenía el anticuerpo primario, IgG de cobaya anti-DCX (Chemicon International, CA) diluido 1:5000 en solución de anticuerpos (tabla 6). Al día siguiente, y tras tres lavados cada 10 min (3x10 min) con TBS-T, las membranas se incubaron durante una hora a TA en una solución que contenía el anticuerpo secundario, IgG de cabra anti IgG de cobaya conjugado con HRP, (Sigma) a una dilución 1:5000. Tras lavar de nuevo la membrana con TBS-T (3x10 min), se procedió al revelado mediante quimioluminiscencia usando un *kit* comercial (Western-blotting luminol reagent, Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU) que permite detectar los lugares de unión del anticuerpo secundario mediante la actividad peroxidasa de la HRP. Para su documentación, la membrana se expuso a una película fotográfica que detecta la señal quimioluminiscente. Finalmente, las películas se revelaron según un protocolo mecanizado (Kodak X-OMAT 2000, EE.UU.).

Para realizar el control de carga proteica, la membrana se reincubó con un anticuerpo monoclonal contra GADPH (Applied Biosystems) y se reveló del mismo modo.

Inmunofluorescencia para cultivos primarios

Otro grupo de placas se destinó a la detección de la expresión de la DCX mediante inmunofluorescencia. En este caso la técnica se llevó a cabo directamente sobre las placas P-35. Previamente a la detección antigénica, las placas se lavaron un par de veces con tampón fosfato salino 0,1M, pH 7,3 (PBS) y se fijaron con paraformaldehído tamponado al 4% durante 20 min a TA. A continuación se dieron tres lavados con PBS y se realizó una incubación con metanol a -20 °C durante 10 minutos con el fin de favorecer la penetración del anticuerpo primario. Transcurrido ese tiempo las placas fueron de nuevo lavadas tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario anti-DCX (Chemicon), diluido 1:10000 en solución de anticuerpos (tabla 6) que contenía además Triton X-100 al 0,1%, durante 2 h a TA. A continuación las placas se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 2 h a TA en el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti IgG de cobaya conjugado con biotina, Chemicon) diluido 1:1000 en PBS. Posteriormente se lavaron de nuevo tres veces con PBS y por último se incubaron durante 2 h a TA en una solución que contenía estreptavidina conjugada con cianina 3 (Cy3) diluida 1:500 en PBS. Tras tres lavados con PBS y se colocó encima un cubreobjetos con un medio comercial (Vectashield, Sigma) que mejora la preservación la fluorescencia.

Construcciones vectoriales

Con el fin de producir una expresión estable de un siRNA *in vivo* se generaron lentivirus recombinantes productores de DCX-siRNA y su correspondiente control en forma de shRNA. Los plásmidos utilizados en este trabajo han sido los que se detallan: los vectores virales pLVTHM, psPAX2 y pMD2.G, cedidos por el Prof. Didier Trono (Global Health Institute, École Polytechnique Fédérale de Lausanne) y el vector pCR-BluntTHM cedido por el Prof. Antonio Bernad (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid). Los vectores virales se utilizaron para producir partículas lentivirales y solamente se modificó el vector pLVTHM (figura 3), en el que se llevó a cabo la clonación de los fragmentos sintéticos DCX-shRNA y *scramble*DCX-shRNA. El fragmento *scramble* posee la misma composición de nucleótidos que el DCX-shRNA pero en distinto orden, de modo que no reconoce ningún mRNA presente en células de roedores, y así, éste fue utilizado como control negativo. El plásmido pCR-BluntTHM (figura 3) se utilizó como vector intermediario para clonar los fragmentos shRNA y analizarlos mediante secuenciación para detectar posibles cambios en la secuencia nucleotídica del plásmido.

Diseño de los oligonucleótidos DCX-shRNA y *scramble*DCX-shRNA

A partir de la secuencia DCX-siRNA para interferir la expresión de DCX publicada por Bai y colaboradores (2003), y una vez comprobada su efectividad mediante siRNA en cultivos primarios de neuronas, se diseñó la secuencia del *scramble*DCX-siRNA mediante un programa informático en línea (<http://www.sirnawizard.com/>). A partir de aquí diseñamos los oligonucleótidos necesarios para la construcción de los pLVTHM-shRNA, tanto para el DCX-shRNA como para el *scramble*DCX-shRNA, siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio del Prof. Didier Trono (<http://tronolab.epfl.ch/>). Este protocolo nos permitió diseñar *cassettes* de expresión shRNA que comprende las secuencias con sentido y antisentido del siRNA, una unidad *loop* de 7 pb (formará la horquilla del shRNA), una cola de poliA y las dianas de las enzimas de restricción MluI y ClaI en los extremos 5' y 3' respectivamente (figura 4). Los oligonucleótidos se sintetizaron comercialmente (Gene Link, NY, EE.UU.) y nos fueron proporcionados anillados y defosforilados en los extremos 5'.

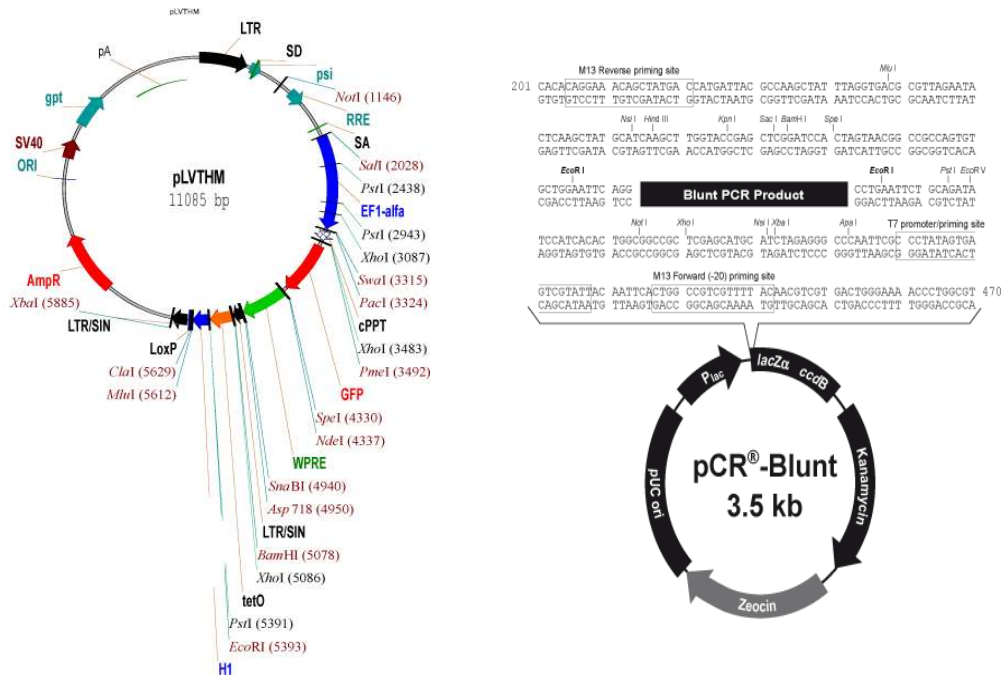


Figura 3. Representación gráfica del mapa de los plásmidos pLVTHM y pCR-blunt.

Diseño de oligonucleótidos

+ DCX-shRNA

Mlu I	sense siRNA	loop	antisense siRNA	stop	Cla I
5'-CGCGT	CCCCGCTCAAGTGACCAACAAGGCTAT	AGACACA	ATAGCCTTGTGGTCACTTGAGC	TTTTGGAAAT	3'
3'-AGGGG	CGAGTTCACTGGTTGTTCCGATATCTGTGT	TATCGGAACA	ACCAGTGA	ACTCGAAAA	CCTTAGC

Figura 4. Oligonucleótidos anillados clonados en el vector lentiviral pLVTHM para formar los vectores de expresión pLVTHM-DCX-shRNA y pLVTHM-scrambleDCX-shRNA

Reacción de fosforilación

Esta reacción se lleva a cabo en 250 ng de oligonucleótidos anillados diluidos en una solución que contiene 1 µl de la enzima polinucleótido cinasa (PNK, New England Biolabs), 1 µl de ATP (adenosin trifosfato) 1 mM (New England Biolabs), 1 µl de buffer T4 PNK (New England Biolabs) y 5 µl de H₂O Milli-Q. La mezcla de reacción se mantuvo 30 min a 37 °C, 10 min a 70 °C y por último 5 min a 4 °C.

Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Modificación del ADN plasmídico

Digestiones enzimáticas

Las endonucleasas de restricción son enzimas purificadas a partir de diferentes cepas bacterianas u hongos, que pueden reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de DNA y cortar la doble hélice en ese punto, o en un sitio no muy lejano a éste. Este punto se denomina sitio o diana de restricción y suelen contener entre 4-12 pares de bases. El mecanismo de corte de DNA se realiza a través de ruptura de dos enlaces fosfodiéster en la doble hebra, lo que da lugar a dos extremos de DNA. Éstos pueden ser romos (cuando los enlaces rotos coinciden) o cohesivos (si no es así).

Todas las digestiones se realizaron en un volumen final de 25 µl, con un 1 µg de DNA y con una unidad de enzima (New England Biolabs, EE.UU.) en las condiciones de solución indicadas por el fabricante. Las mezclas de reacción se llevaron a cabo a una temperatura de 37 °C durante 2 h.

Reacción de desfosforilación

La reacción de desfosforilación se llevó a cabo después de la digestión enzimática para evitar que los vectores se volvieran a ligar consigo mismos, lo que nos produciría colonias con plásmido sin inserto. Para ello utilizamos todo el volumen de la reacción de digestión (25 µl) y añadimos 1 µl de la enzima fosfatasa alcalina (New England Biolabs), 4 µl de buffer de desfosforilación (New England Biolabs) y 10 µl de H₂O Milli-Q. A continuación se sometió a una temperatura de 37 °C durante 15 min e inmediatamente después a 75 °C durante 10 min.

Electroforesis en gel de agarosa

Esta técnica se utilizó con el fin de separar los fragmentos resultantes de las digestiones plasmídicas. Para ello, fundimos la agarosa al porcentaje deseado, que dependía del tamaño de los fragmentos que deseamos separar, en tampón TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM pH 8,0; EDTA 0.1 mM) más bromuro de etidio 4 µg/ml. La mezcla se vertió en un portageles y se colocó un peine adecuado al volumen de carga. Una vez polimerizado el gel, se retiró el peine y se añadió TAE 1X hasta que sobrepasase el gel 1 mm. A continuación se pusieron las muestras diluidas en tampón de carga (New England Biolabs) y se aplicó una corriente de 100 V el tiempo necesario para la separación de las bandas de DNA. Por último se extrajo el gel del portageles y se visualizó bajo luz UV.

Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de los fragmentos de DNA en geles de agarosa se realizó mediante el kit comercial “QIAquick Gel Extraction Kit” (QIAGEN Iberia S.L., España) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante.

Reacción de ligación

La reacción de ligación se llevó a cabo mezclando 1 μ l de plásmido digerido y purificado, 2 μ l del resultado de la reacción de fosforilación de los oligonucleótidos, 1 μ l de enzima ligasa (New England Biolabs) y 1 μ l de buffer de ligación 10X (New England Biolabs). La mezcla se incubó durante toda la noche a una temperatura de 16 °C.

Transformación bacteriana

Para las reacciones de transformación utilizamos bacterias competentes DH5 α TM E. coli (*Escherichia coli*, Invitrogen). Descongelamos una alícuota de 50 μ l de células competentes en hielo y añadimos entre 10-50 ng de DNA, si deseamos amplificar un plásmido, o la mitad del producto de la ligación en su caso. Se mezcló con ayuda de una pipeta y se incubó en hielo durante 30 min. A continuación realizamos un choque térmico a 42 °C durante 20 seg. Posteriormente añadimos 950 μ l de medio LB (medio rico Luria-Bertani) precalentado: triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v). Después se incubó a 37 °C en agitación orbital (225 rpm) durante 1 h. Por último, una vez finalizada la incubación, se plaquean entre 50-150 μ l de cada muestras en placas con LB sólido (se añade agar al 1,5% al LB líquido) más el antibiótico correspondiente en cada caso a una concentración de 100 μ g/ μ l.

Obtención de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico en bajas cantidades (5-15 μ g) se realizaron minipreparaciones (Miniprep) mediante el kit comercial “QIAprep Spin Miniprep Kit” (QIAGEN) en cultivos de 1-5 ml. Las preparaciones se realizaron siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. Para la obtención de DNA en altas cantidades (500-1000 μ l) utilizamos el kit comercial “JETSTAR Plasmid Purification Kit” (Genomed Genycell Biotech España SL) según las instrucciones marcadas por el fabricante.

Northern blot

La técnica de Northern Blot permite la detección de fragmentos específicos de RNA previamente separados por peso molecular mediante electroforesis. La muestra

se transfiere a una membrana de nailon y posteriormente se inmoviliza mediante luz UV y se identifica mediante una sonda específica marcada, en nuestro caso, de forma radiactiva.

Esta técnica la utilizamos, una vez construidos los plásmidos pLVTHM-shRNA, para comprobar que el promotor H1 dirige la expresión de los shRNA. Para ello transfectamos la línea celular HEK 293FT (del inglés: *Human embryonic kidney cells*), cuyo método de cultivo explicaremos posteriormente, con los plásmidos pLVTHM-DCXshRNA y pLVTHM-*scramble*DCX-shRNA. Para ello utilizamos lipofectamina (lipofectamina 2000 reagent, Gibco-BRL) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extracción de RNA enriquecido en RNA de pequeño tamaño

La extracción de RNA para el análisis de Northern-blot la llevamos a cabo mediante el *kit* comercial “mirVana™miRNA Isolation Kit” (Applied Biosystems). Este *kit* combina las ventajas de la extracción orgánica y la extracción en fase sólida para obtener una muestra ultrapura y de alta calidad compuesta de RNAs menores de 200 nucleótidos.

Para ello las células 293FT se despegaron mediante tripsinización (véase mantenimiento de la línea 293FT) y se centrifugaron, posteriormente realizamos el protocolo facilitado por el fabricante.

Preparación de los geles de acrilamida y electroforesis

Los RNAs extraídos se resolvieron electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes. Debido al pequeño tamaño de los fragmentos a detectar utilizamos geles de acrilamida (acrilamida/bisacrilamida 19:1; Applichem, GmbH, Alemania) al 15 % más urea 8 M (tabla 7). El montaje de los geles se lleva a cabo en una célula de electroforesis vertical (mini-PROTEAN, BioRad).

Una vez polimerizado, el gel se somete a una pre-electroforesis durante 30 minutos a 200 V para eliminar la urea de los pocillos. A continuación, se cargaron entre 4-8 µg de RNA enriquecido en RNAs pequeños por pocillo, que previamente fueron mezclados en una proporción adecuada con el buffer de carga (Applied Biosystems) y se habían sometido a una temperatura de 100 °C durante 5 min. Por último se llevó a cabo la electroforesis en TBE (buffer tris-ácido bórico-EDTA, tabla 7) 0,5 X durante 35 min a 230 V. Una vez terminada la electroforesis el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (10 µg/ml) en TBE durante 10-15 min para comprobar la integridad del RNA.

Transferencia

Una vez que se separó el RNA, se llevó a cabo la transferencia desde el gel a una membrana de nailon (Hybond™-N+, Amersham Biosciences) en TBE. Durante el proceso se aplicó una corriente de 300 mA durante 1 h a 4 °C. A continuación, la membrana se sumergió en SSC 2X (tabla 7) durante 30 min, se secó con papel *whatman* y se fijó con luz UV (*UV-stratalinker*).

Marcaje de la sonda e hibridación

La sonda utilizada para la detección de la expresión del DCX-shRNA fue la secuencia sentido del DCX-siRNA (5'-gctcaagtgaccaacaaggctat-3'; EXIQON, Inc., EE.UU.) sintetizada químicamente y marcada radiactivamente con $\gamma^{32}\text{P}$. Para llevar el marcaje de la sonda se mezcló 1 μl de T4 PNK, 4 μl de Buffer T4, 5 μl de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP (3000Ci/mmol) y 10 μl de H₂O Milli-Q con 10 pmol de la sonda y se incubó durante 45-60 min a 37 °C. Una vez marcada la sonda fue purificada en columnas de sephadex (mini Quick Spin™ DNA Columns; Roche) como marcan las instrucciones del fabricante.

Tabla 7. Composición de las soluciones empleadas para la técnica de Northern Blot

<p>SOLUCIÓN DE PREHIBRIDACIÓN</p> <ul style="list-style-type: none"> ✦ Formamida 50% ✦ SSPE 5X ✦ Solución Denhardt's 5X ✦ SDS 0.5% ✦ DNA de esperma de salmón 20$\mu\text{g}/\text{ml}$ <p>(Todo ello diluido en agua libre de nucleasas)</p>	<p>SOLUCIÓN DENHARDT</p> <ul style="list-style-type: none"> ✦ Ficoll 400 5% (p/v) ✦ Polivinilpirrolidona 5% (p/v) ✦ BSA 5% (p/v) <p>(Todo ello diluido en agua libre de nucleasas)</p>										
<p>SSPE 20X</p> <ul style="list-style-type: none"> ✦ NaCl 3.6M ✦ NaH₂PO₄ 200mM ✦ EDTA 20mM ✦ pH 7.7 <p>(Todo ello diluido en agua libre de nucleasas y autoclavado)</p>	<p>TBE 10X</p> <ul style="list-style-type: none"> ✦ Tris Base 0.9M ✦ Ácido Bórico 0.9M ✦ EDTA 20mM <p>(Todo ello diluido en agua libre de nucleasas)</p>										
<p>COMPOSICIÓN GEL</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>TBE 10X</td> <td>1.5 ml</td> </tr> <tr> <td>Acilamida/Bisacrilamida 19:1 40% (Applichem, GmbH, Alemania)</td> <td>5.6 ml</td> </tr> <tr> <td>Urea</td> <td>7.2 g</td> </tr> <tr> <td>AMPS 10% (BioRad)</td> <td>75 μl</td> </tr> <tr> <td>TEMED (BioRad)</td> <td>15 μl</td> </tr> </tbody> </table> <p>(Enrasar a 15 ml con agua libre de nucleasas)</p>	TBE 10X	1.5 ml	Acilamida/Bisacrilamida 19:1 40% (Applichem, GmbH, Alemania)	5.6 ml	Urea	7.2 g	AMPS 10% (BioRad)	75 μl	TEMED (BioRad)	15 μl	<p>SOLUCIÓN DE LAVADO</p> <ul style="list-style-type: none"> ✦ SSC 2X ✦ SDS 0.1% <p>(Todo ello diluido en agua libre de nucleasas)</p>
TBE 10X	1.5 ml										
Acilamida/Bisacrilamida 19:1 40% (Applichem, GmbH, Alemania)	5.6 ml										
Urea	7.2 g										
AMPS 10% (BioRad)	75 μl										
TEMED (BioRad)	15 μl										
	<p>SSC (solución salina concentrada) 20X</p> <ul style="list-style-type: none"> ✦ NaCl 3M ✦ Citrato Sódico 0.3M ✦ pH a 7.0 <p>(Todo ello diluido en agua libre de nucleasas)</p>										

Para la detección específica del DCX-shRNA la membrana primero se incubó en una solución de prehibridación (tabla 7) durante 2 h a una temperatura de 42 °C. Una vez transcurrido este tiempo, la membrana se trasladó a la solución de hibridación (solución de prehibridación más la sonda marcada) durante toda la noche en agitación a TA.

Transcurrido ese tiempo, la membrana se sometió a tres lavados (3X15 min) a TA en solución de lavado (tabla 7) y, por último, se dió un último lavado en SSC 0.1X más SDS 0.1 %.

Para el revelado, la membrana fue expuesta primero en una pantalla (Fuji Imaging Plate Bas III, Fujifilm) que luego se leyó en el revelador (PhosphoImager, BAS-1500, Fujifilm) mediante el software específico (Fujifilm Image Reader V1.3 E).

Producción de partículas lentivirales

La construcción de los vectores lentivirales está basada en el virus HIV (del inglés: *human immunodeficiency virus*). La estructura genómica de este virus es muy similar a la de un retrovirus, contiene los genes *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica las proteínas virales del núcleo (proteínas de la matriz, de la cápsida y de la nucleocápsida), el gen *pol* codifica enzimas virales para la replicación y el gen *env* codifica la envuelta glicoproteica del virus.

Como ya hemos apuntado, para la producción de lentivirus recombinantes productores de shRNA utilizamos, en nuestro caso, tres plásmidos: psPAX2, pMD2.G y pLVTHM (figura 3).

psPAX2 (figura 5) es el vector de empaquetamiento de segunda generación. Contiene los genes *gag* y *pol* que codifican las proteínas y enzimas responsables del empaquetamiento y la replicación pero no posee las secuencias en *cis* cruciales para el empaquetamiento, la transcripción inversa y la integración de transcritos derivados del empaquetamiento del plásmido.

pMD2.G (figura 5) es el vector que codifica la cápsida del virus. Contiene el gen *env* que codifica la glicoproteína VSVG (del inglés: *vesicular stomatitis virus glycoprotein*) y las demás proteínas de la cápsida del virus. La glicoproteína VSVG incrementa la estabilidad del virus y nos permite concentrarlos mediante ultracentrifugación.

pLVTHM (figura 3) es el vector de traducción que posee el gen reportero GFP (del inglés: *green fluorescent protein*) bajo la dirección del promotor CMV y el promotor H1 dependiente de RNA polimerasa III controlando la **unidad shRNA**. Además posee elementos del HIV en *cis* necesarios para poder ser empaquetado, para la transcripción inversa y para la integración.

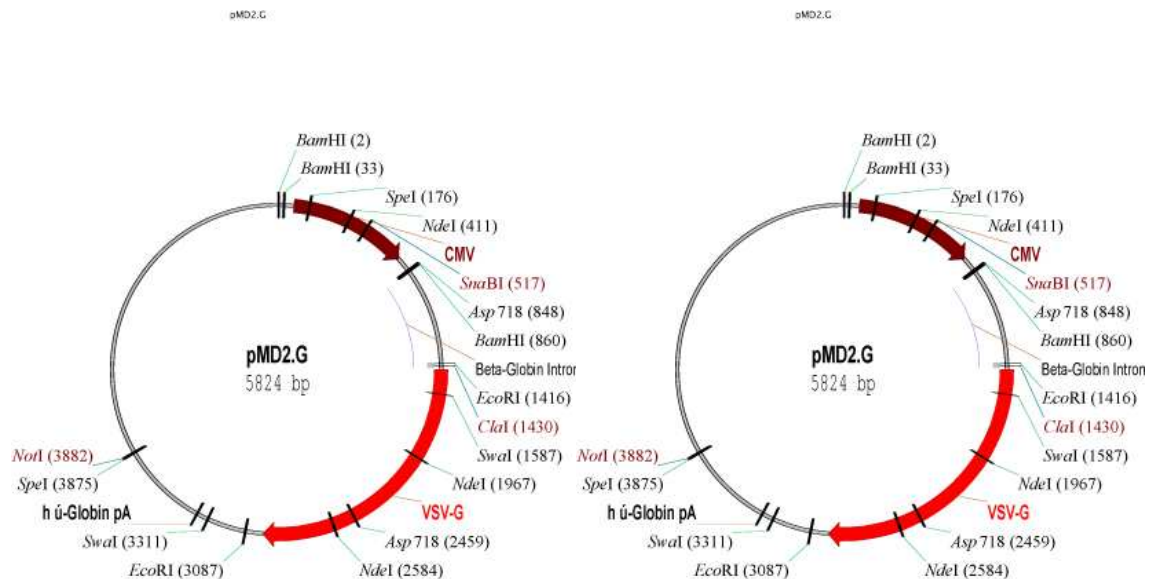


Figura 5. Representación gráfica del mapa del plásmidos virales pMD2.G y psPAX2.

Las partículas lentivirales se generan por coexpresión de los elementos empaquetadores y la presencia de un esqueleto o vector del genoma viral (pLVTHM). Para poder llevar esto a cabo realizamos cotransfección transitoria de la línea celular 293FT con los tres plásmidos virales. La línea 293FT se usa como línea empaquetadora, ya que, es un clon derivado de las células HEK 293 que contienen el antígeno T largo del virus SV40, lo que permite una replicación episomal de los plásmidos que contengan un origen y región promotora temprana de SV40 (Alwine, 1985). En los apartados siguientes describiremos el mantenimiento de esta línea celular, el protocolo de transfección y de recolección de partículas víricas, el método de concentración y la forma de obtención del título viral.

Cultivo de la línea celular 293FT

La línea de 293FT (Invitrogen) se mantuvo y se expandió en medio DMEM (Gibco-BRL) suplementado con: suero bovino fetal (Lonza) 10%, L-glutamina (Gibco-BRL) 20 mM, aminoácidos no esenciales (Gibco-BRL) 1 mM, piruvato sódico (Gibco-BRL) 10 mM, penicilina-streptomina (50 U/ml y 50 mg/ml respectivamente; Gibco-BRL) y

geneticina (Gibco-BRL) 500 µg/ml. Las células se incubaron a una temperatura constante de 37°C y en una atmósfera con un 5% de CO₂.

Las células se sembraron a una densidad de 2-5 x 10⁴ células/ml. El medio se cambió cada tres días, o cuando sobrepasaban el 80% de confluencia. Para realizar los pases, la placa se lavó con PBS y las células se disgregaron enzimáticamente con ayuda de tripsina (0,5 mg/ml) más EDTA (Invitrogen). Tras 2 min de incubación se inhibió la actividad de la tripsina por dilución con medio de cultivo. A continuación las células se centrifugaron a 150-200 x g durante 5 min a TA. Después, se retiró el sobrenadante y se sembraron a la densidad deseada, determinada previamente con ayuda de una cámara Neubauer y utilizando trypan blue (Sigma-Aldrich) para el recuento de las células viables.

Cotransfección de las células 293FT con plásmidos virales

La transfección, en este caso, se llevó a cabo por el método del fosfato cálcico, para lo cual, 72 h antes de la transfección sembramos 2,5 x 10⁶ células en placas P-150. Minutos antes de la transfección (las células estaban al 70 % de confluencia) se llevó a cabo un cambio de medio y se realizó la siguiente mezcla de transfección detallada a la derecha.

Una vez hecha la mezcla se añadieron 1140 µl de HBS 2X (16 g/L NaCl; 0,76 g/L KCl; 0,2 g/L Na₂HPO₄; 10 g/L HEPES; 2 g/L glucosa; pH 7,1) bajo agitación en vortex y se incubó a TA durante un mínimo de 5 min y un máximo de 30 min.

Transcurrido este tiempo se añadió gota a gota la mezcla en la placa con las células.

pLVTHMshRNA	22.5 µg
pMD2.G	7.9 µg
psPAX2	14.6 µg
TE 0.1M (tris-HCl pH 8 más EDTA 0.1 mM pH 8)	660 µl
CaCl ₂ 2.5M	113 µl
Agua	350 µl

Después de 14-16 h se cambió el medio por medio fresco.

12 h más tarde, se recogió el sobrenadante que contenía las partículas virales y se ponía medio fresco. Esta operación puede repetirse hasta tres veces cada 12 h. Los sobrenadantes se filtraron utilizando filtros de 0,45 µm de poro y baja retención de proteínas (Millipore, Bedford, EE.UU.).

Concentración

Los sobrenadantes se sometieron a ultracentrifugación en una ultracentrífuga Beckman utilizando un rotor SW28. La velocidad utilizada fue de 20.000 rpm durante 2

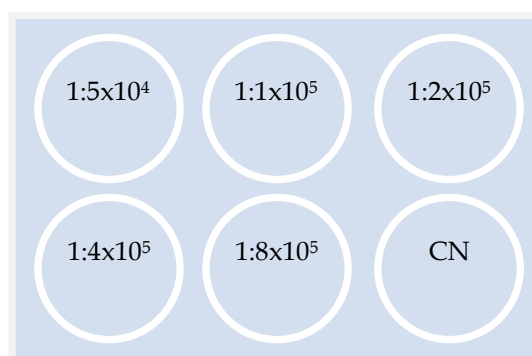
h a 4 °C. Una vez obtenido el pellet, decantamos el sobrenadante cuidadosamente sobre una solución de agua con lejía al 10% y después resuspendimos el pellet en PBS pipeteando hacia arriba y hacia abajo unas 20-30 veces.

Después de esto, las partículas virales concentradas se alicuotaron y se conservaron a -80 °C hasta su utilización. Una de estas alícuotas se utilizó para determinar el título viral obtenido.

Titulación viral

La titulación viral se llevó a cabo infectando células de la línea NHI 3T3 (del inglés: *national institute of health*) utilizando distintas diluciones de los sobrenadantes virales concentrados. Estas células fueron cultivadas con el mismo medio que las HEK 293FT sin geneticina y en las mismas condiciones de CO₂ y temperatura.

24 h antes de la transducción se sembraron $1,5 \times 10^5$ células por pocillo (en placas de 6 pocillos). En el momento de la transducción hicimos las diluciones de virus concentrados que se detallan a la derecha en un volumen final de 750 μ l de medio al que se le añadió un polímero catiónico (polibreno) a una concentración



de 8 μ g/ml. El control negativo (CN) se compone del mismo medio que no contenía virus.

El polibreno es un polímero de bajo peso molecular capaz de unirse a las células, neutralizando su carga superficial, lo que permite que las glicoproteínas virales se unan más eficazmente a sus receptores, reduciendo la posible repulsión entre la partícula viral y la célula.

Las células se dejaron en contacto con los virus durante 16 h y después se añadió 1 ml más de medio. A las 48 h las células se levantaron mediante tripsinización (método explicado para las células HEK 293FT) y se resuspendieron en PBS para su posterior análisis del nivel de fluorescencia (células positivas para GFP) mediante citometría de flujo. A partir del porcentaje de células positivas para GFP se calculó el título viral en unidades transductoras por ml (TU/ml) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{TU/ml} = (\% \text{ células infectadas}/100) \times \text{N}^\circ \text{ células en } t_0 \times \text{FD}$$

Donde, N° **células en t_0** es el número de células que teníamos en el momento de la transducción o infección (teniendo en cuenta que estas células se duplican cada 24 h, tendríamos 3×10^5) y **FD** es el factor de dilución.

Cultivos de progenitores embrionarios de LGE de ratón

Estos cultivos fueron utilizados para valorar el grado de silenciamiento producido por el DCXshRNA. En primer lugar valoramos la expresión de la proteína, mediante inmunofluorescencia, western-blot y mediante PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*), en estas células en distintas condiciones. A continuación, llevamos a cabo la infección con virus concentrados y, mediante PCR cuantitativa, determinamos los niveles de distintos mRNAs para valorar, tanto el grado de silenciamiento, como el impacto en la expresión de otros genes. Estos estudios se realizaron en el Dpto. Biología Celular, Immunología i Neurociències de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona en el laboratorio de los doctores Josep Canals y Jordi Alberch.

El aislamiento y cultivo de CME (células madre embrionarias) se llevó a cabo utilizando ratones de la cepa B6CBA gestantes. Las hembras preñadas se sacrificaron a E14.5 y los fetos se extrajeron rápidamente del útero mediante cesárea. Los cerebros de los fetos fueron extraídos de los cráneos y conservados en PBS pH 7,4 estéril. A continuación se llevó a cabo la disección, bajo lupa, de la LGE (del inglés, *lateral ganglionic eminence*) de forma bilateral. Las LGEs se mezclaron con 3 ml de medio control (tabla 8) y se disgregaron con ayuda de una pipeta Pasteur hasta conseguir una suspensión homogénea. A continuación se añadieron otros 3 ml de medio control y se centrifugaron a $250 \times g$ durante 7 min. El pellet se resuspendió en 1 ml de medio completo (tabla 8) y las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 células/ml.

Mantenimiento

Las células madre crecieron y se mantuvieron en estado indiferenciado formando unas agregaciones esféricas conocidas como neuroesferas. Cuando las neuroesferas sobrepasan un determinado tamaño, el oxígeno y los nutrientes no llegan bien a las células centrales, que van progresivamente muriendo. Antes de que esto ocurra, las células se disgregan y se resiembran. Para ello se recogió la suspensión con las neuroesferas en un tubo cónico y se centrifugó a 500-750 rpm durante 7-10 min. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de medio control (tabla 8). Posteriormente se disgregaron las neuroesferas de forma mecánica para obtener células individualizadas con ayuda de una pipeta, aspirando unas 40 veces apoyando la punta

en el fondo del tubo. Se añadió 1 ml de medio control por cada 5 ml de suspensión inicial de neuroesferas. Centrifugamos 10 min a 1000 rpm, eliminamos el sobrenadante y resuspendimos en medio completo (tabla 8). Cuando el objetivo de la siembra era la expansión y el mantenimiento, las células se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm².

Tabla 8. Composición de los medios de cultivos utilizados para el cultivo de los progenitores embrionarios de LGE de ratón

MEDIO CONTROL (V _f 500 ml)			
DMEM (Gibco-BRL)			250 ml
DMEM F12 (Gibco-BRL)			250 ml
Glucosa 30% (Sigma-Aldrich)			6 ml
Hepes 1M (Gibco-BRL)			2.5 ml
L-glutamina/penicilina/estreptomicina (Gibco-BRL)			5 ml
Heparina 0.2 % (Sigma Aldrich)			1 ml
BSA (Sigma Aldrich)			2 g
Suplemento N2 (Gibco-BRL)			5 ml

A partir del medio control se obtienen los demás medios añadiendo EGF, FGF y/o FBS en la concentración detallada.

	EGF	FGF	FBS
MEDIO COMPLETO	20 ng /ml	10 ng/ml	
MEDIO DE DIFERENCIACIÓN 1 (MD1)		10 ng/ml	
MEDIO DE DIFERENCIACIÓN 2 (MD2)			2%

Análisis de diferenciación

Para diferenciar las células madre a distintos tipos celulares, adherimos las células a la superficie bajo determinadas condiciones de cultivo que propician la diferenciación.

