

DINÁMICA DE LOS DESPLAZAMIENTOS REALIZADOS POR LAS POBLACIONES CELULARES DURANTE EL DESARROLLO DEL TELENCEFALO EN LOS MAMÍFEROS

Dr: Juan A. De Carlos Segovia

Instituto Cajal

Madrid, España

El presente trabajo solo pretende hacer una pequeña revisión de los trabajos que se realizan en la actualidad en mi laboratorio del Instituto Cajal.

Desde hace una serie de años estamos interesados en el estudio del desarrollo del telencéfalo en mamíferos. Dentro de esta estructura hemos prestado especial atención al desarrollo de la corteza cerebral y, dado su temprano desarrollo y su importancia en la aparición de otras estructuras, en el sistema olfativo.

Como es bien conocido, la corteza cerebral es el manto de tejido nervioso que recubre el encéfalo de los mamíferos y que alcanza su mayor desarrollo en los primates y, sin ponerlo en duda, en los humanos. Es una estructura conocida macroscópicamente desde muy antiguo, siendo admirablemente representada por **Andreas Vesalius en su obra "De Humani Corpore Fabrica", publicada en 1543. En esta obra representa el cerebro humano recubierto, en sus dos hemisferios, por la corteza cerebral que se deja ver, después de retraer las membranas meníngeas, formada por multitud de pliegues, lo que no solo aumenta enormemente su superficie y complejidad, sino también le confiere su apariencia tan característica.**

Pero, ¿cómo esta formada la corteza cerebral?

Su conocimiento detallado data de varios cientos de años después de la aparición de la obra de Vesalius, dado que se requirió del desarrollo de la microscopía y de la obtención de buenos métodos tintoriales, pues resultó que el sistema nervioso era muy refractario a las anilinas que se usaban de rutina para impregnar otros tejidos. Una vez superados estos inconvenientes se pudo comprobar que los cerebros de especies de mamíferos muy involucionadas, como el erizo de tierra (*Erinaceus europaeus*), no difería sustancialmente en su composición de los cerebros mas evolucionados, como el humano. Ambos órganos estaban formados por los mismos tipos de células, y si nos fijamos en esta ocasión en el componente neuronal, podemos hacer dos grandes distinciones: células de proyección e interneuronas o

células de axón corto. Las primeras, como muestran los dibujos de Cajal, poseen morfología piramidal y se ha visto que son excitatorias, en contraposición con las interneuronas que son de morfologías variopintas y son inhibitorias. Ambos tipos de neuronas pueden reconocerse en especies de mamíferos tan alejadas en la escala filogenética.

La manera de colocarse distintos grupos de neuronas en la corteza cerebral confieren a esta una variedad regional y una exquisita especificidad. Y esto fue puesto de manifiesto por Korbinian Brodmann en 1909 al publicar que la corteza cerebral se puede dividir en medio centenar de regiones distintas reconocibles entre si utilizando un sencillo método de impregnación ideado por Frank Nissl. Colorantes como la tionina, el azul de metileno, el rojo neutro, etc., se unían a la cromatina celular, de tal modo que en un tejido se podían reconocer todos los cuerpos celulares. Aunque ni se impregnaban las prolongaciones nerviosas, esto fue suficiente para que Brodmann pudiese distinguir distintas áreas corticales en una serie representativa de mamíferos, incluido en hombre, y poner una etiqueta en cada una de esas áreas. Esta etiqueta era un número que se sigue manteniendo en la actualidad. Así por ejemplo, la corteza visual primaria es el área 17, y las áreas visuales secundarias o de asociación se reconocen por los números 18 y 19.

Así como la variedad regional cortical viene determinada en primera instancia por el agrupamiento selectivo de distintas tipologías celulares, podemos reconocer dentro de cada región cortical una exquisita organización celular. De un modo general, dado que es común para todas las áreas neocorticales, vemos una estructuración en 6 capas de disposición horizontal. Podemos decir que cada capa es un mundo distinto, pues están formadas por tipologías determinadas de células, muchas de las cuales proyectan fuera de la corteza cerebral a estructuras subcorticales determinadas y, en contraposición, reciben proyecciones estereotipadas provenientes de diversas regiones cerebrales. Y estas proyecciones que llegan a una determinada región, junto con las aferencias que entran en las distintas áreas, les van a conferir una especificidad regional única. Por ejemplo, las células piramidales de capas 2 y 3, de pequeño y mediano tamaño, realizan proyecciones de asociación a diversas áreas corticales dentro del hemisferio cerebral donde residen, pero también proyecciones callosas al hemisferio contralateral; las grandes células piramidales de capa 5 proyectan sub-corticalmente a largas distancias, pudiendo llegar a medula espinal; y la capa 6 proyecta mayoritariamente a tálamo. La capa 4 y la 1 no son capas que albergan células de proyección y se caracterizan por recibir de manera específica las aferencias procedentes del tálamo.

