



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Estudio del desarrollo postnatal de la extensión caudal de  
la zona subventricular del cerebro de rata: un posible rol  
para los neuroesteroides**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Marianny J. Pernía R. como requisito parcial para optar por el título de Licenciada en Biología.

**Tutora:** Dra. Nathalie Gago

**Asesor académico:** Dr. Jesús Romero

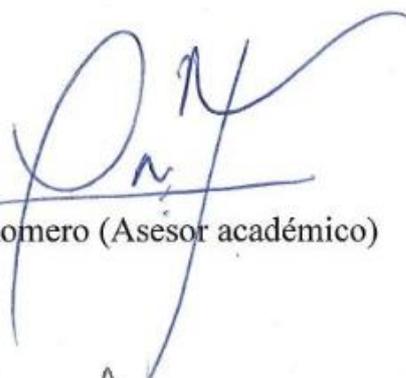
**CARACAS, VENEZUELA**

**SEPTIEMBRE 2012**

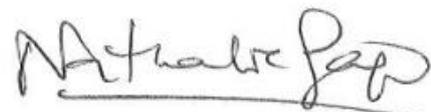
**ACTA**

Quienes suscribimos, los miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el Trabajo Especial de Grado de la **Br. Marianny Pernía Rosales, C.I.: 19.502.672**, titulado: *Estudio del desarrollo postnatal de extensión caudal de la zona subventricular del cerebro de rata: un posible rol para los neuroesteroides*, para optar por el título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos **APROBADO**.

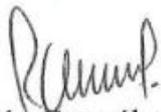
Dando fe de ello, se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas a los veinte días del mes de septiembre de dos mil doce, dejando constar que el Dr. Jesús Romero actuó como coordinador del jurado examinador.



Dr. Jesús Romero (Asesor académico)



Dra. Nathalie Gago (Tutora)



Dr. Jesús González Vegas (Jurado)



Dr. Fernando González (Jurado)



Universidad Central de Venezuela  
 Facultad de Ciencias  
 Escuela de Biología  
Dirección

### CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 26/09/2012, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de la bachiller **Pernía R., Marianny J.**, titular de la cédula de identidad No. 19.502.672; titulado: **“Estudio del desarrollo posnatal de la extensión caudal de la zona subventricular de cerebro de rata: un posible rol para los neuroesteroides.”**; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada al segundo día del mes de octubre del año dos mil doce.

  
 Dr. Jesús Guillermo Romero Muñoz  
 Presidente del  
 Consejo de la Escuela de Biología

JR/br.-

Este trabajo fue realizado en el **Laboratorio de Neuroendocrinología comparada**, de la Escuela J.M. Vargas, de la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela; bajo la supervisión de la profesora Nathalie Gago.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, CDCH-PG-09-67942007/2, y por la coordinación de investigación de la Facultad de Medicina, UCV.

## RESUMEN

Por mucho tiempo se pensó que una vez culminado el proceso de desarrollo, las células madre neurales (CMN) y los progenitores neurales (PN) 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 CMN y PN, y en particular de los factores que regulan la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación de estas células, es indispensable para el desarrollo y el éxito de estrategias terapéuticas. Además de los factores de crecimiento y morfogénicos, otras moléculas están cobrando interés en la actualidad, este es el caso de ciertos neurotransmisores, en particular el 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<sub>A</sub>. El objetivo general del presente trabajo fue el de estudiar el desarrollo postnatal de la extensión caudal de la zona subventricular (ECZSV) de cerebro de rata. La ECZSV es una extensa zona germinal, aun poco estudiada, que reviste los ventrículos laterales y que se sitúa entre el hipocampo y el cuerpo calloso. Los objetivos específicos del presente trabajo fueron, 1) evaluar el espesor de la ECZSV y la densidad celular en la zona intermedia (ZI) asociada a ésta, mediante tinciones con hematoxilina/eosina y DAPI, 2) identificar los diferentes tipos celulares presentes en la ECZSV y en la ZI, mediante inmunofluorescencia, utilizando marcadores específicos para PN (nestina), astrocitos (GFAP) y progenitores de oligodendrocitos (NG2), y 3) determinar por inmunofluorescencia, la expresión de la  $3\alpha$ -HSOR, enzima responsable de la síntesis de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP, en la ECZSV y en la ZI. Se utilizaron ratas Sprague Dawley de 1, 4, 7, 12, 15 y 21 días postnatales (P1, P4, P7, P12, P15 y P21). Los resultados obtenidos muestran que tanto el espesor de la ECZSV como la densidad celular en la ZI disminuyen en función del desarrollo, lo que sugiere la salida de células de la ECZSV y su migración a través de la ZI, hasta llegar al sitio de destino. La expresión de nestina en la ECZSV y en la ZI es considerablemente alta en la primera semana postnatal y luego disminuye. En P1, se observa una alta densidad de fibras nestina<sup>+</sup> en la ZI, posiblemente asociadas a procesos de migración. La expresión de GFAP es considerablemente alta en la ECZSV en P1 y P4, luego disminuye drásticamente hasta desaparecer por completo. En la ZI, la expresión de GFAP incrementa en función del desarrollo, presentando un máximo cerca de P12. La morfología de los astrocitos en la ZI se va haciendo más compleja. Esto sugiere la producción de astrocitos a partir de la ECZSV que migran a la ZI y se diferencian. La expresión de NG2 incrementa en la ECZSV y en la ZI conforme avanza el desarrollo y presenta un máximo entre P12 y P14. Luego, la expresión de NG2 desaparece completamente. Esto indica un pico de producción de progenitores de oligodendrocitos en el momento en que ocurre el proceso de mielinización. La expresión de la  $3\alpha$ -HSOR en la ECZSV incrementa en los primeros días postnatales y alcanza un máximo en P12. Posteriormente, comienza a disminuir sin desaparecer por completo. En la ZI, la enzima presenta una alta expresión en los primeros días postnatales en los progenitores migratorios y luego comienza a disminuir. En términos generales, los resultados obtenidos muestran que la ECZSV presenta grandes cambios estructurales durante el desarrollo postnatal y que constituye una fuente de células gliales durante el desarrollo postnatal. La expresión de la  $3\alpha$ -HSOR en la ECZSV y en los progenitores migratorios y células gliales de la ZI es significativa, lo que constituye una evidencia anatómica sobre el posible papel de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP en el control de la biología de las CMN y de los progenitores gliales *in vivo* durante el desarrollo postnatal en esta zona germinal.

**Palabras clave:** células madre neurales, progenitores neurales, neuroesteroides,  $3\alpha,5\alpha$ -THP (alopregnanolona), extensión caudal de la zona subventricular, desarrollo del sistema nervioso central

**A mis padres**  
**Gracias por creer en mí, los amo.**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, a la Virgen y a los Ángeles que siempre me han cuidado.

A mis padres, por el amor y el apoyo que siempre me han dado.

A mis hermanos, por ser ejemplo de constancia y responsabilidad.

A Víctor, por ser mi pilar.

A Ángela, Fina, Sory, Stephanie y Alejandro, por todo su cariño y por ser mi familia adoptiva.

A mi tutora, por todas sus enseñanzas, por su paciencia, por confiar en mí, por sus consejos y por las incontables conversaciones enriquecedoras e interesantes.

A los jurados: Jesús Alberto González Vegas y Fernando González por sus aportes en el presente trabajo.

A las Sprague Dawley, por su nobleza.

A las profesoras Yuri, Mercedes y Virginia, por ser tan atentas y hacer de la cátedra un ambiente tan familiar.

A Katherine, Gazzen y Anabell, por ser mis hermanos académicos.

A la Dra. Yelitza Campos y al Dr. Walter Mosca, del laboratorio de Fisiopatología del Instituto de Biomedicina, Escuela J.M. Vargas, por la realización del anticuerpo anti-3 $\alpha$ -HSOR.

A la Dra. Emilia Negron del bioterio del IDEA, por todo el apoyo para la obtención de animales.

Al personal del bioterio de la Escuela J.M. Vargas, por brindarme su ayuda en la obtención de animales.

Al Dr. Héctor Rojas y Dr. Juan de Santis, Coordinador del Instituto de Inmunología, por la colaboración prestada para el análisis de los resultados con microscopía confocal.

## ABREVIATURAS

3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -THP: 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  –tetrahidroprogesterona

3 $\alpha$ -HSOR: 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide oxidoreductasa

5 $\alpha$ -DHP: 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona

BO: bulbo olfatorio

CMN: célula madre neural

ECZSV: extensión caudal de la zona subventricular

GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GD: giro dentado del hipocampo

GFAP: proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein*)

NE: neuroesteroides

PN: progenitor neural

PREG: pregnenolona

PROG: progesterona

PSA-NCAM: forma polisialilada de la molécula de adhesión celular neural

SP: subplaca

SNC: sistema nervioso central

VMR: vía de migración rostral

ZI: zona intermedia

ZSG: zona subgranular

ZSV: zona subventricular

ZV: zona ventricular

## INDICE DE CONTENIDO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   | <b>1</b>  |
| <b>I.    DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO</b>  | <b>1</b>  |
| <b>II.   NEUROGÉNESIS EN EL SISTEMA NERVIOSO ADULTO</b>   | <b>5</b>  |
| 1. Zona subventricular de los ventrículos laterales   | 6         |
| 2. Zona subgranular del giro dentado del hipocampo  | 8         |
| 3. Extensión caudal de la zona subventricular   | 10        |
| 4. Regeneración del sistema nervioso central adulto   | 10        |
| <b>ANTECEDENTES</b>   | <b>13</b> |
| <b>I.    EL GABA: SUS RECEPTORES Y SUS EFECTOS</b>  | <b>13</b> |
| <b>II.   NEUROESTEROIDES</b>  | <b>15</b> |
| <b>OBJETIVOS</b>  | <b>20</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>21</b> |
| <b>I.    Recolección y procesamiento de los cerebros</b>  | <b>21</b> |
| 1. Animales   | 21        |
| 2. Fijación del tejido  | 22        |
| 3. Cortes del tejido  | 22        |
| <b>II.   Evaluación de los cambios estructurales generales de la<br/>          ECZSV durante el desarrollo postnatal del cerebro de rata</b>                                      | <b>23</b> |
| 1. Coloración histológica con Hematoxilina y Eosina   | 23        |
| 2. Tinción de los núcleos celulares con DAPI  | 23        |
| <b>III.  Identificación de los diferentes tipos celulares presentes en<br/>          la ECZSV a distintos estadios del desarrollo postnatal del<br/>          cerebro de rata</b> | <b>23</b> |
| <b>IV.  Evaluación de la expresión de la 3<math>\alpha</math>-HSOR en la ECZSV<br/>          durante el desarrollo postnatal</b>  | <b>24</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESULTADOS</b>  | <b>27</b> |
| <b>1. Evaluación de los cambios estructurales generales de la extensión caudal de la zona subventricular durante el desarrollo postnatal</b>   | <b>27</b> |
| <b>2. Identificación de los diferentes tipos celulares presentes en la extensión caudal de la zona subventricular a distintos estadios del desarrollo postnatal</b>                    | <b>27</b> |
| <i>a) Expresión de nestina: identificación de progenitores neurales</i>  | <b>34</b> |
| <i>b) Expresión de GFAP: identificación de astrocitos</i>  | <b>44</b> |
| <i>c) Expresión de NG2: identificación de progenitores de oligodendrocitos</i>   | <b>44</b> |
| <b>3. Expresión de la 3<math>\alpha</math>-HSOR en la extensión caudal de la zona subventricular a distintos estadios del desarrollo postnatal</b>                                     | <b>55</b> |
| <b>3.1 Estandarización del protocolo de inmunofluorescencia para el marcaje de la 3<math>\alpha</math>-HSOR utilizando un anticuerpo policlonal</b>                                    | <b>55</b> |
| <b>3.2 Estudio de la expresión de la 3<math>\alpha</math>-HSOR en la extensión caudal de la zona subventricular del cerebro de rata, a distintos estadios del desarrollo postnatal</b> | <b>57</b> |
| <b>3.3 Identificación de las células 3<math>\alpha</math>-HSOR<sup>+</sup> que se originan de la ECZSV, a distintos estadios del desarrollo postnatal</b>                              | <b>57</b> |
| <i>a) Expresión de nestina y de la 3<math>\alpha</math>-HSOR en la ECZSV</i>   | <b>57</b> |
| <i>b) Expresión de GFAP y de la 3<math>\alpha</math>-HSOR en la ECZSV</i>  | <b>63</b> |
| <i>c) Expresión de NG2 y de la 3<math>\alpha</math>-HSOR en la ECZSV</i>   | <b>63</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>DISCUSIÓN</b>   | <b>70</b> |
| <b>1. Evaluación de los cambios estructurales generales de la extensión caudal de la zona subventricular durante el desarrollo postnatal</b>   | <b>70</b> |
| <b>2. Identificación de los diferentes tipos celulares presentes en la extensión caudal de la zona subventricular a distintos estadios del desarrollo postnatal</b>  | <b>71</b> |
| <i>a) Expresión de nestina</i>   | <b>71</b> |
| <i>b) Expresión de GFAP</i>  | <b>75</b> |
| <i>c) Expresión de NG2</i>   | <b>76</b> |
| <b>3. Expresión de la 3<math>\alpha</math>-HSOR en la extensión caudal de la zona subventricular e identificación de las células 3<math>\alpha</math>-HSOR<sup>+</sup> a distintos estadios del desarrollo postnatal</b> | <b>78</b> |
| <i>a) Estandarización del protocolo de inmunofluorescencia para el marcaje de la 3<math>\alpha</math>-HSOR</i>   | <b>78</b> |
| <i>b) 3<math>\alpha</math>,5<math>\alpha</math>-THP y proliferación celular</i>  | <b>79</b> |
| <i>c) 3<math>\alpha</math>,5<math>\alpha</math>-THP y migración celular</i>  | <b>80</b> |
| <i>d) 3<math>\alpha</math>,5<math>\alpha</math>-THP y astrocitos</i>   | <b>81</b> |
| <i>e) 3<math>\alpha</math>,5<math>\alpha</math>-THP y mielinización</i>  | <b>82</b> |
| <i>f) ECZSV y regeneración del SNC</i>   | <b>83</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>  | <b>87</b> |
| <b>PERSPECTIVAS</b>  | <b>89</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>90</b> |

## INTRODUCCIÓN

### I. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

El desarrollo del sistema nervioso se inicia durante el período embrionario, en la fase de gastrulación. Durante esta fase, las neuronas y las células gliales, se producen a partir de una capa de células ectodérmicas localizadas a lo largo de la línea media dorsal del embrión. Éstas células, durante un proceso denominado inducción neural, reciben señales inductivas provenientes de células mesodérmicas que conforman la notocorda, lo cual genera que un subgrupo de células ectodérmicas se diferencie en células madre neurales (CMN), formándose así la placa neural (Jessell y Sanes, 2001; Purves y col., 2008). Una vez formada la placa neural, los márgenes laterales de ésta se pliegan y se forma el tubo neural que discurre a todo lo largo del eje del animal (Fig. 1). Después del proceso de inducción neural, se inicia la diferenciación de los ejes anteroposterior y dorsoventral, formándose así todo el sistema nervioso central (SNC) (Jessell y Sanes, 2001; Purves y col., 2008).

Durante el desarrollo del SNC, la neurogénesis o producción de nuevas células nerviosas, es llevada a cabo por las CMN y por los progenitores neurales (PN), responsables de los procesos de proliferación, migración y diferenciación celular.

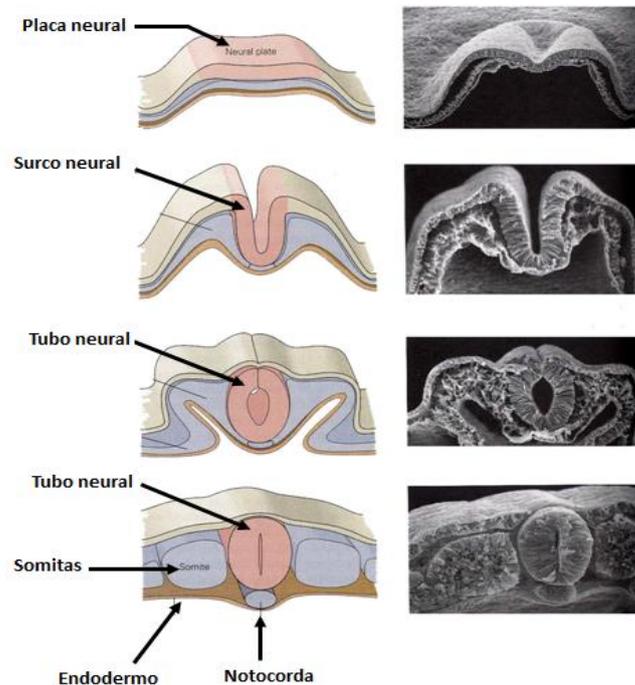
Las CMN son células multipotentes que se caracterizan por tener una gran capacidad de proliferación y de autorrenovación. Éstas forman el neuroepitelio también denominado zona ventricular (ZV), el cual rodea la luz del tubo neural. Estas células neuroepiteliales se encuentran dispuestas radialmente y en contacto con las superficies apical (ventricular) y basal (pial) del tubo neural (revisado por Merkle y Alvarez-Buylla, 2006; revisado por McKay, 1997).

Inicialmente, las CMN se dividen simétricamente, incrementando así la cantidad de células. Luego, se dividen asimétricamente, es decir, a partir de cada CMN se forma otra CMN que permanece adyacente al ventrículo en la ZV, y otra célula, un PN que permanece en una región justo por encima de la ZV, denominada zona subventricular (ZSV), en donde continúa dividiéndose simétricamente.

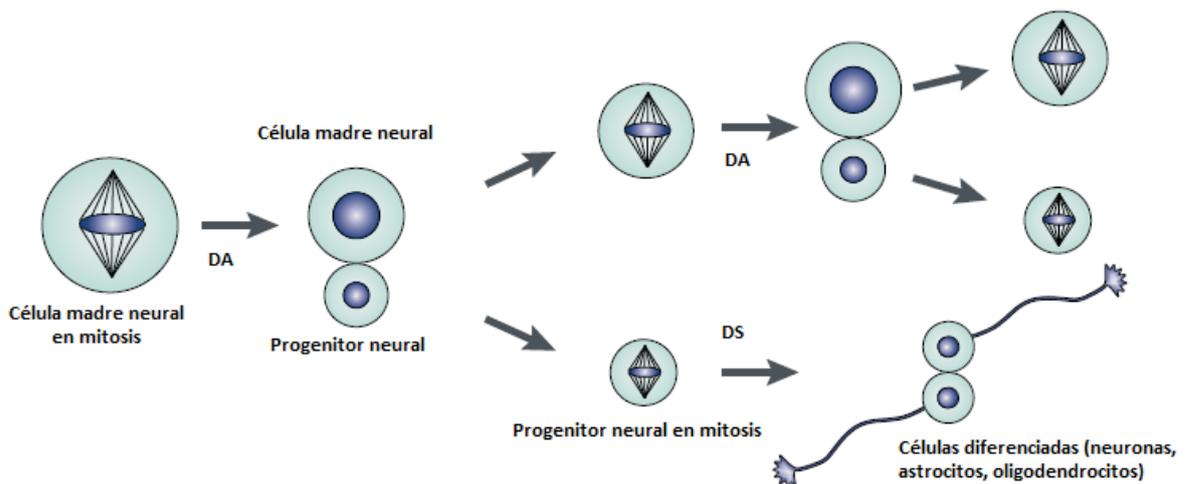
Los PN son células con un cierto grado de multipotencialidad, y con una alta capacidad de proliferación y de migración. Los PN presentan una potencialidad menor que la de las CMN, debido a que se van diferenciando hacia linajes celulares específicos (Lillien, 1997). A diferencia de las CMN, los PN no presentan divisiones asimétricas, por lo que no son capaces de autorrenovarse (revisado por Merkle y Alvarez-Buylla, 2006; Haubensak y col., 2004) (Fig. 2).

Una vez formados los PN éstos migran fuera de las zonas germinales y se dirigen hacia su sitio de destino. Una de las estructuras cuyos fenómenos migratorios se conocen mejor es la corteza cerebral. En efecto, durante el desarrollo de la corteza, los PN presentan dos grandes modos de migración; una migración radial, con una orientación perpendicular con respecto a la superficie

ventricular, y una migración tangencial, con una orientación paralela a la superficie ventricular (Fig. 3A).



**Figura 1. Desarrollo embrionario del tubo neural.** Esquema del desarrollo embrionario del tubo neural durante la fase de gastrulación (izquierda). Micrografías de microscopía electrónica del tubo neural en desarrollo (derecha) (Modificada de Jessel y Sanes, 2001).



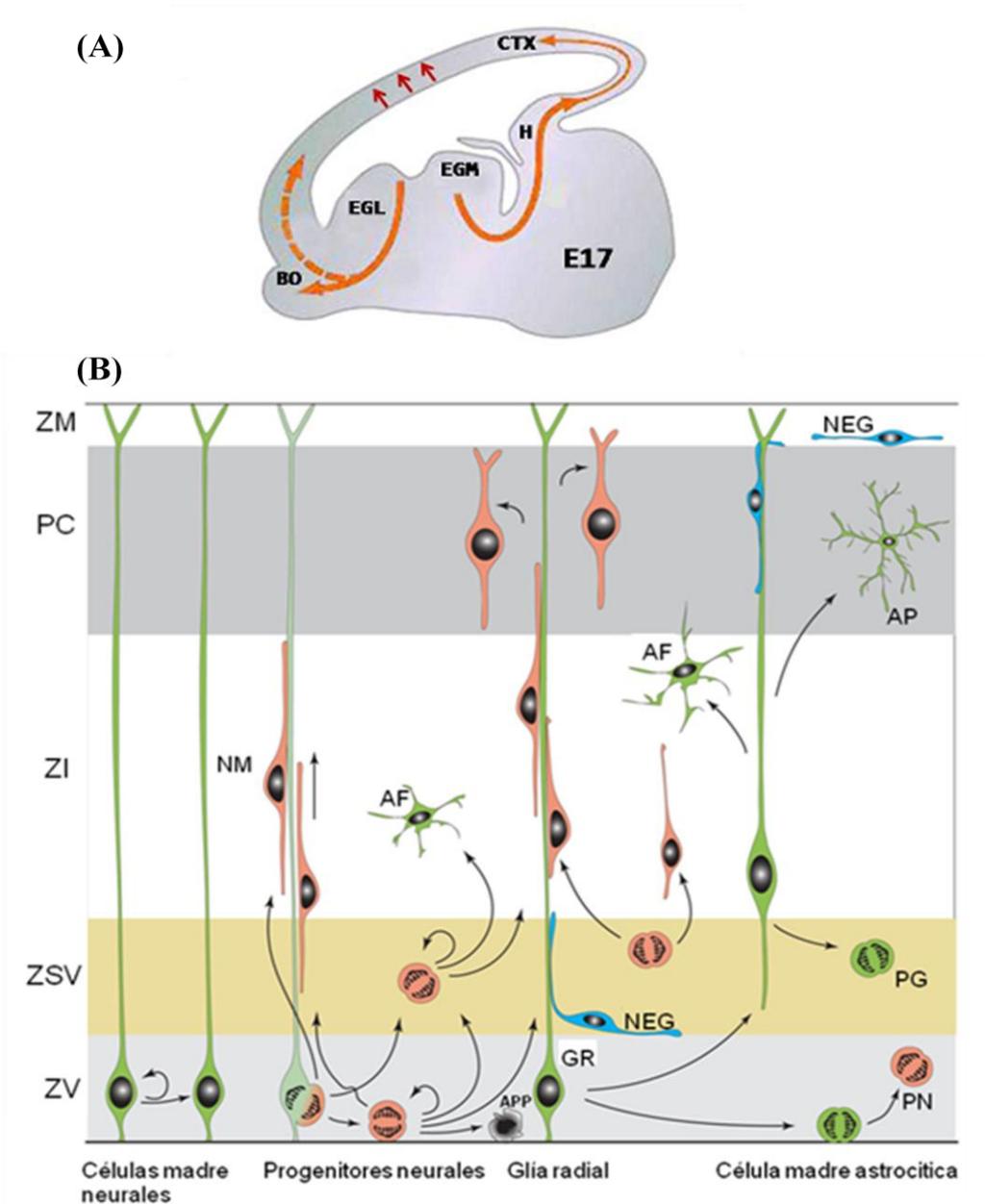
**Figura 2. Tipos de división celular de las células madre neurales.** Una célula madre neural (CMN), inicialmente se divide de forma simétrica dando origen a dos células hijas idénticas (no se muestra en la figura). Posteriormente, la CMN comienza a dividirse de manera asimétrica y origina dos células hijas diferentes: una CMN y un progenitor neural. La primera continúa dividiéndose asimétricamente, mientras que el progenitor neural se divide de manera simétrica para dar origen a dos células idénticas capaces de diferenciarse en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos. DA: división celular asimétrica; DS: división celular simétrica (Modificada de Knoblich, 2001).

En la migración radial participa la glía radial como células guía, la cual se origina a partir de una transformación morfológica que sufren las CMN (revisado por Ihrle 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, y extiende una larga prolongación hacia la superficie pial y ésta es utilizada como sustrato para la migración de las neuronas inmaduras que van a dar origen a las neuronas piramidales (revisado por Rakic, 2007; Cayre y col., 2009). La migración de los diferentes tipos de neuronas piramidales hacia su destino específico es lo que va a permitir la formación de la corteza con su organización laminar específica. Una vez culminada su función en el proceso de migración, la glía radial se transforma en astrocitos fibrosos y/o protoplasmáticos (revisado Cayre y col., 2009). Actualmente, se sabe que además de estas funciones, la glía radial es capaz de actuar como un precursor neuronal y de dar origen a las neuronas de proyección de la corteza (revisado Cayre y col., 2009; revisado por Nadarajah, 2003; Nadarajah y col., 2003) (Fig. 3B)

Con respecto a las interneuronas corticales, éstas se originan a partir de las zonas neurogénicas ventrales; las eminencias gangliónicas media y lateral (Fig. 3A). Las interneuronas corticales migran tangencialmente, siguiendo rutas paralelas a los grandes tractos de fibras que van a conformar el cuerpo calloso y el cíngulo, luego giran y migran radialmente hacia la corteza (revisado Cayre y col., 2009; revisado por Nadarajah, 2003; Nadarajah y col., 2003; Fig. 3).

En el momento del nacimiento la neurogénesis y los procesos de migración neuronal se encuentran prácticamente culminados con la excepción de las neuronas granulares del giro dentado del hipocampo y de la capa granular del cerebelo las cuales se forman durante las primeras semanas de vida postnatal (revisado por Cayre y col., 2009; Morgane y col., 2002). Existe también en este período una intensa producción de interneuronas para los bulbos olfatorios (BO) a partir de la porción anterior de la ZSV (revisado Cayre y col., 2009; ver introducción punto II). Es importante mencionar que la neurogénesis a nivel del hipocampo y de los BO persiste en realidad durante toda la vida (ver punto II, introducción).

Con respecto a las células gliales, en el momento del nacimiento se ha reportado, en cambio, una importante producción y migración de éstas (revisado Cayre y col., 2009). A partir de toda la extensión rostro-caudal de la ZSV se observa un intenso proceso de migración hacia las estructuras vecinas, corteza, estriado, hipocampo y cuerpo calloso, en donde los progenitores gliales se diferencian en astrocitos y en oligodendrocitos (revisado Cayre y col. 2009; Suzuki y Goldman, 2003). La migración dorsal de los progenitores gliales hacia la corteza y cuerpo calloso ocurre en gran medida de manera radial, aparentemente mediante la interacción con la glía radial (Goldman y col., 1997). Sin embargo, en la actualidad, se dispone aún de poca evidencia a favor de la participación de la glía radial en la migración de los progenitores gliales, y aunque se ha establecido el papel de algunas moléculas en el control de la migración glial, en términos generales se conoce aún poco sobre las señales que regulan este proceso (revisado por Cayre y col., 2009).

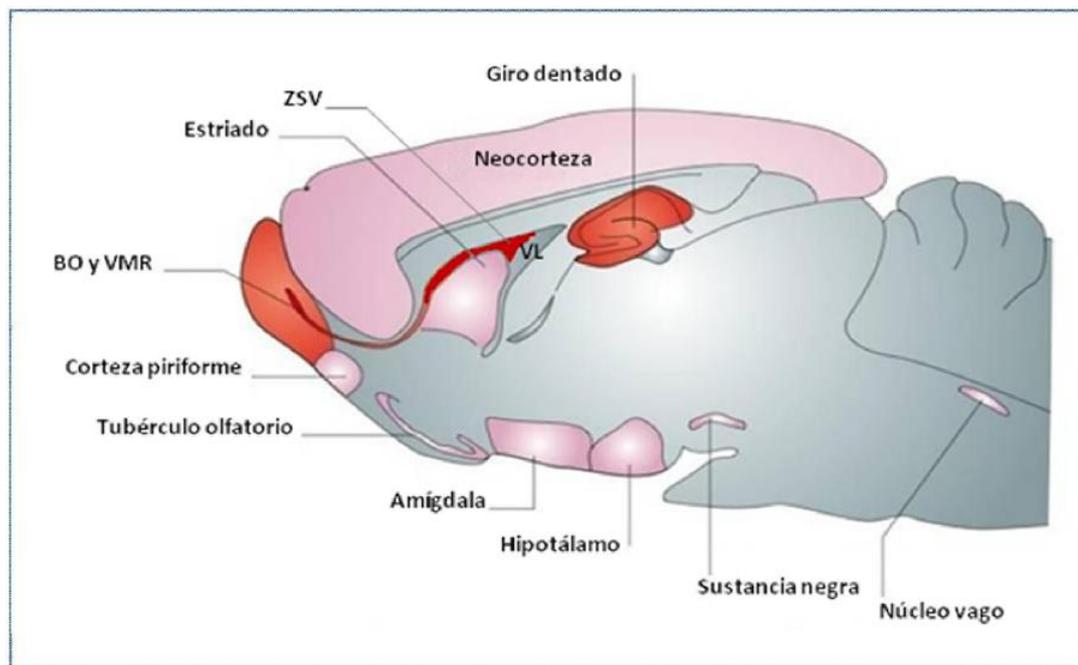


**Figure 3. Principales eventos del desarrollo estructural del telencéfalo. (A) Esquema de un corte sagital de cerebro de rata de 17 días embrionarios (E17).** Los progenitores neurales (PN) originados a partir de la zona ventricular (ZV) de la neocorteza (CTX) y de las eminencias gangliónicas (EG) lateral (EGL) y medial (EGM), migran siguiendo diferentes rutas hasta sus lugares de destino donde se diferencian. Los PN originados de la ZV cortical migran radialmente (flechas rojas), en cambio, los PN originados en la EG migran tangencialmente (flechas naranja). De esta forma, los PN colonizan las capas externas de la corteza, el hipocampo y los bulbos olfatorios (modificado de Corbin y col., 2001). **(B) Tipos de migración durante el desarrollo de la corteza.** La glía radial (GR) se forma a partir de células madre neurales. Luego, la GR se divide asimétricamente y produce neuronas migratorias (NM, células rosadas) y PN (células mitóticas rosadas) que se encuentran en la ZV y en la zona subventricular (ZSV). Los PN posteriormente dan origen a todas las neuronas de proyección de la corteza y a la mayoría de las interneuronas. Por otro lado, se originan neuronas de las eminencias gangliónicas (NEG, células azules), las cuales migran tangencialmente en la ZSV y en la zona marginal (ZM), y posteriormente, migran radialmente hacia la corteza. Eventualmente, la glía radial muere por apoptosis (APP) o genera células endocelulares, astrocitos fibrilares (AF), astrocitos protoplásmicos (AP), progenitores gliales (PG) o células madre astrocítica (PN) las cuales tienen un potencial neurogénico (figura modificada de Rakic, 2007).

Originalmente, se pensaba que una vez culminado el proceso de desarrollo se agotaban las CMN. Sin embargo, hoy en día se sabe que en el SNC adulto persisten CMN y PN en zonas restringidas, denominadas nichos neurogénicos (Altman y Das, 1965; Alvarez-Buylla y Temple, 1998; revisado por Taupin, 2006). En estos nichos existe un microambiente que permite la proliferación y autorrenovación de las CMN; sustentándose así la neurogénesis en el cerebro adulto (Scadden, 2006; Spradling y col., 2001).

## II. NEUROGÉNESIS EN EL SISTEMA NERVIOSO ADULTO

La neurogénesis en el adulto ocurre principalmente en la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado (GD) del hipocampo. Sin embargo, se han descrito otras zonas neurogénicas menos conocidas en el cerebro adulto, tales como: el área CA1 del hipocampo, el estriado, la amígdala, la médula espinal, el hipotálamo, la sustancia negra, entre otras (revisado por Taupin, 2006) (Fig. 4).



**Figura 4. Zonas neurogénicas del cerebro de la ratona adulta.** Se muestran las principales zonas con actividad neurogénica descritas hasta el momento, en un esquema de corte sagital de cerebro de ratona adulta. Las regiones coloreadas en rojo, tales como la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG), la zona subventricular de los ventrículos laterales (ZSV), la vía de migración rostral (VMR) y los bulbos olfatorios (BO), son las regiones más estudiadas y con mayor actividad neurogénica. Aquellas que se encuentran coloreadas de morado claro, tales como la neocorteza, el estriado, la corteza piriforme, la amígdala y el hipotálamo entre otras, corresponden a regiones menos estudiadas. VL: ventrículo lateral. (Modificado de Gould E., 2007).

### 1. Zona subventricular de los ventrículos laterales

La ZSV se forma a partir de la ZV, por lo que es considerada como una zona neurogénica secundaria (revisado por Merkle y Alvarez-Buylla, 2006; Inta y col., 2008). Esta zona es considerada el área con la mayor reserva de CMN y de PN, así como una de las zonas neurogénicas de mayor actividad en el cerebro adulto (revisado por Galli y col., 2003; revisado por Bordey, 2006).

La ZSV se expande durante las últimas etapas del desarrollo prenatal, en paralelo con la reducción progresiva de la ZV. Ésta última continúa reduciéndose durante los primeros días postnatales, hasta que desaparece completamente, permaneciendo solamente la ZSV, asociada a las paredes de los ventrículos laterales del cerebro anterior (Bonfanti y Peretto, 2007).

En la región más anterior de los ventrículos laterales, la ZSV presenta una larga extensión rostral denominada vía de migración rostral (VMR), la cual llega hasta los bulbos olfatorios (BO) (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch y col., 1997). De la parte posterior de la ZSV, se forma una extensión caudal, aún poco estudiada, que reviste el ventrículo lateral y que se extiende hasta el hipocampo (Inta y col., 2008; Suzuki y Goldman, 2003). A partir de esta extensión, las células migran radialmente hacia el cuerpo calloso y hacia la corteza (Suzuki y Goldman, 2003). En el presente trabajo denominaremos a esta zona, extensión caudal de la ZSV (ECZSV).

Con respecto a la estructura de la ZSV, ésta contiene tres tipos de células que se distinguen por sus características morfológicas y ultraestructurales, y por la expresión de distintos marcadores moleculares. Estas células son las células tipo A o neuroblastos migratorios, las células tipo B o astrocitos y las células tipo C (Fig. 5).

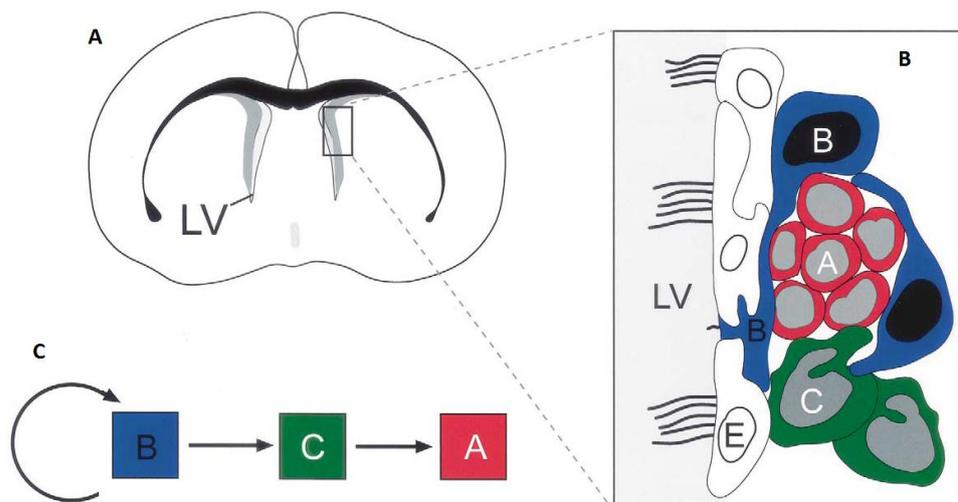
Las células tipo B son las CMN de la ZSV (revisado por Alvarez-Buylla y col., 2002). Estas células son ramificadas, de forma irregular y presentan características ultraestructurales y marcadores moleculares similares a las de los astrocitos, como la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Doetsch y col., 1997; revisado por Galli y col., 2003). Adicionalmente, expresan proteínas del citoesqueleto como la vimentina y nestina, además del transportador de glutamato GLAST y el transportador de GABA GAT4 (revisado por Bordey, 2006; revisado por Galli y col., 2003; Doetsch y col., 1997). Las células tipo B interactúan con el resto de las células de la ZSV así como con el espacio y el líquido ventricular mediante un pequeño cilio (Doetsch y col., 1999).

Las células tipo C se encuentran en contacto tanto con las células tipo A como con las células tipo B o astrocitos (Doetsch y col., 1997). Las células tipo C son PN esféricos de gran tamaño, son inmunopositivas para nestina y poseen la mayor actividad proliferativa de las células de la ZSV por lo que se considera que desempeñan una función de amplificación celular (revisado por Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Doetsch y col., 1997).

Las células tipo A o neuroblastos migratorios, se caracterizan por tener una morfología monopolar o bipolar, con un núcleo alargado y un citoplasma electrondenso reducido. Estas células son inmunopositivas para la forma polisialilada de la molécula de adhesión celular neural (PSA-

NCAM), la  $\beta$ -tubulina, la nestina y la proteína asociada al microtúbulo denominada doblecortina (revisado por Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch y col., 1997). Las células tipo A son progenitores neuronales migratorios que no presentan autorrenovación. Éstas se disponen en cadena, formando así una red de cadenas interconectadas que recorren tangencialmente las paredes del ventrículo lateral. De esta manera, forman la VMR y migran hasta los BO en donde se diferencian en neuronas. A este mecanismo de migración se le ha denominado migración en cadena, el cual es dependiente de la PSA-NCAM (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996; revisado por Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; revisado por Cayre y col., 2009).

Las cadenas migratorias de los neuroblastos se encuentran envainadas por una red tubular formada por las células tipo B o astrocitos, aislándolas de la capa ependimal en la ZSV y del parénquima del estriado en la VMR (revisado por Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Doetsch y col., 1997).



**Figura 5. Composición y estructura de la ZSV.** A: esquema de un corte coronal de cerebro de rata que muestra la ubicación de los ventrículos laterales y de la ZSV. B: Disposición de las células que conforman la ZSV; las células tipo A, las células tipo B y las células tipo C. También se observa la disposición de las células ependimales (tipo E). Las células migratorias tipo A se encuentran envueltas por las células tipo B y tipo C. Las células multiciliadas tipo E se encuentran revistiendo la pared del ventrículo. C: Secuencia de la formación de los tipos de células de la ZSV, en donde destaca la autorrenovación de las células tipo B. (Modificada de Alvarez-Buylla y col., 2002).

En términos generales se considera que las células tipo B o astrocitos de la ZSV adulta, son las CMN a partir de las cuales se forman las células tipo C, que por su alta tasa de proliferación actuaría como un estadio amplificador, y a partir de éstas se van a originar las células tipo A o neuroblastos

migratorios (Fig. 5C), los cuales migran a través de la VMR hasta los BO en donde se diferencian en neuronas (revisado por Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Doetsch y col., 1997).

Existen otras células que interactúan con las células de la ZSV, este es el caso de las células endodiales y de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La ZSV se encuentra separada de la cavidad ventricular por una capa de células endodiales o células tipo E. Ésta células interactúan directamente con las células tipo B (revisado por Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Doetsch y col., 1997). Por otra parte, la superficie de las células tipo E que queda expuesta hacia la luz del ventrículo, presenta múltiples cilios (Doetsch y col., 1997).

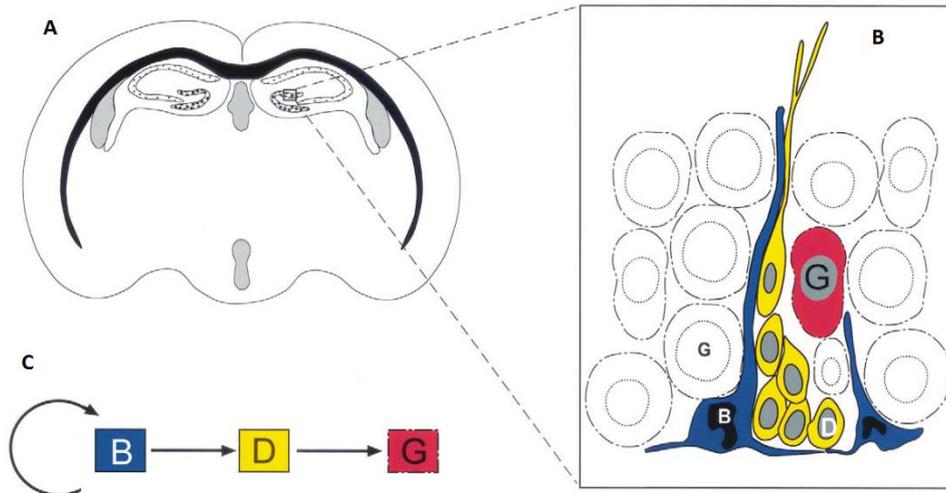
La estrecha relación entre las células de la ZSV y los vasos sanguíneos, sugiere que éstos podrían desempeñar un papel importante en el nicho neurogénico, probablemente en la regulación de la neurogénesis y de la migración celular (revisado por Cayre y col., 2009; revisado por Bordey, 2006).