Cuando nuestro objetivo fue obtener RNA o extractos proteicos, sembramos 2×10^5 células en pocillos de $9,5 \text{ cm}^2$; para la realización de las técnicas de inmunofluorescencia, sembramos $2,5 \times 10^4$ células en pocillos de 2 cm^2 .

Estas células se dejaron crecer en suspensión hasta el día siguiente, que es cuando se transfirieron a una superficie tratada para que las células se adhirieran. Las superficies de siembra (placas de 6 pocillos de $9,5 \text{ cm}^2$ o los cubreobjetos para placas de 24 pocillos de 2 cm^2) se cubrieron con Matrigel™ Matrix (BD Bioscience, Madrid, España) diluido 1:50 en medio control durante al menos una hora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y se lavaron después abundantemente con PBS.

Realizamos tres tipos de diferenciaciones: a neuronas (en proporción mayoritaria), a astrocitos (en proporción mayoritaria) y mixta (proporciones similares de neuronas y glía). Las condiciones de cultivo se detallan en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones cultivo para los diferentes tipos de diferenciaciones.

	D1	D2	D3	D6
NEURONAS	Siembra y MD1	Adhesión	R.M. o cambio de medio MD1	R.M.
ASTROCITOS	Siembra y MD2	Adhesión	R.M. o cambio de medio MD2	R.M.
MIXTO	Siembra y MD1	Adhesión	R.M. o cambio de medio MD2	R.M.

En el día de la siembra las células se pusieron en contacto con los medios de diferenciación indicados. El día 2 las células se adhirieron a la superficie tratada con matrigel y se mantuvieron en el mismo medio. En el día 3 se recogieron las muestras de 3 días de diferenciación (3D DIF) o se cambió el medio por medio fresco con la composición adecuada. El día 6 se recogieron las muestras de 6 días de diferenciación (6D DIF) en cada caso.

Al final, teníamos muestras tanto de neuroesferas proliferantes que llevaban 2 días creciendo como tales (Nfs 2 D), como muestras de diferenciaciones. Las muestras de cada uno de los tipos de diferenciación eran de 3 días en diferenciación o de 6 días de diferenciación. En total teníamos 7 grupos experimentales: Nfs 2 D, 3 D Dif N, 3 D Dif A, 3 D Dif M, 6 D dif N, 6 D Dif A y 6 D Dif M; donde N, A y M son neuronas, astrocitos y cultivo mixto respectivamente.

Inmunofluorescencia y western-blot

Para llevar a cabo las técnicas de inmunofluorescencia, los cubreobjetos con las células en diferenciación se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 15 min. En el caso de Nfs 2 D, las neuroesferas se unieron a cubreobjetos tratados con matrigel durante 15-20 min y posteriormente se fijaron del mismo modo. Los siguientes pasos del protocolo de inmunofluorescencia fueron los mismos que en el caso de los cultivos primarios de neuronas, ya explicado anteriormente, con algunas modificaciones. En este caso no se realizó la incubación con metanol y los anticuerpos primario y secundario se diluyeron en una mezcla de PBS, Triton X-100 (0.2 %) y suero de caballo (Sigma-Aldrich) al 5 %.

Para llevar a cabo la extracción de proteínas en el caso de las diferenciaciones, las células se tripsinizaron del modo descrito con anterioridad y, en el caso de las muestras Nfs 2 D, las neuroesferas en suspensión se centrifugaron directamente. A partir de los *pellets* celulares se extrajeron las proteínas añadiendo solución de extracción (tabla 6) y se realizó todo el proceso y el protocolo de western blot como describimos anteriormente.

Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo según se detalla en apartado dedicado a la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa.

Transducción lentiviral de los progenitores embrionarios

La transducción lentiviral se llevó a cabo con sobrenadantes virales concentrados que expresaban DCX-shRNA o *scramble*DCX-shRNA.

Para determinar el grado de silenciamiento de la proteína, se realizó en células que después fueron diferenciadas a cultivo mixto, ya que, esa era la condición en la que la expresión de la proteína era más alta, y por tanto, donde se podría valorar mejor el grado de silenciamiento. El día de la siembra (día 1), se añadieron los virus concentrados a una dilución 1:1000 en el medio de cultivo MD1 y se mantuvieron en este medio hasta el día 3, en el que se cambió el medio por medio MD2. En el día 6 se recogieron las muestras (shDCX y control) mediante tripsinización (como se ha descrito anteriormente) y realizamos la extracción de RNA para llevar a cabo los análisis de PCR cuantitativa.

Para determinar el nivel de expresión de los demás genes estudiados, la infección se realizó en las mismas condiciones y las células crecieron como neuroesferas en flotación durante 5 días, momento en el cual las células se recogieron mediante

centrifugación y se realizó la extracción de RNA.

Ensayo de PCR cuantitativa

El RNA se obtiene, por una parte de los grupos definidos en el apartado de análisis de diferenciación, y por otra, a partir de muestras de 6 días de diferenciación mixta infectadas con los virus recombinantes que expresan el DCX-shRNA o bien el *scramble*DCX-shRNA.

En este caso la extracción de RNA se realizó utilizando el *kit* comercial “Total RNA Isolation Nucleospin RNA II Kit” (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones marcadas por el fabricante.

De este RNA se utilizaron 500 ng para sintetizar cDNA utilizando *primers* aleatorios y el *kit* comercial “StrataScript First Strand cDNA Synthesis System” (STRATAGENE, Amsterdam, Holanda). La síntesis de cDNA se realizó siguiendo el protocolo facilitado por la casa comercial.

Una vez sintetizado el cDNA, éste se analizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando los ensayos de expresión génica comerciales TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para los genes 18S, Nestina, GFAP, β III tubulina, Olig1, Olig2 y DCX. La técnica se realizó en placas de 96 pocillos utilizando un tampón de reacción con 12,5 Brilliant® QPCR Master Mix (STRATAGENE®), 0,4 μ l de ROX Reference Dye (Invitrogen), 1,25 μ l TaqMan® Gene Expression Assays y 10-20 ng de cDNA diluidos en H₂O libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 μ l.

La reacción consta de una fase de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min y 40 ciclos de una reacción de PCR de dos pasos: 95 °C durante 30 seg y 60 °C durante 1 min.

El análisis de los resultados se realizó utilizando la versión 3.0 del software MxPro™ QPCR (STRATAGEN®). La cuantificación se realizó mediante análisis cuantitativo comparativo expresado como n veces la diferencia de expresión relativa respecto al control utilizado en cada caso. En todos los casos, estos datos fueron normalizados respecto al control 18S. Todos los ensayos se repitieron un mínimo de 3 veces y únicamente las muestras que mostraron resultados consistentes fueron utilizadas para el posterior análisis. Los controles negativos utilizados, a fin de excluir la contaminación por DNA genómico, se obtuvieron omitiendo la transcriptasa inversa en el paso de la síntesis de cDNA. Estas muestras fueron sujetas a la reacción de PCR de la misma manera con cada una de las sondas TaqMan® analizadas.

Para el estudio *in vivo* se utilizaron animales macho, de la especie *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) raza Wistar albina, de entre 280-340 g de peso corporal, adquiridas en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Todos los animales fueron estabulados con acceso a comida y agua *ad libitum* en una habitación que se mantuvo a temperatura (19-22 °C) y humedad relativa constante (40-50 %) siguiendo un fotoperiodo artificial de 12/12 h.

En todos los casos los animales se mantuvieron, manipularon y sacrificaron según lo establecido en la directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC) y la legislación española (Real Decreto 1201/2005) vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Inyecciones estereotáxicas

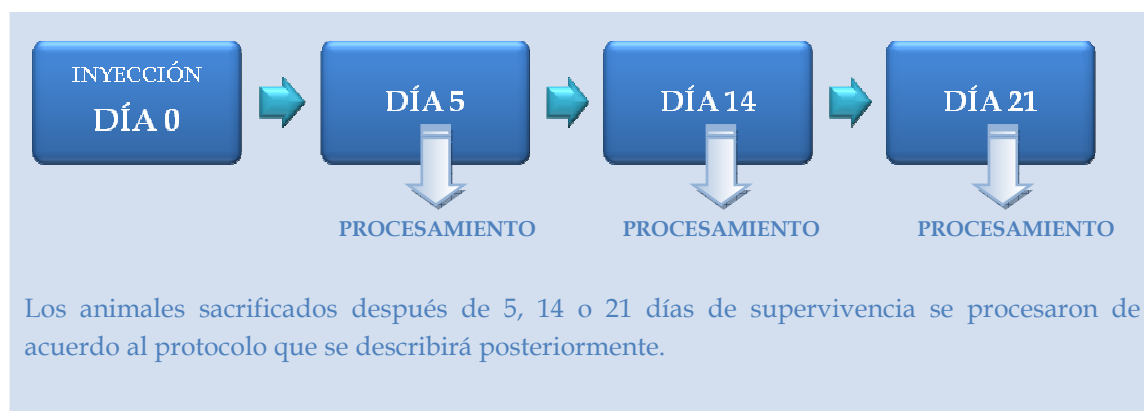
Para la intervención quirúrgica, los animales se anestesiaron intraperitonealmente con una solución compuesta por Ketamina (1 ml/kg de peso corporal, Imalgène 1000®, Merial) y Xilacina (0.5 ml/kg de peso corporal, Rompún® 2%, Bayer). Tras comprobar la ausencia de reflejo parpebral, las ratas se colocaron en un aparato estereotáxico (David Kopf® Instruments, EE.UU.). Éste es un dispositivo mecánico que inmoviliza totalmente la cabeza del animal para así permitir alcanzar con precisión cualquier punto del cerebro mediante el cálculo de sus coordenadas registradas en un atlas estereotáxico a partir de un punto de referencia, en nuestro caso *Bregma*, que es el punto de unión entre las suturas coronal y sagital.

Una vez sujeto el animal, se practicó una incisión en la piel del dorso de la cabeza dejando expuesto el cráneo para así determinar las coordenadas de *Bregma*. A partir de estas coordenadas se determinó el punto de inyección. Las coordenadas seleccionadas para el punto de inyección, el asta dorsal del ventrículo lateral, fueron: rostrocaudal 1,0 mm (con respecto a *Bregma*), lateromedial 1,4 mm (con respecto a *Bregma*) y dorsoventral 3,5 mm (con respecto a la duramadre). La barra de sujeción de los incisivos se situó 2,0 mm por debajo de la línea interaural.

En el hemisferio izquierdo de cada uno de los animales se inyectaron 10 µl de lentivirus recombinantes (pLVTHM-DCX-shRNA o pLVTHM-scrambleDCX-shRNA) concentrados usando una jeringuilla Hamilton serie 700 (VWR International, Bélgica) acoplada a una bomba de microperfusión UltraMicroPump III (World Precision Instruments Inc., Sarasota, EE.UU.) conectada, a su vez, a un controlador Micro4™

(World Precision Instruments Inc.). Para evitar incrementos bruscos de la presión intracraneal, la inyección se llevó a cabo a una velocidad constante de 0,75 $\mu\text{l}/\text{min}$. Una vez finalizada la inyección, la jeringuilla se mantuvo en la misma posición durante 5 min para evitar el reflujo del líquido y después se extrajo lentamente.

Una vez finalizado el proceso, la herida fue suturada con seda trenzada (5/0) y los animales se devolvieron a sus jaulas hasta el momento del sacrificio. Los tiempos de supervivencia y los grupos experimentales para los análisis *in vivo* fueron tal y como se detalla:



Obtención y preparación del tejido

Sacrificio y disección

A cada tiempo establecido, los animales fueron anestesiados profundamente mediante inyección intraperitoneal con una solución compuesta por Ketamina (1 ml/kg de peso corporal, Imalgène 1000®, Merial) y Xilacina (0.5 ml/kg de peso corporal, Rompún® 2%, Bayer). Tras comprobar la ausencia de reflejo palpebral los animales se colocaron sobre una rejilla para proceder a la fijación mediante perfusión intracardiaca.

Para ello se abrió la caja torácica, dejando expuesto el corazón, administrando 0,2 ml de heparina (1%) directamente en el corazón para evitar la formación de coágulos sanguíneos. Se introdujo una cánula en el ventrículo izquierdo alcanzando la aorta ascendente y se realizó un corte en la aurícula derecha para drenar la sangre y dar salida a los líquidos de perfusión. La cánula estaba conectada a una bomba peristáltica que infundía una solución lavadora compuesta de cloruro sódico al 0,9% en H₂O Milli-Q. A continuación se infundieron 350 ml de una solución fijadora (variante

de la solución de Somogyi y Takagi, 1982) compuesta por paraformadehído al 4% (p/v) y ácido pícrico al 0,2% (p/v) en TF.

Tras la fijación, los cerebros fueron extraídos de los cráneos y se seccionaron en bloques y se mantuvieron sumergidos en la misma solución fijadora durante 2 horas a 4°C. Los restos de solución fijadora se eliminaron con varios lavados de 15 minutos en TF. Posteriormente, los bloques de tejido se sumergieron en una solución crioprotectora compuesta por sacarosa 30 % (p/v) en TF a 4 °C en agitación hasta que quedan completamente sumergidos. Posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

Seccionamiento

Los bloques fueron seccionados en congelación utilizando un micrótopo de deslizamiento (Jung SM 2000, cuchilla tipo C, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Alemania) acoplado a una unidad de congelación (Frigomobil, Leica). Se realizaron secciones de 40 µm de grosor que se recogieron de forma seriada sobre placas de 24 pocillos que contenían TF frío. Mediante lavados sucesivos en este mismo tampón se eliminaron los restos del medio de encastrado y fijador. Las secciones fueron almacenadas en TF a 4°C con azida sódica al 0,05 % hasta su procesado.

Inmunohistoquímica convencional

Una vez obtenidas las secciones de tejido, se llevó a cabo la detección de diferentes antígenos mediante el método inmunohistoquímico de la avidina-biotina-peroxidasa o mediante técnicas de inmunofluorescencia tanto simples como dobles. El protocolo seguido fue el siguiente:

Las secciones se lavaron con TF (3x10 min). Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios específicos (tabla 10) durante 72 h a 4 °C en agitación. Estos anticuerpos primarios se diluyeron en TF con suero normal (Sigma-Aldrich) al 5% (v/v) y Triton X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,2%. Tras volver a lavar (3x10 min) con TF las secciones, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, bien unido a biotina (Vector) o combinado con el fluorocromo correspondiente, cianinas 2 ó 3 (Cy2, Cy3; Jackson) (tabla 10), en dilución 1:200 y 1:500 respectivamente, en TF durante 2 h en agitación a TA.

Las secciones que iban a ser reveladas mediante el método ABC, se lavaron con TF (3x10 min) y se incubaron con el complejo ABC (Vector) diluido 1: 250 en TF más Triton X-100 0,05 % durante 1 h a TA. Finalizada la incubación, las secciones se lavaron

con TF (3x10 min) y, posteriormente, se detectó la actividad peroxidasa histoquímicamente, incubando las secciones en un medio de revelado que contenía H₂O₂ (PanReac) al 0,003% (v/v) y el cromógeno 3, 3'-diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich) al 0,05% (p/v) en tampón Tris-HCl 0.2 M pH 7,6. La reacción se controló al microscopio y se detuvo, mediante 2 lavados de 10 min de TF, cuando se alcanzó la tinción óptima de elementos positivos respecto a la tinción inespecífica de fondo. Finalmente, las secciones fueron montadas sobre porta-objetos gelatinizados, ordenadas rostro-caudalmente. A continuación se deshidrataron en una serie de etanol de graduación creciente, se aclararon con xileno y se montaron con Entellan® (Merck).

Las secciones reveladas con fluorocromos, previo a su montaje, se contrastaron con DAPI (del inglés, *4',6-diamidino-2 phenylindole*; Sigma-Aldrich) mediante incubación durante 10 min con una dilución de este compuesto 1:10000 en TF. Finalmente, se montaron sobre portaobjetos gelatinizados, ordenadas de manera rostro-caudal, y se sellaron con Mowiol como medio de preservación de la fluorescencia.

PREPARACIÓN DE MOWIOL

1. Añadir 6g de glicerol (PanReac) en un vaso de precipitados y añadir lentamente 2.4 g de Mowiol 4-88 (Fluka), mientras se va mezclando.
2. Añadir 6ml de H₂O destilada y dejar a TA toda la noche.
3. Añadir 12ml de tampón Tris (Sigma) 0.2M pH6.8 y calentar 10 min a 50 °C, mezclando de vez en cuando.
4. Cuando se disuelva el Mowiol, pasar a tubos de 15ml y centrifugar 15 min a 5000 rpm. Se guarda congelado y a la alícuota en uso se le pone N-Propilgalato (Sigma) al 10% (p/v) y se centrifuga 4 min a 4000 rpm

Controles de la técnica inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia

Los controles de la técnica inmunohistoquímica fueron los siguientes:

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

B) Eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios, por si existen uniones inespecíficas del anticuerpo secundario y del complejo ABC respectivamente.

C) Supresión de las incubaciones con el anticuerpo primario, secundario y complejo ABC, y realización de la histoquímica de la peroxidasa para poner de manifiesto una posible actividad peroxidasa endógena.

Anticuerpo 1 ^{ario}	Casa comercial	Concentración	Anticuerpo 2 ^{ario}
Anti-GFP	abcam	1:4000	Anti-conejo
Anti-GFP	abcam	1:2000	Anti-cabra
Anti-DCX	abcam	1:750	Anti-conejo
Anti-DCX	Chemicon	1:10000	Anti-cobaya
Anti-Iba 1	Wako	1:500	Anti-conejo
Anti-GFAP	Sigma	1:2000	Anti-ratón
Anti-Olig2	Chemicon	1:1000	Anti-conejo

Tabla 10. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Cuantificación

Con objeto de mantener un criterio constante a la hora de realizar las comparaciones entre el grupo experimental y el grupo control, definimos 5 niveles de análisis a lo largo del eje rostrocaudal del BO. La elección de estos niveles, la realizamos de tal modo que, en conjunto, constituyeran una completa representación de la anatomía del BO.

En el momento del seccionamiento, el primer corte recogido correspondió a la primera sección rostral en la que se distinguen por primera vez, y de modo continuo, la capa de las células mitrales y la capa glomerular. El primer nivel corresponde al corte número 5 de la serie primera de cada uno de los animales. A partir de este nivel seleccionamos uno de cada dos cortes de la serie hasta alcanzar el que fuera el nivel 5, donde el área del núcleo olfatorio anterior es aproximadamente igual al área ocupada por el BO.

Análisis cuantitativos de GFP

Para analizar la distribución de las células de nueva generación en el BO bajo las distintas condiciones experimentales, realizamos el recuento de las células positivas a GFP, en cada uno de los niveles descritos anteriormente, utilizando el programa informático Neurolúcida (MicroBrightField). Para ello, analizamos la distribución de los elementos positivos en tres áreas del BO: las capas supramitrales (que incluyen la capa glomerular, la capa plexiforme externa y la capa de las células mitrales), la CGr superficial, la CGr profunda y la SBPE. Para poder establecer una comparación entre

los diferentes grupos experimentales, los datos se expresaron como porcentajes relativos de células positivas en cada una de las zonas definidas con respecto al total de células GFP positivas. Además, con el fin de investigar las posibles diferencias en la maduración de los granos, que representan la gran mayoría de las células de nueva generación, a la hora del recuento, se diferenciaron distintos tipos celulares en base a criterios morfológicos, tal como los describen Petreanu y Álvarez-Buylla (2002).

Para determinar las posibles diferencias tanto en la morfología, la ramificación y la longitud de los árboles dendríticos como en la densidad de espinas dendríticas, realizamos reconstrucciones completas de células con el programa informático NeuroLúcida.

Análisis estadísticos

Para realizar los diferentes análisis estadísticos utilizamos el programa SPSS para Windows (versión 15.0; Inc., Chicago, EE.UU.), llevando a cabo diferentes test dependiendo de las características de los datos a analizar. Previamente se analizó la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Si éstos resultaban paramétricos se aplicó el test de la t de Student, por el contrario, los datos no-paramétricos se analizaron mediante el test U de Mann Whitney. En todos los casos el nivel mínimo de significación se fijó en el 95 %, por lo que consideramos como diferencias significativas los análisis en los que el valor de $p < 0,05$.

Documentación y tratamiento de imágenes

La documentación fotográfica de los resultados se realizó con dos microscopios equipados con campo claro y epifluorescencia: (1) un Olympus AX70 conectado a una cámara digital (Olympus DP70) con los programas DP Manager y DP Controller para tomar y procesar las micrografías y (2) un Olympus AX70 equipado con una cámara XM10 y el programa Cell[^]F. Para los análisis de colocación se obtuvieron imágenes de planos focales con un microscopio láser confocal (Leica TCS SP2) usando láseres de ArKr (488 nm), HeNe (543 nm) y HeNe (633 nm).

Posteriormente, todas las imágenes se procesaron digitalmente con el programa Adobe® Photoshop® CS (Adobe Systems Incorporated). El tratamiento tan solo incluyó modificaciones del tamaño y/o la resolución, así como los ajustes necesarios de brillo y contraste para mejorar la calidad de las mismas.

RESULTADOS

SILENCIAMIENTO *IN VITRO* MEDIANTE siRNA

Bai y colaboradores en el 2003 aplicaron la tecnología del RNA de interferencia para silenciar la expresión de DCX con el fin de determinar el papel de esta proteína en el desarrollo cortical de roedores. Estos autores fueron capaces de disminuir la expresión de la proteína mediante un shRNA dirigido contra la región 3'-UTR (del inglés: *untranslated region*) del mRNA de la DCX.

Con el fin de comprobar la efectividad de la secuencia publicada, y como paso inicial de nuestro estudio, llevamos a cabo la transfección de moléculas de DCX-siRNA (de igual secuencia que la publicada por Bai y colaboradores en 2003) en cultivos primarios de neuronas corticales, células que presentan un elevado nivel de expresión de esta proteína. Tras la transfección, determinamos el grado de silenciamiento proteico producido por el siRNA mediante la inmunodecección de DCX por inmunofluorescencia y western-blot. Se establecieron dos grupos experimentales en los que las células fueron transfectadas con un NT-RNA, moléculas de siRNA que carecen de mRNA diana (control), y con DCX-siRNA. Nuestros resultados (figura 6) coinciden con los ya publicados por Bai y colaboradores (2003) en los que los niveles de expresión de la proteína descienden notablemente en el caso de los cultivos transfectados con el DCX-siRNA respecto al grupo control.

CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE shRNA

Una vez corroborada la eficacia del silenciamiento ejercida por la secuencia utilizada como DCX-siRNA, pasamos a diseñar un sistema de expresión constitutiva de modo que obtuviéramos un silenciamiento estable a lo largo del tiempo. Para ello clonamos *cassettes* de expresión de DCX-shRNA y scrambleDCX-shRNA (su correspondiente control) en el vector lentiviral pLVTHM bajo la dirección del promotor H1 de la RNA polimerasa III (Figura 7a). Este vector contiene, además, el gen reportero GFP bajo la dirección del promotor CMV (promotor temprano del citomegalovirus) lo cual nos permite realizar un seguimiento de las células que expresan los shRNAs mediante la identificación de su coexpresión con GFP.

Determinación de la expresión de shRNA mediante norther-blot

Con objeto de determinar los niveles de expresión a nivel transcripcional del shRNA procedimos a la detección del transcrito DCX-shRNA. Para ello obtuvimos RNAs enriquecidos en moléculas de RNA de pequeño tamaño a partir la línea celular 293FT previamente transfectada con el vector DCX-shRNA-pLVTHM, una vez comprobada la expresión del gen reportero GFP. Los RNAs fueron fraccionados en geles de acrilamida, transferidos a membranas de nailon e hibridados con una sonda LNA (del inglés, Locked Nucleic Acids) con la secuencia *con sentido* del DCX-siRNA marcada radiactivamente. Como control positivo utilizamos una mezcla de los dos oligonucleótidos que componen el *cassette* de expresión DCX-shRNA, que tienen una longitud de 73 y 71 pb.

Los resultados obtenidos mostraron que el promotor H1 utilizado por nosotros, al igual que el promotor U6 utilizado por Bai y colaboradores (2003), es capaz de expresar de forma eficaz los transcritos shRNA. Por otro lado, comprobamos que el DCX-shRNA era reconocido, y posteriormente procesado, en el interior de la célula por la maquinaria de silenciamiento, ya que, observábamos una banda que corresponde al DCX-siRNA maduro. El DCX-shRNA se expresa en forma de pre-shRNA y es procesado intracelularmente hasta obtener un siRNA maduro (figura 7b). Después, la hebra no codificante o *con sentido* se degrada y la hebra codificante o *antisentido* es la que media el silenciamiento. Nuestros resultados muestran una banda que se corresponde con la hebra codificante del siRNA maduro (figura 7c).

GENERACIÓN DE LENTIVIRUS RECOMBINANTES

Una vez realizada la construcción del pLVTHM-DCXshRNA y las comprobaciones detalladas con anterioridad, llevamos a cabo la construcción del correspondiente control pLVTHM-*scramble*DCX-shRNA tal y como se detalla en la sección “Material y Métodos”. A partir de estos esqueletos virales productores de unidades shRNA se generaron sobrenadantes lentivirales utilizando la línea celular 293FT.

Los sobrenadantes virales se concentraron mil veces mediante ultracentrifugación y determinamos su concentración final mediante infección de la línea celular NHI 3T3. El título viral se estableció a partir del porcentaje de células positivas a GFP en cinco diluciones virales seriadas tal y como se detalla en el apartado “Material y Métodos”.

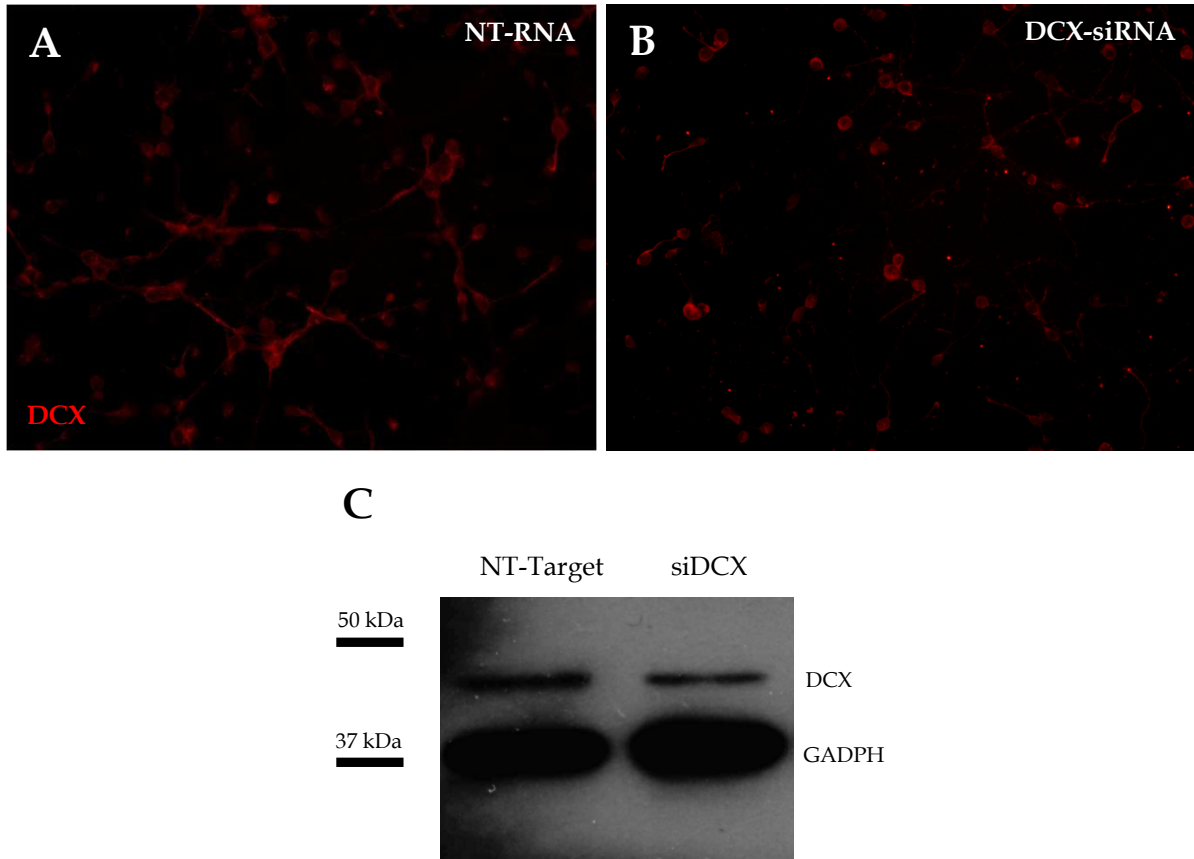


Figura 6. Silenciamiento *in vitro* de la expresión de doblecortina. (A-B) Imágenes de microscopía de epifluorescencia de cultivos de neuronas corticales que han sido transfectadas con NT-RNA (A) y con DCX-siRNA (B) marcadas con DCX. Se puede observar la reducción en el número de elementos inmunofluorescentes para DCX en el cultivo transfectado con el siRNA, así como la diferente morfología, fundamentalmente reflejada en las neuritas respecto al cultivo transfectado con NT-RNA (C) Western-blot para DCX en el que se ha realizado la detección de GADPH como control de carga. Puede observarse la reducción en la banda correspondiente a DCX en el caso de la transfección con siRNA

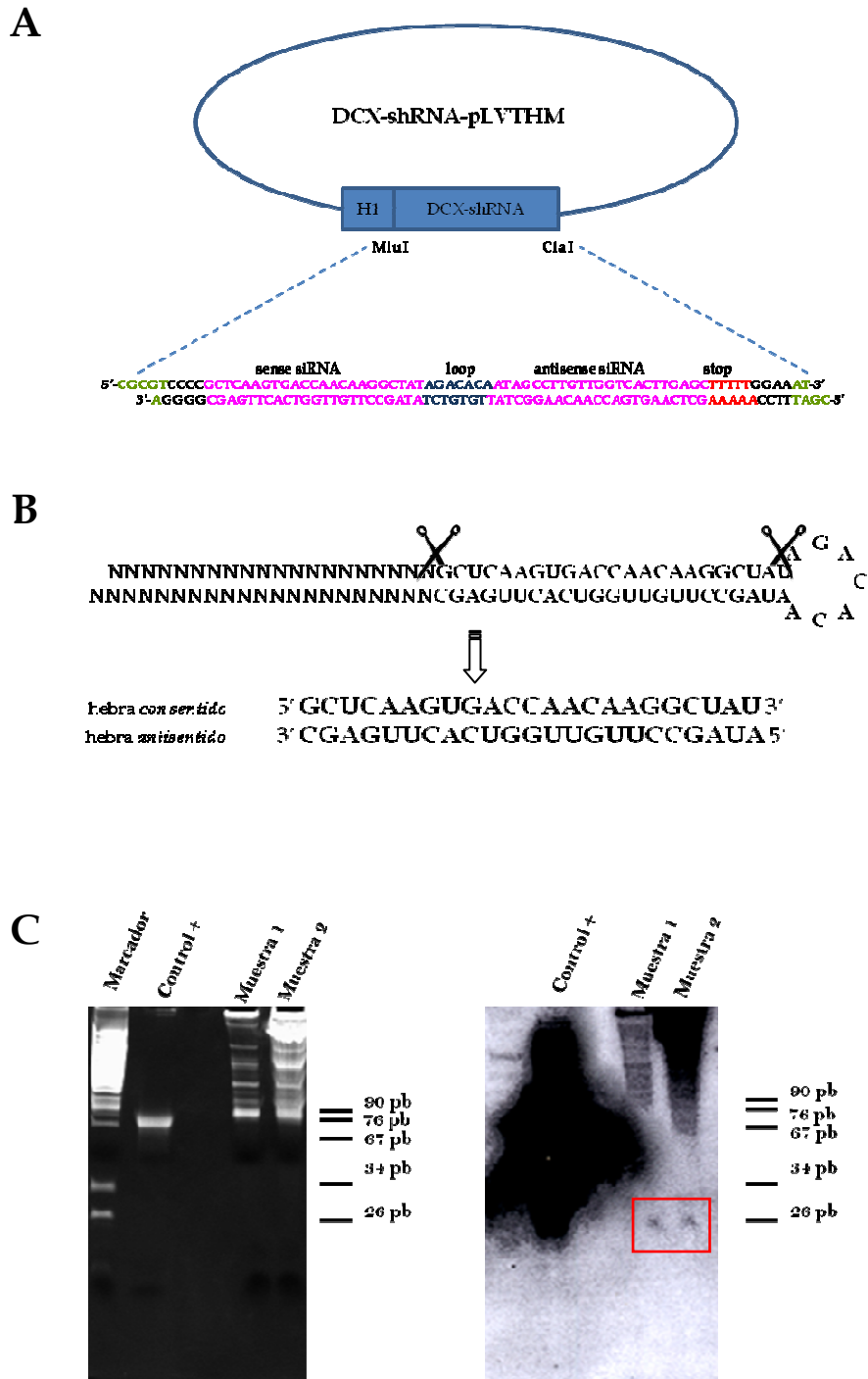
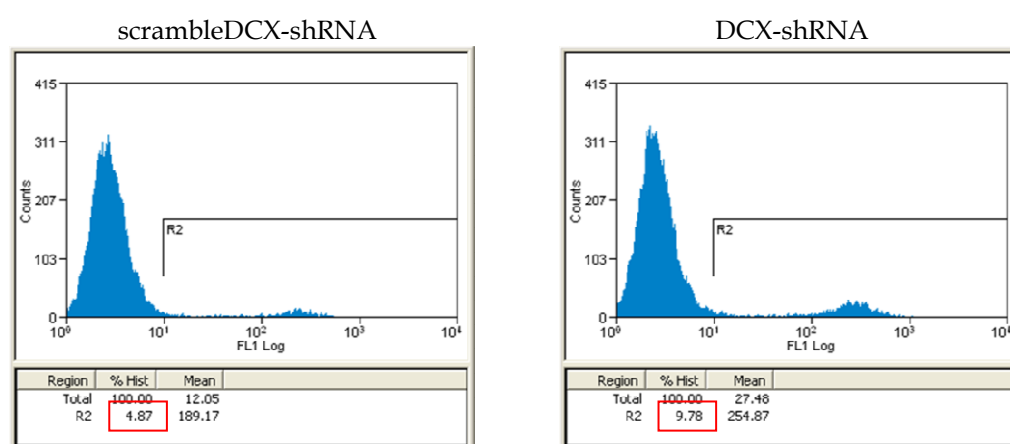


Figura 7. Construcción de un sistema de expresión constitutiva de shRNA. (A) Esquema del vector de expresión de DCX-shRNA. (B) Estructura secundaria predicha para la molécula de pre-DCX-shRNA y para el DCX-siRNA maduro. (C) Detección de DCX-shRNA por hibridación mediante Northern-blot. A la izquierda se muestra el gel de acrilamida con los RNAs resueltos teñidos con bromuro de etidio y a la derecha la membrana hibridada con la sonda específica y revelada mediante autoradiografía. Mediante esta técnica detectamos la hebra antisentido del DCX-siRNA maduro (recuadro rojo).

