

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR

**PAPER DE LA REELINA I LA NETRINA-1 EN LA MIGRACIÓ NEURONAL AL
SISTEMA NERVIÓS CENTRAL. REGULACIÓ PER HORMONES TIROÏDEES**

Mònica Ruiz Grases
Barcelona 2001

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR

**PAPER DE LA REELINA I LA NETRINA-1 EN LA MIGRACIÓ NEURONAL AL
SISTEMA NERVIÓS CENTRAL. REGULACIÓ PER HORMONES TIROÏDEES**

Memòria presentada per la llicenciada Mònica Ruiz Grases per a optar al grau de Doctora de Bioquímica.

Aquesta tesi s'ha inscrit dins del programa de doctorat de Biologia Cel·lular, bienni 1997-1999, de la Universitat de Barcelona. El treball experimental i la redacció de la present memòria han estat realitzats sota la direcció del **Dr. Eduardo Soriano García**, Catedràtic de Biologia Cel·lular, del Departament de Biologia Cel·lular de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Juny 2001

Vist-i-plau del Director de Tesi

Dr. Eduardo Soriano García

El Doctorand

Mònica Ruiz Grases

“Sembla ser que les evolucions, tan ràpides i incoherents, de les abelles, dibuixen en l’espai figures matemàtiques precises que constitueixen un llenguatge.

Somnio en poder escriure una novel·la en què tots els encontres d’un ésser humà en la seva existència, efímers o importants, produïts pel que anomenem casualitat o necessitat, dibuixin també figures, expressin ritmes, siguin allò que tal vegada són: un discurs sàviament elaborat, dirigit a una ànima per al seu compliment i, del qual, l’ànima tan sols en capta, al llarg de tota una vida, unes quantes paraules sense il·lació.”

Louis Pauwels & Jacques Bergier, 1960

La realització d'aquesta Tesi doctoral ha estat possible gràcies al meu director de Tesi, el Dr. Eduardo Soriano, a la col·laboració de la Dra. Soledad Alcántara i a la Directora del Departament de Biologia Cel·lular, Dra. Mercè Durfort.

Agraïxo també la col·laboració dels Drs. Alberto Muñoz, Manuel Alvarez-Dolado y Juan Bernal (*Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"*, Madrid) en els experiments realitzats amb rates hipotiroïdees, sense els quals tampoc s'hagués pogut dur a terme aquest treball.

També m'agradaria donar les gràcies als Drs. Constatino Sotelo i Fernando de Castro (*Institut National de la Santé et la Recherche Médicale U-106*, França) per la seva col·laboració i la gran ajuda proporcionades.

Es diu que el plaer atrau i el dolor empeny. Amb aquesta premisa com a base, gràcies a tots els companys de fatigues en aquest llarg viatge per haver contribuït al meu creixement personal, tant si heu participat a través del dolor com a través del plaer. Crec que els éssers humans, així com les neurones, necessitem unes guies o límits que ens indiquin el nostre camí a la vida. Penso que, en el cas de les persones, els senyals provenen de la gent que ens envolta que serà la que, mitjançant l'atracció o el rebuig, ens farà optar per un comportament o un altre i col·laborarà, així, a la formació del nostre caràcter. Per tant, gràcies, ja que tots heu deixat una empremta en la meva personalitat que ja forma part de la meva història personal i que m'ha ajudat a triar, arribats a la cruïlla de les decisions, un camí més basat en les relacions personals i menys en les professionals. En l'escola de la vida, crec que aquesta experiència ha estat una prova més per a poder adquirir, finalment, la serenitat per a acceptar les coses que no puc canviar, el valor per canviar les que puc canviar i la saviesa per a discernir entre ambdues.