## **2. Zona subgranular del giro dentado del hipocampo**

El GD del hipocampo comienza a formarse a mediados del período de gestación, donde las células progenitoras de la ZV, migran hacia la superficie pial; organizándose en una zona neurogénica transitoria, denominada zona subpial. De ésta manera, los progenitores neurales quedan bordeando la fisura hipocampal (Li y col., 2009). Posteriormente, las nuevas células recién formadas en la zona subpial, comienzan a migrar hacia el interior del polo dentado (hilus) y comienzan a organizarse en el GD, formando así la capa de células granulares (Li y col., 2009). Por otro lado, durante el desarrollo postnatal, a partir del GD se forma una zona germinativa secundaria, que se ubica entre el hilus y la capa de células granulares, denominada ZSG. La ZSG persiste en el adulto, y a partir de ésta se forman PN que luego darán origen a células granulares maduras del GD (Li y col., 2009; revisado por Ihrie y Alvarez-Buylla, 2008; revisado por Cayre y col., 2009).

Las células que se originan a partir de la ZSG no presentan la migración en cadena característica de la ZSV. Estas células en cambio migran pequeñas distancias, desde la ZSG hasta la capa de células granulares del GD, en donde se integran a los circuitos neuronales y se vuelven funcionalmente activas (revisado por Cayre y col., 2009).

La ZSG contiene dos tipos de células que se distinguen por sus características morfológicas y por la expresión de distintos marcadores moleculares. Estas células son los astrocitos, las cuales comparten características ultraestructurales con las células tipo B de la ZSV, y las células tipo D, o progenitores transitorios, homólogas a las células tipo C de la ZSV (revisado por Cayre y col., 2009; Seri y col., 2001) (Fig. 6).



**Figura 6. Composición y estructura de la ZSG del GD.** A: esquema de un corte coronal de cerebro de rata que muestra la ubicación del GD del hipocampo y de la ZSG. B: Disposición de las células que conforman la ZSG; las células tipo B, las células tipo D y las células granulares (G). Los astrocitos de la ZSG (tipo B) tienen largas prolongaciones radiales que penetran la capa granular, y prolongaciones cortas tangenciales que discurren paralelas a la ZSG. C: Secuencia de formación de los tipos de células de la ZSG, donde destaca que los astrocitos por una parte son capaces de autorrenovarse y por otra parte generan progenitores transitorios, tipo D, que se dividen y dan origen a nuevas células granulares (Modificada de Alvarez-Buylla y col., 2002).

Los astrocitos de la ZSG son las CMN de esta zona, y al igual que los astrocitos de la ZSV, expresan GFAP y nestina (revisado por Cayre y col., 2009; Seri y col., 2001). La ZSG contiene astrocitos radiales y astrocitos horizontales. Los astrocitos radiales presentan largas prolongaciones radiales que penetran la capa de células granulares y prolongaciones tangenciales, dispuestas en paralelo a la capa granular. Por su parte, los astrocitos horizontales no presentan prolongaciones radiales (revisado por Ihrie y Alvarez-Buylla, 2008).

Las células tipo D se producen a partir de los astrocitos de la ZSG. Estas células son pequeñas con un citoplasma electrodensito y probablemente funcionan como un precursor transitorio de células neurales del GD (Seri y col., 2001). Además, estas células expresan PSA-NCAM (Seki y Arai, 1993) y doblecortina (revisado por Cayre y col., 2009).

Por otra parte, el GD del hipocampo se encuentra altamente vascularizado, y existe una estrecha relación entre las células proliferativas de la ZSG con los vasos sanguíneos, por lo que al igual que en la ZSV, las células endoteliales de los vasos sanguíneos, pueden formar parte del nicho neurogénico (revisado por Okano y Sawamoto, 2008).

### 3. Extensión caudal de la zona subventricular

La ZSV además de extenderse rostralmente hasta los BO, presenta una extensión caudal 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 el día postnatal 21 (P21) desaparece casi por completo (Alcalá, 2009).

La ECZSV a diferencia de la extensión rostral ha sido aún poco estudiada, sin embargo se ha descrito que durante etapas tempranas del desarrollo postnatal, las células progenitoras de la ECZSV migran radialmente hacia la sustancia blanca, a partir de la cual migran nuevamente de forma radial hacia la corteza (Levison y Goldman, 1993; Zerlin y col., 1995). Adicionalmente, varios investigadores han encontrado que la migración de estos progenitores ocurre tanto en la región dorsal, como en la región lateral de los hemisferios (Levison y col., 1993; Kakita y Goldman, 1999).

Levison y Goldman en 1993, encontraron que la mayoría de las células que habían migrado desde la ECZSV hasta la sustancia blanca, presentaban características morfológicas de oligodendrocitos y que aproximadamente la mitad de éstos eran oligodendrocitos mielinizantes. Por su parte, observaron muy pocos astrocitos en esta zona, los cuales presentaban algunos contactos con los vasos sanguíneos. En cambio, en la corteza, más de la mitad de las células migratorias correspondía a astrocitos, y la mayoría de los oligodendrocitos encontrados era no-mielinizantes.

Por otra parte, Levison y colaboradores en 1993, también encontraron que la mayoría de las células migratorias que permanecen en la sustancia blanca, se diferenciaban en oligodendrocitos, mientras que aquellas que se situaban en la sustancia gris, se diferenciaban en ambos tipos de células gliales (oligodendrocitos y astrocitos). Estos investigadores sugirieron que las distintas señales presentes en la sustancia blanca eran responsables de la diferenciación en oligodendrocitos y/o de la inhibición de la diferenciación en astrocitos. En conclusión, se podría decir que la ZSV presenta dos poblaciones de progenitores: una que migra tangencialmente hasta los BO, en donde los progenitores se diferencian en interneuronas, y otra en donde los progenitores migran radialmente desde la ECZSV y se diferencian en células gliales. Además, esto sugiere que los progenitores mantienen un cierto grado de plasticidad durante su desarrollo, incluso después de que ellos hayan migrado de sus zonas germinales (Levison y Goldman, 1993; Suzuki y Goldman, 2003; revisado por Goldman, 1995).

#### **4. Regeneración del sistema nervioso central adulto**

En el cerebro adulto, las CMN y los PN participan en la neurogénesis en condiciones fisiológicas normales, por ejemplo generan neuronas para los BO en el caso de los progenitores de la ZSV, o participan en procesos de memoria y aprendizaje para los progenitores ubicados en la ZSG del hipocampo (revisado por Cayre, 2009) o constituyen una fuente de células gliales para el cuerpo calloso en el caso de los progenitores de la ECZSV (Parent y col., 2006). Sin embargo, además de desempeñar estas funciones, constituyen una fuente de nuevas células nerviosas (neuronas o células

gliales) en condiciones patológicas. Por ejemplo, se ha establecido que después de una lesión desmielinizante en el cuerpo calloso aumenta la proliferación de células ubicadas en la ZSV y en la vía de migración rostral. Además progenitores PSA-NCAM<sup>+</sup> de la ZSV que normalmente están destinados a transformarse en neuronas en los BO, se desvían de su ruta normal y penetran en la lesión en donde se diferencian en oligodendrocitos y astrocitos (Nait-Ousmesmar y col., 1999). Menn y colaboradores en 2006, por su parte mostraron que las células tipo B de la ZSV generan un pequeño número de progenitores de oligodendrocitos no mielizantes NG2<sup>+</sup>, y oligodendrocitos mielizantes maduros. Estos investigadores observaron que el número de oligodendrocitos derivados de las células tipo B, incrementaba significativamente luego de una lesión desmielinizante en el cuerpo calloso, indicando que los astrocitos de la ZSV desempeñan un papel importante en la reparación de mielina en el cerebro adulto (Menn y col., 2006). Resultados similares fueron observados en ratones a los que se les indujo una encefalomiелitis experimental autoinmune que es un modelo animal experimental de esclerosis múltiple (Picard-Riera y col., 2002). En estos animales se observó que las células de la ZSV además de generar neuronas para los BO en condiciones fisiológicas normales también representan una fuente de nuevas células nerviosas para otras regiones del cerebro.

Al igual que los progenitores de la ZSV, los de la ZSG del hipocampo también representan una fuente para nuevas células. Se ha visto que ocurre un aumento de la neurogénesis a nivel del hipocampo en situaciones patológicas particulares como por ejemplo en la isquemia (Sharp y col., 2002; Felling y Levison, 2003; Kokaia y Lindvall, 2003; Daval y col., 2004) o en la enfermedad de Alzheimer (Jin y col., 2004), lo cual se interpreta como una respuesta del sistema para tratar de restituir las neuronas perdidas.

Observaciones similares han sido reportadas para la ECZSV, por ejemplo, Parent y colaboradores (2006) reportaron que en rata adulta utilizando un modelo de epilepsia inducida por la administración de pilocarpina ocurría un aumento de la gliogénesis en la ECZSV. Este modelo de epilepsia causa la muerte de neuronas hipocampales, y estos investigadores reportaron que las células gliales recién formadas en la ECZSV eran atraídas hacia las zonas lesionadas del hipocampo, sugiriendo nuevamente una participación de los nichos neurogénicos en respuestas de regeneración del SNC.

La presencia de estos progenitores neurales representa por lo tanto una fuente importante de nuevas células nerviosas y ofrece oportunidades interesantes para el desarrollo de estrategias que permitan la regeneración y la reparación del SNC. 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, supervivencia, migración y diferenciación de estas células, es indispensable para el desarrollo y el éxito de cualquier estrategia terapéutica, y constituye, en la actualidad, una de las áreas más activas de investigación sobre la biología del desarrollo y sobre la regeneración y la reparación del SNC del

adulto. Estos estudios se llevan acabo tanto en modelos animales durante el desarrollo como en el adulto.

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 y factores morfogénicos 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), sonic hedgehog (SHH) entre otros (revisado por Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Hagg, 2005). Además de estos factores, otras moléculas están cobrando interés en la actualidad, este es el caso de ciertos neurotransmisores, en particular del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y de los neuroesteroides.

## ANTECEDENTES

### I. EL GABA: SUS RECEPTORES Y SUS EFECTOS

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico o GABA es un aminoácido formado a partir del glutamato, a través de una reacción catalizada por la glutamato descarboxilasa. Este aminoácido actúa como un neurotransmisor en el SNC adulto, generando específicamente corrientes postsinápticas inhibitorias (revisado por Ben-Ari y col., 2007; revisado por Ge y col., 2006; Ganguly y col., 2001). El GABA ejerce su acción a través de 3 clases de receptores: los receptores tipo A ( $GABA_A$ ), los receptores tipo B ( $GABA_B$ ) y los receptores tipo C ( $GABA_C$ ), siendo los receptores principales los  $GABA_A$  y los  $GABA_B$ . Los receptores  $GABA_A$  y los  $GABA_C$ , son de tipo ionotrópicos, los cuales presentan un canal selectivo para el  $Cl^-$  (revisado por Magnaghi, 2007) pero, difieren en su farmacología (Chew y Gallo, 1998). El receptor  $GABA_A$  está constituido por 5 subunidades, que al ensamblarse forman un canal permeable a los iones  $Cl^-$  y en menor grado a los iones bicarbonato  $HCO_3^-$  (revisado por Ben-Ari y col., 2007). Por su parte, los receptores  $GABA_B$  son de tipo metabotrópicos, los cuales se encuentran acoplados a proteínas G, y su activación modula la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  y canales de  $K^+$  (revisado por Ben-Ari y col., 2007; Bowery y Enna, 2000).

Las corrientes postsinápticas inhibitorias producidas por el GABA en el SNC adulto, reducen la probabilidad de que se generen más potenciales de acción en la célula postsináptica, y en consecuencia, disminuyen la excitabilidad neuronal (Randall y col., 1998; revisado por Ben-Ari y col., 2007). El GABA genera estos efectos mediante sus receptores ionotrópicos y metabotrópicos (revisado por Ben-Ari y col., 2007).

El efecto de la activación de los receptores  $GABA_A$  depende del gradiente electroquímico del ión  $Cl^-$  (revisado por Ben-Ari y col., 2007; Ganguly y col., 2001). Por lo general, la concentración de  $Cl^-$  intracelular es más baja que la extracelular, lo que ocasiona que el potencial de equilibrio para este ión sea más negativo que el potencial de reposo de la membrana (Randall y col., 1998), por lo tanto, cuando el GABA se une al receptor  $GABA_A$ , y se incrementa la conductancia del  $Cl^-$ , se produce una entrada del ión a favor de su gradiente electroquímico, y en consecuencia el potencial de membrana se acerca al potencial de equilibrio del  $Cl^-$ ; generándose una hiperpolarización (revisado por Ben-Ari y col., 2007; revisado por Ge y col., 2006).

El efecto de la activación de los receptores  $GABA_B$  es similar al de los receptores  $GABA_A$ , pero en este caso se reduce la corriente para el  $Ca^{2+}$  y se abren los canales de  $K^+$  vía proteínas G (revisado por Ge y col., 2006), ocasionando que el  $K^+$  fluya hacia el exterior a favor de su gradiente electroquímico, dejando el interior celular más negativo e hiperpolarizando la célula (Randall y col., 1998).

Al contrario de lo que ocurre en el SNC adulto, donde el efecto del GABA es inhibitorio, durante el desarrollo del SNC el GABA ejerce efectos excitatorios y no participa en la neurotransmisión, sino que ejerce efectos morfogénicos, tales como la proliferación, migración y diferenciación de los PN (revisado por Bordey, 2006; Haydar y col., 2000; Gago y col., 2004; Nguyen y col., 2003; LoTurco y col., 1995). Durante el desarrollo, la unión del GABA al receptor GABA<sub>A</sub> produce la despolarización de los PN. Esto se debe a que en estas células inmaduras, la concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> es elevada (revisado por Ben-Ari y col., 2007; Ganguly y col., 2001), por lo tanto, el potencial de equilibrio para este ión es menos negativo que el potencial de membrana en reposo. En consecuencia, cuando el GABA se une a sus receptores GABA<sub>A</sub> se produce un aumento en la conductancia del Cl<sup>-</sup>, causando la salida de este ión y la despolarización de la célula (Randall y col., 1998). La despolarización causada por la activación de los receptores GABA<sub>A</sub>, produce un incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular en las neuronas inmaduras, debido a la apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes (revisado por Ben-Ari y col., 2007). Los efectos morfogénicos del GABA durante el desarrollo se explican precisamente por el aumento de Ca<sup>2+</sup> en el citosol, lo que desencadena una serie de respuestas intracelulares que regulan la proliferación, migración y diferenciación celular (Leinekugel y col., 1999; Haydar y col., 2000; Gago y col., 2004; Nguyen y col., 2003).

El cambio del efecto del GABA de excitatorio a inhibitorio se debe a la reducción de la concentración de Cl<sup>-</sup> intracelular a medida que avanza el desarrollo (Ganguly y col., 2001; revisado por Ben-Ari y col., 2007).

Los efectos morfogénicos del GABA han sido claramente demostrados en cerebro de rata (Barker y col., 1998; Ma y Barker, 1995, 1998). Este aminoácido es capaz de modular durante el desarrollo la proliferación celular (LoTurco y col., 1995; Haydar y col., 2000; Nguyen y col., 2003), la migración (Behar y col., 2000) y el crecimiento de las prolongaciones neuronales (Maric y col., 2001). La mayoría de estos resultados ha sido obtenida en cultivos organotípicos de rebanadas de cerebro lo que no permite establecer si se trata de un efecto directo o de un efecto indirecto. Sin embargo, un efecto directo del GABA sobre la proliferación de los progenitores neurales fue recientemente demostrada en dos tipos de progenitores neurales neonatales PSA-NCAM<sup>+</sup>, uno aislado de estriado (Nguyen y col., 2003) y el otro de cerebro entero (Gago y col., 2004). En este último caso, Gago y colaboradores describieron la expresión de distintas subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en progenitores PSA-NCAM<sup>+</sup> purificados, y demostraron que el GABA incrementa la proliferación de estas células de manera dosis-dependiente y de forma específica vía receptores GABA<sub>A</sub> (Gago y col., 2004).

En los nichos neurogénicos del cerebro postnatal también se han reportado efectos similares los del GABA. Por ejemplo, se ha observado que los PN de la ZSV y de la VMR producen GABA y que expresan receptores GABA<sub>A</sub>, además, el GABA es capaz de despolarizar estas células, lo que sugiere un control autocrino/paracrino del GABA en procesos que modulan la migración y proliferación celular (Wang y col., 2003). Por otra parte, se ha visto que estas señales GABAérgicas

disminuyen la velocidad de migración de los neuroblastos en la ZSV y la VMR, y que también disminuyen la proliferación de neuroblastos y astrocitos (Bolteus y Bordey, 2004; revisado por Bordey, 2006).

Actualmente se considera que el GABA actúa como un factor morfogénico importante durante el desarrollo del SNC y que esta señal está conservada en el adulto en los nichos neurogénicos, en donde, mediante mecanismos autocrinos y/o paracrinos, modula una serie de aspectos de la biología de las CMN y de los PN tales como la proliferación, la migración y la diferenciación celular.

## II. NEUROESTEROIDES

El efecto excitatorio del GABA está ampliamente mediado por los receptores GABA<sub>A</sub> los cuales son el blanco de un cierto número de drogas psicoactivas, como las benzodiazepinas, los barbitúricos, el alcohol, así como de los neuroesteroides (NE) (revisado por Sieghart, 1995; revisado por Ito y col., 1996; Lambert y col., 2003).

Los NE son esteroides sintetizados *de novo* en el SN a partir del colesterol o a partir de esteroides circulantes, capaces de ejercer un efecto autocrino o paracrino (Robel y Baulieu, 1994; Schumacher y col., 2000).

La biosíntesis de los NE se inicia con la formación de pregnenolona (PREG) a partir de colesterol, reacción catalizada por el citocromo P-450<sub>scc</sub>, el cual se localiza en la membrana interna mitocondrial y remueve 6 carbonos de la molécula de colesterol. La PREG que se forma pasa de la mitocondria al retículo endoplasmático, en donde es convertida a progesterona (PROG) por la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/Δ<sup>5</sup>-Δ<sup>4</sup> isomerasa (3β-HSD). La PROG luego es reducida por la 5α-reductasa, convirtiéndose en 5α-dihidroprogesterona (5α-DHP). A partir de ésta se forma la 3α,5α-tetrahidroprogesterona (3α,5α-THP) ó alopregnanolona y el isómero 3β (3β,5α-THP), debido a la acción de la 3α-hidroxiesteroide oxidoreductasa (3α-HSOR) y de la 3β-hidroxiesteroide oxidoreductasa (3β-HSOR), respectivamente (Gago y col., 2001; Schumacher y col., 2000). La 3β,5α-THP también puede formarse a partir de la 3α,5α-THP gracias a la acción de la 3(α→β)hidroxiesteroide epimerasa (3(α→β)HSE) (Schumacher y col., 2012).

Los NE ejercen sus efectos a través de diversos mecanismos de acción: el mecanismo genómico y el no genómico (Schumacher y col., 2000; revisado por 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 cuanto al mecanismo no genómico, los NE pueden actuar a través de receptores específicos de membrana (revisado por El-Etr y col., 2000) o actuar a través de varios receptores para neurotransmisores en la membrana plasmática, como por ejemplo el receptor GABA<sub>A</sub> y el receptor NMDA (revisado por Compagnone y Mellon, 2000). Un ejemplo de este mecanismo es el caso del sulfato de PREG

(SPREG) que actúa como modulador positivo de los receptores NMDA. También se ha visto que actúa como modulador negativo de los receptores GABA<sub>A</sub> y que inhibe la acción de canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes (revisado por Mellon, 2007).

Ciertos metabolitos de la PROG presentan la capacidad de modular procesos de neurotransmisión y de neurogénesis vía receptores GABA<sub>A</sub> (revisado por Compagnone y Mellon, 2000). Tal es el caso de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP, la cual actúa como un modulador alostérico positivo de los receptores GABA<sub>A</sub> (revisado por Mellon, 2007; revisado por Brinton y col., 2008). Es interesante mencionar que la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP a altas concentraciones del orden del micromolar, puede actuar como un agonista capaz de abrir el canal iónico en ausencia del GABA (revisado por Lambert y col., 1996).

Debido al efecto de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP sobre el receptor GABA<sub>A</sub>, este NE es capaz de disminuir la excitabilidad neuronal y de generar una serie de efectos fisiológicos y farmacológicos, tales como efectos anticonvulsivantes, analgésicos, anestésicos, ansiolíticos y efectos sobre el estrés, el sueño, la depresión y la memoria (Schumacher y col., 2000). Por otro lado, también se le han atribuido a los NE efectos tróficos y de regeneración sobre el sistema nervioso (Schumacher y col., 2000). Dentro de los efectos neurotróficos destacan los que ejercen la PROG y sus metabolitos sobre la síntesis de mielina en el SNC y SN periférico. Por ejemplo, se ha demostrado que la PROG, la 5 $\alpha$ -DHP y la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP, estimulan la producción de mielina por parte de las células de Schwann de los nervios periféricos, mediante la activación de los genes que codifican para varias de las proteínas de la mielina (Koenig y col., 1995; Melcangi y col., 1999).

En el SNC, Gago y colaboradores en 2001, mostraron que progenitores neurales PSA-NCAM<sup>+</sup> aislados de cerebro de rata recién nacida eran capaces de sintetizar *in vitro* dos esteroides biológicamente activos, la PROG y grandes cantidades de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP. Estos investigadores reportaron que los progenitores PSA-NCAM<sup>+</sup> eran capaces de sintetizar *in vitro* PROG a partir de PREG y que podían metabolizar la PROG en 5 $\alpha$ -DHP y posteriormente en 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP y en 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THP. Adicionalmente, observaron que en estos progenitores, la actividad de la enzima encargada de la síntesis de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP, la 3 $\alpha$ -HSOR, era particularmente elevada con respecto a la que presentaban los progenitores de oligodendrocitos y los oligodendrocitos diferenciados, lo cual sugiere un papel de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP en estadios tempranos del linaje de oligodendrocitos. Estos resultados sugieren que la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP puede modular algunos aspectos de la biología de los progenitores neurales.

En efecto, Gago y colaboradores en 2004, mostraron que la proliferación de los progenitores PSA-NCAM<sup>+</sup> aislados de ratas recién nacidas, se ve aumentada por efecto de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP. Por otra parte, demostraron que el efecto estimulador de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP estaba mediado por receptores GABA<sub>A</sub>, debido a que era abolido por la bicuculina (antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub>). En este mismo trabajo, encontraron que los progenitores PSA-NCAM<sup>+</sup> sintetizaban GABA y que expresaban las subunidades básicas del receptor GABA<sub>A</sub>, requeridas para la unión de los NE y del GABA. Adicionalmente, demostraron que el GABA tenía un efecto estimulador en la proliferación de los

progenitores, efecto que también fue sensible a la bicuculina. En conclusión, los progenitores PSA-NCAM<sup>+</sup> aislados de ratas recién nacidas son capaces de sintetizar tanto GABA como 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP, y éstos pueden modular de manera autocrina y/o paracrina la proliferación de estas células vía receptores GABA<sub>A</sub>.

Wang y colaboradores confirmaron en 2005 los resultados obtenidos por Gago y colaboradores (2004), ya que demostraron que la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP estimulaba la proliferación celular vía receptores GABA<sub>A</sub> en células con capacidad neurogénica aisladas del hipocampo.

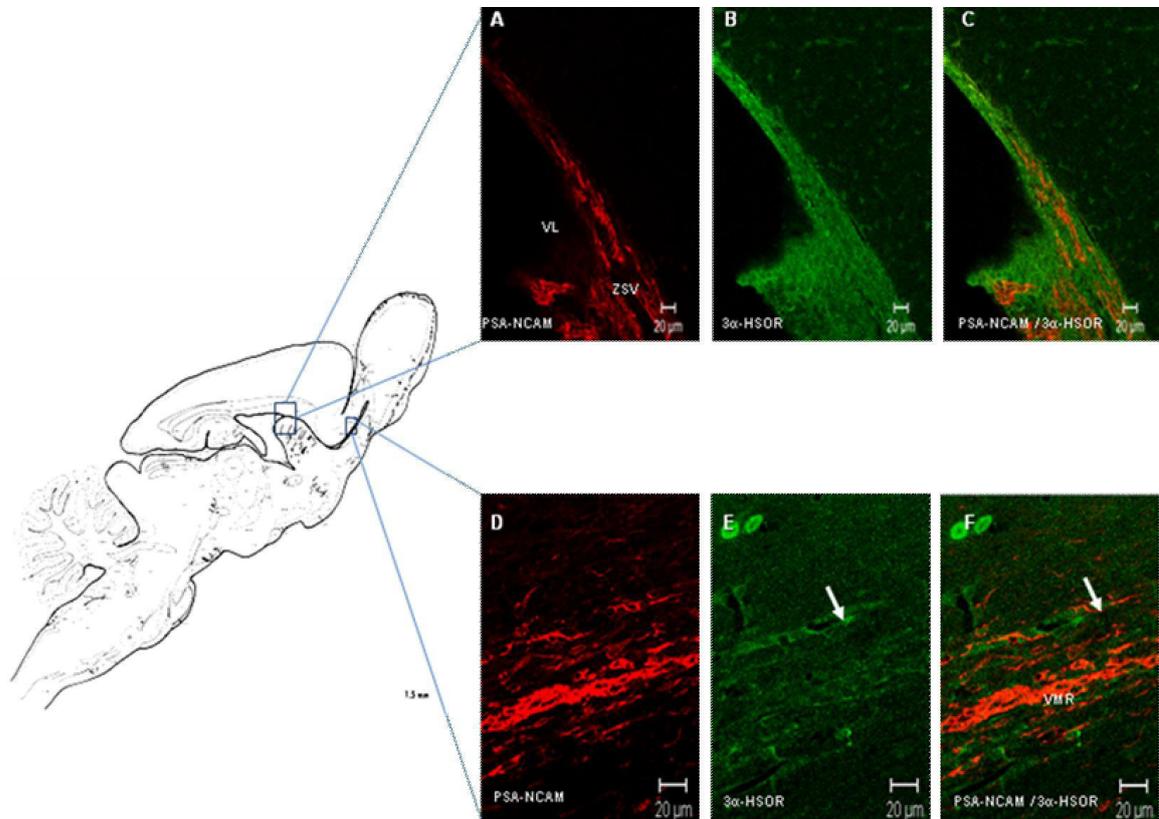
Otro efecto neurotrófico interesante es el que ejerce la PROG sobre la proliferación y la diferenciación de los oligodendrocitos y sus precursores en cultivos de rebanadas de cerebelo (Ghoumari y col., 2005).

En la actualidad, se están desarrollando estudios en el laboratorio, que tienen como objetivo el de establecer el efecto de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP sobre la biología de las CMN y de los PN en condiciones *in vivo*. En este sentido, se estableció recientemente la distribución de la 3 $\alpha$ -HSOR en el cerebro de rata adulta (Gago y col., manuscrito en preparación) (Fig. 7) y durante el desarrollo embrionario y postnatal (Alcalá, 2009). Los resultados obtenidos en rata adulta muestran que la 3 $\alpha$ -HSOR se expresa ampliamente en todo el cerebro, lo cual concuerda con el efecto modulador de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP sobre los receptores GABA<sub>A</sub>. Por otra parte, también se observó que la 3 $\alpha$ -HSOR se expresa en zonas neurogénicas como la ZSV, la vía de migración rostral y la ZSG. De igual forma, también se observó la expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en estructuras dotadas de una alta plasticidad como lo son los BO, los bulbos olfatorios accesorios, el hipocampo y la fimbria del hipocampo, lo que sugiere que la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP pudiese contribuir a la remodelación de los circuitos neuronales. En conjunto estos resultados aportan evidencias anatómicas de que la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP pudiese participar en el control de la biología de los PN que residen en los nichos neurogénicos del cerebro adulto y que de manera más amplia, pudiese participar en la plasticidad neural.

Con respecto a la distribución de la 3 $\alpha$ -HSOR durante el desarrollo embrionario y postnatal los resultados obtenidos fueron también particularmente interesantes (Alcalá, 2009). Al igual que en el adulto, la 3 $\alpha$ -HSOR se expresa ampliamente durante el desarrollo pero siguiendo un patrón espacio-temporal específico. Se observó que, en general, la expresión de la enzima tiende a disminuir a medida que el desarrollo avanza. La expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR es considerable en las zonas neurogénicas, desde las etapas embrionarias hasta las etapas postnatales, siendo más alta al comienzo del desarrollo embrionario y durante el período comprendido entre los días postnatales 7 y 12 (P7 y P12). Durante el desarrollo, la 3 $\alpha$ -HSOR también se expresa en zonas no neurogénicas clásicas, como en la corteza y en el cerebelo.

En conjunto, los resultados obtenidos con respecto a la distribución de la 3 $\alpha$ -HSOR en el cerebro de rata adulta y durante el desarrollo embrionario y postnatal, aportan evidencias anatómicas

sobre el posible papel de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP como modulador de la proliferación, migración y diferenciación de los PN en las zonas neurogénicas.



**Figura 7. Distribución de la enzima  $3\alpha$ -HSOR en el cerebro de la rata adulta.** Inmunofluorescencia para la  $3\alpha$ -HSOR (Alexa 488) y PSA-NCAM (rodamina) en cortes sagitales de cerebros de ratas macho adultos, a nivel de la zona subventricular (ZSV) (A, B, C) y de la vía de migración rostral (D, E, F). Se puede observar que la ZSV, adyacente al ventrículo lateral (VL) así como la VMR, ambas caracterizadas por la expresión de PSA-NCAM (A y D, respectivamente), expresan también la  $3\alpha$ -HSOR (B y E, respectivamente). En las fotografías C y F es posible apreciar la expresión de PSA-NCAM y de  $3\alpha$ -HSOR simultáneamente. A la izquierda, se muestra, en un esquema de corte sagital de rata, el nivel en donde se realizaron las fotografías. (Gago y col., manuscrito en preparación).  $3\alpha,5\alpha$ -THP:  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroprogesterona;  $3\alpha$ -HSOR: enzima  $3\alpha$ -hidroxiesteroide oxidoreductasa.

Adicionalmente, cabe destacar dos resultados particularmente interesantes que se obtuvieron a partir de estos trabajos, primero, la alta expresión de la  $3\alpha$ -HSOR en las células endoteliales siguiendo un patrón espacio-temporal definido y segundo, la alta expresión de la enzima en la ECZSV. En efecto, se observó, durante el desarrollo postnatal, una muy alta densidad de células  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> que formaban cadenas radiales que penetraban en el cuerpo calloso. Estas cadenas desaparecieron en P21, quedando sólo células  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> aisladas, dispersas en la sustancia blanca. La expresión de la  $3\alpha$ -HSOR en la ECZSV y en las cadenas radiales que se derivan de ésta, sugiere que la  $3\alpha,5\alpha$ -THP

pudiese modular ciertos aspectos asociados a la función de esta zona neurogénica, como son la producción de células gliales (oligodendrocitos y astrocitos), y la mielinización. Estos resultados junto con toda la evidencia acumulada en favor de un efecto de la PROG y de sus metabolitos, en particular de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP, en la biología de las células del linaje oligodendrocitario (Gago y col., 2001; Schumacher y col., 2000; Ghoumari y col., 2005) y en la síntesis de mielina en el SNC (Schumacher y col. 2000; Ghoumari y col., 2003; Schumacher y col., 2012), han motivado el presente proyecto cuyo objetivo es el de aumentar nuestro conocimiento sobre el desarrollo postnatal de la ECZSV y sobre el posible papel que pudiese jugar la  $3\alpha,5\alpha$ -THP en este nicho neurogénico.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Estudiar el desarrollo postnatal de la extensión caudal de la zona subventricular del cerebro de rata.

### Objetivos específicos

1. Evaluar los cambios estructurales generales de la ECZSV durante el desarrollo postnatal del cerebro de rata.
2. Identificar los diferentes tipos celulares presentes en la ECZSV a distintos estadios del desarrollo postnatal del cerebro de rata.
3. Evaluar la expresión de la  $3\alpha$ -HSOR en la ECZSV durante el desarrollo postnatal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las características estructurales de la ECZSV del cerebro de rata que se estudiaron fueron: el grosor de la ECZSV, y el número de células que conforman la zona intermedia (ZI). Para ello se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina (H/E), y/o con 4',6-diamidina-2'-fenilindol dihidrocloruro (DAPI), de cortes sagitales de cerebro de rata a distintos estadios del desarrollo postnatal, desde el primer día postnatal hasta el día 21. Ambos parámetros se evaluaron en tres áreas distintas: región anterior, región media y región posterior de la ECZSV, empleando un programa de procesamiento de imágenes, llamado Image J.

Por otra parte, para identificar los diferentes tipos celulares presentes en la ECZSV a distintos estadios del desarrollo postnatal, se realizaron pruebas de inmunofluorescencia, utilizando marcadores específicos para progenitores neurales (nestina), astrocitos (GFAP), y progenitores de oligodendrocitos (NG2). Adicionalmente, los núcleos de todas las células fueron visualizados con DAPI.

Finalmente, para evaluar la expresión de la  $3\alpha$ -HSOR en la ECZSV durante el desarrollo postnatal, se desarrollaron los siguientes aspectos:

- en un primer tiempo, se estandarizó el protocolo de inmunohistoquímica para el marcaje de la  $3\alpha$ -HSOR utilizando un anticuerpo policlonal desarrollado contra un péptido sintético de la enzima. La estandarización se realizó primero en hígado y luego en cerebro de rata. Se estandarizó la concentración del anticuerpo, el tiempo de incubación y el tipo de corte (corte flotante o corte congelado).
- luego de la estandarización, se empleó el anticuerpo contra la  $3\alpha$ -HSOR en las condiciones óptimas establecidas, para evaluar la expresión de la enzima, empleando la técnica de inmunofluorescencia. Los núcleos de todas las células fueron visualizados con DAPI.
- finalmente, se realizaron dobles marcajes con el anticuerpo anti- $3\alpha$ -HSOR y los distintos marcadores de células nerviosas, nestina, GFAP o NG2.

### I. Recolección 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 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 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**

### **Fijación de los animales**

Los animales postnatales se fijaron por perfusión intracardíaca. 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 4°C toda la noche. Estos cerebros fueron utilizados para realizar cortes congelados. Para ello, éstos se congelaron sumergiéndolos en isopentano a -70°C 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 4°C, hasta la realización de los cortes flotantes en vibratomo. Los cortes congelados fueron utilizados para las tinciones con hematoxilina-eosina y DAPI, 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. Los cortes fueron recolectados en láminas previamente gelatinizadas con una solución de gelatina al 0,5% y luego fueron almacenados a -70 °C.

### **b) Cortes en vibratomo**

Se realizaron cortes sagitales de 30 a 50 µm de espes de los cerebros almacenados en BP a 4°C mediante el empleo de un vibratomo LEICA modelo VT1000S, or. Los cortes se almacenaron en placas de 24 pozos en BP a 4°C.

## **II. Evaluación de los cambios estructurales generales de la ECZSV durante el desarrollo postnatal del cerebro de rata**

Para estudiar los cambios generales de la ECZSV durante el desarrollo postnatal se evaluaron dos parámetros, por un lado se midió el espesor de la ECZSV y por otro lado se contó el número de células que conforman la zona migratoria asociada a la ECZSV correspondiente a la zona intermedia (ZI). Para ello, se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina (H/E) y tinciones con 4',6-diamidina-2'-fenilindol dihidrocloruro (DAPI), en cortes sagitales de cerebro de rata a distintos estadios del desarrollo postnatal. Ambos parámetros se evaluaron en tres áreas distintas: región anterior, región media y región posterior de la ECZSV, empleando el programa Image J.

### **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 SONY.

### **2. Tinción de los núcleos celulares con DAPI**

De igual forma, también se realizaron tinciones con DAPI de los cortes congelados de cerebro de rata. Para ello, los cortes fueron incubados por 30 minutos con DAPI (0,1 µg/ml), y luego se realizaron 3 lavados con PBS, 5 minutos cada vez. Los resultados se analizaron con un microscopio invertido de fluorescencia axiovert 25, marca Zeiss.

## **III. Identificación de los diferentes tipos celulares presentes en la ECZSV a distintos estadios del desarrollo postnatal del cerebro de rata**

La identificación de los diferentes tipos celulares presentes en la ECZSV se realizó mediante inmunofluorescencia utilizando marcadores celulares específicos. Se utilizó la expresión del filamento intermedio nestina para identificar progenitores neurales, del proteoglicano NG2 para identificar los progenitores de oligodendrocitos y del filamento intermedio GFAP para la identificación de astrocitos.

El protocolo general utilizado para las pruebas de inmunofluorescencia se describe brevemente a continuación. Todas las inmunofluorescencias se realizaron en cortes flotantes. Todas las

incubaciones se realizaron a temperatura ambiente con agitación continua y entre cada incubación se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Los cortes se incubaron con suero normal de cabra (normal goat serum: NGS) al 5% en PBS con 0,3% de Tritón X-100 (PBST) durante 30 minutos. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario diluido en PBST, durante 4 horas. Luego, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario respectivo (ver Tabla 1) por 2 horas y en oscuridad. Posteriormente, los cortes fueron incubados en oscuridad con DAPI a una concentración de 0,1 µg/ml en PBST por 30 minutos. Finalmente, los cortes se montaron con un medio de montaje para fluorescencia (Immunomount). Los resultados fueron luego analizados utilizando un microscopio invertido de fluorescencia axiovert 25, marca Zeiss y con microscopía confocal Olympus. En cada prueba de inmunofluorescencia, se realizaron controles negativos, en los que se sustituyó la incubación con el anticuerpo primario por una incubación con PBST. En estos controles no se observó marcaje para ninguno de los marcadores de interés, lo que comprueba que los anticuerpos secundarios no producen, en nuestro material, marcajes inespecíficos.

Para la realización de las inmunofluorescencias fue necesario estandarizar las concentraciones de los anticuerpos primarios y los tiempos de incubación. Para el anticuerpo anti-NG2 se probaron las diluciones 1/50, 1/100, 1/200 y 1/500, obteniéndose el mejor marcaje con la dilución 1/100. Para los anticuerpos anti-nestina y anti-GFAP, se probaron las diluciones recomendadas por el fabricante, es decir 1/100 y 1/200, respectivamente, obteniéndose buenos resultados en ambos casos. Con respecto al tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se probaron dos tiempos de incubación, 2 horas y 4 horas, obteniéndose diferencias significativas para el anticuerpo anti-NG2, el cual dio inmunomarcaje sólo con 4 horas de incubación. De acuerdo a estos resultados, se decidió emplear un tiempo de incubación de 4 horas para todos los anticuerpos primarios.

En la tabla 1 se presenta un resumen de los anticuerpos, donde se muestran las diluciones de los distintos anticuerpos utilizados, las características generales de los mismos, y los anticuerpos secundarios respectivos.

#### **IV. Evaluación de la expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en la ECZSV durante el desarrollo postnatal**

Para el desarrollo de este objetivo, primero fue necesario estandarizar el protocolo de inmunofluorescencia para la 3 $\alpha$ -HSOR, luego, se estudió la expresión de la enzima durante el desarrollo postnatal y finalmente se realizaron dobles marcajes con la enzima y los distintos marcadores celulares para identificar el tipo celular de las células 3 $\alpha$ -HSOR+.

La inmunofluorescencia para la 3 $\alpha$ -HSOR se realizó utilizando un anticuerpo policlonal desarrollado contra un péptido sintético de la enzima. Este anticuerpo fue realizado en colaboración con los doctores Walter Mosca y Yelitza Campos del laboratorio de Fisiopatología del Instituto de

Biomedicina, Escuela de Medicina J.M. Vargas. El protocolo consistió en la inmunización de conejos con un péptido sintético, análogo a una región antigénica de la enzima, predicha por métodos bioinformáticos. Posteriormente, la especificidad del anticuerpo generado fue evaluada por inmunodot (Fig. 8).

Los parámetros que se estandarizaron para la inmunofluorescencia fueron el tipo de corte (cortes congelados o flotantes), la dilución del anticuerpo y el tiempo de incubación. El anticuerpo anti-3 $\alpha$ -HSOR fue probado en cortes congelados y cortes flotantes de hígado y de cerebro de rata (de P7 a P15), lo que permitió determinar que el anticuerpo permite el marcaje de la enzima por inmunofluorescencia en ambos tejidos, pero únicamente en cortes flotantes.

En cuanto a las diluciones del anticuerpo anti-3 $\alpha$ -HSOR, se probaron las diluciones 1/1000, 1/500, 1/200, 1/120 y 1/100. El marcaje obtenido con las tres primeras diluciones fue muy leve, en cambio con las diluciones 1/120 y 1/100, el marcaje fue mucho mejor, y se decidió trabajar con la dilución 1/120, debido a que daba la mejor relación marcaje/ruido de fondo (Tabla 1).



**Figura 8. Inmunodot del antisuero contra el péptido sintético de la 3 $\alpha$ -HSOR.** (A) Inmunoreactividad del antisuero contra el péptido sintético. De izquierda a derecha, las cantidades empleadas del péptido fueron 5, 2 y 1  $\mu$ g. (B) Control negativo utilizando el suero preinmune. No se observa ninguna inmunoreactividad.