Elegimos como dilución de trabajo aquella con la que obteníamos un porcentaje de células GFP positivas mayor del 1%.

En las gráficas se muestran los porcentajes de células GFP positivas (recuadro rojo) con respecto al total de células infectadas con los virus scrambleDCX-shRNA y DCX-shRNA a una dilución 1×10^5 y 2×10^5 respectivamente. En el eje X se representa el nivel de emisión de fluorescencia (*FL 1 Log*) y en el eje Y el número de células (*counts*). Las células situadas en la región R2 son las células positivas a GFP, esa región se determinó haciendo previamente un blanco con células de la línea celular NHI 3T3 sin infectar.



En la siguiente tabla se detalla el porcentaje de células infectadas, el número de células total en el día de la infección, el factor de dilución y el título viral hallado en cada caso.

	% células infectadas	Nº células en t_0	FD	TU/ml
scrambleDCX-shRNA	9,78	3×10^5	1.0×10^5	2.94×10^9
DCX-shRNA	4,87	3×10^5	2.0×10^5	2.92×10^9

SILENCIAMIENTO *IN VITRO* MEDIANTE shRNA

El siguiente objetivo planteado fue conocer el grado de silenciamiento *in vitro* producido por el DCX-shRNA. En esta ocasión, utilizamos cultivos de progenitores embrionarios de LGE de ratón. En primer lugar, determinamos en estas células la expresión de DCX tanto en condiciones proliferativas (neurosferas en flotación) como

en condiciones de diferenciación a distintas estirpes celulares. A continuación, seleccionamos aquella condición en la que la expresión de nuestra proteína era mayor, realizamos la infección con lentivirus productores de DCX-shRNA y scrambleDCX-shRNA (a partir de ahora nos referiremos a esta construcción como control) y determinamos, mediante PCR cuantitativa, los niveles de expresión del mRNA para DCX, así como el de otros transcritos pertenecientes a diferentes genes que consideramos que podrían estar implicados de alguna manera en los procesos de diferenciación neural.

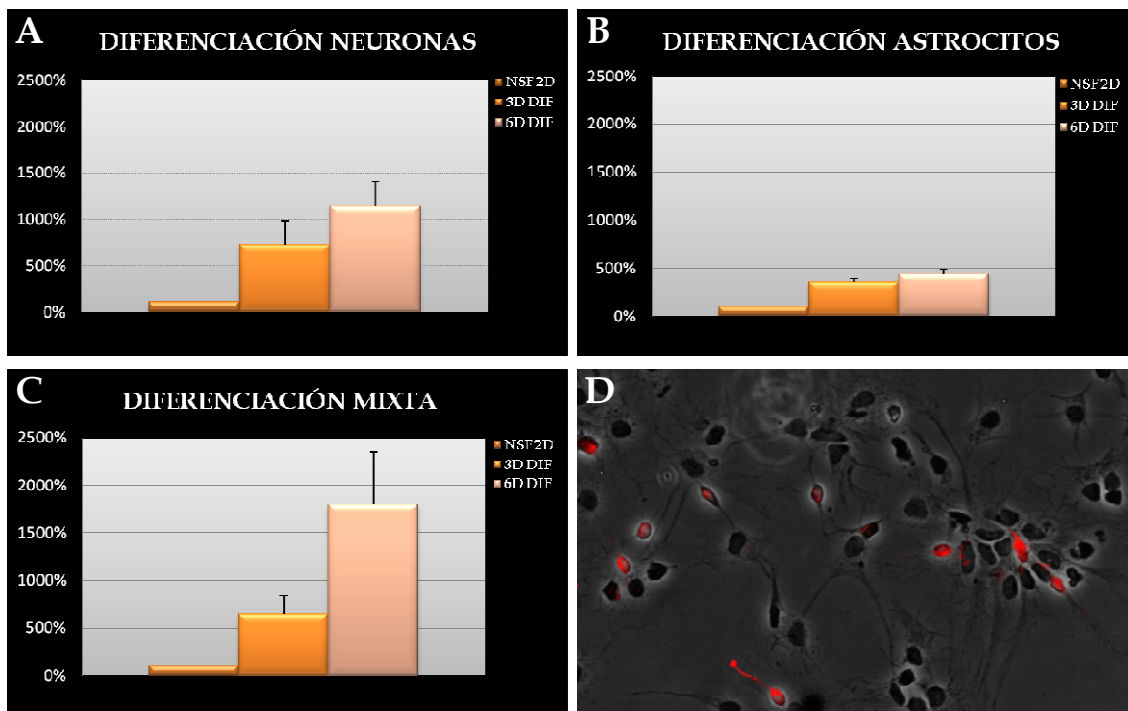
Determinación de la expresión de doblecortina

Determinamos la expresión de DCX mediante PCR cuantitativa, inmunofluorescencia y western-blot en cada una de las siguientes muestras:

- Nfs 5D..... Neuroesferas de 5 días
- 3 D Dif..... N 3 días de diferenciación a neuronas
- 3 D Dif A..... 3 días de diferenciación a astrocitos
- 3 D Dif M..... 3 días de diferenciación mixta (neuronas+glía)
- 6 D dif N..... 6 días de diferenciación a neuronas
- 6 D Dif A..... 6 días de diferenciación a astrocitos
- 6 D Dif M..... 6 días de diferenciación mixta (neuronas+glía)

Los resultados obtenidos tras realizar la PCR cuantitativa indicaron que los niveles del mRNA de DCX aumentaban a lo largo del tiempo en cultivo en todas las muestras analizadas (figuras 8a-c). La DCX es una proteína específica de neuronas, no habiéndose detectado en células gliales (Rao y Shetty, 2004), sin embargo, detectamos expresión de su mRNA en cultivos de astrocitos. Consideramos que los niveles que se pudieran encontrar en estas muestras se debían a las pocas células de estirpe neuronal que se pudieran encontrar en estos cultivos, ya que, no son cultivos puros.

Por otro lado, mediante inmunofluorescencia y western-blot sólo obtuvimos resultados positivos en el caso de las muestras de 6 días de diferenciación mixta (figuras 8d y e). Esto indica que, aunque en estas condiciones existen transcritos de DCX, no existe expresión de proteína, o que su expresión es tan baja que no podemos detectarla mediante ninguna de las dos técnicas utilizadas.



E

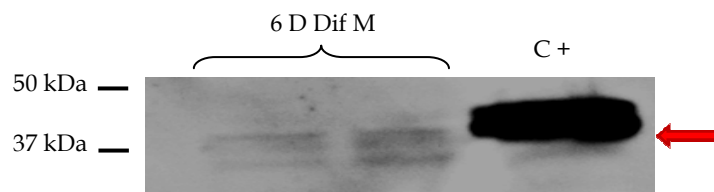


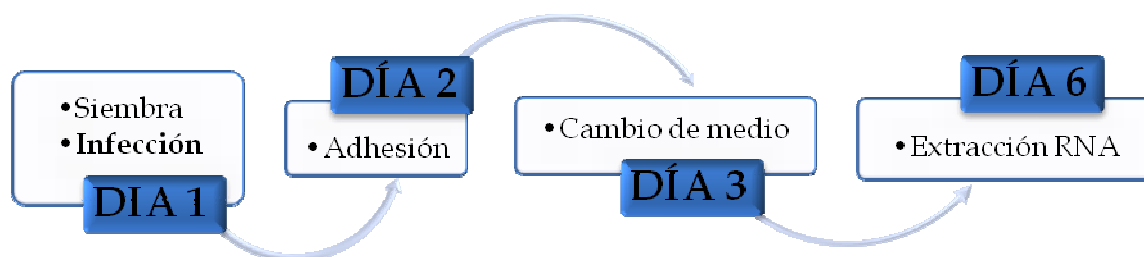
Figura 8. Análisis de la expresión de DCX en progenitores embrionarios de LGE. (A-C) Diagramas de barras que muestran las cantidades relativas de mRNA de doblecortina obtenido mediante PCR cuantitativa en cultivos de neuronas (A), de astrocitos (B) y mixtos (C). En cada caso se comparan las muestras en estadio proliferativo (Nsf 2 D: neuroesferas de 2 días de proliferación) con las condiciones de diferenciación de 3 y de 6 días (3D Dif, 6D Dif). Los diagramas muestran los niveles de expresión del mRNA como porcentaje relativo a un control, en este caso las neuroesferas de 2 días de proliferación, considerado como el 100%. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media. (D) Superposición de una imagen de campo claro con una de fluorescencia para doblecortina de cultivos mixtos de 6 días de diferenciación. Se detectan células positivas a doblecortina (rojo) con morfología neuronal. (E) Western-blot para doblecortina de muestras de 6 días de diferenciación en cultivos mixtos. Como control positivo (C+) se utilizaron extractos proteicos de encéfalos de embriones de ratón.

Infección con lentivirus recombinantes

Una vez que determinamos la condición que presentaba mayores niveles de expresión de DCX, infectamos estas células con lentivirus recombinantes productores de DCX-shRNA y su correspondiente control y analizamos mediante PCR cuantitativa la expresión de los diferentes genes mencionados anteriormente.

Determinación del grado de silenciamiento

Para evaluar el grado de interferencia producido sobre la expresión de DCX, debido a que los niveles de expresión del mRNA de la proteína presentaban su pico máximo a los 6 días de diferenciación mixta, se siguió el siguiente protocolo de infección:



Con las muestras recogidas tras las infecciones, inicialmente determinamos los niveles de expresión de DCX para evaluar el efecto del DCX-shRNA en el nivel de expresión de su transcrito. Nuestros resultados (figura 9) muestran una reducción altamente significativa en las células que expresan el DCX-shRNA ($40,68 \pm 9,3\%$; $n=6$; $p=0,001$) con respecto a su control (en el que consideramos un nivel de expresión del 100%). Por lo tanto, nuestro sistema es capaz de reducir casi un 60% la expresión del transcrito de DCX en estas condiciones.

Efecto del silenciamiento sobre la expresión de otros genes

En este caso seguimos el siguiente protocolo de infección:



Además de evaluar el grado de silenciamiento de DCX, las muestras fueron procesadas para analizar la expresión de diferentes marcadores mediante PCR cuantitativa. Se analizaron los marcadores neurales nestina y vimentina, el marcador astrogial GFAP, el marcador neuronal Tuj1, y los marcadores oligodendrogiales Olig1 y Olig2 para comprobar si la reducción de DCX producía efectos en la diferenciación celular. Nuestros resultados (figura 10) muestran que en los cultivos en los que se ha silenciado la expresión de DCX existe una reducción significativa en la expresión del marcador neuronal Tuj1 ($65,4 \pm 5,4\%$, $n=3$, $p=0,037$; media \pm EEM, error estándar de la media) con respecto a los controles (en el que consideramos un nivel de expresión del 100%). No observamos ningún efecto en la expresión del resto de marcadores.

SILENCIAMIENTO *IN VIVO* MEDIANTE shRNA

Con el fin de evaluar el efecto de la pérdida de expresión de DCX durante los procesos neurogénicos dentro del SNC adulto, inyectamos estereotáxicamente lentivirus recombinantes (productores de DCX-shRNA y su correspondiente control), altamente concentrados, en el ventrículo lateral izquierdo de ratas macho adultas. Los puntos de inyección fueron examinados previamente al procesado completo del tejido, mediante la detección inmunohistoquímica de la expresión del gen reportero GFP. Sólo aquellos animales que presentaban el punto de inyección en el asta dorsal fueron incluidos en el estudio (figura 11). Debido a la variabilidad en el número total de células infectadas dentro de la ZSV, los análisis cuantitativos de distribución no se realizaron en términos absolutos, si no como porcentajes relativos de células en cada capa referidos al número total de células del recuento.

Inicialmente evaluamos el grado de silenciamiento *in vivo* mediante inmunofluorescencia doble para GFP y DCX. A continuación, determinamos los tipos morfológicos generados en cada caso y analizamos el efecto de la pérdida de expresión de DCX en los procesos migratorios de los precursores de la ZSV, tanto en la migración tangencial a través de la CMR como en la migración radial a través del BO. Y, por último, evaluamos los efectos ejercidos en la diferenciación de estas células en su llegada al BO.

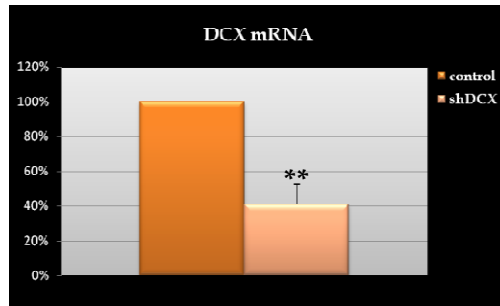


Figura 9. Determinación *in vitro* del grado de silenciamiento producido por DCX-shRNA. Diagrama de barras que representa los niveles de expresión de doblecortina obtenidos mediante PCR cuantitativa en cultivos de progenitores embrionarios de LGE diferenciados a neuronas tras ser infectados con lentivirus recombinantes productores de DCX-shRNA y de su correspondiente control. El gráfico muestra los niveles de expresión del mRNA como porcentaje relativo al control, considerado como 100%. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media. ** $p < 0.01$.

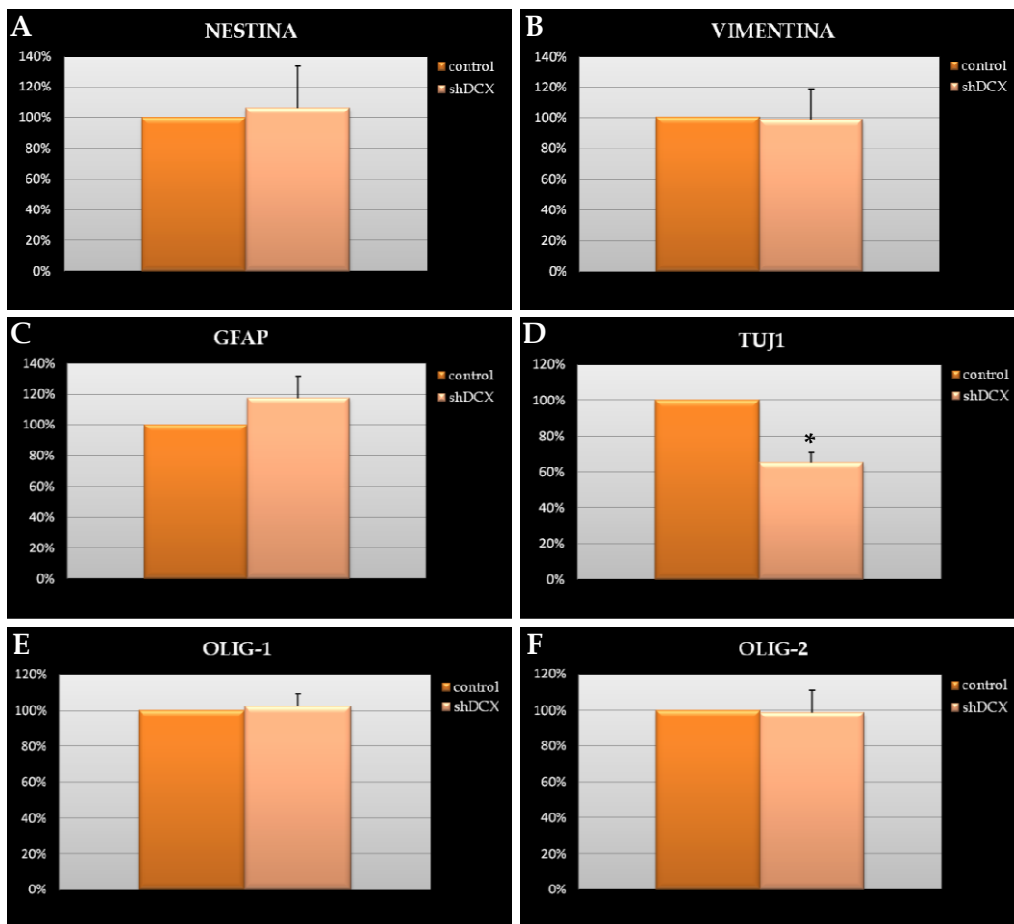


Figura 10. Efectos de la reducción de los niveles de DCXmRNA en la expresión de los transcritos de otros genes. Diagramas de barras que representan los niveles de expresión de nestina (A), vimentina (B), GFAP (C), Tuj1 (D), Olig-1 (E) y Olig-2 (F) obtenidos mediante PCR cuantitativa. Las muestras se extrajeron a partir de cultivos de progenitores embrionarios de LGE diferenciados a neuronas tras ser infectados con lentivirus recombinantes productores de DCX-shRNA y de su correspondiente control. Los gráficos muestran los niveles de expresión del mRNA como porcentaje relativo al control, considerado como 100%. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$.

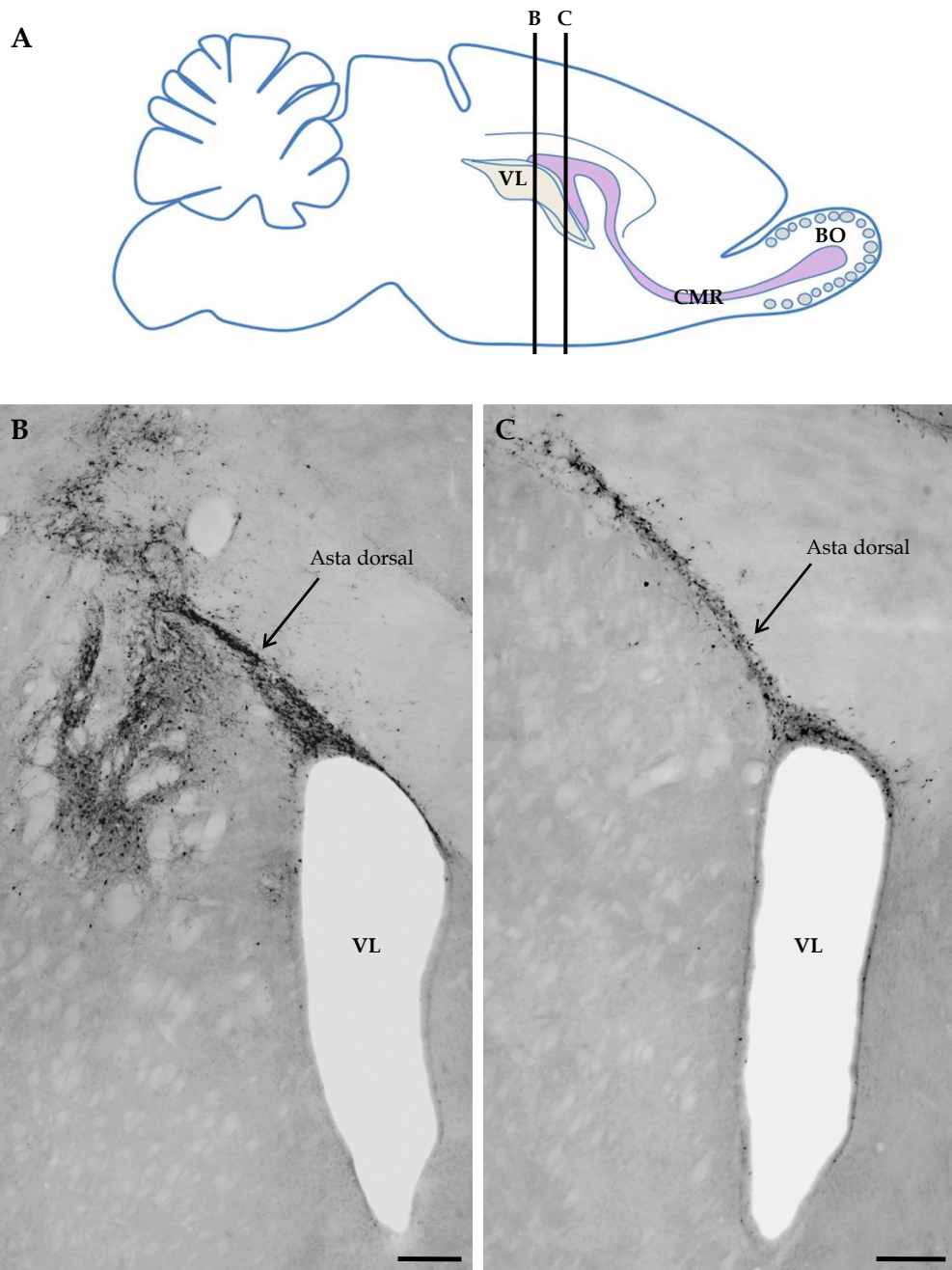


Figura 11. Localización del punto de inyección en los animales incluidos en el estudio. (A) Esquema de una sección sagital de uno de los hemisferios del cerebro de rata adulta. Las líneas indican los niveles de las secciones coronales mostradas en B y C. (B y C) Secciones coronales de BO de rata realizadas en la región donde se localiza el punto de inyección (B) y en una región más rostral (C) donde se pueden observar las células infectadas, mediante la inmunodetección de GFP, dentro del asta dorsal y en la ZSV cercana a la misma. BO, bulbo olfatorio; CMR, corriente migratoria rostral; GFP, proteína fluorescente verde; VL, ventrículo lateral. Barra de escala: 200 μ m

Determinación del grado de silenciamiento

Con el fin de evaluar el grado de silenciamiento, examinamos la expresión de DCX en las células GFP-positivas situadas en el BO 15 días después de la inyección lentiviral. Elegimos este tiempo de supervivencia porque: (1) es el tiempo que se considera necesario para que los progenitores provenientes de la ZSV puedan alcanzar el BO y se distribuyan a través de las diferentes capas, y (2), el pico máximo de expresión de DCX se da una vez transcurridos 10-12 días a partir de la generación de los neuroblastos (Brawn et al., 2003; Couillard-Després et al., 2005).

En la condición control (infección con lentivirus recombinantes productores de scrambleDCX-shRNA), siempre observamos expresión de DCX prácticamente en todas las células GFP-positivas (figura 12). Entre los elementos que exhiben colocalización destacan diferentes tipos de células cuya morfología apunta a que se encuentran en migración así como granos en diferentes estados de diferenciación. Además, encontramos células positivas para ambos marcadores cuya morfología y localización es acorde con las de células periglomerulares.

La expresión de DCX se localizó tanto en el cuerpo celular como en los procesos, si bien es cierto que, en neuronas con morfología celular más compleja y con un aspecto más diferenciado, la expresión de la proteína estaba restringida a ciertas zonas como la periferia del citoplasma y el inicio de las prolongaciones.

En el caso de la infección con los lentivirus recombinantes productores de DCX-shRNA, observamos que en la mayor parte de la población de células GFP-positivas se había silenciado la expresión de DCX hasta el punto de no ser detectada mediante inmunofluorescencia (figura 13). Del total de células analizadas, había una pequeña proporción en las que la expresión de DCX persistía, aunque estaba claramente reducida respecto a la hallada en los controles. Sólo en casos aislados encontramos alguna célula positiva para GFP con niveles altos de DCX.

Efectos producidos por el silenciamiento de doblecortina

Análisis de migración tangencial

Para llevar a cabo este análisis, examinamos la expresión de DCX en células positivas a GFP, 5 días después de la inyección lentiviral. Elegimos este tiempo de supervivencia porque: (1) trascurrido este tiempo el genoma viral ya se ha integrado en el material genético de la célula y, por tanto, ya tendrá lugar la expresión tanto del DCX-shRNA como del gen reportero, y (2), los progenitores infectados en la ZSV aun

no habrán llegado al BO y se encontrarán en su mayor parte en el proceso de migración tangencial a través de CMR.

Nuestros resultados muestran que las células GFP-positivas de animales que han sido transducidos con el DCX-shRNA son capaces de migrar tangencialmente, de modo que parece que el silenciamiento de la expresión de DCX no afecta de modo detectable a la migración tangencial. De hecho, estas células no sólo son capaces de migrar, si no que probablemente lo hagan de igual forma y a la misma velocidad, ya que, transcurridos 5 días, llegan a los mismos niveles rostrales que en condiciones control (figura 14). Además, morfológicamente presentan las mismas características propias de las células de tipo I identificadas por Petreanu y Álvarez-Buylla (2002) (figura 14). Por lo tanto, parece que la migración tangencial a través de la CMR adulta no se ve afectada por la pérdida de expresión de DCX.

Tipos morfológicos de células de nueva generación

Con el fin de determinar si la pérdida de DCX alteraba la generación de los distintos tipos morfológicos formados postnatalmente en el BO, examinamos la expresión de DCX en células GFP-positivas 21 días después de la inyección lentiviral. A este tiempo, las células de nueva generación deberían ya presentar morfologías típicas de células diferenciadas.

Tanto en condiciones control como en ausencia de DCX encontramos los siguientes tipos celulares inmunorreactivos a GFP:

- Comenzando por la CG, encontramos células de pequeño tamaño localizadas alrededor de los glomérulos con un cuerpo celular pequeño y redondeado, con dendritas de contorno tortuoso y con numerosas espinas, datos que nos permitieron identificarlas como células periglomerulares (figura 15a, flecha). Además, con esta misma localización hemos observado células con un cuerpo celular ligeramente mayor que el de las neuronas periglomerulares, de morfología ligeramente ovoide y que presentan de una o dos dendritas apicales carentes de espinas observables y un axón que discurre por la CPE. Estas células fueron identificadas como células empenachadas externas (figura 15a, punta de flecha y 15c, flecha). Por último, también observamos neuronas con somas fusiformes que presentan dos troncos dendríticos que se originan desde lugares opuestos del soma y que discurren de forma paralela a laminación del bulbo sin llegar a penetrar en el interior de los glomérulos, características típicas de las células de axón corto superficiales (figura 15b).

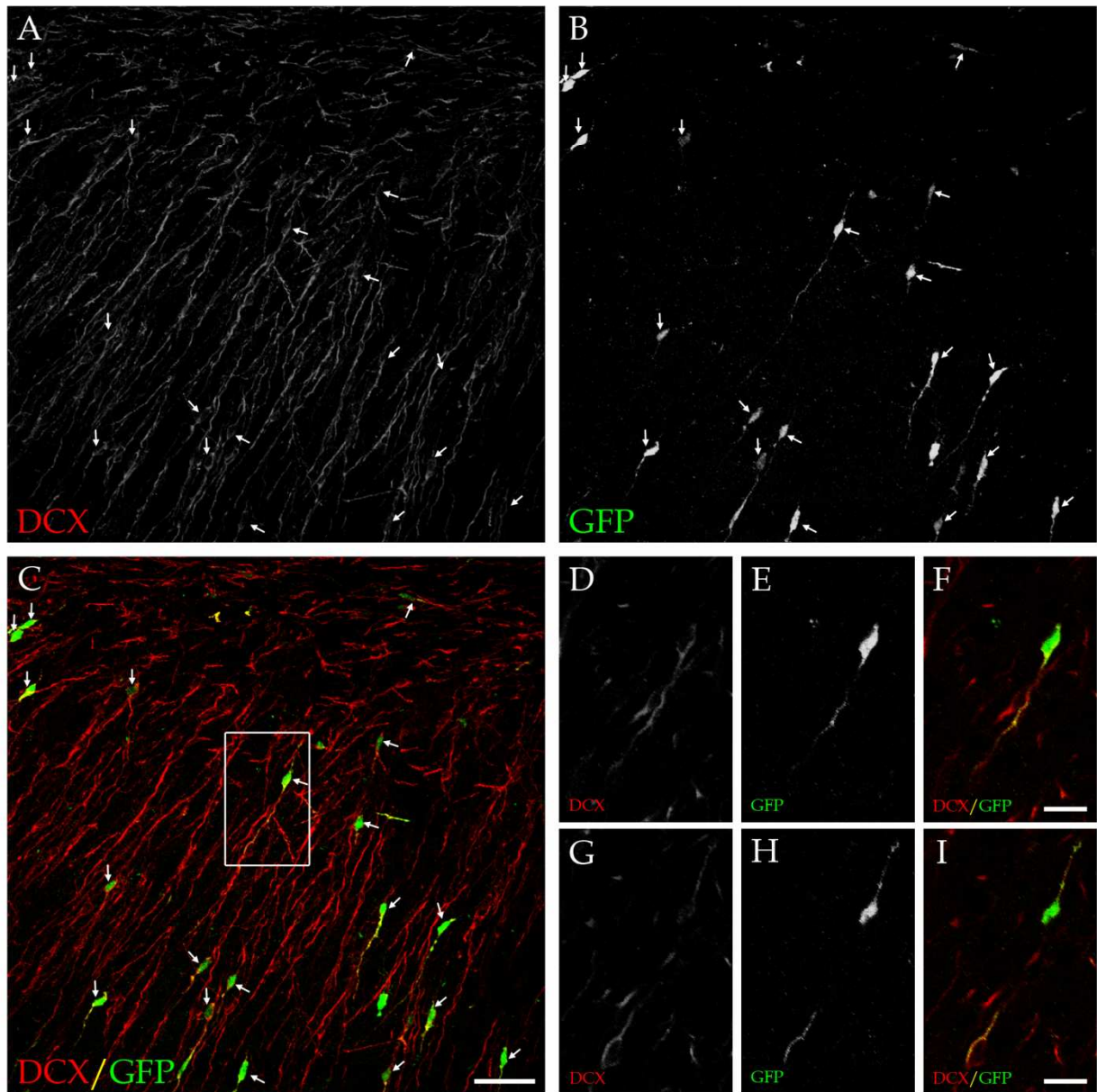


Figura 12. Expresión de doblecortina en células de nueva generación del BO en condiciones control tras 15 días de supervivencia. Imágenes de microscopía láser confocal de secciones coronales de BO procesadas para inmunofluorescencia para doblecortina (rojo) y para GFP (verde). (A-C) Proyecciones máximas de planos focales para doblecortina y GFP (A y B) y para la mezcla de ambos (C). Prácticamente la totalidad de las células GFP-positivas expresan también doblecortina (flechas) tras 15 días de supervivencia después de la infección viral en condiciones control. (D-I) Planos focales consecutivos de la región enmarcada en C para doblecortina (D y G), GFP (E y H) y la mezcla de ambos (F e I). GFP, proteína fluorescente verde. Barras de escala: 200 μm (A-C) y 100 μm (D-I).

