

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA



*Distribución de la enzima 3 α -hidroxiesteroide oxidoreductasa
en el cerebro de rata durante el desarrollo embrionario y postnatal:
un posible rol para los neuroesteroides en el control de
la biología de los progenitores neurales*

Trabajo Especial de Grado

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la **Br. Katherine A. Alcalá H.**, como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología

Tutora: Dra. Nathalie Gago

Asesora académica: Dra. Concepción Hernández

JULIO, 2009

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	ii
ABREVIATURAS	iii
INTRODUCCION	1
I. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO	
1. Neurogénesis durante el desarrollo	1
2. Desarrollo de las estructuras telencefálicas	3
a) Desarrollo de la neocorteza	4
b) Desarrollo de la zona subventricular de los ventriculos laterales	5
c) Desarrollo del giro dentado del hipocampo	7
II. NEUROGENESIS EN EL SISTEMA NERVIOSO ADULTO	9
1. Zona subventricular de los ventrículos laterales	9
a) Estructura de la zona subventricular	9
b) Migración y diferenciación de los neuroblastos de la ZSV	11
2. Zona subgranular del giro dentado del hipocampo	11
III. PSA-NCAM COMO MARCADOR MOLECULAR DE LAS CELULAS MADRE NEURALES Y PROGENITORES NEURALES	14
1. Moléculas de adhesión celular neural	14
2. PSA-NCAM durante el desarrollo	15
3. Función de PSA-NCAM en la migración celular	16

ANTECEDENTES	17
I. GABA	17
1. El GABA y sus receptores	17
2. El GABA como modulador de la neurogénesis	18
II. NEUROESTEROIDES	20
1. Biosíntesis de los neuroesteroides	20
2. Mecanismo de acción de los neuroesteroides	21
3. Los neuroesteroides como moduladores de la neurogénesis	23
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y METODOS	28
I. RECOLECCION Y PROCESAMIENTO DE LOS CEREBROS	28
1. Animales	28
2. Fijación del tejido	28
a) Fijación de los embriones	28
b) Fijación de los animales postnatales	29
3. Cortes del tejido	29
a) Cortes en criostato	29
b) Cortes en vibratomo	30
II. ESTUDIO NEUROANATOMICO Y DISTRIBUCION DE LA 3α-HSOR	30
1. Coloración histológica con Hematoxilina y Eosina	30
2. Inmunofluorescencia	30

a) Anticuerpos utilizados	30
b) Estandarización del protocolo	31
c) Protocolo empleado	32
d) Controles	33
RESULTADOS	34
I. DESCRIPCIÓN NEUROANATOMICA DEL CEREBRO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y POSTNATAL	34
1. Descripción neuroanatómica del cerebro de rata durante el desarrollo embrionario	34
2. Descripción neuroanatómica del cerebro de rata durante el desarrollo postnatal	37
II. DISTRIBUCION DE LA 3α-HSOR EN EL CEREBRO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	40
1. Distribución de la 3 α -HSOR en embriones de 14 días	40
a) Neuroepitelio cortical	40
b) Neuroepitelio olfatorio	40
c) Eminencia gangliónica lateral	40
2. Distribución de la 3 α -HSOR en embriones de 17 días	44
a) Neuroepitelio cortical	44
b) Eminencias gangliónicas	44
c) Bulbo olfatorio	44
d) Hipocampo	44
3. Distribución de la 3 α -HSOR en embriones de 20 días	48

a) Neocorteza	48
b) Eminencias gangliónicas	48
c) Bulbo olfatorio	48
d) Hipocampo	51
e) Cerebelo	51
III. DISTRIBUCION DE LA 3α-HSOR EN EL CEREBRO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL	51
1. Expresión de la 3 α -HSOR en las zonas neurogénicas	51
a) Zona subventricular de los ventrículos laterales	51
b) Vía de migración rostral	57
c) Bulbo olfatorio	60
d) Extensión caudal de la zona subventricular	60
e) Giro dentado del hipocampo	66
2. Expresión de la 3 α -HSOR en las zonas no neurogénicas clásicas	70
a) Corteza	70
b) Cerebelo	78
c) Otras estructuras	81
DISCUSION	84
I. ESTUDIO NEUROANATOMICO DEL CEREBRO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO	84
II. EXPRESIÓN DE LA 3α-HSOR DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	84
1. Análisis general de la expresión de la 3 α -HSOR durante el desarrollo embrionario	84

2. Inferencias funcionales de la expresión de la 3 α -HSOR durante el desarrollo embrionario	87
a) Posible efecto de la 3 α ,5 α -THP sobre la proliferación celular	87
b) Posibles efectos de la 3 α ,5 α -THP sobre la migración celular	89
c) Posibles efectos de la 3 α ,5 α -THP sobre diferenciación celular	91
III. EXPRESIÓN DE LA 3α-HSOR DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL	92
1. Expresión de la 3 α -HSOR en las zonas neurogénicas durante el desarrollo postnatal	92
a) Expresión de la 3 α -HSOR en la ZSV, VMR y BO	92
b) Expresión de la 3 α -HSOR en la ECZSV y las cadenas radiales relacionadas	94
c) Expresión de la 3 α -HSOR en la ZSG e hipocampo	96
2. Expresión de la 3 α -HSOR en zonas no neurogénicas clásicas	98
a) Expresión de la 3 α -HSOR en la corteza	98
b) Expresión de la 3 α -HSOR en el cerebelo	100
3. Expresión de la 3 α -HSOR en los endotelios vasculares	102
PERSPECTIVAS	105
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFIA	108

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco con toda sinceridad: (esperé mucho para escribir esta parte, por fin!)

A Dios y a la Virgen, por darme toda la fortaleza y la voluntad para realizar este trabajo dando lo mejor de mí y ayudándome siempre a superar los obstáculos.

A mi mamá, por apoyarme incondicionalmente en todo a pesar de mis momentos de mal humor y estrés, gracias mamá por ser tan paciente y esforzarte para ayudarme a lograr esta meta... aquí la tienes, lo logramos!

A mi papá, por ser mi papá.

A mi familia, por brindarme su apoyo en los momentos que más lo necesitaba.

A mis tías, en el extranjero, por animarme aunque estén lejos y esforzarse para que su ayuda siempre me llegara en el momento adecuado.

A mi Tutora, por guiarme tan bien durante la realización de este trabajo, confiar en mí y ser paciente, y por brindarme siempre su apoyo, su comprensión y su positivismo, de verdad tuve mucha suerte en conocerla.

A mis pobres ratitas, ustedes son las protagonistas de esta historia.

A todos los que trabajan en la Cátedra de Fisiología de la escuela J.M. Vargas, por crear en conjunto un ambiente de trabajo súper agradable y familiar, esto contribuyo a que el trabajo en el laboratorio fuera mucho más placentero.

A mis amistades, por estar conmigo en buenas y malas, compartiendo las dificultades y los éxitos que se dieron durante el camino y ayudando siempre en lo que podían.

Al personal del bioterio, por brindarme consejos para obtener los animales de la manera más efectiva.

Y por último, un agradecimiento especial a Guy Mensah-Nyagan, por suministrarnos gentilmente el anticuerpo anti-3 α -HSOR, a Michael Shumacher, por su colaboración en este trabajo y a Philippe Leclerc, por su ayuda en la toma de las fotos confoca

RESUMEN

Por mucho tiempo se pensó, que una vez culminado el desarrollo del sistema nervioso, las células madre y los progenitores neurales desaparecían por completo. Sin embargo, actualmente se sabe que estas células persisten en nichos neurogénicos en el tejido adulto, sirviendo como fuente de nuevas células nerviosas durante toda la vida, y pudiendo participar en procesos regenerativos. Debido a esto, el estudio en profundidad de la biología de las células madre y de los progenitores neurales, y en particular de los factores que regulan la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de estas células, es indispensable para el desarrollo exitoso de estrategias terapéuticas. Además de los factores de crecimiento, otras moléculas están cobrando interés en la actualidad, este es el caso de los neurotransmisores, en particular del GABA y de los neuroesteroides, como la $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroprogesterona ($3\alpha,5\alpha$ -THP o alopregnanolona) un metabolito neuroactivo de la progesterona que actúa como un potente modulador del receptor GABA_A. Recientemente, utilizando un modelo *in vitro*, de progenitores neurales aislados de cerebro de rata recién nacida, se estableció que la $3\alpha,5\alpha$ -THP y el GABA eran capaces de estimular la proliferación de estas células actuando vía receptores GABA_A. El objetivo general del presente trabajo fue el de aportar evidencias anatómicas de la posible participación de la $3\alpha,5\alpha$ -THP en el control de la biología de los progenitores neurales *in vivo*. Se determinó, por inmunofluorescencia, la distribución de la 3α -hidroxiesteroide oxidoreductasa (3α -HSOR), enzima responsable de la síntesis de la $3\alpha,5\alpha$ -THP, en el cerebro de rata durante el desarrollo. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 14, 17 y 20 días embrionarios (E14, E17 y E20), y de 1, 4, 7, 12, 15 y 21 postnatales (P1, P4, P7, P12, P15 y P21). En E14, la enzima se expresó en la zona ventricular (ZV), el neuroepitelio olfatorio y las eminencias gangliónicas. En E17, la 3α -HSOR se expresó en las capas externas de la corteza, los bulbos olfatorios (BO) y el hipocampo. En E20, la expresión de la enzima fue más amplia y se observó en la ZV y en la zona subventricular (ZSV). En las etapas postnatales, la expresión de la 3α -HSOR en las zonas neurogénicas aumentó durante las primeras semanas y luego disminuyó sin desaparecer. En la extensión caudal de la ZSV, se observó una alta densidad de células 3α -HSOR⁺ que conforman cadenas radiales que penetran el cuerpo caloso (CC). En P21, las cadenas celulares en el CC desaparecen, quedando solo células 3α -HSOR⁺ aisladas. Se observaron también endotelios vasculares 3α -HSOR⁺ asociados a las zonas neurogénicas. Además, la expresión de la enzima en los vasos se incrementó considerablemente durante P12 y P15. En términos generales, los resultados obtenidos muestran que la 3α -HSOR se expresa ampliamente durante el desarrollo embrionario y postnatal siguiendo un patrón espacio-temporal definido. Pudimos establecer que la expresión de la enzima es considerable en las zonas neurogénicas, siendo más alta al comienzo del desarrollo embrionario y durante el período postnatal comprendido entre P7 y P12. El presente trabajo aporta evidencias anatómicas sobre el posible papel de la $3\alpha,5\alpha$ -THP en el control de la biología de las células madre neurales y de los progenitores neurales *in vivo* durante el desarrollo.

Palabras clave: células madre neurales, progenitores neurales, neuroesteroides, $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroprogesterona (alopregnanolona), receptor GABA_A, desarrollo del sistema nervioso central.

ABREVIATURAS

- 3 α , 5 α -THP:** 3 α ,5 α -tetrahidroprogesterona
- 3 α -HSOR:** 3 α -hidroxiesteroide oxidoreductasa
- 5 α -DHP:** 5 α -dihidroprogesterona
- BO:** bulbo olfatorio
- CC:** cuerpo calloso
- CMN:** célula madre neural
- ECZSV:** extensión caudal de la zona subventricular
- EG:** eminencia gangliónica
- EGL:** eminencia gangliónica lateral
- EGM:** eminencia gangliónica medial
- GABA:** ácido γ -aminobutírico
- GD:** giro dentado del hipocampo
- GFAP:** proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein*)
- NC:** neuroepitelio cortical
- NE:** neuroesteroides
- NEO:** neuroepitelio olfatorio
- PC:** placa cortical
- PN:** progenitor neural
- PP:** preplaca
- PREG:** pregnenolona
- PROG:** progesterona
- PSA-NCAM:** forma polisialilada de la molécula de adhesión celular neural
- SNC:** sistema nervioso central
- SP:** subplaca
- VMR:** vía de migración rostral
- ZI:** zona intermedia
- ZM:** zona marginal
- ZSG:** zona subgranular
- ZSV:** zona subventricular
- ZV:** zona ventricular

INTRODUCCION

I. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

Todas las células del sistema nervioso, neuronas y células gliales, se producen durante la gastrulación a partir de una capa de células ectodérmicas localizadas a lo largo de la línea media dorsal del embrión. La formación del sistema nervioso se inicia con el proceso de inducción neural, en el cual estas células ectodérmicas comienzan a recibir señales de células mesodérmicas que conforman la notocorda, iniciándose así la diferenciación de un subgrupo de células ectodérmicas en un epitelio columnar denominado placa neural (Jessell y Sanes, 2001). Una vez formada la placa neural, ésta comienza a plegarse en una estructura tubular denominada tubo neural. La proliferación de las células en la región rostral del tubo neural, dará origen inicialmente a 3 vesículas, prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Posteriormente, el prosencéfalo se subdivide en telencéfalo y diencefalo, y el mesencéfalo se subdivide en metencéfalo y mielencéfalo, formándose luego las estructuras principales del sistema nervioso central (SNC) adulto (Jessell y Sanes, 2001). Por otro lado, se forma la cresta neural, constituida por un grupo de células que emerge de la parte dorsal del tubo neural y que se dispersa a lo largo de diferentes vías hacia la periferia. Estas células son las responsables de dar origen al sistema nervioso periférico (Jessell y Sanes, 2001).

1. Neurogénesis durante el desarrollo

El término neurogénesis significa la producción de nuevas células nerviosas. La neurogénesis en el sistema nervioso es llevada a cabo por células madre neurales (CMN) y por progenitores neurales (PN) e incluye los procesos de proliferación, migración y diferenciación celular que permitirán el desarrollo y el crecimiento del parénquima del SNC.

Las CMN son células multipotentes que se caracterizan por tener una gran capacidad de proliferación y de autorrenovación, gracias a que son capaces de dividirse asimétricamente. Estas células también presentan una gran capacidad de migración (Alvarez-Buylla y Temple, 1998). En el tubo neural,

las CMN forman un neuroepitelio pseudoestratificado y están dispuestas radialmente, así entran en contacto tanto con la superficie apical (ventricular) como con la superficie basal (pial) del tubo neural (revisado por Merkle y Alvarez-Buylla, 2006). Inicialmente, las células se dividen simétricamente para incrementar la cantidad de CMN, de esta manera se van formando más capas germinativas. Posteriormente, las CMN se dividen asimétricamente, es decir que de cada CMN se forma una CMN que permanece adyacente al ventrículo, en la zona ventricular (ZV), y otra célula, un PN que permanece en una segunda capa germinativa denominada zona subventricular (ZSV) (Noctor y col., 2008). Un PN es una célula progenitora multipotente pero con una capacidad restringida para la autorrenovación (Taupin, 2006). Esta célula es la que dará origen a la célula diferenciada (Lillien, 1997). Para explicar cómo un progenitor se va poco a poco comprometiendo hacia un linaje celular hasta que se diferencia plenamente se han propuesto mecanismos instructivos, en donde señales del medio ambiente determinan el tipo de progenie que se producirá a partir de la CMN, y mecanismos selectivos en donde las señales del medio ambiente seleccionan el tipo de progenie que sobrevivirá y proliferará (Mehler y Kessler, 1999).

Existen varias evidencias que sugieren que las CMN sufren una transformación morfológica y que dan origen a la glía radial (revisado por Ihrie y Alvarez-Buylla, 2008). La glía radial es una célula bipolar que se orienta ortogonalmente al tejido en crecimiento, posee el soma en la ZV, en donde se divide (Fig.1B). En el neuroepitelio cortical, extiende una prolongación celular corta hacia la superficie ventricular y una fibra más larga ramificada, hacia la superficie pial y desempeñan un papel fundamental en el proceso de migración de los PN (Fig.1B) (Bonfanti y Peretto, 2007). La glía radial conserva muchas de las características de CMN como la capacidad de autorrenovarse y de dar origen a neuronas y células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) (revisado por Ihrie y Alvarez-Buylla, 2008), además de que expresa marcadores celulares similares a los de las CMN (Noctor y col., 2008).

2. Desarrollo de las estructuras telencefálicas

Las principales zonas neurogénicas que se encuentran en el adulto, se localizan en el telencéfalo. Estas zonas son de particular interés en el presente trabajo, por lo tanto es necesario explicar un poco como éstas se forman en el telencéfalo durante el desarrollo.

La primera diferenciación regional del telencéfalo, ocurre durante las etapas más tempranas del desarrollo, donde se distingue la formación de unas protuberancias ventrolaterales que se desarrollan hacia la cavidad ventricular (Fig.1A). Estas protuberancias se dividen mediante un surco en dos partes, una parte lateral que se denomina eminencia gangliónica (EG) lateral (EGL) y una parte medial denominada eminencia gangliónica medial (EGM) (Fig.1A). Esta primera regionalización divide al telencéfalo en dos grandes dominios germinativos, el dorsal y el ventral. De la ZV dorsal, se originan principalmente células destinadas a formar la neocorteza y el hipocampo (Fig.1A). Por otra parte, de la ZV ventral se originan células destinadas a formar principalmente el estriado y el neuroepitelio olfatorio (Fig.1A), pero también pueden colonizar parte de la neocorteza y el hipocampo. Se ha descrito una tercera eminencia, denominada eminencia gangliónica caudal y se cree que da origen a una parte del sistema límbico (revisado por De Carlos y col., 1996 y Corbin y col., 2001).

Los progenitores neurales originados a partir las CMN, llegan a su destino mediante una combinación de migración radial y migración tangencial (revisado por Corbin y col., 2001). En la migración radial el progenitor es guiado por la glía radial a lo largo del eje ventricular-pial (Fig.1B) (Rakic, 1996). En la migración tangencial las células, se dispersan siguiendo un plano paralelo a la superficie pial, sin la participación de ningún tipo celular específico (Fig.1A), aunque la célula migratoria puede interactuar con un sustrato formado por células gliales y/o neurales. Por otro lado, estas células también pueden ser guiadas por factores quimiotáctiles y expresar distintas moléculas de membrana que le faciliten el movimiento, como por ejemplo, las caderinas y las moléculas de adhesión celular neural (NCAM) (revisado por Corbin y col., 2001).

a) Desarrollo de la neocorteza

La corteza cerebral se desarrolla a partir de la ZV dorsal. Muy temprano en el desarrollo, los PN originados a partir de esta zona, migran hasta la superficie pial formando así una primera capa denominada capa plexiforme o preplaca (Fig.1B). A medida que se generan más progenitores, estos se posicionan en la parte más interna de la preplaca, de esta manera se diferencia la placa cortical (PC) y quedan formadas dos nuevas capas, una capa superficial denominada zona marginal (ZM) y una capa más interna inmediatamente por debajo de la PC, denominada subplaca (SP) (Fig.1B). Las neuronas recién formadas de la PC dan origen a las capas II-VI de la corteza adulta. Estas capas se forman en una secuencia “de adentro hacia afuera”, es decir, las capas corticales más internas se forman primero y las capas más externas se forman después. La ZM luego se diferencia en la capa I. Al comienzo, la ZM está constituida por las células Cajal-Retzius y por otros tipos celulares que aun no se han caracterizado totalmente. Por otra parte, entre la SP y la ZV se forma la zona intermedia (ZI) (Fig.1B), donde se localizan las primeras vías aferentes y eferentes de la corteza y que posteriormente formarán la materia blanca en la corteza adulta. A medida que la PC se desarrolla se va formando también la ZSV dorsal (Fig.1B) (revisado por Parnavelas, 2002).

De manera general, las principales neuronas de la corteza, las células piramidales y las interneuronas GABAérgicas, se originan en regiones neurogénicas diferentes. La mayoría de las células piramidales se originan a partir de las zonas neurogénicas dorsales (ZV/ZSV del neuroepitelio cortical), mientras que una gran cantidad de interneuronas GABAérgicas se origina de las zonas neurogénicas ventrales (ZV/ZSV de las EG) (revisado por Parnavelas, 2002). Esto implica que los PN de estas células deben migrar a través de rutas diferentes hasta posicionarse en su lugar correspondiente en la PC (revisado por Nadarajah y col., 2003). Los PN de las células piramidales utilizan principalmente la migración radial, en donde participa la glía radial como célula guía. Los progenitores de interneuronas GABAérgicas en cambio migran desde las EG utilizando una migración tangencial (revisado por Parnavelas, 2002). En este último caso, las células pueden migrar colonizando la ZM y la ZI antes de

situarse en la PC, o bien, pueden llegar primero a la ZSV y a la ZV cortical y luego empezar una migración radial hasta la PC (revisado por Nadarajah y col., 2003). Este es el patrón básico de formación de la neocorteza, sin embargo, el desarrollo de las diferentes capas y en especial de la PC, es mucho más complejo.

b) Desarrollo de la zona subventricular de los ventrículos laterales

La ZSV es una de las zonas neurogénicas que prevalece en el cerebro hasta la edad adulta y se forma como una zona germinativa secundaria, a partir de las primeras capas proliferativas de la ZV. Las células de la ZSV se dividen y expanden ampliamente durante las últimas etapas del desarrollo prenatal, en paralelo con la reducción progresiva de la ZV (revisado por Bonfanti y Peretto, 2007). Esto continúa así incluso durante los primeros días postnatales (primera semana en ratas), hasta la desaparición completa de la ZV quedando solamente la ZSV (revisado por Bonfanti y Peretto, 2007). En el adulto, la ZSV permanece en contacto con los ventrículos laterales. De la parte anterior de ésta, se forma una extensión rostral denominada vía de migración rostral (VMR), que discurre a través del tracto olfatorio, hasta llegar a los bulbos olfatorios (BO) (Fig.2) (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996). Por otro lado, de la parte posterior de la ZSV, se forma una extensión caudal que bordea la pared dorsal del ventrículo y que se prolonga hasta el hipocampo. Actualmente, se le considera como una extensión de la ZSV (Fig.1C), que genera otras vías de migración distintas a la VMR, que se dirigen hacia el CC y la corteza (Inta y col., 2008). En el presente trabajo, hemos denominado esta zona extensión caudal de la ZSV (ECZSV).

Toda la estructura de la ZSV se forma a partir de la ZV de la neocorteza y de la ZV de las EG (Young y col, 2007). Las células que provienen de la ZV de la neocorteza dan origen a la parte dorsal de la ZSV adulta, incluyendo su extensión caudal. Por otra parte, las células de la ZV de las eminencias dan origen a las células de la región más interna de la ZSV y a la parte ventral de ésta (Fig.1C) (Young y col, 2007, Marshall y Goldman, 2002).

A nivel celular, el desarrollo de la ZSV empieza con cambios posicionales y morfológicos que sufre la glía radial embrionaria y que se caracterizan por el desplazamiento del soma de esta célula de la

ZV hacia la ZSV y por la retracción de las fibras radiales que proyectan hacia la superficie pial, adoptando así una forma transitoria conocida como célula radial monopolar. Esta célula, se convierte luego en una célula multipolar muy ramificada (revisado por Bonfanti y Peretto, 2007). Estas modificaciones de la glía radial, de un sistema fibroso a un sistema de malla de fibras difusas, viene acompañado por cambios moleculares que afectan principalmente la expresión de filamentos intermedios como la vimentina y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Así, la glía radial adquiere características de astrocitos (revisado por Bonfanti y Peretto, 2007). El cambio más relevante que sufre la glía radial, es el cambio posicional de su fibra principal; de una orientación radial a una orientación tangencial en el borde externo de la ZSV, es decir, en el límite de la zona con el parénquima circundante (revisado por Bonfanti y Peretto, 2007). De esta manera, las células tipo astrocito recién formadas a partir de la glía radial de la ZV dorsal y ventral, se van posicionando en los bordes de la ZSV, mientras que en la parte interna de ésta se encuentran los PN, provenientes de las EG, formando una masa homogénea de células (Fig.1C) (Marshall y Goldman, 2002). Estas células exhiben una gran capacidad migratoria.

A medida que se incrementan las ramificaciones de las células tipo astrocitos, se va formando un septo de cierto grosor, que luego se convertirá en especies de canales de fibras astrocíticas, llamados tubos gliales (Fig.2B.2) (Peretto y col., 1997). Paralelamente, las células migratorias cambian sus interacciones y pasan de una masa homogénea a formar grupos de cadenas tangenciales, relacionadas con estos tubos astrocíticos. De esta manera, queda formada la VMR (revisado por Bonfanti y Peretto, 2007).

En las primeras etapas embrionarias, el neuroepitelio olfatorio (NEO) se encuentra constituido principalmente de progenitores generados a partir de la ZV de la EGL. Estas células colonizan el NEO por medio de una migración radial, utilizando como guía las fibras largas que extiende la glía radial desde la ZV de la EGL hacia la región ventrolateral del telencéfalo incluyendo el NEO (De Carlos y col., 1996). Posteriormente en el desarrollo, los PN que dan origen a las distintas neuronas del BO, provienen de la ZSV y migran tangencialmente a través de la VMR (revisado por Corbin y col., 2001).

c) Desarrollo del giro dentado del hipocampo

El hipocampo se forma a partir de la parte media del neuroepitelio cortical y durante su desarrollo ocurre una serie de eventos similares a los que ocurren en la neocorteza. Sin embargo, existen diferencias significativas, por ejemplo, las capas de la neocorteza se desarrollan en una secuencia “de adentro hacia afuera”, pero la capa de células granulares o giro dentado (GD) del hipocampo se forma en una secuencia “de afuera hacia adentro”, es decir, de la superficie pial hacia la región interna del polo dentado (Fig.1D.1) (Li y col., 2009).

A mediados del período gestacional, los progenitores que se derivan de la ZV hipocampal se organizan en una región neurogénica transitoria, denominada zona subpial. Esta se origina por el desplazamiento de algunas células progenitoras de la ZV hasta la superficie pial, de esta manera los PN quedan bordeando externamente todo el primordio hipocampal (Fig.1D.2) (Li y col., 2009). Luego, a partir de esta zona transitoria, las nuevas células formadas comienzan a migrar hasta la región interna del polo dentado (hilus) y comienzan a organizarse en el GD, utilizando para ello las prolongaciones de la glía radial, las cuales atraviesan el hilus y conectan la ZV con la superficie pial (Fig.1D.4). Por otro lado, de este proceso también se origina una zona germinativa secundaria, la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (Fig.1D.3) (Li y col., 2009). Esta zona germinativa secundaria, persiste en el adulto como una capa de células proliferativas en la parte interna del GD y los progenitores que se forman a partir de ésta dan origen a células granulares maduras del GD (revisado por Irhie y Alvarez-Buylla, 2008).

Al igual que en la neocorteza, durante el desarrollo del hipocampo, los PN pueden llegar a su lugar de destino migrando tangencialmente y/o radialmente (Manent y col., 2006). Tangencialmente, el hipocampo es colonizado por dos vías de migración diferentes, una vía superficial que discurre junto a la ZM de la neocorteza en desarrollo, y una segunda vía interna que discurre sobre la ZSV, ambas vías

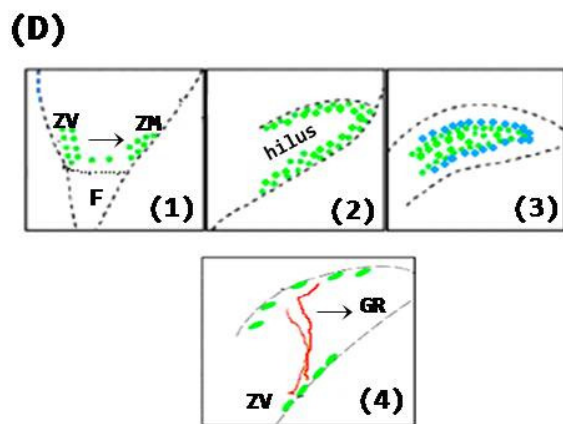
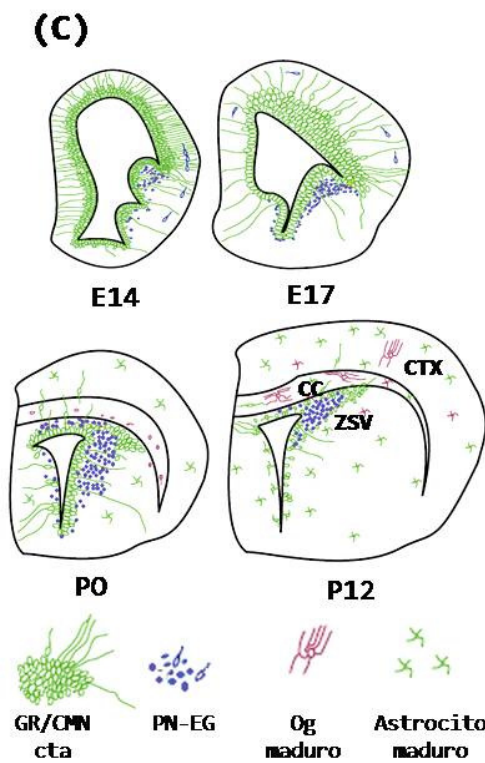
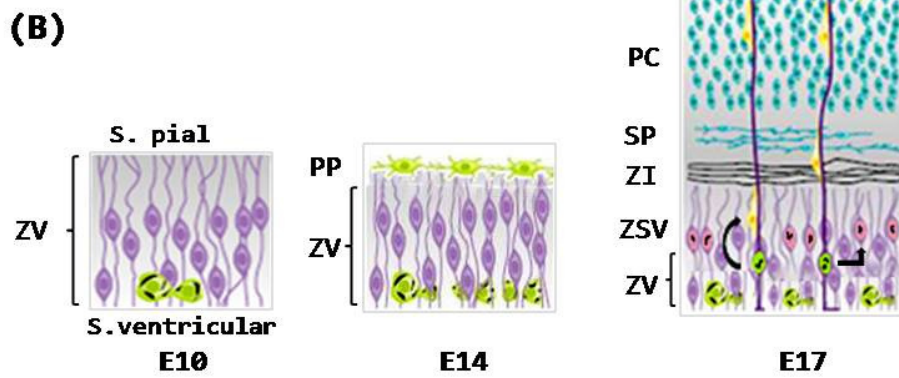
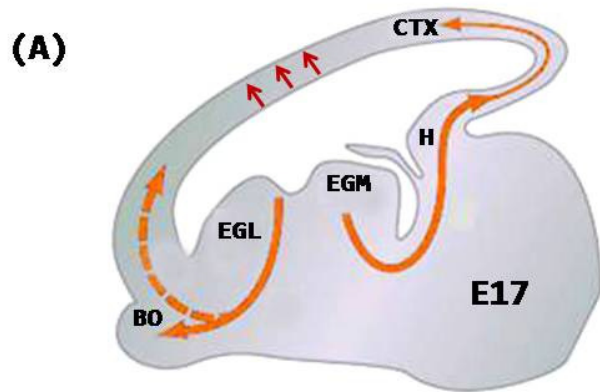


Figura 1. Principales eventos del desarrollo estructural del telencéfalo. (A) Esquema de un corte sagital de cerebro de rata de 17 días embrionarios (E17). Los progenitores neurales (PN), originados a partir de la zona ventricular (ZV) de la neocorteza (CTX) y de las eminencias gangliónicas (EG) lateral (EGL) y medial (EGM), migran siguiendo diferentes rutas (flechas) hasta sus lugares de destino donde se diferencian. Los PN originados en la CTX migran radialmente (flechas rojas), en cambio, los PN originados en las EG migran tangencialmente (flechas naranja). De esta manera, los PN colonizan las capas externas de la CTX, el hipocampo y los bulbos olfatorios (modificado de Corbin y col., 2001). (B) Desarrollo de la neocorteza. Al comienzo del desarrollo embrionario (E10), el neuroepitelio cortical está formado por células madres neurales (CMN) en constante proliferación (verdes) y que contactan tanto con la superficie pial, como con la superficie ventricular (lila). Estas células constituyen la ZV cortical. En E14, se forma una capa externa a partir de la ZV llamada preplaca (PP), que luego formará la zona marginal (ZM). Luego, en E17, ya se han formado la placa cortical (PC), la subplaca (SP), la ZM, la zona intermedia (ZI), constituida principalmente por fibras. También se puede observar la zona subventricular (ZSV), originada a partir de la ZV como capa generativa secundaria. La glía radial (violeta oscuro) sirve como célula guía de los progenitores neurales (PN) (amarillo) en la migración radial. Por otro lado, estas células actúan como CMN (verde) dando origen a neuronas o células gliales directamente, ó dando origen a PN intermedios que permanecen proliferando en la ZSV (rosado) (modificado de Campbell y Götz, 2002). (C) Desarrollo de la ZSV. Representación esquemática de cortes trasversales de cerebro en diferentes etapas del desarrollo. A medida que el desarrollo avanza la glía radial de la ZV cortical y de las EG, se transforma en células tipo astrocito (cta) (verdes). Estas células en la ZSV adulta actúan como CMN y se localizan en los bordes de la ZSV. Por otro lado, los PN provenientes de las EG (azul), se ubican en el interior de la ZSV y están rodeados por las cta. De la ZSV, se originan astrocitos maduros y oligodendrocitos (og) (violeta) que colonizan la corteza (CTX) y el cuerpo calloso (CC) (modificado de Marshall y Goldman, 2002). (D) Desarrollo del giro dentado (GD) del hipocampo. (D.1) Al comienzo del desarrollo embrionario los progenitores (verde) de la ZV migran hasta la ZM, así se organizan formando el polo dentado muy cerca de la fimbria (F). (D.2) Luego, atravesando el hilus terminan de bordear toda la formación hipocampal y comienzan a colonizar la región interna del mismo. (D.3) A medida que se van formando nuevas células granulares (azul) los PN van quedando restringidos en la parte interna del GD y se constituye así la zona subgranular (ZSG). (D.4) Las células de la ZV atraviesan el hilus utilizando la glía radial (GR, rojo) (modificado de Li y col., 2009).

constituidas por progenitores de interneuronas GABAérgicas. Por otro lado, las células piramidales recién formadas migran radialmente hasta su lugar correspondiente en el hipocampo (Manent y col., 2006).

II. NEUROGENESIS EN EL SISTEMA NERVIOSO ADULTO

En las primeras etapas del desarrollo la cantidad de CMN es muy grande, a medida que el sistema nervioso va madurando, estas células van diferenciándose y su número va disminuyendo. Por mucho tiempo se pensó que una vez culminado el proceso de desarrollo las CMN desaparecerían por completo. Sin embargo, actualmente se sabe que éstas persisten en el tejido adulto y que derivan de las CMN de las capas germinativas primitivas. Las CMN presentes en el SNC después del nacimiento y hasta la etapa adulta, están confinadas a sitios histológicamente definidos. Estos compartimientos se han denominado nichos neurogénicos debido a que en ellos existe un microambiente que le permite a las CMN expresar su potencial, el cual se traduce en el mantenimiento y en la reparación del tejido nervioso (Spradling y col., 2001; Scadden, 2006). Las principales zonas neurogénicas del adulto son la ZSV de los ventrículos laterales y la ZSG del giro dentado del hipocampo (revisado por Bonfanti y Peretto, 2007).

1. Zona subventricular de los ventrículos laterales

a) Estructura de la zona subventricular

La ZSV en el adulto está conformada por tres tipos principales de células, definidos por su morfología ultraestructural y marcadores moleculares (Fig.2B.3). Los neuroblastos o células tipo A, son células bipolares con un núcleo grande y un citoplasma electrondenso reducido, son inmunopositivas para la forma polisialilada de la molécula de adhesión celular neural (PSA-NCAM), para la β -tubulina, la doblecortina y la nestina (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996; Nacher y col., 2001). Las células tipo A recorren tangencialmente las paredes del ventrículo lateral y corresponden al grupo de PN que forman cadenas de células migratorias (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996).

Los astrocitos o células tipo B, son células ramificadas de forma irregular que expresan nestina, GFAP y vimentina (Peretto y col., 1997; Doetsch y col., 1997). Las células tipo B forman una red tubular que envuelve a las cadenas de células tipo A, aislándolas de la capa endotelial y del parénquima del estriado en la VMR (Fig.2B.2) (Lois y Alvarez-Buylla, 1994). Se ha propuesto que las CMN de esta zona son las células tipo B, de hecho, Merkle y colaboradores, en 2004, mostraron que a partir de la glía radial se originan varios tipos celulares de la ZSV postnatal, incluyendo los astrocitos, y que luego éstos permanecen en el adulto como un tipo celular con características de CMN.

Además de las células tipo A y tipo B, existen las células tipo C, que son células de gran tamaño que expresan nestina, y que también rodean las paredes del ventrículo lateral en la ZSV. Estas células se encuentran poco presentes en la VMR. Las células tipo C son el grupo celular con mayor actividad proliferativa en la ZSV (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1997).

En base a estos tipos celulares, Doetsch y colaboradores, en 1997, propusieron un modelo de neurogénesis en la ZSV adulta en donde las células tipo B que son CMN originan los progenitores neurales tipo C que a su vez, generan las células tipo A o neuroblastos migratorios, los cuales migran a los BO se diferencian en diferentes tipos de interneuronas.

Existen otras células relacionadas con la ZSV, como son las células endoteliales, que se encuentran entre la ZSV y la cavidad ventricular, formando un epitelio no germinativo de células multiciliadas (Fig.2B.3). Éstas se comienzan a formar a partir de la glía radial al final de la etapa embrionaria (Spassky y col., 2005).

Las células de la ZSV también se encuentran en estrecha relación con los vasos sanguíneos (Fig.2B.3), por lo que se presume que esta interacción pudiera tener importancia en el aporte de señales al nicho neurogénico, ya que se ha visto que las fibras de los astrocitos y de los neuroblastos envuelven el endotelio vascular (Mercier y col., 2002).

b) Migración y diferenciación de los neuroblastos de la ZSV

Una vez formados los neuroblastos, éstos migran dentro de los tubos gliales hasta los BO, a través de la VMR utilizando un tipo de migración en cadena la cual es dependiente de la forma polisialilada de la molécula de adhesión celular neural (PSA-NCAM) (Fig.2B.1) (Lois y Alvarez-Buylla, 1994). A diferencia del rol que cumple la glía radial durante el desarrollo como célula guía en la migración de los PN, los tubos gliales astrocíticos parecen no ser esenciales en la migración de los progenitores en la ZSV adulta y en la VMR (Wichterle y col., 1997). Se piensa más bien que pudieran estar implicados en el aislamiento y la compartimentalización de la zona neurogénica y en la formación de un microambiente que permita los procesos neurógenicos en el adulto (Fasolo y col., 2002).

Una vez que llegan a los BO, los neuroblastos dejan los tubos gliales y prosiguen su migración radialmente (Lois y Alvarez-Buylla, 1994), como células aisladas y atraviesan el parénquima de los BO y de los BO accesorios (Bonfanti y col., 1997). Muchos de estos progenitores se diferencian en células granulares GABAérgicas, y otro grupo más pequeño, se diferencia en células periglomerulares dopaminérgicas (De Marchis y col., 2004).

Los PN de la ZSV no sólo dan origen a los diferentes tipos de interneuronas en los BO, sino que también se ha visto que dan origen a células mielinizantes como los oligodendrocitos en el cuerpo calloso (CC) y el estriado, y que originan también astrocitos maduros en la corteza (Levison y col., 1993).