Con respecto al tiempo de incubación para el anticuerpo anti-3 $\alpha$ -HSOR, se probaron tres tiempos de incubación, toda la noche, 2 horas y 4 horas, obteniéndose resultados similares en todos los casos.

Para la realización de los dobles marcajes contra la 3 $\alpha$ -HSOR y los distintos marcadores celulares (nestina, NG2 y GFAP), los cortes fueron incubados con una mezcla de los dos anticuerpos primarios, por 4 horas, y luego con una mezcla de los dos anticuerpos secundarios respectivos por 2 horas. El protocolo general para las inmunofluorescencias fue similar al descrito anteriormente.

En la tabla se muestran las diluciones de los distintos anticuerpos utilizados y las características de los mismos.

**Tabla 1. Tabla resumen de los anticuerpos utilizados para las pruebas de inmunofluorescencia.** Se presentan las características generales de los anticuerpos primarios y secundarios, así como las diluciones empleadas.

| <b>Anticuerpo primario</b> | <b>Características</b>  | <b>Anticuerpo secundario respectivo</b>     | <b>Características</b>  |
|----------------------------|---|---|---|
| Anti-GFAP                  | Anticuerpo comercial,<br>MAB360 Chemicon-Millipore<br>Anticuerpo monoclonal hecho en<br>ratón, isotipo IgG1<br><br>Dilución: 1/200      | anti-IgG de<br>ratón<br>Dilución:<br>1/100  | Anticuerpo comercial,<br>AP124R Chemicon-<br>Millipore.<br>Anticuerpo policlonal<br>hecho en cabra,<br>acoplado a la rodamina |
| Anti-NG2                   | Anticuerpo comercial,<br>MAB5384 Chemicon-Millipore<br>Anticuerpo monoclonal hecho en<br>ratón, isotipo IgG1<br><br>Dilución: 1/100     | anti-IgG de<br>ratón<br>Dilución:<br>1/100  | Anticuerpo comercial,<br>AP124R Chemicon-<br>Millipore.<br>Anticuerpo policlonal<br>hecho en cabra,<br>acoplado a la rodamina |
| Anti-<br>nestina           | Anticuerpo comercial,<br>MAB353 Chemicon-Millipore<br>Anticuerpo monoclonal hecho en<br>ratón, isotipo IgG1<br><br>Dilución: 1/100      | anti-IgG de<br>ratón<br>Dilución:<br>1/100  | Anticuerpo comercial,<br>AP124R Chemicon-<br>Millipore.<br>Anticuerpo policlonal<br>hecho en cabra,<br>acoplado a la rodamina |
| Anti-3 $\alpha$ -<br>HSOR  | Anticuerpo no comercial,<br>Anticuerpo policlonal hecho en<br>conejo contra un péptido sintético<br>de la enzima<br><br>Dilución: 1/120 | anti-IgG de<br>conejo<br>Dilución:<br>1/100 | Anticuerpo comercial,<br>Interchim Molecular<br>Probes.<br>Anticuerpo policlonal<br>hecho en cabra acoplado<br>a Alexa 488    |

## RESULTADOS

### 1. Evaluación de los cambios estructurales generales de la extensión caudal de la zona subventricular durante el desarrollo postnatal

Para el estudio de los cambios estructurales de la ECZSV se realizaron dos tipos de tinciones, se colorearon los cortes de cerebro con H/E o con DAPI. La evaluación de los parámetros analizados, a saber el espesor de la ECZSV y la densidad de células migratorias en la ZI, se efectuó con DAPI debido a que el análisis de las imágenes era más sencillo y preciso.

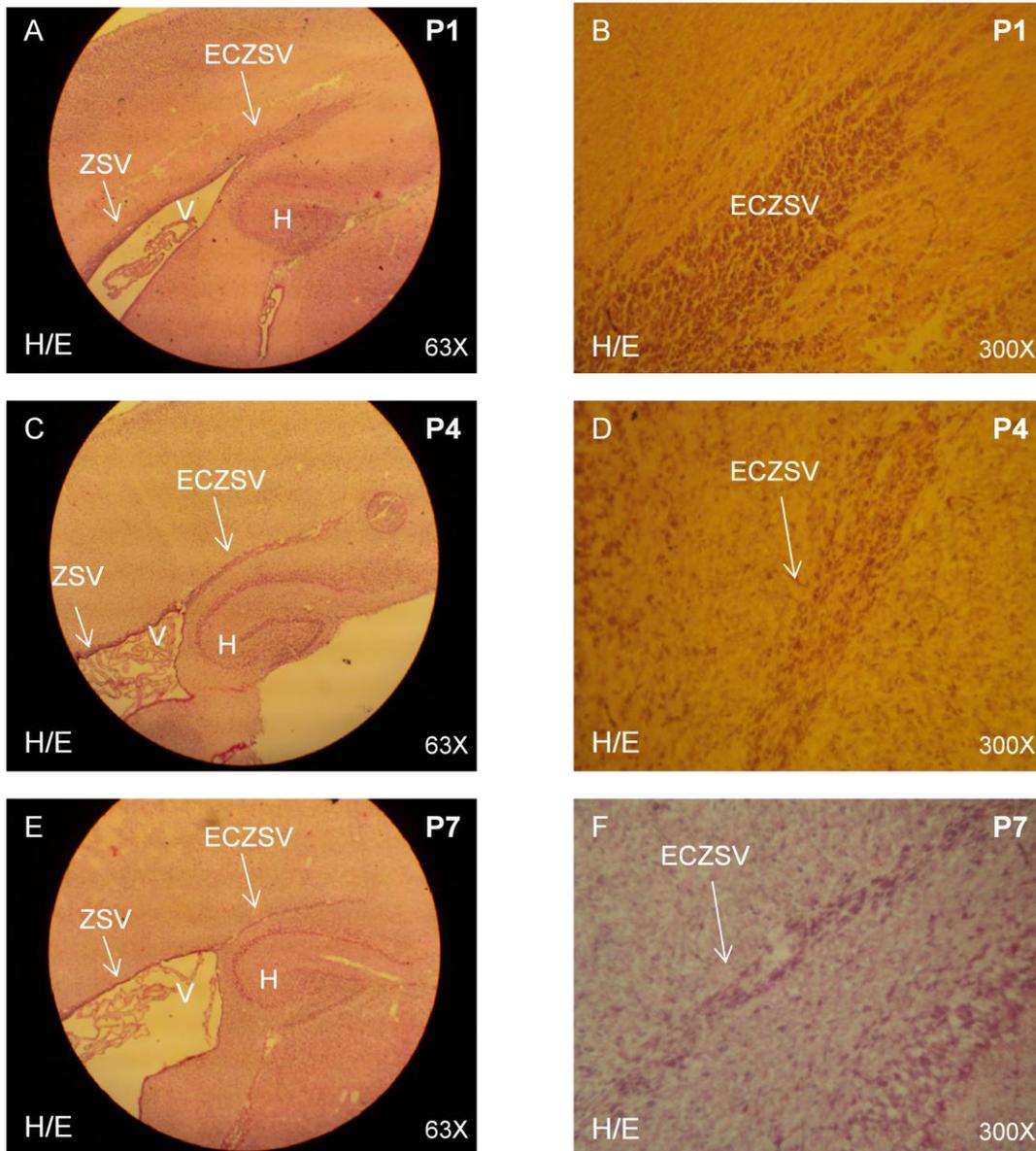
Se observó que el espesor de la ECZSV disminuye notablemente a medida que avanza el desarrollo, tanto en la región anterior, como en la media (Figs. 9, 10, 11, 12, 13). Sin embargo, el espesor de la región posterior se comporta de manera diferente, manteniéndose más o menos constante entre P4 y P15, y posteriormente disminuye (Fig. 13).

Por otra parte, se obtuvo que la densidad celular en la ZI disminuye notablemente de P1 a P4, y posteriormente se mantiene más o menos constante hasta P12 (Figs. 11B, 11D, 13). Las edades P15 y P21 no fueron tomadas en cuenta para el análisis de este parámetro, debido a que en estas edades la ZI como tal ya no existe, y en su lugar se encuentra el cuerpo caloso.

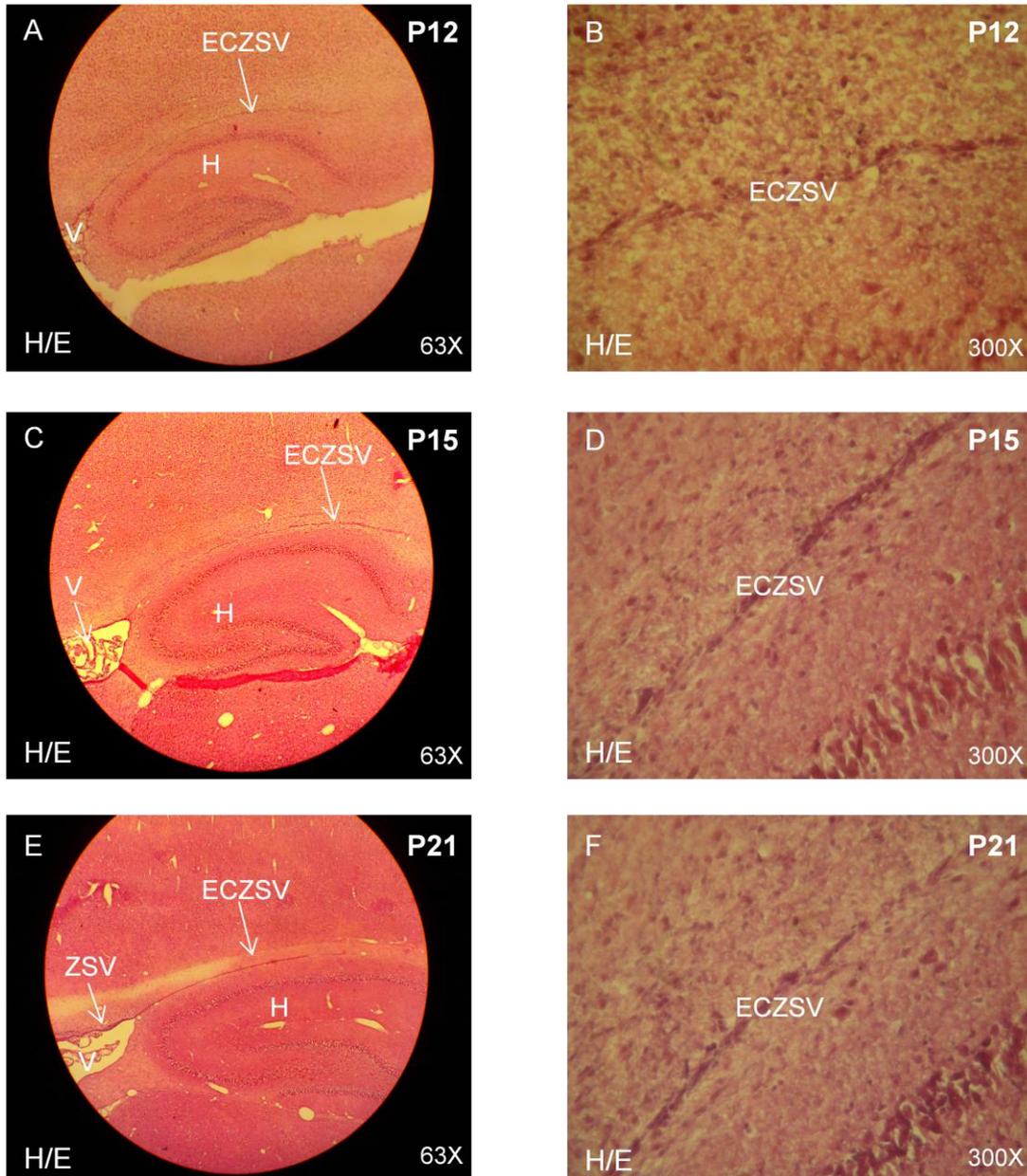
Desde P1 a P12 se observó la presencia de cadenas radiales formadas por células migratorias en la ZI, cualitativamente, la cantidad de estas cadenas parece disminuir (Figs. 11B, 11D, 11F y 12B). Adicionalmente, se observó que en P 12 la orientación de las células comienza a cambiar y en P15 las cadenas se encuentran dispuestas tangencialmente (Figs. 12D, 15). Por otra parte, en P21 se observó que la disposición de las células es más homogénea y no se observaron cadenas celulares (Figs. 12F, 15).

### 2. Identificación de los diferentes tipos celulares presentes en la extensión caudal de la zona subventricular a distintos estadios del desarrollo postnatal

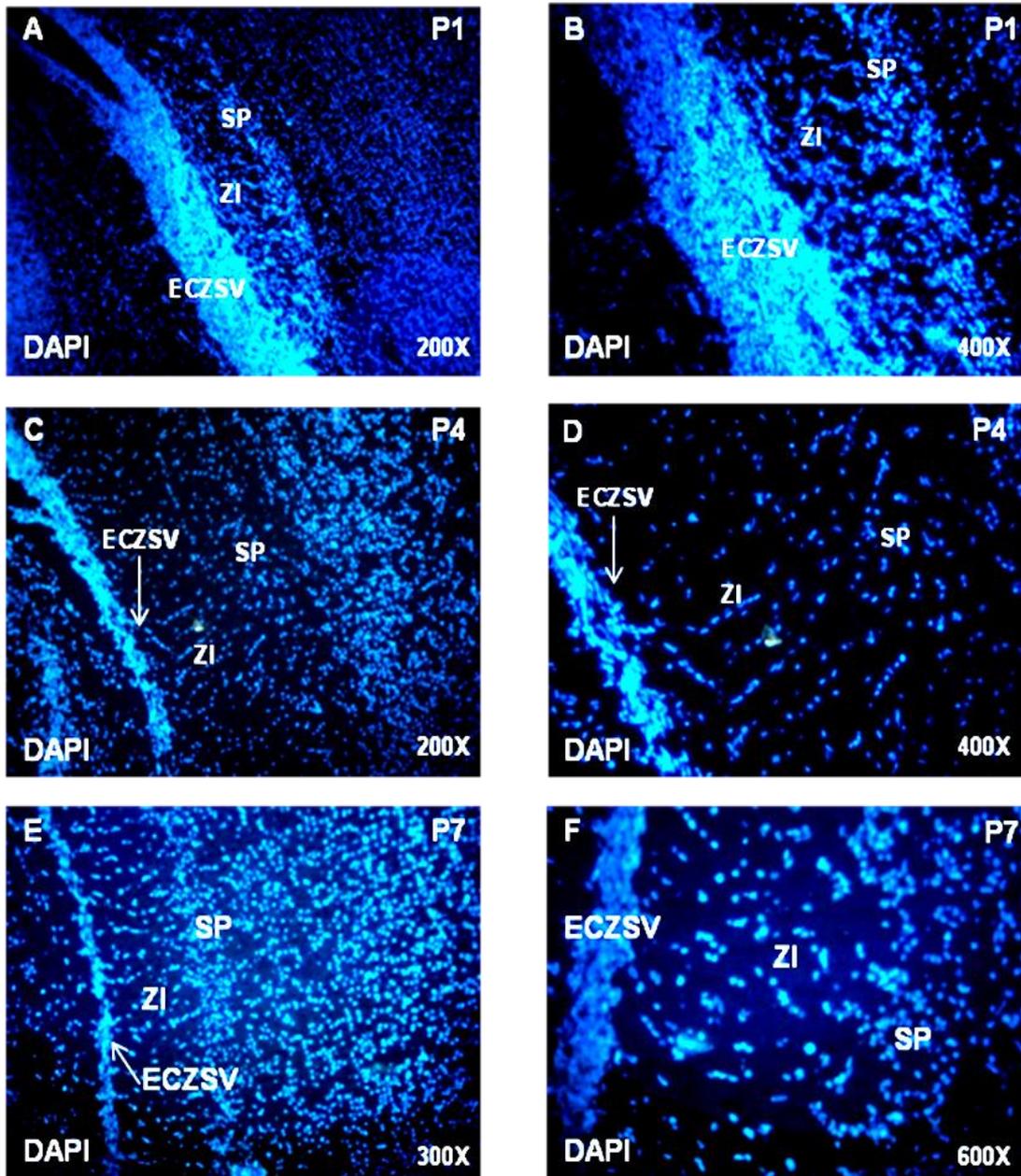
De manera general, se pudo observar la presencia de progenitores neurales, de astrocitos y de progenitores de oligodendrocitos, tanto en la ECZSV como en la región de células migratorias correspondiente a la ZI de la corteza en desarrollo. Adicionalmente, se pudo observar que la presencia de estos tipos celulares durante el desarrollo postnatal sigue un patrón espacio-temporal definido.



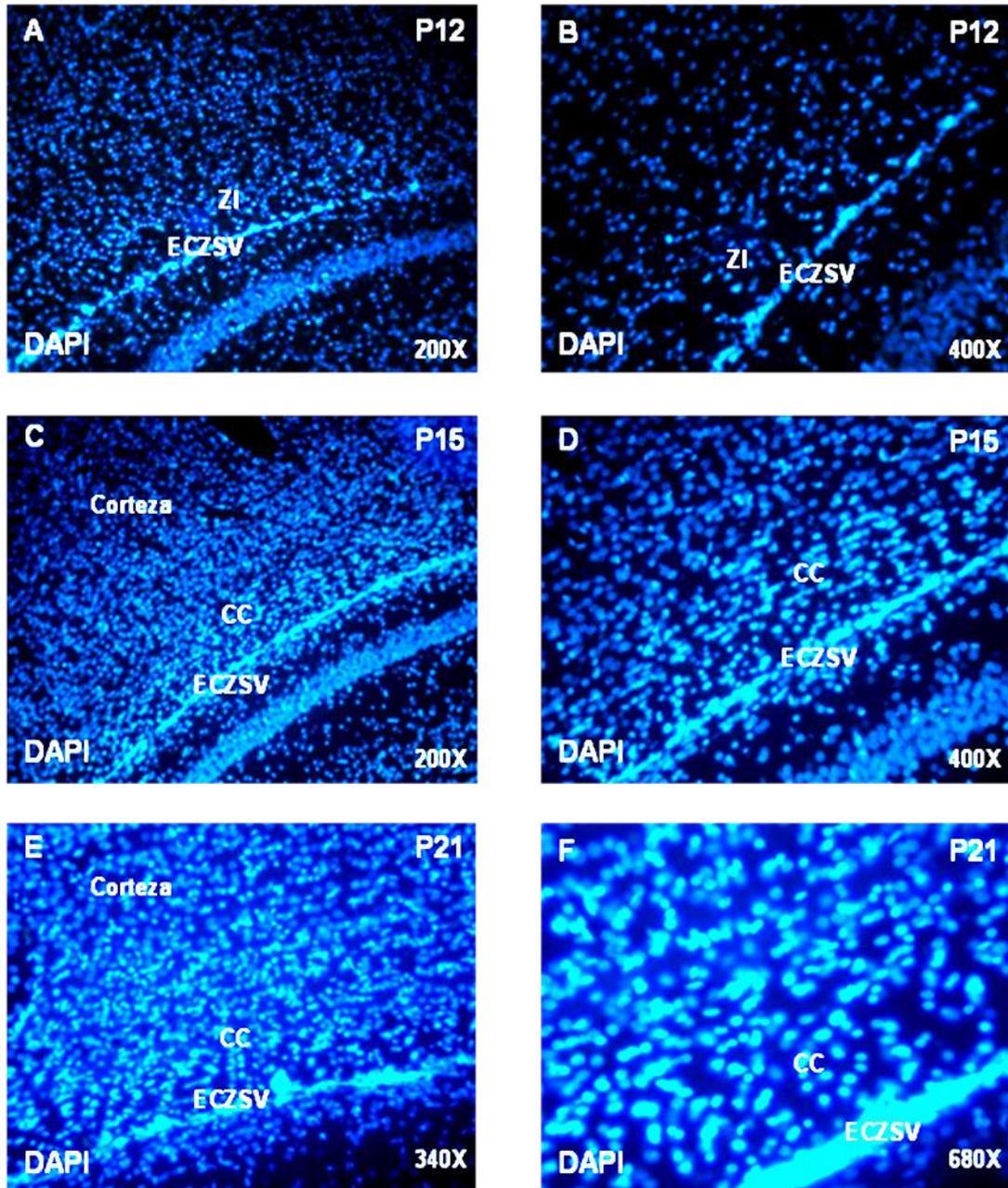
**Figura 9. Cambios estructurales de la ECZSV durante el desarrollo postnatal.** Tinción con hematoxilina y eosina (H/E) de cortes sagitales de cerebro de rata durante la primera semana del desarrollo postnatal. (A, C y E) Fotografías tomadas utilizando una lupa estereoscópica. (B, D y F) Fotografías tomadas utilizando un microscopio invertido con luz blanca. (A, C y E) Visión general de la ECZSV de P1, P4 y P7, también se observan la ZSV, el ventrículo (V) y el hipocampo (H). Nótese la disminución progresiva del espesor de la ECZSV conforme el desarrollo avanza. (B, D y F) Acercamiento de la ECZSV a P1, P4 y P7. En P1 se observa una alta densidad de células que conforman la ECZSV, la cual va reduciendo su espesor durante este período del desarrollo postnatal.



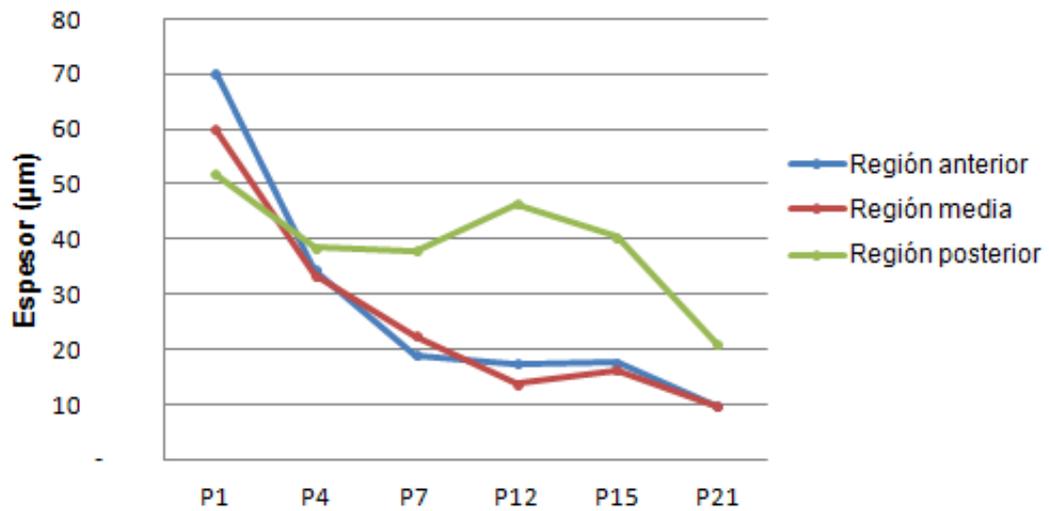
**Figura 10. Cambios estructurales de la ECZSV durante el desarrollo postnatal.** Tinción con hematoxilina y eosina de cortes sagitales de cerebro de rata durante la primera semana del desarrollo postnatal. (A, C y E) Fotografías tomadas utilizando una lupa estereoscópica. (B, D y F) Fotografías tomadas utilizando un microscopio invertido con luz blanca. (A, C y E) Visión general de la ECZSV de P12, P15 y P21, también se observan la ZSV, el ventrículo (V) y el hipocampo (H). Nótese la disminución progresiva del espesor de la ECZSV conforme el desarrollo avanza. (B, D y F) Acercamiento de la ECZSV a P12, P15 y P21.



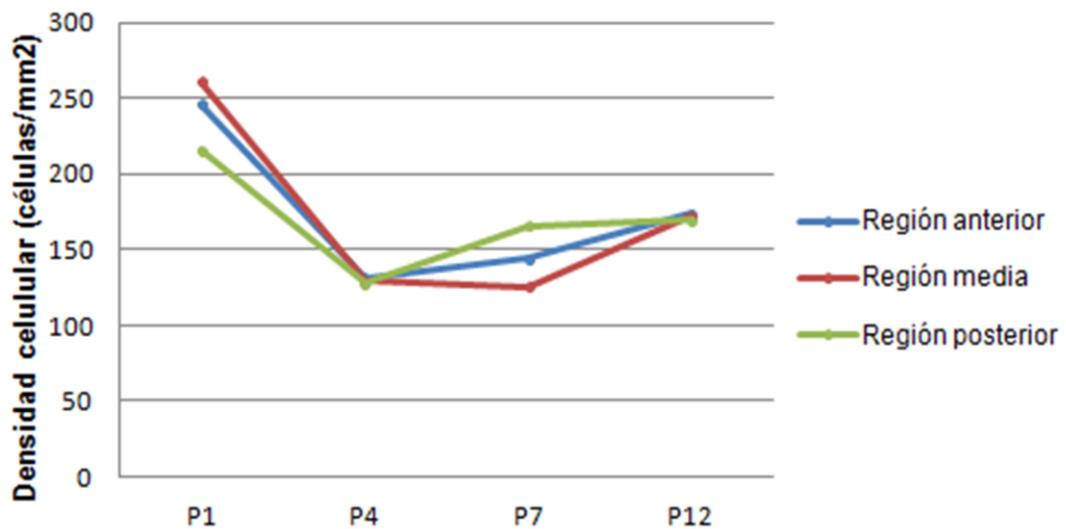
**Figura 11. Cambios estructurales de la ECZSV durante el desarrollo postnatal.** Tinción de los núcleos celulares con DAPI en cortes sagitales de cerebro de rata durante la primera semana del desarrollo postnatal. Fotografías tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia. **(A, C y E)** Visión general de la ECZSV y de la zona intermedia (ZI) formada por las células migratorias. Nótese la disminución progresiva del espesor de la ECZSV a medida que el desarrollo avanza. **(B, D y F)** Acercamiento de la ECZSV y de la ZI en P1, P4 y P7. En P1 se observa una alta densidad de células que se dirigen a la subplaca (SP).



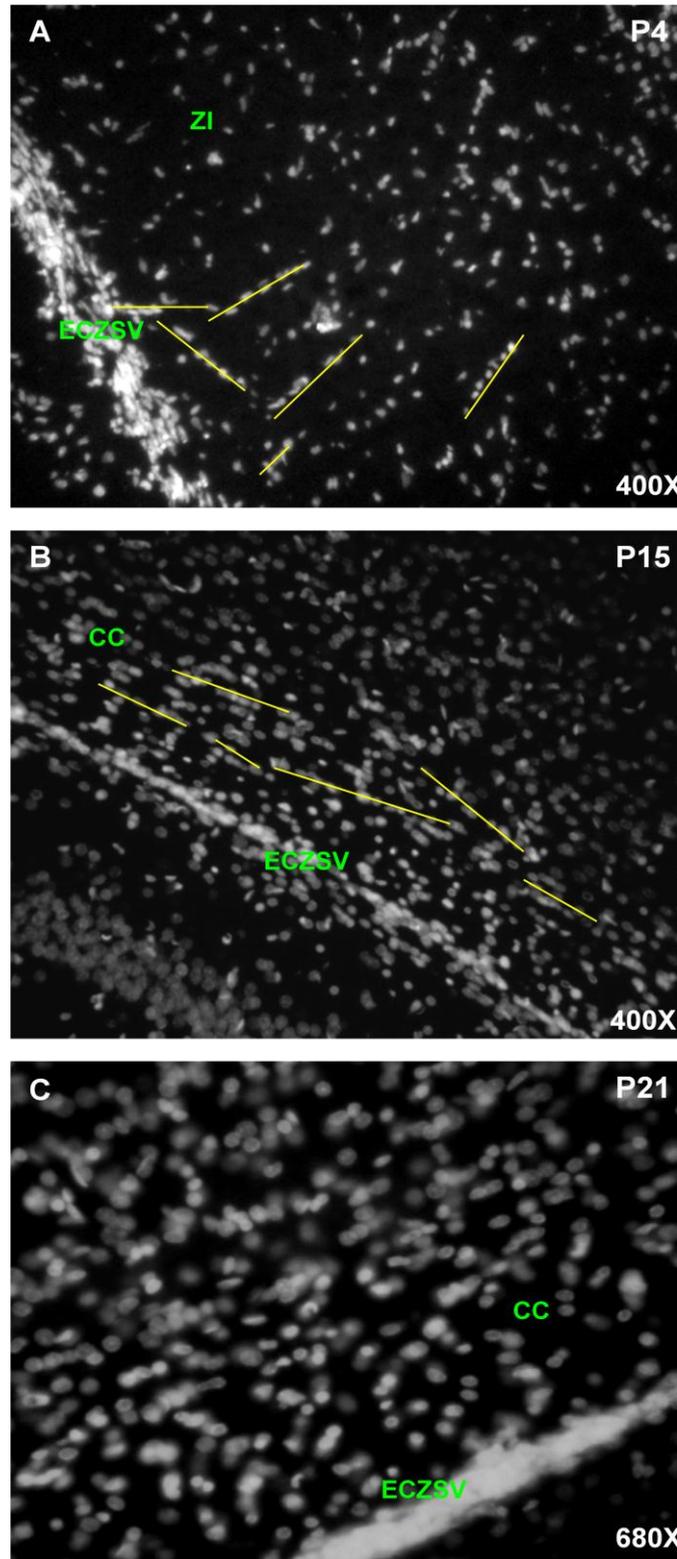
**Figura 12. Cambios estructurales de la ECZSV durante el desarrollo postnatal.** Tinción de los núcleos celulares con DAPI en cortes sagitales de cerebro de rata durante la primera semana del desarrollo postnatal. Fotografías tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia. (A, C y E) Visión general de la ECZSV. Nótese la disminución progresiva del espesor de la ECZSV a medida que el desarrollo avanza. (B, D y F) Acercamiento de la ECZSV y de la zona intermedia (ZI) en P12, y cuerpo calloso (CC) en P15 y P21. Nótese la presencia de cadenas tangenciales en la región del CC en P15 (D) y la distribución homogénea de las células en esa misma zona, en P21 (F).



**Figura 13. Espesor de la extensión caudal de la zona subventricular a lo largo del desarrollo postnatal.** Se observa la disminución del espesor de la ECZSV en las regiones anterior y media, a medida que avanza el desarrollo. El espesor de la región posterior disminuye de P1 a P4, se mantiene constante de P4 a P15 y posteriormente disminuye.



**Figura 14. Densidad celular en la zona intermedia a lo largo del desarrollo postnatal (desde P1 hasta P12).** Se observa la disminución de la densidad celular de P1 a P4. A partir de P4, la densidad celular se mantiene más o menos constante.



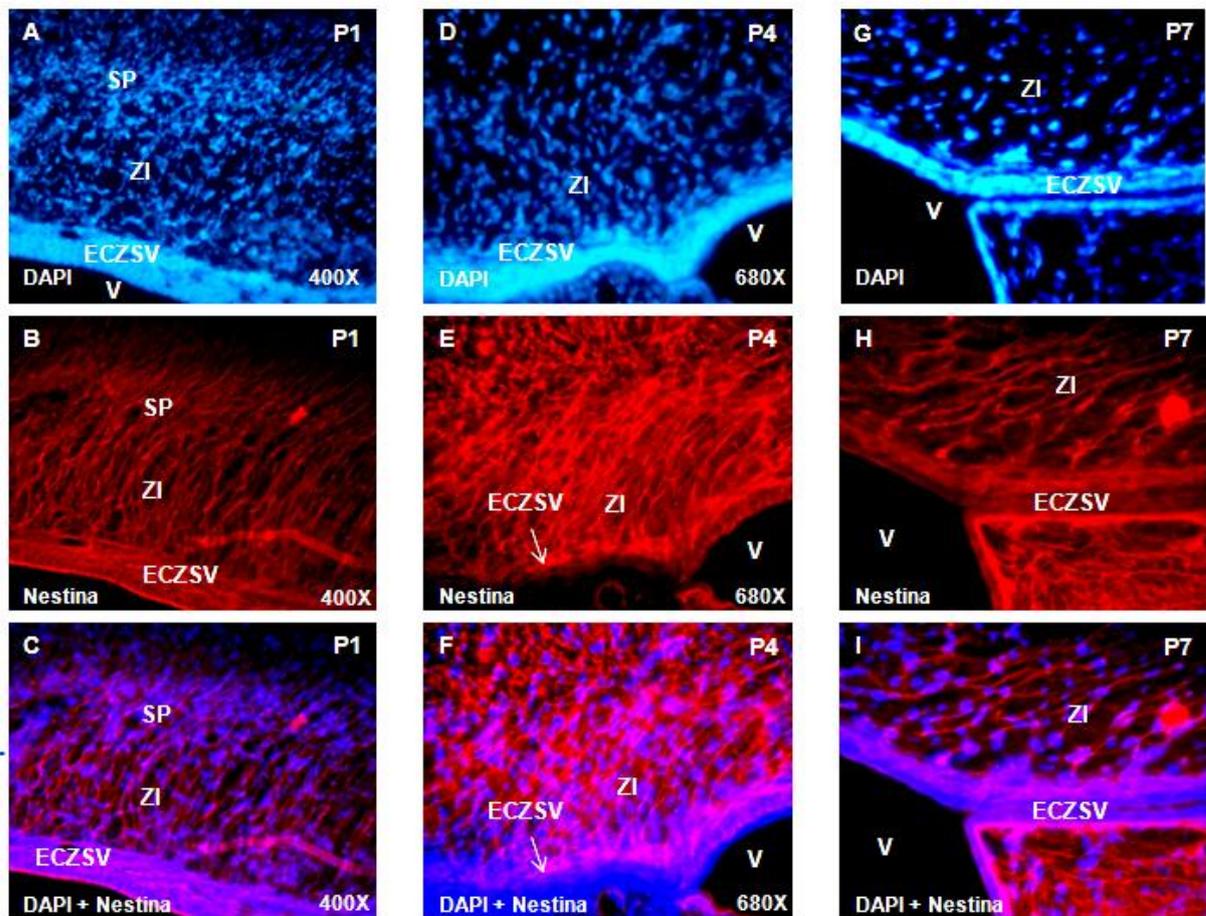
**Figura 15. Disposición de las células en la zona intermedia y cuerpo calloso.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, B y C) en cortes sagitales de cerebro de rata en P4, P15 y P21. (A) En P4 se observan cadenas radiales de células migratorias (señaladas con líneas amarillas). (B) En P15 se observan cadenas tangenciales formadas por células en el cuerpo calloso (CC) (señaladas con l. (C) En P21 se observan las células de la zona intermedia (ZI) dispuestas de manera homogénea.

a) *Expresión de nestina: identificación de progenitores neurales*

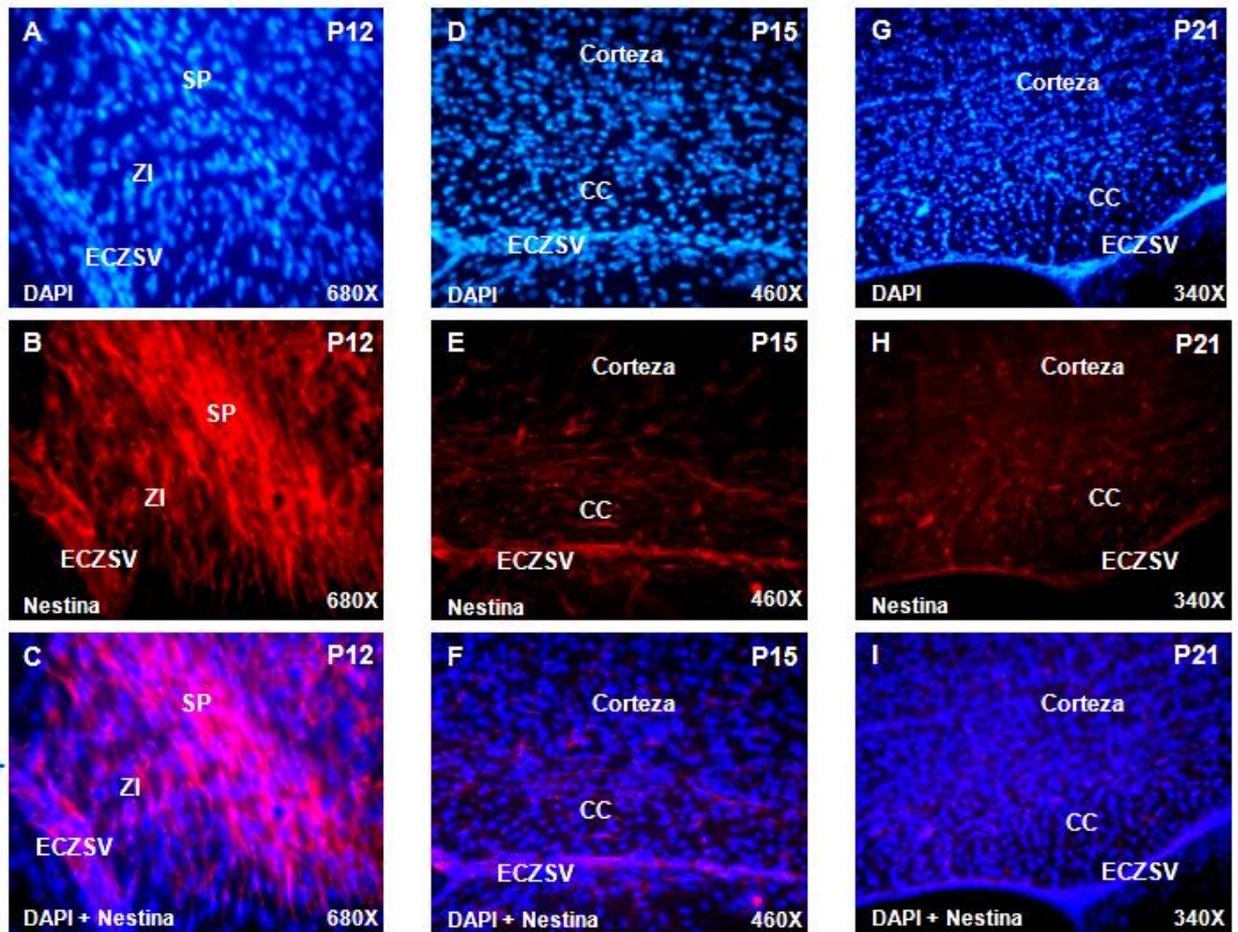
En los resultados obtenidos para las edades postnatales estudiadas se observó que la expresión de nestina en la ECZSV sigue un patrón espacio-temporal definido en el cual disminuye en función del desarrollo (Figs. 16B, 16E, 16H, 17B, 17E, 17H, 18B, 18E, 18H, 19B, 19E, 19H). En P1, la expresión es moderada (Figs. 16B, 18B) y ésta disminuye en P4, tanto en la región anterior como en la media, sin embargo, hubo una expresión importante en los límites dorsal y ventral de la ECZSV (Figs. 16E, 18E). Aunque la expresión disminuye con el desarrollo, se siguen observando elementos inmunoreactivos en P12, P15 y P21 (Figs. 17B, 17E, 17H, 23B, 23E, 23H). Por otra parte, la expresión en la región posterior presenta un patrón diferente, la cual es importante y similar en las tres primeras edades, y posteriormente comienza a disminuir a partir de P12 hasta P21 (Figs. 20B, 20E, 20H, 21B, 21E, 21H).

En la ZI asociada a la ECZSV, se observó una alta densidad de fibras fuertemente inmunoreactivas para nestina, que disminuyen en función del desarrollo (Figs. 22B, 22E, 22H, 23B, 23E, 23H). En P1 se observaron fibras nestina+ dispuestas radialmente (Fig. 22B). La disposición radial se va perdiendo en P7 (Figs. 22E, 22H). Adicionalmente, a partir de P7 se observó una fuerte disminución de la expresión de nestina (Fig. 22H). Por su parte, P12 y P15 se observó que las fibras inmunoreactivas presentaban una disposición tangencial en el cuerpo calloso (Figs. 23B, 23E). En P21, sólo se observaron algunos elementos inmunoreactivos (Fig. 23I).