INDEX	i
ABREVIATURES	ix
INTRODUCCIÓ	
1. HISTOGÈNESI DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL	1
1.1. Gastrulació i inducció neural	1
1.2. Vesiculació i segmentació	1
1.3. Morfogènesi secundària	4
1.4. Proliferació i migració neuronal	5
1.5. Axogènesi	6
2. LA MIGRACIÓ NEURONAL	7
2.1. Histogènesi i migració en el córtex cerebral	8
2.1.1. El córtex cerebral adult	8
2.1.2. Formació de la preplaca	9
2.1.3. Formació de la placa cortical	9
2.1.4. La zona marginal i la subplaca	10
2.1.5. Hipòtesi de la unitat radial	12
2.1.6. Progenitors d'origen extracortical	14
2.2. Histogènesi i migració cerebel·lar	16
2.2.1 El córtex cerebel·lar	16
2.2.2 Les zones germinals del cerebel	16
2.2.3 La capa de cèl·lules de Purkinje	18
2.2.4 La capa granular interna	19
2.2.5 Les interneurons de la capa molecular	22
2.2.6 Els nuclis precerebel·lars	22
3. MECANISMES DE MIGRACIÓ	24
3.1. La migració radial	25
3.1.1 Els mutants neurològics i la migració radial	26
3.2. La migració tangencial	28
3.3. La Reelina en la migració	31
3.3.1 El mutant <i>reeler</i>	31
3.3.2 Les cèl·lules de Cajal-Retzius	33
3.3.3 La Reelina	33
3.3.4 Hipòtesi del mecanisme d'actuació de la Reelina	35

3.4. La Netrina-1 en la migració.....	37
3.4.1 El paper de la Netrina-1 en l'axogènesi.....	37
3.4.2 Els receptors de la Netrina-1.....	38
4. LA MIGRACIÓ NEURONAL EN ANIMALS HIPOTIROÏDEUS.....	41
4.1. L'hipotiroïdisme en animals experimentals.....	42
4.1.1 Característiques generals dels animals hipotiroïdeus.....	42
4.1.2 Els defectes de migració en animals hipotiroïdeus.....	43
4.2. L'hormona tiroïdea.....	44
4.3. Gens diana de l'hormona tiroïdea.....	45
OBJECTIUS.....	51
MATERIALS I MÈTODES	
1. ORIGEN I UTILITZACIÓ D'ANIMALS EXPERIMENTALS.....	55
2. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE REELINA.....	55
2.1. Tractament i preparació del teixit.....	55
2.2. Hibridació <i>in situ</i> i immunocitoquímica.....	55
2.3. Hibridació <i>in situ</i> de doble marcatge.....	56
2.4. Experiments control.....	57
2.5. Anàlisi de dades.....	57
3. EFECTE DE L'HORMONA TIROÏDEA SOBRE L'EXPRESSIÓ	
DE REELINA I DAB1.....	58
3.1. Tractament i preparació del teixit.....	58
3.2. Extracció de RNA i anàlisi mitjançant Northern Blot.....	58
3.3. Hibridació <i>in situ</i> i immunocitoquímica.....	59
3.4. Cultius organotípics.....	59
3.5. RT-PCR quantitatiu.....	59
3.6. Preparació d'extracte de cervell i anàlisi per immunoblot.....	60
3.7. Experiments control.....	60
3.8. Anàlisi de dades.....	61
4. ESTUDI DELS EFECTES DE LA NETRINA-1 EN LA MIGRACIÓ.....	61
4.1. Tractament i preparació del teixit.....	61
4.2. Cultiu d'explants.....	61
4.3. Immunocitoquímica.....	62
4.4. Hibridació <i>in situ</i>	62

4.5. Experiments control.....	63
4.6. Anàlisi de dades.....	63
RESULTATS	
1. PATRÓ D'EXPRESSIÓ DEL mRNA DE LA REELINA EN EL CERVELL DE RATOLI AL LLARG DEL DESENVOLUPAMENT.....	67
1.1. Expressió primerenca en el cervell anterior.....	67
1.2. Expressió en la zona marginal-cap a I del neocòrtex en desenvolupament.....	68
1.3. Expressió en la zona marginal de l'hipocamp en desenvolupament.....	69
1.4. Expressió en la capa I i stratum lacunosum-moleculare en estadis postnata ls i en l'adult.....	71
1.4.1 Neocòrtex.....	71
1.4.2 Hipocamp.....	71
1.5. Expressió en zones derivades de la placa cortical.....	72
1.5.1 Neocòrtex.....	72
1.5.2 Hipocamp.....	73
1.6. Expressió en els còrtex piriforme i entorrinal.....	74
1.7. Expressió en el bulb olfactori, el cervell anterior basal i l'hipotàlem.....	75
1.7.1 Bulb olfactori.....	75
1.7.2 Cervell anterior basal.....	75
1.7.3 Hipotàlem.....	76
1.8. Expressió en el diencèfal en desenvolupament.....	76
2. PATRÓ D'EXPRESSIÓ DE REELINA I DAB1 EN EL CERVELL DE LA RATA. ESTUDI COMPARATIU ENTRE RATES HIPOTIROÏDEES I CONTROL.....	96
2.1. Expressió del mRNA de reelina en el còrtex cerebral i l'hipocamp de rates control i hipotiroïdees.....	96
2.2. Expressió de la proteïna reelina en el còrtex cerebral i l'hipocamp de rates control i hipotiroïdees.....	97
2.3. Expressió de reelina en el cerebel i bulb olfactori de rates control i hipotiroïdees.....	99
2.4. Expressió del mRNA i proteïna del gen Dab1 en rates	