2. Zona subgranular del giro dentado del hipocampo

El GD es parte de la formación del hipocampo, localizada en la parte dorso-caudal del telencéfalo, debajo del cuerpo calloso. En el adulto está formado por tres capas de cierto grosor (4-10 células) constituidas por pequeñas neuronas, llamadas células granulares, localizadas entre el hilus y la capa molecular. Los axones de las células granulares, conocidos como fibras musgosas, proyectan hacia el haz de Ammon, mientras que las dendritas se ramifican en la capa molecular (Fig.2A.1) (Bonfanti y Ponti, 2007). La proliferación celular que se observa durante el desarrollo persiste en el hipocampo

adulto, gracias a la existencia de la ZSG. Las jóvenes células granulares que se originan a partir de esta zona, expresan PSA-NCAM (Seki y Arai, 1993) y doblecortina (Brown y col., 2003), y se vuelven eléctricamente activas integrándose con éxito a los circuitos neuronales del GD (Fig.2A.2) (Espósito y col., 2005).

En la ZSG no se han encontrado cadenas de células migratorias, como las que se observan en la ZSV, y esto se debe a que las nuevas células generadas se diferencian localmente en la capa granular (Fig.2A.2), por lo que no requieren desplazarse una gran distancia, como lo hacen los neuroblastos de la ZSV para llegar a los BO (Bonfanti y Ponti, 2007). Al igual que en la ZSV, en la ZSG se han encontrado astrocitos que igualmente expresan nestina y GFAP (Filippov y col., 2003), sin embargo, éstos no se encuentran formando tubos gliales, y más bien permanecen como una célula astrocítica tipo glía radial (Fig.2A.3), por lo que también se ha propuesto que puedan constituir la CMN del hipocampo (Seri y col., 2004).

Las células tipo C de la ZSV presentan una célula homóloga en la ZSG, llamada célula tipo D (Bonfanti y Ponti, 2007). Son células pequeñas con un citoplasma electrodensito y probablemente funcionan como un precursor transitorio en la formación de nuevas células neurales (Filippov y col., 2003).

Por otro lado, las células proliferativas de la ZSG, están estrechamente relacionadas con microcapilares que penetran en el GD, por lo que al igual que en la ZSV, los endotelios vasculares pueden formar parte del nicho neurogénico (Palmer y col., 2000)

La neurogénesis, sobre todo en la ZSG, parece estar involucrada en algunos procesos de aprendizaje y de memoria, por ejemplo, se ha observado que en experimentos en los que se estimula el aprendizaje, la neurogénesis aumenta en el GD. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales estos procesos se llevan a cabo en el adulto, no han sido dilucidados aún (revisado por Taupin, 2005).

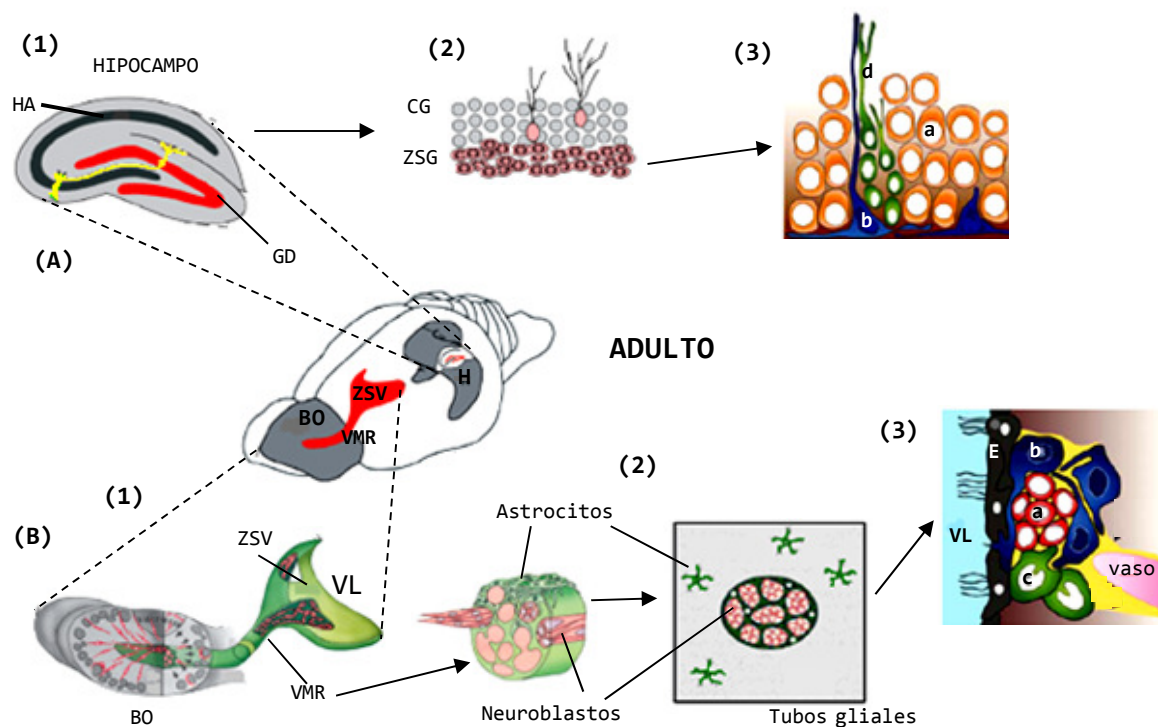


Figura 2. Estructura celular de las zonas neurogénicas en el cerebro adulto. La neurogénesis en el adulto ocurre principalmente en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (H) y en la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales, desde donde se extiende la vía de migración rostral (VMR) hasta los bulbos olfatorios (BO). **(A)** Representación esquemática del hipocampo. **(A.1)** La ZSG se localiza en la parte interna del giro dentado (GD). En el giro dentado las células granulares (en amarillo) extienden una fibra musgosa hacia el Haz de Ammon (HA), mientras que las dendritas se ramifican en la capa molecular. **(A.2)** Los progenitores de la ZSG (en rosa oscuro) dan origen a células granulares. Estas nuevas células generadas, se diferencian localmente en la capa granular. **(A.3)** Los tipos celulares de la ZSG son similares a los descritos en la ZSV, sin embargo, los neuroblastos ó células tipo a (naranja) no se encuentran formando cadenas de células migratorias como en la ZSV. Las células tipo b o astrocitos (azul) permanecen como una célula tipo glía radial, sin formar tubos gliales. Las células tipo d (verde) actúan como un progenitor transitorio de nuevas células nerviosas. **(B)** La ZSV en el adulto permanece en contacto con los ventrículos laterales (VL). **(B.1)** Los neuroblastos generados en la ZSV migran formando cadenas de células a través de la VMR, hasta llegar a los BO, donde prosiguen la migración radialmente y se diferencian en interneuronas. **(B.2)** Las cadenas de células migratorias (rosado) se encuentran dentro de tubos gliales formados por los astrocitos (verde). **(B.3)** Por último, se representa un esquema de los tipos celulares de la ZSV. Las células tipo a están rodeadas de las células tipo b, las cuales forman los tubos astrocíticos. Las células tipo c homólogas a las células tipo d de la ZSG, poseen la mayor actividad proliferativa en la ZSV. También se encuentran en la ZSV células ependimales (en gris), que son células ciliadas que rodean las paredes de los ventrículos laterales (VL). También se encuentran vasos sanguíneos asociados a esta estructura celular. Nótese la diferencia en la organización celular con respecto a la ZSG. (figura modificada de Bonfanti y Ponti, 2007 y de Ihrie y Alvarez-Buylla, 2008).

III. PSA-NCAM COMO MARCADOR MOLECULAR DE CÉLULAS MADRE NEURALES Y PROGENITORES NEURALES.

Las CMN y los PN pueden ser identificados y estudiados gracias al empleo de marcadores moleculares siendo uno de los más utilizados PSA-NCAM. En el presente proyecto se utilizó este marcador para identificar estas células en el cerebro de rata durante el desarrollo por lo que es importante hacer una mención sobre esta molécula.

1. Moléculas de adhesión celular neural

El ensamblaje de la compleja arquitectura del SNC durante el desarrollo y su posterior mantenimiento, depende mucho de las moléculas de adhesión celular (CAMs), las cuales son capaces de estabilizar y modular las interacciones celulares (revisado por Bonfanti, 2006). Aunque la mayoría de las CAMs están formadas estructuralmente por un número limitado de tipos proteicos (caderinas, inmunoglobulinas, fibronectina tipo III, dominios de semaforina), sus distintas combinaciones en número y arreglos, da como resultado una gran variedad de pequeños subgrupos (revisado por Bonfanti, 2006).

Las proteínas que constituyen las CAMs, pueden interactuar con una proteína del mismo tipo, adhesión conocida como homofílica, o se pueden unir a diferentes ligandos, en la adhesión de tipo heterofílica. Se pueden también encontrar combinaciones de ambos tipos. Además pueden interactuar tanto con ligandos expresados en la superficie celular, como con ligandos de la matriz extracelular (revisado por Bonfanti, 2006).

Entre los tipos de CAMs se encuentran las moléculas de adhesión celular neural NCAM. Estas son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que son codificadas por un solo gen, conformado por 26 exones (revisado por Bonfanti, 2006). De este gen, se pueden originar de 20 a 30 formas diferentes de NCAM, ya sea por procesos de splicing alternativos, o por modificaciones post-traduccionales. Las NCAM están constituidas por cinco inmunoglobulinas (Ig 1-5), y por dos dominios de fibronectina tipo III (Fn 1-2). Estas moléculas pueden establecer interacciones homofílicas (revisado por Bonfanti, 2006).

Polímeros de ácido polisialílico (PSA) pueden ser añadidos a las NCAM. Estos son carbohidratos que se derivan del ácido neuroamínico y generalmente se encuentran como residuos terminales de glicoconjugados de la superficie celular, por lo que desempeñan un rol importante en el reconocimiento celular y en procesos de adhesión (revisado por Bonfanti, 2006). Son homopolímeros lineales constituidos por una serie de monómeros de 8 hasta más de 100, los cuales son añadidos a NCAM por procesos post-traduccionales (Rutishauser y Landmesser, 1996) en el dominio Ig5 del lado extracelular de NCAM (revisado por Bonfanti, 2006). PSA es sintetizado en el citosol y se ensambla a NCAM dentro del aparato de golgi por acción de una enzima polisialiltransferasa, sintetizando así PSA-NCAM. Esta se expresa luego en la membrana celular posiblemente por un proceso de exocitosis inducido por un aumento en la concentración de calcio intracelular (revisado por Bonfanti, 2006).

2. PSA-NCAM durante el desarrollo

Durante el desarrollo del SNC, PSA-NCAM se considera como un marcador de células progenitoras multipotentes inmaduras, y en el adulto, además de marcar estas células, también es un marcador de regiones cerebrales con alta plasticidad estructural (revisado por Nguyen y col., 2001). PSA-NCAM sin embargo, está ausente en las fases más tempranas del desarrollo, y de hecho no se ha observado inmunoreactividad de la molécula en el neuroepitelio joven ni en la ZV del cerebro en desarrollo (Seki y Arai, 1991). Tan pronto se comienzan a formar las capas marginales del cerebro embrionario, empiezan a aparecer marcajes intracelulares difusos para PSA-NCAM, mientras que la ZV continúa sin inmunoreactividad. De esta manera se comienza a observar un débil marcaje para PSA en las capas germinativas secundarias, es decir en la ZSV (Seki y Arai, 1991). En el tubo neural de rata, el cambio de células madre PSA⁻ a progenitores PSA⁺, ocurre entre los días 10 y 14 de la etapa embrionaria (revisado por Bonfanti, 2006).

La expresión de PSA-NCAM está altamente asociada a progenitores de células gliales durante el desarrollo, por ejemplo, *in vivo*, se han observado progenitores PSA⁺ en la ZSV, que migran al cuerpo calloso y a la corteza, y que se diferencian en oligodendrocitos y astrocitos respectivamente (Marshall y

Goldman, 2002). Posteriormente, en la etapa adulta, la progenie de las CMN que se dividen en la ZSV originan principalmente neuroblastos PSA-NCAM⁺ (Ponti y col., 2006).

3. Función de PSA-NCAM en la migración celular

Las moléculas de adhesión son esenciales en los procesos de migración celular. PSA-NCAM en particular presenta propiedades que le permiten a la célula mantener una dinámica alterna de adhesión-liberación, lo cual es posible gracias a una disminución de la interacción membrana-membrana producto de la presencia de PSA en la molécula de NCAM. En efecto, la alta densidad de cargas negativas en la molécula de PSA y la hidratación del polímero, trae como consecuencia impedimentos estéricos, que disminuyen la interacción entre las moléculas de NCAM favoreciendo los procesos de migración (revisado por Bonfanti, 2006). En las primeras etapas del desarrollo los procesos migratorios no parecen ser estrictamente dependientes de PSA-NCAM, ya sea para la migración radial como para la migración tangencial. En efecto, en ratones deficientes de PSA (Chazal y col., 2000) y NCAM ambos tipos de migración se pueden llevar a cabo normalmente aunque, se altera un poco la morfología celular. Por el contrario, en el SNC maduro, la migración tangencial sí es altamente dependiente de PSA-NCAM (Hu, 2000). En la ZSV y a lo largo de la VMR, los neuroblastos migran mediante un mecanismo que es independiente de los astrocitos que conforman los tubos gliales. Esta independencia se ha relacionado con el hecho de que estos progenitores son PSA-NCAM⁺ lo que les permite migrar mediante un mecanismo de migración en cadena (Ponti y col., 2006). Al llegar al BO, la pérdida de la expresión de PSA en estos progenitores coincide con la diferenciación de estas células (revisado por Bonfanti, 2006). Se piensa entonces que PSA, además de su papel en la migración celular pudiese bloquear los eventos celulares contacto-dependientes que pudieran desencadenar anticipadamente la diferenciación de los neuroblastos en la ZSV y en la VMR (Petridis y col., 2004).

En el hipocampo, aunque los progenitores de células granulares del GD presentan una disposición diferente a la presente en la ZSV, éstos también expresan PSA-NCAM. Por otro lado, los astrocitos de la ZSG, son inmunonegativos para PSA (Seri y col., 2004). Se ha observado igualmente, un marcaje para

PSA-NCAM en células no granulares de la fimbria y el hilus involucradas en los procesos de plasticidad estructural del hipocampo (Nacher y col., 2002).

ANTECEDENTES

De manera general, el estudio en profundidad de la biología de las CMN y de los PN y en particular de los factores que regulan la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de estas células, es indispensable para el desarrollo exitoso de estrategias terapéuticas, por lo que esta área de investigación constituye una de las más activas en el campo de la biología del desarrollo y en el campo de la regeneración y reparación del sistema nervioso.

En la regulación de la neurogénesis intervienen diversos factores que actúan durante el desarrollo y que persisten en los nichos neurogénicos en la etapa adulta. Estos factores pueden ser clasificados en factores de contacto, presentes en la superficie de las células, como por ejemplo PSA-NCAM, o presentes en la matriz extracelular, y en factores difusibles que incluyen factores de crecimiento como las proteínas morfogénicas óseas (BMP), el factor de crecimiento tipo insulínico (IGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) entre otros. Además de los factores de crecimiento, otras moléculas están cobrando interés en la actualidad, este es el caso de neurotransmisores, en particular del ácido γ -aminobutírico (GABA) y de los neuroesteroides, que constituyen el punto central de interés del presente proyecto.

I. GABA

1. El GABA y sus receptores

El GABA es un aminoácido formado a partir del glutamato, en una reacción catalizada por la glutamo descarboxilasa (GAD) y actúa como neurotransmisor en el SNC adulto, generando corrientes postsinápticas inhibitorias (Randall y col., 1998). Ejerce su acción a través de dos clases principales de

receptores: receptores GABA tipo A (GABA_A) y receptores GABA tipo B (GABA_B). Un tercer tipo de receptor ha sido identificado como tipo C (GABA_C) (Ashok y Ticku, 1999). El receptor GABA_A es el que está más ampliamente distribuido y funciona como un receptor ionotrópico, que presenta un canal selectivo para el Cl⁻. El receptor GABA_C también es un receptor ionotrópico asociado a un canal de Cl⁻ pero con una farmacología muy distinta a la de los receptores GABA_A por lo que ha sido clasificado en un grupo aparte (Chew y Gallo, 1998). El receptor GABA_B en cambio, funciona de manera metabotrópica, y se encuentra acoplado a proteínas G, cuya activación modula la apertura de canales de Ca⁺² o K⁺ (Bowery, 1993). El receptor GABA_A está formado por 5 subunidades. En los mamíferos se han descrito las subunidades α_1 a α_6 , β_1 a β_3 , γ_1 a γ_3 , δ , ϵ , ρ_1 a ρ_3 y π . Debido a la gran diversidad de subunidades y a la estructura pentaméricas del receptor, en teoría habría más de medio millón de combinaciones y por lo tanto de receptores posibles. En la naturaleza, aunque el número de combinaciones observadas es elevado es sin embargo mucho menor que lo que teóricamente se pudiese esperar. La diversidad de asociaciones de subunidades, permite la formación de receptores GABA_A con propiedades farmacológicas diferentes (Hevers y Lüddens, 1998; Ashok y Ticku, 1999). La distribución de estas subunidades en las distintas estructuras cerebrales es muy variable (revisado por Ashok y Ticku, 1999). También se ha visto que la expresión de las subunidades puede variar durante las distintas etapas del desarrollo (Laurie y col., 1992).

2. El GABA como modulador de la neurogénesis

En el SNC adulto el GABA genera potenciales sinápticos inhibitorios, que reducen la probabilidad de que se generen potenciales de acción en la célula postsináptica (Randall y col., 1998) y esto lo hace por medio de sus receptores GABA_A y GABA_B (Leinekugel y col., 1999). Por lo general, la concentración de Cl⁻ intracelular es más baja que la extracelular, ocasionando que el potencial de equilibrio de este ion sea más negativo que el potencial de reposo de la membrana (Randall y col., 1998), de tal manera que cuando el GABA se une al receptor GABA_A, y se aumenta la conductancia al Cl⁻ se

produce una entrada del ion a favor de su gradiente electroquímico (Leinekugel y col., 1999). Esto trae como consecuencia que el potencial de membrana se acerque al potencial de equilibrio del Cl^- y por ende que haya una hiperpolarización. El potencial de membrana se aleja del umbral de excitación por lo que se requiere de una estimulación de mayor intensidad para alcanzar el umbral y que se generen potenciales de acción (Randall y col., 1998). El efecto es similar a través de los receptores GABA_B , sólo que en este caso se activan canales de K^+ vía proteínas G (Leinekugel y col., 1999), causando que dicho ion fluya al exterior a favor de su gradiente electroquímico, dejando el interior celular más negativo e hiperpolarizando la célula (Randall y col., 1998).

Sin embargo, en el SNC en desarrollo, la situación es muy diferente ya que el GABA ejerce un efecto excitatorio, el cual no está asociado con la neurotransmisión sino con efectos morfogénicos por vía de modular la proliferación, migración y diferenciación de los PN (Lauder, 1993). En este caso, la acción del GABA sobre el receptor GABA_A , provoca la despolarización de los progenitores (Leinekugel y col., 1999). Esto se debe a la elevada concentración intracelular de Cl^- en estas células inmaduras (Zhang y col., 1991), lo que hace que el potencial de equilibrio del Cl^- sea menos negativo que el potencial de membrana en reposo, de tal manera que el aumento en la conductancia de Cl^- por acción del GABA sobre sus receptores GABA_A , causa la salida de este ion y la despolarización de la célula (Randall y col., 1998). Las razones por las cuales se encuentran elevadas las concentraciones intracelulares de Cl^- en estas células neonatales, se debe a la inmadurez de los sistemas homeostáticos que regulan la concentración de este ion (revisado por Leinekugel y col., 1999).

Los efectos morfogénicos del GABA durante el desarrollo se explican precisamente por la despolarización producida por el GABA, que trae como consecuencia la activación de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, lo que aumenta la concentración de calcio en el citosol desencadenando una serie de respuestas intracelulares (Leinekugel y col., 1999) que modulan la proliferación (Lo Turco y col., 1995), la migración celular y el crecimiento de las prolongaciones neurales (revisado por Lauder, 1993).

En etapas postnatales, Wang y colaboradores, en 2003, observaron que PN de la ZSV y de la VMR, producían GABA y expresaban el receptor GABA_A. Por otra parte, el GABA fue capaz de despolarizar estas células, lo que sugiere un control autocrino/paracrino del GABA en procesos que regulan la migración y la proliferación celular. Por ejemplo, se ha visto que estas señales GABAérgicas disminuyen la migración de los neuroblastos en la ZSV y en la VMR (Bolteus y Bordey, 2004) y que además disminuyen la proliferación de las células tipo B (astrocitos) (Bordey, 2006). Adicionalmente en progenitores PSA-NCAM⁺ purificados, se describió la expresión de distintas subunidades del receptor GABA_A y se demostró que el GABA incrementa la proliferación de estas células de manera dosis-dependiente, y de forma específica vía receptores GABA_A (Gago y col., 2004).

No existe un consenso sobre el efecto del GABA, de hecho en otros modelos celulares se ha reportado también un efecto inhibitorio sobre la proliferación (Nguyen y col., 2001; Lo Turco y col., 1995). Estas diferencias pudieran explicarse por el grado de compromiso de los PN hacia un determinado linaje celular. Sin embargo, en conclusión, se podría decir que los PN expresan receptores GABA_A y que el GABA modula la proliferación de estas células, ya sea de manera inhibitoria o estimuladora, dependiendo del tipo de progenitor estudiado (Gago y col., 2004).

II. NEUROESTEROIDES

1. Biosíntesis de los neuroesteroides

Los esteroides son producidos por glándulas endocrinas esteroideogénicas, en particular por las gónadas y las glándulas adrenales. Estos compuestos son transportados por la sangre hasta el SNC y periférico, en donde fácilmente pueden atravesar la barrera hematoencefálica, siempre y cuando no estén en su forma conjugada con sulfatos (Schumacher y col., 2000). Sin embargo, se ha visto que los esteroides pueden ser sintetizados *de novo*, a partir del colesterol, en el SNC y en los nervios periféricos, estos esteroides han sido denominados neuroesteroides (NE), término que sólo hace alusión al sitio en

donde se sintetizan, es decir, el sistema nervioso (Robel y Baulieu, 1994). De hecho muchas de las enzimas clásicas de la biosíntesis de los esteroides, que se expresan en las glándulas periféricas, se encuentran también en el sistema nervioso, aunque pueden presentarse con algunas modificaciones (Compagnone y Mellon, 2000).

El primer paso en la biosíntesis de los NE, es la formación de pregnenolona (PREG) a partir de colesterol, reacción catalizada por el citocromo P450_{scc}, que se localiza en la membrana interna mitocondrial, y el cual remueve 6 carbonos de la molécula de colesterol. La PREG formada pasa luego de la mitocondria al retículo endoplásmico, en donde es convertida a progesterona (PROG) por la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/Δ⁵-Δ⁴ isomerasa (3β-HSD). La PROG es reducida por la 5α-reductasa, convirtiéndose en 5α-dihidroprogesterona (5α-DHP). Por último, a partir de ésta se forma la 3α,5α-tetrahidroprogesterona (3α,5α-THP) ó alopregnanolona, gracias a la acción de la 3α-hidroxiesteroide oxidoreductasa (3α-HSOR). Se puede formar también el isómero 3β (3β,5α-THP), gracias a la 3β-hidroxiesteroide oxidoreductasa (3β-HSOR) (Schumacher y col., 2000).

En el cerebro se encuentran además, enzimas del grupo de las sulfotransferasas y sulfhidrolasas, que convierten los esteroides clásicos en una variedad de componentes que también son neuroactivos (Compagnone y Mellon, 2000).

2. Mecanismos de acción de los neuroesteroides

Los NE ejercen sus efectos de manera autocrina/paracrina, a bajas concentraciones, generalmente en el orden del nanomolar (Schumacher y col., 2000). Sus acciones pueden ser genómicas y no genómicas (Schumacher y col., 2000; Compagnone y Mellon, 2000). En el mecanismo genómico, los NE actúan regulando la transcripción de genes sensibles a hormonas. Cuando se unen a receptores intracelulares específicos, éstos interactúan con elementos que generalmente se encuentran en la región promotora de los genes (Schumacher y col., 2000). En el mecanismo no genómico los NE, actúan sobre

varios receptores para neurotransmisores en la membrana plasmática, como por ejemplo el receptor GABA_A y el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Compagnone y Mellon, 2000), entre otros.

La PROG o la 5 α -DHP, se unen al receptor intracelular específico actuando a través de un mecanismo geonómico. Cuando se forma el complejo ligando-receptor, se disocian las proteínas de choque térmico que estaban asociadas y el receptor es fosforilado. Una vez activado, interactúa con elementos de respuesta específicos de la PROG, los cuales se encuentran en la región promotora del gen blanco, activando su transcripción (El-Etr y col., 2000). Se ha descrito por ejemplo, que la PROG regula la expresión de los ARNms de las distintas subunidades del receptor GABA_A en el hipocampo de ratas hembras, siendo afectada la expresión de las subunidades α y γ , pero no la expresión de las subunidades β (revisado por, El-Etr y col., 2000). Por esta vía, la PROG es capaz de modular la actividad GABAérgica (El-Etr y col., 2000).

Además de los efectos a largo plazo mediados por receptores intracelulares, los esteroides pueden ejercer efectos rápidos actuando a nivel de receptores de membrana. Por ejemplo, el sulfato de PREG (SPREG) y la 3 α ,5 α -THP, ejercen sus efectos en el cerebro a través de mecanismos no genómicos, activando receptores para neurotransmisores o canales iónicos (El-Etr y col., 2000). El SPREG actúa como un modulador positivo del receptor NMDA y también se ha visto que inhibe la acción de canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes (revisado por Mellon, 2007). Por otro lado, uno de los ejemplos más documentados de la acción de los NE sobre receptores para neurotransmisores, es la capacidad de varios metabolitos de la PROG de modular procesos de neurotransmisión y de neurogénesis vía receptores GABA_A (Compagnone y Mellon, 2000). La actividad de estos receptores, es modulada por un cierto número de drogas psicotrópicas como las benzodiazepinas y los barbitúricos, el alcohol y también por los NE. Ciertos NE potencian el efecto del GABA aumentando el tiempo de apertura del canal de Cl⁻ (Lambert y col., 1996). El efecto de estos NE es muy potente porque de hecho concentraciones del nanomolar son suficientes para potenciar el efecto del GABA. Entre estos NE esta la 3 α ,5 α -THP y la

3 α ,5 β -THP, ésta última presente sobre todo en aves. El efecto de estos esteroides es altamente específico, sólo los isómeros 3 α son activos, en cambio la configuración α ó β en el carbono 5 (que determina la configuración 5 α o 5 β), no parece ser determinante (Lambert y col., 1996). Es interesante mencionar que la 3 α ,5 α -THP a altas concentraciones del orden del micromolar, se comporta como un agonista capaz de abrir el canal iónico en ausencia del GABA (Lambert y col., 1996).

Hosie y colaboradores, en el 2006, pudieron identificar dos sitios de unión específicos en los dominios transmembrana del receptor GABA_A, que median la potenciación y la activación directa del receptor provocada por los NE. Estos interactúan con el receptor en una cavidad formada por los dominios transmembrana de la subunidad α , potenciando las respuestas del GABA, y también se unen a residuos que se encuentran entre las subunidades α y β , provocando la activación directa del receptor. Ambos sitios son requeridos para la modulación del receptor por los NE, y además se conservan en los distintos tipos de receptores GABA_A.

3. Los neuroesteroides como moduladores de la neurogénesis

Debido al efecto de la 3 α ,5 α -THP sobre el receptor GABA_A, este NE es capaz de disminuir la excitabilidad neuronal y de generar una serie de efectos comportamentales, tales como efectos anticonvulsiantes, analgésicos, anestésicos, ansiolíticos y efectos sobre el estrés, el sueño, la depresión y la memoria (revisado por Schumacher y Robert, 2001). A parte de estos efectos comportamentales, se les han atribuido también a los NE efectos tróficos y de regeneración sobre el sistema nervioso (Schumacher y col., 2000). Uno de los NE implicado en este tipo de efectos es la 3 α ,5 α -THP.

Gago y colaboradores en 2004, mostraron que la PROG aumentaba la proliferación de los progenitores PSA-NCAM⁺ aislados de ratas recién nacidas. Se demostró que este efecto era mediado por un metabolito 5 α reducido de la PROG y no por la PROG directamente, ya que al inhibir la acción de la 5 α -reductasa el efecto era abolido por completo, y además la expresión del receptor de la PROG en estas

células resultó ser casi nula. Los investigadores demostraron que el metabolito involucrado era la $3\alpha,5\alpha$ -THP, el cual además puede ser sintetizado por estos progenitores (Gago y col., 2001). Por otra parte, el efecto estimulatrio de la $3\alpha,5\alpha$ -THP, el cual se da en el orden del nanomolar, fue abolido por la bicuculina, indicando que el efecto estaba mediado por receptores $GABA_A$. En este mismo trabajo, se demostró que los progenitores PSA-NCAM⁺ también eran capaces de sintetizar GABA y que expresaban las subunidades básicas del receptor $GABA_A$ requeridas tanto para la unión de los NEs como para la unión del GABA. Los investigadores mostraron también que el GABA era capaz de incrementar la proliferación de las células progenitoras, efecto que fue igualmente sensible a la bicuculina. En conclusión, los progenitores PSA-NCAM⁺ aislados de ratas recién nacidas son capaces de sintetizar tanto GABA como $3\alpha,5\alpha$ -THP, y que éstos actuando vía receptores $GABA_A$ pueden modular de manera autocrina y/o paracrina la proliferación de estas células.

Recientemente, Wang y colaboradores, en 2005, demostraron en células con capacidad neurogénica aisladas del hipocampo, que la $3\alpha,5\alpha$ -THP estimulaba la proliferación celular vía receptores $GABA_A$, confirmando los resultados obtenidos por Gago y colaboradores (2004). Wang y colaboradores, también demostraron que la activación de los receptores $GABA_A$ producía la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes y por ende un influjo rápido del ion. Estos investigadores proponen, que este aumento en la concentración de calcio intracelular activa mecanismos calcio-dependientes de la mitosis, lo que explicaría el aumento en la proliferación celular.

De manera general, estos resultados muestran que la proliferación celular de ciertos PN puede estar modulada de manera autocrina y/o paracrina por la $3\alpha,5\alpha$ -THP y por el GABA, actuando vía receptores $GABA_A$ (Fig. 3). Estos resultados fueron sin embargo, obtenidos *in vitro* en modelos de células aisladas y resulta de particular interés determinar si en condiciones *in vivo* los NE, y en particular la $3\alpha,5\alpha$ -THP pueden modular ciertos aspectos de la biología de los PN, como por ejemplo la proliferación celular. Así como se explicó anteriormente, se ha demostrado que el GABA actuando vía

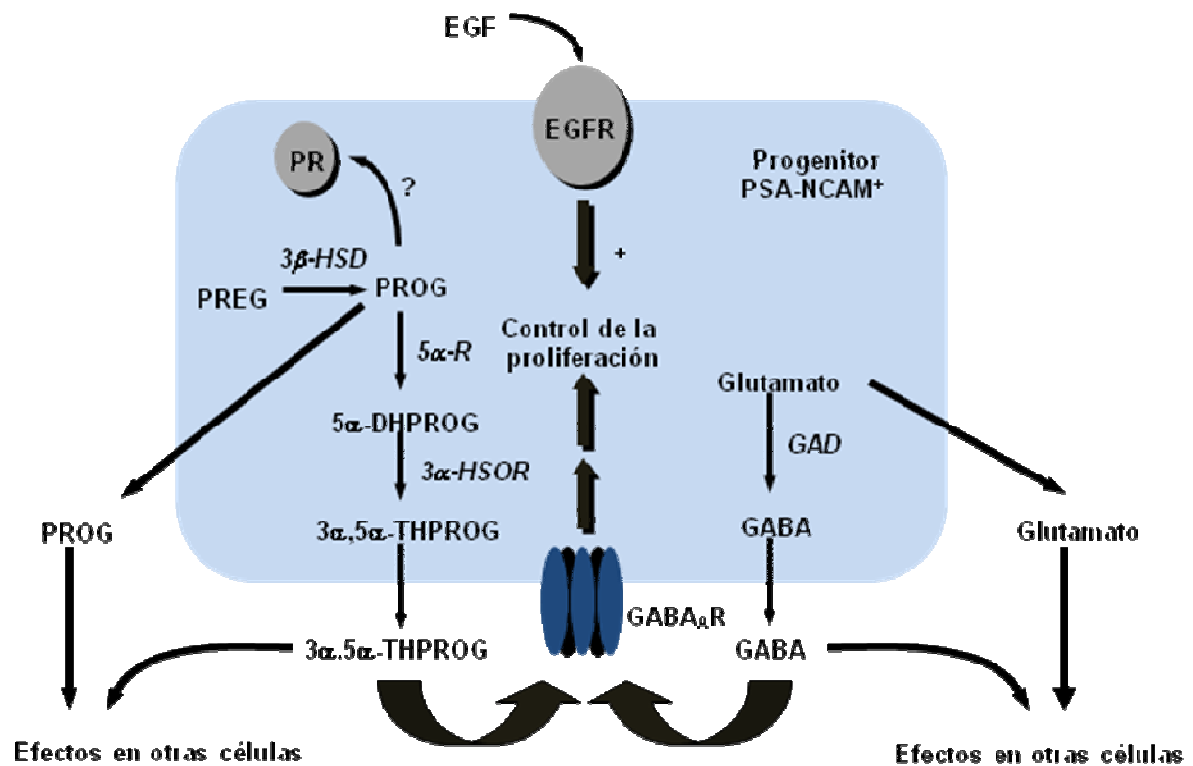


Figura 3. Factores que regulan la proliferación de progenitores PSA-NCAM⁺ aislados de ratas recién nacidas. Los factores de crecimiento, los aminoácidos como el GABA y los neuroesteroides como la 3α, 5α- THP, son factores que participan en la regulación de la proliferación de estos progenitores. El EGF ejerce su importante efecto mitogénico sobre los progenitores PSA-NCAM⁺. Estas células expresan igualmente receptores GABA_A y sintetizan GABA, el cual es capaz de estimular la proliferación celular. Por otro lado, los progenitores PSA-NCAM⁺ también sintetizan 3α, 5α- THP, la cual a concentraciones del orden del nanomolar, incrementa la proliferación de los mismos, vía receptores GABA_A, muy probablemente potenciando el efecto del GABA. De esta manera, el GABA y la 3α, 5α- THP, *in vitro*, pueden modular la proliferación de estos progenitores neurales de forma autocrina y/o paracrina, actuando a través de receptores GABA_A (modificado de Gago y col., 2004).

receptores GABA_A, es capaz *in vivo* de modular la proliferación y migración de células de la ZSV y de la VMR (Bolteus y Bordey, 2004; Bordey, 2006), por lo que potencialmente la 3 α ,5 α -THP pudiese también ejercer efectos moduladores sobre los PN en condiciones *in vivo*, sin embargo, estos posibles efectos deben ser demostrados y caracterizados, y es lo que motivó la realización del presente trabajo.

OBJETIVOS

El presente trabajo se enmarca en un proyecto más amplio que tiene como objetivo general el de establecer el efecto de la $3\alpha,5\alpha$ -THP, un metabolito neuroactivo de la progesterona, en la proliferación, migración y supervivencia de los progenitores neurales *in vivo*, durante el desarrollo y en el individuo adulto. Como una de las aproximaciones experimentales se desarrolló el presente trabajo cuyo **objetivo general** fue el de aportar una evidencia anatómica de la posible participación de la $3\alpha,5\alpha$ -THP en el control de la biología de los progenitores neurales *in vivo* durante el desarrollo.

Los **objetivos específicos** del presente trabajo fueron:

1. Establecer la distribución de la 3α -HSOR, enzima responsable de la síntesis de la $3\alpha,5\alpha$ -THP, en el cerebro de rata durante el desarrollo embrionario y postnatal.
2. Determinar si existe una correlación entre la distribución de la 3α -HSOR y la distribución de los progenitores neurales que expresan PSA-NCAM.

MATERIALES Y MÉTODOS

En primer lugar, se realizó un estudio neuroanatómico del cerebro de rata durante el desarrollo embrionario y postnatal, utilizando para ello la tinción con hematoxilina y eosina (H/E), y en segundo lugar, se determinó por inmunofluorescencia la distribución de la 3 α -HSOR en el cerebro de rata durante el desarrollo embrionario y postnatal y se estableció si existe una correlación entre la expresión de esta enzima y los progenitores PSA-NCAM⁺.

I. RECOLECCION Y PROCESAMIENTO DE LOS CEREBROS

1. Animales

Se trabajó con ratas Sprague-Dawley mantenidas bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12h-12h, con acceso *ad libitum* al alimento y al agua. Se utilizaron embriones de 14, 17 y 20 días de gestación (E14, E17, E20) y ratas postnatales de 1, 4, 7, 12, 15 y 21 días de nacidas (P1, P4, P7, P12, P15 y P21).

Para la obtención de los embriones se realizaron apareamientos entre machos y hembras a primeras horas de la mañana y en oscuridad, por un período de 2 a 4 horas. Los animales estuvieron en oscuridad desde las últimas horas de la tarde del día anterior, para extender algunas horas el ciclo nocturno. Se consideró como día cero el día del apareamiento. Para la obtención de los animales postnatales, los apareamientos de machos y hembras se realizaron por tres días, conservando los ciclos normales de luz-oscuridad. En ambos casos se realizó un seguimiento continuo de las hembras, pesándolas 2 veces por semana.

2. Fijación del tejido

a) Fijación de los embriones

Las hembras gestantes fueron anestesiadas intraperitonealmente con una mezcla de ketamina (100mg/ml) y xilacina (relajante muscular, *Xilagal* al 2 %), en una proporción de 24 mg de ketamina por 100g de peso del animal, y 0,1 ml de xilacina por animal. Los embriones se disecaron, se lavaron en

buffer fosfato 0,1 M pH 7,2 (BP) y se sumergieron en una solución de paraformaldehído (PAF) al 4 % en BP a 4⁰C por dos días.

b) Fijación de los animales postnatales

Los animales postnatales se fijaron por perfusión intracardiaca. Para ello, éstos fueron anestesiados con ketamina (100mg/ml) por vía intraperitoneal en una proporción de 24 mg de ketamina por 100g de peso del animal. Posteriormente, los animales fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con un flujo constante mantenido por una bomba de perfusión. Se realizó primero un lavado perfundiendo con 20 ml de BP y luego se perfundió con PAF al 4% en BP. El volumen de fijador que se utilizó fue aproximadamente el doble en mililitros del peso del animal. Después de la perfusión, se disecaron los cerebros y se sumergieron en PAF al 4% en BP, por 1 hora, para la postfijación. Una parte de los cerebros, se sumergió luego en una solución de sacarosa al 15 % en BP, y se mantuvo a 4⁰C toda la noche. Estos cerebros fueron utilizados para realizar cortes congelados. Para ello, éstos se congelaron sumergiéndolos en isopentano a -70⁰C y luego se conservaron en papel de aluminio a la misma temperatura. La otra parte de los cerebros, se transfirió a BP después de la postfijación y se almacenaron a 4⁰C, hasta la realización de los cortes flotantes en vibratomo. Los cortes congelados fueron utilizados para las tinciones con hematoxilina-eosina y los cortes flotantes fueron utilizados para las inmunofluorescencias.