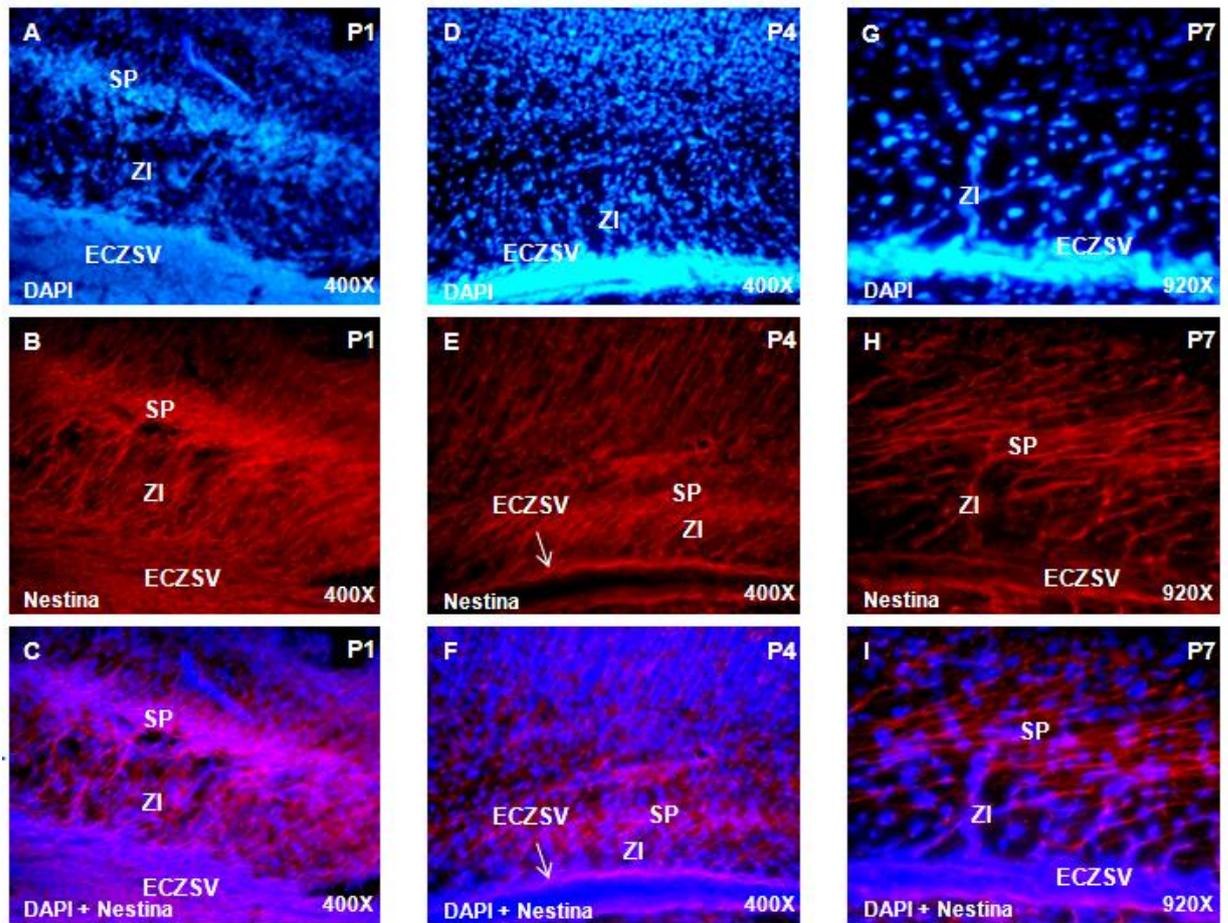
Por otra parte, en la ZI se observó una gran cantidad de células migratorias asociadas a las fibras nestina<sup>+</sup> (Figs. 22C, 22F, 22I, 23C, 23F). Pareciera que estas células se encuentran migrando sobre las fibras, debido a que fue posible apreciar mediante microscopía confocal, la superposición de núcleos y fibras (Fig. 24) y la presencia de muchos núcleos asociados a una sola fibra (Fig. 25).



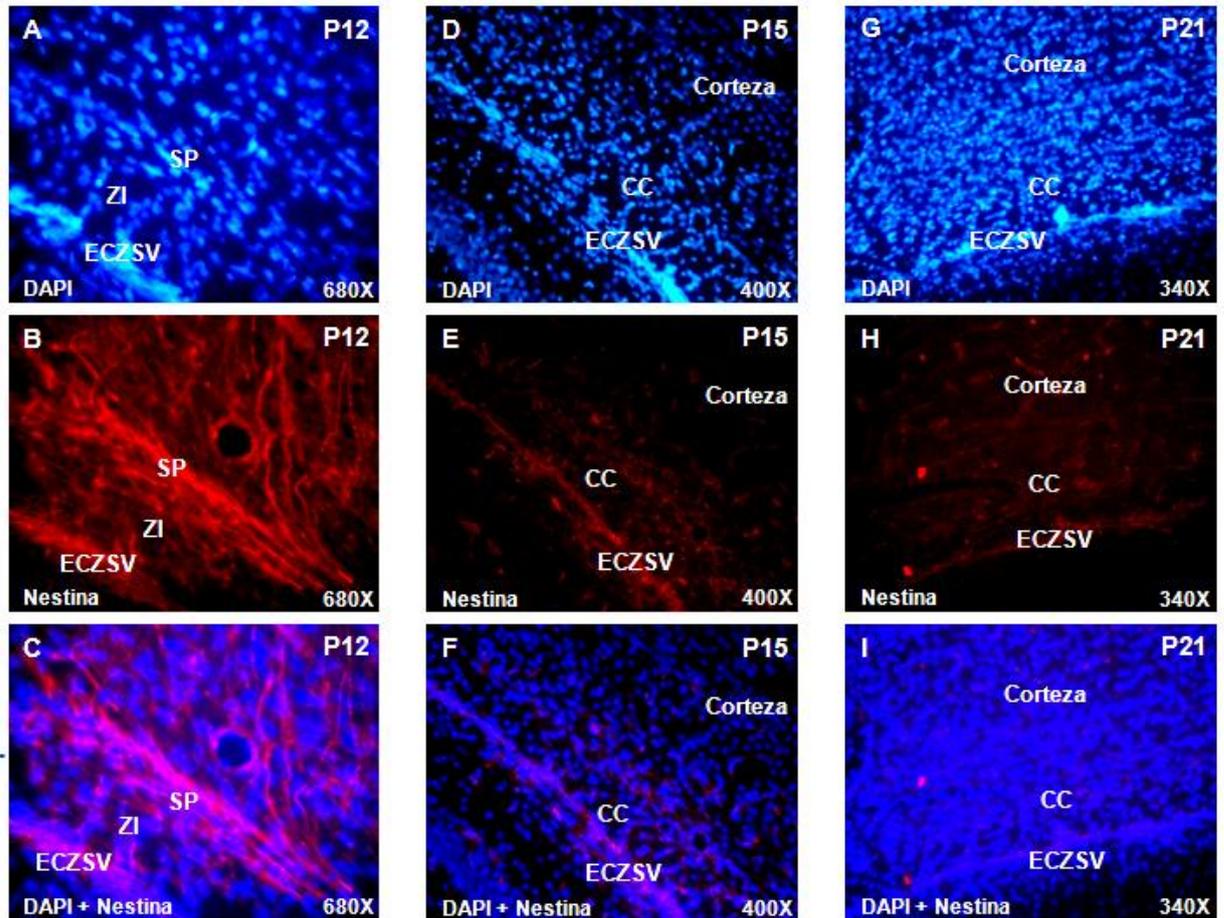
**Figura 16. Expresión de nestina en la región anterior de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para nestina (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje de nestina (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la región anterior de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido. **(B, E y H)** En la ECZSV, se observa la mayor expresión de nestina en P1, y a partir de P4 comienza a disminuir, observándose principalmente en los bordes de la ECZSV. **(C, F e I)** En la zona intermedia (ZI) se observa una alta densidad de fibras nestina<sup>+</sup>, núcleos DAPI<sup>+</sup> sobres estas fibras.



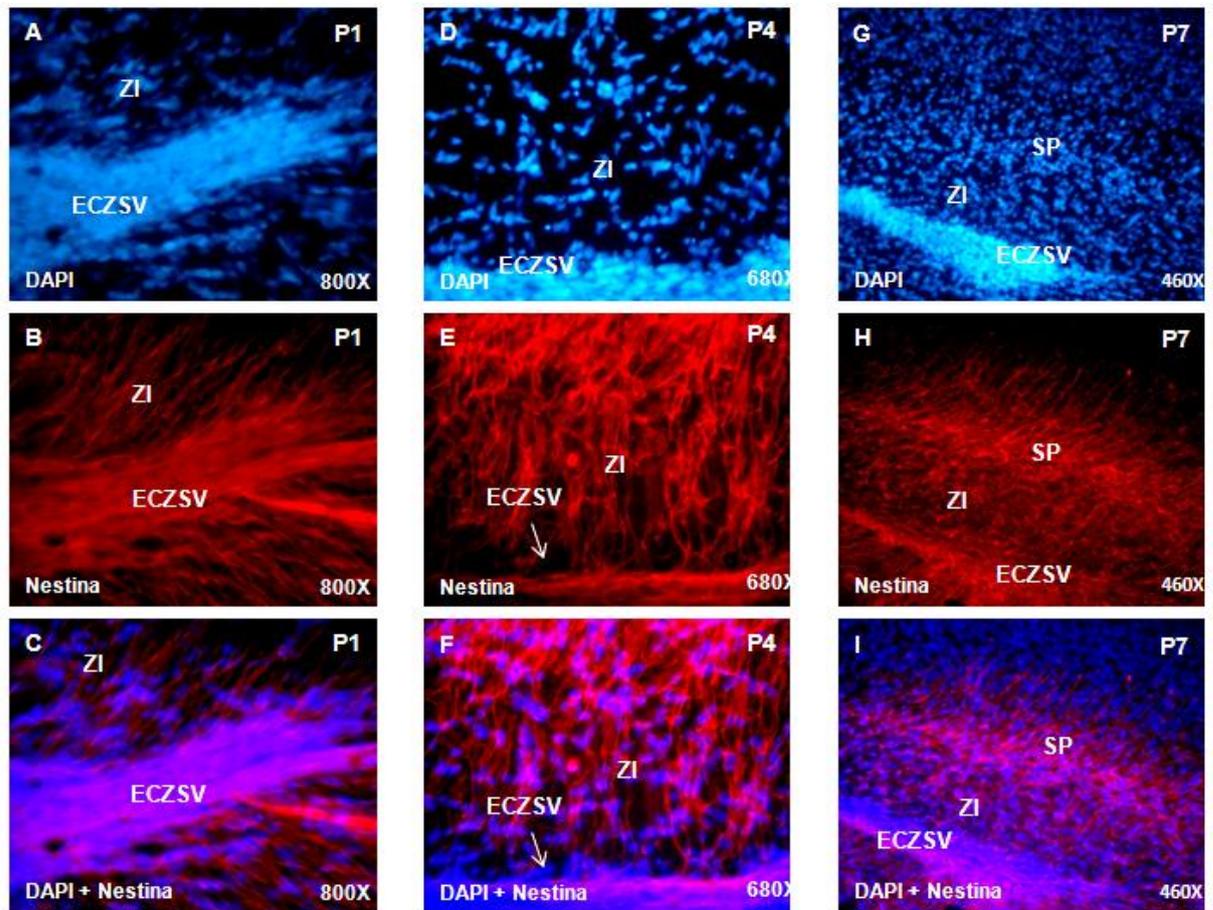
**Figura 17. Expresión de nestina en la región anterior de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para nestina (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje de nestina (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la región anterior de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido. (B, E y H) Se observa inmunoreactividad para nestina en la ECZSV en las tres edades postnatales correspondientes y la disminución de la misma conforme el desarrollo avanza. ZI: zona intermedia, SP: subplaca, CC: cuerpo calloso.



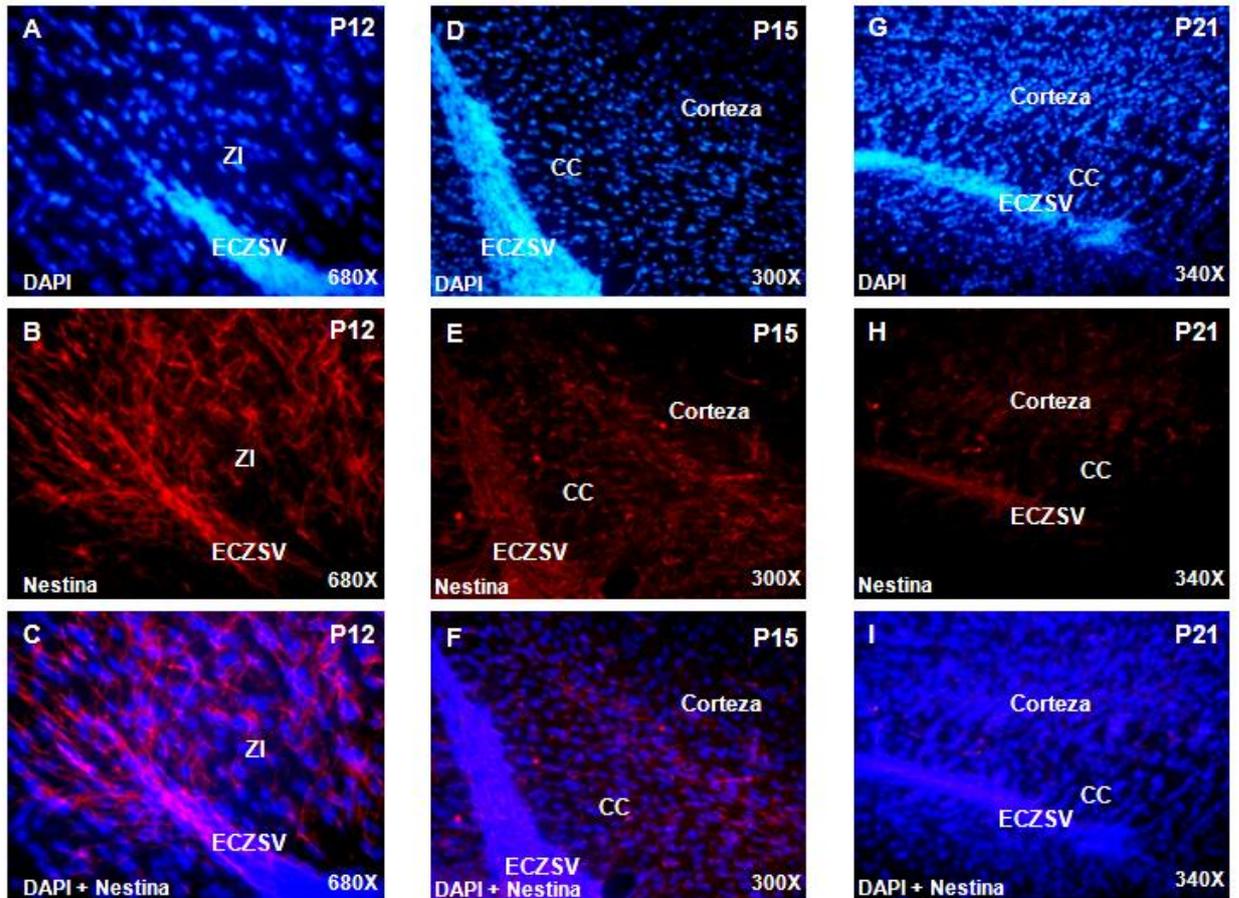
**Figura 18. Expresión de nestina en la región media de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para nestina (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje para nestina (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la región media de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido. **(B, E y H)** En la ECZSV, se observa la mayor expresión de nestina en P1, y a partir de P4 comienza a disminuir, observándose principalmente en los bordes de la ECZSV. ZI: zona intermedia, SP: subplaca.



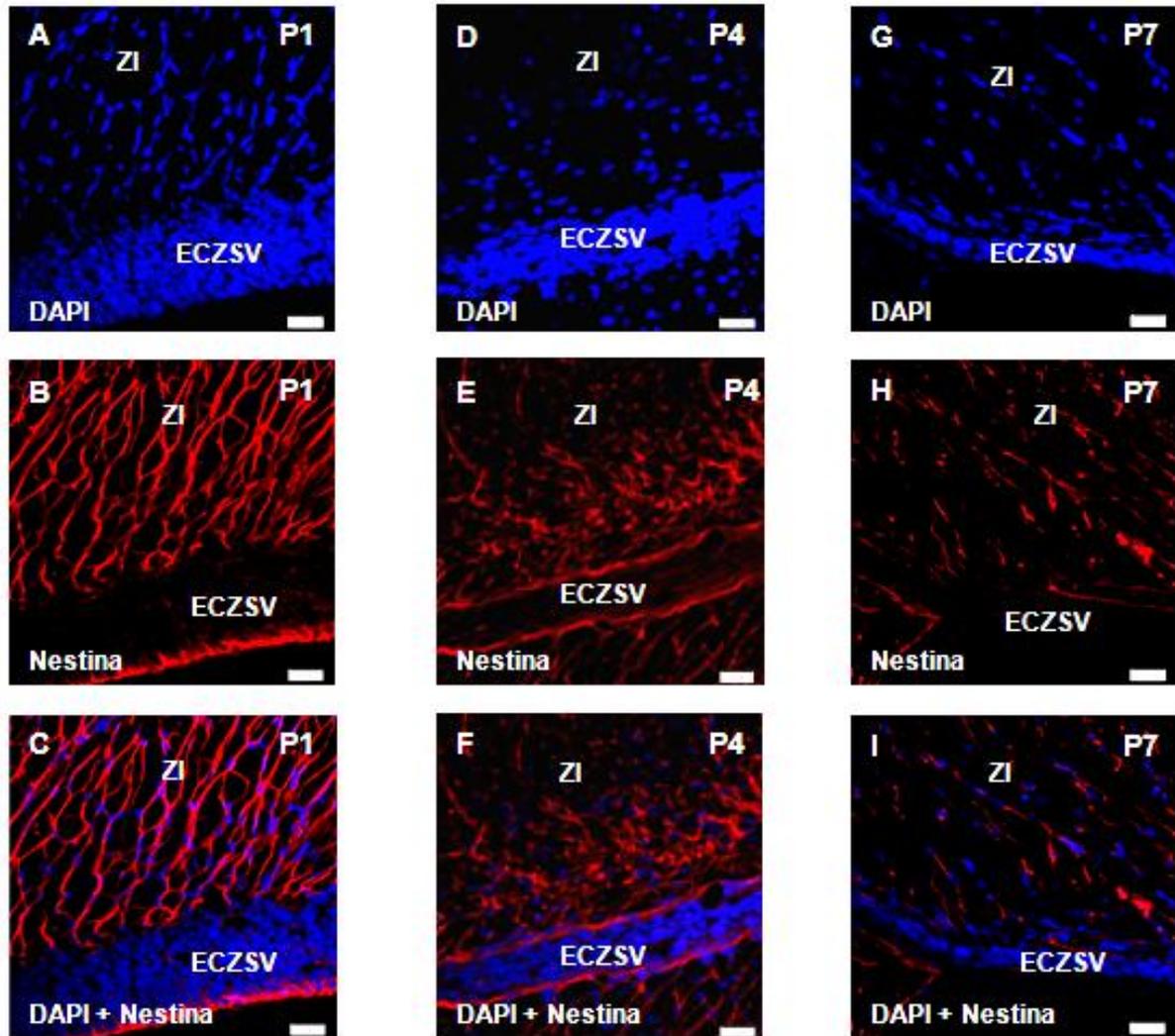
**Figura 19. Expresión de nestina en la región media de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para nestina (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje para nestina (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la región media de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido. (B, E y H) Se observa inmunoreactividad para nestina en la ECZSV en las tres edades postnatales correspondientes y la disminución de la misma conforme el desarrollo avanza. ZI: zona intermedia, SP: subplaca, CC: cuerpo calloso.



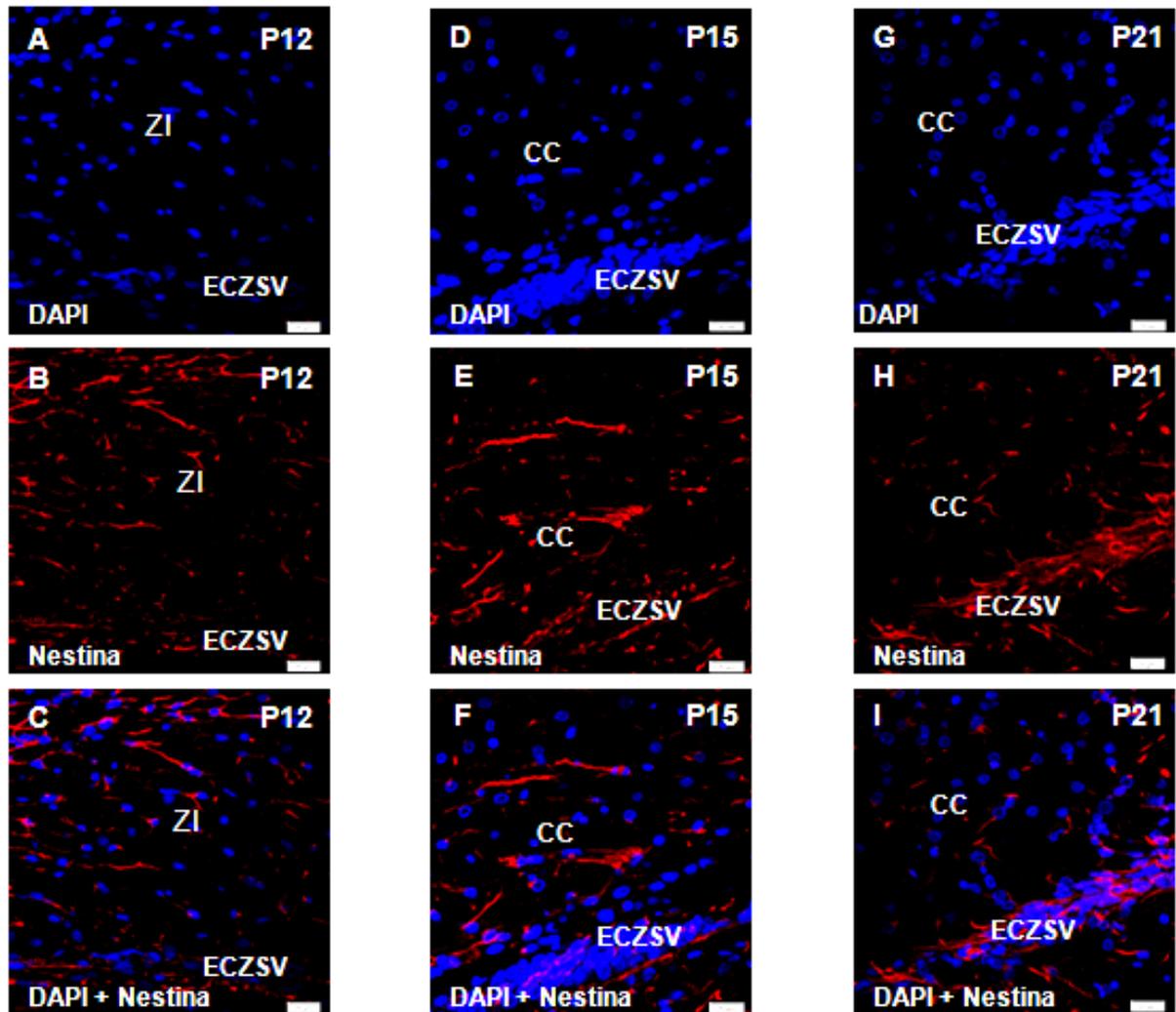
**Figura 20. Expresión de nestina en la región posterior de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para nestina (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje para nestina (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la región posterior de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido. Se observa alta inmunoreactividad para nestina en la ECZSV a P1. **(B, E y H)** En P4 y P7, las células de la ECZSV son nestina<sup>+</sup> y la expresión de este marcador es mayor que en las regiones anterior y media de la ECZSV. ZI: zona intermedia, SP: subplaca.



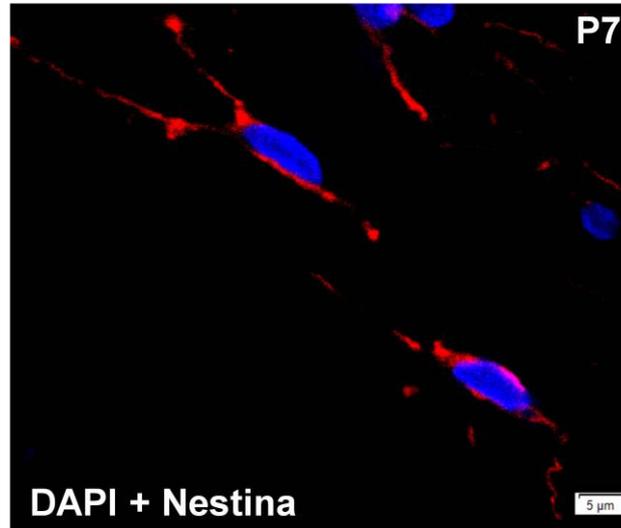
**Figura 21. Expresión de nestina en la región posterior de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para nestina (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje para nestina (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la región posterior de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido. (B, E y H) En estas tres edades, las células de la ECZSV son nestina<sup>+</sup> y la expresión de este marcador es mayor que en las regiones anterior y media de la ECZSV. Además, la expresión de nestina en la ECZSV disminuye con el desarrollo. ZI: zona intermedia, SP: subplaca, CC: cuerpo calloso.



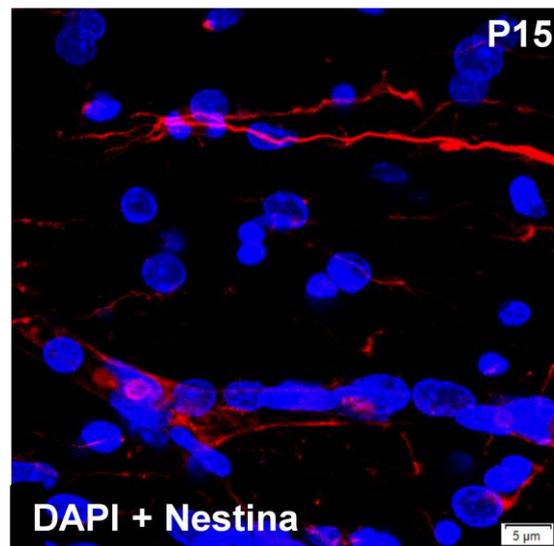
**Figura 22.** Expresión de nestina en la ECZSV y la zona intermedia (ZI) en cortes sagitales de cerebro de rata. Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para nestina (rodamina) (B, E y H) y superposición de las imágenes respectivas para cada edad (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la ECZSV y de la ZI. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. **(B)** En P1, se observa una alta densidad de fibras nestina<sup>+</sup> en la ZI. **(E)** En P4, se observa que la densidad de fibras nestina<sup>+</sup> en la ZI disminuye con respecto a P1. **(H)** En P7, el número de fibras nestina<sup>+</sup> en la ZI, disminuye con respecto a P4. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m.



**Figura 23. Expresión de nestina en la ECZSV y la zona intermedia (ZI) en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para nestina (rodamina) (B, E y H) y superposición de las imágenes respectivas para cada edad (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la ECZSV y de la ZI. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. **(B y E)** En P12 y P15, se observa inmunoreactividad para nestina en las fibras de la ZI y cuerpo calloso (CC). **(E)** Nótese la disposición tangencial de las fibras nestina<sup>+</sup> en la ZI en P12 y en el CC en P15. **(H)** En P21, se observan Algunos elementos inmunoreactivos. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m.



**Figura 24. Expresión de nestina en células de la zona intermedia (ZI) en cortes sagitales de cerebro de rata de 7 días postnatales.** Superposición del marcaje de los núcleos celulares con DAPI y del marcaje para nestina (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P7 en la ZI. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. Se observan fibras nestina<sup>+</sup> asociadas a los núcleos celulares de las células migratorias presentes en la ZI. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 5 µm.



**Figura 25. Expresión de nestina en el cuerpo calloso (CC) en cortes sagitales de cerebro de rata de 15 días postnatales.** Superposición del marcaje de los núcleos celulares con DAPI y del marcaje para nestina (rodamina) en cortes sagitales de cerebro de rata en P15 en el CC. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. Se observan cadenas de células migratorias dispuestas sobre fibras nestina<sup>+</sup> en CC. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 5 µm.

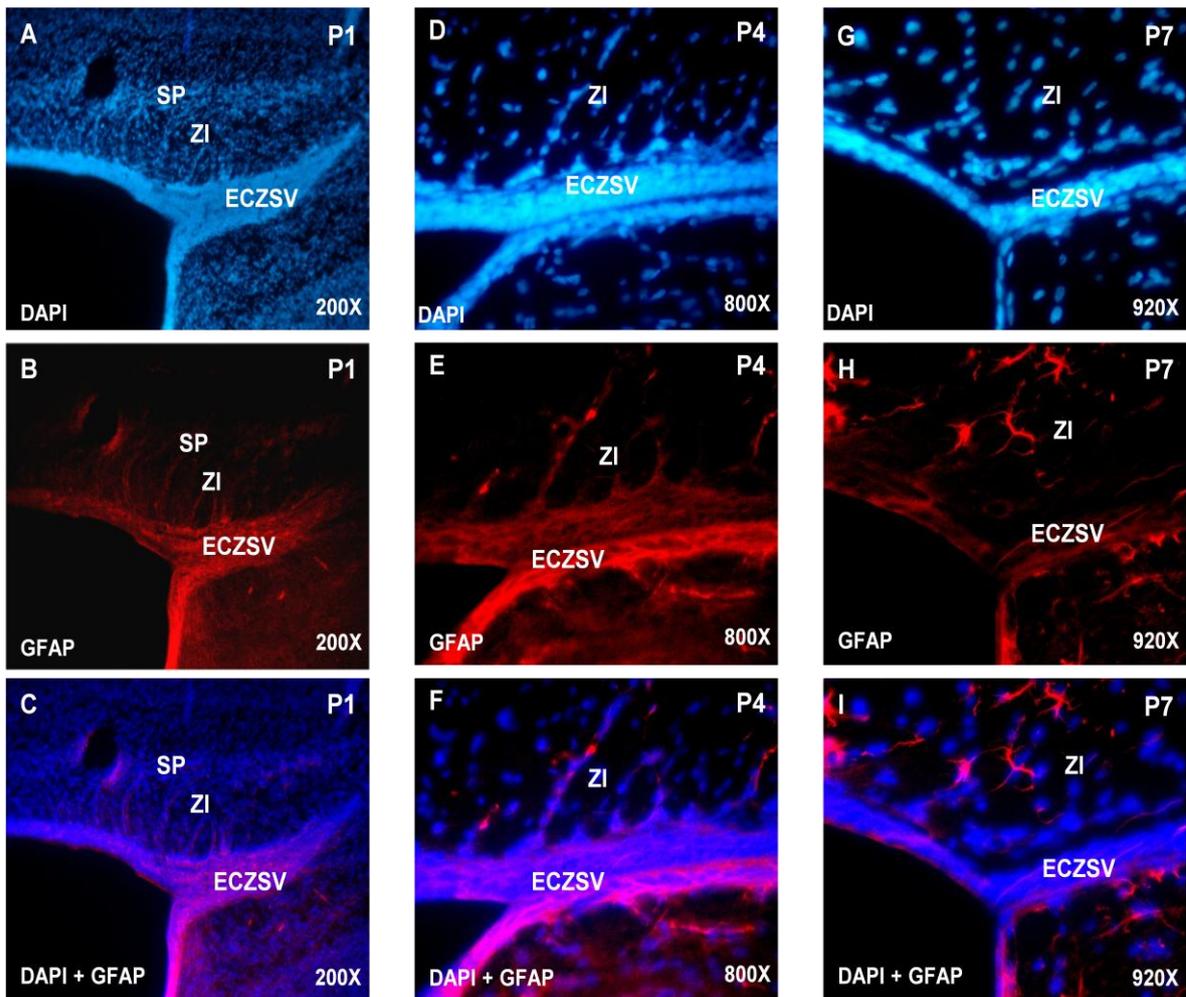
**b) *Expresión de GFAP: identificación de astrocitos***

Se observó que la capa de células que conforman la ECZSV son inmunopositivas para GFAP. Esta expresión, sigue un patrón espacio-temporal definido. En efecto, GFAP se expresó de manera similar y moderada en P1 y P4, edades donde se observa la mayor expresión de dicha proteína (Figs. 26B, 26E, 28B, 28E, 30B, 30E). En P4 se observó un fuerte marcaje en el borde ventral de la ECZSV (Fig. 28E). Por su parte, a partir de P7 hasta P21 no se observó inmunoreactividad para GFAP en la ECZSV (Figs. 26H, 27B, 27E, 27H, 28H, 29B, 29E, 29H, 30H, 31B, 31E, 31H). Esto se pudo observar en las tres áreas analizadas (anterior, media y posterior).

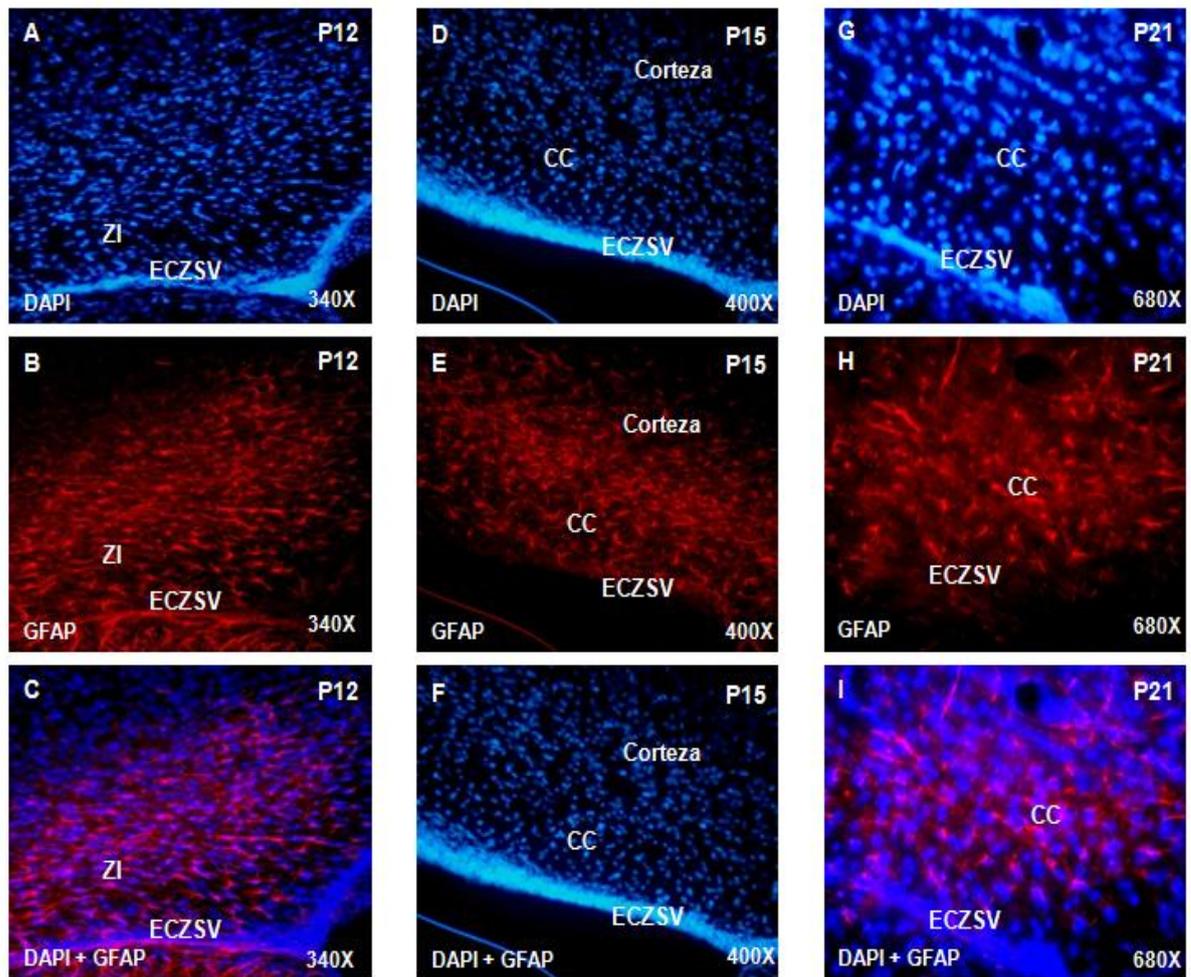
En la ZI, región de las células migratorias que se originan de la ECZSV no se observaron células GFAP<sup>+</sup> en P1 (Fig. 32B), pero la densidad de células GFAP<sup>+</sup> fue aumentando en función del desarrollo postnatal, alcanzando un máximo cerca de P12 (Figs. 32E, 32H, 33B, 33E, 33H). Adicionalmente, se encontró que conforme avanza el desarrollo, la densidad de astrocitos presentes en la región proximal al hipocampo de la ECZSV incrementa (Figs. 30B, 30E, 30H, 31B, 31E, 31H, 32B, 32E, 32H, 33B, 33E, 33H). Es interesante acotar que la morfología de las células migratorias GFAP<sup>+</sup> cambia del cuarto al séptimo día postnatal, pasando de ser células redondas con una morfología sencilla, posiblemente progenitores neurales, a células con una morfología más compleja formada por numerosas prolongaciones, lo cual sugiere que son astrocitos diferenciados (Figs. 26E, 26H, 32E, 32H). Adicionalmente, se observaron células GFAP<sup>+</sup> asociadas a vasos (Fig. 31B, 31C).

**c) *Expresión de NG2: identificación de progenitores de oligodendrocitos***

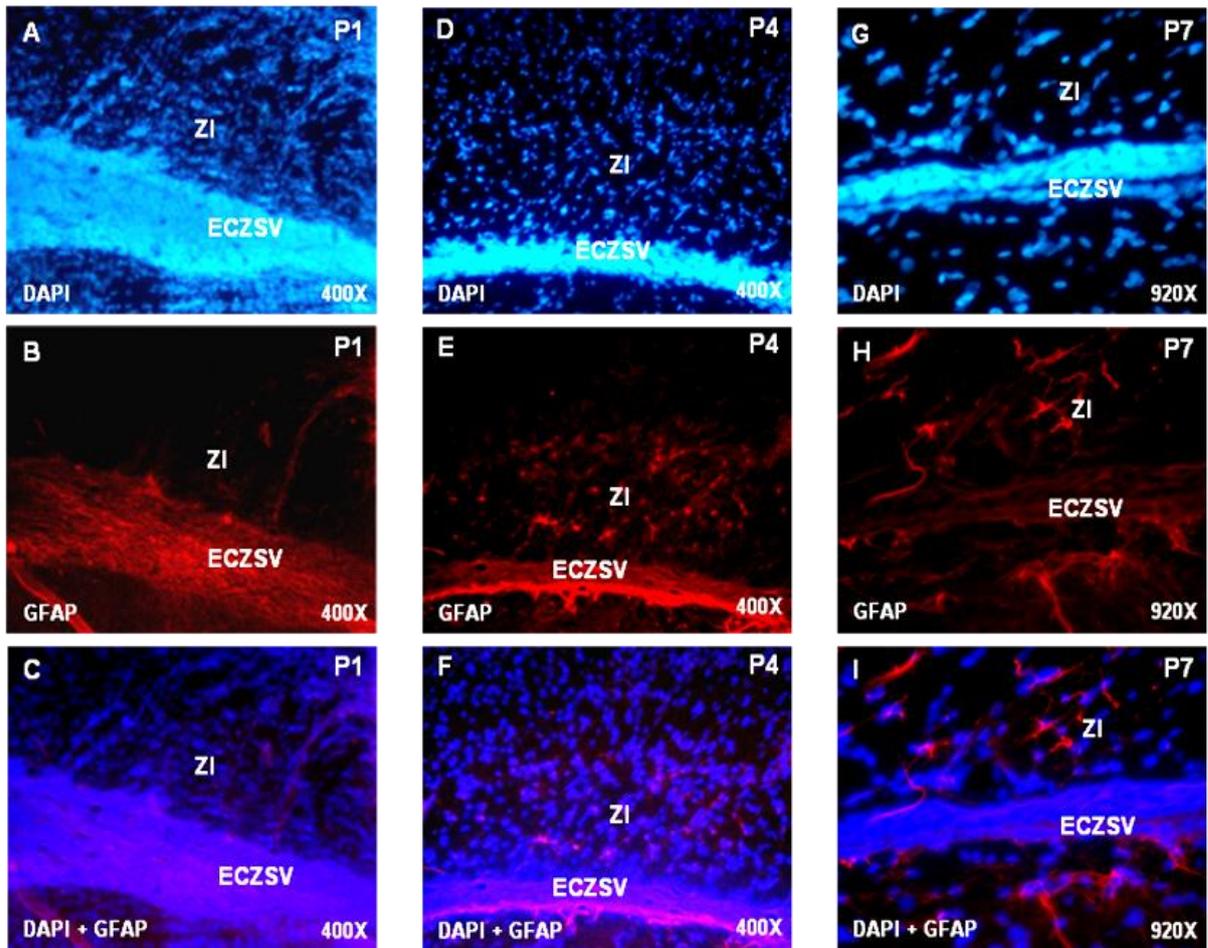
En la ECZSV y en la ZI asociada a ésta, se pudo observar la presencia de progenitores NG2<sup>+</sup>, así como de células endoteliales NG2<sup>+</sup> de vasos sanguíneos en desarrollo, siguiendo un patrón espacio-temporal definido (Figs. 34, 35). La presencia de células endoteliales NG2<sup>+</sup> de vasos sanguíneos en desarrollo se observó en P1 (Fig. 34B), y en menor cantidad, en P4 (resultados no mostrados). Por otra parte, la presencia de células NG2<sup>+</sup>, con morfología de progenitores de oligodendrocitos, se observó en P1 y P4 y posteriormente, el número de estas células aumentó en P7 y P12 (Figs. 34B, 34E, 34H, 35B). Adicionalmente, en P12 se observaron algunas células NG2<sup>+</sup> con morfología monopolar y bipolar (Fig. 36). En cambio, en P15 y P21, no se observaron células NG2<sup>+</sup> en el cuerpo calloso, ni en la ECZSV (35E, 35H).