control i hipotiroïdees.....	99
2.5. Regulació de l'expressió de reelina per l'hormona tiroïdea <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>	100
3. PAPER DE LA NETRINA-1 EN LA MIGRACIÓ DELS PRECURSORS GENERATS EN EL LLAVI RÒMBIC.....	115
3.1. Efecte en neurones i neurites provinents del llavi ròmbic inferior.....	115
3.2. Efecte en neurones i neurites del llavi ròmbic superior i de la capa germinal externa.....	117
3.3. Patró d'expressió de la netrina-1 i dels seus receptors en el tronc encèfalic inferior i cerebel en desenvolupament.....	118
DISCUSSIÓ	
1. LA REELINA EN EL DESENVOLUPAMENT CEREBRAL.....	131
1.1. Expressió primerenca del mRNA de reelina i la regionalització del prosencèfal.....	131
1.2. Expressió del mRNA de reelina en les cèl·lules de Cajal-Retzius.....	132
1.3. La Reelina i la migració neuronal en el córtex cerebral.....	133
1.4. Altres possibles funcions de la Reelina en el desenvolupament neural: creixement axonal.....	136
1.5. L'expressió de reelina en neurones GABAèrgiques del córtex cerebral adult.....	138
1.6. Expressió permanent del mRNA de reelina en el bulb olfatori	139
2. L'HORMONA TIROÏDEA EN LA MIGRACIÓ NEURONAL.....	140
2.1. L'hormona tiroïdea regula els nivells d'expressió de reelina.....	140
2.2. L'hormona tiroïdea afecta directament o indirecta els nivells de proteïna Dab1	141
2.3. L'hormona tiroïdea controla la migració neuronal a través de la regulació dels nivells de Reelina.....	142
3. LA NETRINA-1 EN EL DESENVOLUPAMENT DEL CEREBEL I NUCLIS PRECEREBEL·LOSOS.....	143
3.1. La Netrina-1 és una molècula de senyalització per la	

migració de les neurones destinades al nucli pontí.....	143
3.2. Correlació dels efectes de la Netrina-1 amb el patró d'expressió <i>in vivo</i>.....	145
3.3. La quimiorepulsió que exerceix la Netrina-1 sobre els progenitors de les cèl·lules granulars i els seus axons és dependent de l'edat.....	148
3.4. La Netrina-1 està implicada en el creixement axonal i la migració neuronal.....	150
4. MECANISMES DE MIGRACIÓ NEURONAL.....	151
CONCLUSIONS.....	159
BIBLIOGRAFIA.....	163

ABREVIATURES MÉS UTILITZADES

BP	pons basilar
cem	migració extramural contralateral
CNS	sistema nerviós central
CP	placa cortical
CR	Cajal-Retzius
ECN	nucli cuneat extern
EGL	làmina germinal externa
IGL	làmina granular interna
iim	migració intramural ipsilateral
IO	oliva inferior
IZ	zona intermèdia
LGE	eminència ganglionar lateral
IRL	llavi ròmbic inferior
LRN	nucli reticular lateral
MGE	eminència ganglionar medial
MZ	zona marginal
ML	capa molecular
NRTP	nucli pontí tegmental reticular
PCL	capa de cèl·lules de Purkinje
pms	via de migració pontomedul·lar
PP	preplaca
RMS	ruta de migració rostral
SNC	sistema nerviós central
SP	subplaca
SVZ	zona subventricular
T3/T4	hormona tiroïdea
TR	receptor de l'hormona tiroïdea
TRE	element de resposta a l'hormona tiroïdea
uRL	llavi ròmbic superior
VZ	zona ventricular
WM	substància blanca

Nota: Donada la freqüent i extesa utilització dels acrònims anglesos, no els he traduït per a facilitar la comprensió del text.