3. Cortes del tejido

a) Cortes en criostato

Se realizaron cortes sagitales de los cerebros congelados con un criostato LEICA modelo CM3050S, de 14 µm de espesor para los cerebros postnatales, y de 20 µm de espesor para los embriones. Los cortes fueron recolectados en láminas previamente gelatinizadas con una solución de gelatina al 0,5% y luego fueron almacenados a -70⁰C.

b) Cortes en vibratomo

Se realizaron cortes sagitales de los cerebros almacenados en BP a 4⁰C con un vibratomo LEICA modelo VT1000S, de 30 a 50 μm de espesor. Los cortes se almacenaron en placas de 96, 24 y 12 pozos en BP a 4⁰C.

II. ESTUDIO NEUROANATOMICO Y DISTRIBUCION DE LA 3α-HSOR

1. Coloración histológica con Hematoxilina y Eosina

Con los cortes de cerebro de rata congelados, se procedió a hacer la tinción con H/E para realizar el estudio neuroanatómico. Para ello, se rehidrataron los cortes en BP y se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente. Luego, se incubaron con la solución de hematoxilina por 1 minuto y se lavaron con agua corriente. Posteriormente, los cortes se incubaron en la solución de eosina por 3 minutos y se pasaron por una batería de alcoholes (70%, 70% y 100%). Finalmente, se sumergieron en un xilol primario y luego en xilol secundario por 5 minutos cada vez y se montaron con medio de montaje permanente MAR-TEX. Los resultados fueron observados con luz blanca con un microscopio invertido de fluorescencia axiovert 25, marca Zeiss y bajo una lupa estereoscópica marca Zeiss para obtener una visión de conjunto. Las imágenes fueron captadas con una cámara digital marca TUCSEN.

2. Inmunofluorescencia

a) Anticuerpos utilizados

Se utilizaron los anticuerpos primarios anti-3α-HSOR, anticuerpo policlonal hecho en conejo y el anticuerpo anti-PSA-NCAM, monoclonal, hecho en ratón, IgM de Chemicon MAB5324. El anticuerpo anti-3α-HSOR no es comercial. El anticuerpo anti-3α-HSOR se reveló con el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 488 de Interchim Molecular Probes, y el anticuerpo anti-PSA-NCAM se reveló con el anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón acoplado a rodamina de Chemicon.

Es importante mencionar que el anticuerpo anti-3 α -HSOR fue desarrollado en conejo contra la enzima purificada de hígado de rata (Penning y col., 1984; Smithgall y Penning, 1988). La efectividad y especificidad de este anticuerpo han sido demostradas en estudios bioquímicos e histológicos (Smithgall y Penning, 1988; Pawlowski y col., 1991; Jez y col., 1996), inclusive en el SNC (Patte-Mensah y col., 2004).

b) Estandarización del protocolo

Se realizaron varias pruebas para estandarizar algunos parámetros de la metodología como las diluciones de los anticuerpos, los tiempos de incubación, el volumen de anticuerpo para la incubación y el tipo de placa para la incubación.

En cuanto a las diluciones, se probaron dos diluciones diferentes para el anticuerpo anti-3 α -HSOR, una dilución 1/500 y otra 1/700. No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a los resultados, por lo que se decidió trabajar con la dilución 1/700. Para los otros anticuerpos no fue necesario la estandarización de las diluciones, debido a que ya se disponía de las diluciones óptimas. Los anticuerpos, tanto primarios como secundarios, fueron diluidos en PBS con 0,3% de triton y 0,2% de gelatina.

Con respecto a los tiempos de incubación, la incubación de los cortes flotantes con el anticuerpo anti-3 α -HSOR se realizó durante toda la noche, obteniéndose buenos resultados. Para el anticuerpo anti-PSA-NCAM se realizaron dos pruebas con tiempos distintos, una incubación durante toda la noche y otra durante 2 horas. Con ambas se pudo obtener muy buenos resultados, por lo que se decidió utilizar el tiempo de incubación de 2 horas, a modo de acortar el tiempo total del protocolo.

También se probaron diferentes volúmenes de incubación para los anticuerpos primarios y secundarios. Se realizaron incubaciones con volúmenes de 300, 400 y 500 μ l para cada anticuerpo. Aunque no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al marcaje, se decidió utilizar un volumen de 500 μ l ya que facilitaba la manipulación de los cortes flotantes y se favorecía la preservación de los

mismos. Así mismo, se probaron placas de 12 y de 24 pozos para realizar las incubaciones. Se escogieron las placas de 12 pozos para facilitar la manipulación de los cortes.

c) Protocolo empleado

El protocolo general utilizado para las inmunofluorescencias se describe a continuación. Todas las incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente con agitación continua y todos los anticuerpos fueron preparados en PBS con 0,3% triton X-100 (PBST) con 0,2% de gelatina.

- Los cortes seleccionados se incubaron 1 hora con suero normal de cabra (*normal goat serum*: NGS) al 5 % en PBS con 0,3% de triton X-100 (PBST) y 0,2% de gelatina.
- Luego se aspiró el NGS.
- Se incubaron los cortes con el anticuerpo primario anti-3 α -HSOR a una dilución de 1/700 durante toda la noche.
- Al día siguiente, los cortes se lavaron 3 veces con BP por 5 min cada vez.
- Luego, los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario anti-PSA-NCAM a una dilución de 1/400 por 2 horas.
- Los cortes se lavaron nuevamente 3 veces con BP por 5 min cada vez.
- Posteriormente, los cortes se incubaron con una mezcla de los anticuerpos secundarios respectivos por 2 horas. Ambos anticuerpos se utilizaron con una dilución de 1/100.
- Los cortes se lavaron 3 veces con BP por 5 min cada vez.
- Por último, se incubaron los cortes con 0,1 μ g/ml de 4',6-diamidina-2'-fenilindol dihidrocloruro (DAPI) por 30 min para marcar todos los núcleos de las células.
- Se realizó un último lavado 3 veces con BP por 5 min cada vez.
- Luego, los cortes se montaron en láminas previamente gelatinizadas, se dejaron secar y se montaron con un medio de montaje para fluorescencia (Fluoromont-G)
- Finalmente, las láminas se almacenaron a 4°C protegidas de la luz.

Los resultados fueron analizados utilizando un microscopio de epifluorescencia. Las imágenes fueron captadas con una cámara digital, marca TUCSEN y con confocal utilizando un microscopio confocal marca Zeiss.

d) Controles

En cada prueba de inmunofluorescencia, se realizaron controles negativos, en los que se obvió la incubación con los anticuerpos primarios. En estos controles, como era de esperarse, no se observó marcaje ni para la 3 α -HSOR, ni para PSA-NCAM, lo que comprueba que los anticuerpos secundarios no producen, en este material, marcajes inespecíficos.

RESULTADOS

I. DESCRIPCIÓN NEUROANATOMICA DEL CEREBRO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y POSTNATAL

1. Descripción neuroanatómica del cerebro de rata durante el desarrollo embrionario

En E14 el telencéfalo, mesencéfalo y rombéncefalo presentan una morfología sencilla y un parénquima nervioso poco desarrollado (Fig.4A).

El telencéfalo o cerebro anterior de E14, está constituido por el neuroepitelio cortical, las eminencias gangliónicas lateral y medial, y el neuroepitelio olfatorio (Fig.4B). Además, el ventrículo lateral se observa como una cavidad bastante amplia (Fig.4B). Por otro lado, el neuroepitelio cortical, está formado por tan sólo 2 capas; la ZV, que se extiende por toda la pared del ventrículo, y más externamente la preplaca (PP) (Fig.5A).

En E17, el cerebro presenta una morfología más compleja y ya se empiezan a distinguir prácticamente todas las estructuras del telencéfalo. El cerebro posterior en cambio no presenta aun una morfología muy definida (Fig.4C). En el telencéfalo, se puede observar claramente la neocorteza, el BO, las EG y el hipocampo. A esta edad, el ventrículo lateral se observa aun bastante amplio (Fig.4D).

En la neocorteza de E17 se pueden distinguir las mismas capas que se observan en el neuroepitelio cortical de E14, pero además se puede observar la aparición de 4 nuevas capas, la ZSV, la cual se origina a partir de la ZV, la placa cortical (PC), subyacente a la ZM, la subplaca (SP), que se encuentra por debajo de la PC y la zona intermedia (ZI) (Fig.5B). La ZV nuevamente, se observa revistiendo toda la pared del ventrículo y se distingue fácilmente por que se observa como una capa de color violeta intenso alrededor del ventrículo, producto de la tinción de los núcleos con hematoxilina y de la alta densidad de células (Fig.4D).

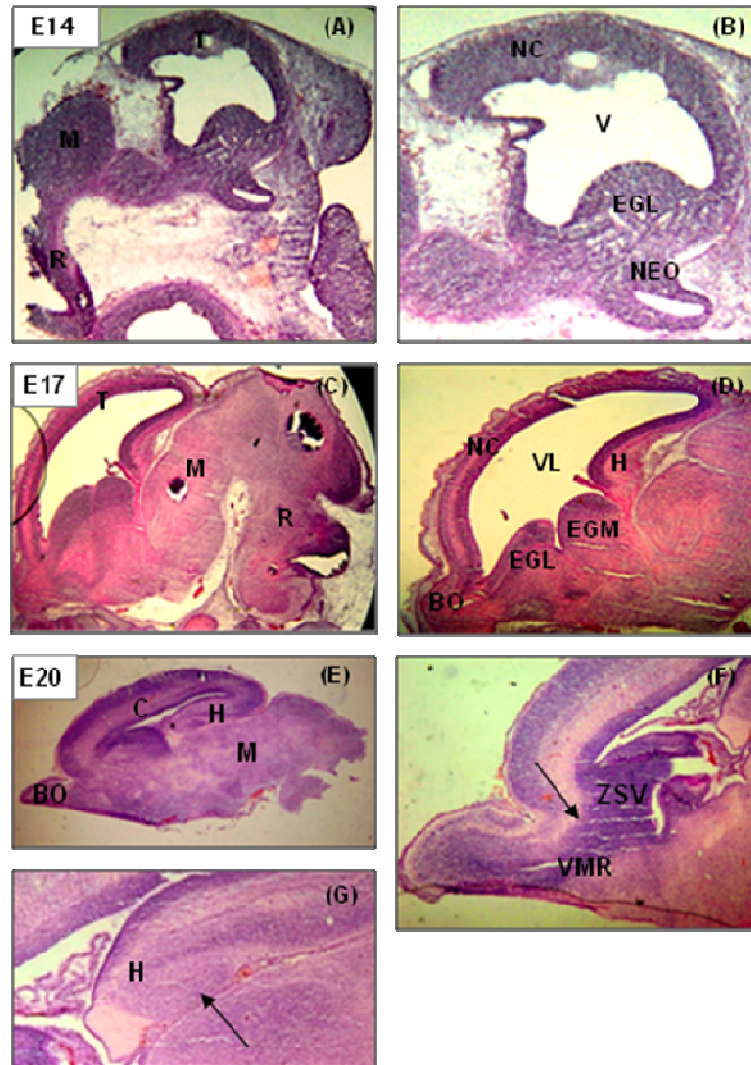


Figura 4. Tinción con hematoxilina y eosina de cortes sagitales de cerebro de rata durante el desarrollo embrionario. Fotografías tomadas utilizando una lupa estereoscópica. (A y B) Cerebro en desarrollo de E14. (A) Se observan el telencéfalo (T), el mesencéfalo (M) y parte del rombencéfalo (R). (B) Acercamiento del telencéfalo. Se observa en desarrollo la eminencia gangliónica lateral (EGL), el neuroepitelio cortical (NC) y el neuroepitelio olfatorio (NEO) Nótese lo amplio del ventrículo lateral (VL). (C y D) Cerebro en desarrollo de E17. (C) Se observan el T, el M y el R. A E17 ya se distingue claramente la estructura de los hemisferios cerebrales. (D) Acercamiento del T. Se observan las EGL, la eminencia gangliónica medial (EGM), el neuroepitelio cortical (NC), el bulbo olfatorio (BO) y el hipocampo (H). Nótese, el marcaje con hematoxilina (violeta oscuro) de la ZV, la cual bordea toda la pared del VL. (E, F y G) Cerebro en desarrollo de E20. (E) Visión general. Se observa un mayor desarrollo de las estructuras telencefálicas. La corteza (C) ha aumentado su tamaño y el VL se ha reducido considerablemente. (F) Acercamiento de la región rostral del telencéfalo. Se observa la zona subventricular (ZSV) y la vía de migración rostral (VMR) que se extiende hasta los BO. La ZSV, a esta edad, comienza a restringirse hacia la parte anterior del VL y comienza a formarse la VMR. (G) Acercamiento del hipocampo (H). En este momento del desarrollo no se ha formado aun el giro dentado del hipocampo. Aumentos: (A) 20x, (B) 32x, (C) 20x, (D) 32x, (E) 18x, (F) 25x, (G) 36x.

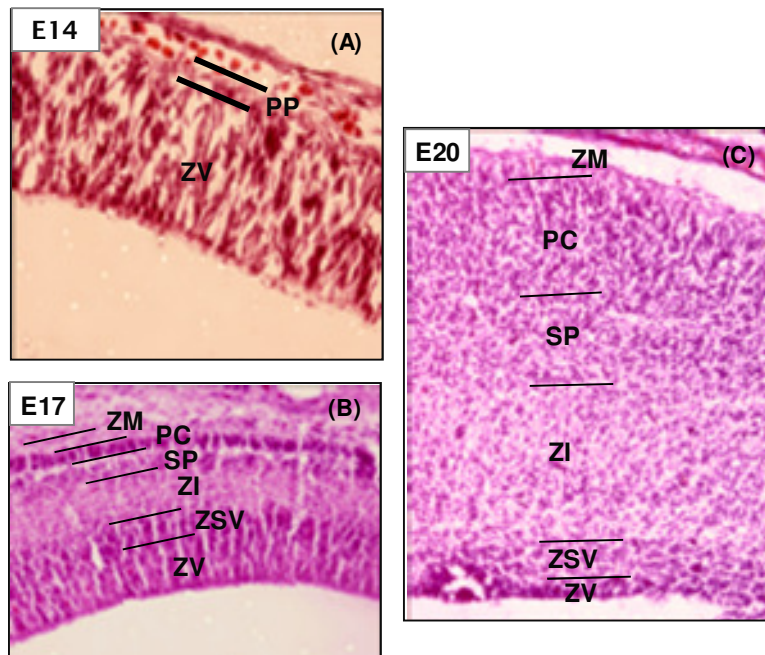


Figura 5. Desarrollo embrionario de la neocorteza. Fotografías tomadas de los cortes sagitales teñidos con hematoxilina y eosina de la figura 4, utilizando un microscopio óptico. **(A)** En el neuroepitelio cortical de E14 se distinguen 2 capas: la zona ventricular (ZV) (zona neurogénica) y una capa mas externa, denominada preplaca (PP). **(B)** En E17, el neuroepitelio cortical está conformado, de la capa mas externa a la mas interna, por: la zona marginal (ZM), la placa cortical (PC), la subplaca (SP), la zona intermedia (ZI), la zona subventricular (ZSV) (capa germinativa secundaria) y la zona ventricular (ZV). Esta última se ha reducido considerablemente. **(C)** En E20, se observan las mismas capas corticales que en E17. Sin embargo, la ZI, la SP y la PC han aumentado en grosor, mientras que la ZV casi ha desaparecido. En todas las fotografías las líneas muestran el límite aproximado que separa cada capa. Aumentos: (A) 40x, (B) 20x y (C) 20x.

En E20, el desarrollo del telencéfalo se observa muy avanzado. Se puede notar el gran desarrollo del parénquima cortical y la reducción de la cavidad ventricular, así como también el desarrollo del hipocampo y del BO (Fig.4E). Sin embargo, en el hipocampo, aun no se puede distinguir con claridad la formación del GD (Fig.4G). Para este estadio embrionario, ya se puede observar la aparición de la VMR, la cual surge de la ZSV y se extiende hasta el BO (Fig.4F).

En E20, la neocorteza continua presentando las mismas capas que se observan en E17 (Fig.5C), sin embargo, existen algunas diferencias. La ZV, se ha reducido considerablemente observándose como una capa delgada de células que reviste el VL. La ZSV, por el contrario se observa más desarrollada, al igual que la ZI, la SP y la PC (Fig.5C).

2. Descripción neuroanatómica del cerebro de rata durante el desarrollo postnatal

Durante el período postnatal se observa un desarrollo progresivo de las estructuras cerebrales y en general de todo el parénquima nervioso hasta alcanzar en P21 una organización anatómica muy similar a la observada en el adulto (Figs.6 y 7).

Con respecto a las zonas neurogénicas, es interesante mencionar que la ZSV y la VMR pueden distinguirse muy claramente. Estas se encontraban ya formadas justo antes del nacimiento. Se puede notar que en P1 y P4, estas zonas están conformadas por una gran cantidad de células (Figs.6B y 6E). Por otra parte, a medida que el desarrollo avanza se observa una reducción considerable en el número de células que conforman estas estructuras (Figs.6 y 7). De igual forma, durante las edades postnatales tempranas se observa que el GD y el cuerno de Ammon están conformados por una gran cantidad de células (Figs.6C y 6F), pero al igual que en la ZSV y en la VMR, éstos disminuyen de tamaño en las etapas postnatales más avanzadas (Figs.6 y 7). Por otro lado, en las primeras edades postnatales, no se distinguen aun las capas que conforman el BO y el cerebelo. Estas se van desarrollando conforme avanza el desarrollo postnatal (Figs.6 y 7).

También se puede observar que el crecimiento de la corteza sigue una dirección antero-posterior, mientras el rombencéfalo queda restringido en una posición postero-ventral (Figs.6 y 7).

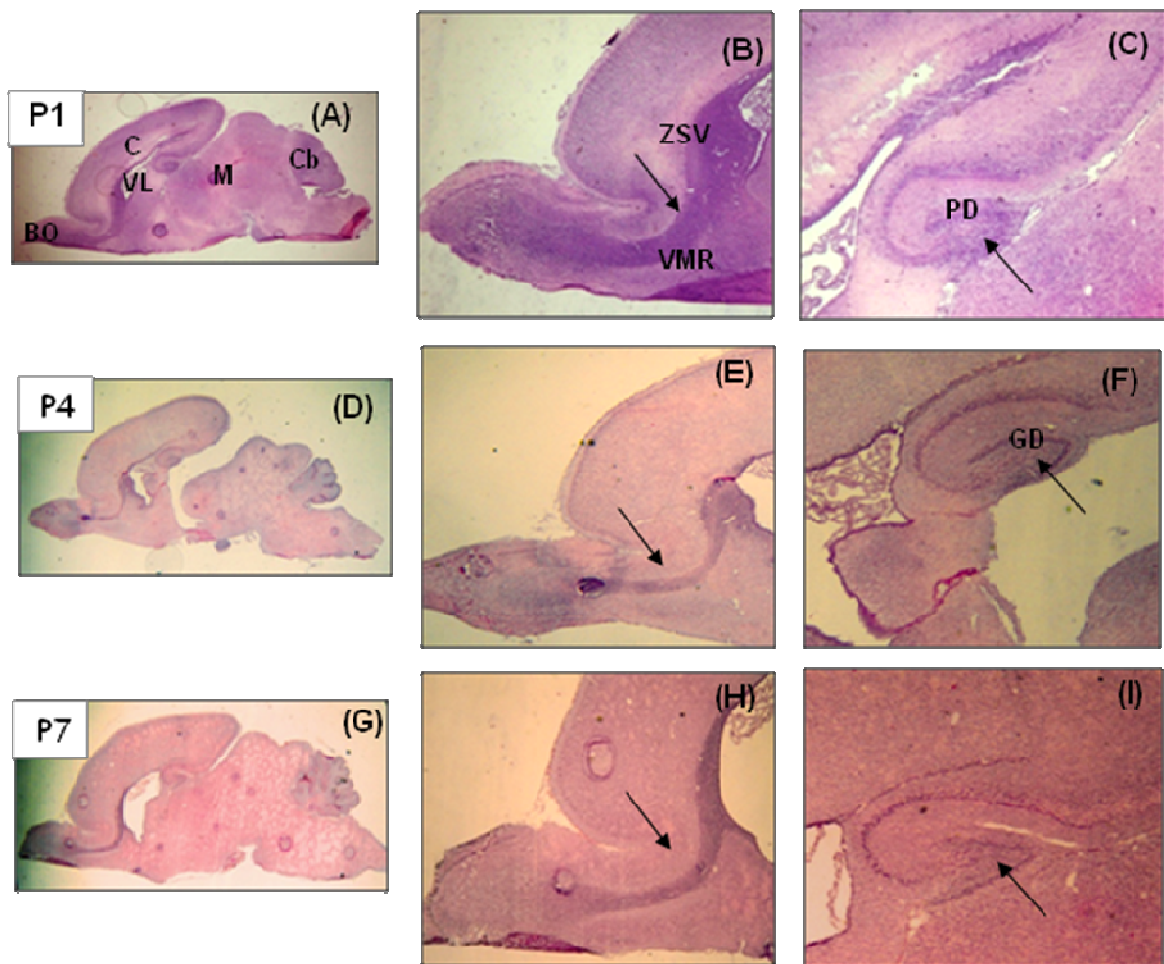


Figura 6. Tinción con hematoxilina y eosina de cortes sagitales de cerebro de rata durante la primera semana postnatal. Fotografías tomadas utilizando una lupa estereoscópica. (A, D y G) Visión general del cerebro de P1, P4 y P7, respectivamente. Nótese el crecimiento progresivo de la corteza (C), del cerebelo (Cb) y del bulbo olfatorio (BO) y la reducción del mesencéfalo (M) y del ventrículo lateral (VL). (B, E y H) Acercamiento de la zona subventricular (ZSV) y de la vía de migración rostral (VMR) a P1, P4 y P7. Se observa la reducción de la ZSV y de la VMR (flecha) a medida que avanza el desarrollo. (C, F e I) Acercamiento del hipocampo a P1, P4 y P7. En P1, se observa una alta densidad de células que conforman el polo dentado (PD) (flecha). Luego, se observan las células organizadas en el giro dentado (GD), el cual va reduciendo su tamaño durante este período del desarrollo postnatal. Aumentos: (A, D y G) 10x, el resto de las fotografías a 32x.

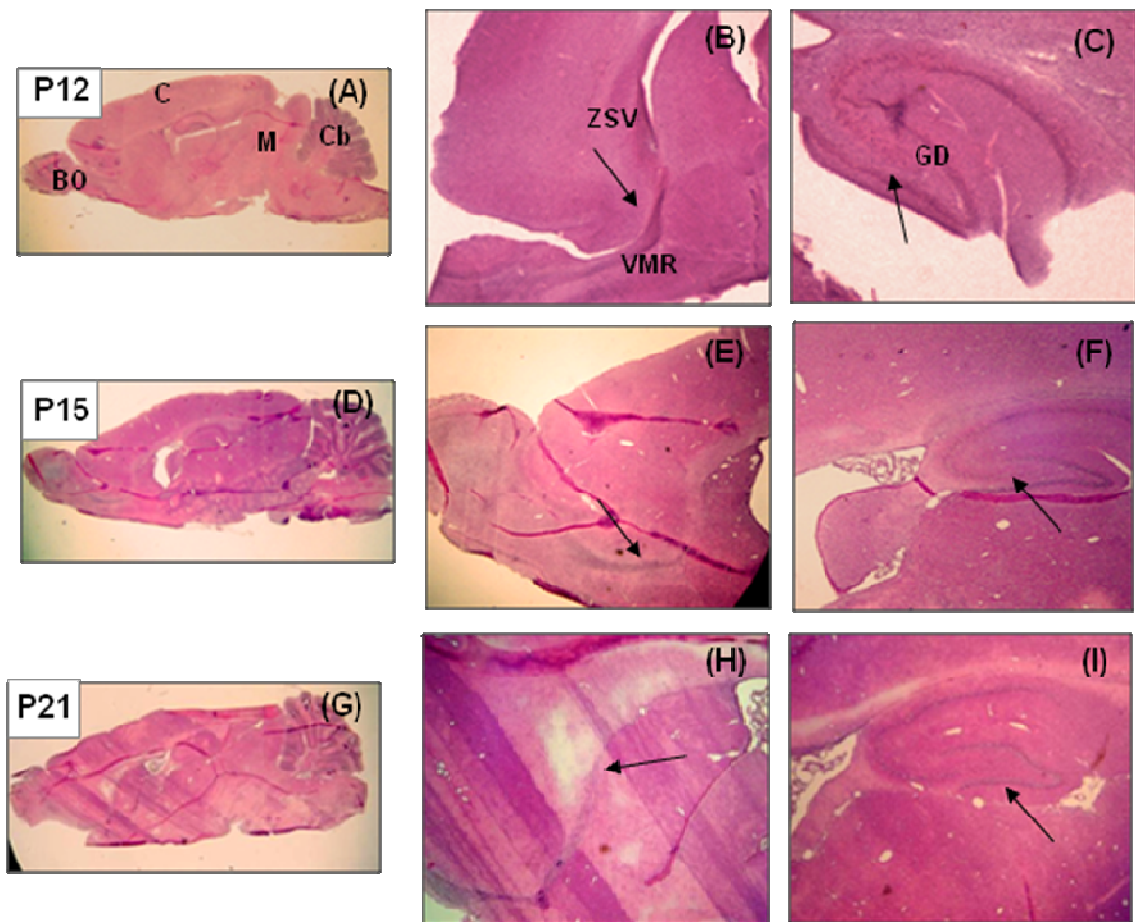


Figura 7. Tinción con hematoxilina y eosina de cortes sagitales de cerebro de rata durante la última semana postnatal. Fotografías tomadas utilizando una lupa estereoscópica. (A, D y G) Visión general del cerebro de P12, P15 y P21, respectivamente. Nótese el crecimiento progresivo de la corteza (C), del cerebelo (Cb) y del bulbo olfatorio (BO) y la reducción del mesencéfalo (M) y del ventrículo lateral (VL). Para esta etapa ya se han formado todas las fisuras cerebelares (comparar con figura 6). (B, E y H) Acercamiento de la zona subventricular (ZSV) y de la vía de migración rostral (VMR) a P12, P15 y P21. Se observa la reducción de la ZSV y de la VMR (flecha) a medida que avanza el desarrollo. (C, F e I) Acercamiento del hipocampo a P12, P15 y P21. Se observan las células organizadas en el giro dentado GD (flecha), el cual continua reduciendo su tamaño durante este período del desarrollo postnatal. Aumentos: (A, D y G) 10x, (B, C y H) 36x, (E, F y I) 32x

II. DISTRIBUCION DE LA 3 α -HSOR EN EL CEREBRO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

1. Distribución de la 3 α -HSOR en embriones de 14 días

a) Neuroepitelio cortical

La 3 α -HSOR se expresa altamente en los cuerpos celulares que forman la ZV, la cual conforma prácticamente todo el neuroepitelio cortical (Fig.8A). Así mismo, se encontró inmunoreactividad para la enzima en una capa delgada de células hacia la región más externa de la neocorteza en la PP (Fig.8A). Ambas capas se pueden distinguir con cierta facilidad ya que, las células de la PP expresan altamente PSA-NCAM, a diferencia de las células de la ZV, las cuales se observan inmunonegativas para esta molécula (Figs.8B y 8C).

b) Neuroepitelio olfatorio

En el neuroepitelio olfatorio se encontró una alta expresión de la 3 α -HSOR (Fig.9A), pero una baja inmunoreactividad para PSA-NCAM (Fig.9B). El marcaje con el anticuerpo anti-3 α -HSOR es difuso, posiblemente por la gran densidad de células que conforman el neuroepitelio olfatorio (Figs.9A y 4B).

c) Eminencia gangliónica lateral

Se encontró una gran cantidad de células altamente inmunoreactivas para la 3 α -HSOR en la ZV y en la ZSV de la EGL (Fig.10A). Al igual que en el neuroepitelio cortical, estas células de la ZV no expresan PSA-NCAM, sin embargo se encontraron algunas células aisladas inmunopositivas para la molécula en esta zona (Figs.10B y 10C). Por otro lado, en la ZSV, se observa una gran cantidad de progenitores claramente PSA-NCAM⁺. Es interesante mencionar que no todas las células 3 α -HSOR⁺ que se observan en la ZSV expresan también PSA-NCAM (Figs.10D, 10E y 10F).

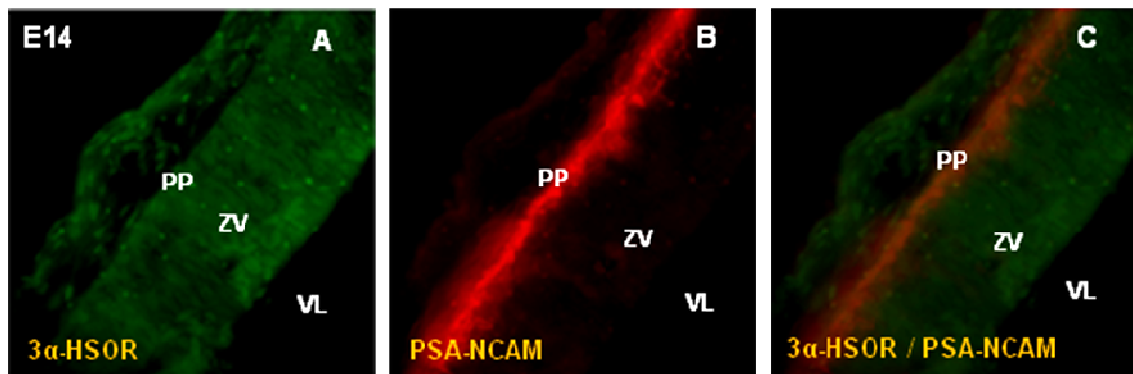


Figura 8. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en E14 a nivel del neuroepitelio cortical. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia. (A) Se observa una alta inmunoreactividad para la 3 α -HSOR en la zona ventricular (ZV) y en la preplaca (PP). Nótese, la intensidad del marcaje en los somas celulares que están bordeando la pared del ventrículo lateral (VL). (B) Se observa una alta expresión de PSA-NCAM en la PP. Las células de la ZV son inmunonegativas para PSA-NCAM. (C) Superposición de (A) y (B). Se observa que la enzima colocaliza con PSA-NCAM en las células de la PP. Aumentos: A, B y C 40x.

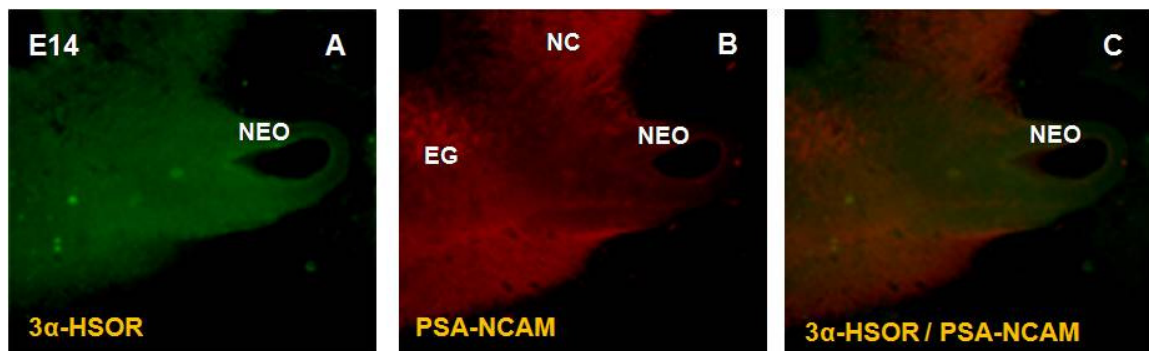


Figura 9. Inmunofluorescencia para la 3α-HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en E14 a nivel del neuroepitelio olfatorio (NEO). Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia. (A) La 3α-HSOR se expresa fuertemente en el NEO, el cual está conformado por una alta densidad de células. (B) El NEO presenta una baja expresión de PSA-NCAM. Sin embargo, hacia el neuroepitelio cortical (NC) y las eminencias gangliónicas (EG), se observa un fuerte marcaje de PSA-NCAM en las prolongaciones celulares. (C) Superposición de A y B. Aumentos: A, B y C 10x.

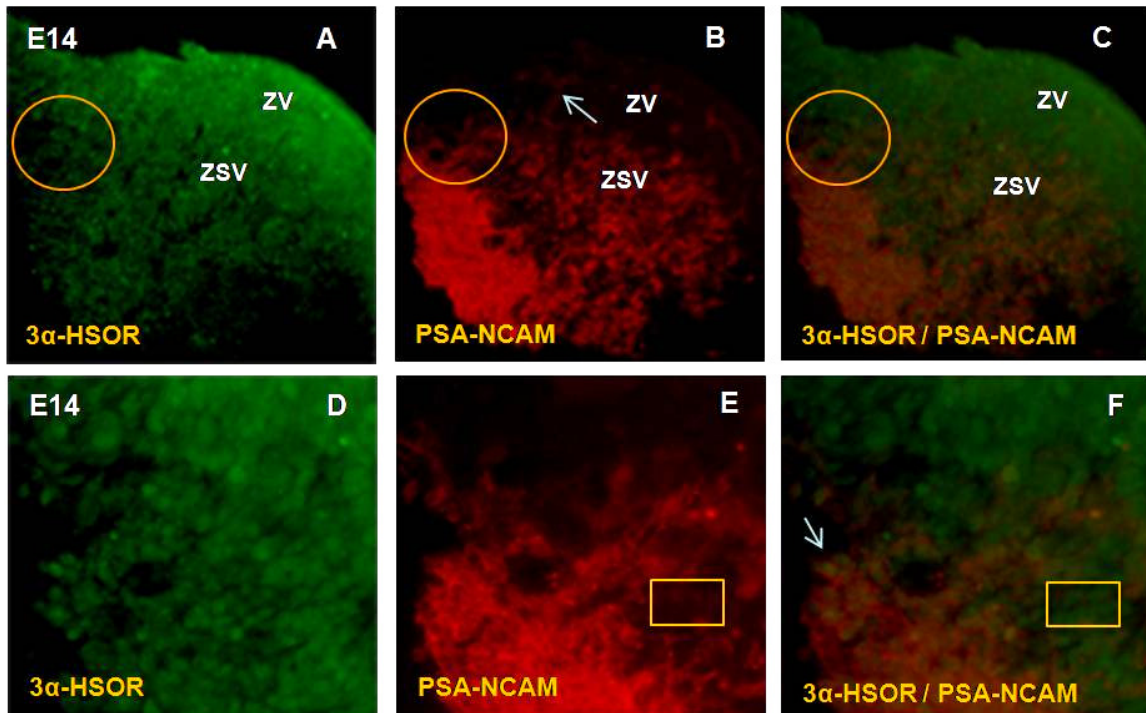


Figura 10. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en E14 a nivel de la eminencia gangliónica lateral. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia. (A) Se observa una alta inmunoreactividad para la 3 α -HSOR en la zona ventricular (ZV) y en la zona subventricular (ZSV). Al igual que en el neuroepitelio cortical, la ZV está conformada por una alta densidad de células. (B) PSA-NCAM permite distinguir las dos capas germinativas. En la ZV, se observan pocas células aisladas PSA-NCAM⁺ (flecha), posiblemente correspondan a progenitores neurales (PN) recién formados. En la ZSV, se observan una gran cantidad de PN que expresan PSA-NCAM. (C) Superposición de A y B. La enzima colocaliza con PSA-NCAM en la ZSV de la EG. (D, E y F) Acercamiento de una región de la ZSV (círculos en A, B y C respectivamente). (D) La 3 α -HSOR se expresa claramente a nivel de los somas celulares de la ZSV. (E y F) Todas las células PSA-NCAM⁺ de la ZSV expresan la enzima (F). Sin embargo, se observan algunas células 3 α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁻ (cuadros en E y F). PSA-NCAM se expresa a nivel de la membrana celular (flecha en F). Aumentos: A-D 20x, D-F 40x.

2. Distribución de la 3 α -HSOR en embriones de 17 días

a) Neuroepitelio cortical

Se encontraron células altamente inmunopositivas para la 3 α -HSOR en la ZM, en la SP y en la PC. En el resto de las capas de la neocorteza se observó una disminución considerable de la expresión de la 3 α -HSOR (Fig.11A). Por otro lado, las células de la ZM y de la SP también expresan claramente PSA-NCAM (Figs. 11B y 11C). De hecho, en la SP se pudieron observar muy claramente células 3 α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺ (Fig.11H). Así mismo, se encontró inmunoreactividad para PSA-NCAM en las células de la ZSV y en prolongaciones celulares de la ZI (Fig.11B). En las células de la PC y de la ZV se observó muy poco marcaje para la molécula (Fig.11B).

b) Eminencias gangliónicas

A esta edad, no se observó inmunoreactividad para la 3 α -HSOR en la ZV ni en la ZSV de las EG (Fig.11D). En la ZSV, por otra parte, se observa claramente un conjunto de células pequeñas bipolares con morfología de progenitores neurales que expresan PSA-NCAM en la membrana celular y en sus prolongaciones (Fig.11E).

c) Bulbo olfatorio

En el BO, la 3 α -HSOR se expresa principalmente en un gran número de células localizadas en la región más externa de la estructura. En áreas más internas del BO la intensidad del marcaje para la enzima es mucho menor (Fig.12A). Por otro lado, en toda la región externa se observaron células 3 α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺. En la región interna, el marcaje para PSA-NCAM se observó más intenso (Figs.12B y 12C).

d) Hipocampo

Se pudo observar una inmunoreactividad considerable para la 3 α -HSOR, principalmente en todo el hipocampo y la fimbria (Fig.13A). Sin embargo, el marcaje para la enzima es bastante difuso (Fig.13A). Por otro lado, PSA-NCAM se expresa en la ZM, el polo dentado y la fimbria (Fig.13B).