De esta manera, la función de cualquier estructura cerebral depende de su composición neuronal y del patrón de conectividades sinápticas que presenta, tanto extrínsecas como intrínsecas, inhibitorias y excitatorias.

Posteriormente, la organización de la corteza cerebral se complicó un poquito más, al ponerse de manifiesto que podía tener también una organización columnar. Fue uno de los últimos discípulos de Cajal, Lorente de Nó quien, en 1938, introdujo la idea de que las células de la corteza cerebral estaban dispuestas en módulos verticales que podían comunicarse entre sí mediante interneuronas. Sin embargo, esta observación de Lorente de Nó no tomó cuerpo hasta 1957, cuando el electrofisiólogo Vernon Mountcastle se dio cuenta que si introducía un electrodo de registro en corteza cerebral en sentido perpendicular a la superficie pial, las neuronas que se iba encontrando al penetrar el electrodo desde capa 2 hasta capa 6, se agrupaban en un estrecho cilindro o columna vertical, y que esta estructura representaba una unidad de organización elemental, dado que respondía electrofisiológicamente del mismo modo; es decir, sus células constituyentes eran activadas por estimulación de la misma clase de receptores periféricos desde prácticamente los mismos campos periféricos receptivos y con latencias que no diferían sustancialmente entre las células de las distintas capas, dentro de una misma columna.

Conociendo todos estos detallitos estructurales y admirando la formidable organización alcanzada por la corteza cerebral, nos preguntamos en el laboratorio cómo se había logrado llegar a dicha complejidad.

Empezando desde el principio, recordamos que el sistema nervioso se origina a partir de la lámina embrionaria conocida como Ectodermo, que se engruesa para formar la Placa neural que a su vez se plegará y fusionará dorsalmente para constituir el Tubo neural. Este tubo se va cerrando en dirección rostral y caudal, a modo de cremallera, y en la porción cefálica o más rostral, va sufriendo una serie de flexuras que van a dar lugar a las vesículas cerebrales primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Estas tres primeras divisiones del tubo, a su vez se van a diferenciar en más estructuras, de tal modo que el prosencéfalo va a dar lugar al telencéfalo y diencefalo, como vesículas cerebrales secundarias. Y son estas estructuras las que nos interesaba estudiar en el laboratorio, dado que en el telencéfalo se van a desarrollar la corteza cerebral y núcleos basales y en el diencefalo el tálamo e hipotálamo, entre otras estructuras.

Tentativas de estudio de la Corteza Cerebral

En un momento determinado del desarrollo embrionario, se desarrollan un par de vesículas en el telencéfalo cuyas finas paredes están bañadas por el líquido

cefalorraquídeo albergado en unas grandes oquedades que van a constituir los ventrículos laterales. Desde un principio se puede reconocer perfectamente realizando un corte coronal, el telencéfalo dorsal o palio y el telencéfalo basal o subpalio. En la superficie del subpalio también son visibles desde estadios tempranos las eminencias ganglionares, que en número de tres (medial, lateral y caudal), constituyen unas importantes estructuras transitorias, donde se van a generar abundantes poblaciones neuronales durante el desarrollo del telencéfalo. Pero si atendemos al palio, vemos que en el espesor de las vesículas telencefálicas, que en un principio están constituidas por un tejido epitelial pseudo-estratificado, es donde se va a desarrollar toda la corteza cerebral.

Las células se generan en la Zona Ventricular (ZV), desde donde ascienden para situarse en el estrato superior, justo por debajo de la piamadre. Estas primeras células, que se denominan células de Cajal-Retzius (C-R), se colocan horizontalmente formando una empalizada. En una segunda ronda de mitosis se produce otra clase de células que ascienden para colocarse inmediatamente por debajo de las células de C-R. Estas dos poblaciones celulares van a constituir la Preplaca, primera capa diferenciada en el neuroepitelio cortical. En sucesivas oleadas mitóticas se producen otros tipos celulares que asciende por el neuroepitelio ayudándose de la glía radial. Estas células sobrepasan a la segunda población celular formada, pero no puede sobrepasar a las células de C-R. El resultado es que la Preplaca se comienza a abrir descomponiéndose en dos capas distintas. La capa superior se denominará Zona Marginal (ZM) y la capa inferior Zona de las células de la Subplaca (SP). A su vez, la población de células que se intercalan entre estos dos estratos va a dar lugar a la Placa Cortical (PC). Esta sigue creciendo con un gradiente rostro-caudal y latero-medial. A la vez que va creciendo la PC, sus células empiezan a emitir procesos que intentan abandonar el neuroepitelio, constituyéndose así un nuevo estrato que denominamos Zona Intermedia (ZI), por donde van a transcurrir axones de entrada y salida del neuroepitelio cortical. Mientras tanto, se ha formado una PC densa en la que, en un momento determinado, se segrega la capa 6 cortical, compuesta de células de proyección subcortical, con destino preferente en el tálamo. La siguiente capa en segregarse es la capa 5, luego la 4, 3 y 2. El resultado final es que la ZM va a constituir la capa 1 en el adulto; la PC va a originar las capas 2 a 6; la subplaca se mantiene y la ZI va a pasar a denominarse Sustancia Blanca.