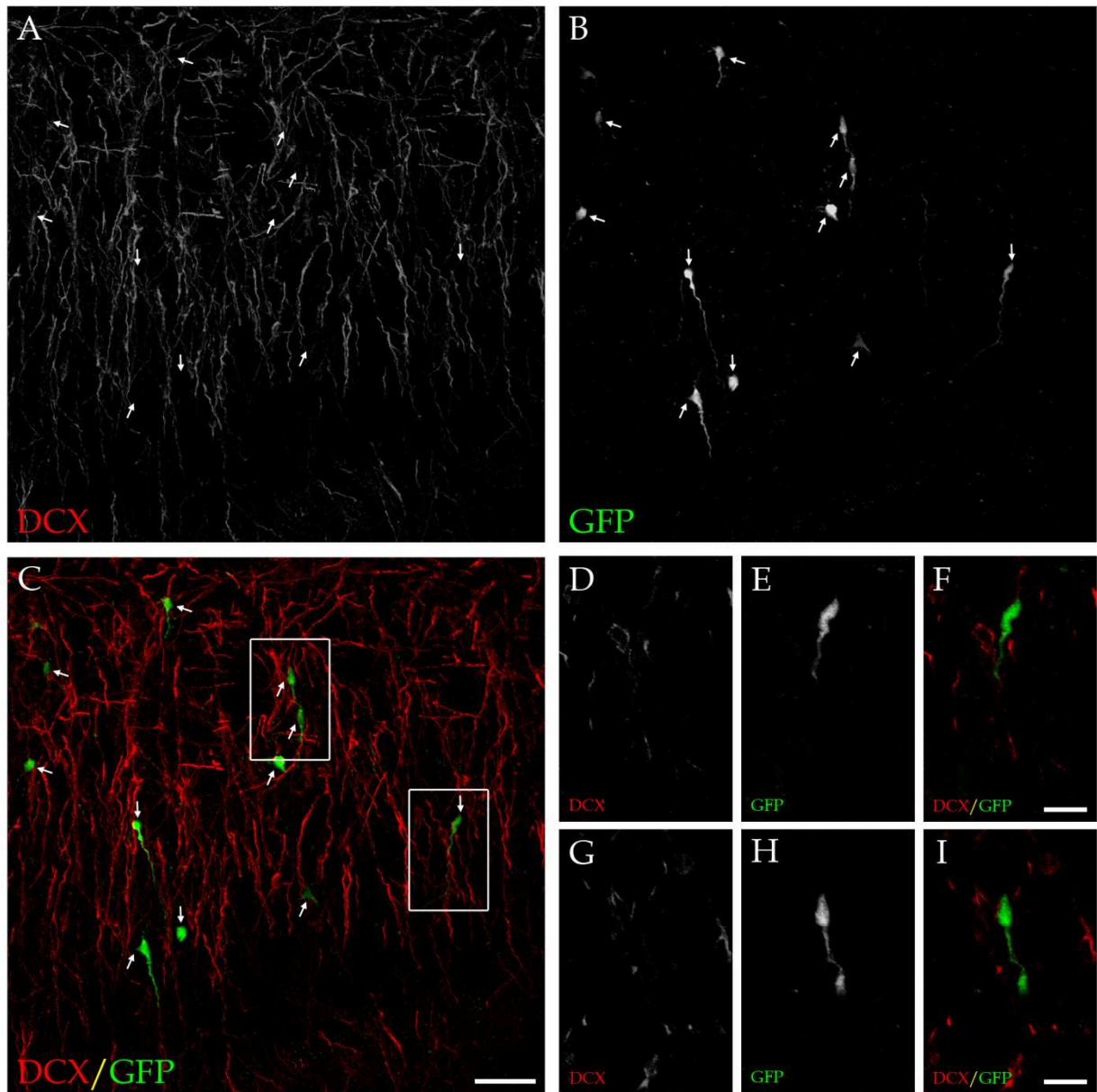


Figura 13. Silenciamiento *in vivo* de la expresión de doblecortina en células de nueva generación del BO mediante RNA de interferencia tras 15 días de supervivencia. Imágenes de microscopía láser confocal de secciones coronales de BO marcadas mediante inmunofluorescencia para doblecortina (rojo) y para GFP (verde). (A-C) Proyecciones máximas de planos focales para doblecortina y GFP (A y B) y para la mezcla de ambos (C). Se hace patente la pérdida de expresión de doblecortina 15 días después de la administración del RNA de interferencia específico para la proteína mediante vectores virales. (D-I) Ampliaciones de las regiones enmarcadas en C para el marcaje de doblecortina (D y G), de GFP (E y H) y para la mezcla de ambos (F e I). BO, bulbo olfatorio; GFP, proteína fluorescente verde. Barras de escala: 200 μm (A-C) y 100 μm (D-I).

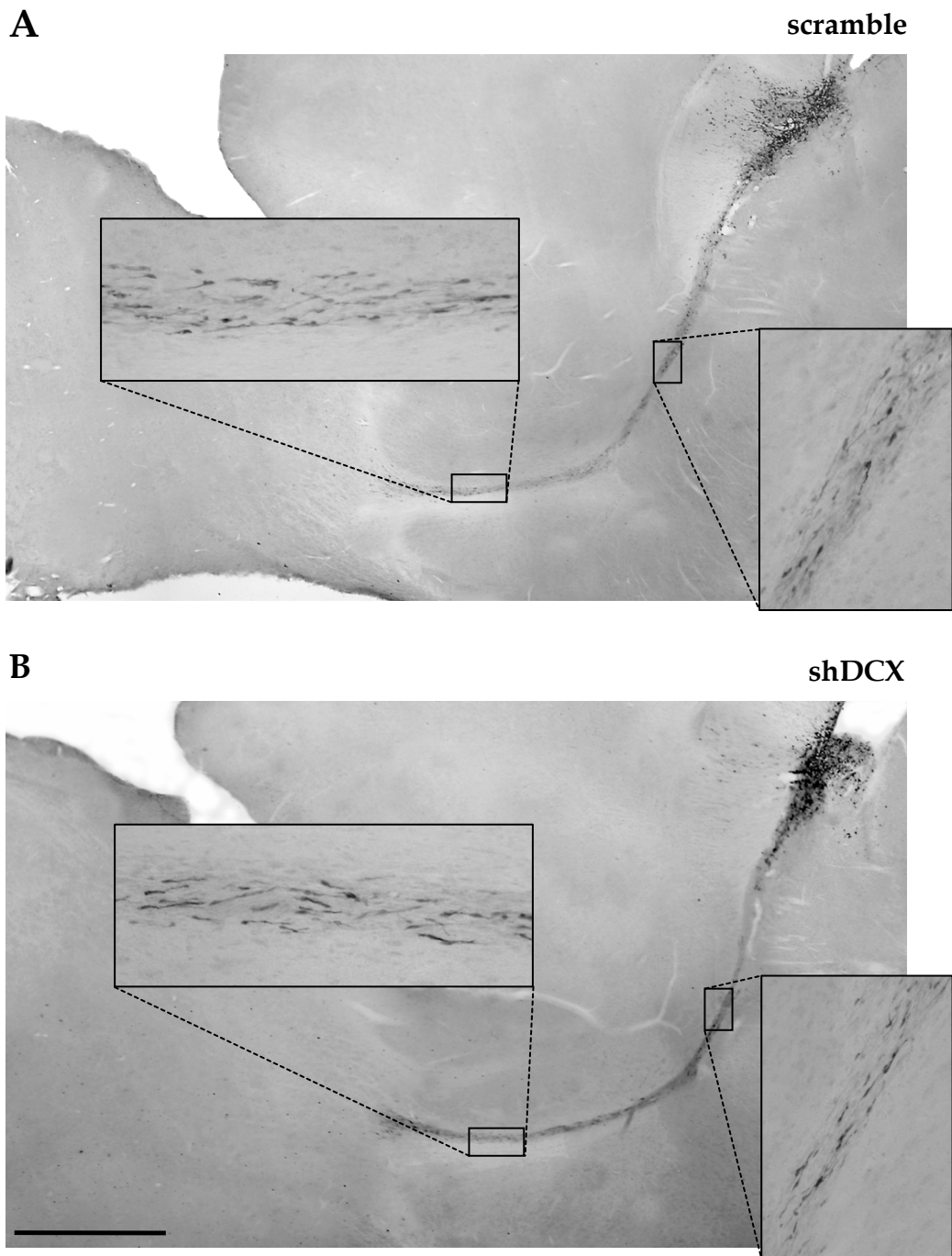


Figura 14. El silenciamiento *in vivo* de doblecortina no altera la migración tangencial de los progenitores de la ZSV a través de la CMR adulta. (A-B) Fotomicrografías de secciones parasagitales a nivel de la CMR en las que se ha llevado a cabo la inmunodetección de GFP en condiciones control (A) y en ausencia de doblecortina (B) 5 días después de la infección lentiviral. Los progenitores de ZSV son capaces de migrar tangencialmente hacia regiones rostrales en ausencia de doblecortina, presentando la misma morfología en las distintas condiciones experimentales. CMR, corriente migratoria rostral; GFP, proteína fluorescente verde; ZSV, zona subventricular. Barra de escala: 1 mm.

- En la CPE, hemos encontrado interneuronas que morfológicamente son similares a las descritas anteriormente como células de axón corto superficiales caracterizadas por Kosaka y colaboradores en 1994 (figura 15 d-f). Estos resultados coinciden con publicaciones recientes donde se pone de manifiesto la generación adulta y continua de las interneuronas que pueblan la CPE (Yang, 2008).

De acuerdo con trabajos previos, en las capas inframitrales encontramos mayoritariamente granos (figura 15g). En menor proporción, también observamos diversos tipos de células profundas de axón corto. Según la clasificación de Ramón y Cajal (Cajal, 1911), las hemos identificado como células de Golgi (figura 15h), células de Cajal (figura 15i punta de flecha), células multiespinadas (figura 15i flecha) y células de Blanes (figura 15j).

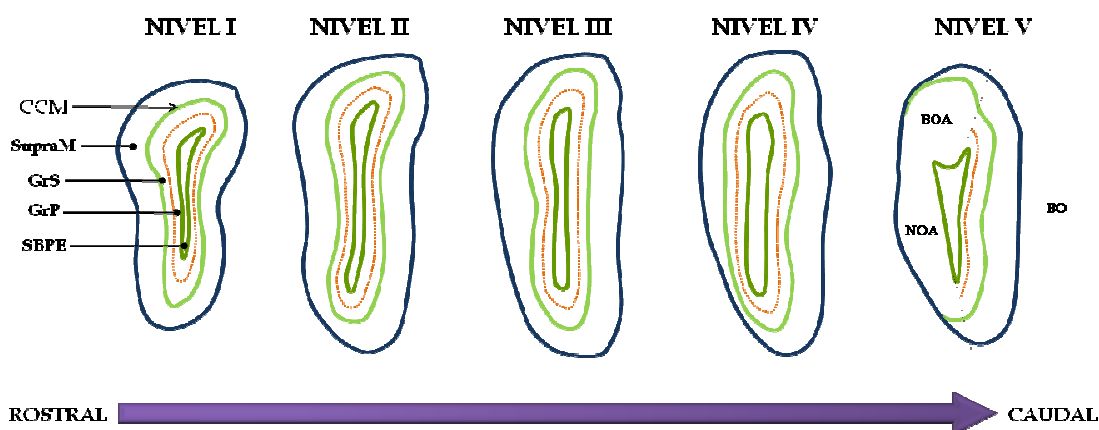
Además de estos tipos celulares, cuyas características morfológicas han sido definidas con anterioridad en la literatura, hemos encontrado células cuya morfología no correspondía a ninguno de los tipos celulares descrito hasta el momento en el BO. Llamativamente, mientras que estas células se observaron sólo de forma esporádica en condiciones control, fueron localizadas con una frecuencia notablemente mayor en ausencia de DCX. Éstas se disponían preferentemente en la SBPE y en la región profunda de la CGr a los 15 días de la infección lentiviral y, posteriormente comienzan a ser observadas en la CPE tras 21 días de supervivencia. Estas células presentan un cuerpo celular de contorno irregular, del que emergen múltiples prolongaciones, normalmente cortas, finas, tortuosas y muy ramificadas (figura 16). Mediante inmunofluorescencia doble con GFP y marcadores de diferentes poblaciones gliales, descartamos la posibilidad de que se tratase de astrocitos, oligodendrocitos o microglía (figura 17). Como se discutirá en la próxima sección, estas células podrían representar un estadio intermedio del proceso de migración radial, que como detallaremos a continuación, se ve afectado por la pérdida de DCX.

Análisis de migración radial

Con objeto de evaluar el efecto de la pérdida de expresión de DCX en la migración radial, llevamos a cabo el recuento de las células inmunorreactivas a GFP en diferentes capas del BO, tanto en condiciones control como en condiciones de ausencia de DCX, 15 y 21 días después de las correspondientes inyecciones lentivirales. Elegimos estos periodos de supervivencia porque representan la ventana temporal en la que las células de nueva generación se encuentran migrando radialmente a través de las

diferentes capas del BO, antes de establecerse definitivamente en sus lugares de destino.

A continuación se representan los cinco niveles rostrocaudales en los que llevó a cabo el recuento celular y las capas analizadas en cada uno de ellos. La elección de estos niveles se realizó según los criterios detallados en el apartado “Material y



Métodos”.

Las áreas en las que centramos nuestro estudio fueron: (1) las capas supramitrales (supraM) en la que se incluyen la CG y la CPE, (2) la región más superficial de la capa de los granos (GrS) (donde además se incluye la CPI), (3) la región más profunda de la capa de los granos (GrP) y (4) la SBPE. En conjunto, las subdivisiones GrS y GrP se encuentran delimitadas externamente por la CCM e internamente por la aparición de la SBPE, y el límite entre ambas fue establecido de modo que ambas tuvieran el mismo espesor. En el nivel más caudal (nivel 5), el recuento solamente se llevó a cabo en la zona del BO, descartando el bulbo olfatorio accesorio (BOA) y el núcleo olfatorio anterior (NOA) que aparecen en situación dorsal y lateral respectivamente.

A los 15 días de supervivencia, en condiciones control, un $96,58 \pm 0,52\%$ de las células GFP-positivas se localizaban en las capas inframitrales (infraM, donde se agrupan GrS, GrP y la SBPE). De estas células, un $74,11 \pm 2,53\%$ se localizan en los sectores GrP y GrS y se distribuyen de una forma homogénea entre ambas ($37,25 \pm 1,52\%$ y $36,86 \pm 2,15\%$ respectivamente). Sin embargo, en ausencia de DCX, los porcentajes en la GrS y la GrP muestran diferencias significativas con respecto al control (figura 18a) de modo que se reducía notablemente el número de elementos

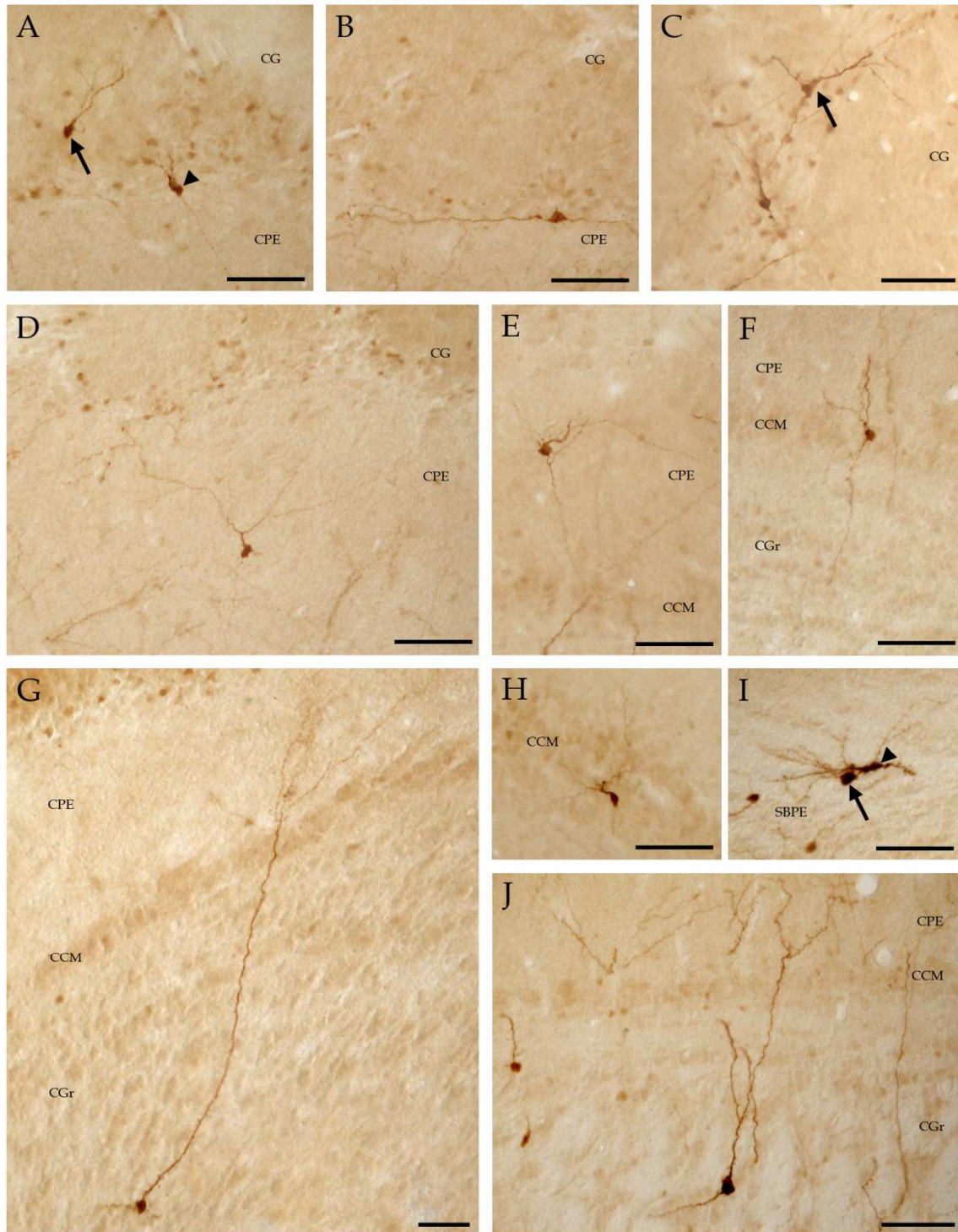


Figura 15. Tipos celulares inmunorreactivos a GFP en el BO 21 días después de la inyección lentiviral. Estos tipos morfológicos fueron observados tanto en condiciones control como en condiciones de ausencia de doblecortina mediante inmunofluorescencia para GFP. (A-C) Células localizadas en la CG. En esta zona mayoritariamente encontramos células periglomerulares (A, flecha), pero además, observamos neuronas con características de células superficiales de axón corto (B) y otras cuya morfología recuerda a las células empenachas externas (A, punta de flecha y C, flecha). (D-F) Neuronas localizadas en la CPE con morfologías acordes a las descritas para las células superficiales de axón corto caracterizadas por Kosaka et al. (1994). (G-J) Células localizadas en las CIM. En esta zona hemos identificado fundamentalmente granos (G), aunque en menor medida también varios tipos de células profundas de axón corto (H-J). BO, bulbo olfatorio; CPE, capa plexiforme externa; CG, capa glomerular; CIM, capas inframitrales. Barras de escala: 30 μ m

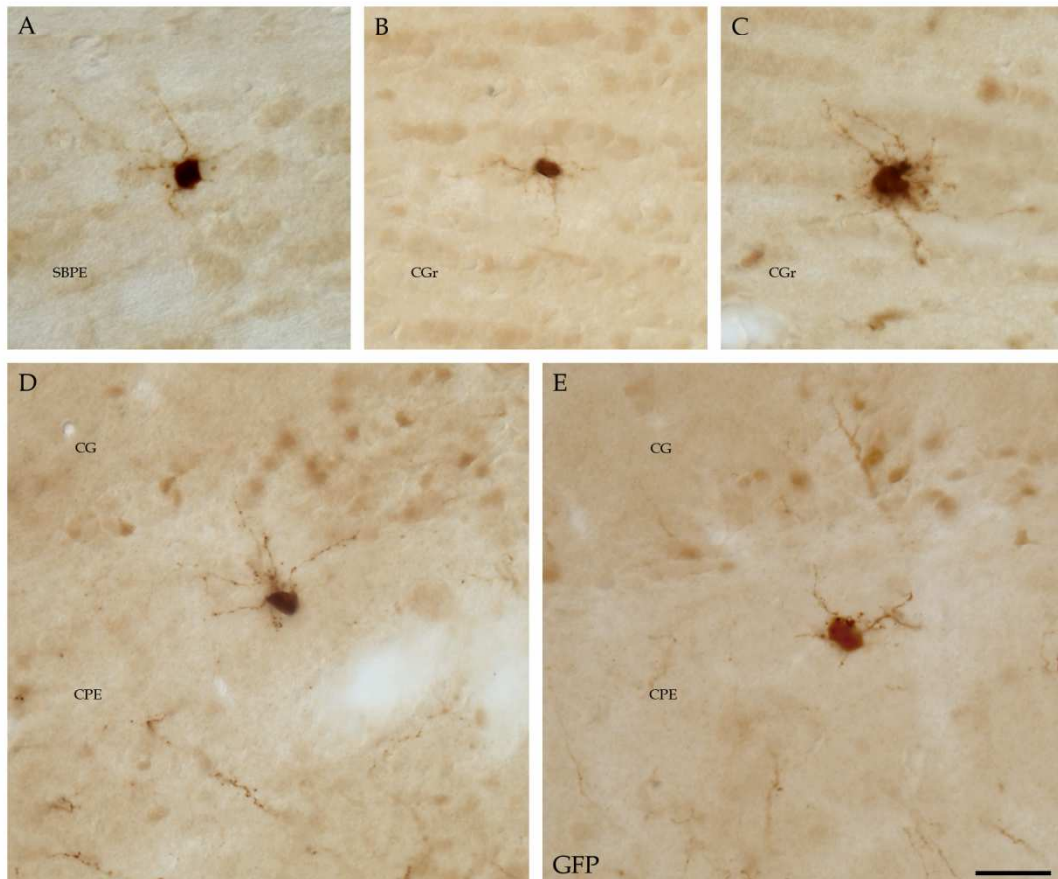


Figura 16. Células de nueva generación con morfología multipolar encontradas en el BO en condiciones de ausencia de doblecortina. Células inmunorreactivas a GFP que presentan múltiples ramificaciones que emergen de toda la superficie del cuerpo celular, el cual tiene un contorno irregular. (A-C) Células multipolares localizadas en la SBPE 15 días después de la infección lentiviral (D y E) Células multipolares localizadas en la CPE tras 21 días de supervivencia. BO, bulbo olfatorio; CPE, capa plexiforme externa; CG, capa glomerular; SBPE, sustancia blanca periependimaria. Barra de escala: 30 μ m

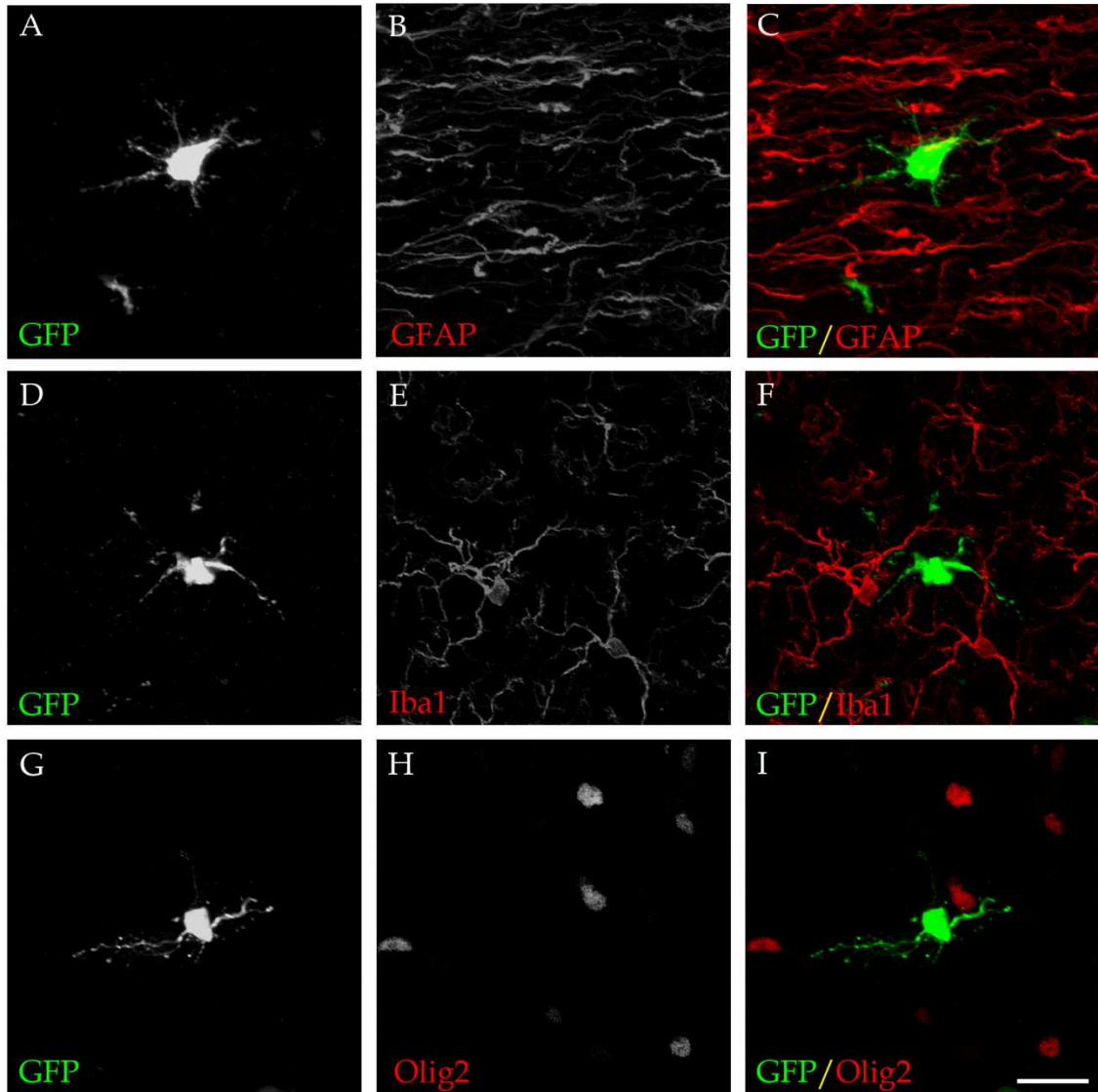


Figura 17. Las células multipolares encontradas entre las células de nueva generación que pierden la expresión de doblecortina no expresan marcadores gliales. (A-I) Imágenes de microscopía láser confocal de cortes coronales de BO marcados para GFP (verde) y para GFAP, Iba1 u Olig2 (rojo), donde se representa las proyecciones máximas del conjunto de planos focales. BO, bulbo olfatorio; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; GFP, proteína fluorescente verde. Barra de escala: 20 μ m

marcados en la GrS mientras que se acumulaban más en la GrP, aunque el valor total se mantenía prácticamente invariable (GrS: $30,64 \pm 1,47\%$, $p= 0,006$; GrP: $42,76 \pm 1,32\%$, $p= 0,030$). Por otro lado, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de células positivas a GFP localizadas en la SBPE y en las capas supraM (figuras 18a y b).

Tras 21 días de supervivencia realizamos el análisis del mismo modo. En este caso encontramos diferencias significativas en todas las capas (figura 18c y d, tabla 11).

Capa	Scramble (n=5)	shDCX (n=5)
supraM	$4.64 \pm 0.48\%$	$1.88 \pm 0.32\%$, $p<0.001$
GrS	$47.22 \pm 1.78\%$	$31.34 \pm 2.33\%$, $p<0.001$
GrP	$34.99 \pm 2.02\%$	$46.65 \pm 2.57\%$, $p=0.001$
SBPE	$13.15 \pm 1.98\%$	$20.13 \pm 2.00\%$, $p= 0.019$

Tabla 11. La ausencia de DCX altera la distribución de las células de nueva generación del BO. Porcentaje de células GFP+ en cada área de estudio del BO 21 días después de la infección lentiviral. Los datos representan la media \pm EEM.

Los datos obtenidos muestran que en ausencia de DCX se produce: (1) un acúmulo de células positivas a GFP en las capas más profundas del BO, ya que, aumentan sus porcentajes relativos tanto en la SBPE como en la GrP; y (2), una menor llegada de nuevas células a las partes más superficiales del BO, ya que, se produce un descenso en los porcentajes de células localizadas tanto en las capas supraM como en las GrS.

Teniendo en cuenta que, como mostramos anteriormente, la ausencia de DCX no parece afectar a los mecanismos de migración tangencial, de manera que en condiciones experimentales y control no hay diferencias en el número de elementos que llegan al BO, los datos obtenidos en el estudio de la migración radial indicarían que la ausencia de DCX afecta a la capacidad de desarrollar el proceso de migración radial en los neuroblastos, y de ahí las diferencias de distribución entre capas observadas.

Efectos sobre la diferenciación

El estudio dirigido a determinar los efectos de la DCX sobre los procesos de diferenciación neuronal lo realizamos únicamente sobre la población de células cuya

características morfológicas indicaban su pertenencia a la población de células grano. Esto se debió a que este tipo celular es el más abundante ya que es al que dan lugar mayoritariamente los neuroblastos de nueva generación. De este modo, teníamos, en todos los casos, asegurado un tamaño de muestra representativo.

Análisis del proceso de maduración

Como hemos adelantado en el apartado “Introducción”, han sido descritos diferentes estadios en la maduración de los granos generados en etapas postnatales en función de criterios morfológicos (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002). Los estadios definidos en el referido estudio, son denominados como de clase 1, 2, 3, 4 y 5, y se pueden observar apareciendo de forma progresiva en el BO adulto después de una inyección retroviral en la SVZ. El tipo morfológico de clase 1 representa el estadio más indiferenciado y el de clase 5 representa morfológicamente un grano completamente maduro. Las descripciones morfológicas tan detalladas de cada clase realizada por los autores y los evidentes signos distintivos para cada una de ellas hizo posible que en nuestro trabajo pudiéramos identificar con claridad cada uno de estos estadios en el BO 15 días después de la inyección lentiviral en la SVZ (figura 19a-e). De este modo realizamos un recuento de las células pertenecientes a cada estadio en condiciones control y en condiciones de ausencia a de DCX, para así determinar si la secuencia temporal de maduración de los granos se veía alterada por la ausencia de la proteína.

Nuestros resultados reflejan un enlentecimiento del proceso de maduración de los granos en ausencia de DCX. De hecho, en estas condiciones, se puede apreciar un aumento significativo del porcentaje de células menos diferenciadas (de tipo 2 fundamentalmente) y una disminución significativa de los porcentajes de las células más diferenciadas (tipos 3, 4 y 5) (figura 19f y tabla 12). Llamativamente, sin embargo, la proporción de células de tipo 1 no se mostraba alterada, al igual que sucedía con la del resto de tipos interneuronales identificados.

CÉLULA	Scramble (n=5)	shDCX (n=5)
Clase 1	21.31 ± 2.37%	22.34 ± 2.33%, p=0.758
Clase 2	34.50 ± 2.15%	57.69 ± 1.92%, p=0.000
Clase 3	17.80 ± 2.01%	8.61 ± 0.59%, p=0.000
Clase 4	13.26 ± 1.24%	1.63 ± 0.30%, p= 0.000
Clase 5	5.18 ± 0.98%	0.35 ± 0.12%, p= 0.000
OIN	7.95 ± 0.96%	9.37 ± 0.87%, p= 0.281

Tabla 12. La ausencia de DCX altera la maduración de los granos de nueva generación del BO. Porcentaje de células de tipo 1, 2, 3, 4 y 5 en el BO 15 días después de la infección lentiviral. Los datos representan la media ± EEM. BO, bulbo olfatorio; OIN, otras interneuronas.