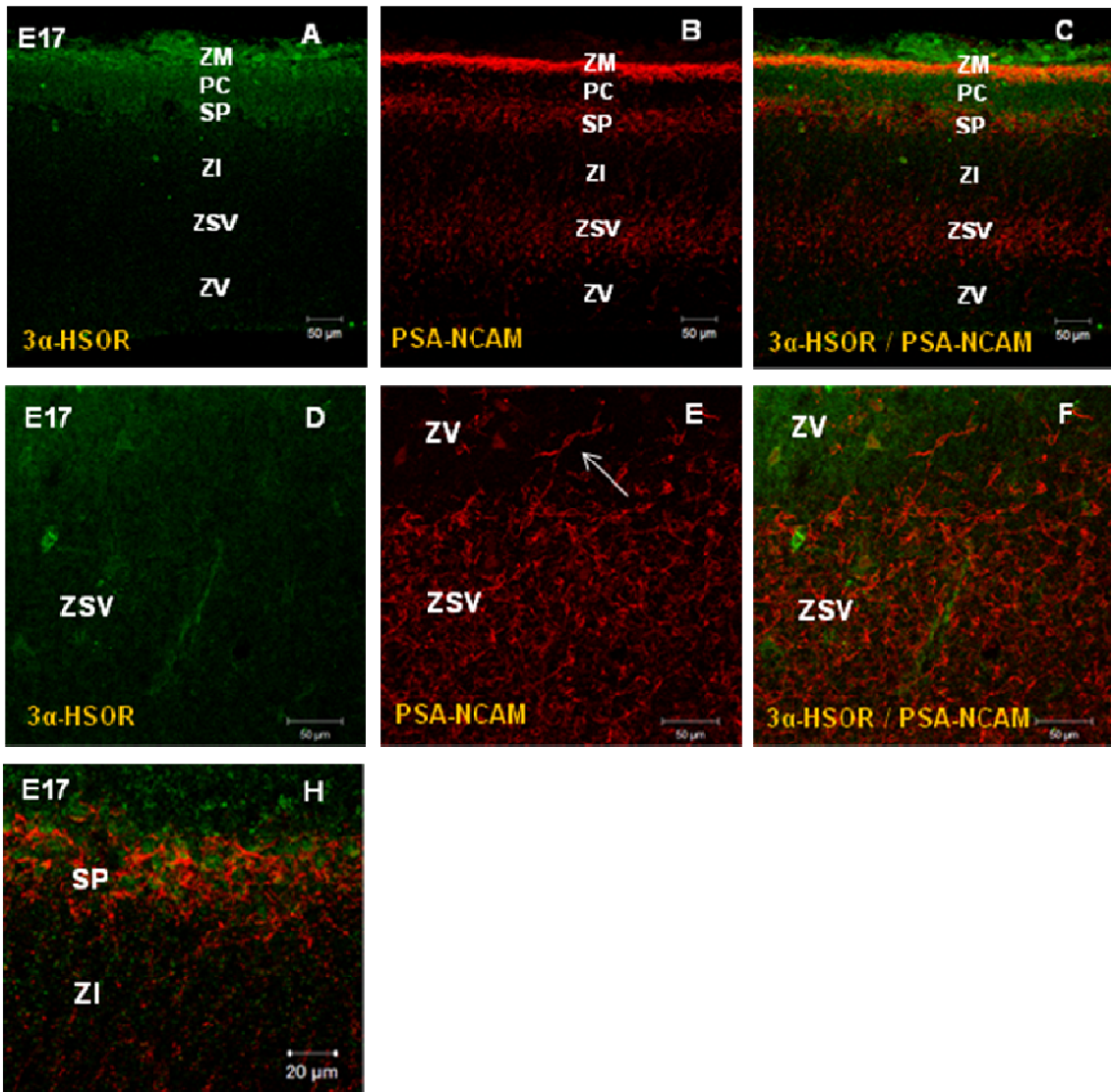


Figura 11. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en E17 a nivel de la neocorteza y de la eminencia gangliónica lateral (EGL). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A, B y C) Expresión de la 3 α -HSOR a nivel de la neocorteza. (A) La 3 α -HSOR se expresa en la neocorteza, a nivel de la subplaca (SP), la placa cortical (PC) y la zona marginal (ZM). En estas capas el marcaje es intenso pero difuso. En la zona intermedia (ZI), la zona subventricular (ZSV) y la zona ventricular (ZV), no se observa marcaje para la 3 α -HSOR. (B) PSA-NCAM se expresa claramente en la ZM, en la SP y en la ZSV. En la ZM el marcaje para la molécula es mas intenso. También se observan algunas prolongaciones PSA-NCAM+ en la ZI. (C) Superposición de A y B. La 3 α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en las capas mas externas de la neocorteza (ZM, PC y SP). En la SP, se observa claramente que la enzima se expresa en los somas celulares y PSA-NCAM en las membranas de estas células (H). (D, E y F) Expresión de la 3 α -HSOR a nivel de la EGL. (D) No se observa marcaje para la 3 α -HSOR en toda la EGL. (E) Al igual que en la EGL de E14, PSA-NCAM se expresa fuertemente en la ZSV. Nótese la morfología de los progenitores neurales (PN) (flecha), son células pequeñas y bipolares. (F) Superposición de D y E. En E17, los PN de la ZSV de la EGL, no expresan la 3 α -HSOR. Barra de escala: 50 μ m, excepto en H que vale 20 μ m.

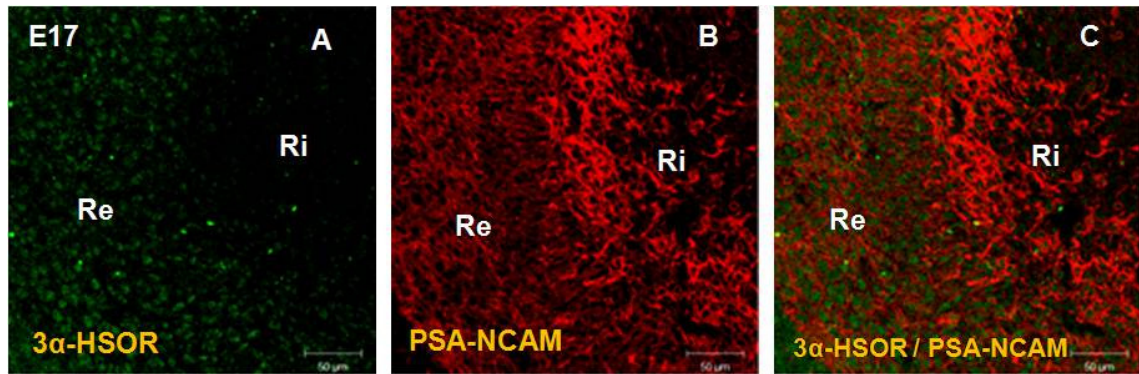


Figura 12. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en E17 a nivel del bulbo olfatorio (BO). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. **(A)** En E17, aun no se han estructurado las distintas capas del BO. Sin embargo, se distingue una región externa (Re) y una región interna (Ri), según la expresión de la 3 α -HSOR. La enzima se expresa principalmente en las células de la Re. En la Ri, el marcaje es muy bajo y difuso. **(B)** La mayor expresión de PSA-NCAM se observa en un número considerable de células entre la Ri y la Re. Sin embargo, en la Re el marcaje para la molécula es intenso. **(C)** Superposición de A y B. Las células de la Re son claramente 3 α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺. Barra de escala: todas 50 μ m.

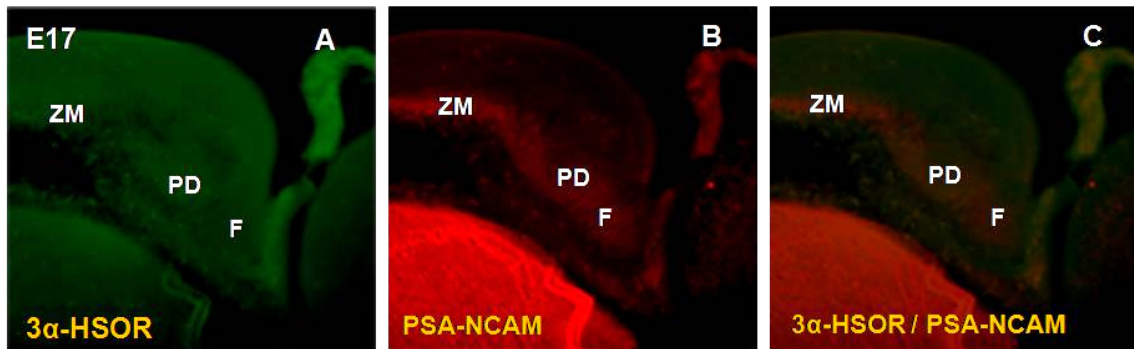


Figura 13. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en E17 a nivel del hipocampo. Las fotografías fueron tomadas utilizando un microscopio de fluorescencia invertido. **(A)** La 3 α -HSOR en el hipocampo de E17, se expresa fuertemente en la zona marginal (ZM), el polo dentado (PD) y la fimbria (F). El marcaje para la enzima en esta estructura se observa intenso pero un poco difuso, posiblemente por la alta densidad de células. **(B)** Se observa inmunoreactividad para PSA-NCAM en la ZM y en el PD. En la fimbria, la expresión de la molécula es a nivel de las fibras. **(C)** Superposición de A y B. La 3 α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en la ZM, el PD y la fimbria. Aumento: 20x.

3. Distribución de la 3 α -HSOR en embriones de 20 días

a) Neocorteza

Se observaron claramente células inmunopositivas para la 3 α -HSOR en la ZM. En la PC también se observó una alta expresión para la enzima. En la SP y en la ZI la inmunoreactividad para la 3 α -HSOR es mucho menor, sin embargo se pudo distinguir algunas células 3 α -HSOR⁺ (Fig.14A). En la ZSV y en la ZV, se observó igualmente una expresión considerable de la enzima (Fig.14D). En cuanto a PSA-NCAM, esta molécula se expresa altamente en todas las capas de la neocorteza (Fig.14B), siendo la inmunoreactividad un poco más baja en la ZSV y en la reducida ZV (Fig.14E). Por otra parte, se observaron células que co-expresan la 3 α -HSOR y PSA-NCAM en la ZM y en la PC. En la ZI, se encontró una gran cantidad de fibras PSA-NCAM⁺ en el cíngulo y el CC (Figs.14B y 14C).

b) Eminencias gangliónicas

En las EG, la inmunoreactividad para la 3 α -HSOR es bastante baja y difusa. El marcaje para la enzima se encontró principalmente en la ZV (Fig.14D). Esta última al igual que en la neocorteza, se ha reducido considerablemente. Por otro lado, se observó un marcaje intenso para PSA-NCAM en la ZSV, pero no en la ZV (Fig.14E). Es interesante destacar que se encontraron algunos endotelios vasculares 3 α -HSOR⁺ en esta zona (Fig.14D).

c) Bulbo olfatorio

En el BO de E20 se pudo distinguir claramente un gran número de células altamente inmunoreactivas para la 3 α -HSOR (Fig.15A). Estas células se distribuyen en la capa granular, en la capa de células mitrales y en la capa glomerular (Fig.15A). Además, en las 3 capas se encontraron células 3 α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺, aunque también hay células 3 α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁻ y 3 α -HSOR⁻/PSA-NCAM⁺ (Fig.15C).

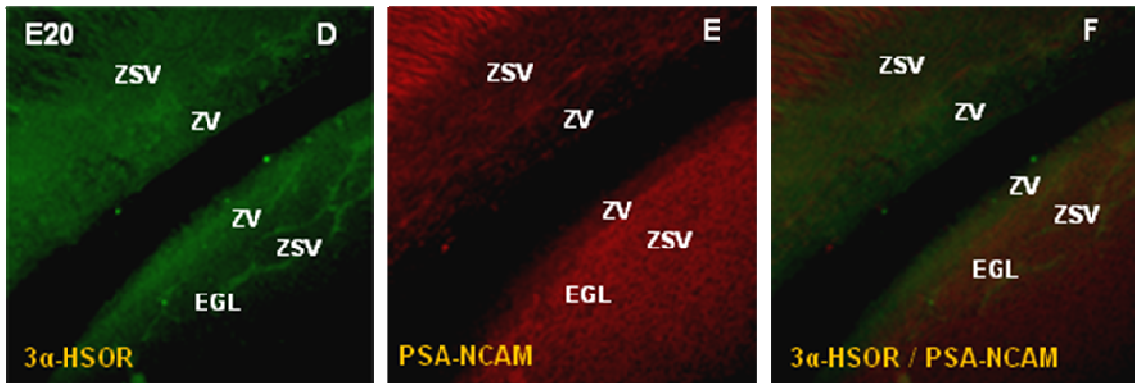
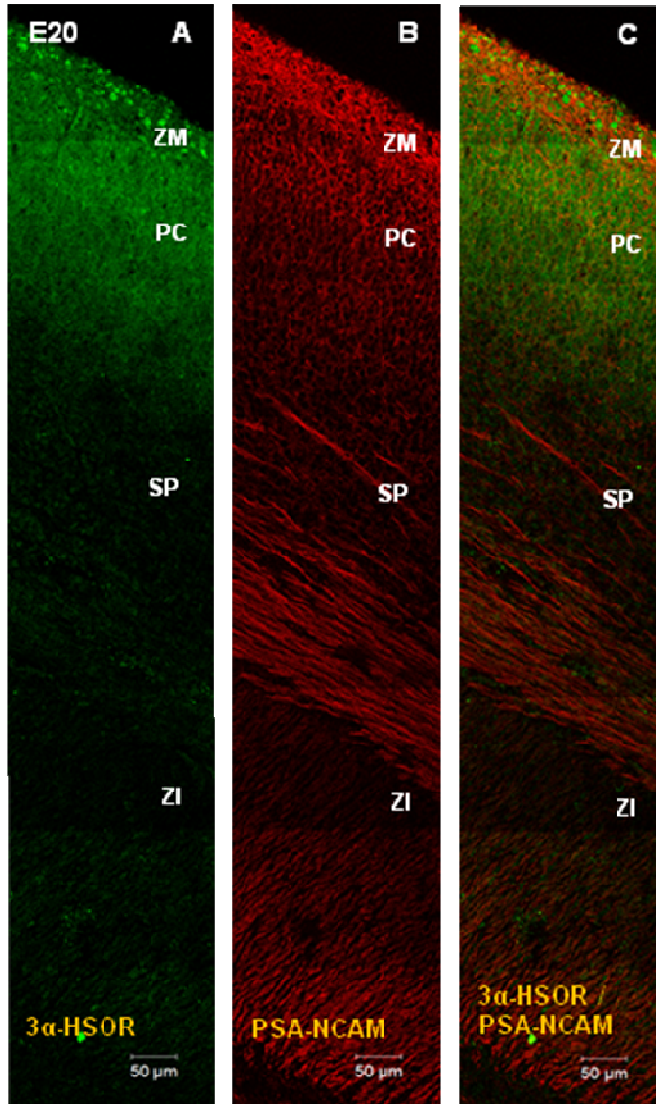


Figura 14. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en E20 a nivel de la neocorteza y de la eminencia gangliónica lateral (EGL). (A, B y C) Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A) Se observa una alta inmunoreactividad para la 3 α -HSOR en la placa cortical (PC) y en la zona marginal (ZM). Nótese, las células fuertemente marcadas para la enzima en esta última capa. En la subplaca (SP) y la zona intermedia (ZI), también se observan células 3 α -HSOR⁺. Sin embargo, el marcaje es mas bajo que en las capas externas. (B) PSA-NCAM se expresa fuertemente en la ZM y la PC. En la ZI, se observan fibras con una alta inmunoreactividad para la molécula. (C) Superposición de A y B. La 3 α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM principalmente en las capas externas de la neocorteza. (D, E y F) Las fotografías fueron tomadas utilizando un microscopio de epifluorescencia. (D) La expresión de la enzima es difusa en la zona ventricular (ZV) y subventricular (ZSV) de la neocorteza. En la EGL, la enzima se expresa en la ZV. También se observan algunos capilares marcados. (E) La expresión de PSA-NCAM es baja y difusa en la ZSV de la neocorteza. En la ZV prácticamente no se observa marcaje. En la ZV y la ZSV de la EGL, la expresión de PSA-NCAM es similar a la de la neocorteza. Sin embargo, el marcaje es un poco mas intenso en la ZSV de la EGL que en la ZSV cortical. (F) Superposición de D y E. La 3 α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en la ZSV de ambas estructuras. Aumentos: (A-C): Barra de escala = 50 μ m; (D-F): 20x.

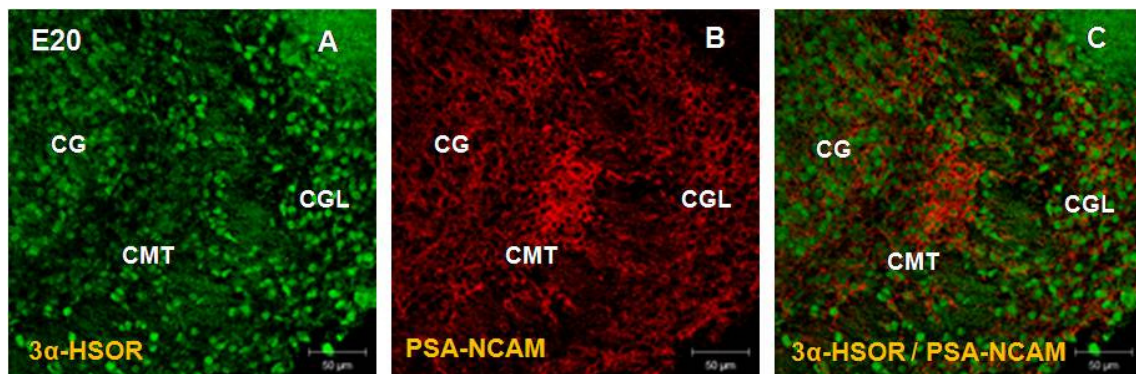


Figura 15. Inmunofluorescencia para la 3α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en E20 a nivel del bulbo olfatorio (BO). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. **(A)** Se observan células claramente 3α -HSOR⁺ en la capa glomerular (CGL), en la capa de células mitrales (CMT) y en la capa granular (CG). **(B)** Se observa una alta expresión de PSA-NCAM en las tres capas del BO de E20. La CMT presenta un mayor marcaje para la molécula que el resto de las células. **(C)** Superposición de A y B. Todas las células del BO de E20 son 3α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺. Barra de escala: 50 μ m.

d) Hipocampo

En el hipocampo, la expresión de la 3α -HSOR se observa un poco difusa, sin embargo se pueden notar algunas células inmunoreactivas para la enzima distribuidas por toda la estructura (Fig.16A). Estas células también son inmunopositivas para PSA-NCAM (Figs.16B y 16C). De hecho, hacia la parte posterior del hipocampo se pueden observar claramente unas cuantas células de gran tamaño altamente 3α -HSOR⁺ y que también expresan PSA-NCAM (Fig.16D).

e) Cerebelo

Se encontró una baja inmunoreactividad para la 3α -HSOR en la capa granular externa del cerebelo. En la capa granular interna, en cambio, la expresión de la enzima se observó más claramente en algunas de las células que conforman esta capa (Fig.17A), las cuales eran también PSA-NCAM⁺ (Figs.17B y 17C). La expresión de PSA-NCAM, se observó a nivel de las membranas y prolongaciones de la gran cantidad de células que conforman la capa granular externa (Fig.17B).

III. DISTRIBUCION DE LA 3α -HSOR EN EL CEREBRO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL

1. Expresión de la 3α -HSOR en las zonas neurogénicas

En general, durante el desarrollo postnatal la 3α -HSOR se expresa altamente en las células que conforman las distintas zonas neurogénicas. Sin embargo, se observa una disminución de la inmunoreactividad para la enzima a medida que avanza el desarrollo. En P15 y P21, se observa un marcaje difuso para la 3α -HSOR, mientras que en las edades más tempranas se puede distinguir claramente que la expresión de la enzima se encuentra a nivel de los somas celulares (Tabla 1).

a) Zona subventricular de los ventrículos laterales

En P1 se observan células inmunopositivas para la 3α -HSOR ubicadas en la región de la ZSV más adyacente al ventrículo lateral. Estas células no presentan inmunoreactividad para PSA-NCAM

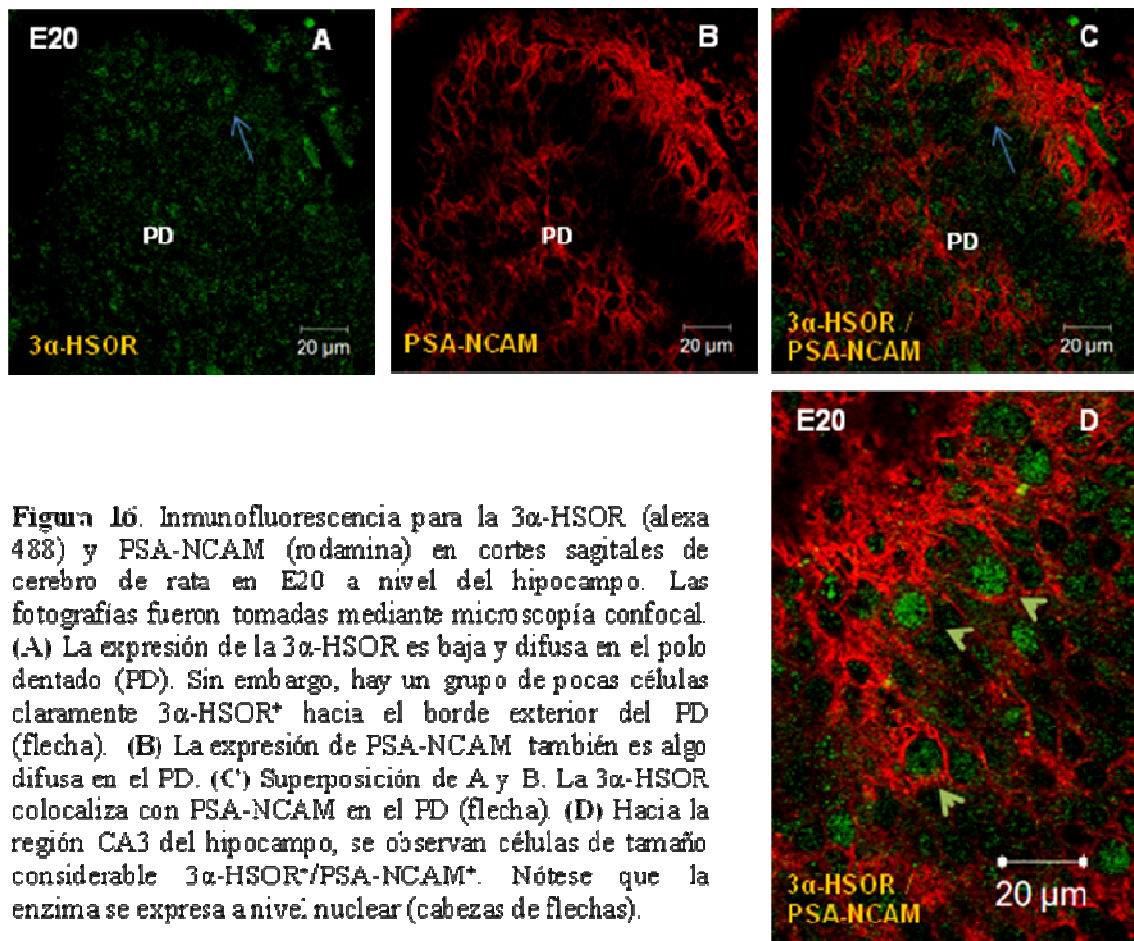


Figura 16. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en E20 a nivel del hipocampo. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A) La expresión de la 3 α -HSOR es baja y difusa en el polo dentado (PD). Sin embargo, hay un grupo de pocas células claramente 3 α -HSOR⁺ hacia el borde exterior del PD (flecha). (B) La expresión de PSA-NCAM también es algo difusa en el PD. (C) Superposición de A y B. La 3 α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en el PD (flecha). (D) Hacia la región CA3 del hipocampo, se observan células de tamaño considerable 3 α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺. Nótese que la enzima se expresa a nivel nuclear (cabezas de flechas).

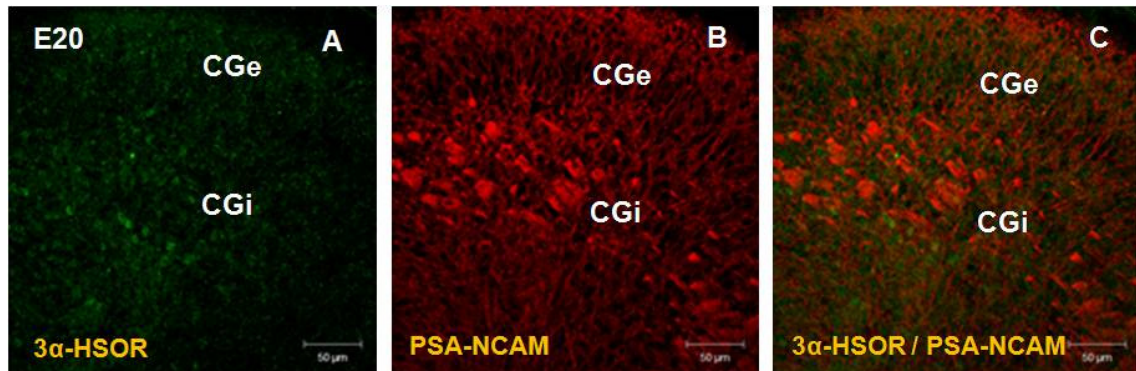


Figura 17. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en E20 a nivel del cerebelo. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. **(A)** La 3 α -HSOR se expresa poco en la capa granular externa (CGe) y en la capa granular interna (CGi) del cerebelo de E20. **(B)** PSA-NCAM se expresa fuertemente en ambas capas del cerebelo. Nótese las prolongaciones PSA-NCAM⁺ que conectan la CGe con la CGi. **(C)** Superposición de A y B. La enzima colocaliza con PSA-NCAM en ambas capas del cerebelo de E20. Barras de escala: 50 μ m.

(Figs.18A y 18C). En el resto de la ZSV la expresión de la enzima es mucho menor (Fig.18A). Por otro lado, la expresión de PSA-NCAM es baja comparada con edades más avanzadas, aunque se pueden observar varias células inmunopositivas para la molécula confirmando que se trata de la ZSV (Fig.18B).

En P4, el marcaje para la 3α -HSOR es más definido. Se pueden observar células inmunoreactivas para la enzima, distribuidas en toda la ZSV (Fig.18D). Estas células, también son PSA-NCAM⁺ (Figs.18F). En esta edad, se observa una alta expresión de PSA-NCAM en toda la estructura.

En P7, la gran mayoría de las células que conforman la ZSV son 3α -HSOR⁺ (Fig.18G) y PSA-NCAM⁺ (Fig.18I).

En P12, se puede observar nuevamente una gran cantidad de células altamente inmunopositivas para la enzima, que se localizan en la región de la ZSV más adyacente al ventrículo. Sin embargo, el marcaje de estas células es más difuso que en P7 (Fig.19A). Estas células, al igual que en P1, son inmunonegativas para PSA-NCAM, sin embargo en esta región se pudieron observar algunas cadenas celulares que expresan PSA-NCAM (Fig.19B). El resto de las células que conforman la ZSV, también presentan una alta expresión de la 3α -HSOR y además son inmunopositivas para PSA-NCAM (Figs.19A y 19C).

Tanto en P15 como en P21, se pudo observar una disminución de la expresión de la 3α -HSOR en la ZSV. Además el marcaje para la enzima se observa bastante difuso (Figs.19D y 19G). Por otro lado, se observa nuevamente una alta inmunoreactividad para PSA-NCAM en esta región (Figs.19E y 19H).

Es importante mencionar que se encontró, en varias de las edades postnatales estudiadas, una gran cantidad de endotelios vasculares inmunopositivos para la 3α -HSOR asociados a la ZSV. Se puede observar un ligero marcaje para la enzima en algunos vasos de la ZSV de P4 y P7 (Figs.18D y 18G). Sin embargo, la expresión de la 3α -HSOR aumenta significativamente en los endotelios vasculares de la ZSV en P12 y P15 (Figs.19A y 19D). En P21, la expresión de la enzima aunque sigue elevada, empieza a disminuir. Como era de esperar, las células endoteliales no son inmunoreactivas para PSA-NCAM.

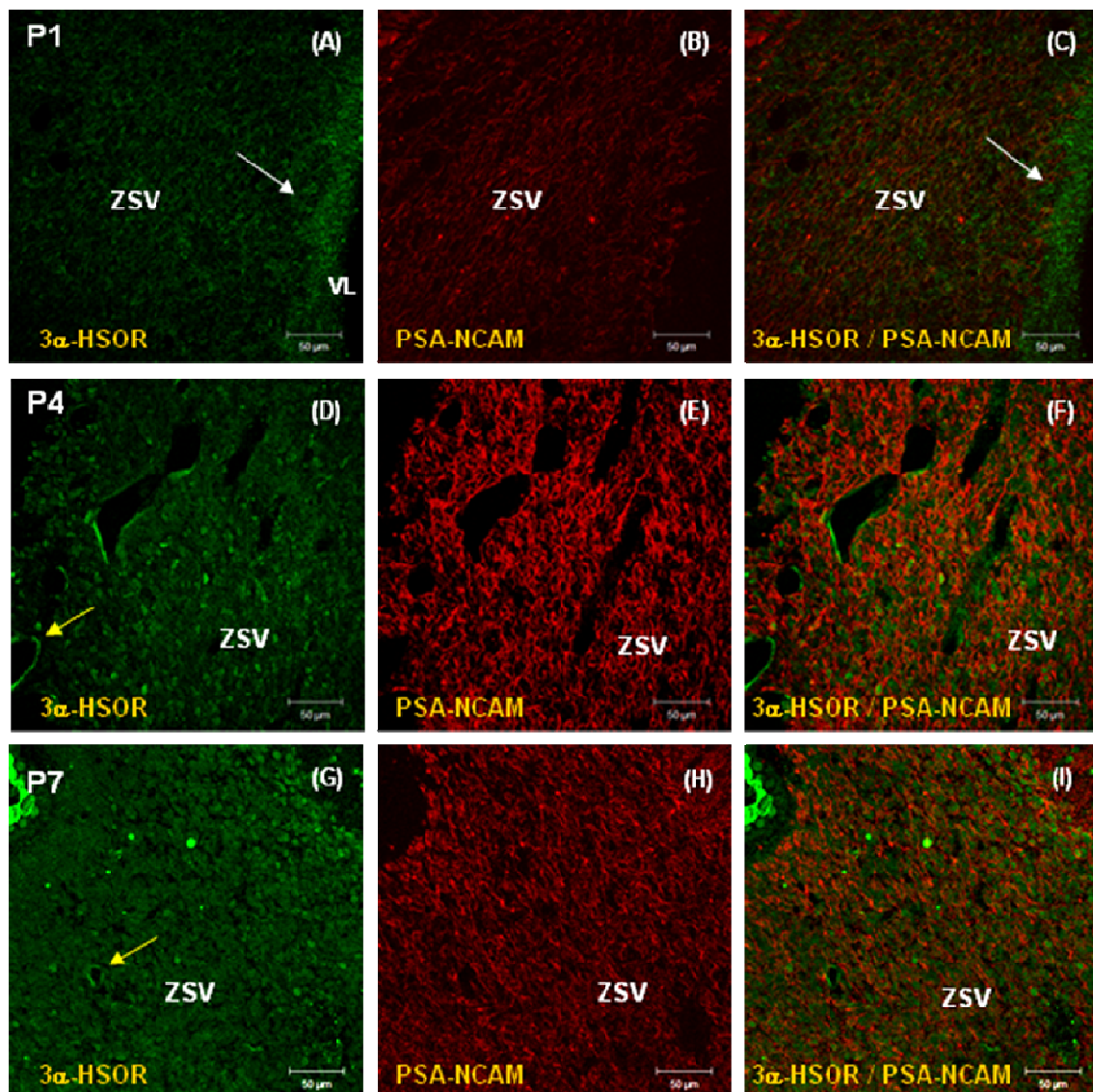


Figura 18. Inmunofluorescencia para la 3α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la zona subventricular (ZSV). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A, D y G) Expresión de la 3α -HSOR en P1, P4 y P7 respectivamente. La expresión en P1 se observa difusa luego a medida que el desarrollo avanza la intensidad del marcaje aumenta. En P1, se observan un conjunto de células altamente 3α -HSOR⁺ bordeando la pared del ventrículo lateral (VL) (flecha en A). En P7, se distinguen claramente los somas celulares que expresan la enzima (G). Se observan algunos endotelios vasculares inmunopositivos para la 3α -HSOR en P4 y P7 (flechas amarillas en D y en G). (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P1, P4 y P7 respectivamente. Al comienzo el marcaje para PSA-NCAM es bajo y difuso (B), a medida que el desarrollo avanza la intensidad del marcaje aumenta (E y H). (C, F y I) Las células de la ZSV de P1, P4 y P7 son claramente 3α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺. En P1, sin embargo, las células que bordean la pared ventricular son PSA-NCAM⁻ (flecha en C, ver también B). Barra de escala: 50 μ m.

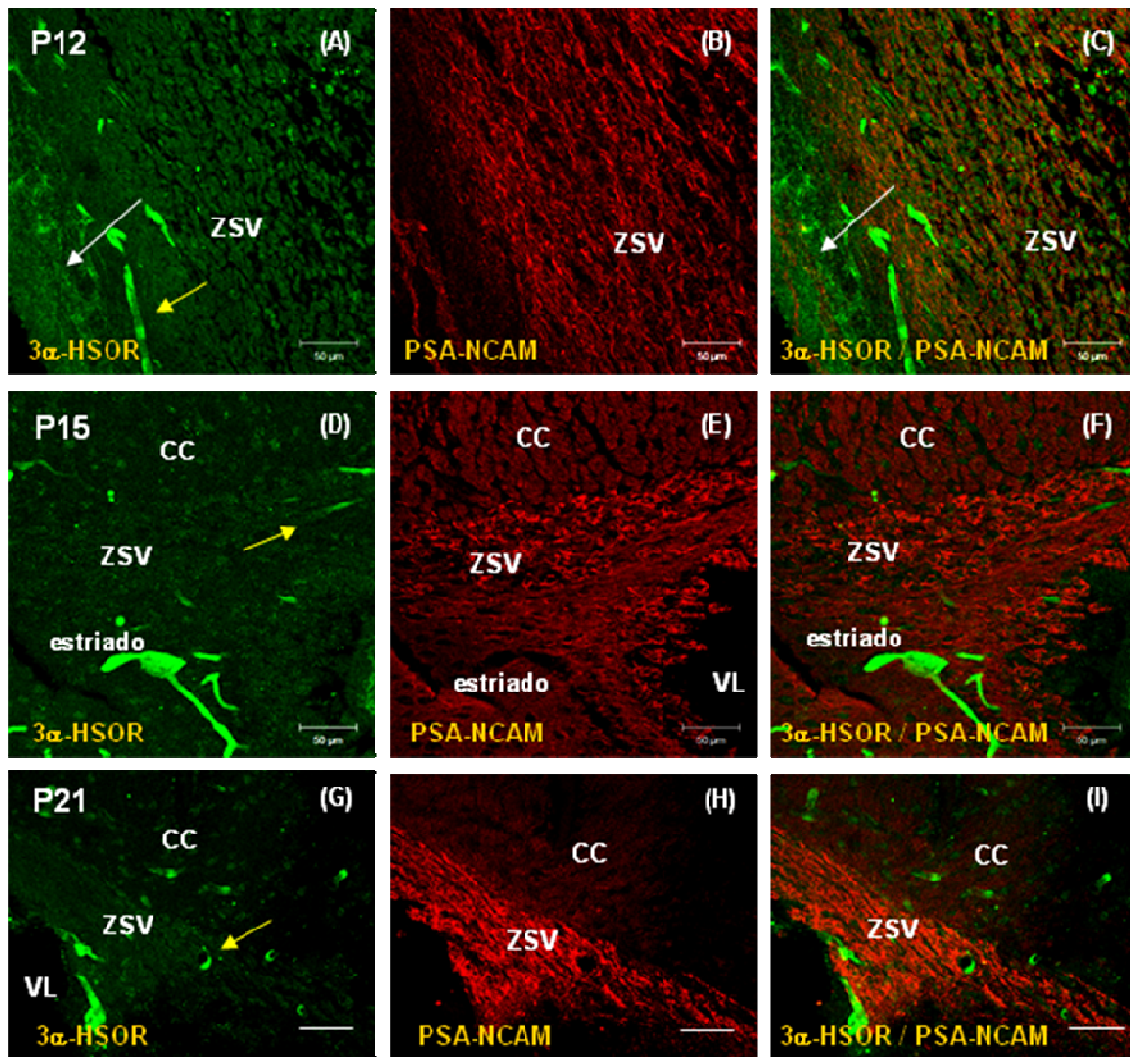


Figura 19. Inmunofluorescencia para la 3α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la zona subventricular (ZSV). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A, D y G) Expresión de la 3α -HSOR en P12, P15 y P21, respectivamente. El marcaje para la enzima es intenso en P12. A esta edad se observa un conjunto de células altamente 3α -HSOR⁺ ubicadas hacia la pared ventricular (flecha en A). En P15 y P21, la expresión de la 3α -HSOR en la ZSV ha disminuido considerablemente y se observa un marcaje difuso. En las tres edades postnatales se observan vasos altamente inmunoreactivos para la enzima dentro de la ZSV (flechas amarillas en A, D y G). En P15 y P21, el cuerpo calloso (CC) y el estriado presentan células 3α -HSOR⁺ aunque el marcaje es muy bajo y difuso (D y G). (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P12, P15, P21 respectivamente. La expresión de esta molécula en la ZSV se mantiene relativamente alta durante este período postnatal. La expresión de PSA-NCAM en el CC y el estriado es mas baja (E y H). (C, F y I) La 3α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en la ZSV las últimas semanas postnatales. En P12, las células 3α -HSOR⁺ hacia la pared ventricular no expresan PSA-NCAM (flecha en C, ver también B). Barra de escala: 50 μ m.

b) Vía de migración rostral

En la VMR de P1, aunque se observó una alta expresión de la 3α -HSOR al igual que en la ZSV, el marcaje para la enzima es bastante difuso. Sin embargo, se pudieron observar algunas células que presentan una alta inmureactividad para la enzima (Fig.20A) así como para PSA-NCAM (Fig.20B).

En P4, se observa un número considerable de células inmunopositivas para la 3α -HSOR en la VMR (Fig.20D). Además, también se puede observar que estas células se encuentran formando cadenas PSA-NCAM⁺ (Figs.20E y 20F).

Por otra parte, en P7 se observa claramente una alta inmunoreactividad para la enzima en la mayoría de las células que conforman la VMR (Fig.20G) y estas células expresan también PSA-NCAM (Fig.20I).

En P12, el resultado es similar, se observaron células inmunopositivas para la 3α -HSOR en toda la extensión de la VMR (Fig.21A), que también son PSA-NCAM⁺ (Fig.21B).

Así mismo, en P15 y P21 se observa inmunoreactividad para la 3α -HSOR en la VMR (Figs.21D y 21G). Sin embargo, el marcaje es más difuso, al igual que en la ZSV de estos estadíos. Por otro lado, se observa una clara expresión de PSA-NCAM (Figs.21E y 21H).