La manera de migración de estas células generadas en la ZV neuroepitelial durante el desarrollo, fue descrita por Pasko Rakic en 1972 como migración radial o gliofílica, dado que se ayuda de la glía radial para ascender a su posición adecuada. Sin embargo, no olvidemos que existe otro tipo de desplazamiento, la migración

tangencial, que en un principio se pensó que era un mecanismo minoritario y de mucha menor importancia.

En cuanto al origen de las células que pueblan la corteza cerebral, se pensaba que todas procedían de la zona germinativa del propio neuroepitelio cortical. Sin embargo, fue mi laboratorio el que desbarata esta idea al describir que hay una población importante de células que se generan en las eminencias ganglionares del subpallio y que alcanzan la corteza cerebral en desarrollo mediante migración tangencial (De Carlos et al., 1996; Jiménez et al., 2002). Por lo tanto, con nuestra descripción de las células que se incorporan procedentes del subpallio, había que admitir, al menos un origen dual de las células corticales.

¿Cómo pusimos de manifiesto la existencia de poblaciones celulares que se incorporan al pallio procedente de estructuras subpaliales?

Abordamos el estudio de la migración de poblaciones celulares. Para ello, pensamos que solo se pueden estudiar movimientos celulares en animales vivos y por supuesto preservando la integridad del cerebro. Sería una falacia abordar este tipo de estudios sobre rodajas de tejido mantenidas vivas en placa, dado que en las zonas germinativas preservadas en las rodajas se iban a generar abundantes poblaciones celulares, pero estas iban a desplazarse por el espesor de la propia rodaja, no pudiendo tomar rutas, presumiblemente fisiológicas, que han sido suprimidas al realizar la rodaja. Por lo tanto, los resultados que obtendríamos serían altamente artefactuales. Tratando de evitar esto, pusimos a punto en el laboratorio de un método de cultivo de embriones enteros.

Brevemente, a partir de una ratona gestante de estadio del desarrollo conocido, extraemos los embriones por cesárea. Mediante disección roma separamos las capas musculares uterinas y la decidua uterina. Después se elimina la membrana de Reichert, y se observa al embrión por transparencia. Por último, se abre el saco amniótico con pinzas de relojero por la región menos vascularizada y exponemos el embrión, vivo y unido a sus membranas y placenta por los vasos umbilicales. Esto es importante, pues el embrión se va a alimentar y oxigenar gracias a la placenta. Una vez expuesto el embrión, se le inyecta bajo lupa una o dos sustancias fluorescentes en las áreas en las que estamos interesados estudiar y se introduce en un frasco que contiene medio de cultivo (suero homólogo de rata) y este se une a un rotor hueco, por donde se le oxigena con carbógeno, que está introducido en un pequeño incubador que mantiene constante la temperatura a 36°C. El rotor moviliza los frascos de cultivo a 33rpm. Los embriones se sacan a las 24 horas y se estudia si en el lugar de inyección se han generado células, si han migrado, qué ruta han utilizado y hasta donde han llegado con su desplazamiento. Posteriormente, por medio de reacciones inmunohistológicas, caracterizamos las

poblaciones celulares de acuerdo a la expresión de distintas proteínas o péptidos testados (**relina, calretinina, calbindina,...**)