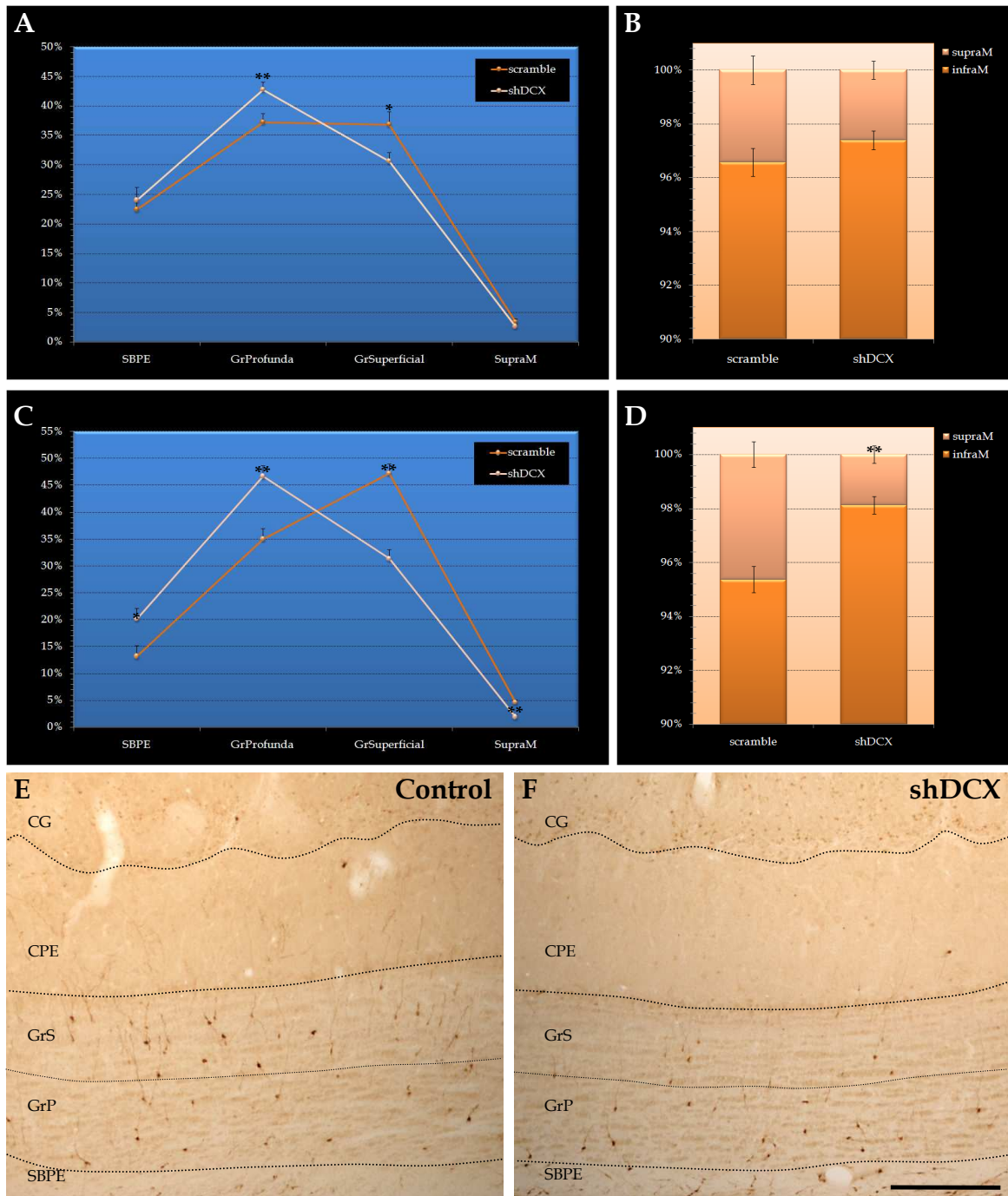
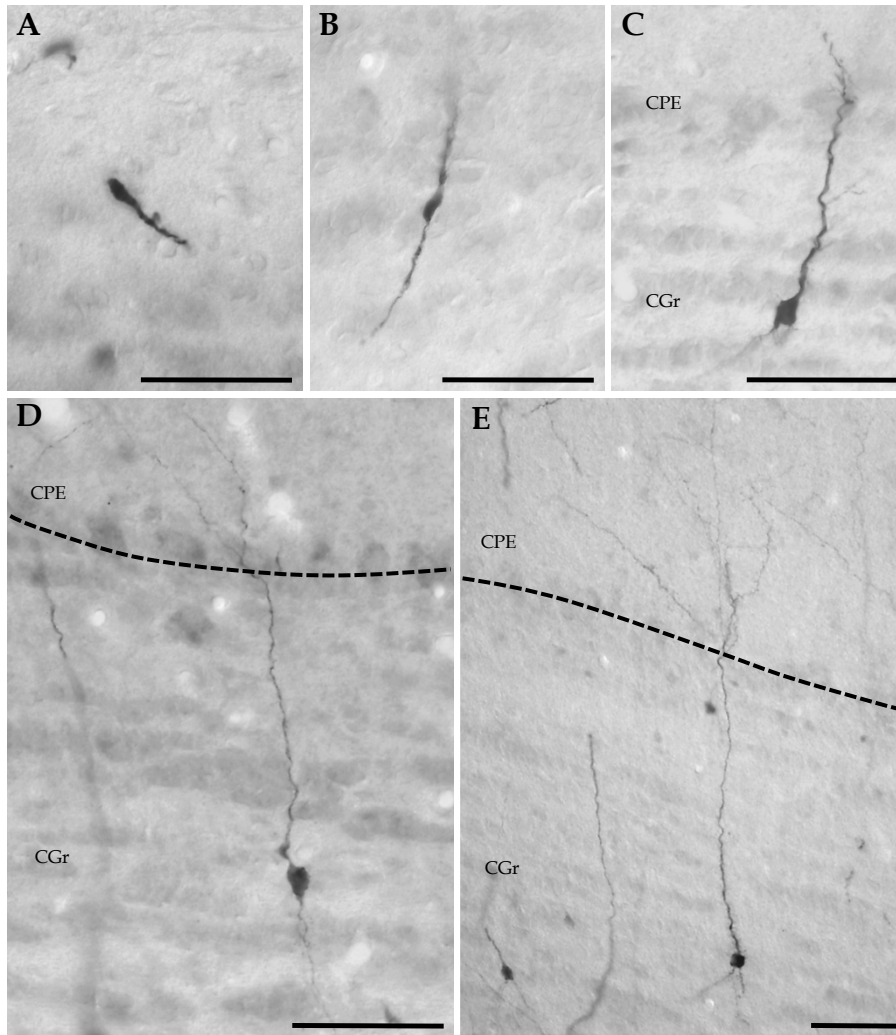


Figura 18. La pérdida de doblecortina altera la migración radial. (A-D) Representaciones gráficas que muestran los resultados del análisis cuantitativo de la distribución de las células GFP+ en el BO 15 días (A y B) y 21 días (C y D) después de la infección lentiviral. Los resultados se muestran como porcentajes de células GFP+ en cada capa referido al número total del BO. Las gráficas A y C representan los resultados del análisis de distribución en la CG, GrS, GrP y en la SBPE, y los diagramas de barras B y D representan los datos agrupados en capas infraM y supraM. Tras 15 días de supervivencia en ausencia de doblecortina observamos un menor porcentaje de células de nueva generación en la CGrS y un mayor porcentaje en la CGrP con respecto al control. Tras 21 días de supervivencia observamos más células en las capas más profundas (SBPE y GrP) y menos en las más superficiales (GrS y supraM) en condiciones de ausencia de doblecortina. (E y F) Detección inmunohistoquímica de GFP en secciones coronales de BO en condiciones control (E) y en ausencia de doblecortina (F) 21 días después de la infección lentiviral. Las líneas discontinuas delimitan las regiones analizadas. BO, bulbo olfatorio; CPE, capa flexiforme externa; CG, capa glomerular; GFP, proteína fluorescente verde; GrP, parte profunda de la capa de los granos; GrS, parte superficial de la capa de los granos; SBPE, sustancia blanca periependimaria; infraM, capas inframitrales; supraM, capas supramitrales. Barra de escala: 200 μ m



F ESTADIOS DE MADURACIÓN DE LOS GRANOS

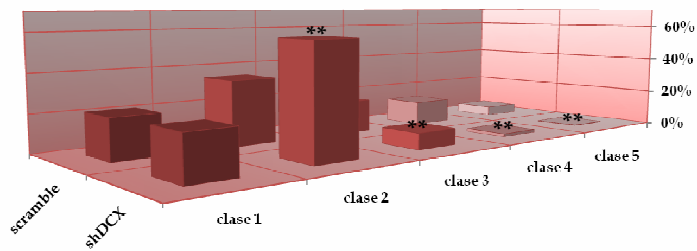


Figura 19. La pérdida de doblecortina altera la maduración de los granos de nueva generación del BO. (A-E) Células inmunorreactivas a GFP identificadas en el BO 15 días después de la infección viral que se corresponden con células de clase 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) y 5 (E), que a su vez se relacionan con diferentes estadios de diferenciación, y cuyas características fueron definidas por Petreanu y Álvarez-Buylla en 2002. (F) Diagrama de barras que muestra los resultados del análisis cuantitativo de las proporciones relativas de cada uno de estos tipos celulares en el BO, en condiciones control (scramble) y en ausencia de doblecortina, 15 días después de la infección lentiviral. BO, bulbo olfatorio; CPE, capa plexiforme externa; GFP, proteína fluorescente verde; CGr, capa de los granos. Barras de escala: 50 μ m

Análisis morfológico de los granos de nueva generación

Una vez que evidenciamos que la ausencia de DCX es un factor determinante para que los granos alcancen su madurez en un tiempo determinado, quisimos comprobar si en esas condiciones se produciría el desarrollo morfológico completo, aunque fuera necesario más tiempo de maduración, o si la ausencia de DCX iba a impedir de algún modo la diferenciación completa de estas células para formar elementos maduros. Para ello examinamos los BOs después de 21 días de supervivencia en condiciones control y en ausencia de DCX. Observamos que en las dos condiciones las características morfológicas de la mayor parte de los granos de nueva generación se correspondían con las descritas como distintivas del estadio 5 en el proceso de maduración de los granos.

No obstante, aunque las características generales de estas células eran equiparables tanto en condiciones experimentales como control, un detallado análisis de las mismas nos permitió evidenciar que las células observadas en el grupo control presentaban una complejidad estructural notablemente mayor que las del grupo en el que se había silenciado la expresión de DCX.

Para poder cuantificar las diferencias observadas en la complejidad estructural, que se mostraba fundamentalmente en la complejidad de los árboles dendríticos, utilizamos el programa informático NeuroLúcida con el que realizamos reconstrucciones tridimensionales de diferentes neuronas. De este modo, obtuvimos una serie de parámetros en cada una de las neuronas estudiadas que podíamos comparar entre los grupos experimental y control y así dar apoyo estadístico a las diferencias observadas en nuestro estudio microscópico.

Así, llevamos a cabo la reconstrucción tridimensional completa de 25 neuronas en cada grupo experimental. Las células elegidas se encontraban homogéneamente distribuidas a lo largo del eje rostro-caudal y se seleccionaron aquellas que presentaban el mayor árbol dendrítico y cuya estructura se encontraba completa en el total del grosor de la sección. Para salvar posibles diferencias en las longitudes de las dendritas a causa de la posición del grano en el BO, se reconstruyeron el mismo número de granos profundos y superficiales (con sus somas situados en la parte profunda y superficial de la CGr respectivamente) en cada una de las condiciones.

Cada una de las neuronas reconstruidas tridimensionalmente fue analizada con el software NeuroExplorer (MBF Bioscience, Inc.), con ayuda del cual se evaluaron variables morfológicas específicas como el tamaño y la morfología somática, la

estructura y la longitud dendrítica total y el número y la densidad de espinas dendríticas (tabla 13). Las variables descriptivas somáticas se refirieron a proyecciones en un plano XY, ya que, todos los somas fueron reconstruidos como una imagen en dos dimensiones a partir del plano donde el cuerpo celular se encontraba en foco.

En el análisis de los árboles dendríticos, el estudio se centró fundamentalmente en el árbol dendrítico apical, ya que por sus características intrínsecas era en el que mejor podían determinarse y valorarse los distintos parámetros a estudiar. Nuestros resultados mostraron una reducción significativa de la longitud total del árbol dendrítico en ausencia de DCX (figura 20; $519,08 \pm 27,96 \mu\text{m}$ vs. $398,28 \pm 26,93 \mu\text{m}$, $p=0,003$). Parece, por tanto, que la proteína DCX tiene un importante papel en la elongación de las dendritas durante el proceso de diferenciación celular en la neurogénesis adulta. Además, encontramos diferencias significativas en el número de nodos de ramificación, puntos de bifurcación y trifurcación (figura 20; $5,04 \pm 0,52$ vs. $3,20 \pm 0,14$, $p=0,007$), lo cual se traduce en un menor número de ramificaciones y por tanto una menor complejidad estructural del árbol dendrítico en su conjunto.

Una vez demostrado que la reducción de DCX inducía un desarrollo más limitado del árbol dendrítico en los granos de nueva generación, quisimos conocer si esta reducción podía atribuirse a un menor desarrollo de las dendritas en alguna capa específica del BO. Nuestros resultados mostraron que la longitud del árbol dendrítico localizado en las capas inframitrales no varió entre las diferentes condiciones experimentales (GrP: $26,32 \pm 6,43 \mu\text{m}$ vs. $43,43 \pm 16,77 \mu\text{m}$, $p=0,508$; GrS: $153,16 \pm 15,02 \mu\text{m}$ vs. $147,89 \pm 14,18 \mu\text{m}$, $p=0,800$). Sin embargo, la longitud total del árbol dendrítico que discurre por la CPE estaba claramente reducido en ausencia de DCX respecto al control (figura 21a; $354,57 \pm 29,69 \mu\text{m}$ vs. $215,55 \pm 18,69 \mu\text{m}$, $p=0,010$). Este dato demuestra que la reducción de la longitud total del árbol dendrítico de los granos de nueva generación en ausencia de DCX se debe fundamentalmente a una disminución de la extensión del árbol dendrítico apical localizado en la CPE.

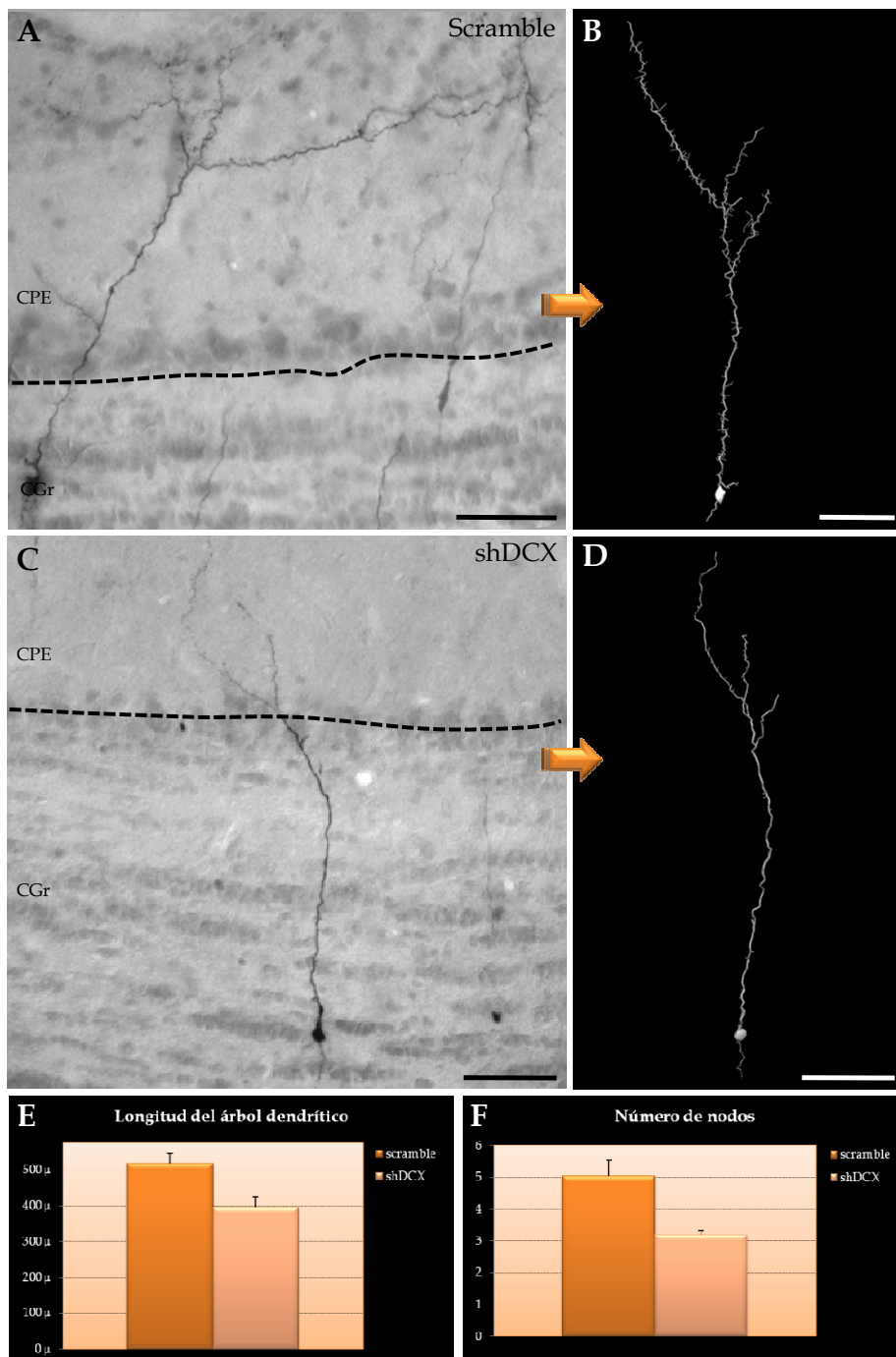


Figura 20. La pérdida de doblecortina reduce el desarrollo del árbol dendrítico de los granos de nueva generación del BO. (A-D) Fotomicrografías (A y C) y reconstrucciones tridimensionales (B y D) que muestran ejemplos de granos de nueva generación en condiciones control (A y B) y en ausencia de doblecortina (C y D). Nótese la menor complejidad del árbol dendrítico en el segundo caso, así como la menor presencia de espinas dendríticas. (E y F): Diagramas de barras que representan la longitud del árbol dendrítico apical y del número de nodos de ramificación en las distintas condiciones experimentales. La línea discontinua marca la CCM. BO, bulbo olfatorio; CCM, capa de células mitrales CPE, capa plexiforme externa; CGr, capa de los granos. Barras de escala: 50 μm

	PARÁMETROS	DESCRIPCIÓN	FÓRMULAS
Árbol apical	Longitud total	Suma de las longitudes de cada uno de los segmentos de distinto orden que forman el árbol dendrítico apical	
	Número de nodos	Número de puntos de bi/trifurcación	
	Posición dendritas	Longitud del árbol dendrítico en cada capa del BO analizada	
	Tortuosidad	Longitud real de un segmento dividido por la distancia entre sus puntos inicial y final	
	Densidad y número de espinas	Número total de espinas en el árbol y densidad de espinas/ μm	
Soma	Perímetro	Longitud del perímetro del soma (μm)	
	Área	Área del soma (μm^2)	
	$Feret_{\text{máx}}$	Diámetro máximo del cuerpo celular	
	$Feret_{\text{mín}}$	Diámetro máximo perpendicular al $Feret_{\text{máx}}$	
	Aspect ratio	Índice de simetría de un contorno. Cuando tiende a uno indica una forma simétrica (círculo, cuadrado...)	$D_{\text{máx}}/D_{\text{mín}}$
	Compactness	Describe la relación entre el área y el diámetro máximo. Rango de valores entre 0-1	$[\sqrt{(4A/\pi)}]/D_{\text{máx}}$
	Form factor	Describe la forma del contorno de igual manera que el parámetro compactness pero teniendo en cuenta la complejidad del perímetro	$4\pi A/\pi D_{\text{máx}}^2$
	Convexity	Medida del patrón de complejidad de un contorno. Un contorno liso presenta un valor de 1 y a medida que aumentan las indentaciones el valor disminuye.	P_{convexo}/P
	Solidity	Medida del patrón de complejidad de un contorno, teniendo en cuenta su área en vez del perímetro como en el caso del índice convexity	A/A_{convexa}

Tabla 13. Parámetros analizados en el análisis morfológico de los granos de nueva generación. Se analizaron diferentes parámetros cuyo uso es común en las evaluaciones de la complejidad del árbol dendrítico y del cuerpo celular de las neuronas. A , área; D , diámetro; P , perímetro.

Otra de las variables utilizada para el análisis de morfología dendrítica fue la tortuosidad. El índice de tortuosidad nos aporta información acerca del grado de complejidad de la vía tomada por la dendrita para alcanzar su destino final. Nuestros resultados mostraron un aumento significativo del índice de tortuosidad en ausencia de DCX con respecto a condiciones control (figura 21b; $1,168 \pm 0,008$ vs. $1,205 \pm 0,010$, $p=0,007$). Este dato sería indicativo de que la presencia de DCX debe inducir, directa o indirectamente, un direccionamiento del crecimiento de las dendritas mucho más definido.

Por otra parte, llevamos a cabo una comparación tanto del número total de espinas dendríticas del árbol dendrítico apical, como de la densidad de espinas (espinas/ μm de longitud de la dendrita) en las dos condiciones. Encontramos una reducción significativa, no sólo en el número total de espinas, lo que podría ser debido a la reducción de la longitud total de las ramificaciones, si no también en la densidad de espinas medida como número de espinas por μm de longitud dendrítica (figura 21c; $0,0593 \pm 0,0052$ vs. $0,0415 \pm 0,0051$ espinas/ μm ; $p=0,017$). Parece por tanto, que la pérdida de la proteína no sólo afecta a la extensión y a la ramificación de las dendritas, si no que puede estar implicada en procesos de formación de sinapsis. Además, examinando la morfología de las espinas, pudimos observar que en condiciones de ausencia de DCX éstas eran más pequeñas y que algunas de ellas no presentaban cabeza o si la presentaban, su tamaño estaba bastante reducido (figura 21 d y e).

Por último, quisimos estudiar si existía alguna variación en la morfología del soma. En este caso, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros estudiados tras la introducción de DCX-shRNA contra DCX (tabla 14).

CÉLULA	Scramble (n=5)	shDCX (n=5)
Perímetro	28.01 ± 0.94	27.70 ± 0.86 , $p=0.809$
Área	49.57 ± 2.91	48.21 ± 2.80 , $p=0.736$
<i>Feret</i> _{máx}	10.44 ± 0.39	9.96 ± 0.37 , $p=0.368$
<i>Feret</i> _{min}	6.55 ± 0.24	6.57 ± 0.22 , $p=0.955$
<i>Aspect ratio</i>	1.62 ± 0.07	1.53 ± 0.06 , $p=0.339$
<i>Compactness</i>	0.76 ± 0.02	0.79 ± 0.01 , $p=0.244$
<i>Form factor</i>	0.79 ± 0.02	0.78 ± 0.02 , $p=0.985$
<i>Convexity</i>	0.98 ± 0.007	0.96 ± 0.01 , $p=0.237$
<i>Solidity</i>	0.96 ± 0.005	0.97 ± 0.005 , $p=0.480$

Tabla 14. Valores obtenidos en el análisis de los parámetros somáticos en las distintas condiciones experimentales

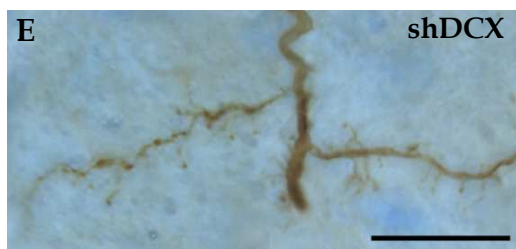
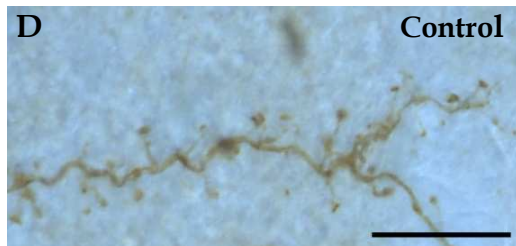
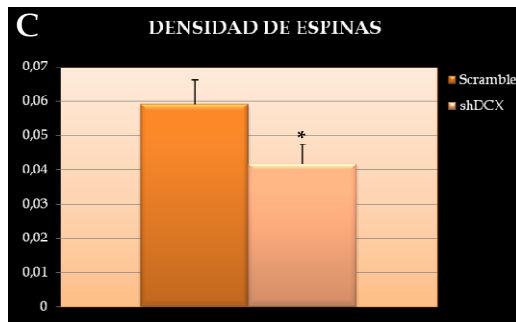
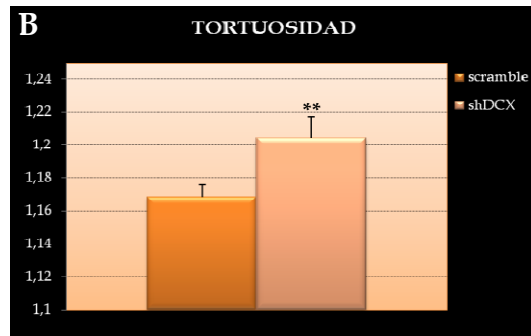
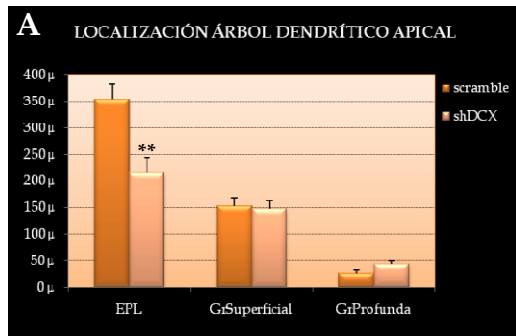


Figura 21. Análisis morfológico de los granos de nueva generación. (A) Diagrama de barras que muestra la distribución del árbol dendrítico apical en las diferentes capas. La reducción del árbol dendrítico en condiciones de ausencia de doblecortina es especialmente patente en la CPE. (B) Diagrama de barras que muestra el índice de tortuosidad en las distintas condiciones experimentales. Éste muestra un aumento significativo de la tortuosidad de las dendritas tras la administración del DCX-shRNA. (C) Diagrama de barras en el que se representa la densidad de espinas ($n^{\circ}/\mu\text{m}$). Ésta se reduce significativamente cuando se reduce la expresión de doblecortina. (D y E) Fotomicrografías de secciones coronales de BO marcadas para GFP 21 días después de la inyección lentiviral. Puede observarse que las dendritas de las células inyectadas con DCX-shRNA presentan menor número de espinas, y además de menor tamaño, que es patente tanto en el tallo como en la cabeza de la espina. BO, bulbo olfatorio; GFP, proteína fluorescente verde. Barras de escala: 100 μm

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, hemos logrado silenciar la expresión de la proteína DCX, tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante el uso de la tecnología del RNA de interferencia. Para poder llevar a cabo esta técnica hemos utilizado vectores lentivirales como vehículos de expresión de moléculas shRNA. Hemos comprobado, por una parte, que conseguimos una gran reducción de la expresión proteica y, además, esta pérdida de expresión es estable, pudiendo así valorar los efectos producidos por la reducción de los niveles de DCX en distintas etapas de la neurogénesis en el sistema SVZ-BO de roedores adultos: la migración y la diferenciación temprana de las células de nueva generación del BO. Mediante este análisis hemos podido comparar los resultados obtenidos en animales adultos con trabajos previos donde se ha estudiado la función de DCX en el proceso neurogénico que tiene lugar durante el desarrollo embrionario.

iRNA COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO

La técnica del iRNA explota una ruta natural y compleja presente en las células eucariotas que encierra un mecanismo específico dentro del complejo proceso de regulación de la expresión génica e incluye la maquinaria de degradación de mRNA de una forma específica de secuencia (Dorsett y Tuschl, 2004; Novina y Sharp, 2004). Gracias a su potencia y selectividad, en los últimos años se ha convertido en la herramienta más poderosa para valorar muy diversos mecanismos y rutas biológicas a través de su análisis mediante pérdida de función. Este sistema presenta ventajas respecto a otras aproximaciones experimentales como puede ser el uso de animales KO. En éstos, la ausencia total de una proteína puede provocar alteraciones que no se correspondan con los acontecimientos que tienen lugar de modo natural, o aparecer, como ha sido demostrado y comentado con anterioridad en la sección “Introducción”, mecanismos tendentes a compensar la ausencia de la proteína (Bai et al., 2003). A pesar de que mediante la técnica del iRNA no se obtienen reducciones del 100% en los niveles proteicos, esto puede suponer una ventaja añadida, ya que, es probable que las cantidades residuales de proteína que sean expresadas sean capaces de inhibir la regulación positiva de otros genes relacionados con la función de la proteína diana y evitar así mecanismos compensatorios relacionados con la ausencia total de expresión. Además, la interferencia mediada por RNA se dirige solamente a una subpoblación celular, y estas células se encontrarán rodeadas de un ambiente tisular completamente

normal, cosa que no ocurre en los animales KO. Esto puede ser un factor decisivo, por ejemplo, a la hora de extraer conclusiones acerca de las implicaciones en las cascadas de relaciones que determinan el proceso migratorio. Y por último, otra de sus ventajas sería su uso *in vivo* en otras especies en las que, como la rata, la generación de animales KO es muy complicada.

Consideraciones técnicas

Antes de aplicar la técnica se hizo necesario tener en cuenta ciertos aspectos para evitar los denominados efectos *off-target* (Jackson et al., 2003; Persengiev et al., 2004; Scacheri et al., 2004). Se denominan efectos *off-target* a las consecuencias colaterales que la introducción de un RNA de interferencia en la célula puede ejercer sobre genes distintos del gen que se busca silenciar. Teóricamente, dado que el apareamiento entre bases es altamente específico y que el cambio de una sola base puede prevenir la hibridación entre dos ácidos nucleicos, podríamos pensar que buscando secuencias que sean homólogas únicamente al gen diana eliminaríamos los posibles efectos inespecíficos. Desafortunadamente, esta precaución es insuficiente para asegurar que no ocurren cambios en los niveles de expresión de otros genes, que además no tienen por qué estar relacionados con el gen diana, pudiendo estar involucrados en procesos que nada tienen que ver con el que se está estudiando.

Por un lado debemos tener en cuenta que el mecanismo de regulación génica mediada por miRNAs resulta de un apareamiento imperfecto entre el mRNA diana y la hebra guía o codificante del miRNA (He y Hannon, 2004; Kim, 2005). Teóricamente al introducir un siRNA en la célula, éste puede estar actuando como un miRNA (Doench et al., 2003; Saxena et al., 2003), y degradar otros mRNAs (Yekta et al., 2004; Bagga et al., 2005) cuya secuencia no es del todo complementaria a la del siRNA introducido. De hecho, se han descrito silenciamientos *off-target* con una complementariedad de tan solo 7 nucleótidos (Lin et al., 2005). Por ello, para asegurarnos de que los efectos observados al introducir un iRNA son específicos, deberemos asegurarnos de que dos moléculas dirigidas hacia distintas regiones de un mismo mRNA desencadenan las mismas respuestas biológicas. En este sentido, en el presente trabajo utilizamos la secuencia publicada por Bai y colaboradores en 2003 contra el mRNA de DCX. La especificidad de esta secuencia ha sido analizada previamente por éstos y otros autores que observaban los mismos efectos, aunque en

diferente grado, introduciendo moléculas de siRNA contra distintas regiones del mRNA de la proteína (Bai et al., 2003; Ocbina et al., 2006).

Por otro lado, dado que las proteínas que procesan los iRNAs introducidos de forma exógena también participan en el mecanismo de regulación génica mediado por miRNAs, es posible que determinadas dosis de siRNAs en la célula saturen, de alguna forma, esta maquinaria de procesamiento, produciendo así efectos indeseados en la expresión de otros genes que están siendo regulados por miRNAs (Hong et al., 2005). De hecho, se ha comprobado que en el caso de los shRNAs existe una competencia con los miRNAs, saturando la disponibilidad de Exportina 5, proteína encargada del transporte de los pre-miRNA del núcleo al citoplasma. Además, se ha visto que en el procesamiento de RISC existe competencia por la proteína Argonauta-2, que forma parte del complejo del silenciamiento (Grimm y Kay, 2007). Para evitar en lo posible estos riesgos, en nuestro trabajo utilizamos como control un shRNA con la misma composición nucleotídica que la publicada, pero en distinto orden (scramble), y cuya secuencia hemos comprobado que no es complementaria a ningún mRNA celular. Utilizando este tipo de control minimizamos al máximo los efectos *off-target* producidos como consecuencia de la regulación negativa de los miRNA debida a la sobresaturación de la maquinaria de procesamiento.

En cualquier caso, estudios recientes *in vitro* han demostrado que, de forma general, los shRNAs producen menos efectos *off-target* que los siRNAs (Rao et al., 2009a y b). Estas diferencias en la aparición de efectos indeseados pueden ser debidas al hecho de que los shRNAs se transcriben en el núcleo y allí están sujetos a mecanismos de regulación y de procesamiento endógenos del propio núcleo celular, a diferencia de los siRNAs que son más susceptibles de degradación por encontrarse en el citoplasma lo cual puede producir más efectos inespecíficos. En concreto, se supone que los extremos 5' creados de forma endógena por el enzima Dicer durante el procesamiento de un shRNA son menos inmunogénicos que los extremos 5' exógenos de los oligómeros siRNAs (Kim et al., 2005; Marques et al., 2006). Esto hace que las moléculas de shRNAs no estimulen la respuesta inmune mediada por interferón a diferencia de lo que ocurre en muchos casos con la introducción de siRNAs (Robbins et al., 2006).

Lentivirus como vehículos de expresión

A la hora de dirigir las moléculas de iRNA al interior de las células diana, la efectividad de este proceso es un aspecto crítico para que la aplicación de la técnica sea

satisfactoria. Existen innumerables metodologías para inducir la expresión de iRNAs en el interior celular, entre las que destacan los vectores lentivirales basados en el virus HIV-1.

Los vectores virales se han utilizado con éxito a la hora de silenciar genes en tipos celulares muy diversos (Dittgen et al., 2004). Estos sistemas, en general, suplen las deficiencias de otras técnicas como son las transfecciones transitorias y el uso de otros vectores de expresión basados en plásmidos, ya que permiten una expresión estable del transcrito en distintos tipos celulares, incluso aquellos difíciles de transfectar (Yam et al., 2002; Geraerts et al., 2006). En concreto, para alcanzar los objetivos propuestos en el presente trabajo de Tesis Doctoral, los lentivirus, en particular, presentan ciertas ventajas con respecto a otros sistemas virales, que serán discutidas a continuación y que han hecho que los hayamos elegido como herramienta en nuestro trabajo.

Existen dos grupos de vectores virales dependiendo de si su genoma se integra dentro del material genético de la célula hospedadora (virus integrativos: oncoretrovirus y lentivirus) o si permanece en el núcleo predominantemente en forma extracromosómica (virus episomales: adenovirus, herpes virus y virus adenoasociados), (Thomas et al., 2003). Mientras que los vectores episomales son capaces de mantener estable la transcripción en células no proliferantes, los vectores virales integrativos representan la herramienta necesaria para mantener una transcripción estable en células en división (Thomas et al., 2003). Además, hay evidencias de que los vectores adenoasociados pueden contener propiedades y/o estimular procesos celulares que bloqueen el silenciamiento génico mediado por iRNA (Leonard y Schaffer, 2006; Grimm y Kay, 2007), además de que presentan baja capacidad de transducir neuronas (Lundstrom, 2003). Dentro de los vectores integrativos, los oncoretrovirus solamente infectan células en división, mientras que los vectores lentivirales son capaces de infectar tanto células en división como células en otros estadios del ciclo, e incluso perfectamente diferenciadas (Buchsacher y Wong-Staal, 2000; Greber y Fassati, 2003).

Por otra parte, los lentivirus, a diferencia de los oncoretrovirus y de los virus adenoasociados, tienden a integrarse lejos de los promotores presentes en el genoma celular, por lo que no afectarían a la regulación de otros genes (Wu et al., 2003). Este hecho es decisivo en investigación básica a la hora de minimizar efectos *off-target*, pero sobre todo en lo que a terapia génica se refiere, ya que, lo contrario podría representar un gran riesgo oncogénico (Cattoglio et al., 2007; Cockrell y Kafri, 2007). Otra de las

ventajas de los lentivirus frente a otros tipos de vectores virales es su escasa inmunogenicidad. En este sentido, trabajos previos han demostrado la efectividad de los vectores lentivirales para introducir genes en distintas estirpes celulares del SNC generando una expresión estable en el tiempo en ausencia de respuesta inflamatoria (Naldini et al., 1996; Geraerts et al., 2006). Todas estas razones han hecho de los lentivirus nuestra elección como herramienta a la hora de optar por un método de aplicación del iRNA en la SVZ de roedores adultos.