Al igual que en la ZSV, en la VMR se encontraron endotelios vasculares 3α -HSOR⁺. En P1, P4 y P7 se pueden notar vasos ligeramente inmunoreactivos para la enzima que discurren junto a la VMR (Figs.20A, 20D y 20G). En P12, P15 y P21 se observó un aumento significativo de la cantidad de endotelios vasculares inmunopositivos para la 3α -HSOR. En P12, es particularmente interesante mencionar cómo estos vasos que expresan la enzima se encuentra estrechamente relacionados con progenitores PSA-NCAM⁺ que conforman la VMR (Figs.21C y 36A). En P15, los vasos 3α -HSOR⁺ se localizan en las zonas cercanas a la VMR así como también en el interior de la misma (Fig.21D). En P21, se encontraron igualmente vasos inmunopositivos para la 3α -HSOR en el interior de la VMR (Fig.21G).

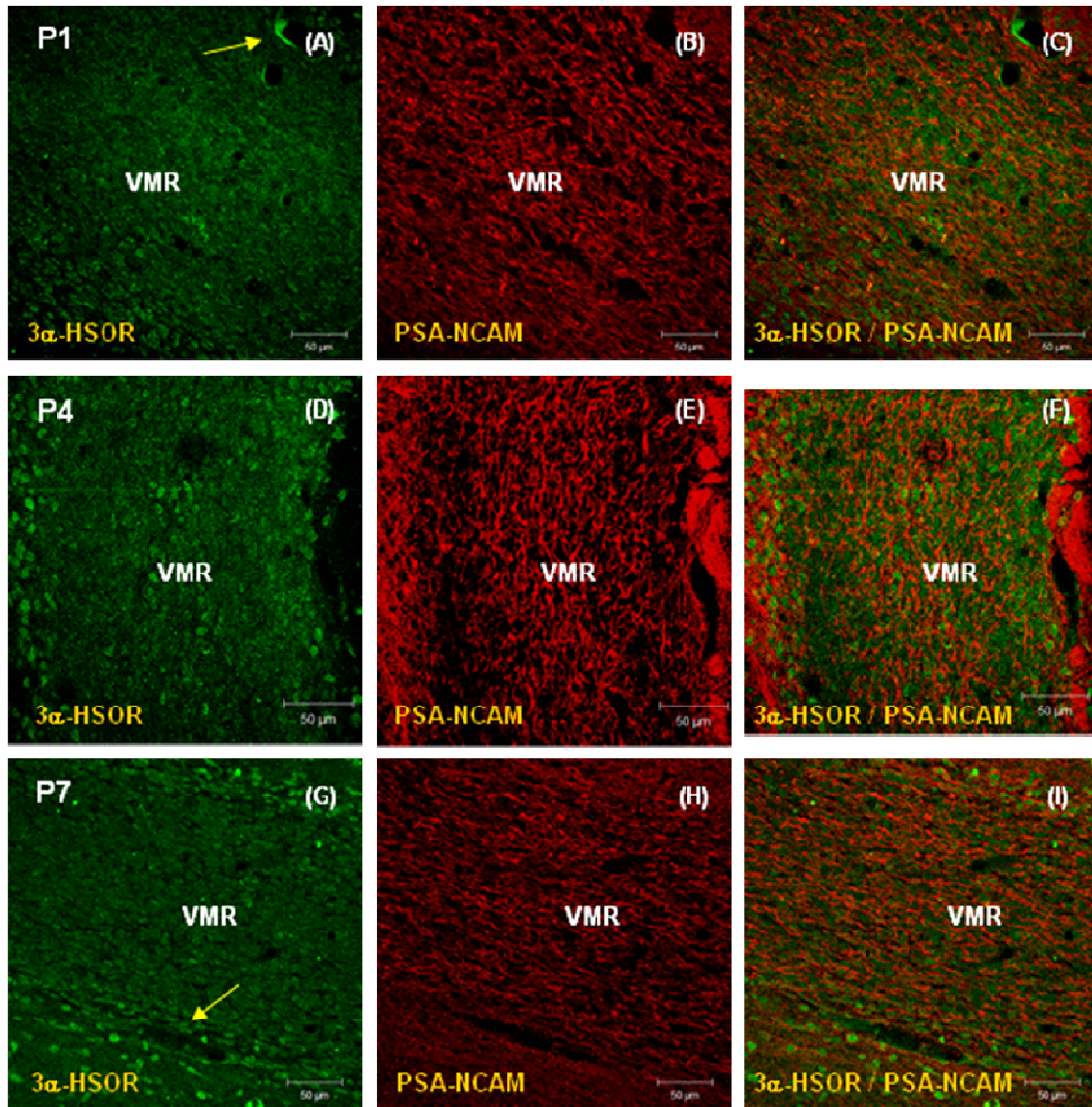


Figura 20. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la vía de migración rostral (VMR). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A, D y G) Expresión de la 3 α -HSOR en P1, P4 y P7 respectivamente. Al igual que en la ZSV, en la VMR, la expresión de la enzima aumenta conforme avanza la primera semana postnatal. También se observan vasos 3 α -HSOR⁺ asociados a la VMR (flechas en A y G). Nótese, la alta densidad de células que conforman la VMR, sobretudo en P7 (G). (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P1, P4 y P7 respectivamente. Se observa una expresión considerable de PSA-NCAM en la VMR en las distintas edades. Estas células PSA-NCAM⁺ forman cadenas de neuroblastos migratorios en la VMR. (C, F y I) Las células de la VMR durante la primera semana postnatal son 3 α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺. Barra de escala: 50 μ m.

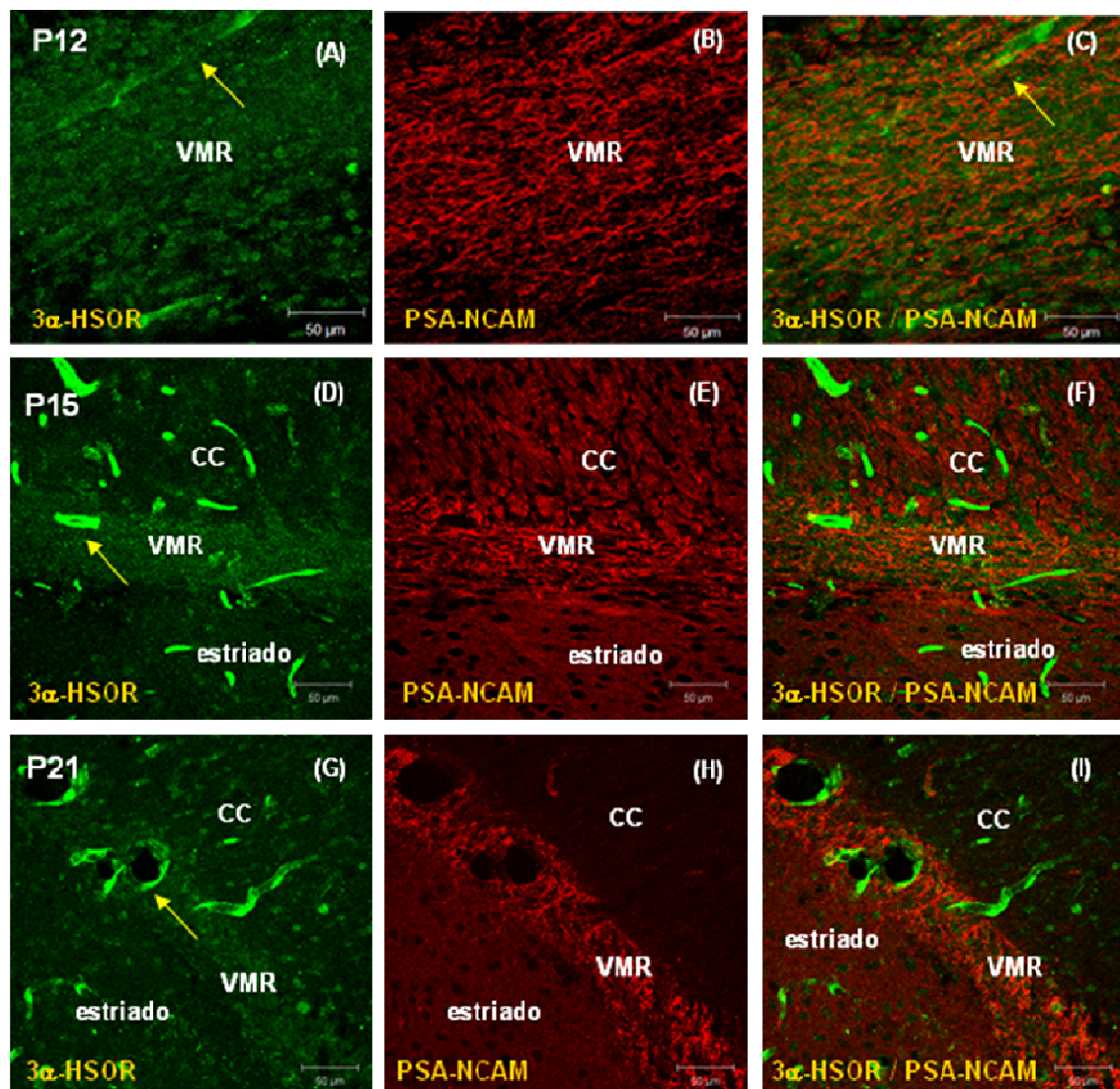


Figura 21. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la vía de migración rostral (VMR). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A, D y G) Expresión de la 3 α -HSOR en P12, P15 y P21 respectivamente. En la VMR el marcaje para la enzima disminuye en las últimas etapas del desarrollo. En P15 y P21 se observa un marcaje difuso. Al igual que en la ZSV, en la VMR también se observan vasos altamente inmunopositivos para la 3 α -HSOR (flechas en A, D y G). (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P12, P15 y P21 respectivamente. Las cadenas celulares de la VMR, son fuertemente PSA-NCAM. Nótese, que al igual que la ZSV, la VMR ha reducido su tamaño considerablemente durante el desarrollo (comparar con fig. 21 y ver figs. 19 y 20). El estriado también expresa la molécula, sin embargo el marcaje es más bajo (E y H). Las fibras del cuerpo calloso (CC) en P15 son claramente PSA-NCAM⁺ (E), pero para P21 el marcaje ha disminuido considerablemente (H). (C, F y I) La 3 α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en la VMR y en el estriado en la última semana postnatal. Las prolongaciones de los progenitores de la VMR de P12 se encuentran en estrecha relación con el vaso 3 α -HSOR⁺ (flecha en C). Barras de escala: 50 μ m.

c) Bulbo olfatorio

En P1, las células mitrales del BO, son claramente inmunopositivas para la 3 α -HSOR. En la capa granular, el marcaje para la 3 α -HSOR es más difuso (Fig.22A). Por otro lado, las células mitrales también expresan altamente PSA-NCAM. El resto de las células que constituyen el BO son igualmente inmunopositivas para PSA-NCAM (Fig.22C).

En el resto de las edades postnatales, las células mitrales forman una capa considerable de células altamente inmunoreactivas para la 3 α -HSOR (Figs.22 y 23). Aunque en las últimas etapas del desarrollo esta capa se ha reducido un poco sus células siguen expresando la enzima. Por otra parte, se encontró que estas células también expresan PSA-NCAM (Figs.22 y 23).

En la capa granular y en la capa glomerular, en todas las edades, se observó también una alta inmunoreactividad para la 3 α -HSOR y para PSA-NCAM (Figs.22 y 23). Sin embargo, a partir de P12 el marcaje para la 3 α -HSOR disminuye considerablemente (Fig.23). La expresión de PSA-NCAM en estas células no varía significativamente durante el desarrollo postnatal.

Adicionalmente, es interesante mencionar que de nuevo se encontró un cierto número de endotelios vasculares 3 α -HSOR⁺ distribuidos en todo el BO (Figs.23D y 23G).

d) Extensión caudal de la zona subventricular

En términos generales se pudo observar que en las edades postnatales tempranas la extensión caudal de la ZSV (ECZSV), que reviste el ventrículo lateral y que se extiende hasta el hipocampo, está conformada por una capa considerable de células altamente inmunoreactivas para la 3 α -HSOR. De esta capa celular, se forman cadenas radiales de células 3 α -HSOR⁺ que entran en el cuerpo caloso. Por otro lado, se puede observar que estas células son inmunonegativas para PSA-NCAM. Sin embargo, existen ciertas variaciones de la expresión de la enzima y de PSA-NCAM en los diferentes estadios.

En P1, esta capa de células 3 α -HSOR⁺ está conformada por una gran cantidad de células que forman un número considerable de cadenas celulares que penetran en el cuerpo caloso (CC) (Fig.24A).

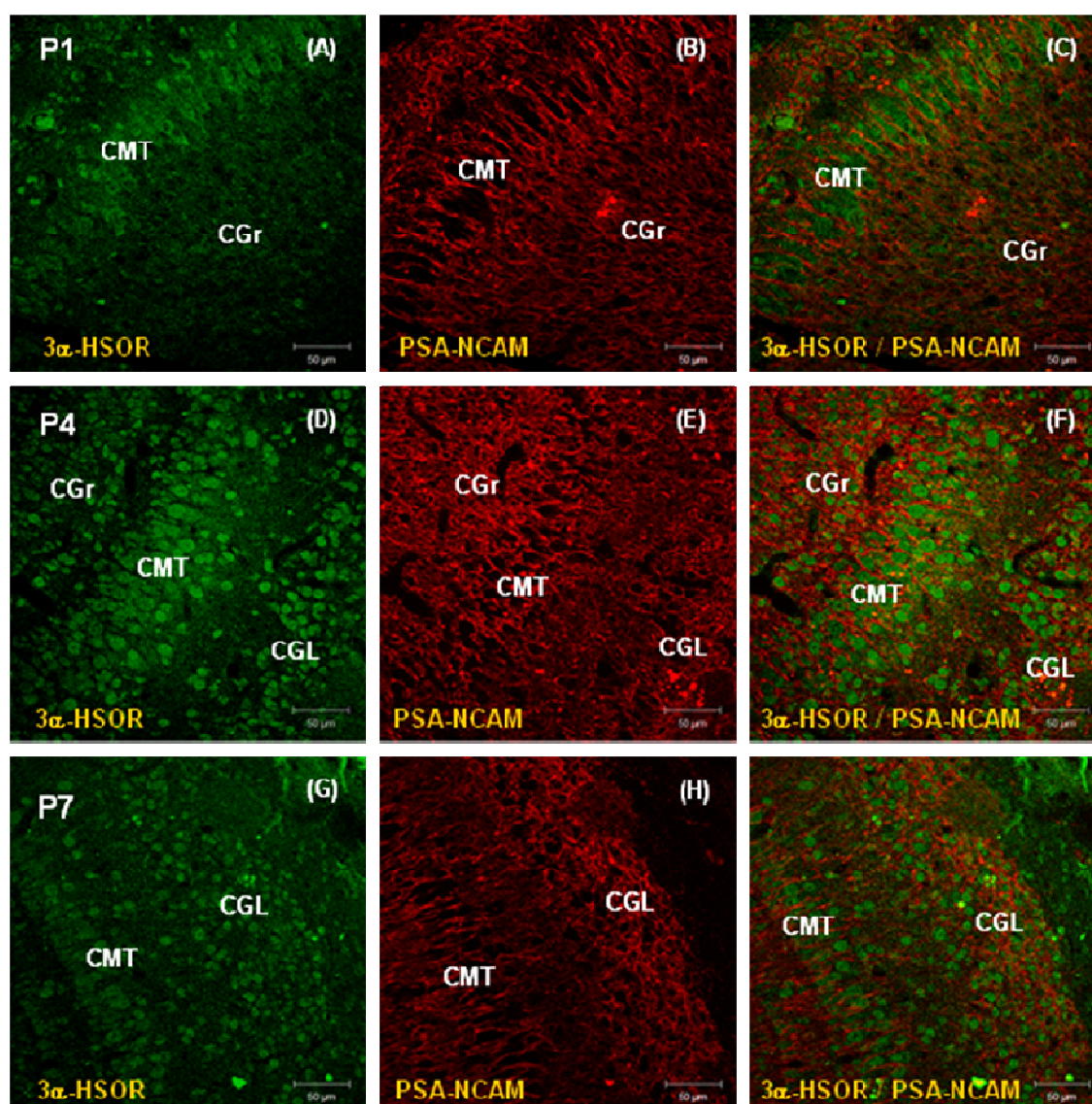


Figura 22. Inmunofluorescencia para la 3α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel del bulbo olfatorio (BO). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A, D y G) Expresión de la 3α -HSOR en P1, P4 y P7 respectivamente. Se observa una expresión clara de la 3α -HSOR en el BO en la primera semana postnatal. En P1, se observa un marcaje alto pero difuso en la capa de células mitrales (CMT). En P4, esta capa está conformada por una gran cantidad de células 3α -HSOR⁺, el grosor de la capa disminuye un poco en P7. La expresión de la enzima en la capa glomerular (CGL) es significativa en P4 y P7. En P1, el marcaje para la 3α -HSOR en la capa granular (CG) es difuso, pero luego aumenta en P4. (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P1, P4 y P7 respectivamente. En general, se observa una alta expresión de la molécula en todas las células del BO durante este periodo postnatal. (C, F y I) Las células del BO en la primera semana postnatal son 3α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺. Barras de escala: 50 μ m.

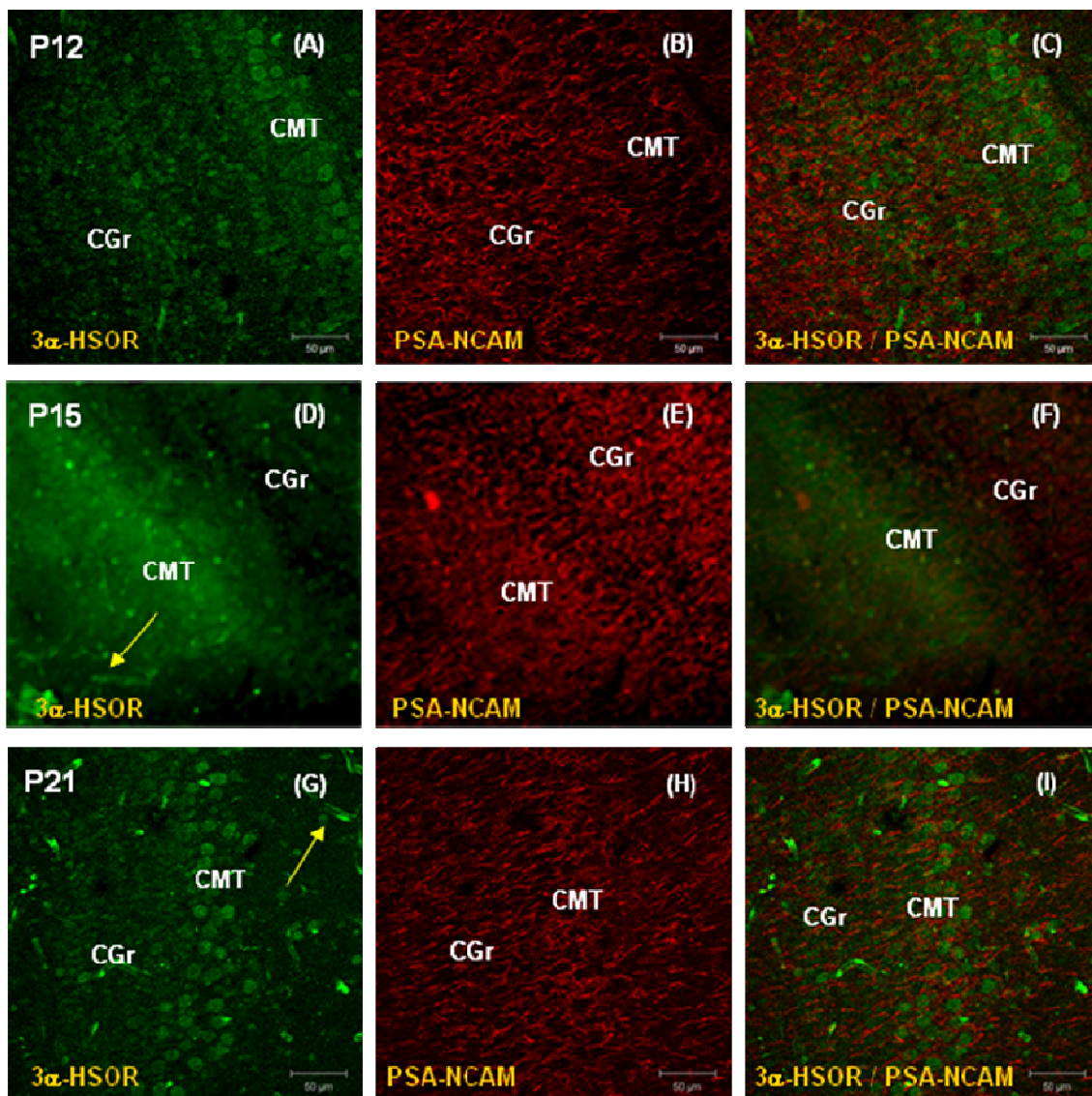


Figura 23. Inmunofluorescencia para la 3α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel del bulbo olfatorio (BO). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal, excepto las de P15 que fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia. (A, D y G) Expresión de la 3α -HSOR en P12, P15 y P21 respectivamente. Durante esta etapa postnatal la expresión de la enzima se mantiene similar en todas las edades en las células mitrales (CMT). Lo mismo ocurre en la capa granular (CG). En P21, en esta capa disminuye un poco el marcaje. En P15 y P21 se observan algunos capilares que expresan la enzima (flechas en P15 y P21). (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P12, P15 y P21. El marcaje para PSA-NCAM se mantiene similar en el BO de todas las edades, pero ha disminuido un poco comparado con la primera semana postnatal (comparar con fig. 23). (C, F y I) Durante este período del desarrollo la 3α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en las células del BO. Barras de escala: 50 μ m. Aumento: D-F 20x

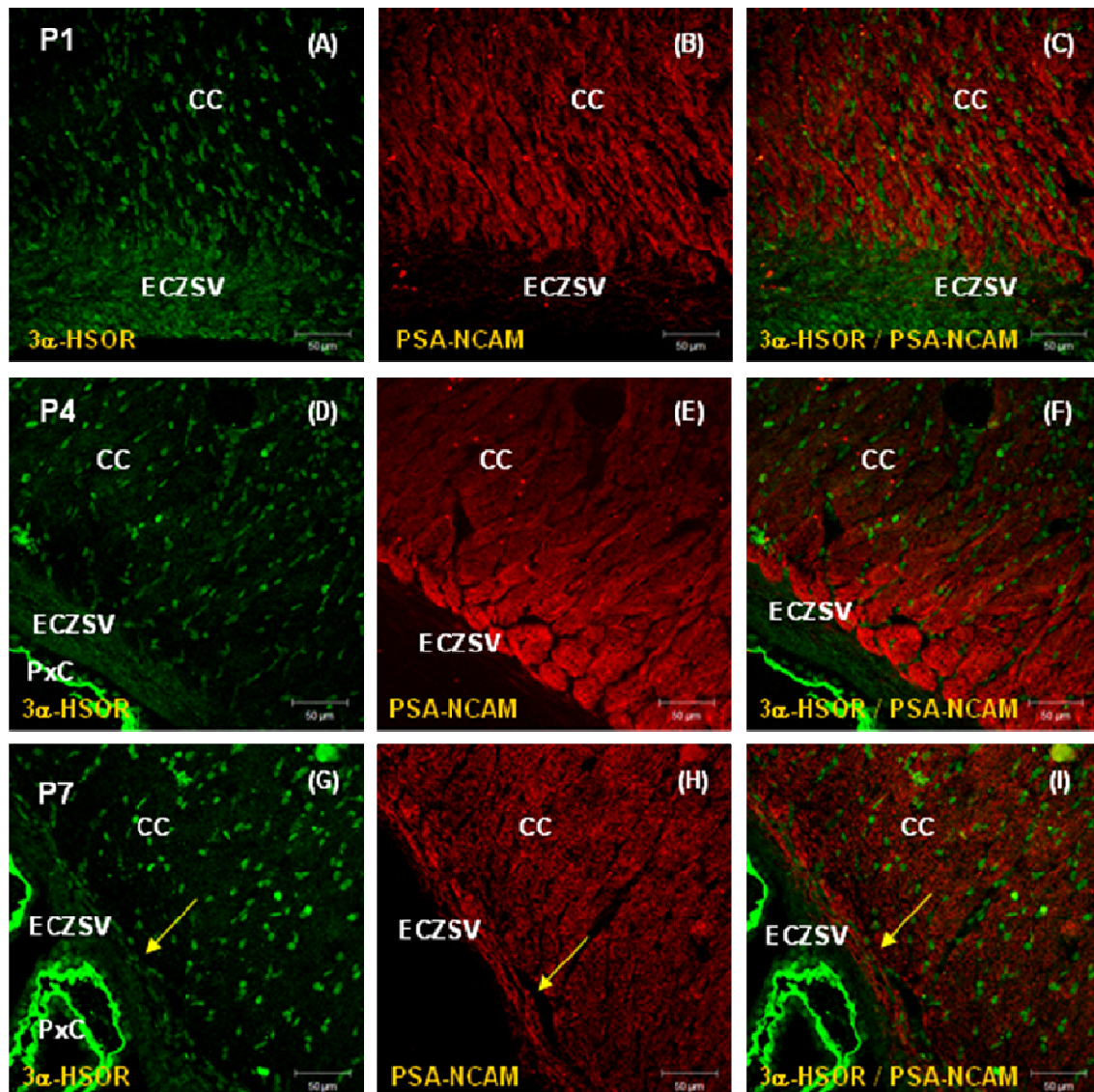


Figura 24. Inmunofluorescencia para la 3α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodanina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la extensión caudal de la zona subventricular (ECZSV). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A, D y G) Expresión de la 3α -HSOR en P1, P4 y P7 respectivamente. Las células que conforman la ECZSV son 3α -HSOR⁺. De esta región se observan cadenas celulares también 3α -HSOR⁺ que se adentran en el cuerpo calloso (CC). Tanto el grosor de la ECZSV, como la cantidad de cadenas celulares que surgen de esta, disminuye conforme avanza el desarrollo. En P7, se observan cadenas celulares longitudinales 3α -HSOR⁺ cercanas al CC (flecha en G). El plexo coroideo (PxC) presenta un marcaje particularmente intenso para la enzima (D y G). (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P1, P4, y P7 respectivamente. La expresión de PSA-NCAM en las fibras del CC disminuye un poco conforme avanza el desarrollo. La ECZSV es inmunonegativa para esta molécula. (C, F y I) Las células de la ECZSV son 3α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁻. En P7, las cadenas longitudinales son 3α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺ (flechas en I y H). Barras de escala: 50 μ m.

Por otra parte, el CC está constituido por una alta densidad de fibras altamente inmunopositivas para PSA-NCAM (Fig.24B).

En P4, la ECZSV está conformada por un menor número de células. Estas son 3α -HSOR⁺ aunque el marcaje es más difuso que en P1. Sin embargo, se siguen observando claramente las cadenas de células inmunopositivas para la enzima que surgen de esta capa y que penetran en el CC (Fig.24D). Las fibras del CC a esta edad siguen presentando una alta inmunoreactividad para PSA-NCAM (Fig.24E).

En P7, se observó que en la ECZSV la expresión de la 3α -HSOR disminuye y el marcaje es mucho más difuso. Sin embargo, se pudo observar claramente en esta zona un conjunto de células inmunoreactivas para la 3α -HSOR conformando cadenas longitudinales que están en contacto con el CC (Fig.24G). Estas células son además PSA-NCAM⁺ (Fig.24I). También, se pueden observar varias células 3α -HSOR⁺ que surgen de la ECZSV y penetran en el CC, cuyas fibras expresan PSA-NCAM.

Adicionalmente, se puede observar en P4 y P7 una intensa inmunoreactividad para la enzima en el plexo coroideo (Figs.24D y 24G).

En P12, se puede observar una capa más delgada de células inmunopositivas para la 3α -HSOR en la ECZSV. En esta edad, también se pueden observar varias cadenas celulares 3α -HSOR⁺ que surgen de la ECZSV y entran en el CC (Fig.25A). Además, se observa una expresión considerable de PSA-NCAM en las fibras del CC (Fig.25B).

En P15 y P21, prácticamente no se encontró inmunoreactividad para la 3α -HSOR en la EZSV, y la capa de células que conforman esta región se ha reducido significativamente. De igual forma, se encontraron algunas células con una baja expresión de la enzima en el CC (Figs.25D y 25G).

Por otro lado, en P15 el CC es altamente inmunoreactivo para PSA-NCAM (Fig.25E). En P21, la expresión de esta molécula en el CC disminuye. Cabe destacar, que en P21, también se observó un conjunto de fibras PSA-NCAM⁺ en el cíngulo (Fig.25H). En esta región además se observan algunas células de gran tamaño que expresan la 3α -HSOR (Fig.25I).

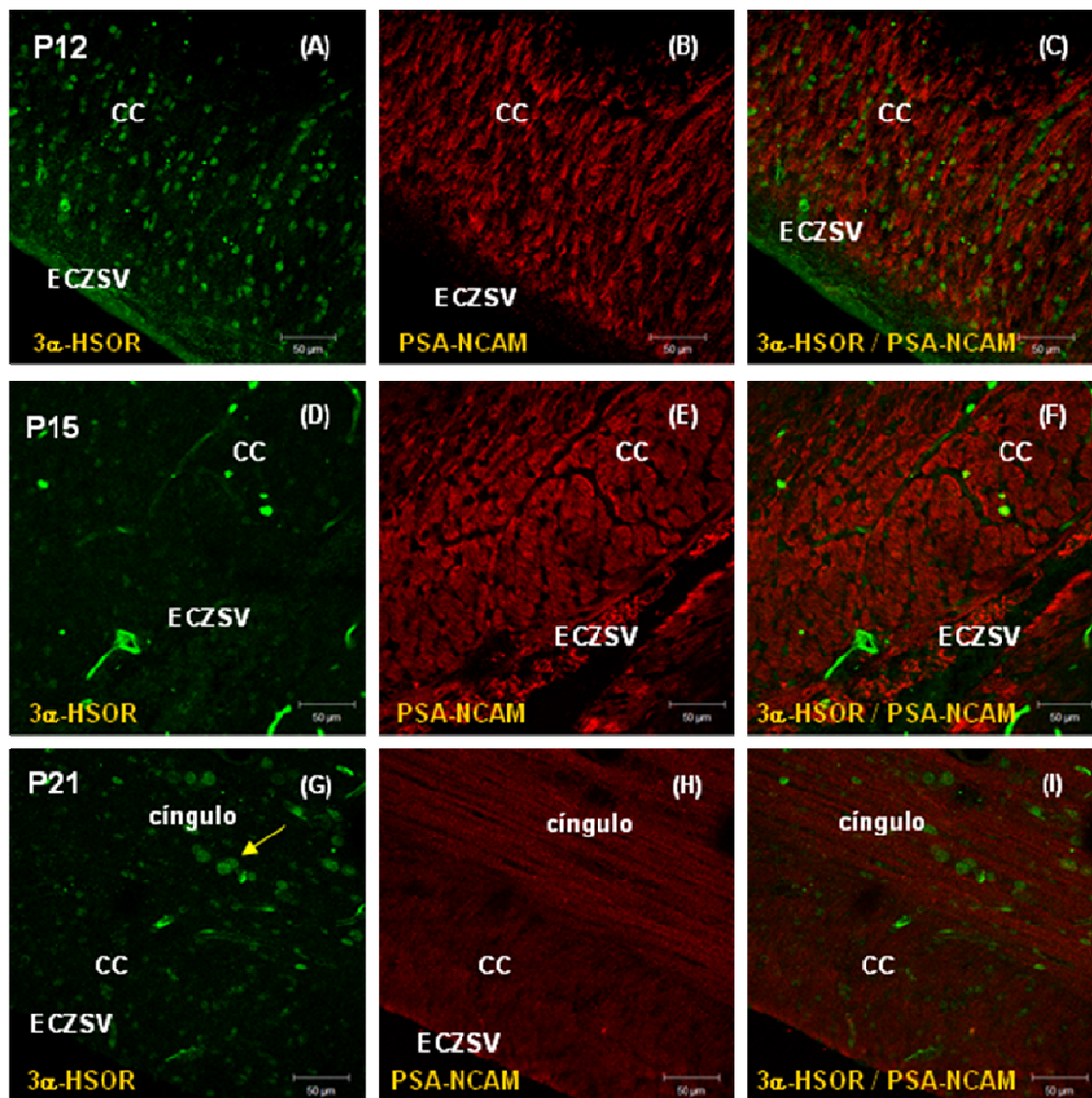


Figura 25. Inmunofluorescencia para la 3α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la extensión caudal (ECZSV). Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A, D y G) Expresión de la 3α -HSOR en P12, P15 y P21 respectivamente. La ECZSV se reduce considerablemente durante la última semana postnatal. En P12, aun se observa una alta expresión de la enzima principalmente en las células mas cercanas a la pared ventricular (A). En el cuerpo calloso (CC) de P15 y P21, se observan pequeñas células aisladas 3α -HSOR⁺. En el cíngulo de P21, se observan células de gran tamaño también 3α -HSOR⁺ (flecha en G). (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P12, P15 y P21 respectivamente. La expresión de esta molécula en las fibras del CC disminuye significativamente en P21. La expresión de PSA-NCAM en el cíngulo también es baja. (C, F y I) Las células del CC y del cíngulo son 3α -HSOR⁺/ PSA-NCAM⁺. Barras de escala 50 μ m.

e) Giro dentado del hipocampo

En P1, se pudo observar claramente una gran cantidad de células fuertemente marcadas con el anticuerpo anti-3 α -HSOR en el polo dentado (Fig.26A). A esta edad el GD no se encuentra aun bien estructurado. Por su parte, la expresión de PSA-NCAM es baja y difusa en toda la estructura (Fig.26B).

En P4, P7 y en P12 el marcaje para la 3 α -HSOR es muy similar. El GD se encuentra mejor estructurado y está conformado por un gran número de células altamente 3 α -HSOR⁺. Las células del hilus (H) también expresan la enzima (Figs.26 y 27). Tanto las células granulares como las células del hilus son altamente inmunopositivas para PSA-NCAM. Sin embargo, en P1 el marcaje para esta molécula es un poco menor que en P7 y P12 (Figs.26 y 27) Además, se puede observar claramente que esta molécula se expresa a nivel de la membrana plasmática y en las prolongaciones de estas células (Fig.26 y 27).

En P15, el GD presenta un marcaje claro aunque un poco más difuso para la 3 α -HSOR (Fig.27D). Adicionalmente, también se encontró una alta expresión de PSA-NCAM en esta región. En el hilus, se observan muy pocas células 3 α -HSOR⁺ pero se siguen observando fibras inmunopositivas para PSA-NCAM (Fig.27F).

Cabe destacar aquí que a lo largo del desarrollo postnatal, desde P1 hasta P15 no se pudo observar con claridad la ZSG, normalmente ubicada en la parte interna del GD, posiblemente por la alta inmunoreactividad que existe para PSA-NCAM en todo el GD de estos estadios.

Por otra parte, en P21, se observó una disminución de la 3 α -HSOR en el GD (Fig.27G). En cuanto a PSA-NCAM, se observa una alta inmunoreactividad para la molécula en un gran número de fibras que atraviesan el GD y que se originan de la ZSG. En P21, ya se logra distinguir fácilmente la ZSG se distingue fácilmente en la cara interna del GD gracias al marcaje contra PSA-NCAM (Fig.27I).

En P12, P15 y P21 se observa nuevamente una cantidad considerable de endotelios vasculares altamente inmunopositivos para la 3 α -HSOR en el GD (Fig.27). Varios de estos vasos inmunoreactivos se encuentran en estrecha relación con las fibras PSA-NCAM⁺ que atraviesan el GD (Figs.27 y 36B).