1. HISTOGÈNESI DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

1.1. GASTRULACIÓ I INDUCCIÓ NEURAL

El sistema nerviós central (CNS) comença a desenvolupar-se quan el zigot es troba en estat bilaminar. En la zona de juxtaposició de les dues vesícules, l'amniòtica i la vitelina, es genera el disc embrionari que donarà lloc a l'embrió pròpiament dit. Durant la gastrulació, aquest disc es convertirà en trilaminar o tridèrmic passant a estar constituït per les capes anomenades ectoderm, mesoderm i endoderm. El sistema nerviós sorgirà de l'ectoderm que, sota la inducció provocada per molècules secretades en el mesoderm, es dividirà en una part central, la placa neural, dues bandes que la delinearàn, les crestes neurals, i les zones més laterals, que esdevindran la pell de l'embrió i diferents especialitzacions sensorials de tipus placodal. Posteriorment, tindrà lloc el procés anomenat neurulació (**Fig.1**), pel qual la placa neural es replegarà sobre si mateixa, de manera que les crestes neurals s'elevaran deixant un canal neural entre elles. Quan els dos costats del canal es trobin a la línia mitja dorsal, es fusionaran deixant el canal tancat i internalitzant la placa neural. El procés de neurulació no és simultani al llarg del tub neural de manera que les parts més anteriors i posteriors del canal restaran obertes transitòriament formant els neuroporus anterior i posterior (Gould, 1977; De Robertis et al., 1990; Delgado et al., 1998).

1.2. VESICULACIÓ I SEGMENTACIÓ

La inducció esmentada amb anterioritat no és homogènia al llarg dels diferents territoris rostro-caudals de la placa neural, fet que causarà una expressió gènica diferencial que es traduirà en un creixement independent de les diferents regions. Fruit d'aquest creixement diferencial, en el tub neural es poden observar diversos bombaments que acabaran esdevenint vesícules anomenades segments neurals o neuròmers sempre que afectin a tota una secció transversa del tub neural. En el cas de les vesícules òptiques, el creixement diferencial produeix vesícules no segmentàries que no es consideren neuròmers ja que no creuen l'eix longitudinal. Poc després de l'aparició de les vesícules òptiques, en el tub neural es distingeixen tres regions: el prosencèfal primari, el mesencèfal i el rombencèfal. Els processos de creixement i d'especificació genètica de les diferents parts del tub neural (ara controlats per gens de segmentació i interaccions morfogenètiques entre les diferents vesícules), però, no s'aturen i les vesícules primàries es veuen sotmeses a divisions secundàries, particularment el prosencèfal i el rombencèfal (**Fig.2**).