De esta manera, pudimos demostrar que las células que exhiben migración tangencial dentro del neuroepitelio cortical durante el desarrollo de la corteza cerebral, se generan en las eminencias ganglionares del subpalio y entran en esta estructura mediante migración tangencial (De Carlos et al., 1996). Un año después de nuestro hallazgo, dos laboratorios, uno americano (Anderson et al., 1997) y otro japonés (Tamamaki et al., 1997), trabajando independientemente, describen que las células que entran en corteza por desplazamientos tangenciales, expresan GABA, por lo que son identificadas como células inhibitorias, es decir, interneuronas corticales. Poco tiempo después, la comunidad científica admitirá que las células excitatorias de la corteza cerebral, es decir, las células de proyección, de morfología predominante piramidal, son generadas en la zona germinativa del neuroepitelio cortical y alcanzarán el estrato que les corresponda dentro de esta estructura, mediante migración radial (gliofilica). En contraposición a esto, todas las células inhibitorias de corteza (interneuronas), se generaran en las eminencias ganglionares y alcanzarán el neuroepitelio mediante migración tangencial. Posteriormente se desarrollará la creencia de que el lugar de generación mayoritario de interneuronas corticales es la ZV de la eminencia ganglionar medial. No obstante, según nuestra experiencia, las eminencias ganglionares lateral y caudal también tienen una contribución importante al suministro de estas células.

Estudio de las células de Cajal-Retzius

Las células de C-R son las primeras en aparecer en el neuroepitelio y poseen un papel importante en el desarrollo de la corteza cerebral. Estas células secretan una proteína denominada Relina que parece ser de vital importancia en la estructuración de la Corteza Cerebral. Se ha comprobado que en mutantes defectivos para esta proteína la corteza se desarrolla distorsionada y, lo que es más importante, su estructuración en capas aparece invertida. De esta manera, la Relina podría tener un papel atrayente para que las células de la PC asciendan desde la ZV y sobrepasen a las células de la subplaca, deteniendo su migración cuando han alcanzado este punto. Esta podría ser la explicación de la escisión de la Preplaca en dos.

En cuanto al origen de las células de C-R, también se pensó en un principio que era exclusivamente en la zona germinativa del neuroepitelio, pero posteriormente viéndose que algunas de las células generadas en el subpalio expresaban Relina y podrían alcanzar el neuroepitelio por la zona marginal, se caracterizaron como células de C-R. Teníamos así tres áreas de posible generación de esta tipología

celular: el área septal, el palio ventral (PV) y una estructura caudo-medial conocida como cortical hem (CH).

Conociendo que estas células son las primeras en aparecer en el neuroepitelio cortical y que se requieren para el correcto posicionamiento por capas de las células de la PC, elegimos nuestra edad de estudio en ratones, la edad más temprana de la formación de corteza; en ratones empezamos el estudio con embriones de 10 días de gestación (E10) y pudimos ver que estas células empiezan a ser visibles en E10, poseen un pico de generación (o de visualización) en E11 y empiezan a decaer en E12. Esto era lógico, pues las células de la PC empiezan a generarse en E13 y las células de C-R ya deberían estar colocadas en sus posiciones ocupando toda la superficie de las vesículas telencefálicas en ese estadio. De acuerdo a estas edades de estudio, vimos que en el área septal y en el PV no se generaban células que cumpliesen nuestros requisitos, por lo que fueron áreas descartadas. Aquí podría ser importante hacer mención además, que toda célula que exprese Relina no puede ser considerada como célula de C-R.

Para estudiar si el CH podía ser un área de generación de células de C-R, dividimos esta estructura, dado su tamaño, en tres subáreas, a las que denominamos como CHRostral, CHMedial y CHCaudal, y realizamos inyecciones de trazadores fluorescentes en cada una de ellas, en embriones distintos. De esta manera, pudimos ver que las células migratorias generadas en el CH en estadios E10 y E11 pueblan completamente la superficie del neuroepitelio cortical en 24 horas. Las células muestran una ruta de migración tangencial y oblicua, con dirección caudo-rostral. Asimismo, pudimos comprobar cómo estas células expresan relina como marcador específico y calretinina. Otro dato importante que pudimos observar con nuestros experimentos es que las poblaciones de células generadas en el CHC, no se mezclaban con las generadas en el CHM, y estas tampoco lo hacían con las generadas en el CHR (García-Moreno et al., 2007). Es decir, las células generadas en un área determinada, ocupan siempre un área determinada, sin mezclarse con las células que se han generado en áreas adyacentes. ¿Cómo hacen esto?

Para intentar abordar este hecho, ideamos los siguientes experimentos.