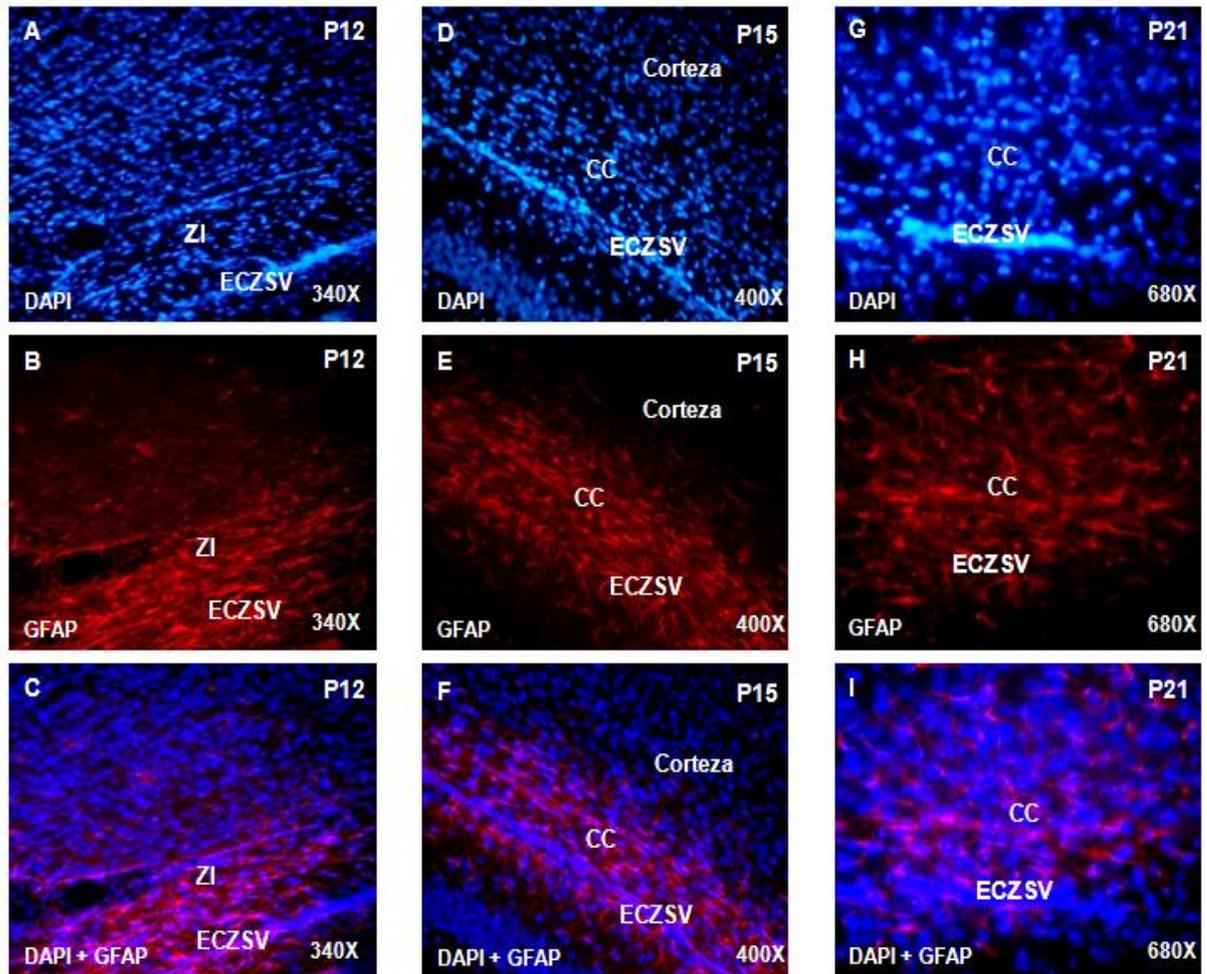
**Figura 26. Expresión de GFAP en la región anterior de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje para GFAP (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la región anterior de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido. **(B y E)** Se observa un marcaje moderado en P1 y P4. En P4, se observa un fuerte marcaje en el borde ventral de la ECZSV. **(H e I)** En P7 no se observa marcaje para GFAP en la ECZSV. ZI: zona intermedia, SP: subplaca.



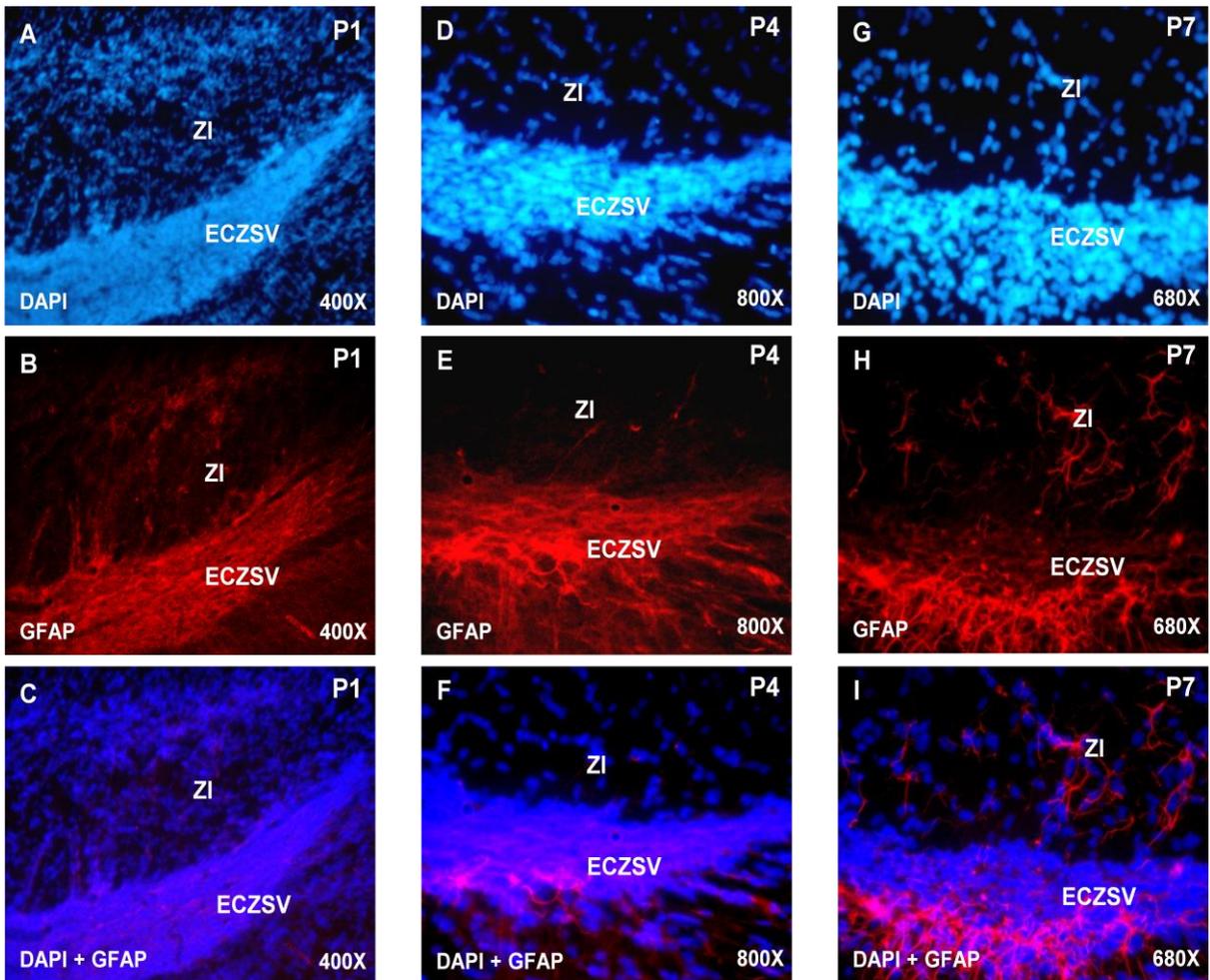
**Figura 27. Expresión de GFAP en la región anterior de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje para GFAP (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la región anterior de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido. (B, E, H, C, F e I) En P12, P15 y P21 no se observa inmunoreactividad para GFAP en la ECZSV. Se observan células GFAP<sup>+</sup> tanto en los bordes dorsal y ventral de la ECZSV. ZI: zona intermedia, CC: cuerpo calloso.



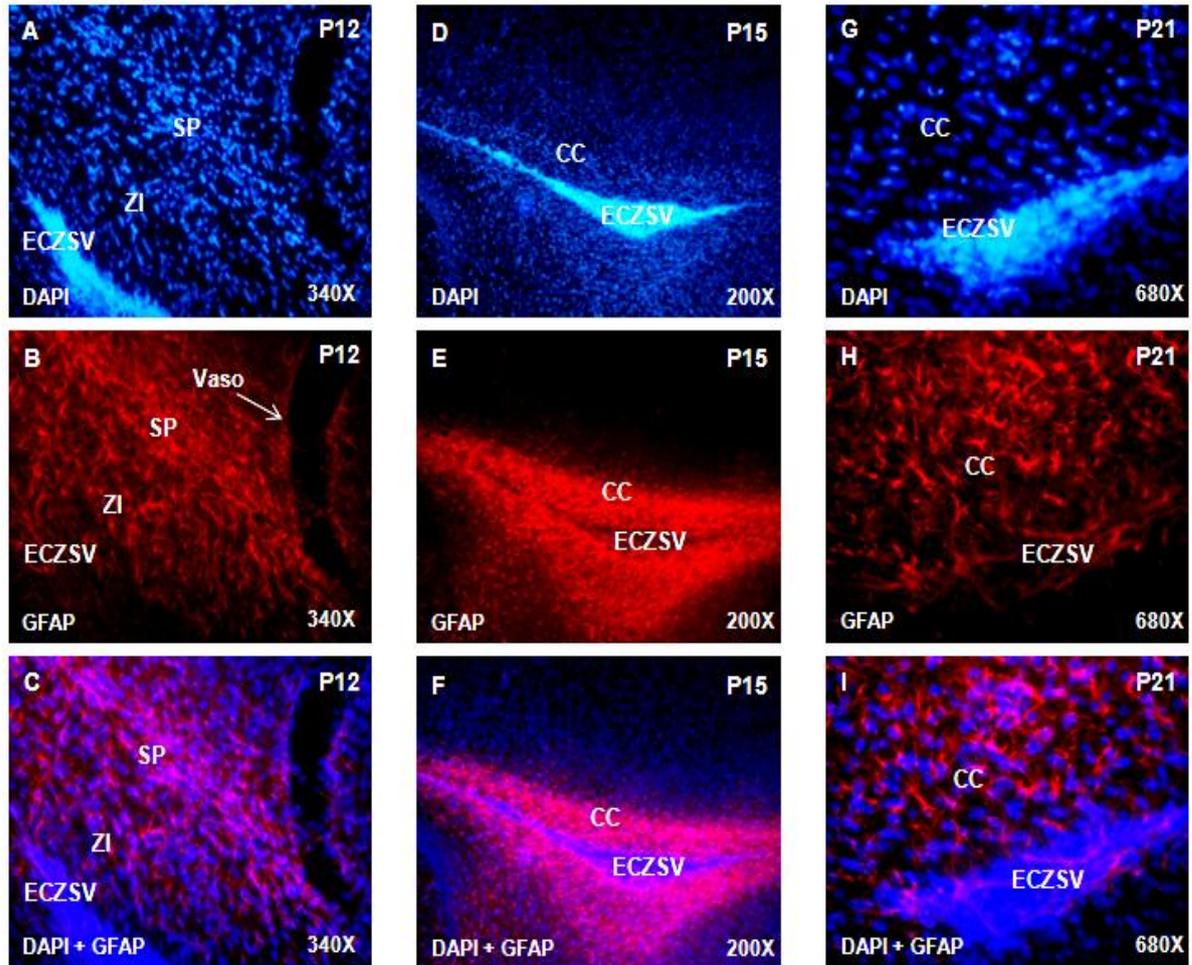
**Figura 28. Expresión de GFAP en la región media de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje para GFAP (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la región media de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido. (B y E) Se observa un marcaje moderado en P1 y P4. En P4, se observa un fuerte marcaje en el borde ventral de la ECZSV. (H e I) En P7 no se observa marcaje para GFAP en la ECZSV. ZI: zona intermedia.



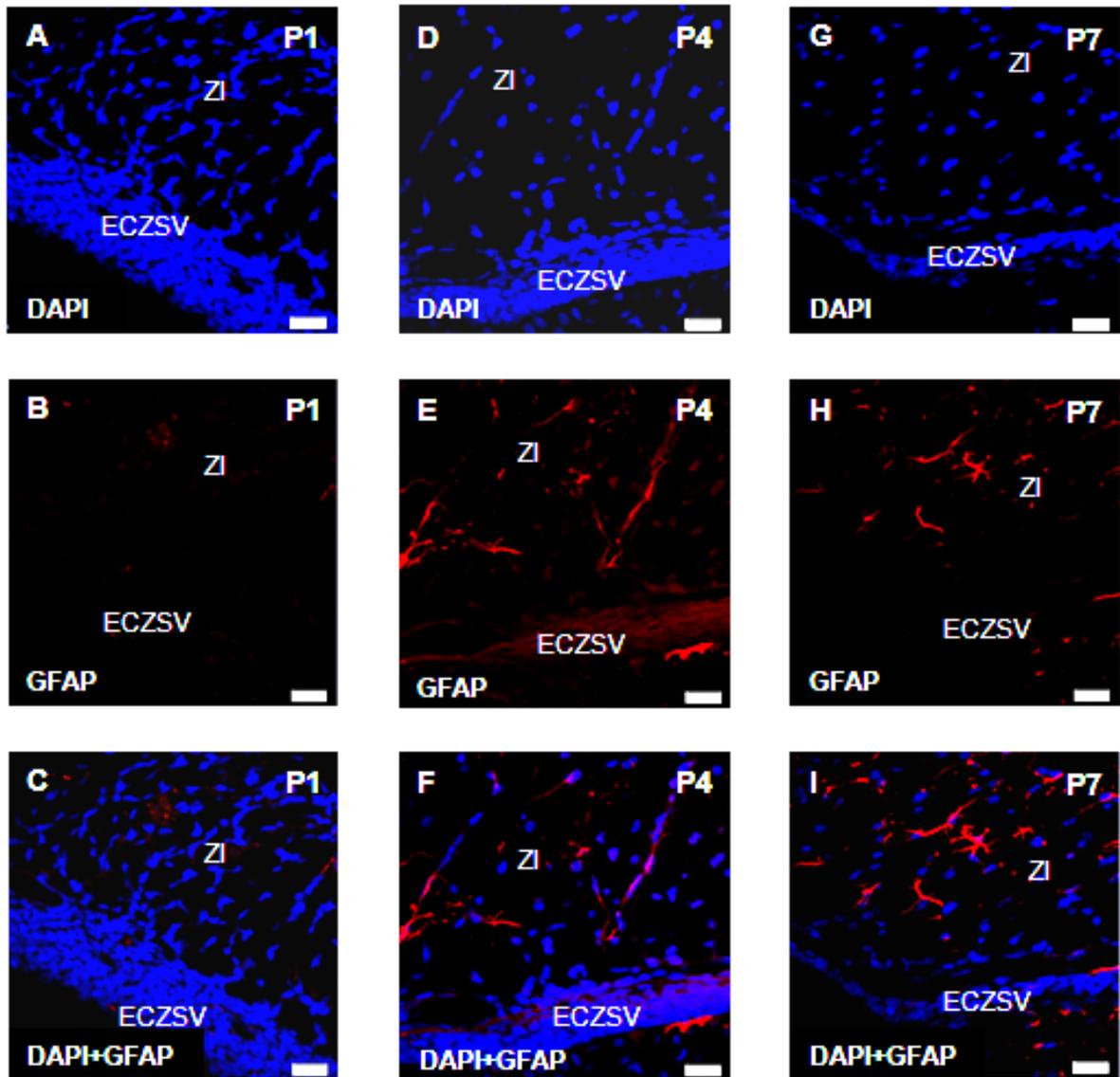
**Figura 29. Expresión de GFAP en la región media de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje para GFAP (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la región media de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido. (B, E, H, C, F e I) En P12, P15 y P21 no se observa inmunoreactividad para GFAP en la ECZSV. Se observan células GFAP<sup>+</sup> tanto en los bordes dorsal y ventral de la ECZSV. ZI: zona intermedia, CC: cuerpo calloso.



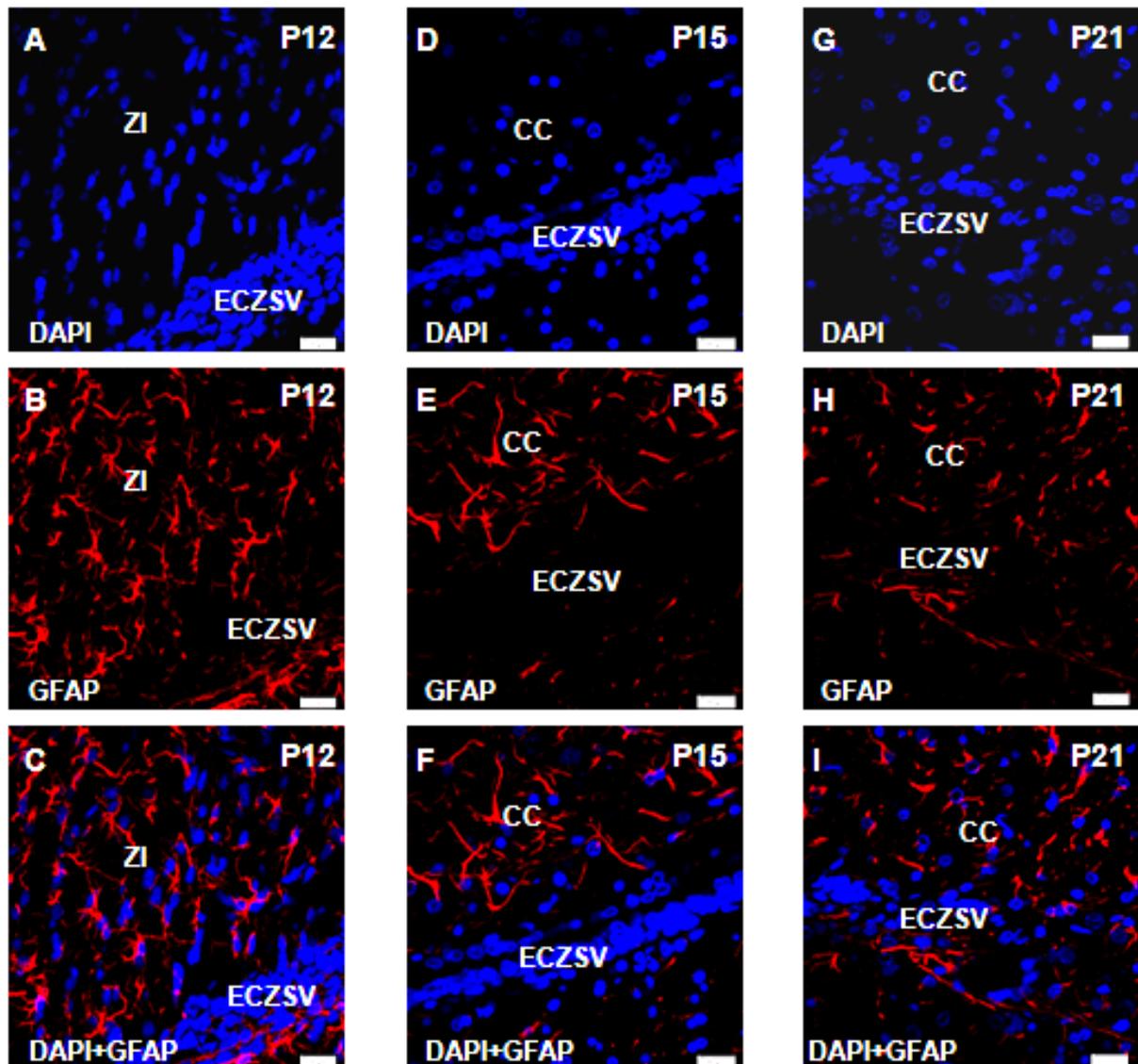
**Figura 30. Expresión de GFAP en la región posterior de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje para GFAP (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la región posterior de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido (B y E). Se observa un marcaje moderado en P1 y P4. En P4, se observa un fuerte marcaje en el borde ventral de la ECZSV. (H e I) En P7, se observa un marcaje apreciable en el borde ventral de la ECZSV.



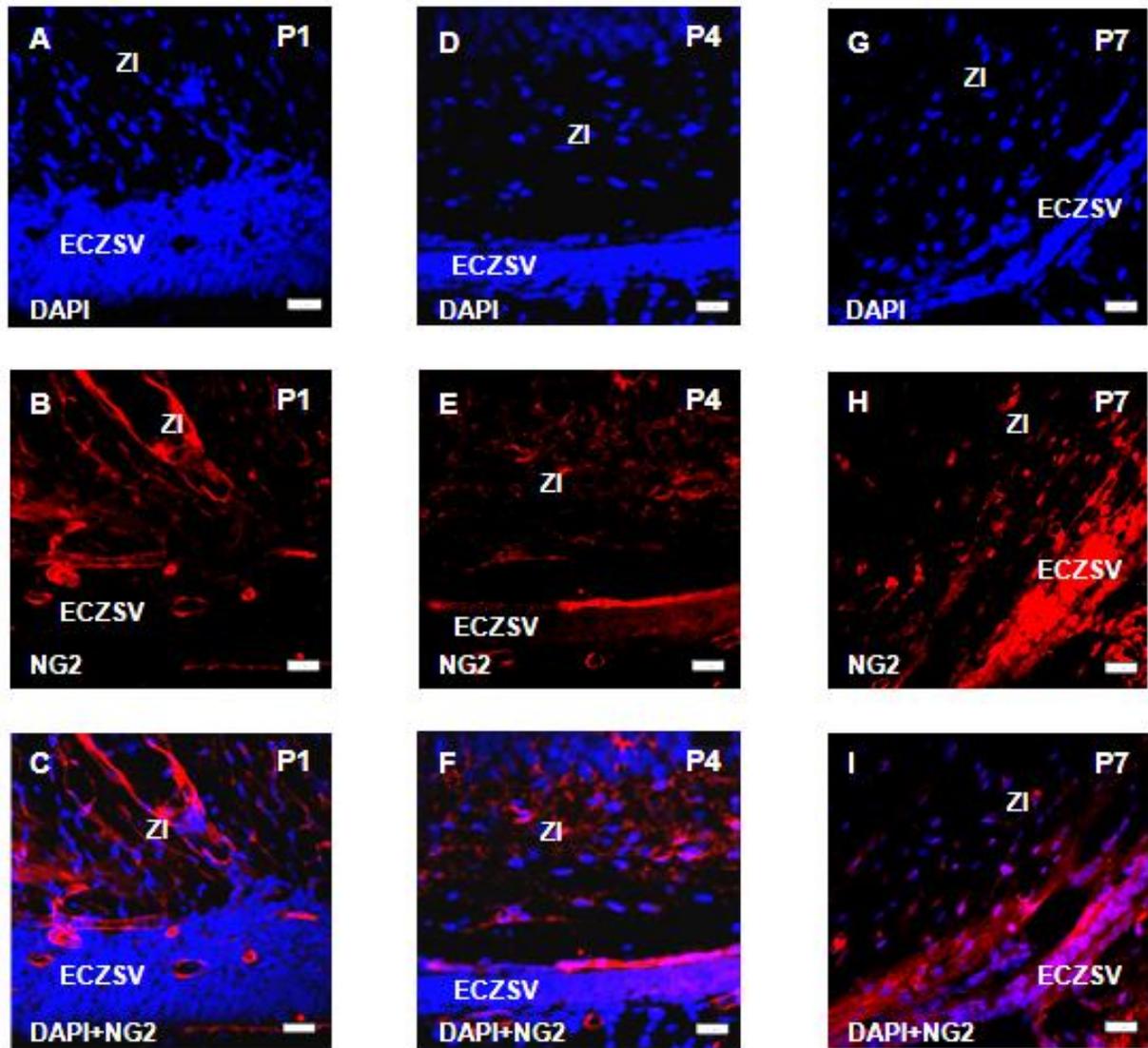
**Figura 31. Expresión de GFAP en la región posterior de la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI y del marcaje para GFAP (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la región posterior de la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia invertido. (B, C, E, F, H e I) En P12, P15 y P21 no se observa inmunoreactividad para GFAP en la ECZSV, sin embargo, se observan células GFAP<sup>+</sup> en los bordes de la misma. (B) Se observan también células GFAP<sup>+</sup> asociadas a un vaso. ZI: zona intermedia, SP: subplaca, CC: cuerpo calloso.



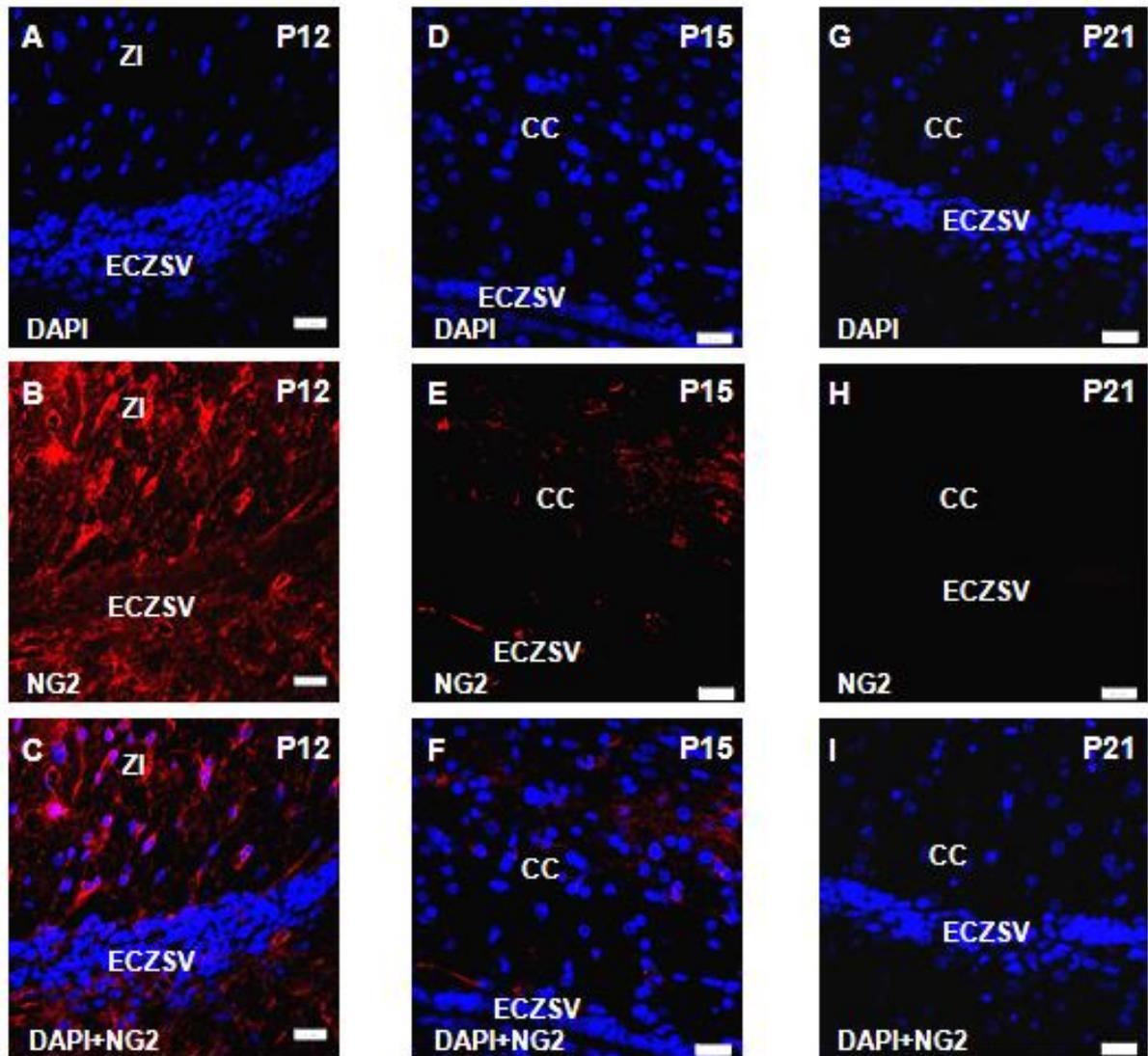
**Figura 32. Expresión de GFAP en la zona intermedia en cortes sagitales de cerebro de rata** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (B, E y H) y superposición de las imágenes respectivas para cada edad (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la ECZSV y de la zona intermedia (ZI). Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. **(B)** En P1, las células migratorias de la ZI, son inmunonegativas para GFAP. **(E)** En P4, se observan algunas células GFAP<sup>+</sup> en la región migratoria. **(H)** En P7, el número de células GFAP<sup>+</sup> en la ZI, incrementa con respecto a P4. Además, la morfología de las células migratorias GFAP<sup>+</sup> presentes en la ZI cambia del cuarto al séptimo día postnatal, pasando de ser células redondas con una morfología sencilla a células con una morfología más compleja formada por numerosas prolongaciones (**E y H**). La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m.



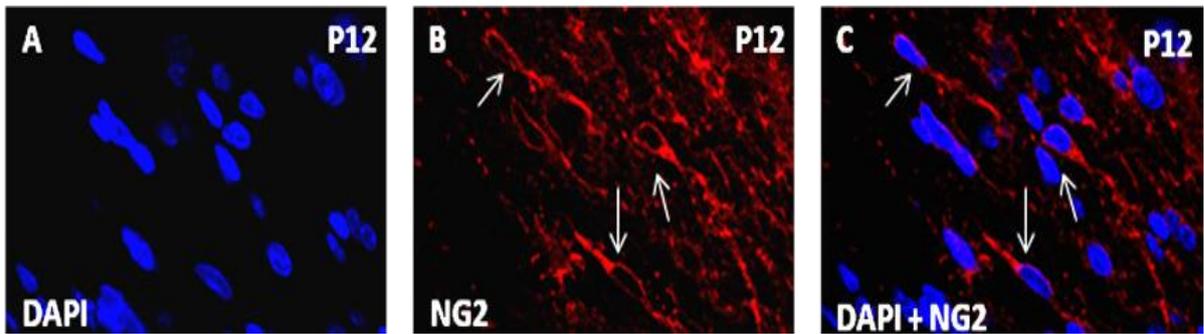
**Figura 33. Expresión de GFAP en la zona intermedia (ZI) en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (B, E y H) y superposición de las imágenes respectivas para cada edad (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la ECZSV, de la ZI y cuerpo calloso (CC). Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. (B, E y H) En las tres edades correspondientes, se observa una cantidad significativa de células GFAP<sup>+</sup> en la ZI, la cual parece disminuir desde P12 a P21. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20 µm.



**Figura 34. Expresión de NG2 en la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para NG2 (rodamina) (B, E y H) y superposición de las imágenes respectivas para cada edad (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la ECZSV y de la ZI. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. (B, E y H) Se observa la expresión de NG2 en células de la ECZSV y de la zona intermedia (ZI). La expresión de este marcador celular aumenta de P1 a P7. NG2 se expresa también en células endoteliales de vasos en desarrollo en el primer día postnatal. (E) En P1 y P4, se observan algunas células NG2<sup>+</sup> con morfología redondeada y otras con morfología bipolar. (H) En P7, el número de células NG2<sup>+</sup> en la ZI incrementa con respecto a P4. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m.



**Figura 35. Expresión de NG2 en la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para NG2 (rodamina) (B, E y H) y superposición de las imágenes respectivas para cada edad (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la ECZSV y de la zona intermedia (ZI). Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. **(B, E y H)** Se observa la expresión de NG2 en células de la ECZSV y de la ZI. La expresión de este marcador celular disminuye de P12 a P21. **(B)** En P12, se observan una cantidad significativa de células NG2<sup>+</sup> con morfología bipolar. **(E y H)** En P15 y P21, no se observan células NG2<sup>+</sup> en el cuerpo calloso (CC), ni en la ECZSV. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m.



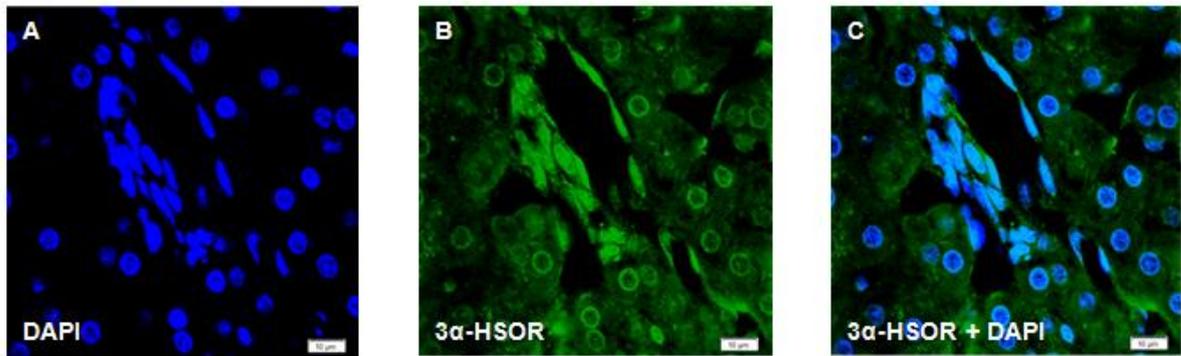
**Figura 36. Expresión de NG2 en células de la zona intermedia (ZI) en cortes sagitales de cerebro de rata de 12 días postnatales.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A), inmunofluorescencia para NG2 (rodamina) (B) y superposición de las imágenes del marcaje de los núcleos con DAPI con el marcaje para NG2 (C) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12 a nivel de la ZI asociada a la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. (B y C) Se observa la expresión de NG2 en las células migratorias de la ZI. Se observan células monopolares y bipolares (señaladas con flechas). Además, se observa que el marcaje de NG2 es citoplasmático.

### 3. Expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en la extensión caudal de la zona subventricular a distintos estadios del desarrollo postnatal

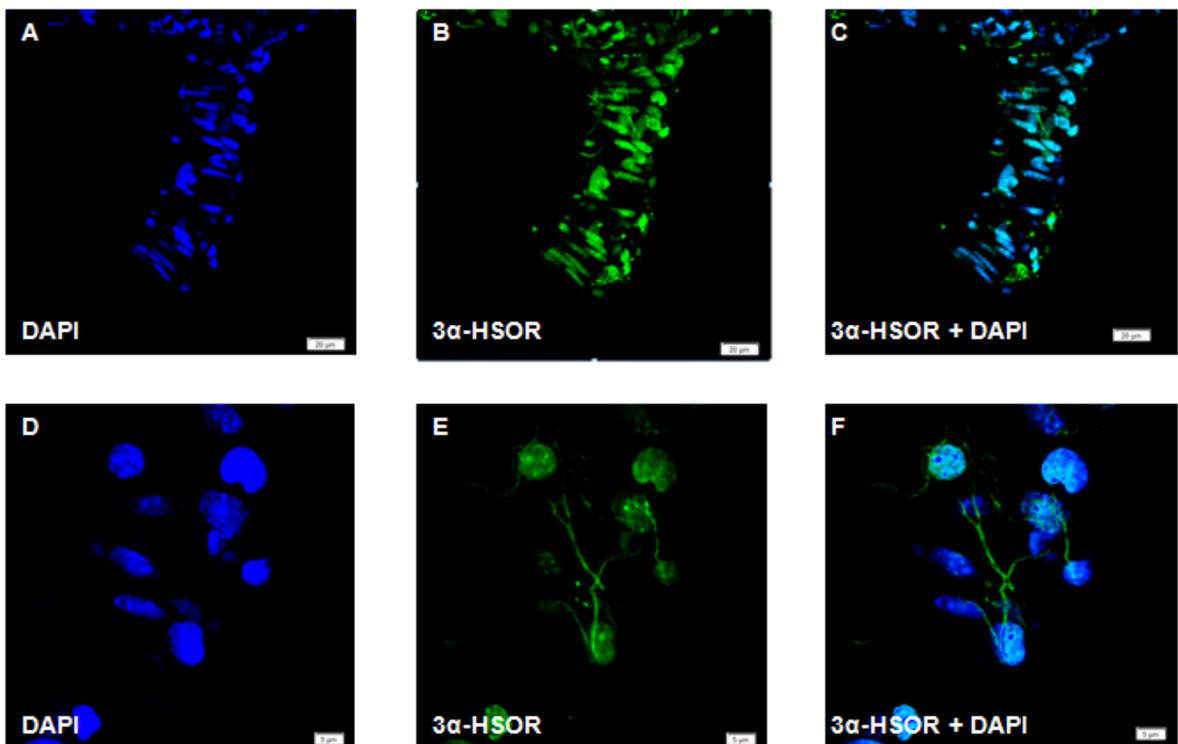
#### 3.1 Estandarización del protocolo de inmunofluorescencia para el marcaje de la 3 $\alpha$ -HSOR utilizando un anticuerpo policlonal.

El anticuerpo anti-3 $\alpha$ -HSOR fue probado en cortes congelados y cortes flotantes de hígado y de cerebro de rata (de P7 a P15), lo que permitió determinar que el anticuerpo permite el marcaje de la enzima por inmunofluorescencia en ambos tejidos, pero únicamente en cortes flotantes. Adicionalmente se probaron distintas diluciones y tiempos de incubación, determinándose que la dilución 1/120 es la que daba la mejor relación marcaje/ruido de fondo y un tiempo de incubación de 4 horas, el cual permitía un mejor marcaje.

En términos generales, se observó una fuerte expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en las células endoteliales de hígado y de tejido nervioso, y un marcaje de la enzima tanto citoplasmático como nuclear en las células hepáticas y nerviosas (Figs. 37, 38). En definitiva, este anticuerpo puede ser utilizado para el estudio de la expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR mediante inmunohistoquímica.



**Figura 37. Inmunofluorescencia para la 3 $\alpha$ -HSOR (alexa 488) y tinción con DAPI en cortes flotantes de hígado de rata adulta.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A), inmunofluorescencia para la 3 $\alpha$ -HSOR (alexa 488) (B) y superposición de la imagen obtenida para el marcaje de la 3 $\alpha$ -HSOR con la imagen obtenida de la tinción con el DAPI (C). Las fotografías fueron tomadas en un microscopio confocal. (B) Se observa inmunoreactividad para la 3 $\alpha$ -HSOR en las células endoteliales y en las células hepáticas. En las primeras, el marcaje es nuclear, y en las últimas, se observa un marcaje tanto nuclear como citoplasmático. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 10  $\mu$ m.



**Figura 38. Inmunofluorescencia para la 3 $\alpha$ -HSOR (alexa 488) y tinción con DAPI en cortes flotantes de cerebro de rata de 15 días.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A y D), inmunofluorescencia para la 3 $\alpha$ -HSOR (alexa 488) (B y E) y superposición de la imagen obtenida para el marcaje de la 3 $\alpha$ -HSOR con la imagen obtenida de la tinción con el DAPI (C y F). Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal, en un mismo campo a dos niveles diferentes de un vaso. (A y D) Se observa inmunoreactividad para la 3 $\alpha$ -HSOR en las células endoteliales, así como un marcaje nuclear de las mismas. (A, B y C) La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m. (D, E y F) La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 5  $\mu$ m.

### 3.2 Estudio de la expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en la extensión caudal de la zona subventricular del cerebro de rata, a distintos estadios del desarrollo postnatal.

La expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en la ECZSV y en la ZI se pudo identificar principalmente en los núcleos celulares (Figs. 39, 40). Se observó que las células que conforman la ECZSV son altamente inmunoreactivas para el anticuerpo contra la 3 $\alpha$ -HSOR. El marcaje para la enzima aumentó de P1 a P4, y se mantuvo similar desde P4 hasta P12, edad a partir de la cual disminuyó (Figs. 39B, 39E, 39H, 40B, 40E, 40H). Además, se observó que a partir de P4, las células de la ECZSV presentan un marcaje más definido. A partir de la ECZSV se observaron cadenas radiales de células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> que penetran en el cuerpo calloso. A groso modo, se pudo observar que el número de estas células disminuye a medida que el desarrollo avanza. Adicionalmente, se observó en P1, que muchas células de la ZI presentan prolongaciones inmunoreactivas para la enzima (Fig. 39B). Estas prolongaciones desaparecen a partir de P4. Es importante acotar que no todas las células de la ZI son 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>.