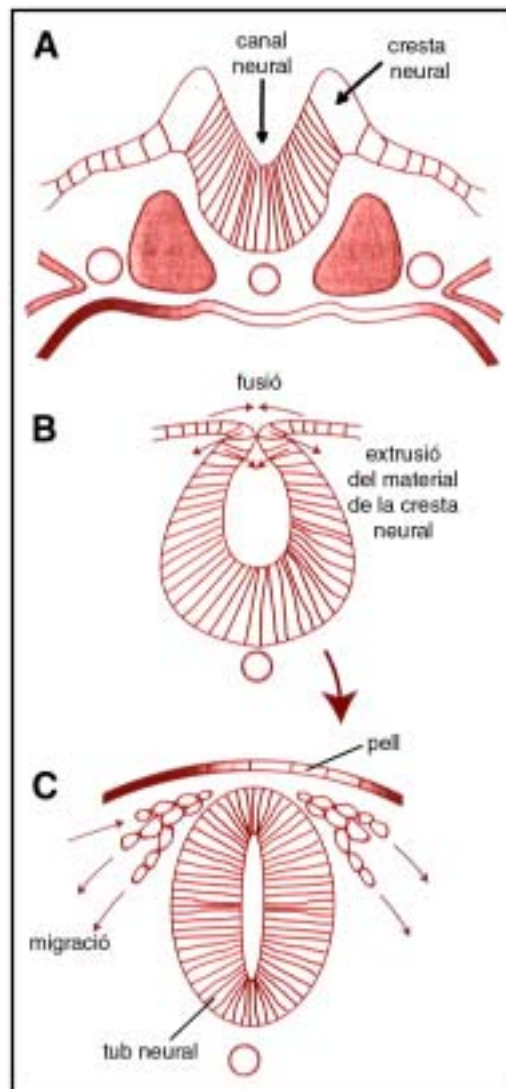


Figura 1. Esquema que il·lustra la neurulació. A) Fase de canal neural. B) Separació i extrusió de les poblacions de la cresta neural (origen del sistema nerviós perifèric). C) Fase de tub neural tancat.

Extret del llibre: Manual de Neurociència, Eds. Delgado JM, Ferrús A, Mora F, Rubia FJ (1998)