Utilizamos dos cepas de ratonas preñadas en estadio E11, que es cuando se da el pico de generación de las células de Cajal-Retzius. Una de las cepas es normal y la otra es una cepa transgénica donde todas sus células (con la excepción del pelo y los eritrocitos) expresan la proteína verde fluorescente (GFP) cuando son expuestos a luz ultravioleta. Usando este material realizamos implantes de piezas de CH (rostral, medial o caudal) de los animales verdes a los animales normales. Se realizan implantes empleando distintas combinaciones, por ejemplo, piezas del CHM se implantan en el CHM del embrión receptor; piezas rostrales (CHR) a lugares

caudales (CHC) y piezas caudales (CHC) a lugares rostrales (CHR). Pretendemos conocer si las células que se generan en un área determinada van a posicionarse en el área esperada de acuerdo a su lugar de origen o si por el contrario, cambian su lugar de establecerse dependiendo del nuevo sitio donde ha sido implantadas. Los embriones implantados son cultivados en frascos rotatorios durante 24 horas y estudiados por microscopia de fluorescencia, dado que las células transplantadas portan el marcador GFP. De esta manera podemos comprobar que las células implantadas en áreas ectópicas se comportan como sus células vecinas, adoptando sus rutas de migración de acuerdo al área cerebral donde se han implantado. Para evitar equívocos en nuestros hallazgos, realizamos un experimento mucho más forzado: Implantamos una pieza de CH, estructura palial en la eminencia ganglionar lateral (EGL), estructura subpalial. Vimos que las células implantadas se movían a lo largo de una nueva vía migratoria a través del subpalio. Hicimos reacciones de inmuno sobre las secciones obtenidas para saber si las células migratorias expresaban marcadores típicamente paliales (reelina calretinina, Tbr1) o cambiaban a expresar marcadores subpaliales (calbindina) y vimos que las células paliales implantadas nunca expresaban marcadores subpaliales. Estas células mantienen su fenotipo, dado que no pierden sus marcadores paliales, aunque si cambian sus rutas y destinos de migración, de acuerdo al lugar donde se han implantado. Esto quiere decir, que las rutas de migración y destinos deben estar codificados por moléculas que se encuentran en el ambiente donde se generan las células o bien en las áreas por donde transcurre su migración, y no en ellas mismas (Ceci et al, 2010).

En una colaboración posterior con grupos mexicanos y americanos, estudiamos una cepa de ratones mutantes para el factor de transcripción *Lhx5* y cuando analizamos que ocurre con el CH en estos mutantes nos encontramos con que los embriones de 11 días de gestación, presentan un acortamiento caudal del CH revelado en función de la expresión de *Wnt3a*. Por otro lado, la expresión de *Wnt5a* en la región correspondiente al CH de embriones mutantes era indetectable a nivel caudal y apenas se podía visualizar en el CHR. Estos resultados demuestran que dentro del cortical hem podría existir cierta heterogeneidad genética que permite dividir a esta estructura en, al menos, dos regiones. Una mitad rostral más resistente a la mutación de *Lhx5* y una región caudal que presenta mayor sensibilidad a ella. Convenientemente, este fenotipo viene acompañado además de la pérdida de la señal de reelina en la PP cortical de embriones de 12 días, así como de la formación de ectopias celulares en diferentes regiones telencefálicas. Esto nos indica la importancia de este factor de transcripción en la migración y posicionamiento final de las células de C-R (Miquelajauregui et al., 2010).

Migración telencefálica temprana

Una vez estudiadas las primeras células en aparecer en el neuroepitelio cortical hicimos unas tinciones inmunológicas contra una serie de proteínas que habían sido implicadas en migración celular: doblecortina (DCx), calretinina (CR) y calbindina (CB). Lo interesante de este experimento es que lo realizamos en primeros estadios del desarrollo telencefálico E10/11 y utilizando cerebros enteros. Como las células siempre migran superficialmente esperábamos que el anticuerpo penetrase bien y poder estudiar el marcaje. Así vimos como todo el marcaje de células migratorias tempranas se distribuía principalmente ventralmente, es decir, en el subpalio. Luego seccionamos los cerebros coronalmente y vimos como las células ocupaban la corteza olfativa, formada por tres áreas, la corteza piriforme (PC), el tubérculo olfativo (OT) y la corteza entorrinal (EC). Este resultado nos hizo recordar experimentos previos realizados en el laboratorio con anterioridad en los que no habíamos logrado comprender, en aquel tiempo que es lo que estaba pasando. Estos consistieron en hacer inyecciones de Timidina-tritiada intraperitonealmente a ratas preñadas para ver generación células temprana. Las células que se están dividiendo en el momento de la inyección, incorporan en su ADN el análogo de la Timidina y quedan marcadas. Posteriormente las podemos estudiar a distintos tiempos del desarrollo del animal, si los sacrificamos secuencialmente. Haciendo inyecciones en E12 (primeros estadios del desarrollo telencefálico en rata) y sacrificando al animal 6 horas después, vemos abundantes células marcadas en todo el espesor telencefálico, ya sea palial como subpalial. Sin embargo, si sacrificamos tres días después, solo vemos marcaje en el área septal y en la corteza olfativa. ¿Qué había pasado con todas las células que habíamos visto marcadas en el palio? Pensamos que había ocurrido un fenómeno de muerte celular programada (apoptosis), usualmente común durante el desarrollo. Para **comprobarlo realizamos varias tinciones específicas de muerte neuronal (TUNEL...)** y comprobamos que no habían desaparecido por muerte celular; sin embargo no **había rastro de ellas...y no se nos ocurrió pensar entonces en una migración** masiva, pues antes no se admitía que las células se desplazasen a larga distancia para ocupar y formar parte eventualmente de otras estructuras (De Carlos et al., 1996).