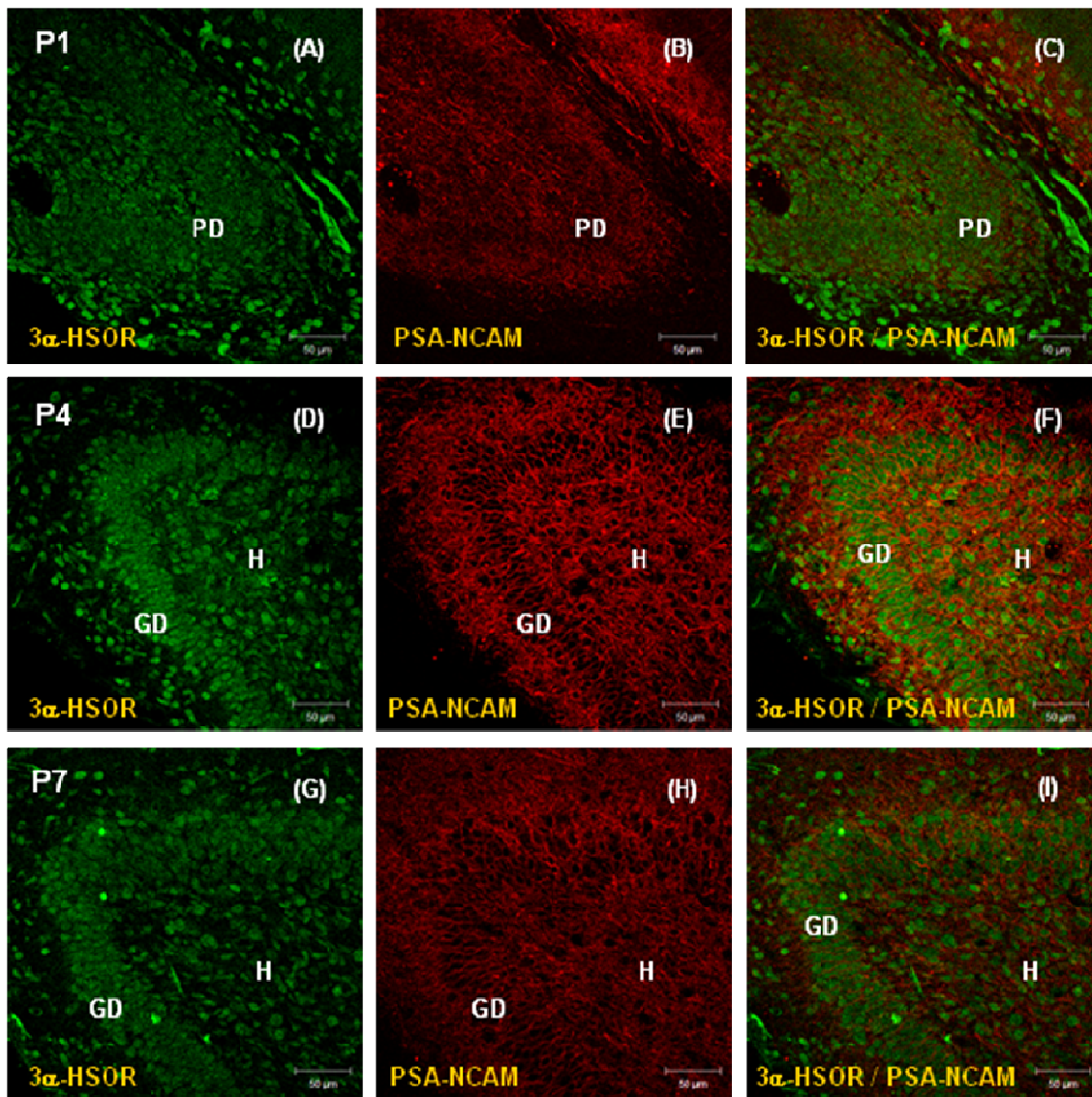


Figura 26. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel del hipocampo. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A, D y G) Expresión de la 3 α -HSOR en P1, P4 y P7 respectivamente. La expresión de la enzima es alta durante este período del desarrollo en las células del hipocampo. En P1, aun no se ha estructurado el giro dentado (GD). A esta edad, se forma el polo dentado (PD) conformado por una alta densidad de células (A). En P4, ya se distinguen el GD y el hilus (H) (D). (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P1, P4 y P7 respectivamente. En P1, el marcaje para PSA-NCAM es relativamente bajo y difuso. En P4 y P7 se observa claramente la expresión de la molécula en el GD y en el H. (C, F y I) La 3 α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en las células del GD y el H en los primeros estadios postnatales. Barrade escala: 50 μ m

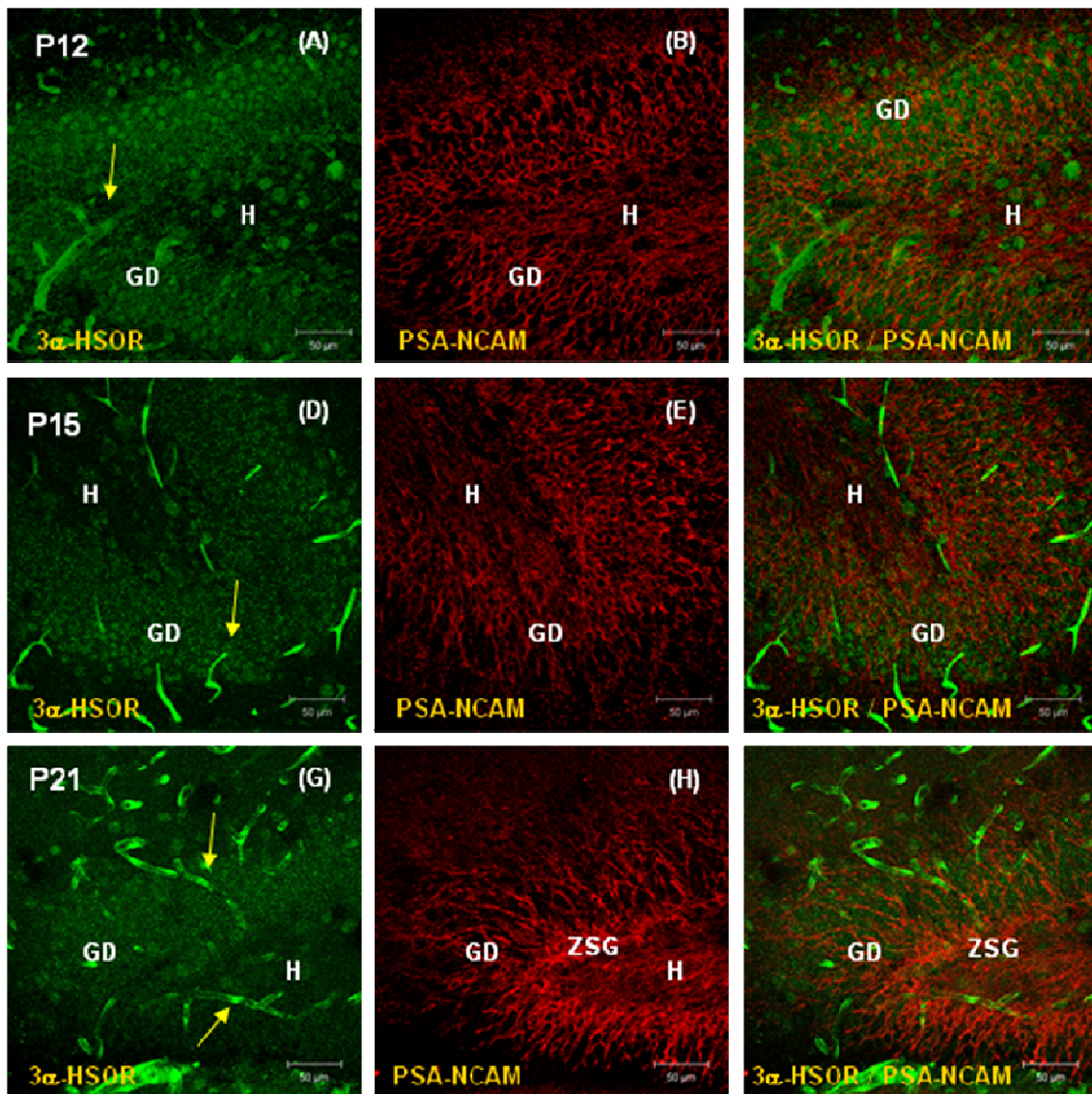


Figura 27. Inmunofluorescencia para la 3α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel del hipocampo. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A, D y G) Expresión de la 3α -HSOR en P12, P15 y P21 respectivamente. El marcaje para la enzima en el giro dentado (GD) de P12 y P15 es alto pero difuso. En P21, el marcaje es mas bajo. Lo mismo ocurre con la expresión de la 3α -HSOR en las células del hilus (H). Nótese, los endotelios vasculares 3α -HSOR⁺ asociados a al GD (flechas en A, D y G). (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P12, P15 y P21. PSA-NCAM se expresa en el GD y las fibras del H. En P21, se distingue la zona subgranular (ZSG) en el interior del GD. De esta zona proliferativa, surgen prolongaciones también PSA-NCAM⁺ que atraviesan el GD (H). (C, F y I) La 3α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en el GD hasta P21. Barras de escala: 50 μ m

Estructura	ZV		ZSV		VMR	ECZSV	BO	GD	VASOS
	Neoc.	EGL	Neoc.	EGL					
E14	+++	+++	NA	+++	NA	NA	++	NA	NA
E17	+	+	+	+	NA	NA	+/-	+/-	+/-
E20	+	+	++	+	NA	NA	+++	+/-	+/-
P1	NA		+		++	+++	+/-	++	+/-
P4	NA		++		++	++	+++	+++	+/-
P7	NA		+++		+++	++	+++	+++	+/-
P12	NA		+++		++	+/-	+/-	++	+++
P15	NA		+		+	-	+/-	++	+++
P21	NA		+		+	-	+/-	+	++

Tabla 1. Expresión de la 3 α -HSOR en las zonas neurogénicas durante el desarrollo embrionario y postnatal. Nótese, que la mayor expresión de la enzima en las zonas neurogénicas, en la etapa postnatal, se encontró en P4 y P7 (barras azules). La intensidad del marcaje está indicada por: (+++), (++) , (+), (+/-) y (-). NA (no aplica) se utilizó para aquellas estructuras que han desaparecido o que no se han formado en la edad que se está considerando. Abreviaturas: vía de migración rostral (VMR), extensión caudal de la ZSV (ECZSV), bulbo olfatorio (BO), giro dentado (GD), neocorteza (Neoc.) y eminencia gangliónica lateral (EGL).

2. Expresión de la 3 α -HSOR en las zonas no neurogénicas clásicas

En las zonas no neurogénicas clásicas, como la corteza y el cerebelo, también se encontró una expresión importante para la 3 α -HSOR que varía en función del desarrollo postnatal (Tabla 2).

a) Corteza

En P1, se pudo observar un gran número de células 3 α -HSOR⁺ distribuidas en toda la corteza. En la capa I de la corteza, se observó un grupo de células fácilmente distinguibles que expresan altamente la enzima. En la PC el marcaje de la 3 α -HSOR se observa tenue y difuso. En la SP, en cambio se pudo observar claramente un conjunto de células de gran tamaño que son inmunopositivas para la 3 α -HSOR. Por otro lado, en la zona intermedia (ZI) también se encontraron células que expresan la enzima. Como se mencionó anteriormente el CC y la ECZSV presentan una cantidad considerable de células 3 α -HSOR⁺ (Fig.28A).

En cuanto a la expresión de PSA-NCAM, a esta edad, se observa una alta expresión de la molécula principalmente a nivel de las fibras del CC, la zona intermedia (ZI) y en fibras de la capa I (Fig.28B).

En P4, a diferencia de P1, se observan claramente células 3 α -HSOR⁺ distribuidas en todas las capas de la corteza. En las capas más externas se encontró un conjunto de células de gran tamaño que expresa altamente la enzima. Por otra parte, en las capas internas se observan células más pequeñas que igualmente son inmunoreactivas para la 3 α -HSOR. En esta edad, aun se pueden observar células inmunopositivas para la enzima en la SP, así como también en la ZI. En el CC y la ECZSV se encontró también un cierto número de células 3 α -HSOR⁺ (Fig.29A).

PSA-NCAM se expresa intensamente en las fibras de la capa I y en el conjunto de fibras que forman el CC. En el resto de la corteza, se observa una baja inmunoreactividad para esta molécula (Fig.29B).

En P7, se observó nuevamente una gran cantidad de células altamente inmunopositivas para la 3 α -HSOR en la corteza. La capa I, ya completamente formada, presenta pocas células 3 α -HSOR⁺. Por

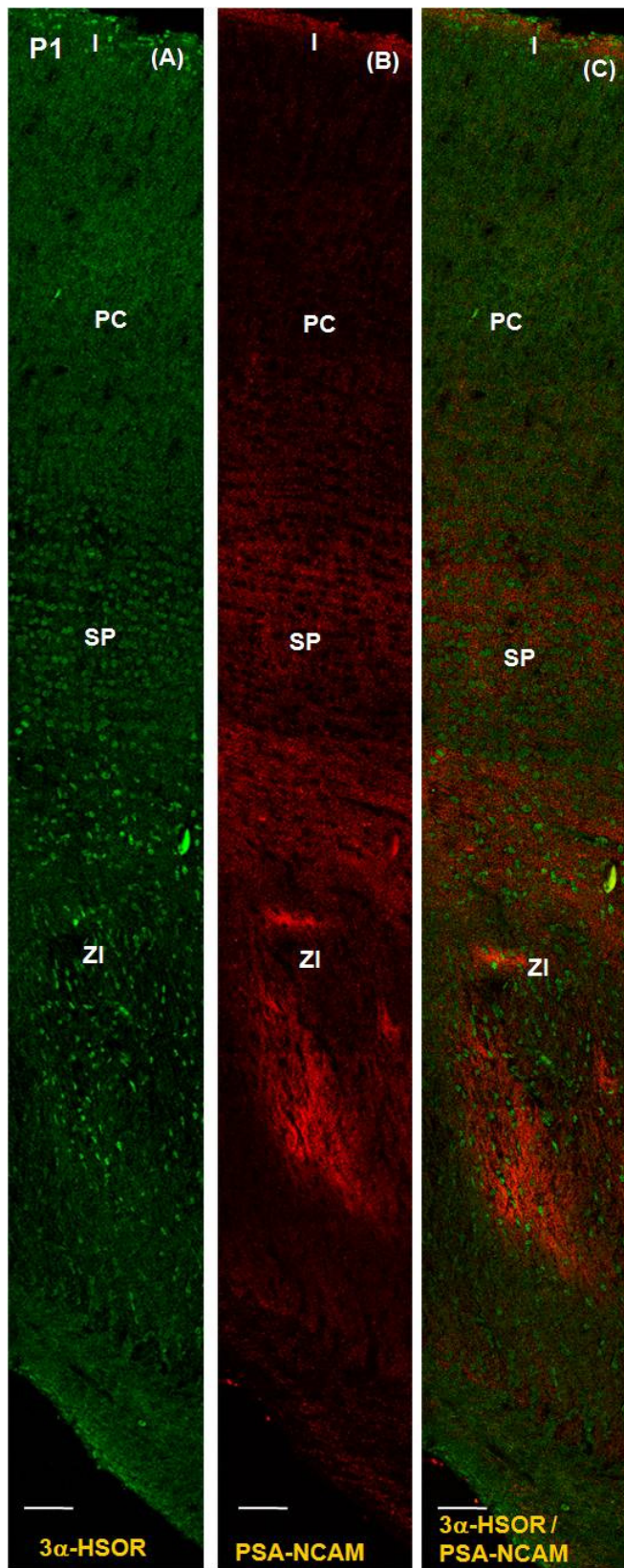


Figura 28. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1 a nivel de la corteza. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A) La 3 α -HSOR se expresa fuertemente en las células de la capa I. Aun no se distinguen las capas de la corteza en la placa cortical (PC) y el marcaje para la enzima es difuso. En la subplaca (SP) y en la zona intermedia (ZI) se observan células 3 α -HSOR⁺. Nótese, la diferencia morfológica de estas células. (B) PSA-NCAM se expresa en la capa I, en la SP y en las fibras de la ZI. (C) La 3 α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en la ZM, la SP y la ZI. En la PC las células son 3 α -HSOR⁺/PSA-NCAM. Barras de escala: 50 μ m

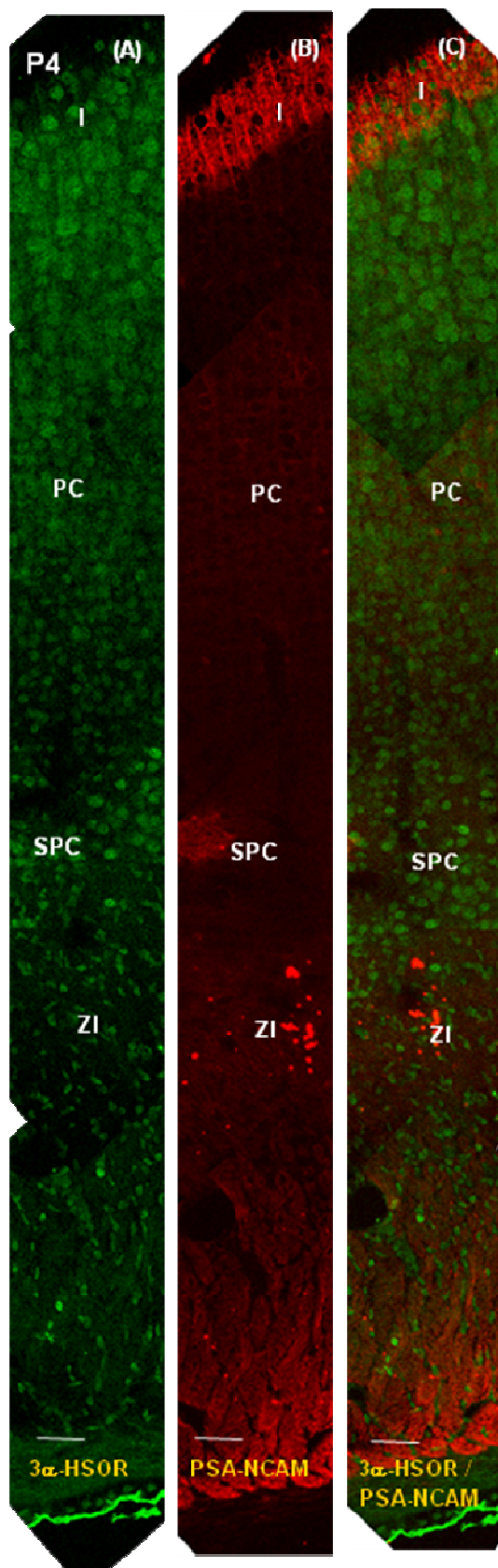


Figura 29. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P4 a nivel de la corteza. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A) La 3 α -HSOR se expresa en las células que conforman todas las capas de la corteza. En la placa cortical (PC) se comienza a observar la diferenciación de los distintos tipos celulares. La subplaca (SP) se ha reducido considerablemente. Nótese, los diferentes tamaños celulares en las distintas capas. (B) En general, la expresión de PSA-NCAM es muy baja en la corteza. En la capa I, el marcaje para la molécula es intenso al igual que en el cuerpo caloso. (C) Las células de la capa I son 3 α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺. Barras de escala: 50 μ m

el resto de las capas se observa una gran cantidad de células de tamaño variable que son inmunoreactivas para la enzima. En la ZI, el CC y la ECZSV igualmente se observan células 3α -HSOR⁺ (Fig.30A).

A esta edad, se observa una alta inmunoreactividad para PSA-NCAM en toda la corteza. Se puede observar claramente la expresión de la molécula en las fibras presentes en las distintas capas de la corteza, así como también en las fibras de la ZI y del CC (Fig.30B).

En P12, la capa I de la corteza está formada por pocas células que son 3α -HSOR⁺. En la región del cíngulo y en el CC también se encontraron células que expresan la enzima. Sin embargo, en las otras capas corticales se observa una cantidad considerable de cuerpos celulares altamente 3α -HSOR⁺ (Fig.31A). Por otro lado, PSA-NCAM se expresa claramente en las fibras de la capa I, en las fibras longitudinales del cíngulo y en las fibras del CC. Igualmente, se observa inmunoreactividad para esta molécula en las fibras de las células corticales (Fig.32B).

Es importante mencionar, que a esta edad, se encontró un número considerable de vasos sanguíneos inmunopositivos para la 3α -HSOR, distribuidos por toda la corteza. Por microscopia confocal, pudimos establecer claramente que son las células endoteliales las que expresan la enzima y no alguna otra estructura asociada a los vasos sanguíneos (Fig.36C).

En P15 y en P21, se encontró una disminución de la expresión de la 3α -HSOR en las células que conforman las distintas capas corticales. Esto se observa igualmente, en el cíngulo y el CC (Figs.33 y 32). Por otra parte, en ambas edades, se observa una baja expresión de PSA-NCAM en toda la corteza, aunque se encontró una mayor inmunoreactividad para la molécula en las fibras del cíngulo y del CC (Figs. 33 y 32).

Cabe destacar que en P15, se observó una gran cantidad de vasos 3α -HSOR⁺ distribuidos por toda la corteza. En P21, por el contrario, la expresión de la enzima en los endotelios vasculares disminuye (Figs. 33 y 32).

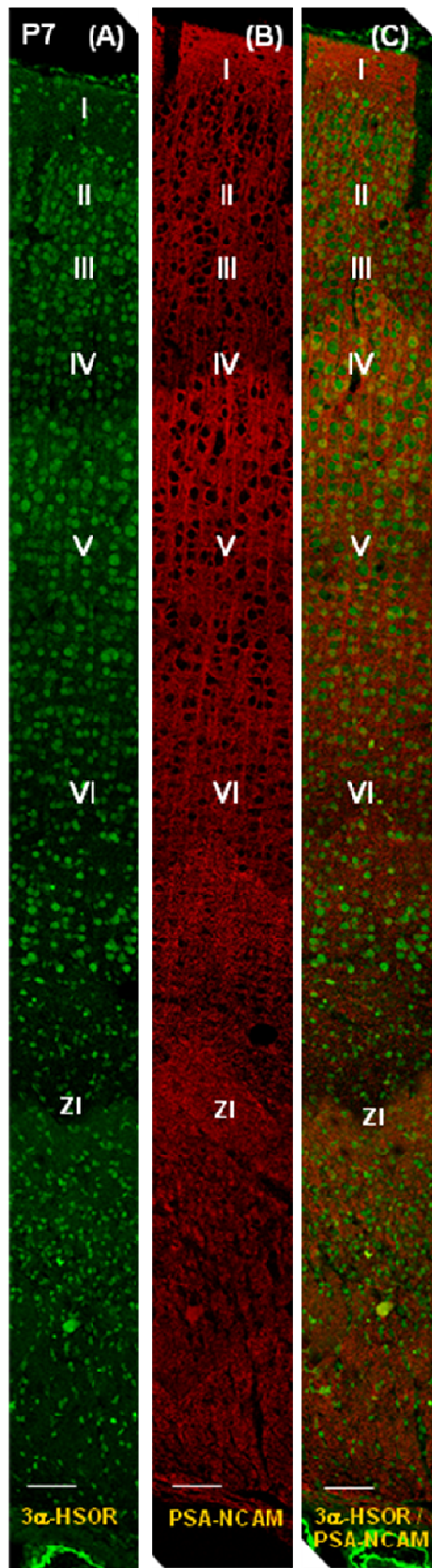


Figura 30. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P7 a nivel de la corteza. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A) En P7, ya se han formado todas las capas de la corteza. Todas las células que conforman estas capas son altamente 3 α -HSOR⁺. Se observa claramente las diferencias de tamaño celular en las distintas capas. En la capa I, la cantidad de células se ha reducido. (B) En toda la corteza el marcaje para PSA-NCAM es intenso. (C) Las células de la corteza en P7 son 3 α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺. Barras de escala: 50 μ m

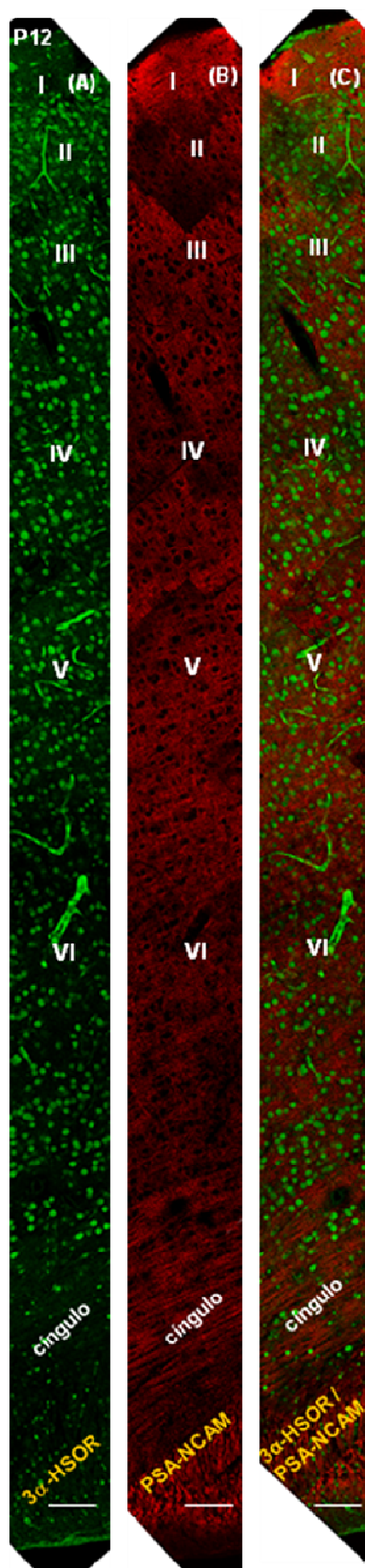


Figura 31. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12 a nivel de la corteza. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A) En todas las capas de la corteza se expresa altamente la 3 α -HSOR. Nótese, que las capas se han desarrollado considerablemente y se observa una mayor separación entre las células. Se observan también vasos 3 α -HSOR⁺. (B) La expresión de PSA-NCAM es considerable en la corteza, sin embargo es un poco mas baja que en P7 (comparar con fig. 31). En la capa I el marcaje para la molécula sigue siendo intenso. (C) La 3 α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en las distintas capas corticales. Barras de escala: 50 μ m

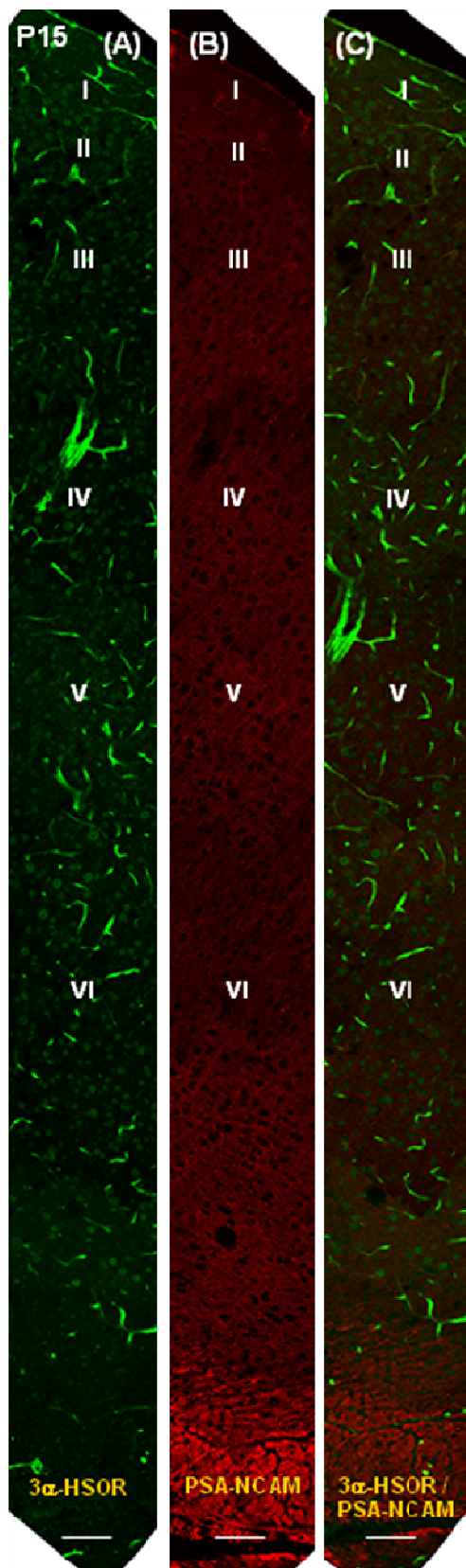


Figura 32. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P15 a nivel de la corteza. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopia confocal. (A) En P15, La expresi3n de la 3 α -HSOR en la corteza ha disminuido considerablemente. Se observan un gran n3mero de vasos sangu3neos fuertemente marcados para la enzima distribuidos por toda la corteza. (B) La expresi3n de PSA-NCAM es baja en las distintas capas de la corteza. En el cuerpo calloso (CC) la expresi3n de la mol3cula es significativamente alta (C) En P15, la 3 α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en la corteza. Barras de escala: 50 μ m.

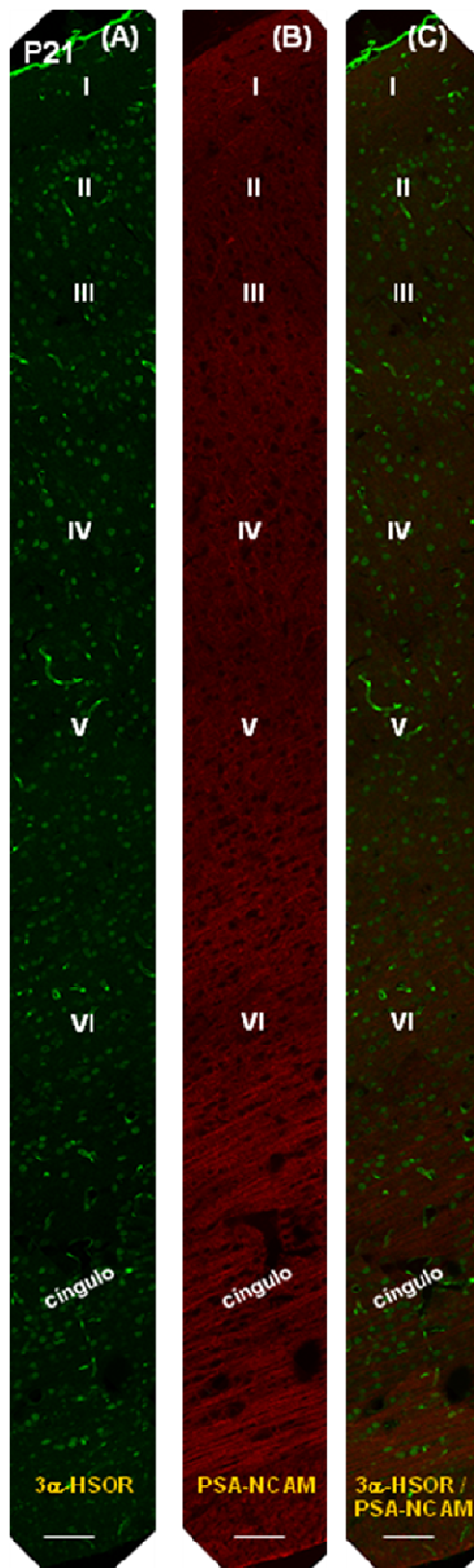


Figura 33. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P21 a nivel de la corteza. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (A) El marcaje para la 3 α -HSOR en la corteza de P21 es muy similar al que se observa en P15 (ver fig. 33). A esta edad, no se distinguen claramente los límites de cada capa. Por otro lado, la capa I, está conformada por pocas células. (B) PSA-NCAM se expresa en las prolongaciones celulares de la corteza, las cuales se observan bien desarrolladas. En la capa I se observan fibras PSA-NCAM⁺ paralelas a la superficie. (C) La 3 α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en la corteza de P21. Barras de escala: 50 μ m.

b) Cerebelo

En P1, se puede observar una gran cantidad de cuerpos celulares inmunoreactivos para la 3α -HSOR distribuidos en la capa granular interna y en la capa granular externa. En este período del desarrollo no se pudo distinguir claramente las células de Purkinje (Fig.34A). Por otro lado, en ambas capas, principalmente en la capa granular externa se observó un gran número de prolongaciones celulares que expresan PSA-NCAM (Fig.34B).

En P4, se observan claramente células altamente 3α -HSOR⁺ en la capa granular interna y también se pueden distinguir varias células de Purkinje que expresan la enzima. En la capa granular externa prácticamente no se observa inmunoreactividad para la 3α -HSOR (Fig.34D). En cuanto a PSA-NCAM, esta molécula se expresa altamente en fibras de la capa granular interna y en algunas prolongaciones adyacentes a la capa de células de Purkinje (Fig.34E).

En P7, se observan células de Purkinje 3α -HSOR⁺ que ya se encuentran dispuestas en una sola capa de células. También en la capa granular interna, se encontraron células inmunopositivas para la enzima, aunque presentaron un marcaje relativamente difuso. Una vez más, en la capa granular externa no se observa inmunoreactividad para el anticuerpo anti- 3α -HSOR (Fig.34G). Por otra parte, se encontró una alta inmunoreactividad para PSA-NCAM en la capa granular interna y en la capa molecular (Fig.34H).

En P12, nuevamente, se observa una alta inmunoreactividad para la enzima en las células de Purkinje. También se encontró una expresión considerable de la 3α -HSOR en la capa granular interna y en algunos cuerpos celulares en la capa molecular (Fig.35A). Por otro lado, se observaron células PSA-NCAM⁺ en la capa granular interna y en las células de Purkinje. En la capa molecular, se encontró una gran cantidad de prolongaciones que también expresan PSA-NCAM (Fig.35B).

En P15 y en P21, las células de Purkinje presentan un tamaño considerable y expresan claramente la 3α -HSOR. Las células de la capa granular interna también expresan la enzima, sin embargo en P15 el marcaje se vuelve más difuso. En la capa molecular, la inmunoreactividad para la

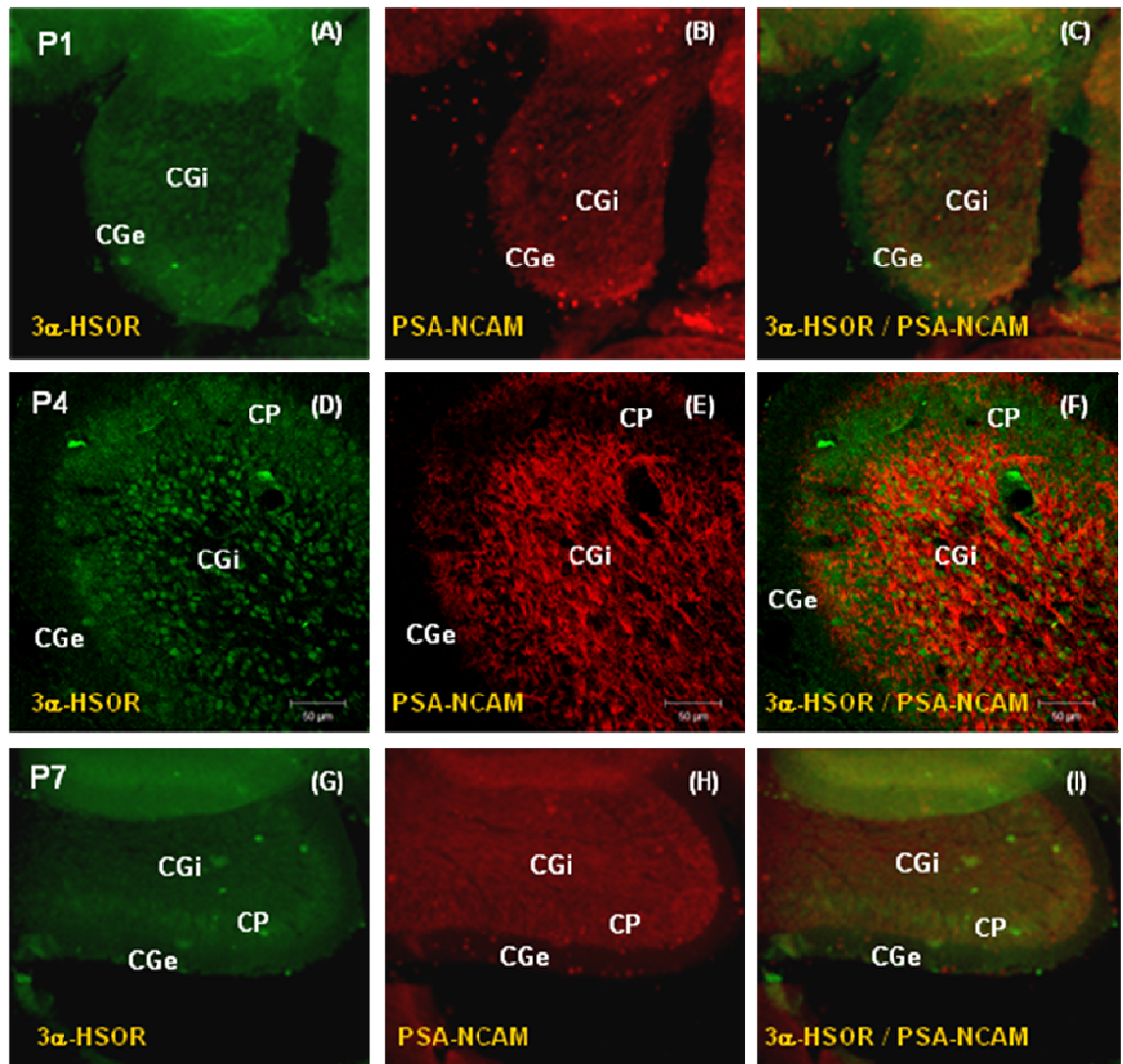


Figura 34. Inmunofluorescencia para la 3α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel del cerebelo. Las fotografías fueron tomadas utilizando un microscopio de epifluorescencia. Para P4 se utilizó microscopía confocal. (A, D y G) Expresión de la 3α -HSOR en P1, P4 y P7 respectivamente. En P1, el marcaje para la enzima es un poco difuso y se pueden distinguir la capa granular externa (CGe) y la capa granular interna (CGi). La CGe está conformada por una alta densidad de células. En P4, las células de la CGI y las células de Purkinje (CP) recién formadas, son claramente 3α -HSOR⁺, aunque en las CP el marcaje es mas difuso. En P7, la capa de CP comienza a estructurarse claramente. A esta edad la expresión de la 3α -HSOR en la CGe y en la CGI se observa difusa y ha disminuido considerablemente. (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P1, P4 y P7 respectivamente. Se observa una alta expresión de PSA-NCAM en la CGe y en la CGI de P1. A partir de P4, la expresión de esta molécula desaparece en la CGe, pero se mantiene alta en la CGI en las CP. (C, F y I) La 3α -HSOR colocaliza con PSA-NCAM en la CGe, la CGI y las CP durante la primera semana postnatal. Barras de escala: 50 μ m. Aumentos A-C y G-I 20x.

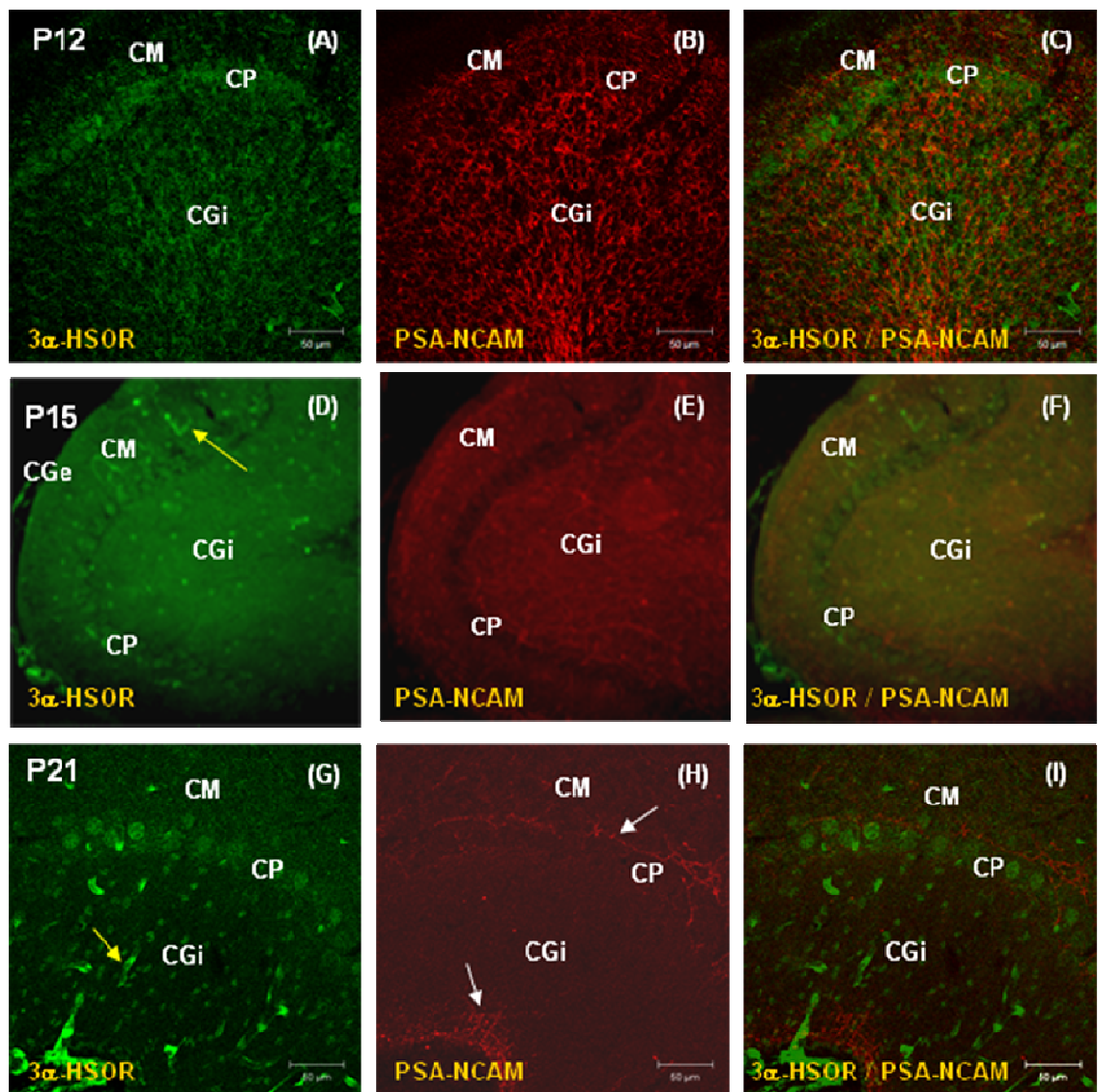


Figura 35. Inmunofluorescencia para la 3α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel del cerebelo. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal, excepto para P15 en donde se utilizó un microscopio de epifluorescencia (A, D y G). Expresión de la 3α -HSOR en P12, P15 y P21 respectivamente. La expresión de la 3α -HSOR en la capa molecular (CM) y en la capa granular interna (CGi) disminuye conforme avanza el desarrollo. Las células de Purkinje (CP) expresan igualmente la enzima y para esta etapa del desarrollo postnatal ya la capa de CR se ha estructurado completamente. La CGe, se ha reducido significativamente. La expresión de la enzima en esta capa es muy difusa. En P15 y en P21, se observan endotelios vasculares 3α -HSOR⁺ (flechas en D y G). (B, E y H) Expresión de PSA-NCAM en P12, P15, P21. La expresión de PSA-NCAM en la CGi y en las CP disminuye considerablemente durante esta etapa del desarrollo. En la CM, la expresión de la molécula es relativamente alta hasta P21. En esta última edad, se observan prolongaciones PSA-NCAM⁺ en la CGi y entre la capa de CP y la CM (flechas en H). (C, F y I) Las células del cerebelo durante este periodo postnatal son 3α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺. Barras de escala: 50 μ m. Aumentos: D-F 10x.