De forma general, los vectores lentivirales aplicados a la interferencia mediada por RNA contienen dos *cassettes* de expresión (Janas et al., 2006), uno que contiene la secuencia que dará lugar al shRNA, y otro que será la unidad de expresión de la proteína marcadora (normalmente la GFP) que permitirá monitorizar las células infectadas. Se ha demostrado que la elección del promotor que conduce la expresión del shRNA es decisiva para la eficiencia del iRNA (Kawasaki y Taira, 2003). Hasta la fecha, dos de los promotores de la RNA polimerasa III son los más utilizados a la hora de dirigir la expresión de los shRNAs: el promotor U6 y el promotor H1. Estos promotores tienen ventajas con respecto a otros de las RNA polimerasas II y la III, y es que presentan una estructura simple, un sitio de inicio de la transcripción bien definido y dirigen la síntesis de RNAs pequeños de forma natural (Paule y White. 2000; Myslinski et al., 2001).

Bai y colaboradores (2003) utilizaron el promotor U6 para dirigir la expresión del shRNA contra DCX, en cambio, en nuestro sistema lentiviral utilizamos el promotor H1 para expresar el *cassette* DCX-shRNA. Aunque existen trabajos en los que se demuestra que el promotor U6 es más eficaz a la hora de silenciar un gen mediante iRNA (Mäkinen et al., 2006), Boudreau y colaboradores (2008) demostraron que este promotor daba lugar a transcritos que se acumulaban en el citosol y en el núcleo, indicando que tanto la exportina 5 como Dicer podrían llegar a saturarse (Boudreau et al., 2008). Además, se ha demostrado que la expresión lentiviral de grandes cantidades de shRNAs, producidas bajo la dirección del promotor U6, resultan tóxicas en linfocitos primarios humanos *in vitro* (An et al., 2006). Por ello, estos autores recomiendan el uso del promotor H1, que no tiene una actividad transcripcional tan alta mientras que es lo suficientemente eficaz como para llevar a cabo la interferencia mediada por RNA.

EXPRESIÓN DE DOBLECORTINA EN PROGENITORES EMBRIONARIOS DE LGE

De acuerdo con la literatura consultada, la expresión de DCX, *in vivo*, comienza en algún momento durante el periodo en el que una célula madre sale del ciclo celular y se compromete hacia un linaje neuronal dando lugar a un neuroblasto (Brown et al., 2003; Kronenberg et al., 2003). Su expresión alcanza el pico máximo alrededor de la segunda semana de vida de la célula y sus niveles se van reduciendo progresivamente hasta hacerse prácticamente indetectable después de un mes (Brown et al., 2003; Couillard-Despres et al., 2005). En el presente trabajo hemos determinado la expresión de DCX *in vitro* en progenitores de LGE tanto en condiciones proliferativas (neuroesferas en flotación) como en condiciones de diferenciación a distintas estirpes celulares. Aunque hemos obtenido cierta expresión de su mRNA en todos los casos, sólo existen niveles detectables de proteína en el caso de cultivo mixto (neuronas más glía) de 6 días de diferenciación.

En condiciones proliferativas los progenitores embrionarios multipotenciales se mantienen en estado indiferenciado formando agregaciones esféricas denominadas neuroesferas. En estas condiciones no detectamos expresión de DCX a nivel proteico, dato que coincide con trabajos previos en los que no se observa coexpresión de DCX con marcadores de células madre/multipotentes como GFAP y Nestina (Kronenberg et al., 2003; Rao y Shetty, 2004). Aunque no detectamos la presencia de la proteína, hemos observado cierta expresión de mRNA. Esto puede ser debido a que las neuroesferas no son completamente homogéneas, ya que, se ha comprobado que existen células que salen de ciclo celular y presentan distintos grados de diferenciación dentro de la propia neuroesfera (Jensen y Parmar, 2006; Ahn et al., 2008).

En los cultivos con 3 días de diferenciación *in vitro*, tampoco hemos encontrado expresión de proteína en ningún caso, aunque hemos observado un aumento de los niveles de mRNA, particularmente en la diferenciación mixta/neuronas. Este dato puede estar indicando que en este estadio algunas de las células ya han comenzado a expresar DCX, aunque es posible que los niveles no sean lo suficientemente elevados como para ser detectados por western-blot o por inmunofluorescencia. A los 6 días de diferenciación los niveles de mRNA aumentan en todos los casos, pero especialmente en la diferenciación mixta, que, como hemos indicado anteriormente es donde también detectamos la presencia de la proteína. Estos resultados coinciden con otras

publicaciones en las que se demuestra que los niveles de DCX aumentan durante la diferenciación neuronal temprana (Brown et al., 2003; Couillard-Despres et al., 2005). No obstante, llega un momento en el que la expresión se reduce a medida que la neurona va alcanzando su madurez, que es lo que consideramos que podría estar sucediendo en los cultivos de neuronas, en los que los niveles de proteína son más bajos (no han sido detectados por las técnicas utilizadas) que en cultivo mixto tras el mismo tiempo de diferenciación *in vitro*. De hecho, morfológicamente, las células en las condiciones de cultivo de neuronas parecen más maduras y diferenciadas que las neuronas del cultivo mixto. Por ello consideramos que en el caso del cultivo de neuronas la expresión de DCX puede haber comenzado a regularse negativamente debido a la madurez alcanza por las neuronas en estas condiciones.

El silenciamiento *in vitro* de doblecortina reduce los niveles del mRNA de Tuj1

En los experimentos realizados que iban encaminados a determinar la influencia de la reducción de la expresión de DCX sobre la expresión de otros genes, nuestros resultados demuestran un descenso en los niveles de expresión de Tuj1 al reducirse *in vitro* los niveles de DCX. Esta isoforma de la β tubulina (β III tubulina) se expresa de forma exclusiva en células del linaje neuronal en el SNC de vertebrados superiores (Havercroft y Cleveland, 1984; Lee et al., 1990a y b). Su expresión comienza de forma temprana en neuronas post-mitóticas y continúa durante el proceso de diferenciación celular (Jiang y Oblinger, 1992; Lee et al., 1990b; Lee y Pixley, 1994). Diferentes trabajos muestran la coexpresión de Tuj1 tanto con DCX (Yang et al., 2004) como con NeuN (Ambrogini et al., 2004). Aunque Tuj1 se ha utilizado durante mucho tiempo como marcador específico de células de nueva generación en los procesos de neurogénesis adulta (Doetsch et al., 1997; Gould et al., 2001), esta utilidad es dudosa, ya que, su expresión se mantiene constante en algunas poblaciones de células maduras como las células de Purkinje del cerebelo (Baltanás, 2009).

Ante estas evidencias recogidas en la literatura consideramos la posibilidad de que la disminución de Tuj1 debida al silenciamiento de DCX pudiera estar reflejando un retraso en la salida del ciclo celular y en la determinación de las células madre a neuronas mediada por la ausencia de DCX. Estos datos coincidirían con los resultados de nuestro análisis *in vivo*, donde hemos observado un retraso en la maduración de los granos tras silenciar la expresión de DCX. Sin embargo, no hemos observado aumento

del marcador astrogial GFAP ni de los marcadores neurales nestina y vimentina. Es posible que debido a que la expresión de estos marcadores es mucho mayor dentro de la neuroesfera que la de Tuj1, mientras que las diferencias en los niveles de Tuj1 resultan significativas, las variaciones en los niveles del resto de marcadores podrían no mostrar significación estadística. Por otro lado, existen trabajos en los que se demuestra que la expresión ectópica de DCX en células de glioma produce una detención del ciclo celular en la fase G₂ (Santra et al., 2006 y 2009), por lo que se podría pensar que la disminución en los niveles de DCX tendría un efecto contrario. No obstante debemos tener en cuenta que: (1) Santra y colaboradores (2009) inducen la expresión de la proteína en células que normalmente no la expresan y (2) que los mecanismos intracelulares en las células de glioma pueden ser totalmente diferentes a lo que ocurre en el caso de nuestros progenitores embrionarios de LGE.

Otra posibilidad es que el descenso de DCX tenga un efecto directo en los niveles de expresión de Tuj1. La DCX pertenece a la familia de proteínas de unión a microtúbulos (MAPs) y entre sus funciones destaca la regulación de la dinámica microtubular (Horesh et al., 1999; Moores et al., 2003). Las distintas isoformas de β tubulina son originadas por diferentes genes y muestran especificidad de tejido (Ferlini et al., 2007; Khodiyar et al., 2007). Además, cada una de ellas es susceptible a modificaciones post-traduccionales que pueden afectar a las propiedades de la dinámica microtubular, bien de forma directa, bien mediante la acción de determinadas MAPs (Kavallaris et al., 1997). Se ha demostrado que la expresión ectópica de DCX en células de glioma produce catástrofe microtubular y aumenta la despolimerización de la actina. (Santra et al., 2009). Es posible, por tanto, que variaciones en los niveles de DCX pudieran afectar, directa o indirectamente, a proteínas constituyentes o reguladoras del citoesqueleto, entre las que se encuentra Tuj1. En este sentido, existen varios trabajos que relacionan la expresión de esta forma de la β tubulina con la resistencia a drogas contra el cáncer en algunos tipos de tumores (Kavallaris et al., 1997; Shali et al., 2005; Verrills y Kavallaris, 2005; Ferrandina et al., 2006). Sería válido considerar que la expresión de esta isoforma asegurara de algún modo la denominada inestabilidad dinámica de los microtúbulos, que representa un atributo esencial en el citoesqueleto (Gordon-Weeks, 2004) y que se sabe que está regulada activamente por DCX.

SILENCIAMIENTO DE DOBLECORTINA EN PROGENITORES DE LA SVZ ADULTA

En 1996, Naldini y colaboradores demostraron que los lentivirus constituyen una herramienta eficaz para poder llevar a cabo transferencia génica. Estos experimentos fueron realizados en el SNC de roedores mediante inyección estereotáxica en el estriado y en el hipocampo (Naldini et al., 1996). Posteriormente otros investigadores corroboraron estos resultados en otras regiones del cerebro como la ZSV o el interior de los ventrículos laterales (Geraerts et al., 2006). Estos autores han comprobado que en el cerebro se produce una expresión estable del transgen incluso meses después de la infección lentiviral (Naldini et al., 1996, Geraerts et al., 2006). Pero, los lentivirus, además de actuar como vehículos de expresión, facilitan el marcaje *in vivo* de las células madre neurales adultas. Este hecho puede considerarse como un instrumento interesante para poder realizar un seguimiento *in vivo* y analizar las características de las células de nueva generación. En nuestro trabajo hemos detectado diferentes estirpes entre las células de nueva generación, y aunque éste no era un objetivo específico planteado para el presente trabajo de Tesis Doctoral, por lo novedoso de algunos de los hallazgos realizados hemos decidido hacer referencia a ellos en este apartado.

En este sentido, entre los tipos celulares encontrados, tres semanas después de la infección lentiviral, encontramos: interneuronas cuya generación postnatal había sido descrita con anterioridad; y otras cuya generación, o bien no había sido descrita, o se creía exclusivamente prenatal. Coincidiendo con trabajos previos (Luskin, 1993; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Lledó et al., 2005), los tipos celulares mayoritarios encontrados en nuestro estudio han sido células periglomerulares y granos. Por otra parte, en la CG hemos encontrado células de axón corto, cuya generación postnatal había sido sugerida debido a que algunas de estas células expresan DCX en el adulto (Nacher et al., 2001). Este extremo quedó demostrado años más tarde por Yang (2008). En esta misma capa, hemos encontrado algunas células con morfología de neuronas empenachadas externas. Los primeros trabajos sobre neurogénesis postnatal en el BO (Hinds, 1968a; Bayer, 1983), basados en estudios autorradiográficos, apuntaban a que la generación de las neuronas de proyección (células mitrales y células empenachadas) estaba restringida al desarrollo embrionario. Nuestros propios trabajos previos demostraron que algunas de estas células expresaban DCX en roedores adultos (Vidal, 2006), lo que sugería que eran

células de generación reciente. Ya en 1998, Frazier y Brunjes, al estudiar los cambios acontecidos en el bulbo de la rata durante las primeras semanas de su desarrollo postnatal, observaron un aumento en el número total de células empenachadas externas a P30 con respecto a P0. Por otra parte, no resulta tan extraño, ya que, esta categoría celular representa mayoritariamente un tipo interneuronal que forma parte del grupo de células yuxtglomerulares (Schönfeld y Macrides, 1985).

Además, hemos encontrado varios tipos de interneuronas en la CPE. Este hecho coincide con una publicación reciente (Yang et al., 2008) donde se describen en esta capa distintos tipos interneuronales de generación postnatal que expresan fundamentalmente calretinina y parvalbúmina.

Por último, hemos identificado varios tipos de células profundas de axón corto en la CGr. Este dato no había sido descrito con anterioridad en roedores adultos. Algunos trabajos recientes demuestran, por ejemplo, que las células de Blanes (uno de los tipos de las células profundas de axón corto) se generan mayoritariamente de forma prenatal, pero existe producción de este tipo celular a P30.

Todos estos datos demuestran que existe un porcentaje, nada despreciable, de otros tipos interneuronales, además de granos y células periglomerulares, que son generados durante el desarrollo postnatal de BO. De hecho, en ratas, entre P4 y P40, las interneuronas de la CPE representan más del 3% del total de las células de nueva generación (Yang, 2008). Hasta el momento, estos tipos celulares han sido excluidos de los estudios en los que se analiza el papel de las células de nueva generación en la función olfatoria y, tal vez, deberían tenerse en cuenta en futuras investigaciones.

Grado de silenciamiento de doblecortina

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, hemos determinado *in vivo* los efectos del silenciamiento génico de DCX entre 5 y 21 días después de la infección lentiviral. Previamente hemos valorado, 15 días después de la transducción, mediante doble inmunofluorescencia GFP/DCX el grado de silenciamiento producido por la interferencia mediada por RNA. Nuestros resultados, en condiciones control, muestran que prácticamente todas las células GFP+ expresan DCX. En el caso de las células infectadas con el DCX-shRNA, la expresión de DCX se redujo hasta el punto de no ser detectada por inmunofluorescencia en la gran mayoría de las células GFP positivas.

Bai y colaboradores (2003) utilizaron la tecnología del iRNA mediante electroporación *in utero* para silenciar la expresión de DCX (Bai et al., 2003). Estos

autores consiguieron reducciones en los niveles de DCX del orden del 80% un día después de la electroporación y del 60% cuatro días después de la electroporación. Este sistema de aplicación de la interferencia es capaz de reducir los niveles proteicos de forma rápida, pero parece poco eficaz en cuanto a la estabilidad temporal ya que en solo cuatro días, se pierde un 20% del efecto del DCX-shRNA. En nuestro caso hemos utilizado un sistema de expresión estable, y hemos conseguido que el silenciamiento de DCX perdure en el tiempo para poder analizar distintos aspectos de la neurogénesis adulta. Por otra parte, para determinar el punto de inyección en la aplicación de la técnica de electroporación *in utero*, se debe realizar una inyección certera y, además, dirigir la transfección espacialmente, orientando el campo eléctrico del pulso (LoTurco y Bai, 2006). Todo ello representa serios inconvenientes, fundamentalmente en el caso necesitar infecciones muy localizadas en determinados núcleos o regiones encefálicas.

Migración tangencial a través de la CMR en roedores adultos.

Nuestros resultados demuestran que no existen variaciones en el proceso de migración tangencial a través de la CMR después de silenciar la expresión de DCX. Los neuroblastos, 5 días después de la infección lentiviral, alcanzan el mismo nivel rostral en las dos condiciones experimentales. Además, en ambos casos se distribuyen de forma uniforme a través de la CMR y llegan hasta la entrada del BO. De hecho, 15 días después de la infección lentiviral, el número de neuroblastos localizado en la SBPE es prácticamente el mismo tanto en condiciones control como en ausencia de DCX. Estos datos no coinciden con una publicación anterior donde se afirma que la DCX es necesaria durante la migración de los neuroblastos a través de la CMR en su camino hacia el BO (Koizumi et al., 2006), pero como discutiremos a continuación, nuestros resultados y los de estos autores no tienen por qué ser mutuamente excluyentes.

Koizumi y colaboradores (2006) llevaron a cabo su estudio con ratones adultos KO para DCX. En estos animales existe una alteración de la estructura de la CMR, la cual presenta el doble de grosor que en ratones control. Mediante marcaje de las células de nueva generación con BrdU, comprobaron que existe un retraso en el movimiento de estas células a través de la CMR, de modo que llegan menos células a la CG del BO en el mutante para DCX que en animales silvestres.

No debemos descartar la posibilidad de que los niveles residuales de la proteína que quedan cuando llevamos a cabo el silenciamiento mediante iRNA sean suficientes como desempeñar su función con normalidad en la migración a través de la CMR. Si

esto fuera así, nos indicaría que este sistema es menos susceptible a la reducción de los niveles de DCX, a diferencia de otras rutas migratorias que se alteran de forma dramática en las mismas condiciones. Pero, posiblemente, la razón que explica la disparidad entre los resultados obtenidos por estos autores y los resultados obtenidos en nuestro trabajo, es la diferencia en la forma de abordar uno y otro estudio. Para llevar a cabo nuestro análisis, utilizamos el mecanismo de iRNA para disminuir los niveles de DCX. En este caso, el silenciamiento de la proteína está perfectamente limitado en espacio y tiempo, a diferencia de lo que ocurre con los animales KO.

En primer lugar, en el caso de los animales KO, la mutación no se encuentra restringida a la subpoblación celular objeto de análisis y, por tanto, el ambiente tisular en el que estas células se mueven también se puede considerar, de algún modo, alterado. Como hemos mencionado en la sección de Introducción, se ha descrito que la pérdida de expresión de la proteína no sólo influye en la propia célula afectada, sino que también produce alteraciones en las células adyacentes, en las que los niveles de expresión de la proteína son normales, afectado con ello a su migración (Bai et al., 2003). La migración tangencial a través de la CMR representa un tipo único de migración, denominada migración homofílica, donde es fundamental la asociación entre neuroblastos para poder llevar a cabo su desplazamiento (Lois et al., 1996; Wichterle et al., 1997). En nuestro estudio, solamente se redujo la expresión de DCX en las células infectadas y analizadas mediante la expresión de GFP. Estas células representan una población relativamente pequeña cuando se la compara con el total de las células que se encuentran migrando a través de la CMR. Es decir, las células que pierden la expresión de DCX están migrando sobre neuroblastos cuya expresión de DCX debemos considerarla, en principio, normal, por lo que tenderán a mantener una posición correcta, lo que facilitará el movimiento a través de ellas. En el caso de los animales KO, sin embargo, las células analizadas (marcadas mediante incorporación de BrdU) se están desplazando a través de otras en las que la expresión de DCX también es nula, por lo que el efecto de la ausencia de DCX, en este caso, tendría lugar tanto sobre los elementos migrantes como sobre el sustrato por el que están migrando de modo que se podría alterar de forma muy significativa el proceso de migración. En nuestro estudio, sin embargo, la pérdida de DCX en las células migrantes no sería tan dramática en cuanto a los efectos sobre la migración ya que estas células se encuentran migrando a través de una CMR estructurada, donde también hay neuroblastos “normales” con una morfología bipolar típica sobre los que desplazarse.

En segundo lugar, en los animales KO, el desarrollo embrionario ha tenido lugar en ausencia total de la proteína. Es posible, por tanto, que la pérdida de su función durante el desarrollo ocasione alteraciones estructurales y/o funcionales permanentes que desencadenen los efectos observados por estos autores en animales adultos. De hecho, Koizumi y colaboradores (2006) observaron un engrosamiento de la CMR en ratones KO y comprobaron *in situ* que no existían variaciones en las proporciones entre glía y células de la estirpe neuronal (Koizumi et al., 2006). Si solamente existiese un retraso en el proceso de migración, se produciría un acumulo de neuroblastos, por lo que la proporción neuroblastos/glía aumentaría. Este dato podría estar, por tanto, indicando, que en este modelo experimental existe una modificación intrínseca de la estructura de la CMR que estaría induciendo una alteración en el proceso migratorio de los progenitores hacia el BO.

Para dilucidar la causa de estas diferencias, sería interesante realizar trasplantes celulares de progenitores de ZSV adulta de ratones KO en la ZSV de ratones silvestres y valorar, en este caso, el proceso migratorio.

De cualquier modo, nuestros resultados indican que el papel que desempeña la DCX durante la migración a través de la CMR adulta no es tan relevante como lo es en la migración radial que tiene lugar durante la corticogénesis (Bai et al., 2003) o los procesos de migración tangencial que tienen lugar durante el desarrollo embrionario (Friocourt et al., 2007; Bai et al., 2008). Tal vez existan rutas de migración con características particulares que las hacen más o menos susceptibles o dependientes de la función de DCX, o es posible que existan diferencias regionales en la expresión de otros genes potencialmente compensatorios de DCX como Lis1, Tau o DCLK. Si bien es cierto que no se han detectado variaciones en los niveles de ninguna de estas proteínas mediante western-blot en los ratones KO para DCX, es posible que los niveles basales en la célula sean suficientes para hacer que, en ausencia de DCX, se lleve a cabo el proceso de migración de una forma completamente normal (Burgess et al., 1999; Burgess y Reiner, 2000; Lin et al., 2000). En este sentido se ha comprobado que DCLK y DCX son coexpresadas en células en migración y muestran funciones de estabilización de microtúbulos indistinguibles (Burgess y Reiner, 2000; Lin et al., 2000), e incluso algunos trabajos apuntan que durante la corticogénesis tienen funciones redundantes (Deuel et al., 2006; Koizumi et al., 2006).

El silenciamiento de doblecortina provoca la aparición de células multipolares.

Nuestros resultados muestran la aparición de células con morfología multipolar a distintos niveles del BO cuando interferimos la expresión de DCX *in vivo* durante la neurogénesis adulta. Dado que la morfología de estas células recordaba, en cierto modo, a la de células gliales, realizamos técnicas de doble inmunofluorescencia combinando la detección de GFP (presente en todos esos elementos) con distintos marcadores gliales (GFAP, Olig2 e Iba1), descartando así la posibilidad de que se tratase de oligodendrocitos, astrocitos o células de microglía, al resultar negativos para todos ellos. Por lo tanto, todo parece indicar que se trata de neuronas.

Trabajos recientes han demostrado que, durante la migración radial de los precursores de las neuronas piramidales de la corteza cerebral, los neuroblastos pasan por un estadio multipolar transitorio (Tabata y Nakajima, 2003). Este tipo de morfologías no sólo están presentes durante la corticogénesis, si no que representan un estadio intermedio en la mayoría de modelos migratorios (LoTurco y Bai, 2006). De hecho, las interneuronas que migran tangencialmente durante el desarrollo, también presentan estas morfologías en la zona cercana de la ZSV neocortical (Nadarajah et al., 2002); al igual que las células que migran hacia los núcleos auditivos del tronco del encéfalo (Book y Morest, 1990). Las células que se encuentran en este estadio se mueven de forma serpenteante y al azar, al contrario de lo que ocurre con la locomoción o la translocación somática, en las que tiene lugar una progresión constante y perfectamente orientada del movimiento (Tabata y Nakajima, 2003; Kriegstein y Noctor, 2004; Noctor et al., 2004). Estas células multipolares, sin embargo, permanecen detenidas en su migración, mientras que, durante ese tiempo, sus procesos se extienden y retraen de una forma constante y dinámica (Kriegstein y Noctor, 2004; Noctor et al., 2004). Como consecuencia de ese comportamiento, cuando las células presentan estas morfologías, la velocidad media de la migración disminuye notablemente. Algunos autores han propuesto que la fase multipolar representa un estadio plástico y sumamente dinámico, durante el cual pueden tener lugar cambios muy importantes en las trayectorias de movimiento y en las interacciones célula-célula (LoTurco y Bai, 2006).

Se ha descrito un aumento de este tipo de morfologías neuronales cuando, bajo determinadas circunstancias, se alteran las rutas migratorias. Bai y colaboradores (2003), en el trabajo donde describen la secuencia del DCX-shRNA, observaron que la

proporción de células multipolares aumentaba en el proceso de corticogénesis después de interferir la expresión de DCX mediante electroporación *in utero* (Bai et al., 2003). Un aumento de este tipo morfológico ha sido también descrito después de interrumpir la expresión de otras proteínas implicadas en procesos migratorios como la filamina A (Nagano et al., 2004) o Lis1 (Vallee et al., 2001; Hatten, 2005; Tsai et al., 2005). Además, la aparición de células multipolares se ha descrito también al silenciar la expresión de DCX en otras rutas migratorias, como la corriente cortical lateral durante el desarrollo embrionario (Bai et al., 2008). En nuestro caso, el DCX-shRNA induce un incremento significativo del número de células multipolares, además de afectar a la longitud de los procesos de las células en migración con morfologías bipolares. Lo que aún se desconoce es si la aparición de las morfologías multipolares causa la alteración en el proceso migratorio, o si por el contrario, es la alteración en el proceso de migración lo que causa la aparición de las morfologías aberrantes.

Por tanto, es frecuente encontrar este tipo de morfologías en células que están migrando durante la embriogénesis, pero, cuando se interfiere la expresión de ciertas proteínas como DCX, filamina A o Lis1, la proporción de estos tipos morfológicos con respecto a los tipos bipolares clásicos aumenta (Nagano et al., 2004; Tsai et al., 2005). Esto coincidiría con nuestros resultados, donde hemos encontrado un aumento de este tipo morfológico durante la migración radial del BO adulto tras bloquear la expresión de DCX.

Estas células entran y salen del estadio multipolar a otro bipolar a diferentes tiempos y en distintas localizaciones. (Tabata y Nakajima, 2003; Tsai et al., 2005). Durante la migración de los precursores de las células piramidales de la corteza, en condiciones normales, se pueden observar células con esta morfología en diferentes localizaciones, lo cual sugiere que existen dos subestadios durante esta ruta migratoria. Uno de ellos tiene lugar en el límite entre la ZSV y la denominada zona intermedia (ZI) y el otro en la mitad más superficial de la ZI. Al interferir la expresión de DCX, se observan acúmulos de estas células multipolares preferentemente en la zona superficial de la ZI (Bai et al., 2003). Por el contrario, la sobreexpresión de la proteína provoca una disminución del tipo multipolar y un aumento de las células que adoptan la morfología bipolar (Bai et al., 2003; Ramos et al., 2005). En el caso de la filamina A, la reducción de su expresión provoca un acumulo de células multipolares en las regiones más cercanas de la ZSV (Nagano et al., 2004). La estricta localización de estos fenotipos celulares en uno y otro caso coincide con el patrón de expresión espacio-temporal de

estas dos proteínas. La filamina A se expresa de una forma más temprana, cuando las células todavía se encuentran entre la zona ventricular (ZV) y la ZSV, mientras que la DCX no se expresa de forma significativa hasta que las células no salen del ciclo celular (Gleeson et al., 1999). Es interesante tener esto en cuenta, puesto que en nuestro trabajo, al estudiar los procesos neurogénicos en el SNC adulto en el sistema ZSV-BO, la DCX se expresa en progenitores interneuronales durante entradas y salidas del ciclo celular, ya que, son capaces de dividirse durante su migración, tanto a través de la CMR como en el BO (Smith y Luskin, 1998; Coskun y Luskin, 2002). Es posible, por tanto, que esta proteína no cumpla el mismo papel en estas células, o que su función no tenga la misma relevancia debido estas características tan especiales y exclusivas de este tipo de ruta migratoria.

Migración radial a través del BO en roedores adultos

Mientras que los datos obtenidos en nuestro trabajo revelan que el silenciamiento de DCX no afecta a la migración tangencial a través de la CMR adulta, en esas condiciones, se produce una clara alteración de la migración radial a través del BO. Dos semanas después de la infección lentiviral, encontramos una alteración de los porcentajes relativos de neuroblastos localizados en la CGr profunda y la CGr superficial, mientras que no encontramos diferencias significativas en la SBPE ni en las capas supramitales. Sin embargo, 21 días después de la infección lentiviral, las diferencias se hicieron patentes en todas las capas del BO analizadas. Estos datos indican que, dos semanas después de la infección, las diferencias en la SBPE debidas a un acumulo de neuroblastos están siendo enmascaradas por la llegada de células de nueva generación a través de la CMR, puesto que, como apuntamos anteriormente, nuestros resultados muestran que la migración tangencial no se ve alterada de forma significativa por la reducción en los niveles de DCX. Por otra parte, en las capas supramitales, aun no han llegado suficientes células como para que las diferencias entre una y otra condición experimental sean estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando analizamos el BO 21 días después de la infección lentiviral, observamos un acúmulo de células de nueva generación en la SBPE y la CGr profunda, mientras que existe un número menor de células localizadas en las capas más superficiales. Este hecho nos está indicando que existe un retraso en el proceso de migración radial o una alteración en la capacidad de las células para alcanzar los destinos superficiales.

Como hemos mencionado anteriormente, el silenciamiento de DCX produce un acumulo de neuronas en la ZI durante el desarrollo de la corteza. Es posible, por tanto, que esta región represente un punto decisivo en esta ruta migratoria. Los neuroblastos, cuando llegan a la ZI pueden seguir migrando radialmente o elegir una vía de migración tangencial para distribuirse lateralmente por otras regiones corticales (Götz, 2003). Es posible que la DCX juegue un papel esencial en ese proceso de elección entre una y otra ruta de migración. En la ZI las fibras de glía radial se desfasciulan y esto puede suponer un cambio de sustrato para los neuroblastos que migran a través de ellas (Götz, 2003). Este dato tiene especial relevancia puesto que se ha relacionado la DCX con la regulación de la adhesión neuronal (Kizhatil et al., 2002; Friocourt et al., 2005). Tras silenciar la expresión de la proteína, hemos encontrado células multipolares en la SBPE y en la CPE, por las que discurren una gran cantidad de fibras al igual que lo que ocurre en la ZI durante el desarrollo cortical. Así, las células de nueva generación que migran radialmente a través del BO pueden entrar en un estadio intermedio en su proceso migratorio de forma similar a lo que ocurre en la ZI de la corteza en desarrollo, y que en ese momento sean más susceptibles a la pérdida de expresión de la proteína. Lo que sí es cierto es que, este estadio multipolar debe ser corto en el tiempo o puede que no aparezca en todas las células, ya que hemos encontrado un porcentaje muy bajo de células multipolares en condiciones control. Esa puede ser la razón por la que los efectos observados en el BO adulto no son tan dramáticos como los descritos por otros autores durante el desarrollo embrionario.

Uno de los aspectos más llamativos, tanto de nuestro trabajo como de trabajos previos, es que algunas células con bajos niveles de DCX sean capaces de alcanzar destinos finales superficiales, como la CG en nuestro caso. Es posible que, dentro de la heterogeneidad de estirpes entre los precursores que llegan postnatalmente al BO, existan diferencias en la susceptibilidad a la falta de la proteína. O que, durante esta migración radial existan células con modos de locomoción distintos, al igual que ocurre durante la formación de la corteza (Miyata et al., 2001; Malatesta et al., 2003; Morest y Silver, 2003), durante los cuales la función de DCX puede no ser la misma, o no tener la misma relevancia a la hora de llevar a cabo el movimiento con normalidad.

Diferenciación temprana de los granos de nueva generación del BO

El hecho de que la expresión de DCX no solo se dé en células que están migrando, sino que se mantenga durante varias semanas en la diferenciación temprana (Brown et al., 2003; Couillard-Després et al., 2005), nos lleva a pensar que esta proteína puede ser esencial para la maduración neuronal. Se ha descrito que en disociados de neuronas corticales, la DCX se localiza principalmente en los extremos de las dendritas y en los conos de crecimiento (Francis et al., 1999; Friocourt et al., 2001), al igual que en los precursores interneuronales que pueblan postnatalmente el BO, donde también se localiza en las partes distales de sus procesos. Estos datos son indicativos de la importancia de esta proteína durante los procesos de crecimiento y direccionamiento de las neuritas. Además de sus funciones relacionadas con la estabilización microtubular, se ha descrito su relación con el tráfico vesicular (Friocourt et al., 2001), la regulación de la adhesión celular (Kizhatil et al., 2002; Friocourt et al., 2005) y con las interacciones entre microtúbulos y filamentos de actina (Tsukada et al., 2003; Tsukada et al., 2005). Alteraciones en cada uno de estos procesos pueden influir en la extensión de los procesos neuronales y en la dinámica de ramificación del árbol dendrítico (Dent y Gertler, 2003).

Nuestros resultados muestran que los granos de nueva generación del BO que tienen reducida la expresión de DCX tienen alterado su proceso de maduración, de modo que sufren un retraso significativo con respecto a las condiciones control. Además, forman árboles dendríticos menos ramificados, con ramificaciones más cortas y presentan una menor densidad de espinas. Todos estos datos pueden interpretarse de dos formas distintas. Por un lado, podríamos pensar que el retraso en la maduración de estas células puede ser debido al retardo sufrido en la migración radial. Las células tardarían más tiempo en alcanzar sus destinos finales y esto puede hacer que se retrase su diferenciación. Pero, por otro lado, como hemos apuntado anteriormente, existen evidencias que nos hacen pensar que la DCX puede estar implicada en los procesos de diferenciación temprana, por lo que la reducción de los niveles de la proteína pudiera influir de forma directa sobre la maduración de las células de nueva generación. Además, nuestros resultados coinciden con los de Cohen y colaboradores (2008) quienes detectaron un retraso en la maduración de neuronas hipocámpales tras reducir la expresión de DCX *in vitro* (Cohen et al., 2008). Estos autores observaron que la introducción del DCX-shRNA en estas células hacía que las

neuronas tuvieran un árbol dendrítico menos ramificado y con ramificaciones más cortas. Sin embargo, a diferencia nuestros resultados, estos autores no encontraron diferencias en la densidad de espinas dendríticas (Cohen et al., 2008). Parece que todos estos cambios están asociados a inestabilidad dendrítica más que a una inhibición del proceso de formación de dendritas.