Abordamos el estudio de las migraciones tempranas en el telencéfalo inyectando marcadores fluorescentes en distintas áreas, entre las que se incluían telencéfalo dorsal (palio), telencéfalo basal (Subpalio) y áreas limitantes como el surco septo-eminencial (SES) o el muro medial rostral telencefálico (RMTW). Los embriones inyectados eran cultivados en frascos rotatorios y estudiados a microscopia de

fluorescencia. Así vimos que en los estadios más tempranos del desarrollo telencefálico, distintas áreas germinativas, paliales y subpaliales, dan lugar a poblaciones celulares que expresan marcadores distintos y que migran tangencialmente a lo largo de rutas estereotipadas, convergiendo topográficamente en la corteza olfativa. La migración siempre es superficial, por la preplaca. Estas experiencias ponen de manifiesto que la preplaca constituye un sustrato permisivo importante para la migración tangencial. Que este tipo de migración es masiva y de mucho más envergadura que la migración radial, luego no es un tipo de migración secundaria, sino primordial en primeros estadios del desarrollo. Y lo que es más importante que la corteza olfativa está formada por multitud de poblaciones celulares distintas que se generan separadamente, en lugares distribuidos por toda la vesícula telencefálica y que individualmente migran, utilizando distintas pero estereotipadas rutas, para converger en un destino final donde van a formar una sola estructura. Si a esto le sumamos que cada población celular expresa sus propios marcadores, estaremos explicando la rica variabilidad celular de cada estructura. Además, vemos que en un estadio determinado, todas las áreas germinativas del telencéfalo están generando células olfativas. Posteriormente, esas mismas áreas generarán células con destinos muy diferentes (García-Moreno et al., 2008; 2009; Ceci et al., 2012).

Hasta el momento todos nuestros marcajes se realizaban en embriones que luego eran cultivados enteros en frascos rotatorios. Esta técnica era muy potente a la hora de conocer si en un área determinada de un embrión temprano se generaban células y permitía estudiar la trayectoria seguida por estas células para alcanzar su lugar de asentamiento. Sin embargo, dado el tiempo corto de supervivencia que podíamos dejar a los embriones en cultivo, no podíamos ver en que tipología celular se diferenciaban los neuroblastos migratorios, ni que parte ocupaba de la estructura que conformaban. Para poder hacer estos estudios necesitábamos dejar más tiempo de supervivencia y esto lo intentamos hacer, de una manera un tanto grosera, inyectando en los ventrículos cerebrales embrionarios (diana fácil) un plásmido con el marcador GFP, ayudándonos de transiluminación del cuerno uterino mediante una luz fría. Para que el plásmido penetrara en las células que se estaban dividiendo en ese momento y se incorporara en su material genético y así poder expresar el marcador fluorescente, hacíamos electroporaciones intra-útero. Posteriormente se devolvían los cuernos uterinos al seno materno y se dejaba el tiempo deseado de supervivencia para que continuasen su desarrollo.

Migraciones celulares tangenciales a larga distancia

Con la adquisición de un aparato de ecografía por ultrasonidos, para animales pequeños, empezamos a poder hacer inyecciones intracerebrales e intra-útero, con una buena precisión, asegurándonos además una alta supervivencia postquirúrgica. Abordamos entonces el estudio de las migraciones celulares a larga distancia, tratando de averiguar si la migración tangencial se hallaba limitada a desplazamientos dentro de una misma vesícula encefálica.