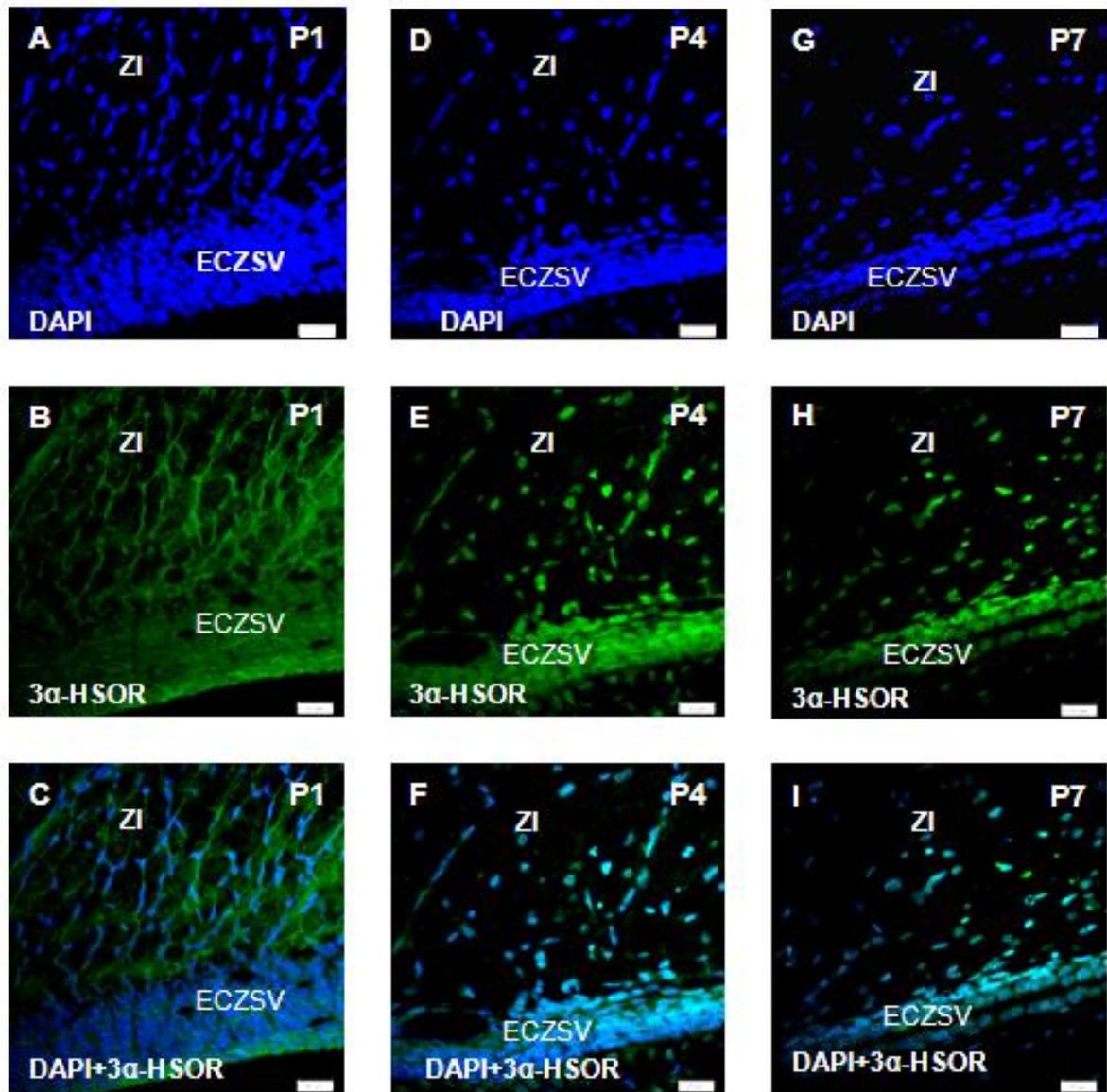
### 3.3 Identificación de las células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> que se originan de la ECZSV, a distintos estadios del desarrollo postnatal

#### a) *Expresión de nestina y de la 3 $\alpha$ -HSOR en la ECZSV*

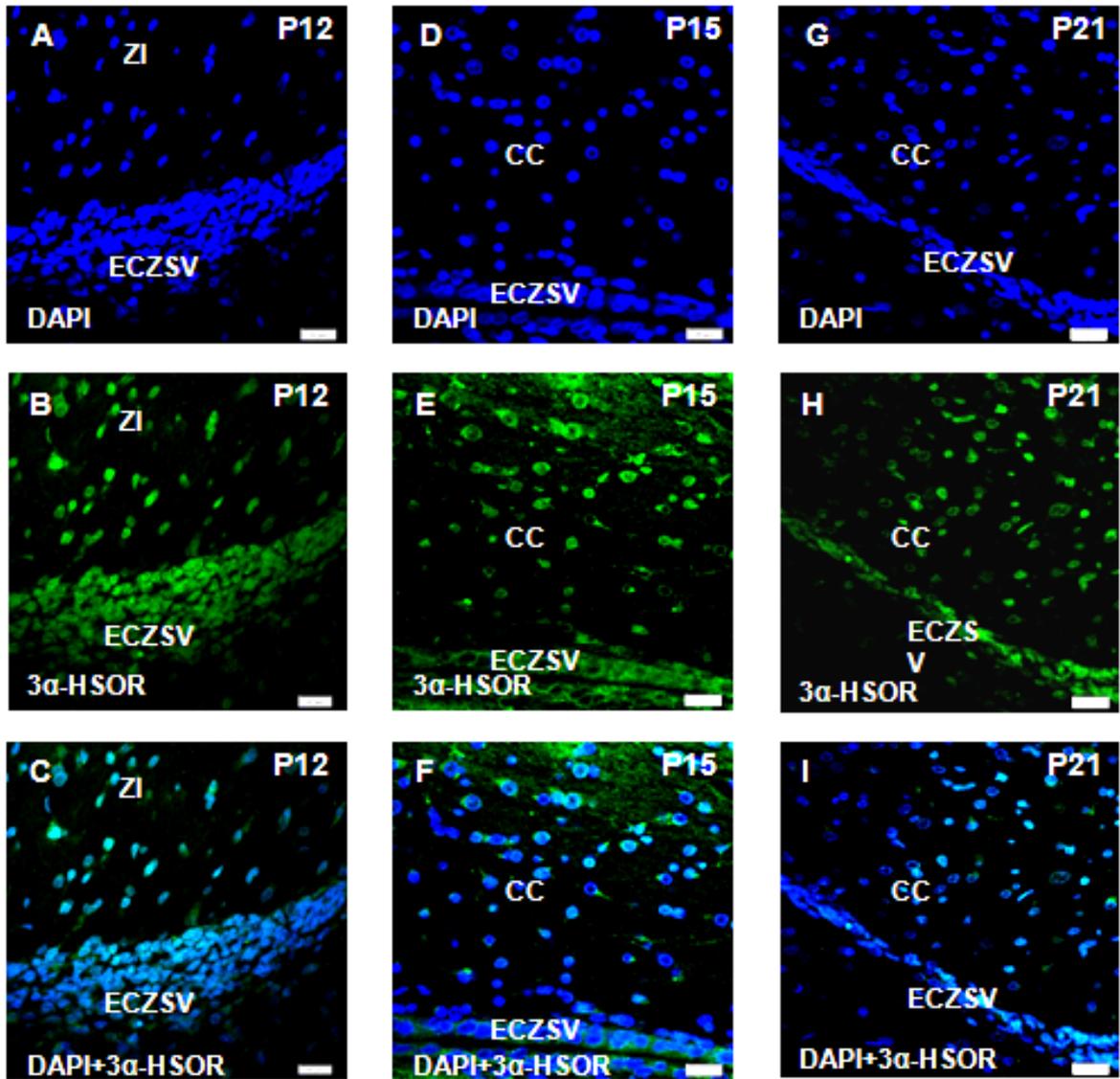
En las células de la ECZSV se observó un marcaje importante para la enzima 3 $\alpha$ -HSOR. Por otra parte, la ECZSV también resultó inmunopositiva para el filamento de nestina. Aunque la expresión de éste se observó principalmente en fibras celulares que se encuentran bordeando las células que conforman la ECZSV (Figs. 41, 42).

De manera general, en la ZI se observó una alta densidad de células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>, así como de fibras nestina<sup>+</sup> (Figs. 41, 42). La densidad de células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> y de fibras nestina<sup>+</sup> disminuye a medida que el desarrollo avanza, (Figs. 41, 42) en concordancia con la disminución de células migratorias.

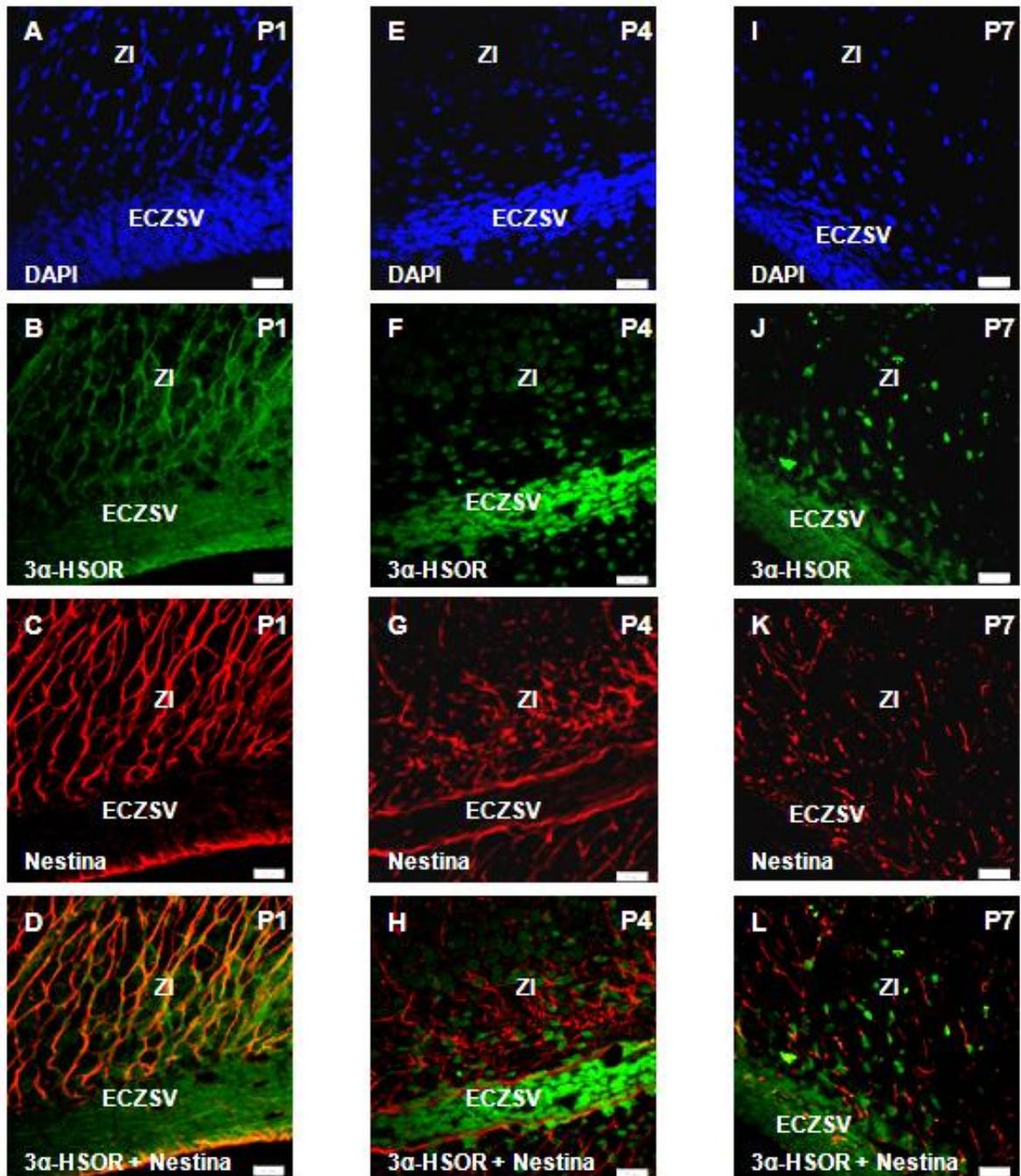
En P1 se observó que las células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> de la ZI presentan prolongaciones inmunopositivas para la enzima y para nestina. Adicionalmente, se observaron cadenas de células migratorias dispuestas sobre algunas fibras 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup>, lo que sugiere, que migran utilizando como soporte estas fibras (Figs. 41B, 41C, 41D). Por su parte, en P4 y P7 también se observaron prolongaciones nestina<sup>+</sup>, sin embargo, en estos casos, la mayoría de las prolongaciones no presentaron inmunomarcaje para la enzima (Figs. 41F, 41G, 41H, 41J, 41K, 41L, 43).



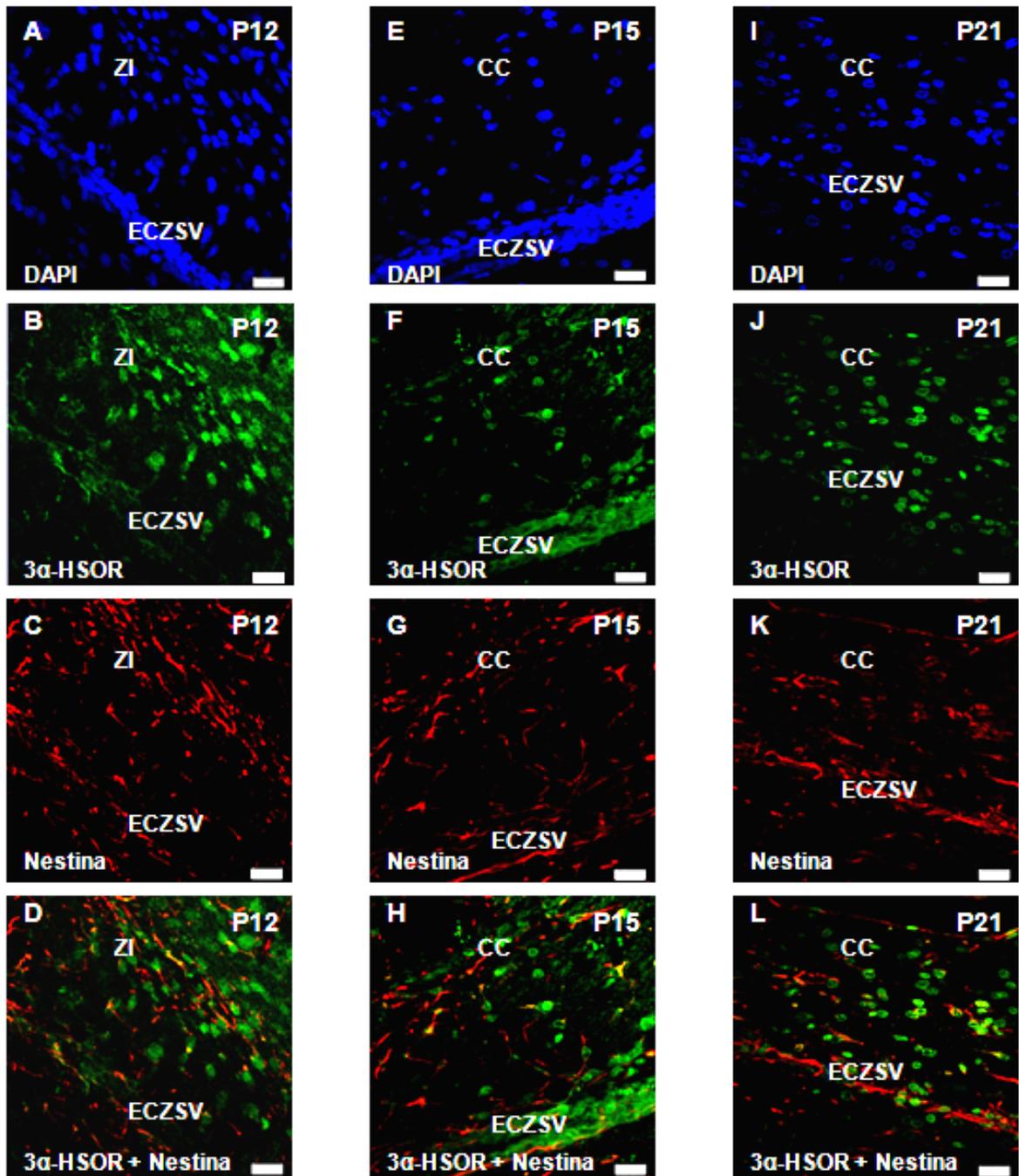
**Figura 39.** Expresión de la  $3\alpha$ -HSOR en la ECZSV y en la zona intermedia (ZI) en cortes sagitales de cerebro de rata. Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para la  $3\alpha$ -HSOR (alexa 488) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI con el marcaje de la enzima (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la ECZSV y de la ZI. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. **(B, E y H)** Expresión de la  $3\alpha$ -HSOR en P1, P4 y P7 respectivamente. La expresión de la enzima aumenta de P1 a P4, y es similar en P4 y P7. Nótese la alta densidad de células migratorias  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> en la ZI, la cual disminuye a medida que el desarrollo avanza. Además, el marcaje en las células de la ECZSV es más definido en P4 y P7 que en P1. **(B)** En P1 se observan prolongaciones celulares  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m.



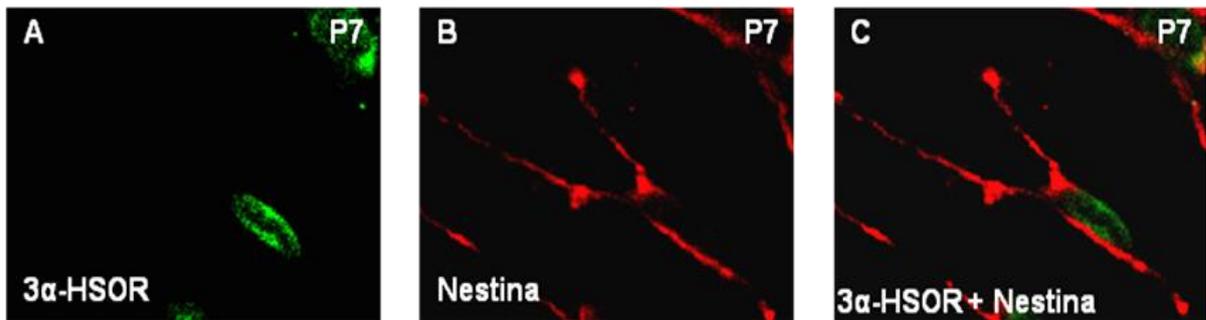
**Figura 40.** Expresión de la  $3\alpha$ -HSOR en la ECZSV y en la zona intermedia (ZI) en cortes sagitales de cerebro de rata. Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, D y G), inmunofluorescencia para la  $3\alpha$ -HSOR (alexa 488) (B, E y H) y superposición del marcaje con DAPI con el marcaje de la enzima (C, F e I) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la ECZSV y de la ZI. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía confocal. (B, E y H) Se observa una fuerte expresión de la enzima en P12, a partir de la cual decae, y se mantiene similar en P15 y P21. Nótese la presencia de células migratorias  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> en la ZI en P12, y en el cuerpo calloso (CC) en P15 y P21. La mayoría de las células presentes en la ZI y CC son  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m.



**Figura 41. Expresión de la  $3\alpha$ -HSOR y de nestina en la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata de P1 a P7.** Marcaje de los núcleos celular con DAPI (A, E e I), inmunofluorescencia para la  $3\alpha$ -HSOR (alexa 488) (B, F y J), inmunofluorescencia para nestina (rodamina) (C, G y K) y superposición del marcaje da la enzima con el marcaje de nestina (D, H y L) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la ECZSV. Fotografías tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia. (D, H y L) La ECZSV es inmunopositiva para la  $3\alpha$ -HSOR, y se observan fibras nestina<sup>+</sup> que bordean las células de la ECZSV. (B, C y D) En P1 se observan células  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> con prolongaciones  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup>. También se observan cadenas de células migratorias  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> dispuestas sobre fibras  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup>. (F, G, H, J, K y L) En P4 y P7 se observan prolongaciones nestina<sup>+</sup>, sin embargo, la mayoría de las prolongaciones no presentan inmunomarcaje para la enzima. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m.

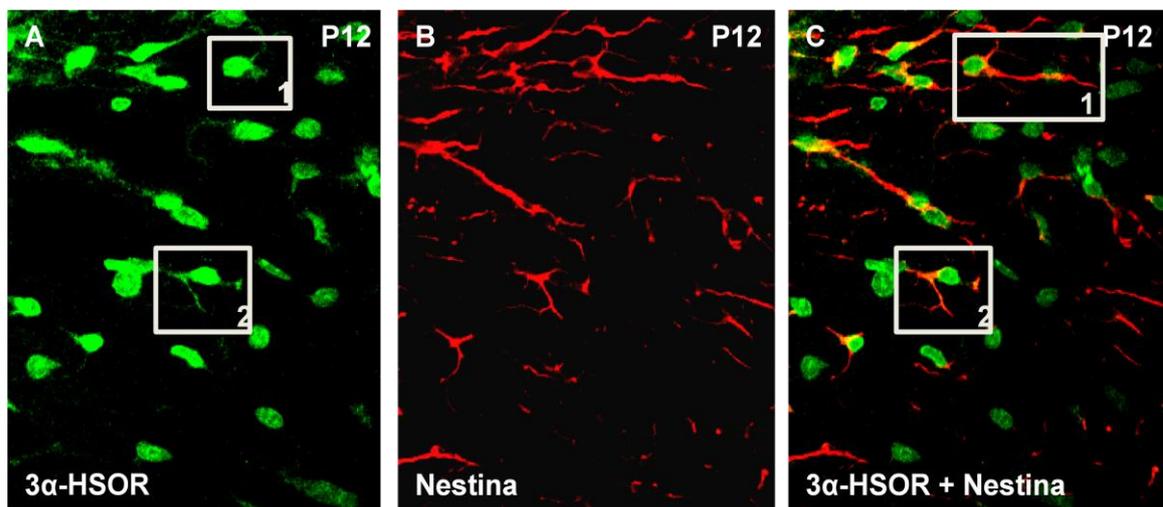


**Figura 42.** Expresión de la  $3\alpha$ -HSOR y de nestina en la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata de P12 a P21. Marcaje de los núcleos celular con DAPI (A, E e I), inmunofluorescencia para la  $3\alpha$ -HSOR (alexa 488) (B, F y J), inmunofluorescencia para nestina (rodamina) (C, G y K) y superposición del marcaje da la enzima con el marcaje de nestina (D, H y L) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la ECZSV. Fotografías tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia. (D, H y L) La ECZSV es inmunopositiva para la  $3\alpha$ -HSOR, y se observan fibras nestina<sup>+</sup> que bordean las células de la ECZSV. Esta expresión disminuye con el desarrollo. (B, F, J, C, G y K) Se observaon fibras que coexpresan los dos marcadores, aunque algunas fibras son únicamente nestina<sup>+</sup>. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m.

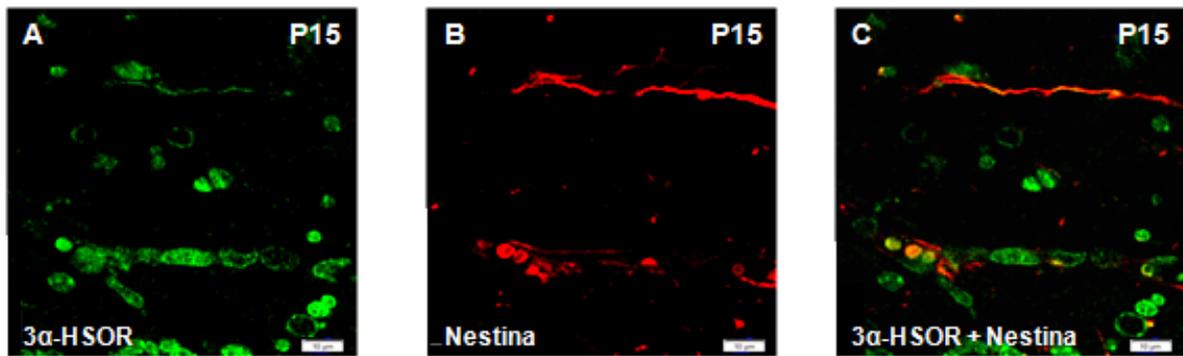


**Figura 43. Expresión de  $3\alpha$ -HSOR y nestina en células en la zona intermedia (ZI) en cortes sagitales de cerebro de rata de 7 días postnatales.** Inmunofluorescencia para  $3\alpha$ -HSOR (alexa 488) (A), inmunofluorescencia para nestina (B) y superposición de la imagen obtenida con el marcaje para la  $3\alpha$ -HSOR con la imagen obtenida para la nestina (C) en cortes sagitales de cerebro de rata en P7 a nivel de la ZI asociada a la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. (A) Se observa un marcaje nuclear para la  $3\alpha$ -HSOR. (B y C) Se observan prolongaciones celulares nestina<sup>+</sup> asociadas a la células  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>.

Con respecto a las edades P12, P15 y P21, se observaron fibras que coexpresan los dos marcadores, aunque algunas fibras son únicamente nestina<sup>+</sup> (Fig. 44). También, se encontró una alta densidad de células que coexpresan ambos marcadores; observándose principalmente la  $3\alpha$ -HSOR a nivel del cuerpo celular y en la parte más proximal de la prolongación. Por su parte, la expresión de nestina se observó principalmente en la prolongación celular, tanto en la porción proximal como distal de ésta (Fig. 44). Adicionalmente, se encontraron cadenas de células migratorias sobre fibras  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup> (Fig. 45).



**Figura 44. Expresión de  $3\alpha$ -HSOR y nestina en células en la zona intermedia (ZI) en cortes sagitales de cerebro de rata de 12 días postnatales.** Inmunofluorescencia para  $3\alpha$ -HSOR (alexa 488) (A), inmunofluorescencia para nestina (B) y superposición de la imagen obtenida con el marcaje para la  $3\alpha$ -HSOR con la imagen obtenida para la nestina (C) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12 a nivel de la ZI asociada a la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. (A) El marcaje de la  $3\alpha$ -HSOR se observa a nivel del cuerpo celular y en la parte más proximal de la prolongación. (B) La expresión de nestina se observa principalmente en la prolongación celular, tanto en la porción proximal como distal de ésta. (C) Se observan fibras que coexpresan los dos marcadores, aunque algunas fibras son únicamente nestina<sup>+</sup>.



**Figura 45. Expresión de 3 $\alpha$ -HSOR y nestina en células en la zona intermedia (ZI) en cortes sagitales de cerebro de rata de 15 días postnatales.** Inmunofluorescencia para 3 $\alpha$ -HSOR (alexa 488) (A), inmunofluorescencia para nestina (B) y superposición de la imagen obtenida con el marcaje para la 3 $\alpha$ -HSOR con la imagen obtenida para nestina (C) en cortes sagitales de cerebro de rata en P15 a nivel de la ZI asociada a la ECZSV. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal. (A) Se observa un marcaje nuclear para la 3 $\alpha$ -HSOR. (C) Se observan células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> dispuestas sobre fibras 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup>. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 10  $\mu$ m.

**b) *Expresión de GFAP y de la 3 $\alpha$ -HSOR en la ECZSV***

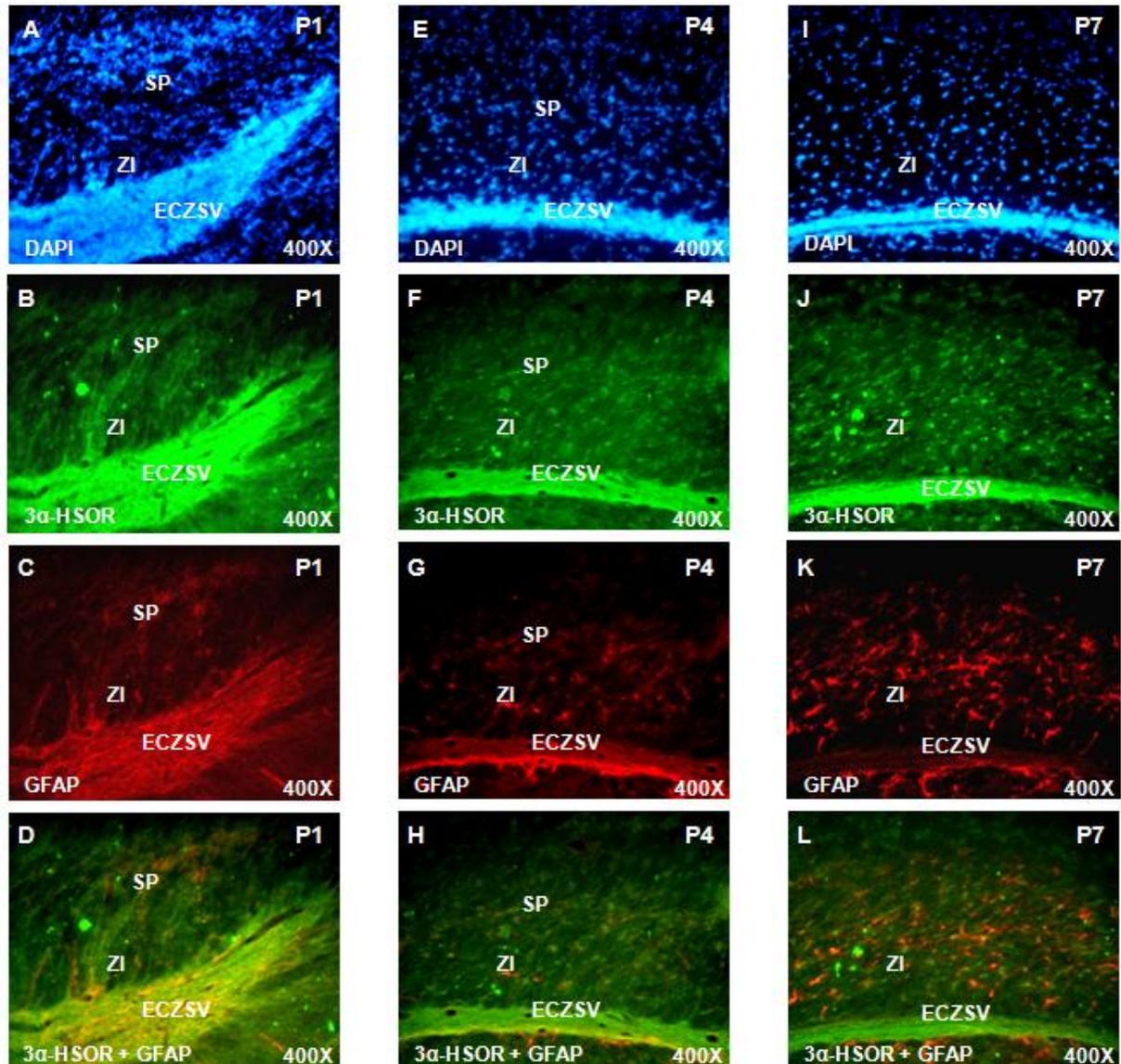
La ECZSV presentó una inmunoreactividad apreciable tanto para la 3 $\alpha$ -HSOR como para la GFAP en animales de 1 y 4 días postnatales. Sin embargo, a partir de P7 hasta P21, no se observó inmunomarcaje para GFAP en la ECZSV (Figs. 46, 47).

En la ZI se observó una gran cantidad de células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>, muchas de las cuales expresaron también la GFAP (Figs. 48, 49), excepto en P1 donde no se observaron células GFAP<sup>+</sup> (Fig. 48C). Sin embargo, en P4 se observan células GFAP<sup>+</sup>/3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>, cuyo número incrementa en P7 (Fig. 48G, 48H, 48K, 48L). Algunas de las células presentes en P4 presentaron una morfología sencilla y redondeada, y otras presentaron prolongaciones GFAP<sup>+</sup>. Por otra parte, en P7 sólo se observan células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> con una morfología más compleja caracterizada por numerosas prolongaciones (Fig. 48K). De manera general, las células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> presentes en la ZI y CC incrementa en función del desarrollo, alcanzando un máximo cerca de P12 (Figs. 48, 49D, 49H, 49L).

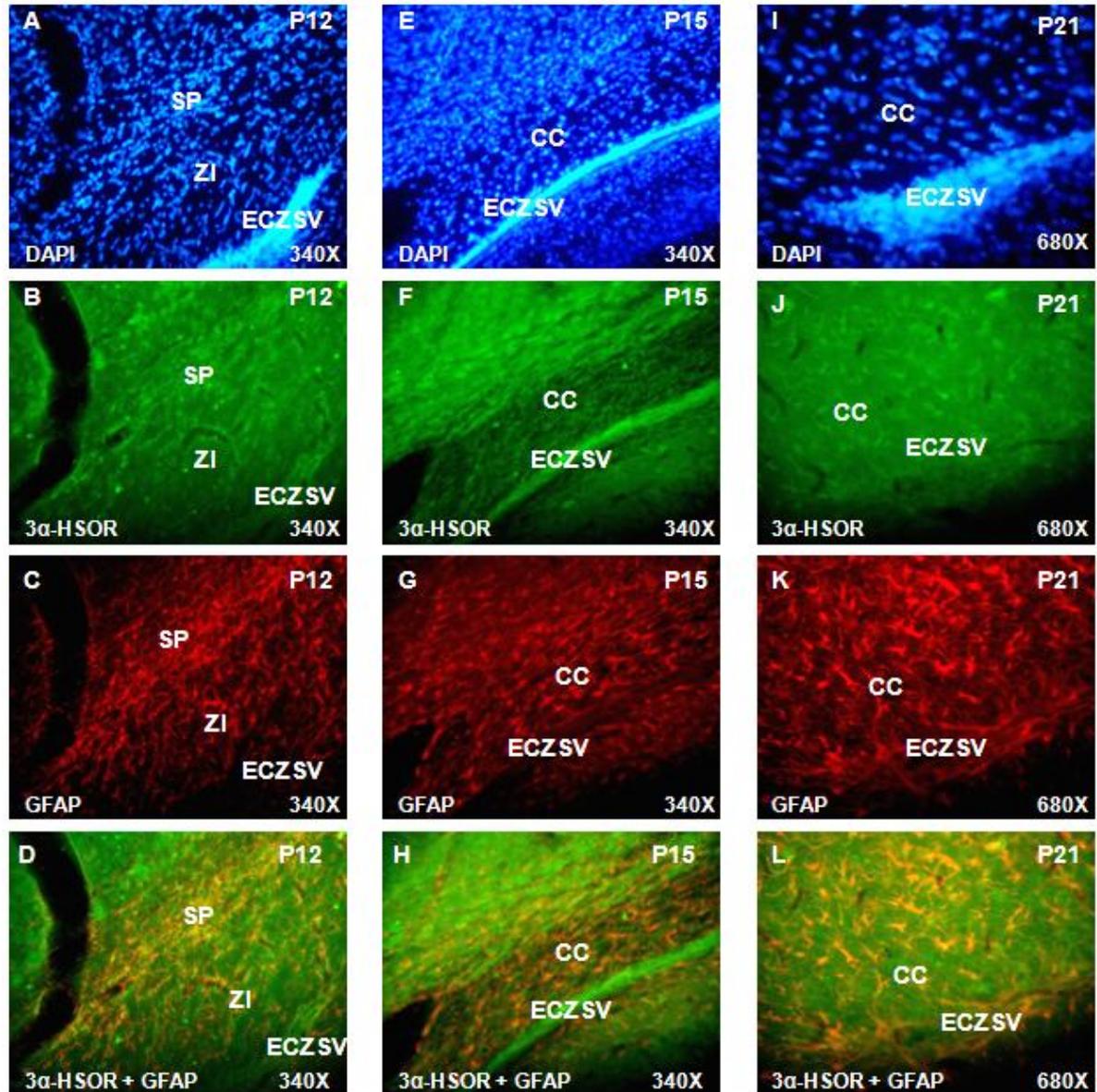
**c) *Expresión de NG2 y de la 3 $\alpha$ -HSOR en la ECZSV***

En la ECZSV y en la ZI asociada a ésta, se pudo observar la presencia de progenitores 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup>, así como de células endoteliales 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup> de vasos sanguíneos en desarrollo, siguiendo un patrón espacio-temporal definido (Figs. 50, 51). En P1 se observó una gran cantidad de endotelios vasculares 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup> distribuidos en la ZI, y en menor cantidad en P4 (Figs. 50C, 50H). Por otra parte, se encontraron algunas células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup> con morfología de progenitores de oligodendrocitos, a los 4 días postnatales y posteriormente, el número de estas células aumentó en P7 y P12 (Figs. 50G, 50H, 50K, 50L, 51C, 51D). En P12 se observaron algunas células

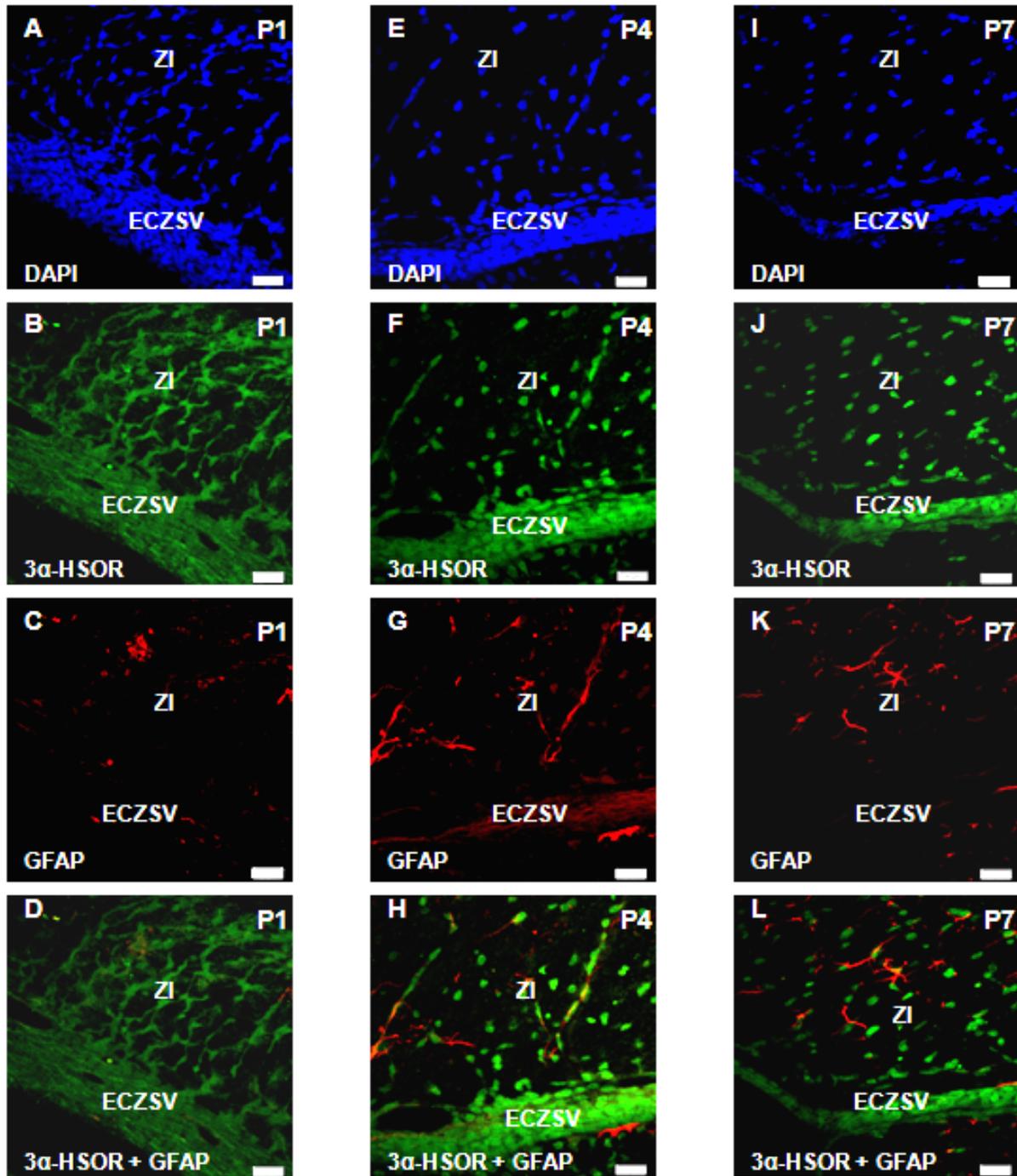
$3\alpha\text{-HSOR}^+/\text{NG2}^+$  con morfología bipolar (Fig. 51D). Adicionalmente, se encontró que no todas las células  $3\alpha\text{-HSOR}^+$  son inmunopositivas para NG2. Con respecto a P15 y P21, no se encontraron células  $3\alpha\text{-HSOR}^+/\text{NG2}^+$  ni en la ECZSV ni en la ZI (Figs. 51K, 51L).



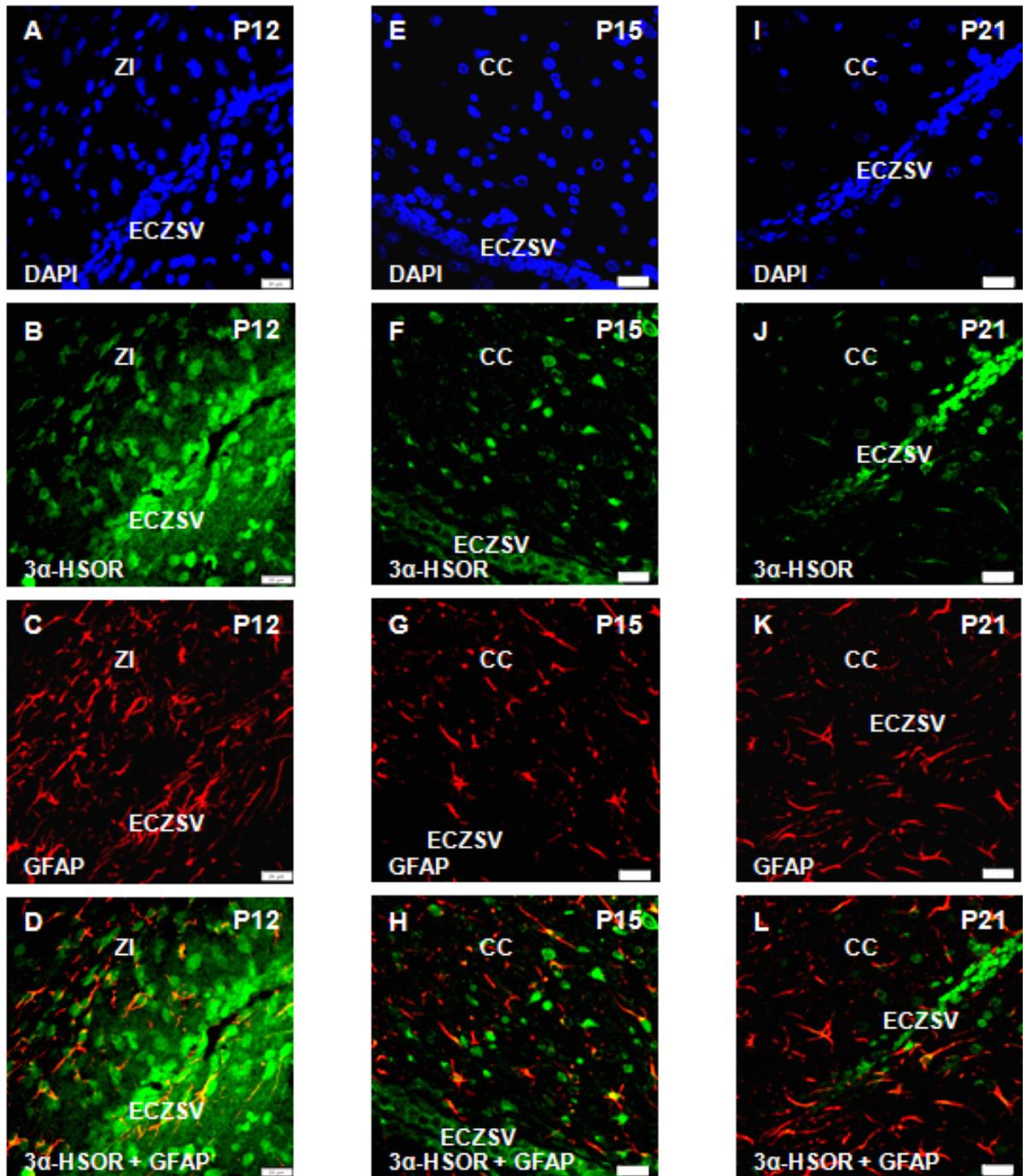
**Figura 46. Expresión de la  $3\alpha\text{-HSOR}$  y de GFAP en la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata de P1 a P7.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, E e I), inmunofluorescencia para la  $3\alpha\text{-HSOR}$  (alexa 488) (B, F y J), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (C, G y K) y superposición de las imágenes obtenidas para el marcaje de la  $3\alpha\text{-HSOR}$  con las imágenes obtenidas para el marcaje de GFAP (D, H y L) en cortes sagitales de cerebro de rata P1 a P7 a nivel de la ECZSV. Fotografías tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia. (B, F, C y G) En P1 y P4 se observa un marcaje apreciable tanto para la  $3\alpha\text{-HSOR}$  como para la GFAP en la ECZSV. (K) En P7 no se observa inmunomarcaje para la GFAP en la ECZSV. ZI: zona intermedia, SP: subplaca.