3 α -HSOR es baja, en ambas edades (Figs.35D y 35G). En P15, se observa un ligero marcaje para la enzima en la capa granular externa, la cual se ha reducido considerablemente en tamaño (Fig.35D). Por otro lado, en P15, se observan fibras PSA-NCAM⁺ en la capa granular interna y en la capa molecular (Fig.35E). En P21, la expresión de la molécula es muy baja, se observan sólo algunas prolongaciones en la parte más interna de la capa granular interna y en el límite de la capa molecular con la capa de células de Purkinje (Fig.35H).

En el cerebelo de ambas edades, se encontraron una vez mas endotelios vasculares 3 α -HSOR⁺ distribuidos por toda la estructura (Figs.34 y 35).

c) Otras estructuras

La 3 α -HSOR también se expresa considerablemente en otras estructuras durante el desarrollo postnatal, como por ejemplo, en el estriado, el BO accesorio, la fimbria del hipocampo y en algunas regiones del mesencéfalo. El marcaje de la enzima en estas estructuras es muy variado. En la fimbria y en el estriado se encontraron células claramente 3 α -HSOR⁺, por el contrario en el BO accesorio y en el mesencéfalo el marcaje es un poco más difuso. Por otra parte, PSA-NCAM se expresa principalmente en las fibras de la fimbria y el estriado, así como también en algunas prolongaciones celulares en el BO accesorio.

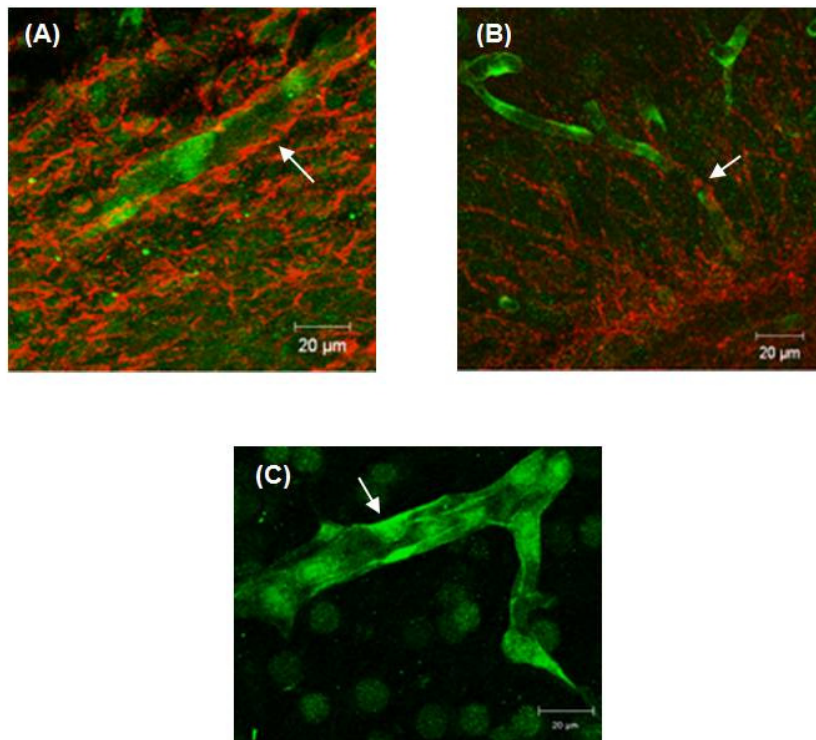


Figura 36. Inmunofluorescencia para la 3 α -HSOR (alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata mostrando vasos sanguíneos. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. **(A)** Vía de migración rostral de P12. Se observan progenitores PSA-NCAM⁺ en estrecha relación con el endotelio vascular (flecha). Las células del endotelio expresan altamente la 3 α -HSOR. **(B)** Giro dentado del hipocampo de P21. Se observan prolongaciones celulares PSA-NCAM⁺ en el GD en estrecha relación con vasos 3 α -HSOR⁺ (flecha). **(C)** Corteza de P12. La 3 α -HSOR se expresa claramente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (flecha). Barras de escala: 20 μ m.

Estructura Edad	Corteza	Cerebelo
*E14	++	NA
*E17	+/-	NA
*E20	+/-	+
P1	+/-	+/-
P4	++	++
P7	+++	++
P12	+++	++
P15	++	+/-
P21	+	+/-

Tabla 2. Expresión de la 3 α -HSOR en las zonas no neurogénicas clásicas durante el desarrollo embrionario y postnatal. (*) En las edades embrionarias la expresión de la 3 α -HSOR en la corteza incluye la zona marginal (o preplaca en E14), la placa cortical, la subplaca y la zona intermedia. Nótese, que la mayor expresión de la enzima en la corteza y el cerebelo postnatal, se encontró en P7 y P12 (barras azules). La intensidad del marcaje está indicada por: (+++), (++), (+), (+/-) y (-). NA: no aplica.

DISCUSION

I. ESTUDIO NEUROANATOMICO DEL CEREBRO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO

Con el estudio neuroanatómico del cerebro de rata realizado durante los períodos embrionario y postnatal, pudimos comprender mejor los diferentes cambios morfológicos e histológicos que ocurren a medida que avanza el proceso de desarrollo.

Los grandes cambios morfológicos se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario, donde también ocurre la mayor producción de nuevas neuronas a partir de las zonas neurogénicas que se desarrollan en la neocorteza y en las EG. En este caso, el marcaje con hematoxilina resultó útil para identificar las regiones neurogénicas en general, ya que éstas se caracterizan por una alta densidad de células de pequeño tamaño que se observan de color violeta intenso producto del marcaje de los núcleos. Con este estudio general, se pudo tener una visión de conjunto de cómo se van estructurando las zonas neurogénicas y cómo con el tiempo se restringen a sitios histológicamente definidos, formando así lo que se conoce como nichos neurogénicos.

Por otro lado, la tinción con hematoxilina y eosina permitió identificar algunas capas transitorias de la neocorteza, durante la última etapa embrionaria y las primeras etapas postnatales, y que luego desaparecen, como lo son la ZV, la ZI, la SP y la ZM. Esto resultó de gran utilidad para ubicar con mayor facilidad las células que expresaron la 3 α -HSOR en estas regiones del telencéfalo en desarrollo.

II. EXPRESIÓN DE LA 3 α -HSOR DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

1. Análisis general de la expresión de la 3 α -HSOR durante el desarrollo embrionario

La 3 α -HSOR se expresa altamente y de manera muy amplia en todo el telencéfalo embrionario. Sin embargo, la expresión de la enzima disminuye considerablemente en algunas estructuras a medida que avanza el desarrollo, tal es el caso de la ZV de la neocorteza y de la EGL. En otras estructuras por el

contrario, el marcaje para la enzima aumenta considerablemente durante el desarrollo embrionario, esto se observa en la ZSV, en los BO, en la PC y en el hipocampo. En términos generales la 3α -HSOR se expresa en el cerebro de rata durante el desarrollo embrionario siguiendo un patrón espacio-temporal definido lo que sugiere que la $3\alpha,5\alpha$ -THP puede participar en el control de la biología de las CMN y de los PN y por lo tanto participar en el proceso de desarrollo.

En la actualidad, se conoce poco acerca de los posibles efectos de la $3\alpha,5\alpha$ -THP sobre la neurogénesis embrionaria. Sin embargo, existen algunas evidencias que indican la presencia del NE en el cerebro durante el desarrollo embrionario e incluso ciertos trabajos muestran algunos efectos sobre la biología de las CMN y/o de los PN.

Con respecto a la presencia de la $3\alpha,5\alpha$ -THP en el cerebro embrionario, ésta pudo ser determinada en el cerebro de rata desde edades tempranas del desarrollo (Pomata y col., 2000). Por otra parte, Lauber y colaboradores en 1996, mediante hibridación *in situ* determinaron la distribución de la 5α -reductasa en el cerebro de rata durante el desarrollo embrionario y postnatal. Encontraron, que en etapas embrionarias tempranas el ARNm para esta enzima se encuentra distribuido ampliamente en todo el sistema nervioso. Entre E14 y E16, encontraron una alta expresión del ARNm de la 5α -reductasa en las zonas proliferativas que rodean al ventrículo, tanto a nivel del neuroepitelio cortical como de las EG. En los últimos días del desarrollo embrionario, entre E18 y E20, la expresión de este ARNm disminuyó y se encontró más difusa, observándose un mayor marcaje en la ZV y en la PC de la neocorteza. Estos resultados, en conjunto con los obtenidos en este trabajo para la 3α -HSOR, muestran una coexpresión regional de ambas enzimas durante el desarrollo embrionario y además, sugieren que desde edades muy tempranas del desarrollo se pueden producir en las zonas neurogénicas del telencéfalo, metabolitos de la PROG como la 5α -DHP y la $3\alpha,5\alpha$ -THP. Es interesante mencionar que en la mayoría de los tejidos esteroideogénicos se requiere de la acción concertada de la 5α -reductasa y de la 3α -HSOR para la síntesis de la $3\alpha,5\alpha$ -THP.

La actividad de estas enzimas se pudo demostrar en cultivos de CMN y PN, aislados de EG de cerebro de ratón de 14 días de gestación (equivalente a E16 en rata) (Melcangi y col., 1996). En estos cultivos la actividad de estas enzimas parece variar según el estadio de maduración de las células y en efecto, se observó que las cantidades de 5α -DHP y de $3\alpha,5\alpha$ -THP producidas eran altas en las células indiferenciadas.

Con respecto a los efectos que puede ejercer la $3\alpha,5\alpha$ -THP, se mostró que en células en cultivo, aisladas de hipocampo de rata de E18, la $3\alpha,5\alpha$ -THP ejerce un efecto sobre la morfología de las prolongaciones celulares (Brinton, 1994). En presencia del NE, los axones y dendritas se retraen significativamente y en este efecto participa la activación de receptores $GABA_A$. De esta manera, la $3\alpha,5\alpha$ -THP pudiese contribuir al desarrollo de los circuitos neuronales durante la etapa embrionaria (Brinton, 1994), aunque esto debe demostrarse con otros trabajos experimentales debido a que esta observación fue realizada únicamente *in vitro* en células en cultivo.

Por otro lado, se ha demostrado que la $3\alpha,5\alpha$ -THP ejerce un efecto sobre la proliferación de PN aislados de cerebro de embriones de rata, favoreciendo la expresión de genes que regulan el ciclo celular. Este efecto es ejercido mediante la activación de receptores $GABA_A$ y la activación de canales de calcio voltaje-dependientes (Wang y col., 2005).

El conjunto de estos resultados y los obtenidos en el presente trabajo, en donde se observa una amplia expresión de la 3α -HSOR en el cerebro de rata durante el desarrollo embrionario siguiendo además un patrón espacio-temporal definido, sugiere que la $3\alpha,5\alpha$ -THP puede participar en el control de la biología de las CMN y de los PN.

2. Inferencias funcionales de la expresión de la 3 α -HSOR durante el desarrollo embrionario

El análisis un poco más detallado del patrón espacio-temporal de la expresión de la 3 α -HSOR durante el desarrollo embrionario nos permite realizar algunas inferencias sobre los posibles efectos de la 3 α ,5 α -THP.

Cómo se mencionó anteriormente, en el telencéfalo, y en otras regiones del sistema nervioso embrionario, existen diversas zonas neurogénicas a partir de las cuales se producen todos los tipos celulares (neuronas y células gliales) que constituyen el parénquima nervioso adulto (ver introducción). En el telencéfalo, estas zonas neurogénicas son la ZV y la ZSV de la neocorteza y de las EG. En un primer tiempo, las CMN proliferan activamente para aumentar el número de éstas. Luego, los PN producidos a partir de las CMN, deben migrar a través de diferentes rutas hasta sus lugares de destino donde se diferencian. La migración de estos PN puede llevarse a cabo mediante un proceso de migración radial, utilizando la glía radial, y/o un proceso de migración tangencial. Una vez que llegan a su destino, las células deben posicionarse en su lugar correspondiente y diferenciarse, de modo que se va formando la citoarquitectura del sistema nervioso (ver introducción).

a) Posible efecto de la 3 α ,5 α -THP sobre la proliferación celular

Uno de los primeros eventos consiste en la proliferación de las CMN con lo cual aumenta el tamaño de la ZV y de la ZSV. En la EGL la ZSV se puede distinguir desde E14. En cambio, en la neocorteza comienza a aparecer sólo un poco antes de E17, y a medida que avanza el desarrollo aumenta considerablemente de tamaño al tiempo que la ZV desaparece (Haydar y col., 2000).

En el presente trabajo, únicamente con la coloración de hematoxilina y eosina, no se pudo distinguir la ZSV en la EGL (ver Fig.4B), ya que la coloración violeta que se observa producto del marcaje de los núcleos, es uniforme en toda la estructura. En este caso, el anticuerpo anti-PSA-NCAM resultó de gran utilidad, ya que permitió distinguir la ZSV de la ZV, tanto en la neocorteza como en la EGL. Durante las etapas tempranas del desarrollo, la expresión de esta molécula es muy baja o casi nula

en las células de la ZV, pero se expresa altamente en las células de la ZM y de la ZSV (Seki y Arai, 1991).

La ZV es la capa germinal primaria, cuyas células tienen una gran capacidad de proliferar y de autorrenovarse (Noctor y col., 2008). Al comienzo del desarrollo las células se dividen de manera simétrica, de modo que se incrementa el número de CMN en la ZV. Poco después se dividen asimétricamente, dando origen a PN (Noctor y col., 2008). A partir de éstos, se estructura la ZSV la cual aparece como la capa germinal secundaria y cuyos progenitores mantienen principalmente divisiones simétricas (Noctor y col., 2008).

La mayor inmunoreactividad para la 3α -HSOR en la ZV se encontró en E14, tanto a nivel de la neocorteza como a nivel de la EGL. En esta etapa, las CMN aun mantienen una división celular simétrica (Noctor y col., 2008). La expresión más baja de la enzima, se encontró en las últimas etapas de la gestación (E17 y E20), donde las CM, llevan a cabo principalmente divisiones celulares asimétricas (Noctor y col., 2008). A diferencia de lo encontrado en la ZV, la expresión de la 3α -HSOR en la ZSV aumenta durante el desarrollo embrionario. La expresión de la 3α -HSOR en estas capas germinales sugiere que la $3\alpha,5\alpha$ -THP pudiese desempeñar alguna función relacionada con el control de la proliferación celular.

A favor de este posible efecto de la $3\alpha,5\alpha$ -THP sobre la proliferación celular, existen una serie de evidencias que demuestran que el GABA, vía receptores $GABA_A$, es capaz de modular la proliferación de las CMN y de los PN de las zonas neurogénicas en las etapas embrionarias. En efecto, Haydar y colaboradores en el 2000, mostraron que el GABA incrementa la proliferación de las células de la ZV en los primeros estadios embrionarios, utilizando un modelo de rebanadas de cerebro *in vitro*. Los resultados que obtuvieron indican que el GABA reduce el tiempo del ciclo celular de las CMN de la ZV, obteniendo así un mayor número de divisiones celulares por unidad de tiempo. Además, el GABA era capaz de ejercer su efecto vía receptores $GABA_A$. En este mismo trabajo, se mostró que el GABA también inhibía la producción de células postmitóticas, es decir, las nuevas células generadas a partir de las CMN, que

migran hasta tomar su posición final en la PC. Los investigadores concluyeron, que el GABA podía entonces mantener a las células de la ZV proliferando, evitando su salida del ciclo celular y, por el contrario, en la ZSV, el GABA disminuiría la proliferación celular. Este mismo grupo de investigadores determinó también, en condiciones *in vivo*, que el GABA se produce en la neocorteza embrionaria y que su expresión disminuye en las zonas neurogénicas a medida que el desarrollo avanza. Por lo que proponen entonces que, a medida que la síntesis del GABA disminuye se va liberando la inhibición que éste ejerce sobre la proliferación de la ZSV, lo que permite aumentar el tamaño de esta zona neurogénica (Haydar y col., 2000). Al ser el receptor GABA_A el único receptor blanco de la 3 α ,5 α -THP descrito hasta el momento, esto abre la posibilidad de que la 3 α ,5 α -THP module también la proliferación de estas células.

b) Posibles efectos de la 3 α ,5 α -THP sobre la migración celular

Aparte del posible control sobre la proliferación, la 3 α ,5 α -THP pudiese también ejercer un efecto sobre la migración de los PN.

A partir de E17, las jóvenes neuronas formadas a partir de la ZV llevan a cabo un proceso de migración radial hasta posicionarse en la PC (Parnavelas, 2002). Por el contrario, los PN originados de las EG deben migrar hasta su lugar de destino empleando para ello una migración tangencial (Parnavelas, 2002). Los progenitores de las interneuronas GABAérgicas migran hasta la neocorteza donde se posicionan en algunas capas, como la ZM y la ZI, para luego tomar su lugar en la PC (Parnavelas, 2002).

En el presente trabajo, encontramos que la expresión de la 3 α -HSOR se mantiene considerablemente elevada durante los estadios E17 y E20 en las distintas capas de la neocorteza y en particular en la PC. Debido a la ubicación y al momento en que se expresa la enzima, es probable que la 3 α ,5 α -THP participe en la modulación de la migración de los PN.

Otra serie de evidencias apoya esta posibilidad. En efecto, se ha visto que el GABA puede modular la migración radial (Behar y col., 1996). Durante la última semana embrionaria (en E17), el GABA es sintetizado por las células cercanas y en los puntos de destino hacia donde se dirigen los

neuroblastos migratorios (Behar y col., 1996), es decir, el GABA se expresa en la ZM (Haydar y col., 2000), en la SP y en la ZI. En E20, el amino ácido se expresa en la PC, mientras disminuye en la ZI (Behar y col., 1996). Por otro lado, durante esta etapa, el GABA favorece, tanto la movilidad de las células, como su rapidez de movimiento, en condiciones *in vitro* y en condiciones *in vivo*. Esto sugiere entonces, que el GABA posiblemente sea liberado al microambiente por las células de estas capas y difunda a través del neuroepitelio sirviendo como un factor trófico para las células migratorias. Incluso, en estadios más cercanos al nacimiento, el GABA pudiera contribuir con la entrada y la organización de las jóvenes neuronas en la PC (Behar y col., 1996). Se ha reportado que el efecto del GABA en la migración de los PN en la neocorteza involucra distintos tipos de receptores GABA y en particular receptores GABA_A (Ma y Barker, 1995). Incluso, se ha encontrado la expresión de una gran variedad de subunidades de estos receptores en las células del neuroepitelio. Los ARNm de las subunidades α_4 , β_1 y γ_1 se expresan durante el desarrollo embrionario en las células de la ZV y en los PN de la ZSV y se expresan incluso en los neuroblastos durante la migración (Ma y Barker, 1995).

En el hipocampo embrionario, en E20, la 3 α -HSOR se expresa en la ZM y en células a nivel de la región CA3. Las interneuronas GABAérgicas del hipocampo migran principalmente a través de una vía de migración superficial adyacente a la ZM, de allí comienzan a colonizar la región CA1 (en E17) y posteriormente, cercano al nacimiento (en E19), colonizan la zona CA3 y lo que posteriormente será el GD (Manent y col., 2006). Esta migración parece estar modulada principalmente por glutamato, ya que el bloqueo del receptor GABA_A no causa efectos sobre la migración de estas células (Manent y col., 2006). Sin embargo, durante E17-E18, en condiciones *in vitro*, jóvenes células piramidales migratorias expresan receptores GABA_A funcionales, cuyos antagonistas reducen el largo de las prolongaciones de las células migrantes y disminuyen su migración (Manent y col., 2005). Esto sugiere entonces, que las células piramidales pueden ser capaces de reaccionar ante señales GABAérgicas del ambiente, provenientes de las células que siguen la ZM hasta el hipocampo (Manent y col., 2005).

De esta manera, los amino ácidos como el GABA y el glutamato, pudieran ejercer efectos en la migración de manera paracrina y sinérgica dependiendo del tipo celular (Manent y col., 2006), y los NE pudiesen modular estos efectos. Así, la 3α - 5α -THP pudiera potencialmente tener también una participación en la modulación de los procesos de migración que se dan en el neuroepitelio cortical en la última etapa del desarrollo embrionario. Posiblemente, al igual que el GABA, el NE sea liberado por las células de la ZM, de la SP y de la PC, convirtiéndose en un factor más del microambiente que participe en la migración celular y en la organización estructural de la corteza.

c) Posibles efectos de la 3α , 5α -THP sobre diferenciación celular

Una vez que los neuroblastos llegan a su destino, el GABA puede promover el crecimiento de las prolongaciones neurales y la diferenciación de los mismos (Leinekugel y col., 1999). Maric y colaboradores en 2001, mostraron en etapas embrionarias, que en condiciones *in vitro*, luego de migrar, las células del área de la PC/SP exhibían en su mayoría señales GABAérgicas autocrinas. Estas señales eran esenciales para el crecimiento de las prolongaciones neurales de estas células. De hecho, el bloqueo de los diferentes componentes del circuito GABAérgico, como la síntesis del GABA y la activación del receptor GABA_A, afectaban considerablemente la maduración de las neuronas de la PC/SP. En el presente trabajo, encontramos que la expresión de la 3α -HSOR es considerablemente elevada durante los estadios E17 y E20 en las distintas capas de la neocorteza pero en particular en la PC, sugiriendo una posible función de la 3α , 5α -THP, actuando vía receptores GABA_A, en la maduración neuronal.

En este mismo orden de ideas, se ha reportado que en el hipocampo, durante el período embrionario, el bloqueo del receptor GABA_A con bicuculina afecta considerablemente el crecimiento de las prolongaciones neurales en condiciones *in vitro* (revisado por Nguyen y col., 2001). En el BO, también se le ha atribuido un papel al GABA en la diferenciación de las células que conforman esta estructura durante las etapas embrionarias (Gascon y col., 2006; Popp y col., 2009).

En general, todos estos resultados, incluyendo los reportados en el presente trabajo, sugieren que la 3α , 5α -THP pudiese participar en la neurogénesis embrionaria modulando los efectos del GABA sobre

la proliferación, migración y diferenciación de las CMN y de los PN vía la activación de receptores GABA_A. Además, es interesante señalar que dependiendo de los requerimientos espacio-temporales una misma molécula o señal puede tener efectos distintos sobre estos procesos celulares.

III. EXPRESIÓN DE LA 3 α -HSOR DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL

La expresión de la 3 α -HSOR, tanto en las zonas neurogénicas como en zonas no-neurogénicas como la corteza y el cerebelo, comienza a aumentar poco antes del nacimiento y continúa así hasta P12. A partir de esta etapa, la expresión de la enzima disminuye, sin desaparecer por completo, hasta P21 donde el marcaje para la 3 α -HSOR es muy similar al del adulto (Gago y col., 2009) (Fig. 37).

1. Expresión de la 3 α -HSOR en las zonas neurogénicas durante el desarrollo postnatal

a) Expresión de la 3 α -HSOR en la ZSV, VMR y BO

En la ZSV de P1, el mayor marcaje para la 3 α -HSOR se encontró en un conjunto de células que bordean la pared anterior del ventrículo lateral. Estas células posiblemente se originaron de las CMN de la ZV. Por la ubicación que presentan dentro de la ZSV, es posible que sean progenitores de astrocitos descendientes de la glía radial (Marshall y col., 2002), específicamente de la glía radial localizada en la EGL (Young y col., 2007). Se ha reportado que estas células expresan GFAP y que tienen la capacidad de proliferar (Young y col., 2007).

En el resto de las edades postnatales, la expresión de la enzima fue más homogénea en toda la ZSV. Sin embargo, en P12 se pudo observar también un conjunto de células 3 α -HSOR⁺ agrupadas hacia la pared ventricular. Estas células pudieran ser las mismas que las que se observan en P1, ya que los astrocitos que se ubican en esta región, mantienen sus características y su posición a lo largo de todo el desarrollo postnatal y hasta la edad adulta (Marshall y col., 2002; Young y col., 2007). Por otro lado, en ambas edades estas células son PSA-NCAM⁻, lo que descarta la posibilidad de que sean neuroblastos

migratorios. Sin embargo, sería necesario realizar un marcaje contra GFAP para confirmar que se trata de progenitores con características astrocitarias.

Es interesante mencionar, que la tendencia que sigue la expresión de la 3α -HSOR durante el desarrollo postnatal coincide con la dinámica espacio-temporal de la proliferación celular en las zonas neurogénicas. Tanto en la ZSV, como en la VMR, la proliferación va aumentando hasta que alcanza el máximo en P12 y luego disminuye paulatinamente (sin desaparecer) hasta la etapa adulta (Faiz y col., 2005). Como ya se mencionó, incluso desde P7, se observa la más alta expresión de la enzima hasta edades posteriores a P12, donde decae y se mantiene muy similar al adulto (Gago y col. 2009). La gran mayoría de las células proliferativas en esta zona son nestina⁺ y algunas incluso son GFAP⁺. En la ZSV, gran parte de ellas están localizadas hacia el borde de la pared del ventrículo (Faiz y col., 2005). Así, la $3\alpha,5\alpha$ -THP pudiera cumplir un papel modulador sobre las células proliferativas de la ZSV y la VMR en función de los requerimientos temporales del desarrollo postnatal.

Por otra parte, se ha propuesto un efecto modulador del GABA actuando vía receptores GABA_A sobre las CMN y los PN de la ZSV y la VMR. En efecto, se ha descrito que los PN de la ZSV y de la VMR son despolarizados por el GABA vía receptores GABA_A (Wang y col., 2003) y que el GABA sintetizado y liberado por estos progenitores disminuye la proliferación de las células GFAP⁺/nestina⁺ de la ZSV, gracias a la activación del receptor GABA_A. Como a partir de estos astrocitos se originan los neuroblastos migratorios, esto sugiere una retroalimentación negativa que permite controlar la proliferación de las células GFAP⁺ y la producción de las células migratorias (Liu y col., 2005). Adicionalmente, se describió la expresión de distintas subunidades del receptor GABA_A en progenitores PSA-NCAM⁺ purificados, y se demostró que el GABA incrementa la proliferación de estas células de manera dosis dependiente y de forma específica vía receptores GABA_A (Gago y col., 2004).

Por otra parte, se ha visto que el GABA también ejerce efectos sobre la migración. Bolteus y Bordey 2004, mostraron en edades postnatales que en la VMR y en la ZSV, el GABA liberado por los neuroblastos disminuye la velocidad de migración de los mismos. Además, mostraron que los astrocitos

eran capaces de mantener los niveles de GABA en el microambiente gracias a la reincorporación celular del amino ácido.

El hecho de que el GABA actuando vía receptores GABA_A module aspectos fundamentales de la neurogénesis de la ZSV y de la VMR y que adicionalmente, en estas estructuras, se exprese de manera significativa la 3 α -HSOR sugiere que la 3 α ,5 α -THP pudiese actuar como una señal moduladora de la neurogénesis.

En el BO la expresión más alta de la 3 α -HSOR se encontró entre las edades P7 y P12. Esto resulta interesante ya que coincide con el período postnatal en el que se forman la mayor cantidad de células granulares. Poco antes de P15, la génesis de estas células decae (revisado por Morgane y col., 2002). En el adulto, se ha mostrado que los tipos celulares que constituyen el BO coexpresan los ARNm de la 5 α -reductasa y de la 3 α -HSOR (Agís-Balboa y col., 2006) y que además ésta última presenta la más alta actividad enzimática comparada con otras regiones del cerebro (Li y col., 1997).

Una vez que los neuroblastos llegan al BO, se diferencian en distintos tipos de interneuronas y se ha demostrado que el GABA participa en este proceso. Gascon y colaboradores en 2006, observaron que las señales GABAérgicas estabilizan el crecimiento axonal y promueven el desarrollo dendrítico de las nuevas células que llegan al BO. Además, este efecto era ejercido vía receptores GABA_A y por la activación de canales de calcio voltaje-dependientes. De esta manera, los cambios en los niveles de GABA que se puedan dar al pasar de la VMR al BO, pudiera influir en la inmovilización de las células y en su diferenciación (Gascon y col., 2006). Estas observaciones sugieren que, aparte de participar en los procesos de proliferación celular, la 3 α ,5 α -THP pudiera también modular los procesos de migración y de diferenciación celular.

b) Expresión de la 3 α -HSOR en la ECZSV y las cadenas radiales relacionadas

La ZSV, además de extenderse rostralmente hasta el BO, también presenta una extensión caudal o posterior que reviste el ventrículo lateral y que se extiende hasta el hipocampo. Al igual que la ZSV

anterior, la ECZSV disminuye en tamaño a medida que el desarrollo avanza, hasta que en P21 prácticamente desaparece por completo (ver Figs.24 y 25).

En todas las edades postnatales estudiadas, prácticamente todas las células 3α -HSOR⁺ de la ECZSV son PSA-NCAM⁻, excepto en P7 donde se observa un conjunto de células que también expresa la molécula de adhesión y que se localiza más adyacente al CC. Sin embargo, las células de la parte más ventral de la ECZSV son siempre 3α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁻.

La ECZSV se origina específicamente de la glía radial que se localiza en la ZV de la neocorteza embrionaria (Young y col., 2007) y al igual que su contraparte de la EGL, sufre un proceso de transformación convirtiéndose en astrocitos GFAP⁺ durante el período postnatal. Además, estos astrocitos permanecen en la parte más ventral de la ECZSV en donde, en P12, se pudo observar una capa celular que expresa fuertemente la 3α -HSOR (Ventura y Goldman, 2007).

Desde P1 hasta P12, se observó una gran cantidad de cadenas celulares 3α -HSOR⁺ y que surgen de la ECZSV y que atraviesan el CC. Se ha visto que los progenitores que se originan de esta región no sólo migran hasta el CC, sino que también llegan a la corteza y el BO, donde se pueden diferenciar en astrocitos maduros (Ventura y Goldman, 2007; Levison y col., 1993), oligodendrocitos (Menn y col., 2007; Levison y col., 1993) e incluso se diferencian en interneuronas GABAérgicas de la corteza y del BO (Inta y col., 2008).

En las primeras etapas postnatales, los PN que dan origen a células gliales colonizan el CC y la corteza, aquellos que permanecen en el CC se diferencian en oligodendrocitos, los que llegan a la corteza son capaces de dar origen también a astrocitos maduros. Sin embargo, después de P14 la gran mayoría de estos PN permanecen solo en el CC donde se diferencian en oligodendrocitos (Levison y col., 1993). Debido a esto es probable que las pequeñas células 3α -HSOR⁺ que se observaron en el CC de P21, correspondan a progenitores de oligodendrocitos. De hecho, se ha visto que los progenitores de oligodendrocitos aislados de cerebro de rata recién nacida son capaces de producir $3\alpha,5\alpha$ -THP *in vitro* (Gago y col., 2001).

Por otro lado, es interesante mencionar que la mayor producción de oligodendrocitos se da entre P4 y P12, período en el que ocurre principalmente el proceso de mielinización (revisado por Morgane y col., 2002). Por lo tanto, la $3\alpha,5\alpha$ -THP que pueda ser sintetizada en el CC durante esta etapa, posiblemente ejerza un efecto, no sólo en la producción de los oligodendrocitos, sino también en los procesos de mielinización.

Las células tipo astrocito que conservan características de CMN y que permanecen en la ECZSV, pueden dar origen a neuroblastos migratorios que llegan hasta el BO donde se diferencian en interneuronas GABAérgicas, así como ocurre con sus contrapartes de la VMR (Ventura y Goldman, 2007). Las cadenas celulares 3α -HSOR⁺/PSA-NCAM⁺ que se pudieron observar en la ECZSV en P7, pudieran corresponder a estos neuroblastos que se dirigen hasta el BO. De hecho, la orientación que siguen las cadenas es paralela a la superficie pial, a diferencia de las que penetran en el CC que son perpendiculares a ésta (Levison y col., 1993).

La expresión de la 3α -HSOR en la ECZSV y en las cadenas radiales y tangenciales que derivan de ésta sugiere que la $3\alpha,5\alpha$ -THP pudiese modular ciertos aspectos asociados con la función de esta zona neurogénica como la producción de células gliales (oligodendrocitos y astrocitos), la mielinización e incluso la generación de interneuronas GABAérgicas en la corteza y el BO.

c) Expresión de la 3α -HSOR en la ZSG y en el hipocampo

La otra zona neurogénica que se forma durante el desarrollo y que persiste hasta la etapa adulta es la ZSG del GD del hipocampo. A diferencia de la ZSV, la ZSG no se estructura como tal hasta mediados del período postnatal (Li y col., 2009; ver Figs. 4 y 6). A pesar de que también se origina de la ZV de la neocorteza embrionaria, la formación de la ZSG requiere de un primer paso que consiste en la relocalización de las células progenitoras de la ZV, para formar el polo dentado del cual surgirá luego la ZSG. Los PN durante la primera semana postnatal se mantienen en el polo dentado en una zona neurogénica previa difícilmente reconocible y donde mantienen una alta proliferación (Li y col., 2009). Por esta razón, en las últimas edades embrionarias y en P1, no se pudo distinguir ni el GD, ni la ZSG

(ver Fig.6C), esta última sólo empieza a reconocerse con facilidad a partir de P21. Por otra parte, la alta expresión de la enzima en el polo dentado, sugiere una posible participación de la $3\alpha,5\alpha$ -THP en la estructuración del GD y de la ZSG.

En P21, la ZSG se observa muy similar a la del adulto (Gago y col., 2009). Se distingue claramente como una capa delgada de células que expresan PSA-NCAM situadas en la parte interna del GD, y de las cuales surgen prolongaciones también PSA-NCAM⁺ que atraviesan la capa granular. En el adulto, se ha visto que las células granulares inmaduras recién formadas, permanecen un tiempo muy cerca de la ZSG y comienzan a extender sus fibras musgosas atravesando la capa granular y contactando con la capa molecular (Espósito y col., 2005). Además, estas células expresan PSA-NCAM (Seki y Arai, 1993) entre otros marcadores moleculares característicos de las células migratorias (Espósito y col., 2005). Estos marcadores desaparecen a medida que la célula se posiciona en su lugar correspondiente dentro del GD y se diferencia completamente en célula granular madura (Espósito y col., 2005).

A partir de P4, se puede distinguir con facilidad el GD. La más alta expresión de la 3α -HSOR en esta región, al igual que en el BO, se encontró entre P4 y P12, período en el cual se encuentra la mayor producción de células granulares (revisado por Morgane y col., 2002). En estas etapas postnatales tempranas, las jóvenes células granulares son capaces de liberar GABA a través de sus fibras musgosas, causando la despolarización de las células piramidales de la zona CA3 del hipocampo (Safiulina y col., 2006). Por otra parte, este efecto ocurre vía receptores GABA_A (Ben-Ari y col., 1994). Al comienzo del desarrollo esta despolarización pudiese ser importante para la maduración de las células piramidales y, luego en estadios posteriores, el GABA pasa a hiperpolarizar estas células así como lo hace en el adulto (Ben-Ari y col., 1994).

A lo largo de todo el período postnatal, se encontró que la 3α -HSOR no sólo se expresa en el polo dentado y luego en el GD si no que se expresa también de manera significativa en las células de la zona CA3 del hipocampo. Además, en el hipocampo adulto, al igual que en el BO, existe una colocalización de los ARNm de la 5α -reductasa y de la 3α -HSOR en las células granulares y en las

células piramidales de la zona CA3 (Agís-Balboa y col., 2006). Por lo tanto, la $3\alpha,5\alpha$ -THP producida en el hipocampo (Li y col., 1997) pudiera modular procesos relacionados con el desarrollo y el establecimiento de los circuitos sinápticos durante el desarrollo postnatal.

En general, todos estos resultados apoyan la idea de que la $3\alpha,5\alpha$ -THP puede ser sintetizada por los diferentes tipos celulares de las zonas neurogénicas y muestran también que el NE pudiera ejercer de manera paracrina/autocrina efectos sobre la proliferación (Wang y col., 2003; Gago y col., 2004), migración (Bolteus y Borrdey, 2004) y diferenciación de estas células (Gascon y col., 2006) vía receptores GABA_A.

2. Expresión de la 3α -HSOR en zonas no neurogénicas clásicas

a) Expresión de la 3α -HSOR en la corteza

Se encontró una expresión considerable de la 3α -HSOR en la corteza y el cerebelo. Estas estructuras, aunque no mantienen la capacidad neurogénica en la edad adulta, sufren cambios importantes durante las diferentes etapas del desarrollo, en los que se establecen y organizan las redes neuronales que permitirán su correcto funcionamiento en la etapa adulta.

En P1, todavía se observa una estructura cortical muy similar a la de E20. A esta edad, las células en la PC son pequeñas y aun se encuentran muy agrupadas. Sólo se puede distinguir la capa I, ya que el resto de las capas no se han formado como tal (Eayrs y Goodhead, 1959). El marcaje para la 3α -HSOR en la PC de P1, se observó difuso, excepto en la capa mas externa donde se distinguen claramente células altamente 3α -HSOR⁺. Por otro lado, a esta edad, la región más externa de la corteza presenta menos axones desarrollados que los que se encuentran en la región más interna (Eayrs y Goodhead, 1959). Además, el CC no se ha desarrollado por completo, por lo que la ZI está constituida principalmente por neuroblastos migratorios (Eayrs y Goodhead, 1959). Posiblemente, la inmunoreactividad para PSA-NCAM que se observa en la SP y la ZI, corresponda tanto a los axones en desarrollo como a las células migratorias.