Marcando la zona ventricular (germinativa) del núcleo para-ventricular hipotalámico (PVH) en embriones en estadios E10-E12, vimos que se generaban unas poblaciones celulares que migraban siguiendo la ruta usada por la **stría terminalis** y colonizaban el núcleo del lecho de la stría terminalis (NLST), el núcleo medial amigdalino (MeA) y el núcleo posteromedial cortical amigdalino (POMc). Nos encontrábamos aquí con una o unas poblaciones celulares que se generaban en el hipotálamo y migraban para alcanzar estructuras telencefálicas, como es el complejo de la amígdala extendida. La migración celular mas larga jamás reportada, en este caso abarcando dos vesículas telencefálicas. La ruta de migración era la inversa de la trazada por la **stría terminalis**. Esta estructura está formada por la unión de axones pertenecientes a neuronas de distintos núcleos amigdalinos (evidentemente residentes en la vesícula telencefálica) que proyectan alcanzando el límite di-telencefálico, cruzándolo e innervando distintas áreas hipotalámicas (vesícula diencefálica). Dado que la formación de la **stría terminalis** se realiza al mismo tiempo que la migración de las células generadas en el núcleo para-ventricular hipotalámico pensamos que podría haber una relación entre ellas y que tal vez la stría no se formaría en ausencia de estas células o bien que las fibras no alcanzarían sus dianas normales sin la presencia de las células en cuestión. Por otro lado, descubrimos que las células generadas en el núcleo PVH expresaban el gen Orthopedia (Otp) y que existía un ratón mutante para este gen, que había estudiado años atrás el Profesor Antonio Simeone. En mutantes Otp $-/-$, los núcleos MeA y POMc existían pero eran de tamaño más reducido que el los ratones controles. Podíamos pensar que las células generadas en el núcleo PVA, habrían muerto o no se habrían generado, con lo que si había una relación directa entre estas células y las **stría terminalis**, probablemente esta un se hubiese formado. Marcamos la stría en material fijado de mutantes Otp $-/-$ pensando no encontrarla y vimos que si se marcaba; seguía existiendo, luego estas células no parecían ser estrictamente necesarias para la formación de este haz axonal.

Pero, ¿qué pasaba con estas células en ausencia de Otp?

Para averiguarlo, bloqueamos la expresión de este gen con el RNA de interferencia adecuado (shRNA) y vimos que las células que no expresan Otp no alcanzaban los núcleos amigdalinos. Hicimos estudios de muerte celular (TUNEL) y vimos que no

había nada de muerte en esa zona y en ese estadio, luego esta no podía ser la causa de su desaparición. Hicimos estudios de proliferación celular con fosfo-histona 3 (p-H3) y vimos que estas células se seguían generando en el PVH. De esta manera concluimos que la inactivación del gen *Otp* en las células hipotalámicas en estudio lo que hacía era interrumpir su migración natural, de tal manera que las células se perdían en el hipotálamo, no llegando nunca a colonizar el telencéfalo. Habíamos descubierto en este trabajo una migración a larga distancia que requería para poder realizarse la expresión de un factor de transcripción que, de no estar presente, no permitiría a estas células saltar de una vesícula a otra (García-Moreno et al., 2010).

Lugares de generación de las células de la subplaca

Aprovechando el ecógrafo de animales decidimos seguir estudiando el desarrollo de la corteza cerebral y centramos nuestro esfuerzo en las células de la subplaca. Estas células son importantes pues se había descrito que se generaban en estadios muy tempranos, junto con las células de C-R, y colonizaban en primera instancia la preplaca. Posteriormente serían desplazadas por las células de la placa cortical quedando colocadas debajo de estas, literalmente acostadas en el borde con la sustancia blanca. Se les ha atribuido papeles muy importantes en el desarrollo de la corteza cerebral y en el establecimiento de las conexiones apropiadas entre la corteza y núcleos profundos. Descritas como una población muy heterogénea de células, donde encontramos células de proyección e interneuronas, sería lógico pensar que se pudiesen generar en diversas estructuras y alcanzar el estrato cortical requerido mediante migración tangencial. Sin embargo lo único aceptado era que se generaban en la zona ventricular cortical y que ascendían hacia la preplaca mediante migración radial. En trabajos anteriores, habíamos constatado que en embriones E10 se generaban células en la ZV del neuroepitelio cortical, que expresaban CR y que ascendían hacia la preplaca radialmente. Dado esta expresión y el estadio de desarrollo tan temprano, las habíamos identificado como células de la subplaca (SP) (García-Moreno et al., 2007). ¿Podrían generarse también en otras estructuras?

Hicimos marcajes en una serie de estructuras que en ese estadio podían ser activas en cuanto a generación de células para ver si podían generar esta tipología. Así, marcamos el septum (Sp), el núcleo preóptico (POA), la eminencia ganglionar lateral (EGL), la medial (EGM) y la caudal (EGC). La respuesta fue no encontrar células que se incorporasen a la preplaca desde ninguna de estas estructuras. ¿Habíamos fallado en nuestra búsqueda de nuevos lugares de generación de estas células?