Otro de los aspectos a resaltar de nuestros resultados es la morfología que presentan las espinas dendríticas tras la reducción de los niveles de expresión de DCX. En este caso las espinas tienen una cabeza más pequeña, y en ocasiones presentan un aspecto de filopodio, con mayor longitud mayor y menor diámetro que las halladas en condiciones control. Este hecho también fue observado por Cohen y colaboradores, que encontraron un aumento de la densidad de filopodios en neuronas hipocampales tras disminuir los niveles de DCX (Cohen et al., 2008).

Las alteraciones observadas en la morfología de las espinas pueden estar reflejando una modificación en la maduración del aparato espinal y, por tanto, de las sinapsis. Se ha descrito que la morfología de las sinapsis cambia durante el desarrollo neuronal. Aunque no existen tipos morfológicos concretos relacionados directamente con los distintos grados de madurez, se asume que todas las espinas comienzan a desarrollarse a partir de un filopodio (Nimchinsky et al., 2002). Por ello, pensamos que la apariencia de las espinas al reducir los niveles de expresión de DCX se debe a un retraso en el establecimiento y en la maduración de las sinapsis. Las espinas sinápticas son estructuras ricas en filamentos de actina (Matus et al., 1982; Capani et al., 2001) y, como hemos mencionado anteriormente, la DCX también está relacionada en diferentes aspectos con el citoesqueleto de actina (Tsukada et al., 2003; Tsukada et al., 2005). Es posible que la reducción de los niveles proteicos altere el citoesqueleto de actina y esto desencadene una alteración en la formación de las espinas. Para poder corroborar esta hipótesis sería interesante un examen ultraestructural, ya que, se ha relacionado el grado de inmadurez de una sinapsis con la presencia del denominado aparato pre-espinal, formado por sáculos de retículo endoplasmático liso que se agrupan junto a la densidad postsináptica (Harris et al., 1992).

Además, los posibles cambios en la morfología de las espinas pueden tener consecuencias funcionales en el establecimiento de las conexiones entre las células de nueva generación con los circuitos ya establecidos. La estructura más común de las espinas consiste en una cabeza globosa unida a la dendrita por un pequeño cuello (Nimchinsky et al., 2002), pero existen variaciones morfológicas. Se ha relacionado el

tamaño de la cabeza de la espina con la densidad de ciertos receptores postsinápticos (Nusser et al., 1998). Además, variaciones en la longitud de la base de la espina pueden alterar la dinámica de calcio (Yuste y Bonhoeffer, 2001, 2004; Segal, 2002; Yuste y Majewska, 2001) y con ello los efectos postsinápticos.

En resumen, nuestros resultados demuestran que la proteína DCX no cumple el mismo papel, o al menos no con la misma relevancia, en distintos procesos neurogénicos. Durante el desarrollo del BO adulto, la reducción de DCX induce alteraciones mucho más sutiles que durante la embriogénesis. Esto acentúa las diferencias descritas entre los procesos neurogénicos que tienen lugar durante etapas embrionarias y los que tienen lugar en etapas postnatales. Además, nuestro trabajo aporta nuevos datos acerca del papel de la proteína durante la diferenciación temprana y en el establecimiento de sinapsis de las células de nueva generación del BO. Entendiendo estos y otros mecanismos involucrados en el desarrollo de la neurogénesis adulta se podrá llegar a entender mejor muchos de los desórdenes que afectan al SNC y así idear las herramientas necesarias para combatirlos.

CONCLUSIONES

1. La interferencia mediada por RNA aplicada al SNC mediante vectores lentivirales y bajo la dirección del promotor de la RNA polimerasa H1, que media la transcripción del cassette DCX-shRNA, permite una expresión estable del transcrito y una alta tasa de interferencia por lo que representa un sistema altamente eficaz para llevar a cabo el silenciamiento de la expresión de DCX *in vivo*.

2. La reducción de la expresión de Tuj1 tras el silenciamiento de DCX indica una relación directa entre ambas MAP's que incide en la funcionalidad y estabilidad del sistema microtubular y que podría constituir el sustrato que pudiera estar reflejando un retraso en la salida del ciclo celular y en la determinación de las células madre a neuronas mediada por la ausencia de DCX.

3. La expresión de DCX no es decisiva para el correcto desarrollo de la migración tangencial de los progenitores generados en la ZSV en su desplazamiento hacia el BO a través de la CMR, mientras que si lo es para los procesos de migración radial, por lo que los mecanismos moleculares que gobiernan estos modelos de migración deben ser claramente diferentes.

4. La presencia o ausencia de DCX determina la capacidad de entrada y duración del estadio multipolar de las células que se encuentran en migración radial. Dada la importancia de este estadio intermedio en el posicionamiento final de los neuroblastos, la DCX está implicada en la determinación del destino final de los elementos migrantes.

5. La reducción de los niveles de DCX altera la diferenciación temprana de las células de nueva generación que llegan al BO. La disrupción de la funcionalidad microtubular representaría el origen del retraso en el establecimiento definitivo del patrón normal de ramificación de los árboles dendríticos así como en la maduración de las espinas dendríticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Rebolledo F. y Mateos-Gómez J.H.** (1989) "Transposition and transplant of epiploon to the brain and spinal cord. Experimental investigation. Current knowledge and perspectives for clinical application". *Gac.Med Mex.*, 125 (11-12): 325-329
- Aguilar R.F.** (2000) "Interferons in neurology". *Rev Invest Clin.*, 52 (6): 665-679
- Ahn J.M., Lee C.H., Kim D.Y., Rhee C.S., Min Y.G. y Kim J.W.** (2008) "Maintenance of regional difference in cellular composition of neurospheres derived from adult mouse olfactory bulb". *Eur.Arch.Otorhinolaryngol.*, 265 (4): 429-434
- Altman J. y Chorover S.L.** (1963) "Autoradiographic investigation of the distribution and utilization of intraventricularly injected adenine-3h, uracil-3h and thymidine-3h in the brains of cats". *J Physiol*, 169: 770-779
- Altman J. y Das G.D.** (1965) "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats". *J Comp Neurol*, 124 (3): 319-335
- Altman J.** (1969) "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb." *J Comp Neurol*, 137 (4): 433-457
- Alvarez-Buylla A. y García-Verdugo J.M.** (2002) "Neurogenesis in adult subventricular zone". *J Neurosci*, 22 (3): 629-634
- Ambrogini P., Lattanzi D., Ciuffoli S., Agostini D., Bertini L., Stocchi V., Santi S. y Cuppini R.** (2004) "Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus". *Brain Res*, 1017 (1-2): 21-31
- An D.S., Qin F.X., Auyeung V.C., Mao S.H., Kung S.K., Baltimore D. y Chen I.S.** (2006) "Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors". *Mol Ther*, 14 (4): 494-504
- Anton E.S., Ghashghaei H.T., Weber J.L., McCann C., Fischer T.M., Cheung I.D., Gassmann M., Messing A., Klein R., Schwab M.H., Lloyd K.C. y Lai C.** (2004) "Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain". *Nat Neurosci*, 7 (12): 1319-1328
- Arias-Carrión O. y Drucker-Colin R.** (2007) "Neurogenesis as a therapeutic strategy to regenerate central nervous system". *Rev Neurol*, 45 (12): 739-745
- Artavanis-Tsakonas S., Matsuno K. y Fortini M.E.** (1995) "Notch signaling". *Science*, 268 (5208): 225-232
- Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D. y Lake R.J.** (1999) "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development". *Science*, 284 (5415): 770-776
- Aungst J.L., Heyward P.M., Puche A.C., Karnup S.V., Hayar A., Szabo G. y Shipley M.T.** (2003) "Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli". *Nature*, 426 (6967): 623-629
- Austin C.P. y Cepko C.L.** (1990) "Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex". *Development*, 110 (3): 713-732
- Aza-Blanc P., Cooper C.L., Wagner K., Batalov S., Deveraux Q.L. y Cooke M.P.** (2003) "Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening". *Mol Cell*, 12 (3): 627-637
- Bai J., Ramos R.L., Ackman J.B., Thomas A.M., Lee R.V. y LoTurco J.J.** (2003) "RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex". *Nat Neurosci*, 6 (12): 1277-1283
- Bai J., Ramos R.L., Paramasivam M., Siddiqi F., Ackman J.B. y LoTurco J.J.** (2008) "The role of DCX and LIS1 in migration through the lateral cortical stream of developing forebrain". *Dev Neurosci*, 30 (1-3): 144-156
- Baltanás FC.** (2009) "Estudio de la pre-neurogeneración y neurodegeneración de las células de Purkinje en un modelo de ataxia

cerebelosa: el ratón mutante PCD. *Tesis Doctoral Universidad de Salamanca*

Banasr M., Hery M., Printemps R. y Daszuta A. (2004) "Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone". *Neuropsychopharmacology*, 29 (3): 450-460

Bartel D.P. (2004) "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function". *Cell*, 116 (2): 281-297

Bayer S.A. (1983) "3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb". *Exp Brain Res*, 50 (2-3): 329-340

Belluzzi O., Benedusi M., Ackman J. y LoTurco J.J. (2003) "Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb". *J Neurosci*, 23 (32): 10411-10418

Belvindrah R., Rougon G. y Chazal G. (2002) "Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice". *J Neurosci*, 22 (9): 3594-3607

Benraiss A., Chmielnicki E., Lerner K., Roh D. y Goldman S.A. (2001) "Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain". *J Neurosci*, 21 (17): 6718-6731

Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. y Hannon G.J. (2001) "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference". *Nature*, 409 (6818): 363-366

Bischofberger J. y Jonas P. (1997) "Action potential propagation into the presynaptic dendrites of rat mitral cells". *J Physiol*, 504 (Pt 2): 359-365

Bonfanti L. y Theodosis D.T. (1994) "Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb". *Neuroscience*, 62 (1): 291-305

Book K.J. y Morest D.K. (1990) "Migration of neuroblasts by perikaryal translocation: role of cellular elongation and axonal outgrowth in the acoustic nuclei of the chick embryo medulla". *J Comp Neurol*, 297 (1): 55-76

Boudreau R.L., Monteys A.M. y Davidson B.L. (2008) "Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs". *RNA*, 14 (9): 1834-1844

Bovetti S., Hsieh Y.C., Bovolín P., Perroteau I., Kazunori T. y Puche A.C. (2007) "Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb". *J Neurosci*, 27 (22): 5976-5980

Brown J.P., Couillard-Despres S., Cooper-Kuhn C.M., Winkler J., Aigner L. y Kuhn H.G. (2003) "Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis". *J Comp Neurol*, 467 (1): 1-10

Brunjes P.C. (1994) "Unilateral naris closure and olfactory system development". *Brain Res Brain Res Rev*, 19 (1): 146-160

Buchsacher G.L., Jr. y Wong-Staal F. (2000) "Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases". *Blood*, 95 (8): 2499-2504

Burgess H.A. y Reiner O. (2000) "Doublecortin-like kinase is associated with microtubules in neuronal growth cones". *Mol Cell Neurosci*, 16 (5): 529-541

Capani F., Martone M.E., Deerinck T.J. y Ellisman M.H. (2001) "Selective localization of high concentrations of F-actin in subpopulations of dendritic spines in rat central nervous system: a three-dimensional electron microscopic study". *J Comp Neurol*, 435 (2): 156-170

Capela A. y Temple S. (2002) "LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal". *Neuron*, 35 (5): 865-875

Cárdenas A., Moro M.A., Hurtado O., Leza J.C. y Lizasoain I. (2005) "Dual role of nitric oxide in adult neurogenesis". *Brain Res Brain Res Rev*, 50 (1): 1-6

- Carleton A., Rochefort C., Morante-Oria J., Desmaisons D., Vincent J.D., Gheusi G. y Lledo P.M.** (2002) "Making scents of olfactory neurogenesis". *J Physiol Paris*, 96 (1-2): 115-122
- Carleton A., Petreanu L.T., Lansford R., Álvarez-Buylla A. y Lledo P.M.** (2003) "Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb". *Nat Neurosci*, 6 (5): 507-518
- Carthew R.W.** (2006) "Gene regulation by microRNAs". *Curr Opin Genet Dev*, 16 (2): 203-208
- Cattoglio C., Facchini G., Sartori D., Antonelli A., Miccio A., Cassani B., Schmidt M., von Kalle C., Howe S., Thrasher A.J., Aiuti A., Ferrari G., Recchia A. y Mavilio F.** (2007) "Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells". *Blood*, 110 (6): 1770-1778
- Cecchi G.A., Petreanu L.T., Alvarez-Buylla A. y Magnasco M.O.** (2001) "Unsupervised learning and adaptation in a model of adult neurogenesis". *J Comput. Neurosci*, 11 (2): 175-182
- Chambers R.A., Potenza M.N., Hoffman R.E. y Miranker W.** (2004) "Simulated apoptosis/ neurogenesis regulates learning and memory capabilities of adaptive neural networks". *Neuropsychopharmacology*, 29 (4): 747-758
- Chazal G., Durbec P., Jankovski A., Rougon G. y Cremer H.** (2000) "Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse". *J Neurosci*, 20 (4): 1446-1457
- Chenn A. y Walsh C.A.** (2002) "Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors". *Science*, 297 (5580): 365-369
- Chiaromello S., Dalmasso G., Bezin L., Marcel D., Jourdan F., Peretto P., Fasolo A. y De Marchis S.** (2007) "BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways". *Eur.J Neurosci*, 26 (7): 1780-1790
- Chiasson B.J., Tropepe V., Morshead C.M. y van der K.D.** (1999) "Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics". *J Neurosci*, 19 (11): 4462-4471
- Cockrell A.S. y Kafri T.** (2007) "Gene delivery by lentivirus vectors". *Mol Biotechnol.*, 36 (3): 184-204
- Cohen D., Segal M. y Reiner O.** (2008) "Doublecortin supports the development of dendritic arbors in primary hippocampal neurons". *Dev Neurosci*, 30 (1-3): 187-199
- Conover J.C., Doetsch F., García-Verdugo J.M., Gale N.W., Yancopoulos G.D. y Álvarez-Buylla A.** (2000) "Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone". *Nat Neurosci*, 3 (11): 1091-1097
- Conover J.C. y Allen R.L.** (2002) "The subventricular zone: new molecular and cellular developments". *Cell Mol Life Sci*, 59 (12): 2128-2135
- Corbin J.G., Nery S. y Fishell G.** (2001) "Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain". *Nat Neurosci*, 4 Suppl: 1177-1182
- Corbo J.C., Deuel T.A., Long J.M., LaPorte P., Tsai E., Wynshaw-Boris A. y Walsh C.A.** (2002) "Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex.". *J Neurosci*, 22 (17): 7548-7557
- Corotto F.S., Henegar J.A. y Maruniak J.A.** (1993) "Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain". *Neurosci Lett*, 149 (2): 111-114
- Coskun V. y Luskin M.B.** (2002) "Intrinsic and extrinsic regulation of the proliferation and differentiation of cells in the rodent rostral migratory stream". *J Neurosci Res*, 69 (6): 795-802
- Couillard-Despres S., Winkler J., Uyanik G. y Aigner L.** (2001) "Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quovadis?". *Curr Mol Med*, 1 (6): 677-688

- Couillard-Despres S., Winner B., Schauback S., Aigner R., Vroemen M., Weidner N., Bogdahn U., Winkler J., Kuhn H.G. y Aigner L.** (2005) "Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis.". *Eur J Neurosci*, 21 (1): 1-14
- Craig T.A., Veenstra T.D., Naylor S., Tomlinson A.J., Johnson K.L., Macura S., Juranic N. y Kumar R.** (1997) "Zinc binding properties of the DNA binding domain of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor". *Biochemistry*, 36 (34): 10482-10491
- Cremer H., Lange R., Christoph A., Plomann M., Vopper G., Roes J., Brown R., Baldwin S., Kraemer P., Scheff S. y .** (1994) "Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning". *Nature*, 367 (6462): 455-459
- D'Arcangelo G., Miao G.G., Chen S.C., Soares H.D., Morgan J.I. y Curran T.** (1995) "A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler.". *Nature*, 374 (6524): 719-723
- De Carlos J.A., López-Mascaraque L. y Valverde F.** (1996) "Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat". *J Neurosci*, 16 (19): 6146-6156
- DeDiego I., Smith-Fernández A. y Fairén A.** (1994) "Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats". *Eur.J Neurosci*, 6 (6): 983-997
- Dent E.W. y Gertler F.B.** (2003) "Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance". *Neuron*, 40 (2): 209-227
- des P., V, Francis F., Pinard J.M., Desguerre I., Moutard M.L., Snoeck I., Meiners L.C., Capron F., Cusmai R., Ricci S., Motte J., Echenne B., Ponsot G., Dulac O., Chelly J. y Beldjord C.** (1998) "Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH)". *Hum Mol Genet*, 7 (7): 1063-1070
- Deuel T.A., Liu J.S., Corbo J.C., Yoo S.Y., Rorke-Adams L.B. y Walsh C.A.** (2006) "Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth". *Neuron*, 49 (1): 41-53
- Dittgen T., Nimmerjahn A., Komai S., Licznarski P., Waters J., Margrie T.W., Helmchen F., Denk W., Brecht M. y Osten P.** (2004) "Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (52): 18206-18211
- Dobyns W.B., Reiner O., Carrozzo R. y Ledbetter D.H.** (1993) "Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13". *JAMA*, 270 (23): 2838-2842
- Doench J.G., Petersen C.P. y Sharp P.A.** (2003) "siRNAs can function as miRNAs". *Genes Dev*, 17 (4): 438-442
- Doetsch F., García-Verdugo J.M. y Álvarez-Buylla A.** (1997) "Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain". *J Neurosci*, 17 (13): 5046-5061
- Doetsch F., García-Verdugo J.M. y Álvarez-Buylla A.** (1999) "Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (20): 11619-11624
- Doetsch F., Caille I., Lim D.A., García-Verdugo J.M. y Álvarez-Buylla A.** (1999) "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain". *Cell*, 97 (6): 703-716
- Doetsch F., Petreanu L., Caille I., García-Verdugo J.M. y Álvarez-Buylla A.** (2002) "EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells". *Neuron*, 36 (6): 1021-1034
- Doetsch F.** (2003) "A niche for adult neural stem cells". *Curr Opin Genet Dev*, 13 (5): 543-550

- Doetsch F. y Hen R.** (2005) "Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain". *Curr Opin Neurobiol*, 15 (1): 121-128
- Dorsett Y. y Tuschl T.** (2004) "siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics". *Nat Rev Drug Discov.*, 3 (4): 318-329
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. y Tuschl T.** (2001) "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells". *Nature*, 411 (6836): 494-498
- Elbashir S.M., Lendeckel W. y Tuschl T.** (2001) "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs". *Genes Dev*, 15 (2): 188-200
- Emsley H.C., Smith C.J., Gavin C.M., Georgiou R.F., Vail A., Barberan E.M., Hallenbeck J.M., del Zoppo G.J., Rothwell N.J., Tyrrell P.J. y Hopkins S.J.** (2003) "An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis". *J Neuroimmunol.*, 139 (1-2): 93-101
- Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A. y Gage F.H.** (1998) "Neurogenesis in the adult human hippocampus". *Nat Med*, 4 (11): 1313-1317
- Faulkner N.E., Dujardin D.L., Tai C.Y., Vaughan K.T., O'Connell C.B., Wang Y. y Vallee R.B.** (2000) "A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function". *Nat Cell Biol*, 2 (11): 784-791
- Ferlini C., Raspaglio G., Cicchillitti L., Mozzetti S., Prislei S., Bartollino S. y Scambia G.** (2007) "Looking at drug resistance mechanisms for microtubule interacting drugs: does TUBB3 work?". *Curr Cancer Drug Targets.*, 7 (8): 704-712
- Ferrandina G., Zannoni G.F., Martinelli E., Paglia A., Gallotta V., Mozzetti S., Scambia G. y Ferlini C.** (2006) "Class III beta-tubulin overexpression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients". *Clin.Cancer Res*, 12 (9): 2774-2779
- Finger E.T. S.L.W.** R.Glenn Northcutt. (1987) "Neurobiology of taste and smell". Toronto, John Wiley & sons. Wiley series in neurobiology.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. y Mello C.C.** (1998) "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*". *Nature*, 391 (6669): 806-811
- Francis F., Koulakoff A., Boucher D., Chafey P., Schaar B., Vinet M.C., Friocourt G., McDonnell N., Reiner O., Kahn A., McConnell S.K., Berwald-Netter Y., Denoulet P. y Chelly J.** (1999) "Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons.". *Neuron*, 23 (2): 247-256
- Frazier L.L. y Brunjes P.C.** (1988) "Unilateral odor deprivation: early postnatal changes in olfactory bulb cell density and number". *J Comp Neurol*, 269 (3): 355-370
- Friocourt G., Chafey P., Billuart P., Koulakoff A., Vinet M.C., Schaar B.T., McConnell S.K., Francis F. y Chelly J.** (2001) "Doublecortin interacts with mu subunits of clathrin adaptor complexes in the developing nervous system". *Mol Cell Neurosci*, 18 (3): 307-319
- Friocourt G., Koulakoff A., Chafey P., Boucher D., Fauchereau F., Chelly J. y Francis F.** (2003) "Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes". *Cereb Cortex*, 13 (6): 620-626
- Friocourt G., Kappeler C., Saillour Y., Fauchereau F., Rodriguez M.S., Bahi N., Vinet M.C., Chafey P., Poirier K., Taya S., Wood S.A., Dargemont C., Francis F. y Chelly J.** (2005) "Doublecortin interacts with the ubiquitin protease DFFRX, which associates with microtubules in neuronal processes". *Mol Cell Neurosci*, 28 (1): 153-164
- Friocourt G., Liu J.S., Antypa M., Rakic S., Walsh C.A. y Parnavelas J.G.** (2007) "Both doublecortin and doublecortin-like kinase

play a role in cortical interneuron migration". *J Neurosci*, 27 (14): 3875-3883

Gadisieux J.F., Evrard P., Misson J.P. y Caviness V.S. (1989) "Dynamic structure of the radial glial fiber system of the developing murine cerebral wall. An immunocytochemical analysis". *Brain Res Dev Brain Res*, 50 (1): 55-67

Gaiano N., Nye J.S. y Fishell G. (2000) "Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain". *Neuron*, 26 (2): 395-404

Galvao R.P., Garcia-Verdugo J.M. y Alvarez-Buylla A. (2008) "Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats". *J Neurosci*, 28 (50): 13368-13383

García-Verdugo J.M., Doetsch F., Wichterle H., Lim D.A. y Álvarez-Buylla A. (1998) "Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells.". *J Neurobiol*, 36 (2): 234-248

Ge S., Pradhan D.A., Ming G.L. y Song H. (2007) "GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis". *Trends Neurosci*, 30 (1): 1-8

Geraerts M., Eggermont K., Hernandez-Acosta P., Garcia-Verdugo J.M., Baekelandt V. y Debyser Z. (2006) "Lentiviral vectors mediate efficient and stable gene transfer in adult neural stem cells in vivo". *Hum Gene Ther*, 17 (6): 635-650

Giachino C., Galbiati M., Fasolo A., Peretto P. y Melcangi R.C. (2004) "Effects of progesterone derivatives, dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone, on the subependymal layer of the adult rat". *J Neurobiol*, 58 (4): 493-502

Gleeson J.G., Allen K.M., Fox J.W., Lamperti E.D., Berkovic S., Scheffer I., Cooper E.C., Dobyns W.B., Minnerath S.R., Ross M.E. y Walsh C.A. (1998) "Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein.". *Cell*, 92 (1): 63-72

Gleeson J.G., Minnerath S.R., Fox J.W., Allen K.M., Luo R.F., Hong S.E., Berg M.J., Kuzniecky R., Reitnauer P.J., Borgatti R., Mira A.P., Guerrini R., Holmes G.L., Rooney C.M., Berkovic S., Scheffer I., Cooper E.C., Ricci S., Cusmai R., Crawford T.O., Leroy R., Andermann E., Wheless J.W., Dobyns W.B., Walsh C.A. y . (1999) "Characterization of mutations in the gene doublecortin in patients with double cortex syndrome". *Ann Neurol*, 45 (2): 146-153

Gleeson J.G. y Walsh C.A. (2000) "Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms". *Trends Neurosci*, 23 (8): 352-359

Gordon-Weeks P.R. (2004) "Actin dynamics: re-drawing the map". *Nat Cell Biol*, 6 (5): 390-391

Gotz M. (2003) "Glial cells generate neurons-master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells". *Neuroscientist*, 9 (5): 379-397

Gould E., Vail N., Wagers M. y Gross C.G. (2001) "Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (19): 10910-10917

Gönczy P., Bellanger J.M., Kirkham M., Pozniakowski A., Baumer K., Phillips J.B. y Hyman A.A. (2001) "zyg-8, a gene required for spindle positioning in *C. elegans*, encodes a doublecortin-related kinase that promotes microtubule assembly.". *Dev Cell*, 1 (3): 363-375

Greber U.F. y Fassati A. (2003) "Nuclear import of viral DNA genomes". *Traffic*, 4 (3): 136-143

Gressens P. (2006) "Pathogenesis of migration disorders". *Curr Opin Neurol*, 19 (2): 135-140

Grimm D. y Kay M.A. (2007) "RNAi and gene therapy: a mutual attraction". *Hematology Am Soc.Hematol.Educ.Program.*, 473-481

Gueneau G., Privat A., Drouet J. y Court L. (1982) "Subgranular zone of the dentate gyrus of young rabbits as a secondary

matrix. A high-resolution autoradiographic study". *Dev Neurosci*, 5 (4): 345-358

Hack I., Bancila M., Loulier K., Carroll P. y Cremer H. (2002) "Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis.". *Nat Neurosci*, 5 (10): 939-945

Hagg T. (2005) "Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view". *Trends Neurosci*, 28 (11): 589-595

Halász N. (1990) "The vertebrate olfactory system. Chemical neuroanatomy, function, and development.". Budapest, Akadémiai Kiadó.

Harris K.M., Jensen F.E. y Tsao B. (1992) "Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation". *J Neurosci*, 12 (7): 2685-2705

Hastings N. y Gould E. (1999) "Erratum: rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J comp neurol* 413:146-154". *J Comp Neurol*, 415 (1): 144

Hatten M.E. (1999) "Central nervous system neuronal migration.". *Annu Rev Neurosci*, 22: 511-539

Hatten M.E. (2005) "LIS-less neurons don't even make it to the starting gate". *J Cell Biol*, 170 (6): 867-871

Havercroft J.C. y Cleveland D.W. (1984) "Programmed expression of beta-tubulin genes during development and differentiation of the chicken". *J Cell Biol*, 99 (6): 1927-1935

He L. y Hannon G.J. (2004) "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation". *Nat Rev Genet*, 5 (7): 522-531

Hebb C.O. y Hozett H. (1949) "The effect of certain analgesic drugs on synaptic transmission as observed in the perfused superior cervical ganglion of the cat.". *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 35 (3): 213-217

Heins N., Malatesta P., Cecconi F., Nakafuku M., Tucker K.L., Hack M.A., Chapouton P., Barde Y.A. y Gotz M. (2002) "Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6". *Nat Neurosci*, 5 (4): 308-315

Hidalgo A., Barami K., Iversen K. y Goldman S.A. (1995) "Estrogens and non-estrogenic ovarian influences combine to promote the recruitment and decrease the turnover of new neurons in the adult female canary brain". *J Neurobiol*, 27 (4): 470-487

Hinds J.W. (1968) "Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. II. Cell proliferation and migration.". *J Comp Neurol*, 134 (3): 305-322

Hinds J.W. (1968) "Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia.". *J Comp Neurol*, 134 (3): 287-304

Hirotsune S., Takahara T., Sasaki N., Hirose K., Yoshiki A., Ohashi T., Kusakabe M., Murakami Y., Muramatsu M., Watanabe S. y . (1995) "The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons". *Nat Genet*, 10 (1): 77-83

Hirotsune S., Fleck M.W., Gambello M.J., Bix G.J., Chen A., Clark G.D., Ledbetter D.H., McBain C.J. y Wynshaw-Boris A. (1998) "Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality". *Nat Genet*, 19 (4): 333-339

Hong J., Qian Z., Shen S., Min T., Tan C., Xu J., Zhao Y. y Huang W. (2005) "High doses of siRNAs induce eri-1 and adar-1 gene expression and reduce the efficiency of RNA interference in the mouse". *Biochem J*, 390 (Pt 3): 675-679

Horesh D., Sapir T., Francis F., Wolf S.G., Caspi M., Elbaum M., Chelly J. y Reiner O. (1999) "Doublecortin, a stabilizer of microtubules". *Hum Mol Genet*, 8 (9): 1599-1610

Hu H. y Rutishauser U. (1996) "A septum-derived chemorepulsive factor for migrating

olfactory interneuron precursors". *Neuron*, 16 (5): 933-940

Hu H., Tomasiewicz H., Magnuson T. y Rutishauser U. (1996) "The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone". *Neuron*, 16 (4): 735-743

Isaacson J.S. y Strowbridge B.W. (1998) "Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS". *Neuron*, 20 (4): 749-761

Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G. y Linsley P.S. (2003) "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi". *Nat Biotechnol.*, 21 (6): 635-637

Jacobowitz D.M. y Winsky L. (1991) "Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat". *J Comp Neurol*, 304 (2): 198-218

Jahr C.E. y Nicoll R.A. (1982) "Noradrenergic modulation of dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb". *Nature*, 297 (5863): 227-229

Janas J., Skowronski J. y Van Aelst L. (2006) "Lentiviral delivery of RNAi in hippocampal neurons". *Methods Enzymol.*, 406: 593-605

Jankovski A. y Sotelo C. (1996) "Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation". *J Comp Neurol*, 371 (3): 376-396

Jankovski A., García C., Soriano E. y Sotelo C. (1998) "Proliferation, migration and differentiation of neuronal progenitor cells in the adult mouse subventricular zone surgically separated from its olfactory bulb". *Eur.J Neurosci*, 10 (12): 3853-3868

Jensen J.B. y Parmar M. (2006) "Strengths and limitations of the neurosphere culture system". *Mol Neurobiol*, 34 (3): 153-161

Jiang Y.Q. y Oblinger M.M. (1992) "Differential regulation of beta III and other tubulin genes during peripheral and central

neuron development". *J Cell Sci*, 103 (Pt 3): 643-651

Jin K., Mao X.O., Sun Y., Xie L., Jin L., Nishi E., Klagsbrun M. y Greenberg D.A. (2002) "Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: hypoxia-inducible expression in vitro and stimulation of neurogenesis in vitro and in vivo". *J Neurosci*, 22 (13): 5365-5373

Johnson F. y Bottjer S.W. (1995) "Differential estrogen accumulation among populations of projection neurons in the higher vocal center of male canaries". *J Neurobiol*, 26 (1): 87-108

Jokeit H., Ebner A., Holthausen H., Markowitsch H.J. y Tuxhorn I. (1996) "Reorganization of memory functions after human temporal lobe damage". *Neuroreport*, 7 (10): 1627-1630

Kaplan M.S., McNelly N.A. y Hinds J.W. (1985) "Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb". *J Comp Neurol*, 239 (1): 117-125

Kato M. y Dobyns W.B. (2003) "Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration". *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 1: R89-R96

Kavallaris M., Kuo D.Y., Burkhart C.A., Regl D.L., Norris M.D., Haber M. y Horwitz S.B. (1997) "Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isoforms". *J Clin. Invest*, 100 (5): 1282-1293

Kawasaki H. y Taira K. (2003) "Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells". *Nucleic Acids Res*, 31 (2): 700-707

Kempermann G. (2002) "Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis". *J Neurosci*, 22 (3): 635-638

Kempermann G., Gast D., Kronenberg G., Yamaguchi M. y Gage F.H. (2003) "Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the

- hippocampus of mice". *Development*, 130 (2): 391-399
- Kempermann G., Wiskott L. y Gage F.H.** (2004) "Functional significance of adult neurogenesis". *Curr Opin Neurobiol*, 14 (2): 186-191
- Khodiyar V.K., Maltais L.J., Ruef B.J., Sneddon K.M., Smith J.R., Shimoyama M., Cabral F., Dumontet C., Dutcher S.K., Harvey R.J., Lafanechere L., Murray J.M., Nogales E., Piquemal D., Stanchi F., Povey S. y Lovering R.C.** (2007) "A revised nomenclature for the human and rodent alpha-tubulin gene family". *Genomics*, 90 (2): 285-289
- Khvorova A., Reynolds A. y Jayasena S.D.** (2003) "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias". *Cell*, 115 (2): 209-216
- Kim D.H., Behlke M.A., Rose S.D., Chang M.S., Choi S. y Rossi J.J.** (2005) "Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy". *Nat Biotechnol.*, 23 (2): 222-226
- Kim V.N.** (2005) "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing". *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (5): 376-385
- Kirschenbaum B. y Goldman S.A.** (1995) "Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (1): 210-214
- Kirschenbaum B., Doetsch F., Lois C. y Álvarez-Buylla A.** (1999) "Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb". *J Neurosci*, 19 (6): 2171-2180
- Kitamura K., Yanazawa M., Sugiyama N., Miura H., Iizuka-Kogo A., Kusaka M., Omichi K., Suzuki R., Kato-Fukui Y., Kamiirisa K., Matsuo M., Kamijo S., Kasahara M., Yoshioka H., Ogata T., Fukuda T., Kondo I., Kato M., Dobyns W.B., Yokoyama M. y Morohashi K.** (2002) "Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans". *Nat Genet*, 32 (3): 359-369
- Kizhatil K., Wu Y.X., Sen A. y Bennett V.** (2002) "A new activity of doublecortin in recognition of the phospho-FIGQY tyrosine in the cytoplasmic domain of neurofascin". *J Neurosci*, 22 (18): 7948-7958
- Kizhatil K., Wu Y.X., Sen A. y Bennett V.** (2002) "A new activity of doublecortin in recognition of the phospho-FIGQY tyrosine in the cytoplasmic domain of neurofascin". *J Neurosci*, 22 (18): 7948-7958
- Koizumi H., Higginbotham H., Poon T., Tanaka T., Brinkman B.C. y Gleeson J.G.** (2006) "Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain". *Nat Neurosci*, 9 (6): 779-786
- Kornack D.R. y Rakic P.** (2001) "The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (8): 4752-4757
- Kosaka K., Aika Y., Toida K., Heizmann C.W., Hunziker W., Jacobowitz D.M., Nagatsu I., Streit P., Visser T.J. y Kosaka T.** (1995) "Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb". *Neurosci.Res.*, 23 (1): 73-88
- Kosaka K., Toida K., Margolis F.L. y Kosaka T.** (1997) "Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. II Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals". *Neuroscience*, 76 (3): 775-786
- Kosaka K., Toida K., Aika Y. y Kosaka T.** (1998) "How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells 1". *Neurosci.Res.*, 30 (2): 101-110
- Kosaka K. y Kosaka T.** (2005) "synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the

periglomerular cells". *Anat.Sci Int*, 80 (2): 80-90

Kosaka T. y Kosaka K. (2005) "Structural organization of the glomerulus in the main olfactory bulb". *Chem Senses*, 30 Suppl 1: i107-i108

Kosodo Y., Roper K., Haubensak W., Marzesco A.M., Corbeil D. y Huttner W.B. (2004) "Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells". *EMBO J*, 23 (11): 2314-2324

Kratskin I. y Belluzzi O. Doty, R. L. (2003) "Anatomy and neurochemistry of the olfactory bulb". 2^a (7): 139-164 Philadelphia, Marcel Dekker, Inc.