En P7, se observa ya la diferenciación completa de la corteza y se distinguen las 6 capas características de la etapa adulta (Eayrs y Goodhead, 1959), todas ellas son altamente 3α -HSOR⁺. Además, ya se han formado muchas de las prolongaciones celulares (Eayrs y Goodhead, 1959), por lo que se observa un aumento considerable de la expresión de PSA-NCAM.

En P12, las diferentes capas de la corteza se distinguen mucho mejor y las células se aprecian más individualizadas, probablemente por un aumento en la densidad de las prolongaciones (Eayrs y Goodhead, 1959). Los marcajes para la 3α -HSOR y para PSA-NCAM son similares a los encontrados en P7.

Por último, alrededor de P15 la corteza presenta todas las características del adulto y los cambios que se dan de aquí en adelante, son esencialmente cuantitativos, como la densidad de las prolongaciones nerviosas por ejemplo (Eayrs y Goodhead, 1959). En estas últimas etapas del desarrollo, la expresión de la 3α -HSOR y de PSA-NCAM ha disminuido. Se ha visto que PSA-NCAM regula negativamente el proceso de mielinización (revisado por Bonfanti, 2006), por lo que la disminución de su expresión durante esta etapa pudiera favorecer este proceso. De hecho, alrededor de P15 es cuando el proceso de mielinización alcanza su punto máximo (revisado por Morgane y col., 2002). Además, esto también pudiera estar relacionado con la culminación de los procesos de modelación y estructuración de la corteza (Eayrs y Goodhead, 1959) en los cuales se requería mantener una interacción célula-célula mucho más flexible, y en donde la expresión de PSA-NCAM es necesaria.

Durante las primeras etapas postnatales, las células de la ZM (o capa I) y las células de la SP producen GABA y presentan corrientes postsinápticas espontáneas. Esto pudiera ser importante durante este período para la formación de los primeros circuitos sinápticos. El establecimiento previo de una red cortical transitoria entre estas células y las neuronas recién formadas de la PC, pudiera servir de base o de guía para el desarrollo de los circuitos sinápticos y la organización en columnas de estas nuevas células. Una vez que culmina el período de migración, y la formación de las capas corticales, la mayoría de las células de la ZM y de la SP desaparecen, completándose así la estructura columnar y laminar

típica de la corteza adulta (revisado por Luhmann y col., 2002). La presencia de la 3 α -HSOR en estas capas transitorias, sugiere entonces que la 3 α ,5 α -THP durante las primeras edades postnatales, pueda contribuir con estos procesos de modelación y conectividad celular en la corteza.

De hecho, se ha reportado que la administración vía intraperitoneal de concentraciones elevadas de 3 α ,5 α -THP en ratas durante el período postnatal temprano (P1-P5), trae como consecuencia alteraciones en la localización de las interneuronas GABAérgicas de la corteza, disminuyendo el número de estas células en las capas II/III y aumentando su número en la capa IV (Grobin y col., 2003). Por otro lado, se estableció que en estas alteraciones participa el receptor GABA_A (Grobin y col., 2006). Esto supone entonces que, para que se dé el desarrollo normal en etapas postnatales tempranas de la organización estructural de la corteza se requieren bajas concentraciones del NE. En el presente trabajo, encontramos precisamente una baja inmunoreactividad para la 3 α -HSOR en esta etapa postnatal.

En edades más avanzadas, entre P10 y P14, la concentración de 3 α ,5 α -THP es elevada en la corteza (Grobin y Morrow, 2001). Esto coincide con el período en el que encontramos que la 3 α -HSOR alcanza la más alta expresión en la etapa postnatal (Fig.37) y también coincide con el período en el que el GABA pasa de excitador a inhibidor (revisado por Grobin y Morrow, 2001). Es posible que en este período la 3 α ,5 α -THP pase de ser un modulador del efecto morfogénico del GABA a ser un modulador del efecto neurotransmisor del GABA, ambos efectos mediados por el receptor GABA_A.

b) Expresión de la 3 α -HSOR en el cerebelo

En cuanto al cerebelo, la 3 α -HSOR se expresa principalmente en la capa granular interna y en las células de Purkinje, independientemente de la etapa del desarrollo.

El desarrollo del cerebelo es uno de los más complejos del sistema nervioso (para revisión: Sudarov y Joyner, 2007). Sin embargo, una gran cantidad de sus PN provienen también de la ZV del telencéfalo, y los procesos de proliferación y migración que ocurren en el desarrollo cerebeloso son similares a los de la neocorteza (Leto y col., 2006). Otros progenitores se originan también de la parte lateral del rombencéfalo (revisado por Leto y col., 2006). En los primeros estadios embrionarios estos

progenitores se sitúan en la capa granular externa donde comienzan a proliferar hasta aproximadamente P16 (Leto y col., 2006). Luego, las nuevas células recién formadas migran, a través de la capa molecular por medio de la glía de Bergmann hasta la capa granular interna, para formar posteriormente las células granulares del cerebelo (Komuro y col., 2001). Al tiempo que esto ocurre, las células de Purkinje comienzan a desarrollarse y organizarse formando la monocapa celular típica del adulto (McKay y Turner, 2005).

Desde un poco antes del nacimiento y en los primeros estadios postnatales, las células de la capa granular interna también son capaces de proliferar (Leto y col., 2006). La expresión más alta de la 3α -HSOR en esta capa, se encontró precisamente en las primeras etapas. Se sabe, que las células del cerebelo son capaces de producir NE durante el período postnatal y que éstos pueden contribuir con los procesos básicos del desarrollo, entre estos NE se encuentra la PROG y la $3\alpha,5\alpha$ -THP (revisado por Tsutsui y col., 2008). La $3\alpha,5\alpha$ -THP, en células granulares aisladas de cerebros de ratas entre los estadios P6 y P8, puede aumentar la proliferación de estas células vía receptores $GABA_A$. Además, la activación de este receptor, así como en otros PN, es capaz de activar canales de calcio voltaje-dependientes (Keller y col., 2004). Posiblemente, este efecto de la $3\alpha,5\alpha$ -THP sea ejercido también en etapas más tempranas del desarrollo.

Por otro lado, en las células de Purkinje la PROG es capaz de promover el crecimiento dendrítico de estas células y promueve la sinaptogénesis a través de la activación de su receptor intracelular (Tsutsui y col., 2001). Aunque, la $3\alpha,5\alpha$ -THP al parecer no es capaz de ejercer este efecto en las células de Purkinje, se ha mostrado que favorece la supervivencia de estas células durante su desarrollo (revisado por Tsutsui y col., 2008).

De esta manera, la $3\alpha,5\alpha$ -THP en la corteza y el cerebelo pudiera cumplir diferentes funciones dependiendo de los requerimientos temporales del desarrollo. Al comienzo, actuaría como un modulador de los efectos morfogénicos del GABA, contribuyendo en los procesos neurogénicos, en el establecimiento de los circuitos sinápticos y participando en la organización estructural del tejido, y

posteriormente, en edades más cercanas a la etapa adulta, la $3\alpha,5\alpha$ -THP pasaría a modular el efecto del GABA como neurotransmisor en los procesos sinápticos, trayendo como consecuencia efectos sobre el comportamiento como por ejemplo, en el sueño, la memoria y el estrés, entre otros (revisado por Schumacher y Robert, 2001).

3. Expresión de la 3α -HSOR en los endotelios vasculares

Es interesante mencionar que se observó una gran cantidad de endotelios vasculares 3α -HSOR⁺ distribuidos por todo el cerebro y en estrecha relación con las células de las zonas neurogénicas (ver Fig.36). En períodos tempranos del desarrollo, se observaron algunos vasos aislados 3α -HSOR⁺ en las EGL de E17 y de E20. La expresión de la enzima en las células endoteliales aumentó durante el desarrollo postnatal, observándose un marcaje muy intenso entre P12 y P21.

Desde muy temprano en el desarrollo, la formación del sistema nervioso y del sistema vascular cerebral están estrechamente relacionados (revisado por Barami y col., 2008). Ambos sistemas se relacionan con el tubo neural; las células del neuroectodermo dan origen a los PN y las células destinadas al sistema vascular cerebral se originan por angiogénesis una vez que el tubo neural es invadido por el sistema vascular principal (revisado por Barami y col., 2008; revisado por Frontczak-Baniewicz y Walski, 2003). A partir de aquí, el desarrollo de los dos sistemas prosigue simultáneamente y es posible que se cree un microambiente con señales mutuas que permitan el desarrollo de ambos (revisado por Barami y col., 2008).

En el sistema nervioso el proceso de angiogénesis es completado hasta P20 (revisado por Frontczak-Baniewicz y Walski, 2003) y se sabe que desde las edades embrionarias el cerebro presenta una alta vascularización, la cual va aumentando en complejidad hasta que culmina el desarrollo. Además, desde este período las células endoteliales se relacionan con las células de las zonas neurogénicas (Stubbs y col., 2009). Sin embargo, en la etapa embrionaria, se observaron muy pocos endotelios vasculares 3α -HSOR⁺ en estas zonas, lo que indica que la expresión de la enzima en los vasos depende de la etapa del desarrollo y quizás también de la maduración de las células endoteliales.

Aun no se tiene muy clara la función, o funciones, exactas que puedan cumplir las células endoteliales como elemento constituyente del nicho neurogénico. Pero se ha visto, que en la ZV y la ZSV embrionarias, las CMN y PN proliferan, agrupándose muy cerca de los endotelios vasculares (Stubbs y col., 2009). Incluso, en la etapa adulta ocurre algo similar con los PN de la ZSG, los cuales proliferan en el mismo lugar donde se localizan los capilares (Palmer y col., 2000). Por otro lado, en la ZSV adulta los astrocitos despliegan una prolongación más larga que se pone en contacto con las células endoteliales (Mirzadeh y col., 2008) y en el BO, los PN utilizan a los vasos como guía para realizar el proceso de migración hasta su posición correspondiente y diferenciarse (Bovetti y col., 2007). En rata adulta, se observó una estrecha relación entre progenitores PSA-NCAM⁺ y vasos 3 α -HSOR⁺ en la VMR, lo que apoya el posible papel de los vasos en los procesos de migración (Gago y col., 2009).

Todo lo anterior indica que las células endoteliales pudieran contribuir al mantenimiento del nicho neurogénico, posiblemente produciendo moléculas tróficas solubles y/o factores de contacto que le permitan a las CMN y a los PN mantener sus procesos de proliferación, migración y diferenciación. De hecho, estas células expresan moléculas como el factor neurotrófico derivado de plaquetas (*brain-derived neurotrophic factor*; BDNF) que permite la diferenciación neuronal. En base a los resultados obtenidos en este trabajo, una de estas moléculas tróficas o moduladoras podría ser también la 3 α ,5 α -THP. Se requerirían más investigaciones para establecer el efecto de este NE sobre la biología de la CMN y de los PN durante el desarrollo y en los nichos neurogénicos del adulto.

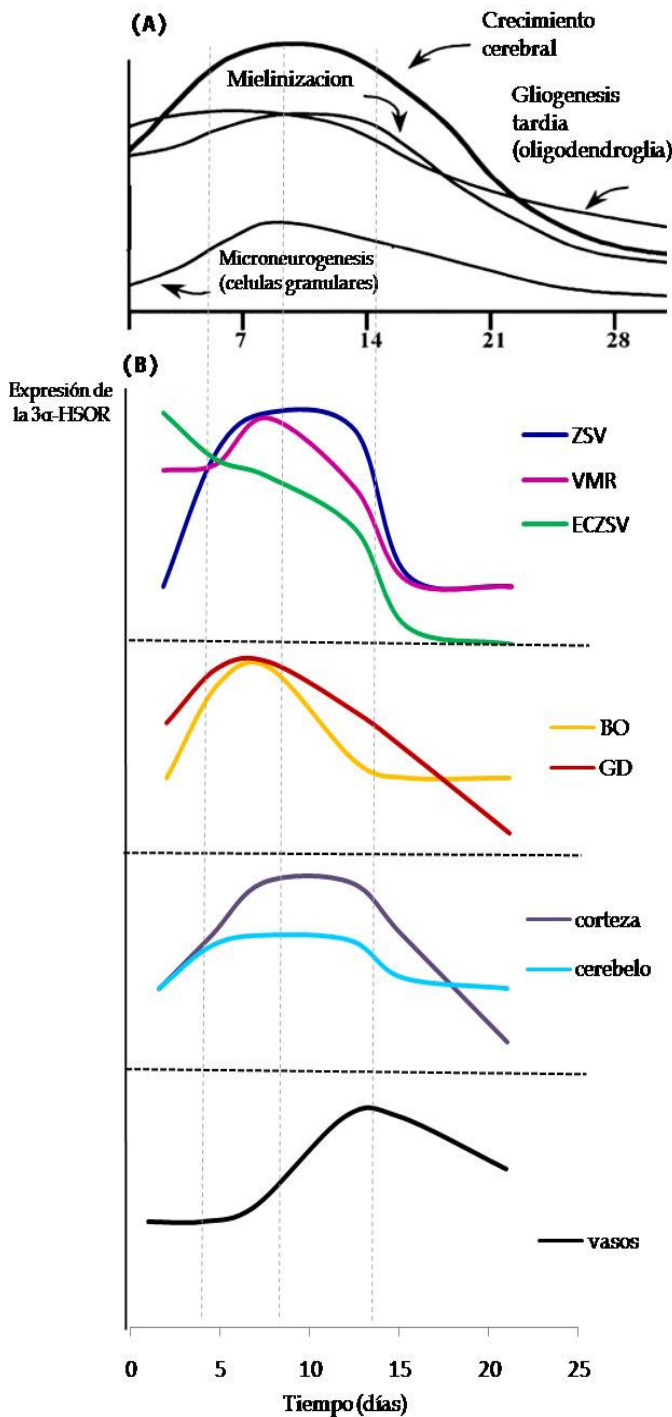


Figura 37. (A) Representación esquemática que muestra la variación de los eventos que ocurren durante el desarrollo postnatal conforme éste avanza (modificado de Morgane y col., 2002). **(B)** Variación cualitativa de la expresión de la 3α-HSOR durante el desarrollo postnatal en cada una de las estructuras estudiadas. La expresión de la enzima en las zonas neurogénicas (ZSV, VMR, BO, GD y ECZSV) es considerablemente alta durante la primera semana postnatal, donde se produce la mayor cantidad de células granulares y de oligodendrocitos (comparar con A). Luego, a medida que avanza el desarrollo la expresión de la 3α-HSOR comienza a disminuir paulatinamente sin desaparecer por completo. Sin embargo, la expresión de la enzima disminuye considerablemente en el GD y en la ECZSV. En la ZSV, la expresión de la 3α-HSOR se mantiene alta hasta P12. Por otro lado, en la corteza y el cerebelo la mayor expresión de la enzima comienza alrededor de P7 y se mantiene elevada hasta P12 aproximadamente. Esto coincide con el proceso de mielinización (comparar con A). Posteriormente, la expresión de la enzima comienza a disminuir. La expresión de la 3α-HSOR en los endotelios vasculares también alcanza su máximo en P12 y continúa relativamente alta hasta P21. La expresión de la 3α-HSOR siguiendo un patrón espacio-temporal definido sugiere que la 3α,5α-THP pudiese participar en el control de los distintos eventos que se ocurren durante el desarrollo.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo ha permitido establecer la distribución de la 3α -HSOR en el cerebro de rata durante el desarrollo embrionario y postnatal con lo cual se pudo observar una amplia expresión de la enzima la cual sigue un patrón espacio-temporal definido. En términos generales, el presente trabajo aporta evidencias anatómicas sobre la posible participación de la $3\alpha,5\alpha$ -THP en la biología de las CMN y de los PN, lo que abre muchas perspectivas de investigación.

Un aspecto importante de estudiar sería el de confirmar y/o establecer los distintos tipos celulares que expresan la 3α -HSOR. Los resultados obtenidos sugieren que la enzima se expresa en una gran cantidad de tipos celulares incluyendo CMN, PN, astrocitos, oligodendrocitos, y neuronas (interneuronas GABAérgicas, células piramidales, células granulares y células de Purkinje). Estos resultados pudiesen confirmarse utilizando marcadores específicos para estos tipos celulares.

Los resultados obtenidos abren un campo muy amplio de investigación, orientado a conocer específicamente el papel de la $3\alpha,5\alpha$ -THP en la biología de los distintos tipos celulares que la expresan y en particular en el control de la biología de las CMN y de los PN, específicamente en el control de la proliferación, la migración, la supervivencia y la diferenciación de estas células. En el laboratorio, se están adelantando trabajos en este sentido que tienen como objetivo el establecimiento de papel de la $3\alpha,5\alpha$ -THP en la proliferación de las CMN y de los PN de la ZSV y de la VMR tanto en el desarrollo postnatal como en el adulto.

Otro aspecto interesante de explorar, sería el de establecer claramente si la $3\alpha,5\alpha$ -THP, como factor modulador de la neurogénesis durante el desarrollo, se conserva en los nichos neurogénicos del adulto así como sucede con otras señales embrionarias como por ejemplo el GABA actuando vía receptores GABA_A.

Un resultado interesante desde el punto de vista de la fisiología del desarrollo fue el de observar la expresión de la enzima en CMN y PN, y luego hacia el final del desarrollo, en células plenamente diferenciadas como neuronas corticales o células de Purkinje en el cerebelo, sugiriendo que la $3\alpha,5\alpha$ -

THP puede ejercer primero un papel como modulador de la morfogénesis y luego como modulador de la neurotransmisión. Este tipo de cambio de función ha sido sugerido para el GABA, que primero desempeña funciones morfogénicas durante el desarrollo y luego funciones de neurotransmisión en el cerebro adulto actuando, en ambos casos, a través de receptores GABA_A. Sería interesante estudiar en profundidad este tipo de cambio de función o "switch" funcional para la 3 α ,5 α -THP.

Otro resultado inesperado y que abre muchas posibilidades de investigación fue la expresión de la 3 α -HSOR en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. En estas células la enzima se expresó ampliamente en todo el encéfalo pero siguiendo un patrón espacio-temporal definido lo que sugiere el desempeño de funciones específicas que resultarían muy interesantes de estudiar, y en particular las que se relacionan con la neurogénesis.

Un aspecto que resultó interesante fue el relacionado con la expresión de PSA-NCAM durante el desarrollo. La expresión de esta molécula de adhesión se utilizó esencialmente para facilitar el estudio de la expresión de la 3 α -HSOR debido a que PSA-NCAM se utiliza como marcador de PN y de estructuras muy plásticas. Sin embargo, pudimos observar una expresión muy amplia de la molécula que varía de manera espacio-temporal durante el desarrollo. Aunque PSA-NCAM ha sido utilizada ampliamente para trabajos de este tipo no se ha realizado, hasta donde sabemos, estudios sobre el patrón de expresión de esta molécula de manera sistemática a diferentes edades del desarrollo. El presente trabajo aporta información importante en este sentido la cual sería interesante ampliar para contribuir con el conocimiento que se tiene sobre el papel de PSA-NCAM en el desarrollo y en los procesos de plasticidad en términos generales.

Finalmente, trabajos de este tipo aumentan nuestro conocimiento sobre la neurogénesis y los factores capaces de modularla y potencialmente pudiesen contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a mejorar la regeneración del SNC.

CONCLUSIONES

En general, el estudio de la distribución de la 3α -HSOR en el cerebro de rata durante las etapas embrionarias y postnatales, proporcionó evidencias anatómicas significativas en cuanto a la posible función de la $3\alpha,5\alpha$ -THP como modulador de los procesos neurogénicos, entre los que se encuentra la proliferación, la migración y la diferenciación de los PN.

Entre las conclusiones mas relevantes de este trabajo se puede mencionar:

1. La 3α -HSOR se expresa ampliamente durante el desarrollo embrionario y postnatal. siguiendo un patrón espacio-temporal definido.
2. La expresión de la 3α -HSOR en general tiende a disminuir a medida que el desarrollo avanza.
3. Desde las etapas embrionarias hasta la etapa postnatal, la expresión de la 3α -HSOR es considerable en las zonas neurogénicas, siendo más alta al comienzo del desarrollo embrionario y durante el período comprendido entre P7 y P12.
4. La 3α -HSOR también se expresa durante el desarrollo de zonas no neurogénicas clásicas, como la corteza y el cerebelo.
5. Los endotelios vasculares 3α -HSOR⁺ pudieran formar parte de los nichos neurogénicos sobretodo en las últimas etapas del desarrollo postnatal.
6. En definitiva el presente trabajo aporta evidencias anatómicas sobre el posible papel de la $3\alpha,5\alpha$ -THP en el control de la biología de las CMN y de los PN.

BIBLIOGRAFIA

- Agís-Balboa RC, Pinna G, Zhubi A, Maloku E, Veldic M, Costa E, Guidotti A. 2006. Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**:14602-14607.
- Alvarez-Buylla A., Temple S. 1998. Stem cells in the developing and adult nervous system. *Neural stem cell.* **36**: 105-110.
- Ashok K.M., Ticku M.K. 1999. An update on GABA_A receptors. *Brain Res.* **29**: 196-217.
- Barami K. 2008. Relationship of neural stem cells with their vascular niche: implications in the malignant progression of gliomas. *J. Clin. Neurosci.* **15**:1193-7.
- Behar TN, Li YX, Tran HT, Ma W, Dunlap V, Scott C, Barker JL. 1996. GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J. Neurosci.* **16**:1808-18.
- Ben-Ari Y, Tseeb V, Ragozzino D, Khazipov R, Gaiarsa JL. 1994. γ -Aminobutyric acid (GABA): a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. *Prog Brain Res.* **102**:261-273.
- Bolteus AJ, Bordey A. 2004. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J. Neurosci.* **24**:7623-7631.
- Bonfanti L. 2006. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog. Neurobiol.* **80**: 129–164.
- Bonfanti L., Peretto P. 2007. Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Prog. Neurobiol.* **83**:24-36.
- Bonfanti L., Peretto P., Merighi A., Fasolo A. 1997. Newly-generated cells from the rostral migratory stream in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *Neurosci.* **81**: 489–502.
- Bonfanti L., Ponti G. 2007. Adult mammalian neurogenesis and the New Zealand white rabbit. *Vet. J.* **175**:310-31.
- Bordey A. 2006. Adult neurogenesis: basic concepts of signaling. *Cell Cycle.* **5**:722-728.
- Bovetti S, Hsieh YC, Bovolin P, Perroteau I, Kazunori T, Puche AC. 2007. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci.* **27**:5976-80.
- Bowery N.G. 1993. GABA_B receptor pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**: 109-147.
- Brinton RD. 1994. The neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one induces cytoarchitectural regression in cultured fetal hippocampal neurons. *J Neurosci.* **14**:2763-74.
- Brown, J.P., Couillard-Després S., Cooper-Kuhn C.M., Winkler J.A., Kuhn H.G. 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* **467**: 1-10.
- Campbell K, Götz M. 2002. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 2002. **25**:235-8.
- Chazal G., Durbec P., Jankovski A., Rougon G., Cremer H. 2000. Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J. Neurosci.* **20**: 1446–1457.
- Compagnone N., Mellon S. 2000. Neurosteroids: bioynthesis and function of these novel neuromodulators. *Neuroendocrinol.* **21**:1-56.

- Corbin J.G., Nery S., Fishell G. 2001. Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nature*. **4**:1177-82.
- De Carlos J. A., López-Mascaraque L., Valverde F. 1996. Dynamics of Cell Migration from the Lateral Ganglionic Eminence in the Rat. *J Neurosci*. **16**:6146–6156.
- De Marchis S., Temoney S., Erdelyi F., Bovetti S., Bovolin P., Szabo G., Puche A.C. 2004. GABAergic phenotypic differentiation of a subpopulation of subventricular derived migrating progenitors. *Europ. J. Neurosci*. **20**: 1307–1317.
- Doetsch F., Alvarez-Buylla A. 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **93**: 14895–14900.
- Doetsch F., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. **17**: 5046–5061.
- Eayrs JT, Goodhead B. 1959. Postnatal development of the cerebral cortex in the rat. *J Anat*. **93**:385–402.
- El-Etr M., Schumacher M., Baulieu E.E. 2000. Effects of progesterone and related steroids in the brain. En: Sitruk-Ware. R , Mischelle D.R. (Eds.). Progesterins and anti-progesterins in clinical practice. Marcel Dekker. Vasel, Pp. 15-59.
- Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*. **25**:10074-86.
- Faiz M, Acarin L, Castellano B, Gonzalez B. 2005. Proliferation dynamics of germinative zone cells in the intact and excitotoxically lesioned postnatal rat brain. *BMC Neurosci*. **6**:26.
- Fasolo A., Peretto P., Bonfanti L. 2002. Cell migration in the rostral migratory stream. *Chem. Senses*. **27**: 581-582.
- Filippov V., Kronenberg G., Pivneva T., Reuter K., Steiner B., Wang L.P., Yamaguchi M., Kettenmann H., Kempermann G. 2003. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol. Cell. Neurosci*. **23**: 373–382.
- Frontczak-Baniewicz M, Walski M. 2003. New vessel formation after surgical brain injury in the rat's cerebral cortex I. Formation of the blood vessels proximally to the surgical injury. *Acta Neurobiol Exp*. **63**:65-75.
- Gago N., Akwa N., Sananés N., Guennoun R., Baulieu EE., El-Etr M., Schumacher M. 2001. Progesterone and the oligodendroglial lineage: stage-dependent biosynthesis and metabolism. *Glia*. **36**: 295–308.
- Gago N., El-Etr M., Sananés N., Cadepond F., Samuel D., Avellana-Adalid V., Baron-Van Evercooren A., Schumacher M. 2004. 3 α ,5 α -Tetrahydroprogesterone (Allopregnanolone) and γ -Aminobutyric Acid: Autocrine/Paracrine Interactions in the control of neonatal PSA-NCAM⁺ progenitor proliferation. *J. Neurosci. Res*. **78**: 770–783.
- Gago, N., Mensah-Nyagan A.G., Guerrero, H., Cardillo, E., Marcano, D., Schumacher, M. 2009. Expression of the neurosteroid 3 α ,5 α -tetrahydroprogesterone in neurogenic zones of the adult rat brain. Manuscrito en preparación.

- Gascon E, Dayer AG, Sauvain MO, Potter G, Jenny B, De Roo M, Zraggen E, Demaurex N, Muller D, Kiss JZ. 2006. GABA regulates dendritic growth by stabilizing lamellipodia in newly generated interneurons of the olfactory bulb. *J Neurosci.* **26**:12956-66.
- Grobin AC, Gizerian S, Lieberman JA, Morrow AL. 2006. Perinatal allopregnanolone influences prefrontal cortex structure, connectivity and behavior in adult rats. *Neuroscience.* **138**:809-19.
- Grobin AC, Heenan EJ, Lieberman JA, Morrow AL. 2003. Perinatal neurosteroid levels influence GABAergic interneuron localization in adult rat prefrontal cortex. *J Neurosci.* **23**:1832-9.
- Grobin AC, Morrow AL. 2001. 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one levels and GABA_A receptor-mediated ³⁶Cl⁻ flux across development in rat cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res.* **131**:31-9.
- Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P. 2000. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci.* **20**:5764-74.
- Hevers; Lüddens. 1998. The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol Neurobiol.* **18**: 35-86.
- Hosie A.M., Wilkins M.E., da Silva H.M., Smart T.G. 2006. Endogenous neurosteroids regulate GABA_A receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* **444**: 486–489.
- Hu H., 2000. Polysialic acid regulates chain formation by migrating olfactory interneuron precursors. *J. Neurosci. Res.* **61**: 480–492.
- Ihrle R.A., Alvarez-Buylla A. 2008. Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res.* **331**:179–191.
- Inta D, Alfonso J, von Engelhardt J, Kreuzberg MM, Meyer AH, van Hooft JA, Monyer H. 2008. Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci.* **105**:20994-9.
- Jessell T.M., Sanes J.R. 2001. The induction and patterning of the nervous system. En: Kandel R.E., Schwartz J.H., Jessell T.M. (Ed.). Principles of Neural Science. Cuarta Edición. MacGraw-Hill, USA. Pp. 1020-1036.
- Jez J.M., Schlegel B.P., Penning T.M. 1996. Characterization of the substrate binding site in rat liver 3 α -hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase. The roles of tryptophans in ligand binding and protein fluorescence. *J. Biol. Chem.* **271**: 30190-30198.
- Keller EA, Zamparini A, Borodinsky LN, Gravielle MC, Fiszman ML. 2004. Role of allopregnanolone on cerebellar granule cells neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res.* **153**:13-7.
- Komuro H, Yacubova E, Yacubova E, Rakic P. 2001. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci.* **21**:527-40.
- Lambert J., Belelli D., Hill-Venning C., Callachan H., Peters J. 1996. Neurosteroid modulation of native and recombinant GABA_A receptors. *Cell. Mol. Neurobiol.* **16**: 155-173.
- Lauber ME, Lichtensteiger W. 1996. Ontogeny of 5 α -reductase (type 1) messenger ribonucleic acid expression in rat brain: early presence in germinal zones. *Endocrinology.* **137**:2718-30.
- Lauder J. 1993. Neurotransmitter as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.* **16**: 233-239.
- Laurie D. J., Wisden W., Seeburg P.H. 1992. The distribution of thirteen GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.* **12**: 4151-4172.

- Leinekugel X., Khalilov I., McLean H., Caillard O., Gaiarsa J., Y., Khazipov R. 1999. GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Advances in Neurology*. **79**: 189-201.
- Leto K, Carletti B, Williams IM, Magrassi L, Rossi F. 2006. Different types of cerebellar GABAergic interneurons originate from a common pool of multipotent progenitor cells. *J Neurosci*. **26**:11682-94.
- Levison SW, Chuang C, Abramson BJ, Goldman JE. 1993. The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development*. **119**:611-22.
- Li G, Kataoka H, Coughlin SR, Pleasure SJ. 2009. Identification of a transient subpial neurogenic zone in the developing dentate gyrus and its regulation by Cxcl12 and reelin signaling. *Development*. **136**:327-35.
- Li G, Kataoka H, Coughlin SR, Pleasure SJ. 2009. Identification of a transient subpial neurogenic zone in the developing dentate gyrus and its regulation by Cxcl12 and reelin signaling. *Development*. **136**:327-35.
- Li X, Bertics PJ, Karavolas HJ. 1997. Regional distribution of cytosolic and particulate 5 α -dihydroprogesterone 3 α -hydroxysteroid oxidoreductases in female rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*. **60**:311-8.
- Chew LJ, Gallo V. 1998. Regulation of ion channel expression in neural cells by hormones and growth factors. *Mol. Neurobiol*. **18**: 175-467.
- Lillien L. 1997. Neural development: Instructions for neural diversity. *Current biology*. **7**:168-171.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A. 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci*. **8**:1179-87.
- Lo Turco J.J., Owens D.F., Heath M.J.S., Davis M.B.E., Kriegstein A.R. 1995. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* **15**:1287–1298.
- Lois C., Alvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* **264**: 1145–1148.
- Luhmann H., Hanganu I., Kilb W. 2002. Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex. *Brain Res.Bulletin*. **60**: 345-353.
- Ma W, Barker JL. 1995. Complementary expressions of transcripts encoding GAD67 and GABA_A receptor α 4, β 1, and γ 1 subunits in the proliferative zone of the embryonic rat central nervous system. *J Neurosci*. **15**:2547-60.
- Manent JB, Demarque M, Jorquera I, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Represa A. 2005. A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci*. **25**:4755-65.
- Manent JB, Jorquera I, Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Represa A. 2006. Glutamate acting on AMPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons. *J Neurosci*. **26**:5901-9.
- Maric D, Liu QY, Maric I, Chaudry S, Chang YH, Smith SV, Sieghart W, Fritschy JM, Barker JL. 2001. GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA_A autoreceptor/Cl⁻ channels. *J Neurosci*. **21**:2343-60.
- Marshall CA, Goldman JE. 2002. Subpallial dlx2-expressing cells give rise to astrocytes and oligodendrocytes in the cerebral cortex and white matter. *J Neurosci*. **22**:9821-30.

- McKay BE, Turner RW. 2005. Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J Physiol.* **567**:829-50.
- Mehler, Kessler. 1999. Progenitor cell biology: implications for neural regeneration. *Arch Neurol.* **56**: 780-4.
- Melcangi RC, Froelichsthal P, Martini L, Vescovi AL. 1996. Steroid metabolizing enzymes in pluripotential progenitor central nervous system cells: effect of differentiation and maturation. *Neuroscience.* **72**:467-75.
- Mellon SH. 2007. Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacol Ther.* **116**:107-24.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. 2007. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci.* **26**:7907-18.
- Mercier F., Kitasako J.T., Hatton G.I. 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: Fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol.* **451**: 170-88.
- Merkle FT, Alvarez-Buylla A. 2006. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol.* **18**:704-9.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell.* **3**:265-78.
- Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev.* **26**:471-83.
- Nacher J., Blasco-Ibanez J.M., McEwen B.S. 2002. Non-granule PSANCAM immunoreactive neurons in the rat hippocampus. *Brain Res.* **930**: 1–11.
- Nacher J., Crespo C., McEwen B.S. 2001. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur. J. Neurosci.* **14**: 629–644.
- Nadarajah B., Alifragis P., Wong R.O.L., Parnavelas J.G. 2003. Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex: Observations Based on Real-time Imaging. *Cerebral Cortex.* **13**:607–611.
- Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G. 2001. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.* **305**:187-202.
- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Kriegstein AR. 2008. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol.* **508**:28-44.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* **425**:479-94.
- Parnavelas JG. 2002. The origin of cortical neurons. *Braz J Med Biol Res.* **35**:1423-9.
- Patte-Mensah C., Penning T.M., Mensah-Nyagan A.G. 2004. Anatomical and cellular localization of neuroactive 5 alpha/3 alpha-reduced steroid-synthesizing enzymes in the spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **477**: 286-299.
- Pawlowski J.E., Huizinga M., Penning T.M. 1991. Cloning and sequencing of the cDNA for rat liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **266**: 8820-8825.

- Penning T.M., Mukharji I., Barrows S., Talalay P. 1984. Purification and properties of a 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase of rat liver cytosol and its inhibition by anti-inflammatory drugs. *Biochem. J.* **222**: 601-611.
- Peretto P., Merighi A., Fasolo A., Bonfanti L. 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res. Bull.* **42**: 9–21.
- Petridis A.K., El-Maarouf A., Rutishauser U. 2004. Polysialic acid regulates cell contact-dependent neuronal differentiation of progenitor cells from the subventricular zone. *Dev. Dynam.* **230**: 675–684.
- Pomata PE, Colman-Lerner AA, Barañao JL, Fiszman ML. 2000. In vivo evidences of early neurosteroid synthesis in the developing rat central nervous system and placenta. *Brain Res Dev Brain Res.* **120**:83-6.
- Ponti G., Aimar P., Bonfanti L. 2006. Cellular composition and cytoarchitecture of the rabbit subventricular zone (SVZ) and its extensions in the forebrain. *J. Comp. Neurol.* **498**: 491–507.
- Popp A, Urbach A, Witte OW, Frahm C. 2009. Adult and embryonic GAD transcripts are spatiotemporally regulated during postnatal development in the rat brain. *PLoS One.* **4**:e4371.
- Rakic, P. 1996. Radial vs. tangential migration of neural clones in the developing cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 11323-11327.
- Randall D., Burggren W., French K. 1998. Comunicación a lo largo de y entre neuronas. En: Fisiología Animal, mecanismos y adaptaciones. MacGraw-Hill, Interamericana, España. Pp. 201-216.
- Robel P., Baulieu E.E. 1994. Neurosteroids: Biosynthesis and function. *Trends. Endocrinol. Metab.* **5**: 1-8.
- Rutishauser U., Landmesser L. 1996. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promotor of plasticity in cell–cell interactions. *Trends Neurosci.* **19**: 422–427.
- Safiulina VF, Fattorini G, Conti F, Cherubini E. 2006. GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus. *J Neurosci.* **26**:597-608.
- Scadden D.T. 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* **441**: 1075–1079.
- Schumacher M., Akwa Y., Guennoun R., Robert F., Labombarda F., Dérarnaud F., Robel P., De Nicola A., Baulieu E. E. 2000. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: Trophic and protective effects. *J. Neurocytol.* **29**: 307-326.
- Schumacher M., Robert F. 2001. Progesterone: Synthesis, metabolism, mechanisms of action and effects in the nervous system. En: Pfaff D. (Ed.). Hormones brain and behaviour. Academia Press.
- Seki T, Arai Y. 1993. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci.* **13**:2351-8.
- Seki T., Arai Y. 1991. Expression of highly polysialylated NCAM in the neocortex and piriform cortex of the developing and the adult rat. *Anat. Embryol.* **184**: 395–401.
- Seri B., García-Verdugo J.M., Collaudo-Morente L., McEwen B.S., Alvarez-Buylla A. 2004. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J. Compar. Neurol.* **478**: 359–378.
- Smithgall; Penning. 1988. Electrophoretic and immunochemical characterization of 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenases of rat tissues. *Biochem J.* **254**: 715-21.
- Spassky N., Merkle F.T., Flames N., Tramontin A.D., García-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J. Neurosci.* **25**: 10–18.

- Spradling A.S., Drummond-Barbosa D., Kai T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature* .**414**: 98–104.
- Stubbs D, DeProto J, Nie K, Englund C, Mahmud I, Hevner R, Molnár Z. 2009. Neurovascular congruence during cerebral cortical development. *Cereb Cortex*. **19**:i32-41.
- Sudarov A, Joyner AL. 2007. Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Dev*. **2**:26.
- Taupin P. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical interest. *Med. Sci. Monit*. **11**: 247-252.
- Taupin P. 2006. Neurogenesis in the adult central nervous system. *C. R. Biologies* **329**: 465–475.
- Tsutsui K. 2008. Progesterone biosynthesis and action in the developing neuron. *Endocrinology*. **149**:2757-61.
- Ventura RE, Goldman JE. 2007. Dorsal radial glia generate olfactory bulb interneurons in the postnatal murine brain. *J Neurosci*. **27**:4297-302.
- Wang D., Krueger D. D., Bordey A. 2003. GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABA_A receptor activation. *J Physiol*. **550**: 785–800.
- Wang J.M., Johnston P.B., Ball B.G., Brinton R.B. 2005. The neurosteroid Allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *J. Neurosci*. **25**: 4706–4718.
- Wichterle H., García-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. 1997. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron*. **18**: 779–791.
- Young KM, Fogarty M, Kessar N, Richardson WD. 2007. Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *J Neurosci*. **27**:8286-96.
- Zhang L., Spigelman I., Carlen P.L. 1991. Development of GABA-mediated chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurons of immature rat hippocampal slices. *J.Physiol*. **444**: 25-49.