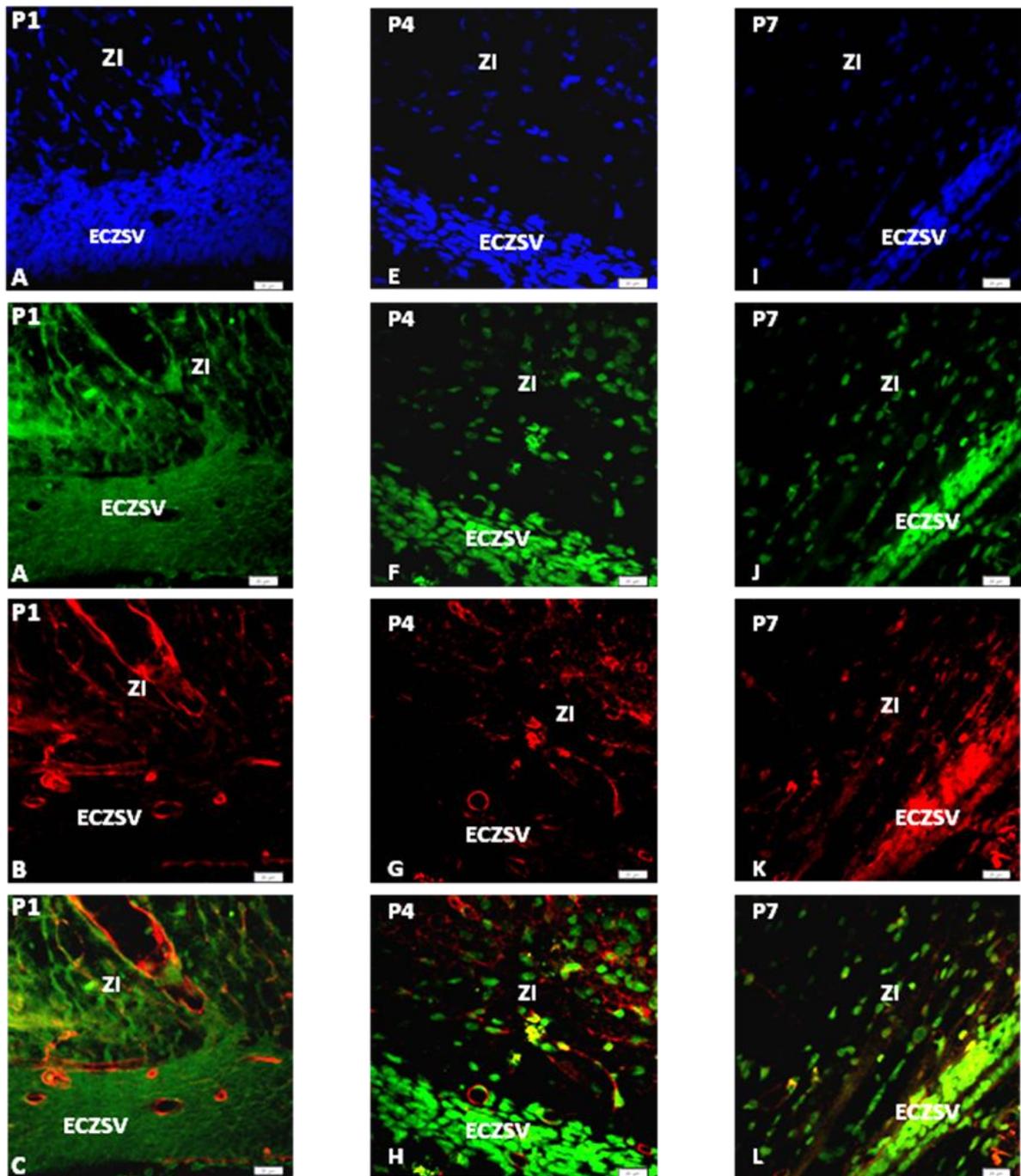
**Figura 47. Expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR y de GFAP en la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata de P12 a P21.** Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (A, E e I), inmunofluorescencia para la 3 $\alpha$ -HSOR (alexa 488) (B, F y J), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (C, G y K) y superposición de las imágenes obtenidas para el marcaje de la 3 $\alpha$ -HSOR con las imágenes obtenidas para el marcaje de GFAP (D, H y L) en cortes sagitales de cerebro de rata P12 a P21 a nivel de la ECZSV. Fotografías tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia. **(B, F y J)** La expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en la ECZSV disminuye desde P12 hasta P21. **(C, G y K)** No se observa inmunomarcaje para la GFAP en la ECZSV en las tres edades correspondientes. ZI: zona intermedia, SP: subplaca, CC: cuerpo calloso.



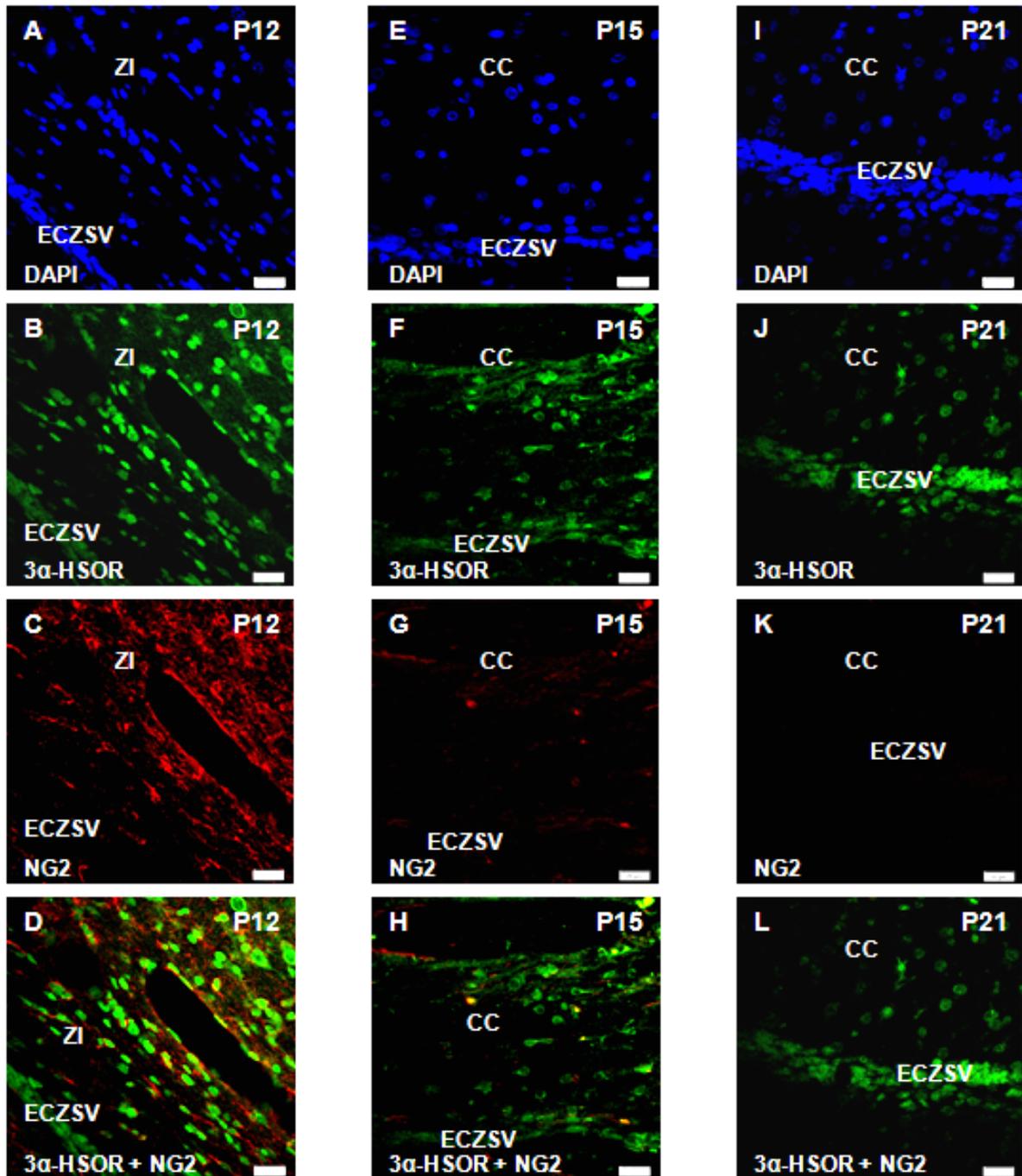
**Figura 48. Expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR y de GFAP en la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata P1 a P7.** Marcaje de los núcleos con DAPI (A, E e I), inmunofluorescencia para la 3 $\alpha$ -HSOR (alexa 488) (B, F y J), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (C, G y K) y superposición del marcaje de la enzima con el marcaje para GFAP (D, H y L) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la ECZSV. Fotografías tomadas con un microscopio confocal. (C y D) En P1 se observan células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> en la zona intermedia (ZI). (G, H, K y L) En P4 y P7 se observa una gran cantidad de células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>, algunas de las cuales expresan también la GFAP. (K y L) En P7 se observa una cantidad mayor de células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>, y con una morfología más compleja que en P4 (K y L). La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m.



**Figura 49. Expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR y de GFAP en la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata P12 a P21.** Marcaje de los núcleos con DAPI (A, E e I), inmunofluorescencia para la 3 $\alpha$ -HSOR (alexa 488) (B, F y J), inmunofluorescencia para GFAP (rodamina) (C, G y K) y superposición del marcaje de la enzima con el marcaje para GFAP (D, H y L) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la ECZSV. Fotografías tomadas con un microscopio confocal. (D, H y L) Se observa una gran cantidad de células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>, algunas de las cuales expresan también la GFAP. La densidad de células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> parece disminuir desde P12 a P21. La barra situada en la esquina inferior derecha corresponde a 20  $\mu$ m.



**Figura 50. Expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR y de NG2 en la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata de P1 a P7.** Marcaje de los núcleos con DAPI (A, E e I), inmunofluorescencia para la 3 $\alpha$ -HSOR (alexa 488) (B, F y J), inmunofluorescencia para NG2 (rodamina) (C, G y K) y superposición del marcaje de la enzima con el marcaje para NG2 (D, H y L) en cortes sagitales de cerebro de rata en P1, P4 y P7 a nivel de la ECZSV. Fotografías tomadas con un microscopio confocal. En P1 se observan endotelios vasculares 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup> distribuidos en la ECZSV y en la ZI, y en menor cantidad en P4 (B, C, G y H). En P4 se observan algunas células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup> con morfología sencilla y redondeada (G y H). En P7 se observan una mayor cantidad de células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup> con morfología sencilla y redondeada, con respecto a P4 (K y L).



**Figura 51.** Expresión de la  $3\alpha$ -HSOR y de NG2 en la ECZSV en cortes sagitales de cerebro de rata de P12 a P21. Marcaje de los núcleos con DAPI (A, E e I), inmunofluorescencia para la  $3\alpha$ -HSOR (alexa 488) (B, F y J), inmunofluorescencia para NG2 (rodamina) (C, G y K) y superposición del marcaje de la enzima con el marcaje para NG2 (D, H y L) en cortes sagitales de cerebro de rata en P12, P15 y P21 a nivel de la ECZSV. Fotografías tomadas con un microscopio confocal. En P12 se observan células  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup> con morfología sencilla y redondeada (C y D). En P15 y P21, no se encontraron células  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup> ni en la ECZSV ni en la ZI (K y L).

## DISCUSIÓN

El estudio de las zonas neurogénicas reviste gran interés debido al papel que éstas desempeñan en los procesos de plasticidad cerebral, así como de regeneración y reparación del tejido nervioso. En el SNC de los mamíferos, se han descrito varias zonas neurogénicas siendo las dos más estudiadas la ZSV y la ZSG del giro dentado del hipocampo. El presente trabajo se centra en el estudio de otra zona neurogénica, aun poco estudiada, que hemos denominado ECZSV. Se trata de una extensa zona germinal que bordea los ventrículos laterales y que en su parte anterior forma un continuo con la ZSV, debido a esto la hemos denominado extensión caudal de la ZSV. Esta zona ha recibido otros nombres en otros trabajos como *the posterior periventricle* (pPV, Nakatomi y col., 2002), la zona subcallosal (Seri y col., 2006) o simplemente ZSV, sin establecer diferencias entre la porción anterior y la porción posterior (Suzuki y Goldman, 2003). Consideramos sin embargo, que es más apropiado establecer la diferencia entre estas dos porciones debido a que presentan diferencias estructurales y funcionales importantes. Por otra parte, es conveniente conservar el término de ZSV debido a que existe un claro continuo entre las dos porciones y el empleo de un nombre completamente diferente como el de zona subcallosal sugiere que esta zona neurogénica no guarda relación con la ZSV. Debido a estas razones hemos decidido denominarla ECZSV.

### **1. Evaluación de los cambios estructurales generales de la extensión caudal de la zona subventricular durante el desarrollo postnatal**

La ECZSV corresponde a una zona germinal que bordea a los ventrículos laterales y que se sitúa entre el cuerpo calloso y el hipocampo. Durante el desarrollo del SNC, el hipocampo crece significativamente de tamaño, lo cual trae como consecuencia que la pared del ventrículo en la parte ventral de la corteza quede yuxtapuesta con la pared del ventrículo de la parte dorsal del hipocampo, produciendo que la luz del ventrículo en esta zona colapse. A pesar de que es difícil distinguir entre las dos paredes ventriculares juxtapuestas, y de que éstas suelen verse como una sola estructura, es posible en ciertas regiones observar remanentes de la luz ventricular. Incluso se ha podido identificar en la ECZSV la presencia de células ependimales indicando el origen ventricular de esta estructura (Seri y col., 2006).

El estudio de los cambios estructurales de la ECZSV durante el desarrollo postnatal, nos permitió conocer y comprender los diferentes cambios morfológicos que se llevan a cabo en esta zona durante este período de desarrollo. Se observaron grandes cambios morfológicos que siguen un patrón espacio-temporal definido, en particular, se pudo evaluar una disminución importante del espesor de la ECZSV, y de la densidad de células migratorias en la ZI (Figs. 13, 14).

El proceso de desarrollo del SNC prosigue durante el período postnatal temprano, momento en el cual se llevan a cabo importantes procesos de producción y de migración de células nerviosas, particularmente de células gliales (revisado por Cayre y col., 2009). A partir de la ECZSV en particular, se ha reportado que migran células gliales hacia el cuerpo calloso y la corteza, en donde se diferencian en oligodendrocitos y astrocitos (Levison y Goldman, 1993; Suzuki y Goldman, 2003). Debido a esto, la disminución del espesor de la ECZSV se debe a la salida de progenitores gliales que migran hacia la ZI y la corteza, donde se van posicionando y diferenciando en células gliales.

En la ZI, se pudo observar, desde P1 hasta P12, la presencia de cadenas radiales formadas por células migratorias. Estas cadenas corresponden a los progenitores gliales que migran hacia la corteza (Suzuki y Goldman, 2003). A medida que estos encuentran su sitio de destino y se van diferenciando, los procesos de migración van disminuyendo, lo cual es concomitante con la disminución de la densidad celular en la ZI a lo largo del desarrollo postnatal.

Por otro lado, la presencia de cadenas radiales formadas por células migratorias, disminuye en P15. En esta edad se observaron cadenas tangenciales (orientadas paralelamente a la pared del ventrículo), las cuales corresponden a las fibras que conforman el cíngulo. Posteriormente, en P21, no se observaron cadenas de ningún tipo, en cambio, las células se encuentran dispuestas homogéneamente, reflejando que ya en esta etapa del desarrollo postnatal, las células provenientes de la ECZSV se han posicionado en su sitio de destino (Fig. 15).

## **2. Identificación de los diferentes tipos celulares presentes en la extensión caudal de la zona subventricular a distintos estadios del desarrollo postnatal**

Las inmunofluorescencias realizadas contra los marcadores celulares nestina, GFAP y NG2, permitieron identificar los tipos de células presentes en la ECZSV y en la ZI.

### **a) *Expresión de nestina***

En el presente trabajo se empleó el marcador de nestina, debido a que este permite identificar células proliferativas y migratorias, como los PN. Este marcador es una proteína del filamento intermedio que participa en la organización estructural de las células mitóticamente activas (revisado por Michalczyk y Ziman, 2005).

Se observó que la expresión de nestina tanto en la ECZSV como en la ZI, disminuye con el desarrollo, siguiendo así un patrón espacio-temporal definido (Fig. 54). Se sabe en términos generales que el filamento intermedio nestina se expresa en células mitóticamente activas y migratorias, en donde participa en la regulación de la organización estructural de la célula (revisado por Michalczyk y

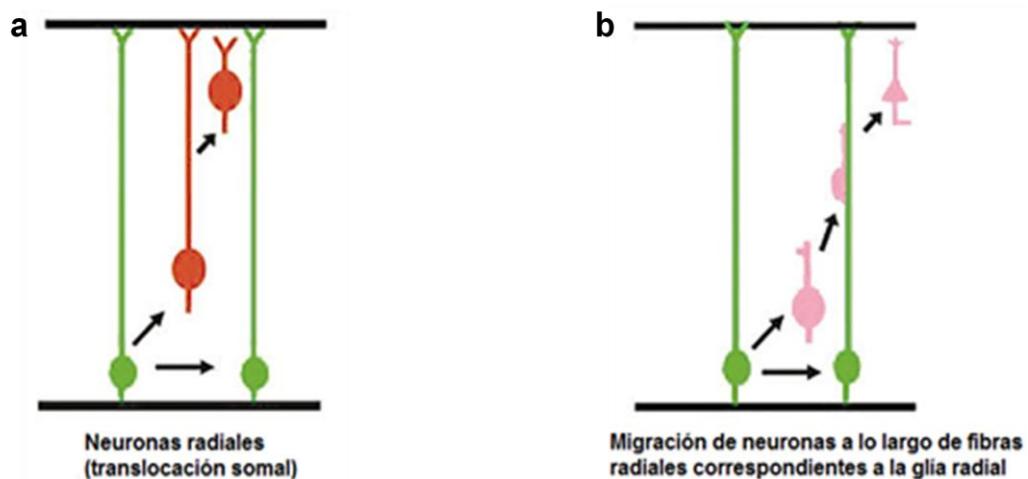
Ziman, 2005). La inmunoreactividad encontrada para nestina en la ECZSV, es evidencia de que esta zona es una zona dinámica y mitóticamente activa, y una fuente de progenitores de nuevas células nerviosas.

Más específicamente, en P1 se observó la expresión de nestina en fibras organizadas radialmente ubicadas en la ZI (Fig. 22C). Por otra parte, se observó una alta densidad de pequeños núcleos marcados con DAPI, característicos de núcleos de progenitores neurales, los cuales se encontraban en estrecha asociación con las fibras nestina<sup>+</sup>, sugiriendo que estos progenitores utilizan las fibras nestina<sup>+</sup> como soporte para su proceso de migración (Fig. 25). Este resultado es altamente sugestivo de un proceso de migración radial mediante el empleo de la glía radial. Estos resultados muestran por una parte, la persistencia de la glía radial postnatalmente y por otra parte, aportan evidencias sobre el posible papel de ésta en los procesos de migración postnatal de progenitores gliales.

Con respecto a la persistencia de la glía radial postnatalmente, Scorza y colaboradores en 2009, observaron en ratas desde P9 a P16, la presencia de prolongaciones radiales nestina<sup>+</sup> en la corteza somatosensorial primaria, y reportaron que la expresión de nestina disminuye conforme avanza el desarrollo. Estos resultados en términos generales son similares a los encontrados en el presente trabajo, donde la expresión de nestina en la ECZSV y la ZI disminuye con el desarrollo postnatal, lo que sugiere que las células que conforman esta zona se van diferenciando en distintos tipos celulares.

En la ZI, sin embargo, se observó que las fibras nestina<sup>+</sup>, van perdiendo su clara organización radial mas precozmente, a partir de P4. Esto sugiere por un lado una modificación estructural de la célula nestina<sup>+</sup> con posiblemente acortamiento de sus prolongaciones, y por otra parte, quizás la existencia de otros mecanismos de migración puesto que en P4 se observa aun una alta densidad de progenitores migratorios en la ZI. En efecto, se ha planteado la existencia de distintos mecanismos de migración radial para los progenitores neuronales corticales aunque desconocemos si los mismos existen también para los progenitores gliales postnatales. Estos mecanismos son la translocación del soma y la locomoción guiada por glía (revisado por Nadarajah, 2003; Nadarajah y col., 2003). En la translocación del soma la célula desarrolla una larga prolongación hacia la superficie pial y presenta una corta prolongación posterior. Al ir el soma avanzando hacia la superficie pial la prolongación posterior se acorta y se hace mas fina progresivamente mientras que la otra prolongación se mantiene fija en la superficie externa. En cambio cuando la célula migra por locomoción presenta dos prolongaciones libres de tamaño relativamente constante que utiliza para desplazarse sobre una fibra glial (glía radial) (Fig. 52) (revisado por Nadarajah, 2003; Nadarajah y col., 2003).

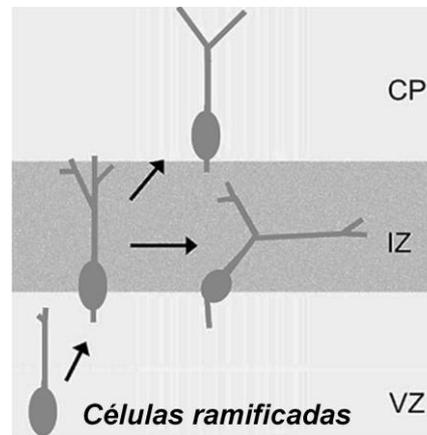
Durante la corticogénesis, las neuronas que migran por translocación del soma son neuronas producidas por división asimétrica a partir de la glía radial y que conservan la misma larga prolongación que la glía radial, la cual extienden hasta la superficie pial. Estas neuronas han sido denominadas neuronas radiales. Estas neuronas van a ir progresivamente translocando su cuerpo celular hacia la superficie pial. Este modo de migración radial se ha registrado en la fase temprana del desarrollo cortical cuando el espesor de la corteza es aun pequeño, pero conforme se va desarrollando esta estructura, las neuronas van adoptando un modo de migración por locomoción guiada por glía (revisado por Nadarajah, 2003; Nadarajah y col., 2003). En este caso, la neurona producida a partir de la glía radial, utiliza la prolongación de esta misma como sustrato para migrar en dirección pial hasta su sitio de destino (Fig. 52).



**Figura 52. Modelo que ilustra el papel de la glía radial en la corteza cerebral durante la corticogénesis.** Durante el desarrollo de la corteza, la glía radial produce neuronas y más células de la glía radial. (a) En las primeras etapas del desarrollo, las neuronas producidas a partir de la glía radial, heredan las fibras radiales y usan la translocación del soma como modo de migración. (b) Posteriormente en el desarrollo, las neuronas migran a lo largo de las fibras radiales correspondientes a la glía radial. (Tomado de Nadarajah 2003).

Aparte, de la migración radial por translocación y por locomoción guiada por glía se ha descrito otro mecanismo migratorio para algunas neuronas corticales las cuales han sido denominadas neuronas ramificadas (*branching cells*) (revisado por Nadarajah y col., 2003). Durante el desarrollo de la corteza, algunas células migratorias son bipolares cuando se encuentran en la ZV, al inicio del proceso de migración, pero luego se ramifican y se vuelven multipolares en la ZI. Este comportamiento aumenta durante la corticogénesis tardía embrionaria. Las prolongaciones de estas células son altamente dinámicas, las ramas se forman y se retraen rápidamente, lo cual sugiere que estas células se encuentran explorando activamente el ambiente. Dependiendo de las señales encontradas, estas células o bien prosiguen su ascenso radial o bien se desplazan tangencialmente (Fig. 53) (revisado por Nadarajah y col., 2003). Aunque este mecanismo de migración no ha sido aun

descrito para los progenitores gliales postnatales, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que un mecanismo de este tipo pudiese estar presente. En efecto, si bien las fibras nestina<sup>+</sup> presentan, en P1, una clara organización radial en términos generales, estas fibras no constituyen las clásicas fibras de la glía radial, las cuales son largas prolongaciones prácticamente paralelas. En este caso, las fibras nestina<sup>+</sup> que se observaron exhiben numerosas ramificaciones (Fig. 22C).



**Figura 53. Esquema de una célula ramificada mostrando el modo de migración característico (*branching cells*).** Las ramas de la célula se forman y se retraen, como explorando activamente el ambiente. (Tomado de Nadarajah y col., 2003)

En conclusión, con respecto a la migración de los progenitores gliales durante el desarrollo postnatal se desconoce si pueden emplear más de un modo de migración, sin embargo, las observaciones realizadas en este trabajo sugieren que esto si sea posible debido a que:

1. en P1, se observaron fibras nestina<sup>+</sup> organizadas radialmente (tipo glía radial) con una gran cantidad de progenitores asociados a éstas, sugestivo de un tipo de migración por locomoción guiada por fibras gliales (Fig. 22C).
2. en P4, la pérdida de la organización radial de las prolongaciones nestina<sup>+</sup> con el acortamiento de las mismas sugiere la participación de algún otro modo de migración quizás algún proceso de translocación del soma considerando que algunas células sólo deben migrar cortas distancias, desde la ECZSV hasta el cuerpo calloso o el cíngulo (Fig. 22F).
3. en P1 y P4 las prolongaciones nestina<sup>+</sup> presentan numerosas ramificaciones lo que sugiere la existencia de células migratorias ramificadas como se ha descrito durante el desarrollo embrionario (*branching cells*) (Figs. 22C, 22F).

Son necesarios otros estudios para establecer el o los modos de migración de los progenitores gliales producidos de la ECZSV durante el período postnatal.

**b) *Expresión de GFAP***

En el presente trabajo se utilizó el marcador GFAP, debido a que éste permite identificar células astrogliales (revisado por Duprey y Paulin, 1995). Este marcador es una proteína del filamento intermedio, que participa en el arreglo del citoesqueleto durante la mitosis (Tardy y col., 1990).

La expresión de GFAP en la ECZSV sigue un patrón espacio-temporal definido, disminuyendo a partir de P4 (Fig. 54B). Además, se observó que la presencia de células GFAP<sup>+</sup> en la ZI se observa a partir de P4 y la cantidad de éstas incrementa a medida que avanza el desarrollo postnatal, al igual que la cantidad de astrocitos presentes en la región ventral de la ECZSV (Fig. 54C). Por otra parte, la morfología de las células GFAP<sup>+</sup> cambia a medida que se van diferenciando y madurando, incrementando el número de prolongaciones celulares; haciéndose así más complejas (Figs. 26E, 26H, 28E, 28H). El patrón espacio temporal de la expresión de GFAP sugiere que la ECZSV participa en la producción de células GFAP<sup>+</sup> en los estadios tempranos del desarrollo postnatal, que estas células luego migran de la ECZSV hacia el cuerpo calloso y la corteza en donde finalmente se diferencian en astrocitos maduros. Nuestras observaciones están en concordancia con los trabajos de Levison y Goldman (1993) y de Suzuki y Goldman (2003) en donde describen que la ECZSV es una fuente de progenitores gliales que migran hacia el cuerpo calloso y la corteza, en donde se diferencian en oligodendrocitos y astrocitos. Por otra parte, Seri y colaboradores en 2006, encontraron que a partir de células aisladas de la ECZSV se generan astrocitos. En general, los resultados obtenidos en el presente trabajo, aportan evidencias del papel de la ECZSV en la producción de astrocitos.

En el presente trabajo, las células GFAP<sup>+</sup> observadas durante el desarrollo postnatal, presentaban un núcleo ovalado, y con pocas y delgadas ramificaciones, característico de los astrocitos fibrosos presentes en la sustancia blanca (revisado por Rajkowska e Hidalgo, 2007). Se ha reportado que estos astrocitos fibrosos se generan a partir de la glía radial (revisado por Kessaris y col., 2008). Por otra parte, durante las etapas tempranas del desarrollo postnatal, la glía radial, antes de desaparecer de la ZSV, genera astrocitos que posteriormente se localizan en la corteza, en la sustancia blanca y en los bordes de la ZSV (revisado por Cayre y col., 2009; revisado por Kessaris y col., 2008). Los patrones de expresión de nestina, y de GFAP encontrados en el presente trabajo, sugieren también que los astrocitos se forman a partir de la glía radial antes de que ésta desaparezca, puesto que el aumento en el número de astrocitos GFAP<sup>+</sup> se correlaciona con la disminución de la expresión de nestina y de la glía radial (Fig. 54).

Es interesante mencionar que aunque se observó una disminución de la expresión de GFAP en la ECZSV en función del desarrollo postnatal, junto con un aumento concomitante del número de astrocitos GFAP<sup>+</sup> en la ZI, persisten algunas células GFAP<sup>+</sup> en la ECZSV en las edades más avanzadas estudiadas, de P12 a P21 (Fig. 33). Seri y colaboradores (2006) estudiaron la composición celular y estructural de la ECZSV de adulto y pudieron identificar por inmunohistoquímica y por

microscopía electrónica la presencia de células similares a las de la ZSV, incluyendo a las células tipo B o astrocitos. En el presente trabajo, las células GFAP<sup>+</sup> que persisten en las edades avanzadas pudiesen corresponder a las células tipo B de la ECZSV.

Finalmente, en el presente trabajo, se observaron astrocitos fuertemente asociados a la superficie de vasos sanguíneos. Xu y Ling en 1994, obtuvieron resultados similares, donde la morfología de las células GFAP<sup>+</sup> se hacía más compleja conforme avanzaba el desarrollo. Adicionalmente, encontraron que el número de astrocitos asociados a la superficie de los vasos del cuerpo calloso incrementaba durante el desarrollo postnatal, sugiriendo, que estas células están involucradas en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica, mediante el control del flujo de sangre, induciendo vasoconstricción o vasodilatación (Xu y Ling, 1994; Rajkowska e Hidalgo, 2007). Por otra parte, algunos investigadores han propuesto la participación de la vasculatura en la migración, supervivencia y diferenciación en progenitores neurales del cerebro adulto (revisado por Cayre y col., 2009). Han visto que células endoteliales activadas secretan metaloproteasas las cuales clivan moléculas de la matriz extracelular, facilitando así la migración de progenitores. La inhibición de estas metaloproteasas, impide la migración radial en neonatos y adultos, sugiriendo que son importantes para la migración celular individual (revisado por Cayre y col., 2009).

En conclusión el presente trabajo, aporta evidencias a favor del papel de la ECZSV en la formación de astrocitos e ilustra la gran diversidad de astrocitos que existen y sus múltiples funciones, así se pudo observar la formación de astrocitos fibrosos ubicados en el cuerpo calloso, de astrocitos asociados a los vasos sanguíneos y que desempeñan funciones relacionadas con el mantenimiento de la barrera hematoencefálica y finalmente de astrocitos que persisten en la ECZSV y que pudiesen corresponder a la célula tipo B de esta zona neurogénica.

### **c) *Expresión de NG2***

En el presente trabajo se utilizó el marcador NG2, ya que este permite identificar progenitores de oligodendrocitos. NG2 es un proteoglicano cuya función se ha visto en la migración de dichos progenitores (revisado por Cayre y col., 2009).

Se encontraron células NG2<sup>+</sup> en la ECZSV y en la ZI, cuya densidad aumentó en función del desarrollo, alcanzando un máximo alrededor de P12 (Fig. 54). Posteriormente, la expresión de NG2 disminuyó y no pudo observarse en P21. Los resultados encontrados son similares a los reportados por otros grupos, en particular Niehaus y colaboradores (1999) quienes observaron que la expresión de NG2 se iniciaba a los 13 días embrionarios, con un pico entre P8 y P12, a partir del cual comenzaba a disminuir gradualmente (revisado por Karram y col., 2005).

En general el patrón espacio temporal de la expresión de NG2 que se obtuvo sugiere que en este período de desarrollo postnatal ocurre una importante producción de oligodendrocitos muy probablemente a partir de progenitores neurales ubicados en la ECZSV. Estas observaciones coinciden con los resultados de Levison y Goldman (1993) y Suzuki y Goldman (2003) quienes demostraron la producción de progenitores de oligodendrocitos a partir de la ECZSV los cuales migran hacia el cuerpo calloso y se diferencian en oligodendrocitos. Incluso, se ha reportado, que a partir de células aisladas de la ECZSV de adulto se forman oligodendrocitos (Seri y col., 2006), lo que indica que después del desarrollo, la ECZSV preserva la capacidad de producir células gliales.

Con respecto al papel de la ECZSV en la producción de células gliales es importante mencionar también que, al igual que para los astrocitos, se ha reportado que los oligodendrocitos de la neocorteza y de la sustancia blanca, se originan a partir de la glía radial, durante etapas tempranas del desarrollo postnatal (Ventura y Goldman, 2007; revisado por Cayre y col., 2009). Los patrones espacio-temporales de la expresión de nestina y de NG2 son congruentes con esta idea.

Es importante destacar igualmente que la mayor densidad de células NG2<sup>+</sup>, correspondiente a una mayor producción de progenitores de oligodendrocitos, se encontró entre P4 y P12, lo cual coincide con el período en el cual ocurre activamente el proceso de mielinización (revisado por Morgane y col., 2002) (Fig. 54).

Es interesante mencionar que en los resultados obtenidos se observaron células NG2<sup>+</sup> en la ZI que presentaban morfología bipolar (Fig. 36). Se ha visto que los oligodendrocitos en sus primeras etapas de desarrollo presentan una morfología monopolar, y cuando inician la etapa de migración, éstos adoptan una morfología bipolar e incluso tripolar; caracterizándose por presentar marcadores específicos como NG2, vimentina, nestina, entre otros (revisado por Bribián y de Castro, 2007). La expresión de NG2 podría estar implicada en los procesos de migración de los progenitores oligodendrocitarios. Algunos estudios han mostrado que moléculas como las integrinas y el condroitin sulfato glicosaminoglicano interactúan con NG2, generando una cascada de señalización y fosforilación de proteínas intracelulares y citoesqueléticas, ocasionando la reorganización del citoesqueleto y movilidad de la célula (revisado por Karram y col., 2005).

Finalmente, se observó un fuerte marcaje para NG2 en los endotelios vasculares, tanto en la ECZSV, como en la ZI en P1 y P4. Este inmunomarcaje corresponde a células denominadas pericitos o periendoteliales, que se encuentran en la membrana de los capilares o vénulas post-capilares. Estas células son contráctiles, por lo que ayudan a estabilizar las paredes de los vasos y a regular el flujo sanguíneo. También se le han atribuido funciones en la permeabilidad endotelial, proliferación, supervivencia, migración y maduración de las células endoteliales (revisado por Shepro y Morel, 1993; revisado por Bergers y Song, 2005).

En conclusión, se observó un patrón de expresión de NG2 que sugiere una producción de progenitores de oligodendrocitos por parte de la ECZSV la cual sigue un patrón espacio-temporal coherente con el intenso proceso de mielinización que ocurre durante las dos primeras semanas de vida postnatal.

### **3. Expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en la extensión caudal de la zona subventricular e identificación de las células migratorias 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> a distintos estadios del desarrollo postnatal**

#### ***a) Estandarización del protocolo de inmunofluorescencia para el marcaje de la 3 $\alpha$ -HSOR***

En el presente trabajo se realizó, en un primer tiempo, un estudio de los cambios estructurales generales de la ECZSV durante el desarrollo postnatal. Posteriormente, se estudió el patrón de expresión de algunos marcadores celulares de interés, a saber nestina que permite identificar la glía radial, GFAP que identifica a los astrocitos y finalmente NG2 que identifica a los progenitores de oligodendrocitos. Con los resultados obtenidos hemos aumentado nuestro conocimiento sobre esta extensa zona germinal. Finalmente, y con el objetivo de empezar a conocer aquellos factores o señales que regulan la neurogénesis en esta zona, se estudió, durante el desarrollo postnatal, la expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR, enzima responsable de la síntesis del neuroesteroides 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP o alopregnenolona.

Se realizó este último objetivo mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo policlonal realizado en colaboración con la Dra. Yelitza Campos y el Dr. Walter Mosca del Laboratorio de Fisiopatología del Instituto de Biomedicina y de la Escuela de Medicina J.M.Vargas de la Facultad de Medicina de la UCV. Para ello, se diseñaron dos péptidos sintéticos que corresponden a regiones antigénicas de la 3 $\alpha$ -HSOR mediante el empleo de métodos bioinformáticos, para luego utilizarlos como inmunógenos en la generación de anticuerpos policlonales en conejo. La especificidad de ambos sueros fue probada por inmunodot encontrando resultados satisfactorios sólo para uno de ellos con el cual proseguimos el trabajo. El anticuerpo, así obtenido fue probado en inmunofluorescencia, primero en un tejido en donde se sabe existe una fuerte expresión de la enzima, como es el hígado y luego en el cerebro. Los resultados obtenidos muestran que este anticuerpo puede ser utilizado en inmunofluorescencia pero únicamente en cortes flotantes. Esto representa para el laboratorio una herramienta de trabajo muy valiosa debido a que no existe en el comercio ningún anticuerpo contra la 3 $\alpha$ -HSOR. Existe sin embargo, otro anticuerpo contra esta enzima realizado por el grupo del Dr. Trevor Penning del Departamento de Farmacología de la Universidad de Pensilvania, USA, el cual fue realizado utilizando la enzima purificada de hígado de rata (Penning y col., 1984; Smithgall y Penning, 1988). Gracias a una colaboración con el Dr. Guy Mensah-Nyagan de la Universidad de Louis Pasteur de Estrasburgo, Francia, obtuvimos una pequeña cantidad del mismo con el que pudimos realizar otros trabajos previos (Gago y col., manuscrito en preparación; Alcalá y

col., 2012). En términos generales, los resultados obtenidos con nuestro anticuerpo son muy similares a los obtenidos con el anticuerpo del Dr. Penning.

**b) *3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP y proliferación celular***

En el presente trabajo se observó que la expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en la ECZSV, aumenta de P1 a P4, se mantiene similar de P4 a P12 y posteriormente decae (Fig. 54). Además, se observó que las células que se originan a partir de la ECZSV y que conforman cadenas que penetran en el cuerpo calloso son fuertemente inmunopositivas para la enzima. El marcaje obtenido se observó tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear, tanto en la ECZSV, como en ZI.

Por otra parte, se observó que las células que conforman la ZI, disminuyen en número conforme avanza el desarrollo postnatal, debido a la disminución del número de células migratorias con el desarrollo (Fig. 54).

La expresión de la enzima fue homogénea a todo lo largo de la ECZSV. El patrón de la expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR durante el desarrollo postnatal en la ECZSV, coincide con la dinámica espacio-temporal de la proliferación celular en zonas neurogénicas como la ZSV y la VMR. En estas zonas, la proliferación aumenta gradualmente hasta que alcanza un máximo en P12 y luego disminuye sin desaparecer hasta la etapa adulta (Faiz y col., 2005). Estos resultados sugieren que la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP pudiese modular la proliferación de las células presentes en la ECZSV, durante el desarrollo postnatal.

A favor de este posible efecto de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP sobre la proliferación celular, existen evidencias directas y evidencias indirectas. En este último caso lo que se demuestra es un efecto del GABA vía receptores GABA<sub>A</sub> sobre la proliferación celular y al ser el receptor GABA<sub>A</sub> el único mecanismo de acción descrito hasta el momento para la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP, entonces potencialmente este neuroesteroide pudiese modular el efecto mediado por el GABA.

En efecto, se ha descrito que los PN de la ZSV y de la VMR son despolarizados por el GABA vía receptores GABA<sub>A</sub> (Wang y col., 2003; revisado por Ben-Ari y col., 2007; Ganguly y col., 2001) y que estas señales GABAérgicas tienen efectos regulatorios en la proliferación de PN. Adicionalmente, se describió la expresión de distintas subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en progenitores PSA-NCAM<sup>+</sup> aislados de cerebro de rata recién nacida, y se demostró que el GABA incrementa la proliferación de estas células de manera dosis dependiente y de forma específica vía receptores GABA<sub>A</sub> (Gago y col., 2004). De igual forma se ha demostrado que el GABA es capaz de disminuir la proliferación de neuroblastos y de astrocitos de la ZSV de rata adulta (revisado por Bordey, 2006). En efecto, como los neuroblastos se originan a partir de células GFAP<sup>+</sup> en la ZSV, el GABA liberado por los neuroblastos, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, controla la proliferación de progenitores GFAP<sup>+</sup> vía receptores GABA<sub>A</sub> (Liu y col., 2005).