Kriegstein A.R. y Noctor S.C. (2004) "Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex". *Trends Neurosci*, 27 (7): 392-399

Kuhn H.G., Dickinson-Anson H. y Gage F.H. (1996) "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation". *J Neurosci*, 16 (6): 2027-2033

Lai K., Kaspar B.K., Gage F.H. y Schaffer D.V. (2003) "Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo". *Nat Neurosci*, 6 (1): 21-27

Lambert d.R. y Goffinet A.M. (2001) "Neuronal migration". *Mech Dev*, 105 (1-2): 47-56

Larsson E., Mandel R.J., Klein R.L., Muzyczka N., Lindvall O. y Kokaia Z. (2002) "Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor". *Exp Neurol*, 177 (1): 1-8

Lavdas A.A., Grigoriou M., Pachnis V. y Parnavelas J.G. (1999) "The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex". *J Neurosci*, 19 (18): 7881-7888

Laywell E.D., Rakic P., Kukekov V.G., Holland E.C. y Steindler D.A. (2000)

"Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (25): 13883-13888

Lee J., Duan W., Long J.M., Ingram D.K. y Mattson M.P. (2000) "Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats". *J Mol Neurosci*, 15 (2): 99-108

Lee M.K., Tuttle J.B., Rebhun L.I., Cleveland D.W. y Frankfurter A. (1990) "The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis". *Cell Motil. Cytoskeleton*, 17 (2): 118-132

Lee M.K., Rebhun L.I. y Frankfurter A. (1990) "Posttranslational modification of class III beta-tubulin". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (18): 7195-7199

Lee V.M. y Pixley S.K. (1994) "Age and differentiation-related differences in neuron-specific tubulin immunostaining of olfactory sensory neurons". *Brain Res Dev Brain Res*, 83 (2): 209-215

Lenington J.B., Yang Z. y Conover J.C. (2003) "Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis". *Reprod. Biol Endocrinol.*, 1: 99

Leonard J.N. y Schaffer D.V. (2006) "Antiviral RNAi therapy: emerging approaches for hitting a moving target". *Gene Ther*, 13 (6): 532-540

Letinic K., Zoncu R. y Rakic P. (2002) "Origin of GABAergic neurons in the human neocortex". *Nature*, 417 (6889): 645-649

Lie D.C., Song H., Colamarino S.A., Ming G.L. y Gage F.H. (2004) "Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases". *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.*, 44: 399-421

Lim D.A., Tramontin A.D., Trevejo J.M., Herrera D.G., Garcia-Verdugo J.M. y Alvarez-Buylla A. (2000) "Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche

for adult neurogenesis". *Neuron*, 28 (3): 713-726

Lin P.T., Gleeson J.G., Corbo J.C., Flanagan L. y Walsh C.A. (2000) "DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization". *J Neurosci*, 20 (24): 9152-9161

Lin X., Ruan X., Anderson M.G., McDowell J.A., Kroeger P.E., Fesik S.W. y Shen Y. (2005) "siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation". *Nucleic Acids Res*, 33 (14): 4527-4535

Linnarsson S., Mikaelis A., Baudet C. y Ernfors P. (2001) "Activation by GDNF of a transcriptional program repressing neurite growth in dorsal root ganglia". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (25): 14681-14686

Linster C. y Gervais R. (1996) "Investigation of the role of interneurons and their modulation by centrifugal fibers in a neural model of the olfactory bulb". *J Comput. Neurosci*, 3 (3): 225-246

Linster C. y Hasselmo M. (1997) "Modulation of inhibition in a model of olfactory bulb reduces overlap in the neural representation of olfactory stimuli". *Behav Brain Res*, 84 (1-2): 117-127

Liu G. y Rao Y. (2003) "Neuronal migration from the forebrain to the olfactory bulb requires a new attractant persistent in the olfactory bulb". *J Neurosci*, 23 (16): 6651-6659

Liu W.L. y Shipley M.T. (1994) "Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystokinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells". *J Comp Neurol*, 346 (4): 541-558

Lledo P.M., Gheusi G. y Vincent J.D. (2005) "Information processing in the mammalian olfactory system". *Physiol Rev*, 85 (1): 281-317

Lledo P.M., Alonso M. y Grubb M.S. (2006) "Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits". *Nat Rev Neurosci*, 7 (3): 179-193

Lledo P.M. y Lazarini F. (2007) "Neuronal replacement in microcircuits of the adult olfactory system". *C R.Biol*, 330 (6-7): 510-520

Lledo P.M., Merkle F.T. y Alvarez-Buylla A. (2008) "Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity". *Trends Neurosci*, 31 (8): 392-400

Lo N.C., Chong C.S., Smith A.C., Dobyns W.B., Carrozzo R. y Ledbetter D.H. (1997) "Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome". *Hum Mol Genet*, 6 (2): 157-164

Lois C. y Álvarez-Buylla A. (1993) "Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (5): 2074-2077

Lois C. y Alvarez-Buylla A. (1994) "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain". *Science*, 264 (5162): 1145-1148

Lois C., García-Verdugo J.M. y Álvarez-Buylla A. (1996) "Chain migration of neuronal precursors". *Science*, 271 (5251): 978-981

LoTurco J.J. y Bai J. (2006) "The multipolar stage and disruptions in neuronal migration". *Trends Neurosci*, 29 (7): 407-413

Lundstrom K. y Boulikas T. (2003) "Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials". *Technol.Cancer Res Treat.*, 2 (5): 471-486

Luskin M.B. (1993) "Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone". *Neuron*, 11 (1): 173-189

Ma D.K., Ming G.L. y Song H. (2005) "Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis". *Curr Opin Neurobiol*, 15 (5): 514-520

Magavi S.S., Mitchell B.D., Szentirmai O., Carter B.S. y Macklis J.D. (2005) "Adult-born and preexisting olfactory granule

neurons undergo distinct experience-dependent modifications of their olfactory responses in vivo". *J Neurosci*, 25 (46): 10729-10739

Makinen P.I., Koponen J.K., Karkkainen A.M., Malm T.M., Pulkkinen K.H., Koistinaho J., Turunen M.P. y Yla-Herttuala S. (2006) "Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain". *J Gene Med*, 8 (4): 433-441

Malatesta P., Hartfuss E. y Gotz M. (2000) "Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage". *Development*, 127 (24): 5253-5263

Margrie T.W., Sakmann B. y Urban N.N. (2001) "Action potential propagation in mitral cell lateral dendrites is decremental and controls recurrent and lateral inhibition in the mammalian olfactory bulb". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (1): 319-324

Marín O. y Rubenstein J.L. (2001) "A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon". *Nat Rev Neurosci*, 2 (11): 780-790

Marín O. y Rubenstein J.L. (2003) "Cell migration in the forebrain". *Annu.Rev Neurosci*, 26: 441-483

Marques J.T., Devosse T., Wang D., Zamanian-Daryoush M., Serbinowski P., Hartmann R., Fujita T., Behlke M.A. y Williams B.R. (2006) "A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells". *Nat Biotechnol.*, 24 (5): 559-565

Martínez-Marcos A., Úbeda-Banón I. y Halpern M. (2001) "Cell migration to the anterior and posterior divisions of the granule cell layer of the accessory olfactory bulb of adult opossums". *Brain Res Dev Brain Res*, 127 (1): 95-98

Matarredona E.R., Murillo-Carretero M., Moreno-Lopez B. y Estrada C. (2005) "Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis". *Brain Res Brain Res Rev*, 49 (2): 355-366

Mattson M.P., Maudsley S. y Martin B. (2004) "A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin". *Ageing Res Rev*, 3 (4): 445-464

Matus A., Ackermann M., Pehling G., Byers H.R. y Fujiwara K. (1982) "High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79 (23): 7590-7594

Meister G. y Tuschl T. (2004) "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA". *Nature*, 431 (7006): 343-349

Menezes J.R., Smith C.M., Nelson K.C. y Luskin M.B. (1995) "The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain". *Mol Cell Neurosci*, 6 (6): 496-508

Menezes J.R., Marins M., Alves J.A., Froes M.M. y Hedin-Pereira C. (2002) "Cell migration in the postnatal subventricular zone". *Braz J Med Biol Res*, 35 (12): 1411-1421

Mercier F., Kitasako J.T. y Hatton G.I. (2002) "Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network". *J Comp Neurol*, 451 (2): 170-188

Merkle F.T., Tramontin A.D., García-Verdugo J.M. y Álvarez-Buylla A. (2004) "Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (50): 17528-17532

Merkle F.T., Mirzadeh Z. y Álvarez-Buylla A. (2007) "Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain". *Science*, 317 (5836): 381-384

Ming G.L. y Song H. (2005) "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system". *Annu.Rev Neurosci*, 28: 223-250

Mirzadeh Z., Merkle F.T., Soriano-Navarro M., García-Verdugo J.M. y Álvarez-Buylla A. (2008) "Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain". *Cell Stem Cell*, 3 (3): 265-278

- Miura H., Yanazawa M., Kato K. y Kitamura K.** (1997) "Expression of a novel aristaless related homeobox gene 'Arx' in the vertebrate telencephalon, diencephalon and floor plate". *Mech Dev*, 65 (1-2): 99-109
- Miyata T., Kawaguchi A., Okano H. y Ogawa M.** (2001) "Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons". *Neuron*, 31 (5): 727-741
- Moores C.A., Francis F., Perderiset M. y Houdusse A.** (2003) "A double-take on MAPs". *Nat Struct Biol*, 10 (5): 314-316
- Morest D.K.** (1970) "The pattern of neurogenesis in the retina of the rat". *Z.Anat.Entwicklungsgesch.*, 131 (1): 45-67
- Morest D.K. y Silver J.** (2003) "Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going?". *Glia*, 43 (1): 6-18
- Mori K., Kishi K. y Ojima H.** (1983) "Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb". *J.Comp.Neurol.*, 219 (3): 339-355
- Mori K., Nagao H. y Yoshihara Y.** (1999) "The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information.". *Science*, 286 (5440): 711-715
- Murase S. y Horwitz A.F.** (2002) "Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream". *J Neurosci*, 22 (9): 3568-3579
- Myslinski E., Ame J.C., Krol A. y Carbon P.** (2001) "An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene". *Nucleic Acids Res*, 29 (12): 2502-2509
- Nacher J., Crespo C. y McEwen B.S.** (2001) "Doublecortin expression in the adult rat telencephalon.". *Eur J Neurosci*, 14 (4): 629-644
- Nadarajah B., Brunstrom J.E., Grutzendler J., Wong R.O. y Pearlman A.L.** (2001) "Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex". *Nat Neurosci*, 4 (2): 143-150
- Nadarajah B. y Parnavelas J.G.** (2002) "Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex". *Nat Rev Neurosci*, 3 (6): 423-432
- Nagano T., Morikubo S. y Sato M.** (2004) "Filamin A and FILIP (Filamin A-Interacting Protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration". *J Neurosci*, 24 (43): 9648-9657
- Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M. y Trono D.** (1996) "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector". *Science*, 272 (5259): 263-267
- Napoli C., Lemieux C. y Jorgensen R.** (1990) "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans". *Plant Cell*, 2 (4): 279-289
- Ng K.L., Li J.D., Cheng M.Y., Leslie F.M., Lee A.G. y Zhou Q.Y.** (2005) "Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling". *Science*, 308 (5730): 1923-1927
- Nguyen-Ba-Charvet K.T., Picard-Riera N., Tessier-Lavigne M., Baron-Van Evercooren A., Sotelo C. y Chedotal A.** (2004) "Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream". *J Neurosci*, 24 (6): 1497-1506
- Nieuwenhuys R.** (1999) "The morphological pattern of the vertebrate brain". *Eur.J Morphol.*, 37 (2-3): 81-84
- Nimchinsky E.A., Sabatini B.L. y Svoboda K.** (2002) "Structure and function of dendritic spines". *Annu.Rev Physiol*, 64: 313-353
- Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A., Dammerman R.S. y Kriegstein A.R.** (2001) "Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex". *Nature*, 409 (6821): 714-720

- Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A., Wong W.S., Clinton B.K. y Kriegstein A.R.** (2002) "Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia". *J Neurosci*, 22 (8): 3161-3173
- Noctor S.C., Martínez-Cerdeno V., Ivic L. y Kriegstein A.R.** (2004) "Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases". *Nat Neurosci*, 7 (2): 136-144
- Nordeen E.J. y Nordeen K.W.** (1989) "Estrogen stimulates the incorporation of new neurons into avian song nuclei during adolescence". *Brain Res Dev Brain Res*, 49 (1): 27-32
- Nottebohm F.** (2002) "Why are some neurons replaced in adult brain?". *J Neurosci*, 22 (3): 624-628
- Novina C.D. y Sharp P.A.** (2004) "The RNAi revolution". *Nature*, 430 (6996): 161-164
- Nusser Z., Lujan R., Laube G., Roberts J.D., Molnar E. y Somogyi P.** (1998) "Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus". *Neuron*, 21 (3): 545-559
- O'Rourke N.A., Dailey M.E., Smith S.J. y McConnell S.K.** (1992) "Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex". *Science*, 258 (5080): 299-302
- Ocbina P.J., Dizon M.L., Shin L. y Szele F.G.** (2006) "Doublecortin is necessary for the migration of adult subventricular zone cells from neurospheres". *Mol Cell Neurosci*, 33 (2): 126-135
- Orona E., Scott J.W. y Rainer E.C.** (1983) "Different granule cell populations innervate superficial and deep regions of the external plexiform layer in rat olfactory bulb". *J Comp Neurol*, 217 (2): 227-237
- Ortega-Pérez I., Murray K. y Lledo P.M.** (2007) "The how and why of adult neurogenesis". *J Mol Histol.*, 38 (6): 555-562
- Palmer T.D., Ray J. y Gage F.H.** (1995) "FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain". *Mol Cell Neurosci*, 6 (5): 474-486
- Palmer T.D., Markakis E.A., Willhoite A.R., Safar F. y Gage F.H.** (1999) "Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS". *J Neurosci*, 19 (19): 8487-8497
- Palmer T.D., Willhoite A.R. y Gage F.H.** (2000) "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis". *J Comp Neurol*, 425 (4): 479-494
- Paolini A.G. y McKenzie J.S.** (1997) "Effects of inactivation of the magnocellular preoptic nucleus of olfactory bulb processing". *Neuroreport*, 8 (4): 929-935
- Pappas G.D., Kriho V., Liu W.S., Tremolizzo L., Lugli G. y Larson J.** (2003) "Immunocytochemical localization of reelin in the olfactory bulb of the heterozygous reeler mouse: an animal model for schizophrenia". *Neurol Res*, 25 (8): 819-830
- Paule M.R. y White R.J.** (2000) "Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III". *Nucleic Acids Res*, 28 (6): 1283-1298
- Pencea V., Bingaman K.D., Wiegand S.J. y Luskin M.B.** (2001) "Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus". *J Neurosci*, 21 (17): 6706-6717
- Peretto P., Merighi A., Fasolo A. y Bonfanti L.** (1997) "Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat". *Brain Res Bull*, 42 (1): 9-21
- Peretto P., Merighi A., Fasolo A. y Bonfanti L.** (1999) "The subependymal layer in rodents: a site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain". *Brain Res Bull*, 49 (4): 221-243
- Peretto P., Giachino C., Panzica G.C. y Fasolo A.** (2001) "Sexually dimorphic neurogenesis is topographically matched with the anterior accessory olfactory bulb of the adult rat". *Cell Tissue Res*, 306 (3): 385-389

- Peretto P., Dati C., De Marchis S., Kim H.H., Ukhanova M., Fasolo A. y Margolis F.L.** (2004) "Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain". *Neuroscience*, 128 (4): 685-696
- Persengiev S.P., Zhu X. y Green M.R.** (2004) "Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)". *RNA*, 10 (1): 12-18
- Peterson D.A.** (2002) "Stem cells in brain plasticity and repair". *Curr Opin Pharmacol.*, 2 (1): 34-42
- Petreanu L. y Álvarez-Buylla A.** (2002) "Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction.". *J Neurosci*, 22 (14): 6106-6113
- Pinching A.J.** (1970) "Synaptic connexions in the glomerular layer of the olfactory bulb". *J Physiol*, 210 (1): 14P-15P
- Pinching A.J. y Powell T.P.S.** (1971a) "The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb". *J.Cell Sci.*, 9 (2): 305-345
- Pinching A.J. y Powell T.P.S.** (1971b) "The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb". *J.Cell Sci.*, 9 (2): 347-377
- Pleasure S.J., Collins A.E. y Lowenstein D.H.** (2000) "Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development". *J Neurosci*, 20 (16): 6095-6105
- Price J. y Thurlow L.** (1988) "Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer". *Development*, 104 (3): 473-482
- Price J.L. y Powell T.P.S.** (1970a) "The morphology of the granule cells of the olfactory bulb". *J.Cell Sci.*, 7 (1): 91-123
- Price J.L. y Powell T.P.S.** (1970b) "The mitral and short axon cells in of the olfactory bulb". *J.Cell Sci.*, 7: 631-651
- Price J.L. Finger, T. y Silver, W.** (1987) "The central olfactory and accessory olfactory systems". 179-204 Nueva York, John Wiley and Sons.
- Puopolo M. y Belluzzi O.** (1998) "Inhibitory synapses among interneurons in the glomerular layer of rat and frog olfactory bulbs". *J Neurophysiol.*, 80 (1): 344-349
- Puopolo M. y Belluzzi O.** (1998) "Functional heterogeneity of periglomerular cells in the rat olfactory bulb". *Eur.J Neurosci*, 10 (3): 1073-1083
- Raber J., Rola R., LeFevour A., Morhardt R.D., Curley J., Mizumatsu S., VandenBerg S.R. y Fike J.R.** (2004) "Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis". *Radiat.Res*, 162 (1): 39-47
- Rakic P. y Sidman R.L.** (1969) "Telencephalic origin of pulvinar neurons in the fetal human brain". *Z.Anat.Entwicklungsgesch.*, 129 (1): 53-82
- Rakic P.** (1972) "Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex". *J Comp Neurol*, 145 (1): 61-83
- Rakic P.** (1990) "Principles of neural cell migration.". *Experientia*, 46 (9): 882-891
- Rall W., Shepherd G.M., Reese T.S. y Brightman M.W.** (1966) "Dendrodendritic synaptic pathway for inhibition in the olfactory bulb". *Exp Neurol*, 14 (1): 44-56
- Ramos R.L., Bai J. y LoTurco J.J.** (2006) "Heterotopia formation in rat but not mouse neocortex after RNA interference knockdown of DCX". *Cereb Cortex*, 16 (9): 1323-1331
- Ramón y Cajal S.** (1909) "Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.". París, Maloine.
- Ramón y Cajal S.** (1911) "Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.". París, Maloine.
- Ramón y Cajal S.** (1914) "Estudios sobre la degeneración y regeneración del Sistema Nervioso". Madrid.

- Rao D.D., Vorhies J.S., Senzer N. y Nemunaitis J.** (2009) "siRNA vs. shRNA: similarities and differences". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61 (9): 746-759
- Rao D.D., Senzer N., Cleary M.A. y Nemunaitis J.** (2009) "Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: what is slowing clinical development". *Cancer Gene Ther.*
- Rao M.S. y Shetty A.K.** (2004) "Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus.". *Eur J Neurosci*, 19 (2): 234-246
- Rasika S., Nottebohm F. y Álvarez-Buylla A.** (1994) "Testosterone increases the recruitment and/or survival of new high vocal center neurons in adult female canaries". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (17): 7854-7858
- Reiner O., Carrozzo R., Shen Y., Wehnert M., Faustinella F., Dobyns W.B., Caskey C.T. y Ledbetter D.H.** (1993) "Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats". *Nature*, 364 (6439): 717-721
- Robbins M.A., Li M., Leung I., Li H., Boyer D.V., Song Y., Behlke M.A. y Rossi J.J.** (2006) "Stable expression of shRNAs in human CD34+ progenitor cells can avoid induction of interferon responses to siRNAs in vitro". *Nat Biotechnol.*, 24 (5): 566-571
- Ross M.E. y Walsh C.A.** (2001) "Human brain malformations and their lessons for neuronal migration". *Annu. Rev Neurosci*, 24: 1041-1070
- Rousselot P., Lois C. y Álvarez-Buylla A.** (1995) "Embryonic PSA-NCAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice.". *J Comp Neurol*, 351 (1): 51-61
- Saghatelian A., de Chevigny A., Schachner M. y Lledo P.M.** (2004) "Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain.". *Nat Neurosci*, 7 (4): 347-356
- Saghatelian A., Roux P., Migliore M., Rochefort C., Desmaisons D., Charneau P., Shepherd G.M. y Lledo P.M.** (2005) "Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation". *Neuron*, 46 (1): 103-116
- Santra M., Zhang X., Santra S., Jiang F. y Chopp M.** (2006) "Ectopic doublecortin gene expression suppresses the malignant phenotype in glioblastoma cells". *Cancer Res*, 66 (24): 11726-11735
- Santra M., Santra S., Roberts C., Zhang R.L. y Chopp M.** (2009) "Doublecortin induces mitotic microtubule catastrophe and inhibits glioma cell invasion". *J Neurochem.*, 108 (1): 231-245
- Sapolsky R.M.** (1999) "Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging". *Exp Gerontol.*, 34 (6): 721-732
- Saxena S., Jonsson Z.O. y Dutta A.** (2003) "Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells". *J Biol Chem*, 278 (45): 44312-44319
- Scacheri P.C., Rozenblatt-Rosen O., Caplen N.J., Wolfsberg T.G., Umayam L., Lee J.C., Hughes C.M., Shanmugam K.S., Bhattacharjee A., Meyerson M. y Collins F.S.** (2004) "Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (7): 1892-1897
- Schild D. y Restrepo D.** (1998) "Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells.". *Physiol Rev*, 78 (2): 429-466
- Schmechel D.E. y Rakic P.** (1979) "A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes". *Anat. Embryol. (Berl)*, 156 (2): 115-152
- Schneider S.P. y Macrides F.** (1978) "Laminar distributions of interneurons in the

- main olfactory bulb of the adult hamster". *Brain Res.Bull.*, 3: 73-82
- Schoenfeld T.A., Marchand J.E. y Macrides F.** (1985) "Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intrabulbar associational system". *J Comp Neurol*, 235 (4): 503-518
- Schoenfeld T.A., Marchand J.E. y Macrides F.** (1985) "Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intrabulbar associational system.". *J Comp Neurol*, 235 (4): 503-518
- Schwanzel-Fukuda M. y Pfaff D.W.** (1989) "Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons". *Nature*, 338 (6211): 161-164
- Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N. y Zamore P.D.** (2003) "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex". *Cell*, 115 (2): 199-208
- Segal A.S., Hayslett J.P. y Desir G.V.** (2002) "On the natriuretic effect of verapamil: inhibition of ENaC and transepithelial sodium transport". *Am J Physiol Renal Physiol*, 283 (4): F765-F770
- Shalli K., Brown I., Heys S.D. y Schofield A.C.** (2005) "Alterations of beta-tubulin isotypes in breast cancer cells resistant to docetaxel". *FASEB J*, 19 (10): 1299-1301
- Sheen V.L., Feng Y., Graham D., Takafuta T., Shapiro S.S. y Walsh C.A.** (2002) "Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact". *Hum Mol Genet*, 11 (23): 2845-2854
- Shen Q., Goderie S.K., Jin L., Karanth N., Sun Y., Abramova N., Vincent P., Pumiglia K. y Temple S.** (2004) "Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells". *Science*, 304 (5675): 1338-1340
- Shepherd G.M.** (1972) "Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb". *Physiol.Rev.*, 52 (4): 864-917
- Shihabuddin L.S., Ray J. y Gage F.H.** (1997) "FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord". *Exp Neurol*, 148 (2): 577-586
- Shihabuddin L.S., Ray J. y Gage F.H.** (1999) "Stem cell technology for basic science and clinical applications". *Arch.Neurol*, 56 (1): 29-32
- Shipley M.T., McLean J.H. y Ennis M.** Paxinos G. (1995) "Olfactory sytem". 899-926 Nueva York, Academic Press.
- Shipley M.T., Fu L., Ennis M., Liu W.L. y Aston-Jones G.** (1996) "Dendrites of locus coeruleus neurons extend preferentially into two pericoerulear zones". *J Comp Neurol*, 365 (1): 56-68
- Shipley M.T. y Ennis M.** (1996) "Functional organization of olfactory system.". *J Neurobiol*, 30 (1): 123-176
- Shoukimas G.M. y Hinds J.W.** (1978) "The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: an electron microscopic serial section analysis". *J Comp Neurol*, 179 (4): 795-830
- Sledz C.A. y Williams B.R.** (2004) "RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways". *Biochem Soc.Trans.*, 32 (Pt 6): 952-956
- Smith C.M. y Luskin M.B.** (1998) "Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream". *Dev Dyn*, 213 (2): 220-227
- Stensaas L.J.** (1967) "The development of hippocampal and dorsolateral pallial region of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. V. Sixty millimeter stage, glial cell morphology". *J Comp Neurol*, 131 (4): 423-436
- Stump G., Durrer A., Klein A.L., Lutolf S., Suter U. y Taylor V.** (2002) "Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain". *Mech Dev*, 114 (1-2): 153-159
- Switzer D.F. y Nanda N.C.** (1985) "Doppler color flow mapping". *Ultrasound Med Biol*, 11 (3): 403-416

- Tabata H. y Nakajima K.** (2003) "Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex". *J Neurosci*, 23 (31): 9996-10001
- Tamamaki N., Nakamura K. y Kaneko T.** (2001) "Cell migration from the corticostriatal angle to the basal telencephalon in rat embryos". *Neuroreport*, 12 (4): 775-780
- Tanaka T., Serneo F.F., Higgins C., Gambello M.J., Wynshaw-Boris A. y Gleeson J.G.** (2004) "Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration". *J Cell Biol*, 165 (5): 709-721
- Tanapat P., Hastings N.B., Reeves A.J. y Gould E.** (1999) "Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat". *J Neurosci*, 19 (14): 5792-5801
- Thomas C.E., Ehrhardt A. y Kay M.A.** (2003) "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy". *Nat Rev Genet*, 4 (5): 346-358
- Thomas L.B., Gates M.A. y Steindler D.A.** (1996) "Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway". *Glia*, 17 (1): 1-14
- Tomari Y. y Zamore P.D.** (2005) "Perspective: machines for RNAi". *Genes Dev*, 19 (5): 517-529
- Torroglosa A., Murillo-Carretero M., Romero-Grimaldi C., Matarredona E.R., Campos-Caro A. y Estrada C.** (2007) "Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway". *Stem Cells*, 25 (1): 88-97
- Tropepe V., Craig C.G., Morshead C.M. y van der K.D.** (1997) "Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma". *J Neurosci*, 17 (20): 7850-7859
- Tropepe V., Coles B.L., Chiasson B.J., Horsford D.J., Elia A.J., McInnes R.R. y van der K.D.** (2000) "Retinal stem cells in the adult mammalian eye". *Science*, 287 (5460): 2032-2036
- Tsai J.W., Chen Y., Kriegstein A.R. y Vallee R.B.** (2005) "LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages". *J Cell Biol*, 170 (6): 935-945
- Tsukada M., Prokscha A., Oldekamp J. y Eichele G.** (2003) "Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein". *Mech Dev*, 120 (9): 1033-1043
- Tsukada M., Prokscha A., Ungewickell E. y Eichele G.** (2005) "Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II". *J Biol Chem*, 280 (12): 11361-11368
- Vallee R.B., Tai C. y Faulkner N.E.** (2001) "LIS1: cellular function of a disease-causing gene". *Trends Cell Biol*, 11 (4): 155-160
- van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D. y Gage F.H.** (2002) "Functional neurogenesis in the adult hippocampus". *Nature*, 415 (6875): 1030-1034
- Verrills N.M. y Kavallaris M.** (2005) "Improving the targeting of tubulin-binding agents: lessons from drug resistance studies". *Curr Pharm.Des*, 11 (13): 1719-1733
- Vidal M.** (2006) "Caracterización neuroquímica de las células de nueva generación del bulbo olfatorio de la rata". *Trabajo de Grado, Universidad de Salamanca*
- Wadhwa R., Kaul S.C., Miyagishi M. y Taira K.** (2004) "Vectors for RNA interference". *Curr Opin Mol Ther*, 6 (4): 367-372
- Walsh C.A.** (2000) "Genetics of neuronal migration in the cerebral cortex". *Ment.Retard.Dev Disabil.Res Rev*, 6 (1): 34-40
- Wang X. y Feuerstein G.Z.** (1995) "Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia". *J Neurotrauma*, 12 (5): 825-832

- Waterhouse P.M., Wang M.B. y Lough T.** (2001) "Gene silencing as an adaptive defence against viruses". *Nature*, 411 (6839): 834-842
- Whitman M.C. y Greer C.A.** (2007) "Adult-generated neurons exhibit diverse developmental fates". *Dev Neurobiol*, 67 (8): 1079-1093
- Wichterle H., García-Verdugo J.M. y Álvarez-Buylla A.** (1997) "Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration.". *Neuron*, 18 (5): 779-791
- Wichterle H., García-Verdugo J.M., Herrera D.G. y Álvarez-Buylla A.** (1999) "Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain". *Nat Neurosci*, 2 (5): 461-466
- Winner B., Cooper-Kuhn C.M., Aigner R., Winkler J. y Kuhn H.G.** (2002) "Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb". *Eur J Neurosci*, 16 (9): 1681-1689
- Woolf T.B., Shepherd G.M. y Greer C.A.** (1991) "Local information processing in dendritic trees: subsets of spines in granule cells of the mammalian olfactory bulb". *J Neurosci*, 11 (6): 1837-1854
- Wray S., Grant P. y Gainer H.** (1989) "Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (20): 8132-8136
- Wray S.D., Ellis T.L. y Bianco S.** (2001) "Migratory neurocysticercosis mimicking a third ventricular colloid cyst. Case report". *J Neurosurg.*, 95 (1): 122-123
- Wu D., Murakami K., Morooka A., Jin H., Inoshima Y. y Sentsui H.** (2003) "In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus". *Virus Res*, 97 (2): 81-87
- Wu W., Wong K., Chen J., Jiang Z., Dupuis S., Wu J.Y. y Rao Y.** (1999) "Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit". *Nature*, 400 (6742): 331-336
- Xiang X., Osmani A.H., Osmani S.A., Xin M. y Morris N.R.** (1995) "NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration". *Mol Biol Cell*, 6 (3): 297-310
- Yam P.Y., Li S., Wu J., Hu J., Zaia J.A. y Yee J.K.** (2002) "Design of HIV vectors for efficient gene delivery into human hematopoietic cells". *Mol Ther*, 5 (4): 479-484
- Yamaguchi M. y Mori K.** (2005) "Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (27): 9697-9702
- Yamashita N., Kosaka K., Ilg E.C., Schafer B.W., Heizmann C.W. y Kosaka T.** (1997) "Selective association of S100A6 (calcyclin)-immunoreactive astrocytes with the tangential migration pathway of subventricular zone cells in the rat". *Brain Res*, 778 (2): 388-392
- Yang H.K., Sundholm-Peters N.L., Goings G.E., Walker A.S., Hyland K. y Szele F.G.** (2004) "Distribution of doublecortin expressing cells near the lateral ventricles in the adult mouse brain". *J Neurosci Res*, 76 (3): 282-295
- Yang Z.** (2008) "Postnatal subventricular zone progenitors give rise not only to granular and periglomerular interneurons but also to interneurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb". *J Comp Neurol*, 506 (2): 347-358
- Yekta S., Shih I.H. y Bartel D.P.** (2004) "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA". *Science*, 304 (5670): 594-596
- Yuste R., Majewska A. y Holthoff K.** (2000) "From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines". *Nat Neurosci*, 3 (7): 653-659
- Yuste R. y Bonhoeffer T.** (2004) "Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies". *Nat Rev Neurosci*, 5 (1): 24-34

Zhao C., Teng E.M., Summers R.G., Jr.,
Ming G.L. y Gage F.H. (2006) "Distinct
morphological stages of dentate granule
neuron maturation in the adult mouse
hippocampus". *J Neurosci*, 26 (1): 3-11