Inyectando en una estructura que se encuentra adyacente dorsalmente al área septal, el muro medial rostral telencefálico en embriones en estadio E11 y estudiando el material a P5, vimos que se marcaba de una forma consistente toda la extensión de la preplaca rostro-caudalmente, con mayor densidad rostral. También encontramos marcado el POA. Repitiendo las inyecciones y estudiando el material a tiempos mas cortos, veíamos como poblaciones celulares generadas en el muro medial rostral telencefálico alcanzaban la preplaca migrando tangencialmente. Posteriormente serían desplazadas por células de la placa cortical y alcanzarían su estrato definitivo. Vimos que estas células constituían una población heterogénea donde coexistían células de la supplaca de proyección e interneuronas, así como algunas células de axón corto de capas 5 y 6. Esto es importante, porque pone de manifiesto que no todas las células de proyección de la corteza se generan en el neuroepitelio cortical y se desplazan radialmente, sino que también existen células de proyección generadas extra-corticalmente y que se desplazan tangencialmente.

Volviendo a prestar atención al neuroepitelio cortical, vimos que haciendo inyecciones muy puntuales con retrovirus en estadio E11 y estudiando en E13, se marcaban células de la SP generadas en E11, algunas de las cuales proyectaba fuera del neuroepitelio, encontrándose todavía en capas superiores. Esto era coherente con descripciones previas donde se identificaban a las células de la SP como primeras células en proyectar fuera de la corteza cerebral (De Carlos y O'Leary, 1992).

En otros experimentos electroporabamos el marcador GFP en la ZV neuroepitelial en E11 y en E12 fijábamos el material y hacíamos reacciones de inmuno contra la CR. Vimos que las células que se generaban en E11 y ascendían a la PP, no expresaban CR; sin embargo ya existía una población CR + en este estrato subpial. Recordemos las primeras células de la SP descritas por nosotros que expresaban CR y que se generaban en E10. Encontrábamos ahora otra población de células de la SP, que se generan en el mismo sitio un día después y ya no expresaban CR, Es decir, distintas poblaciones de células de SP se generan en ZV neocortical, así como en un área extracortical (Pedraza et al., 2013).

Dada la implicación de estas células de generación temprana en el desarrollo de la corteza cerebral y de las cada vez más numerosas enfermedades cerebrales que cursan con fallos en la migración celular temprana, todos estos hallazgos que estamos realizando en el laboratorio adquieren una importancia notoria a la hora de comprender y evaluar diversas patologías, actualmente sin cura.

Bibliografía de nuestros trabajos citados

De Carlos, J.A. and O'Leary, D.D.M. 1992. Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *J. Neurosci.*, 12: 1194-1211.

De Carlos, J.A., López-Mascaraque, L. and Valverde, F. 1996. Dynamics of cell migrations from the ganglionic eminence in the rat. *J. Neurosci.*, 16: 6146-6156.

Jiménez, D., López-Mascaraque, L., Valverde, F. and De Carlos, J.A. 2002. Tangential migration in neocortical development. *Dev. Biol.*, 244: 155-169.

García-Moreno, F., López-Mascaraque, L. and De Carlos, J.A. 2007. Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *J. Comp. Neurol.*, 500 (3): 419-432.

García-Moreno, F., López-Mascaraque, L. and De Carlos, J.A. 2008. Early telencephalic migrations topographically converging in the olfactory cortex. *Cerebral Cortex*, 18 (6): 1239-1252.

Ceci, M.L., López-Mascaraque, L. and De Carlos, J.A. 2010. The influence of the environment on Cajal-Retzius cells migration. *Cerebral Cortex*, 20: 2348-2360.

García-Moreno, F., Pedraza, M., Di Giovannantonio, L.G., Di Salvio, M., López-Mascaraque, L., Simeone, A. and De Carlos, J.A. 2010. A neuronal migratory pathway crossing brain boundaries populates amygdala nuclei. *Nature Neurosci.*, 13 (6): 680-689.

Miquelajáuregui, A., Valera-Echavarría, A., Ceci, M.L., García-Moreno, F., Hoang, K., Ricaño, I., Chowdhury, T.G., Portera-Cailliau, C., Tamariz, E., De Carlos, J.A., Westphal, H. and Zhao, Y. 2010. LIM-homeobox gene ***Lhx5*** is required for normal development of Cajal-Retzius cells. *J. Neurosci.*, 30 (31): 10551-10562.

Ceci, M.L., Pedraza, M. and De Carlos, J.A. 2012. Embryonic septum and ventral pallium, new sources of olfactory cortex. *PLoS ONE*, 7 (9): e44716.

Pedraza, M., Hoerder-Suabedissen, A., Albert-Maestro, M.A., Molnar, Z. and De Carlos, J. A. 2014. Extracortical origin of some murine subplate cell populations. PNAS, 111 (23): 8607-8612.