Con respecto a las evidencias directas, Gago y colaboradores (2004) reportaron que la  $3\alpha,5\alpha$ -THP era capaz de estimular *in vitro* la proliferación celular de progenitores PSA-NCAM<sup>+</sup> aislados de cerebro de rata recién nacida, y que este efecto era abolido en presencia de bicuculina indicando que se encontraba mediado por el receptor GABA<sub>A</sub>. Por otro lado, Wang y colaboradores en 2005, mostraron que la  $3\alpha,5\alpha$ -THP, actuando también vía receptores GABA<sub>A</sub>, estimulaba la proliferación de PN aislados de hipocampo de rata y de CMN derivadas de corteza cerebral de humano.

En conclusión, el conjunto de estas evidencias muestran que el GABA es capaz de regular la proliferación de CMN y PN vía el receptor GABA<sub>A</sub> y que la  $3\alpha,5\alpha$ -THP puede actuar como un factor modulador de estos efectos

### c) *3 $\alpha,5\alpha$ -THP y migración celular*

Desde P1 hasta P12 se observó una gran cantidad de células migratorias  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> que conforman cadenas que surgen de la ECZSV, y que se disponen perpendicularmente con respecto a dicha zona (Figs. 39 y 40). Se ha visto que los progenitores que se originan a partir de esta región, migran hacia el cuerpo caloso y la corteza (Suzuki y Goldman, 2003), donde se diferencian en oligodendrocitos (Seri y col., 2006; Levison y col., 1993) y en astrocitos maduros (Seri y col., 2006; Ventura y Goldman, 2007). Los resultados obtenidos para el doble marcaje de nestina/ $3\alpha$ -HSOR son evidencia de que la ECZSV es una fuente importante de PN durante el desarrollo postnatal; observándose una alta densidad de progenitores migratorios  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> en la ZI en las primeras edades postnatales la cual disminuye conforme avanza el desarrollo, lo que sugiere que estos progenitores se van diferenciando y comprometiendo hacia distintos linajes celulares.

A partir de los resultados obtenidos con el doble marcaje de nestina/ $3\alpha$ -HSOR, se puede plantear, para los progenitores  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup>, los tres tipos de migración que fueron mencionados anteriormente (sección Discusión, punto 2):

Caso 1: locomoción guiada por fibras gliales. En efecto, los progenitores  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> parecieran migrar utilizando como soporte la fibras nestina<sup>+</sup>.

Caso 2: translocación del soma. En efecto en P1 los progenitores  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> presentan prolongaciones relativamente largas dispuestas radialmente las cuales retraen en P4 en donde se observan prácticamente como células esféricas.

Caso 3: mecanismo de células ramificadas (*branching cells*). Esto pareciera ocurrir sobre todo en P1, en donde los progenitores  $3\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> presentan efectivamente prolongaciones claramente ramificadas.

En el primer caso, podría tratarse de la conocida migración radial, donde el soma de la glía radial se encuentra en la ECZSV, y a su vez, extiende una prolongación o fibra hacia la superficie pial,

sirviendo de soporte a los PN en los procesos de migración hacia la neocorteza y cuerpo calloso (Bonfanti y Peretto, 2007). En el segundo caso, se trataría de un proceso de translocación del soma similar al descrito para la glía radial, en donde la glía radial de la ECZSV emite una larga prolongación hacia la superficie pial, y el soma celular avanza hacia la superficie pial (revisado por Nadarajah y col., 2003; revisado por Nadarajah, 2003). Finalmente el tercer caso, podría tratarse de progenitores que presentan prolongaciones, las cuales se extienden y retraen, y en ocasiones ramificándose, presentando un comportamiento exploratorio, como si respondieran a señales de atracción y repulsión del ambiente (revisado por Cayre y col., 2009; revisado por Nadarajah y col., 2003). Además, se ha visto que entre los 13 y 16 días embrionarios, este tipo de migración se encuentra presente en la ZI (O'Rourke y col., 1992).

Es interesante mencionar nuevamente que las células nestina<sup>+</sup> observadas en la ECZSV podrían corresponder a la glía radial, las cuales serían las CMN de esta zona. La glía radial presenta divisiones asimétricas, generando tanto neuronas y progenitores neurales intermedios. También, a partir de la glía radial se generan oligodendrocitos, astrocitos, células ependimales y células tipo B. Estas últimas, continúan funcionando como CMN en el adulto (revisado por Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009; revisado por Rakic, 2007).

La fuerte expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en los progenitores de la ECZSV y de la ZI, y la existencia de prolongaciones celulares que coexpresan tanto la 3 $\alpha$ -HSOR como nestina (Figs. 41, 42, 44) sugiere un posible papel de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP en los procesos de migración de los progenitores originados desde la ECZSV. Aunque no se disponen de evidencias directas sobre el papel de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP sobre la migración celular, se ha descrito sin embargo que el GABA es capaz de ejercer efectos de este tipo. En efecto, se ha reportado que, en edades postnatales, en la VMR y en la ZSV, el GABA liberado por los neuroblastos disminuye la velocidad de migración de los mismos (Bolteus y Bordey, 2004). Existen evidencias de que el GABA puede modular la migración de las células corticales en las últimas etapas del desarrollo embrionario, donde el GABA, sintetizado por células de las diferentes capas de la corteza en desarrollo, actúa como un quimioatrayente hacia los sitios de destino hacia donde se dirigen los neuroblastos migratorios (Behar y col., 1996). Adicionalmente, se ha reportado un efecto regulador del GABA en el crecimiento de las prolongaciones neuronales (Maric y col., 2001).

#### **d) 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP y astrocitos**

Se observó que la mayoría de las células GFAP<sup>+</sup> observadas, son 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> y que éstas incrementan en función del desarrollo. Adicionalmente, se encontraron grandes cambios morfológicos en estas células, pasando de células redondas y sencillas a células con morfología estrellada (Figs. 46G, 46K). Lo que sugiere un papel de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP en los procesos de maduración, diferenciación y migración de células astrogiales.

Diversas observaciones han demostrado que las células astrogliales expresan el receptor GABA<sub>A</sub>. Además, se ha reportado que las señales GABAérgicas pueden modular la organización morfológica de astrocitos inmaduros en el cerebro adulto, así como la expresión de GFAP (revisado por Magnaghi; 2007). Esto sugiere que la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP, al actuar vía receptores GABA<sub>A</sub>, también podría modular la expresión de GFAP y otros aspectos de la biología de los astrocitos, como los cambios morfológicos, proliferación y migración. De hecho, los astrocitos son considerados células blanco de algunos neuroesteroides como la 5 $\alpha$ -DHP y la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP, los cuales son capaces de influir en la expresión de GFAP. Por ejemplo, se ha visto que la expresión de los genes que codifican para este marcador, disminuye debido al efecto de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP (Melcangi y col., 1996).

La ECZSV constituye entonces una fuente importante de células gliales para el cuerpo caloso y la corteza durante el desarrollo postnatal en condiciones fisiológicas normales. Por su parte, la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP podría desempeñar un papel importante en el control de la proliferación, migración y diferenciación de PN, progenitores oligodendrocitarios y astrocitos.

**e) 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP y mielinización**

Con respecto a los resultados obtenidos para el doble marcaje de NG2/3 $\alpha$ -HSOR, se observaron células inmunopositivas para ambos marcadores principalmente en la ZI desde P1 hasta P12, cuya cantidad aumentó en función del desarrollo (Figs. 50, 51, 54). Se ha reportado que después de P14, la mayoría de los PN que se originan de la ECZSV permanecen sólo en el cuerpo caloso donde se diferencian en oligodendrocitos (Levison y col., 1993). Debido a esto, es probable que las pequeñas células 3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> observadas en el cuerpo caloso en P15 y P21 correspondan a un estadio de oligodendrocitos más maduro que el de las células NG2<sup>+</sup>/3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> (progenitores de oligodendrocitos) observadas desde P1 hasta P12. Adicionalmente, pareciera que todas las células NG2<sup>+</sup> expresan la enzima, por lo que ésta podría participar en el control de los procesos de diferenciación y maduración de las células del linaje oligodendrocitario, así como en la migración de los mismos. En efecto, 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, la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP podría ejercer un efecto, no sólo en la producción de oligodendrocitos, sino también en los procesos de mielinización, ya que la presencia de células NG2<sup>+</sup>/3 $\alpha$ -HSOR<sup>+</sup> encontradas en la ZI, se observó durante el período en el que ocurre principalmente el proceso de mielinización (P4 a P12) (revisado por Morgane y col., 2002). De hecho se ha demostrado que la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP estimula la producción de mielina por parte de las células de Schwann de los nervios periféricos, mediante la activación de los genes que codifican para varias de las proteínas de la mielina (revisado por Schumacher y col., 2012). También se ha reportado este efecto de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP en células aisladas de cerebelo de rata y ratón (Ghoumari y col., 2003; revisado por Schumacher y col., 2012). La 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -

THP ejerce este efecto actuando vía receptores GABA<sub>A</sub>, debido a que se vio contrarrestado por la bicuculina (Ghoumari y col., 2003).

Por otro lado, es interesante mencionar que existen evidencias de la presencia de receptores GABA<sub>A</sub> en células NG2<sup>+</sup> del hipocampo de la sustancia gris y blanca, lo que sugiere un posible papel de este aminoácido en el control de la proliferación y división de los progenitores oligodendrocitarios (revisado por Polito y Reynolds, 2005; revisado por Gallo y col., 2008). En efecto, se ha reportado que las señales GABAérgicas estimulan la migración de progenitores de oligodendrocitos (revisado por Trotter y col., 2009). Estas evidencias sugieren que la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP pudiera participar en la modulación de varios aspectos de la biología de los progenitores oligodendrocitarios.

#### *f) ECZSV y regeneración del SNC*

Es interesante mencionar que la ECZSV puede constituir una fuente de células nerviosas también en condiciones patológicas. Por ejemplo, se ha establecido que la ECZSV constituye una fuente de nuevas neuronas que ayudan a reparar la zona CA1 del hipocampo, después de una lesión isquémica (Nakatomi y col., 2002). Observaciones similares han sido reportadas por Parent y colaboradores (2006) donde utilizando un modelo de epilepsia inducida por la administración de pilocarpina observaron un aumento de la gliogénesis en la ECZSV de cerebro de rata adulta. Este modelo de epilepsia causa la muerte de neuronas hipocampales, y estos investigadores reportaron que las células gliales recién formadas en la ECZSV eran atraídas hacia las zonas lesionadas del hipocampo. En estudios realizados por White y colaboradores (2010) también se observó la capacidad de la ECZSV para generar nuevas células gliales luego de una lesión cerebral. Estos investigadores reportaron que la señalización dependiente de  $\beta$ -catenina, la cual influye en la proliferación y diferenciación de varias poblaciones de CMN y PN, se ve incrementada en células NG2<sup>+</sup> y en astrocitos de la corteza y de la ECZSV (White y col., 2010). Estas observaciones sugieren una participación de la ECZSV en respuestas de regeneración del SNC.

Por otra parte, se ha visto que en el cerebro adulto, los progenitores de oligodendrocitos no migran, pero se diferencian en oligodendrocitos mielinizantes, sustituyendo a aquellos que van muriendo (revisado por Cayre y col., 2009). Sin embargo, se ha visto que la proliferación, migración y diferenciación de éstos, se ve estimulada en modelos de desmielinización, donde los progenitores de oligodendrocitos migran hacia el sitio de la lesión, reemplazan a los oligodendrocitos perdidos e inician un proceso de remielinización. Estas observaciones se han realizado tanto en cerebro de rata (Tanaka y col., 2003; Gensert y Goldman, 1997; Levine y Reynolds, 1999) como en médula espinal (Watanabe y col., 2002). Resultados similares fueron observados en ratones a los que se les indujo una encefalomiелitis experimental autoinmune que es un modelo animal experimental de esclerosis múltiple (Picard-Riera y col., 2002). Con este modelo, se vio estimulada la proliferación y migración de

progenitores neurales, astrocitos y progenitores de oligodendrocitos, los cuales migraron hacia los BO y la sustancia blanca. Esto se interpreta como una respuesta del sistema que trata de restituir las neuronas perdidas.

Otros estudios han mostrado que después de una lesión desmielinizante en el cuerpo calloso aumenta la proliferación de células ubicadas en la ZSV y en la vía de migración rostral. Además, progenitores PSA-NCAM<sup>+</sup> de la ZSV que normalmente están destinados a transformarse en neuronas en los BO, se desvían de su ruta normal y penetran en la lesión en donde se diferencian en oligodendrocitos y astrocitos (Nait-Ousmesmar y col., 1999). Gonzalez-Martinez y colaboradores en 2007, por su parte mostraron que en cortes de cerebro de pacientes epilépticos, se veía estimulada la proliferación, diferenciación neuronal y la migración hacia la sustancia blanca y la corteza, de las células de la ZSV. Sería interesante explorar la respuesta de la ECZSV luego de una lesión desmielinizante y de evaluar el posible papel de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP.

El conjunto de todos estos estudios y los resultados del presente trabajo, son evidencia de que la ECZSV es una fuente importante de progenitores y de células gliales tanto en condiciones normales, como en condiciones patológicas. Además, la amplia expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en la ECZSV y en la ZI, aporta evidencias anatómicas de un posible efecto autocrino/paracrino de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP en la proliferación, migración y/o diferenciación de las células gliales, así como en la mielinización. Estudios de este tipo permiten ampliar nuestros conocimientos sobre la neurogénesis y los factores que la modulan y potencialmente pudiesen contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a mejorar la regeneración del SNC.

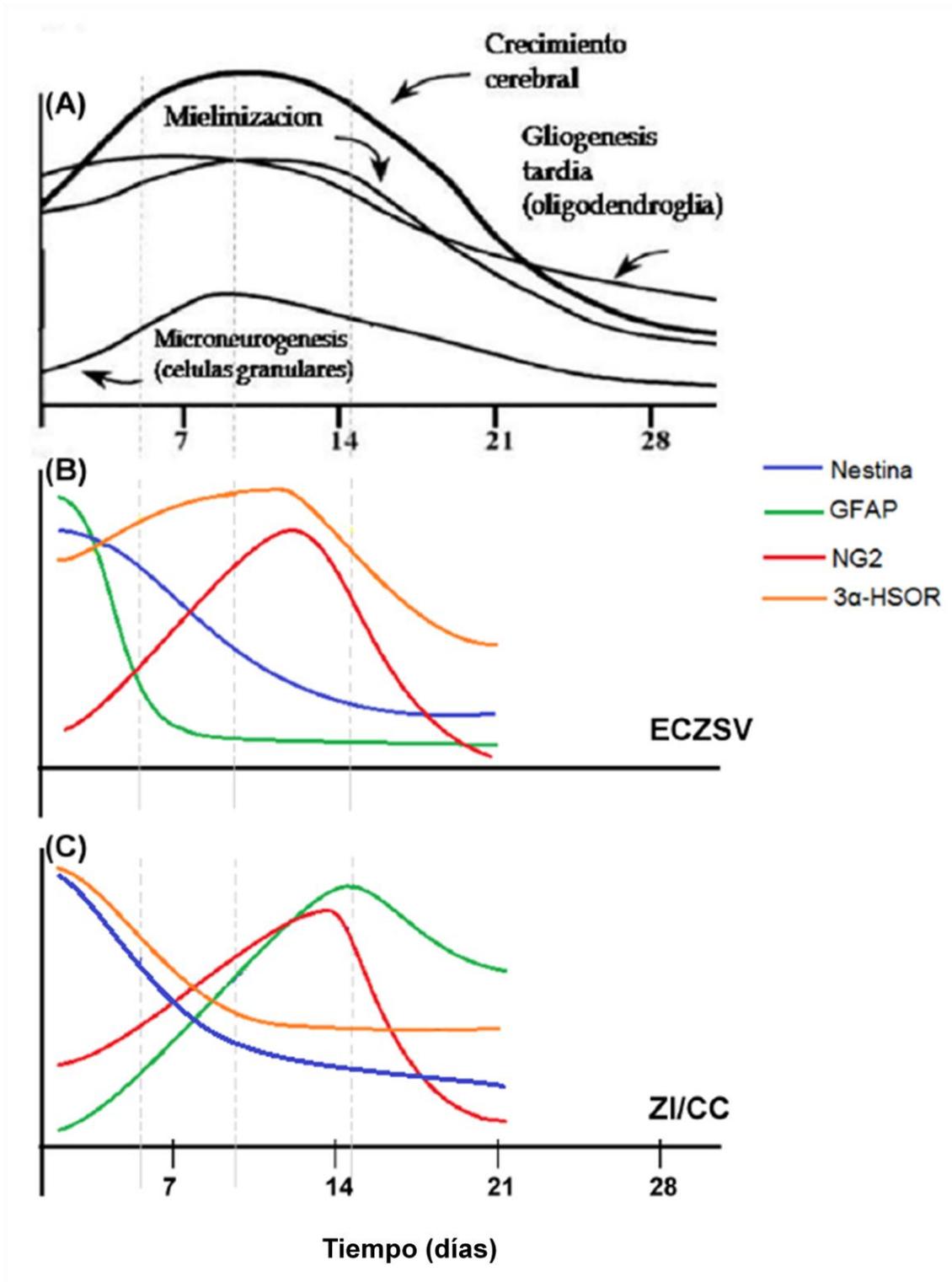


Figura 54. (A) Representación esquemática que muestra la variación de los eventos que ocurren durante el desarrollo postnatal conforme éste avanza (modificado de Morgane y col., 2002). (B) Variación cualitativa de la expresión de Nestina, GFAP, NG2 y 3α-HSOR en la ECZSV. (C) Variación cualitativa de la expresión de Nestina, GFAP, NG2 y 3α-HSOR en la Zona intermedia (ZI).

**Figura 54. (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 Nestina, GFAP, NG2 y 3 $\alpha$ -HSOR en la ECZSV. (C) Variación cualitativa de la expresión de Nestina, GFAP, NG2 y 3 $\alpha$ -HSOR en la Zona intermedia (ZI).** La expresión de nestina en la primera semana postnatal es considerablemente alta en la ECZSV y ZI, donde se produce la mayor cantidad de oligodendrocitos (comparar con A). Luego, disminuye en función del desarrollo. GFAP presenta una expresión considerablemente alta en la ECZSV en P1 y P4, luego disminuye drásticamente hasta desaparecer por completo. En la ZI, la expresión de GFAP incrementa a medida que el desarrollo avanza, presentando un máximo cerca de P12. Esto sugiere que la ECZSV participa en la producción de astrocitos en los estadios tempranos del desarrollo postnatal. La expresión de NG2 es similar en ambas regiones. Ésta incrementa conforme avanza el desarrollo, y presenta un máximo entre P12 y P14. Posteriormente, la expresión de NG2 desaparece completamente. Esto coincide con el proceso de mielinización (comparar con A). En la ZI, se observa como el aumento de astrocitos GFAP<sup>+</sup> se correlaciona con la disminución de la expresión de nestina, lo que sugiere la diferenciación de algunos progenitores nestina<sup>+</sup> en células astrogiales. Lo mismo sucede con la expresión de NG2 y nestina. Finalmente, la expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en la ECZSV incrementa en los primeros días postnatales y alcanza un máximo en P12, donde se produce la mayor cantidad de oligodendrocitos (comparar con A). Luego, comienza a disminuir paulatinamente sin desaparecer por completo. En la ZI, la enzima presenta una expresión considerablemente alta en los primeros días postnatales y luego comienza a disminuir, en concordancia con la disminución de células migratorias. La expresión de 3 $\alpha$ -HSOR siguiendo un patrón espacio-temporal definido, así como de los otros marcadores, sugiere que la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP pudiese participar en el control los distintos procesos que ocurren durante el desarrollo, como la producción de células gliales (oligodendrocitos y astrocitos), la migración y la mielinización.

## CONCLUSIONES

En general, el estudio del desarrollo postnatal de la ECZSV del cerebro de rata proporcionó evidencias de que esta zona germinal constituye una fuente importante de progenitores y de células gliales para el cuerpo calloso y la corteza. Por otra parte, la amplia expresión de la 3 $\alpha$ -HSOR en la ECZSV y en la ZI, aporta evidencias anatómicas de un posible papel de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP en la proliferación, migración y/o diferenciación de las células gliales, así como en el proceso de mielinización. Estudios de este tipo permiten ampliar nuestro conocimiento sobre la neurogénesis y los factores que la modulan y potencialmente pudiesen contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a mejorar la regeneración del SNC.

Entre las conclusiones más relevantes de este trabajo podemos mencionar:

- Ocurren grandes cambios morfológicos de la ECZSV durante el desarrollo postnatal siguiendo un patrón espacio-temporal definido: el espesor de la ECZSV y la densidad de células migratorias en la ZI disminuyen a medida que el desarrollo avanza. Esto sugiere que ocurre la salida de células de la ECZSV y su migración a través de la ZI hasta llegar al sitio de destino.
- La expresión de nestina en la ECZSV y en la ZI es considerablemente alta en la primera semana postnatal y luego disminuye. Esto es evidencia de que esta estructura es una zona dinámica y mitóticamente activa, y una fuente de progenitores para nuevas células nerviosas.
- En P1, se observa una alta densidad de fibras nestina<sup>+</sup> en la ZI organizadas radialmente, lo que sugiere que participan en procesos de migración tipo glía radial.
- En la ECZSV, la expresión de GFAP es considerablemente alta en P1 y P4, luego disminuye drásticamente hasta desaparecer por completo.
- En la ZI, la expresión de GFAP incrementa en función del desarrollo, presentando un máximo cerca de P12 y la morfología de los astrocitos en la ZI se va haciendo más compleja.
- El patrón espacio-temporal de la expresión de GFAP durante el desarrollo postnatal, sugiere que ocurre una producción de astrocitos a partir de la ECZSV, que migran a la ZI y que se diferencian.
- La expresión de NG2 incrementa en la ECZSV y en la ZI conforme avanza el desarrollo y presenta un máximo entre P12 y P14. Luego, la expresión de NG2 desaparece completamente.
- El patrón espacio-temporal de la expresión de NG2 durante el desarrollo postnatal, indica que ocurre un pico en la producción de progenitores de oligodendrocitos en el momento en que ocurre el proceso de mielinización.

- La  $3\alpha$ -HSOR se expresa ampliamente en la ECZSV y en la ZI durante el desarrollo postnatal, siguiendo un patrón espacio-temporal definido.
- La expresión de la  $3\alpha$ -HSOR en la ECZSV incrementa en los primeros días postnatales, alcanzando un máximo en P12 y posteriormente disminuye.
- Las células migratorias que se originan de la ECZSV y que penetran en el cuerpo calloso son fuertemente inmunopositivas para la  $3\alpha$ -HSOR y se encuentran en estrecha relación con las fibras radiales nestina<sup>+</sup>, lo que sugiere un posible papel de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP en el control de la migración de estos progenitores.
- La expresión de la  $3\alpha$ -HSOR en la ECZSV y en los progenitores migratorios y células gliales de la ZI constituye una evidencia anatómica sobre el posible papel de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP en el control de la biología de las CMN y de los progenitores gliales *in vivo* durante el desarrollo postnatal.

## PERSPECTIVAS

El presente trabajo ha permitido conocer los diferentes cambios de la ECZSV del cerebro de rata durante el desarrollo postnatal con lo cual se pudo observar que esta zona es altamente dinámica y presenta grandes cambios morfológicos. También se pudo observar que tanto la ECZSV como la ZI asociada a ésta, presentan una importante expresión de la  $3\alpha$ -HSOR, de nestina, de GFAP y de NG2, siguiendo un patrón espacio-temporal definido. En términos generales, el presente trabajo aporta evidencias anatómicas del papel de la ECZSV como fuente de células gliales para el cuerpo calloso y la corteza, y por otra parte del posible papel de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP en la biología de las CMN y PN.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren muchas perspectivas de investigación, sin embargo los aspectos que nos parecen más interesantes son:

- establecer el o los modos de migración de los progenitores gliales producidos a partir de la ECZSV durante el período postnatal y determinar si la  $3\alpha,5\alpha$ -THP modula estos procesos de migración.
- evaluar el efecto de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP en otros aspectos de la biología de los progenitores migratorios, en particular la proliferación celular, la supervivencia y la diferenciación.
- estudiar el posible papel de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP en los procesos de mielinización y de remielinización del SNC. En este sentido, sería interesante evaluar la respuesta de la ECZSV luego de una lesión desmielinizante y de establecer el posible papel de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP.

En términos generales, los resultados obtenidos abren un campo muy amplio de investigación, orientado a conocer el papel de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP en la biología de los progenitores gliales, específicamente en el control de la proliferación, la migración, la supervivencia y la diferenciación de estas células, así como el papel que ejerce este neuroesteroide en los procesos de mielinización y remielinización del SNC.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcalá K. 2009. Distribución de la 3 $\alpha$ -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. Tesis de licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Altman J., Das G.D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampus neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* **124**: 319-336.
- Alvarez-Buylla A., García-Verdugo J.M. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* **22** (3): 629-634.
- Alvarez-Buylla A., Lim D. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* **41**: 683-686.
- Alvarez-Buylla A., Seri B., Doetsch F. 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain res bull.* **57**: 751-758.
- Alvarez-Buylla A., Temple S. 1998. Stem cells in the developing and adult nervous system. *Neural stem cell.* **36**: 105-110.
- Barker J.L., Behar T., Li Y.-X., Liu Q.-Y., Ma W., Maric D., Maric I., Schaffner A.E., Serafini R., Smith S.V., Somogyi R., Vautrin J.Y., Wen X.-L., Xian H. 1998. GABAergic cells and signals in CNS development. *Persp. Dev. Neurobiol.* **5**: 305-322.
- Behar T.N., Schaffner A.E., Scott C.A., Greene C.L., Barker J.L. 2000. GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb. Cortex.* **10**: 899-909.
- Behar T.N., Li Y.X., Tran H.T., Ma W., Dunlap V., Scott C., Barker J.L. 1996. GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci.* **16**: 1808-18.
- Ben-Ari Y., Gaiarsa J., Tyzio R., Khazipov R. 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev.* **87**: 1215-1284.
- Bergers G., Song S. 2005. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* **7**(4): 452-464.
- Bolteus A.J., Bordey A. 2004. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J. Neurosci.* **24**: 7623-7631.
- Bonfanti L., Peretto P. 2007. Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Prog. Neurobiol.* **83**: 24-36.
- Bordey A. 2006. Adult neurogenesis. Basic concepts of signaling. *Cell Cycle.* **5**: 722-728.
- Bowery N.G., Enna S.J. 2000.  $\gamma$ -Aminobutyric acid<sub>B</sub> receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* **292**: 2-7.
- Bribián A., de Castro F. 2007. Oligodendrocitos: origen embrionario, migración e implicaciones terapéuticas. *Rev Neurol.* **45**(9): 535-546.
- Brinton R.D., Thompson R.F., Foy M.R., Baudry M., Wang J., Finch C.E., Morgan T.E., Pike C.J., Mack W.J., Stanczyk F.Z., Nilsen J. 2008. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front. Neuroendocrinol.* **29**: 313-339.

- Cayre M., Canoll P., Goldman J.E. 2009. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol.* **88** (1): 41-63.
- 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.
- Chew L.J., Gallo V. 1998. Regulation of ion channel expression in neural cells by hormones and growth factors. *Mol Neurobiol.* **18**: 175-467.
- Daval J.L., Pourie G., Grojean S., Lievre V., Strazielle C., Blaise S., Vert P. 2004. Neonatal hypoxia triggers transient apoptosis followed by neurogenesis in the rat CA1 hippocampus. *Pediatr. Res.* **55**: 561-567.
- 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.
- Doetsch F., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. 1999. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 11619-11624.
- Duprey P., Paulin D. 1995. What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *Int J Dev Biol.* **39**: 443-457.
- 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. Vassel, Pp. 15-59.
- 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.
- Felling R.J., Levison S.W. 2003. Enhanced neurogenesis following stroke. *J Neurosci Res.* **73**: 277-283.
- Gago N., Akwa Y., Sananès N., Guennoun R., Baulieu E.E., 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 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -Tetrahydroprogesterone (Allopregnanolone) and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid: Autocrine/Paracrine Interactions in the control of neonatal PSA-NCAM<sup>+</sup> progenitor proliferation. *J. Neurosci. Res.* **78**: 770-783.
- Gago, N., Mensah-Nyagan A.G., Guerrero, H., Cardillo, E., Marcano, D., Schumacher, M. Expression of the 3 $\alpha$ -hydroxysteroid oxidoreductase, enzyme responsible for 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroprogesterone synthesis, in neurogenic zones of the adult rat brain. *Manuscrito en preparación.*
- Galli R., Gritti A., Bonfanti L., Vescovi A.L. 2003. Neural stem cells: an overview. *Circ Res.* **92**: 598-608.
- Gallo V., Mangin J.M., Kukley M., Dietrich D. 2008. Synapses on NG2-expressing progenitors in the brain: multiple functions?. *J Physiol.* **586**: 3767-3781.

- Ganguly K., Schnider A.F., Wong S.T., Poo M. 2001. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*. **105**: 521-532.
- Ge S., Pradhan D.A., Ming G., Song H. 2006. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends neurosci*. **30**: 1-8.
- Gensert J.M., Goldman J.E. 1997. Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron*. **19**: 197-203.
- Ghoumari A.M., Ibanez C., El-Etr M., Leclerc P., Eychenne B., O'Malley B.W., Baulieu E.E., Schumacher M. 2003. Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice culture of rat cerebellum. *J. Neurochem*. **86**: 848-859.
- Ghoumari A.M., Baulieu E.-E., Schumacher M. 2005. Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neurosci*. **135**: 47-58.
- Goldman J.E. 1995. Lineage, migration, and fate determination of postnatal subventricular zone cells in the mammalian CNS. *J Neurosci*. **24**: 61-64
- Goldman J.E., Zerlin M., Newman S., Zhang L., Gensert J. 1997. Fate determination and migration of progenitors in the postnatal mammalian CNS. *Dev Neurosci*. **19**: 42-48.
- González-Martínez J.A., Bingaman, W.E., Toms, S.A., Najm, I.M. 2007. Neurogenesis in the postnatal human epileptic brain. *J Neurosurg*. **107** (3): 628-635.
- Gould E. 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals?. *Nat rev neurosci*. **8**: 481-488.
- Hagg T. 2005. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci*. **28**: 589-595.
- Haubensak W., Attardo A., Denk W., Huttner W.B. 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**: 3196-3201.
- Haydar T.F., Wang F., Schwartz M.L., Rakic P. 2000. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J. Neurosci*. **20**: 5764-5774.
- Ihrie 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 M.M., Meyer A.H., van Hooft J.A., Monyer H. 2008. Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci*. **105**: 20994-20999.
- Ito T., Suzuki T., Wellman S.E., Ing K.H. 1996. Pharmacology of barbiturate tolerance/dependence: GABAA receptors and molecular aspects. *Life Sci*. **59**: 169-95.
- 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.
- Jin K., Peel A.L., Mao X.O., Xie L., Cottrell B.A., Henshall D.C., Greenberg D.A. 2004. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**: 343-347.
- Kakita A., Goldman J.E. 1999. Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slices preparations. *Neuron*. **23**: 461-472.
- Karram K., Chatterjee N., Trotter J. 2005. NG2-expressing cells in the nervous system: role of the proteoglycan in migration and glial-neuron interaction. *Journal of anatomy*. **207**: 735-744.

- Kessarlis N., Pringle N., Richardson W.D. 2008. Specification of CNS glia from neural stem cells in the embryonic neuroepithelium. *Phil Trans R Soc B*. **363**: 71-85.
- Knoblich J. A. 2001. Asymmetric cell division during animal development. *Nature reviews Mol. Cell. Bio.* **2**: 11-20.
- Koenig H.L., Schumacher M., Ferzaz B., Do Thi A.N., Ressousches A., Guennoun R., Jung-Testas I., Robel P., Akwa Y., Baulieu E.-E. 1995. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*. **268**: 1500-1503.
- Kokaia Z., Lindvall O. 2003. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**: 127-32.
- Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* **32**: 149-184.
- Lambert J.J., Belelli D., Hill-Venning C., Calachan H., Peters J.A. 1996. Neurosteroid modulation of native and recombinant GABA<sub>A</sub> receptors. *Cell. Mol. Neurobiol.* **16**: 155-174.
- Lambert J.J., Belelli D., Peden D.R., Vardy A.W., Peters J.A. 2003. Neurosteroid modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Prog. Neurobiol.* **71**: 67-80.
- 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. *Adv Neurol.* **79**: 189-201.
- Levine J.M., Reynolds R. 1999. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Exp Neurol.* **160**: 333-347.
- Levison S.W., Chuang C., Abramson B.J., Goldman J.E. 1993. The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development.* **119**: 611-622.
- Levison S.W., Goldman J.E. 1993. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron.* **10**: 201-212.
- Li G., Kataoka H., Coughlin S.R., Pleasure S.J. 2009. Identification of a transient subpial neurogenic zone in the developing dentate gyrus and its regulation by Cxcl 12 and reelin signaling. *Development.* **136**: 327-35.
- Lillien L. 1997. Neural development: Instructions for neural diversity. *Curr Biol.* **7**: 168-171.
- Liu X., Wang Q., Haydar T.F., 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.
- Ma W., Barker J.L. 1995. Complementary expressions of transcripts encoding GAD67 and GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 4,  $\beta$ 1, and  $\gamma$ 1 subunits in the proliferative zone of the embryonic rat central nervous system. *J. Neurosci.* **15**: 2547-2560.
- Ma W., Barker J.L. 1998. GABA, GAD, and GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 4,  $\beta$ 1, and  $\gamma$ 1 subunits are expressed in the late embryonic and early postnatal neocortical germinal matrix and coincide with gliogenesis. *Microsc. Res. Tech.* **40**: 398-407.
- Magnaghi V. 2007. GABA and neuroactive steroid interactions in glia: new roles for old players?. *Curr neuropharmacol.* **5**: 47-64.
- McKay R. 1997. Stem Cells in the Central Nervous System. *Science.* **276**: 66-71.

- Maric D., Liu Q.-Y., Maric I., Chaudry S., Chang Y.-H., Smith S.V., Sieghart W., Fritschy J.-M., Barker J.L. 2001. GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA<sub>A</sub> autoreceptor/Cl<sup>-</sup> channels. *J. Neurosci.* **21**: 2343-2360.
- Melcangi R.C., Marnaghi V., Cavarretta I., Zucchi I., Bovolín P., D'Úrso D., Martini L. 1999. Progesterone derivatives are able to influence peripheral myelin protein 22 and P0 gene expression: possible mechanism of action. *J. Neurosci. Res.* **56**: 349-357.
- Melcangi R.C., Froelichsthal P., Martini L., Vescovi A.L. 1996. Steroid metabolizing enzymes in pluripotential progenitors central nervous system cells: effect of differentiation and maturation. *Neuroscience.* **72**: 467-75.
- Mellon S.H. 2007. Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacol Ther.* **116**: 107-24.
- Menn B., Garcia-Verdugo J.M., Yaschine C., Gonzalez-Perez O., Rowitch D., Alvarez-Buylla A. 2006. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci.* **26** (30): 7907-7918.
- Merkle F. T., Alvarez-Buylla A. 2006. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol.* **18**: 704-9.
- Michalczyk K., Zimam M. 2005. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organization. *Histol Histopathol.* **20** (2): 661-671.
- Morgane P.J., Mokler D.J., Galler J.R. 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev.* **26**: 471-483.
- Nadarajah B. 2003. Radial glial and somal translocation of radial neurons in the developing cerebral cortex. *Glia.* **43**: 33-36.
- 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.
- Nait-Oumesmar B., Decker L., Lachapelle F., Avellana-Adalid V., Bachelin C., Van Evercooren A.B. 1999. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 4357-4366.
- Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S., Yamamoto S., Hatano O., Kawahara N., Tamura A., Kirino T., Nakafuku M. 2002. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell.* **110**: 429-441.
- Nguyen L., Malgrange B., Breuskin I., Bettendorff L., Moonen G., Belachew S., Rigo J.M. 2003. Autocrine/paracrine activation of GABAA receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM<sup>+</sup>) precursor cells from postnatal striatum. *J. Neurosci.* **23**: 3278-3294.
- Niehaus A., Stremüller J., Diers-Fengers M., Trotter J. 1999. Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration. *J Neurosci.* **19**(12): 4948-61.
- Noctor S.C., Martínez-Cerdeño V., Kriegstein A.R. 2008. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol.* **508**: 28-44.
- Okano H., Sawamoto K. 2008. Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. *Phil Trans R Soc.* **363**: 2111-2122.
- O'Rourke N.A., Dailey M.E., Smith S.J., McConnell S.K. 1992. Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science.* **258**: 299-302.

- Parent J.M., von dem Bussche N., Lowenstein D.H. 2006. Prolonged seizures recruit caudal subventricular zone glial progenitors into the injured hippocampus. *Hippocampus*. **16**: 321-328.
- 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.
- Picard-Riera N., Decker L., Delarasse C., Goude K., Nait-Oumesmar B., Liblau R., Pham-Dinh D., Evercooren A.B. 2002. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**: 13211-13216.
- Polito A., Reynold R. 2005. NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat*. **207**(6): 707-716.
- Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Hall W. C., Lamantia A., McNamara J. O, Williams S. M. 2010. Desarrollo encefálico en la fase temprana. En: Neurociencia.Panamericana, España. Pp. 553-564.
- Rajkowska G., Miguel-Hidalgo J.J. 2007. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. **6**(3): 219-233.
- Rakic P. 2007. The radial edifice of cortical architecture: From neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Res. Rev*. **55** (2): 204-219.
- 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.
- 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., Dérsarnaud 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., Hussain R., Gago N., Oudinet J.P., Mattern C., Ghomari A.M. 2012. Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci*. **6**: 10.
- Scorza C.A., Arida R.M., Scorza F.A., Cavalheiro E.A., Naffah-Mazzacoratti M. 2009. Nestin down-regulation of cortical radial glia is delayed in rats submitted to recurrent *status epilepticus* during early postnatal life. *Arq Neuropsiquiatr*. **67** (3-A): 684-688.
- 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.
- Seri B., García-Verdugo J.M., McEwen B.S., Alvarez-Buylla A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. **21** (18): 7153-7160.
- Seri B., Heere D.G., Gritti A., Ferron S., Collado L., Vescovi A., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. 2006. Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cerebral Cortex*. **16**: i103-i111.

- Sharp F.R., Liu J., Bernabeu R. 2002. Neurogenesis following brain ischemia. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **134**: 23-30.
- Shepro D., Morel N. 1993. Pericyte physiology. *FASEB.* **7**: 1031-38.
- Sieghart W. 1995. Structure and pharmacology of GABAA receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* **47**: 181-234.
- Smithgall, Penning T.M. 1988. Electrophoretic and immunochemical characterization of 3 $\alpha$ hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenases of rat tissues. *Biochem J.* **254**: 715-21.
- Spradling A.S., Drummond-Barbosa D., Kai T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature.* **414**: 98-104.
- Suzuki S.O., Goldman J.E. 2003. Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J Neurosci.* **23** (10): 4240-4250.
- Tanaka K., Nogawa S., Suzuki S., Dembo T., Kosakai A., 2003. Upregulation of oligodendrocyte progenitor cells associated with restoration of mature oligodendrocytes and myelination in peri-infarct area in the rat brain. *Brain Res.* **989**: 172-179.
- Tardy M., Fages C., Le Prince G., Rolland B., Nunez J. 1990. Regulation of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding mRNA in the developing brain and in cultured astrocytes. *Adv Exp Med Biol.* **265**: 41-52.
- Taupin P. 2006. Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system. *Ann. Acad. Med. Singapore.* **35**: 814-820.
- Tramontin A.D, Garcia-Verdugo J.M., Lim D.A., Alvarez-Buylla, A. 2003. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex.* **13**: 580-587.
- Trotter J., Karram K., Nishiyama A. 2009. NG2 cells: properties, progeny and origin. *Brain Res Rev.* **63**(1-2): 72-82.
- Venture R.E., Goldman J.E. 2007. Dorsal radial glia generate olfactory bulb interneurons in the postnatal murine brain. *J Neurosci.* **27**: 4297-302.
- 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.
- Wang D., Krueger D.D., Bordey A. 2003. GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. *J Physiol.* **550**: 785-800.
- Watanabe M., Toyama Y., Nishiyama A. 2002. Differentiation of proliferated NG2-positive glial progenitors cells in a remyelinating lesion. *J Neurosci Res.* **69**: 826-836.
- White B.D., Nathe R., Maris D.O., Nguyen N.K., Goodson J.M., Moon R.T., Horner P.J. 2010. B-Catenin signaling increases in proliferating NG2<sup>+</sup> progenitors and astrocytes during post-traumatic gliogenesis in the adult brain. *Stem Cells.* **28**: 297-307.
- Xu J., Ling E. 1994. Studies of the ultrastructure and permeability of the blood-brain barrier in the developing corpus callosum in postnatal rat brain using electron dense tracers. *J Anat.* **184**: 227-237.
- Zerlin M., Levison S.W., Goldman J.E. 1995. Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of subventricular zone cells in the postnatal rat forebrain. *J Neurosci.* **15**: 7238-7249.