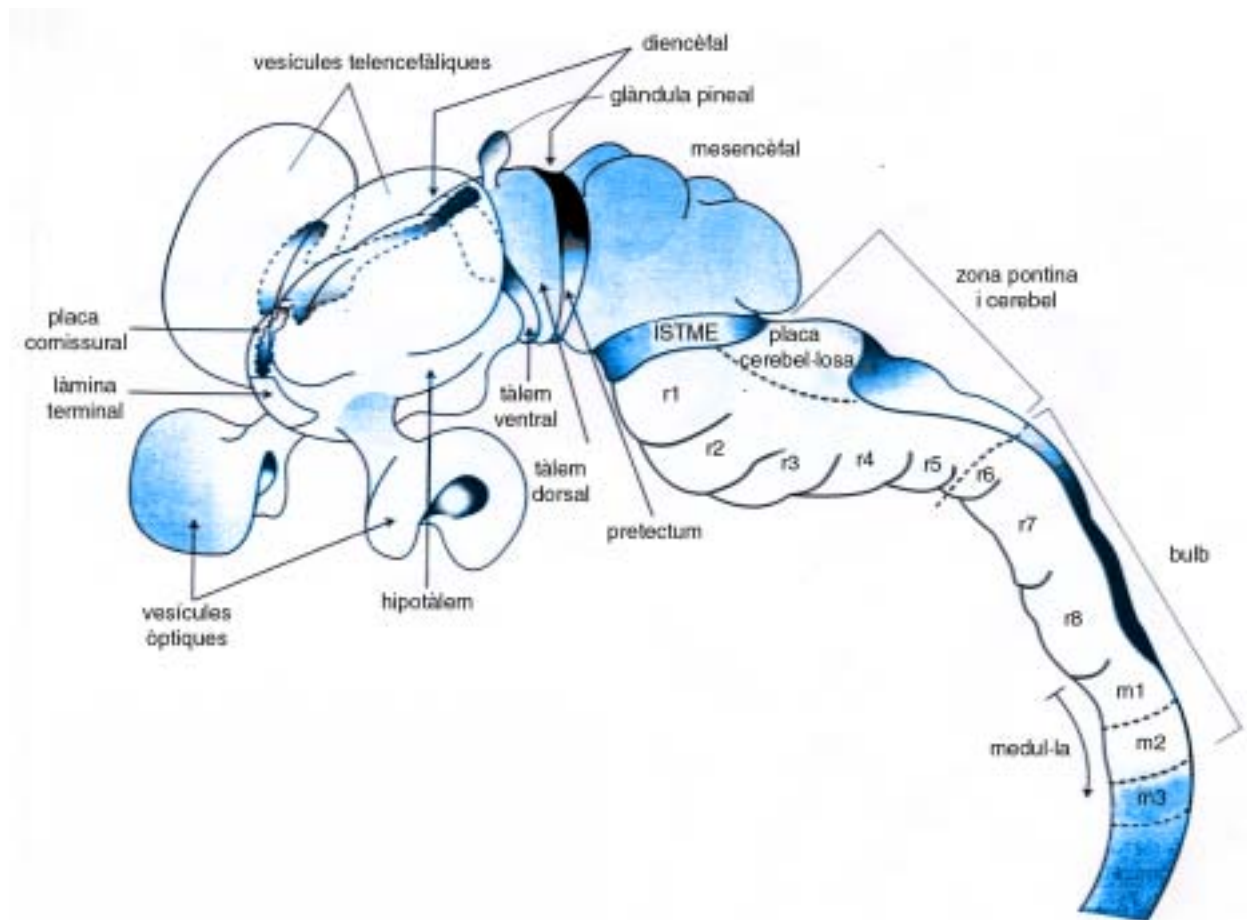


Figura 2. Esquema del sistema nerviós central en estadios embrionaris intermedis. El prosencèfal secundari ja ha donat lloc a les vesícules telencefàliques. Per transparència es mostra la tela corioide del prosencèfal amb les seves ales laterals a cada hemisferi telencefàlic. L'extrem rostral del tub neural queda a nivell de la làmina terminal separada de la tela corioide per la placa comissural (pont prospectiu per a la connexió axonal entre ambdós hemisferis). El diencèfal queda dividit en tres prosòmers. En el mesencèfal hi apareixen els esboços del que seran els col·licles inferiors i superiors. En el rombencèfal hi trobem l'istme, la placa cerebel·losa i una seqüència de rombòmers (r1-r8) seguits dels mielòmers (m1-m3...) que connecten amb la medul·la espinal.

Extret del llibre: Manual de Neurociència, Eds. Delgado JM, Ferrús A, Mora F, Rubia FJ (1998)

INTRODUCCIÓ

El proscèfal primari, que és la porció dilatada anterior que inclou les vesícules òptiques, se subdividirà en el proscèfal secundari i el diencèfal. En la part dorsal del proscèfal secundari es produirà, a més, un bombament bilateral que conduirà a la formació de les vesícules telencefàliques, de les quals en derivarà el telencèfal adult, mentre que la part ventral acabarà formant el territori hipotalàmic. Arribats a aquest punt, val a dir que aquesta concepció embriològica moderna que acabem d'esmentar xoca amb el concepte clàssic de diencèfal, el qual interpreta el territori hipotalàmic com la base del diencèfal i no pas com a la base del prospectiu telencèfal. La protovesícula diencefàlica se subdividirà en tres segments o neuròmers (p1-p3), essent p3 el segment més rostral. Les regions dorsals de cada segment contenen els territoris prospectius de: el pretectum en el cas de p1, el tàlem dorsal més l'epitàlem i la glàndula pineal per p2, i tàlem ventral per p3. En el mesencèfal s'observa la subdivisió del seu sostre en els esboços del que seran els col·lícles superior i inferior (no està clar encara si es tracta o no d'una subdivisió segmentària). En el rombencèfal, en canvi, s'observa una considerable segmentació neuromèrica (rombòmers) que dóna lloc a l'istme del tronc encefàlic, porció estreta que limita amb el mesencèfal, i a una sèrie de vuit rombòmers addicionals (r1-r8). Aproximadament des de l'istme (considerat r0) fins al r5 serà la zona que donarà lloc a la regió pontina del tronc encefàlic adult, incloent el cerebel (format a partir de la placa cerebel·losa dorsal). Els darrers rombòmers, conjuntament amb els 4 o 6 primers mielòmers (segments de la medul·la embrionària), formaran el bulb raquidi adult. Altra vegada s'hauria d'aclarir que en la nomenclatura clàssica es parla de la subdivisió del rombencèfal en dues vesícules, el metencèfal i el mielencèfal, que es correspondrien aproximadament amb aquests dos grups. No obstant, es tracta d'una subdivisió didàctica, ja que les úniques unitats visibles en tots els vertebrats són els rombòmers. Addicionalment, ja des de moments molt primerencs del procés de neurulació, el tub neural es doblegarà sobre el seu eix longitudinal per uns punts de flexió constants. A mida que l'embrió creixi, aquestes flexures es faran menys evidents degut al gran creixement de les diferents zones de l'esboç neural (De Robertis et al., 1990; Krumlauf, 1993; Puelles and Rubenstein, 1993; Wilkins, 1993; Delgado et al 1998).

1.3. MORFOGÈNESI SECUNDÀRIA

Determinats processos de desenvolupament desigual en les diferents zones del CNS acabaran de definir la morfologia del CNS adult. D'una banda, la capacitat proliferativa es mantindrà durant un període més llarg de temps en els territoris dorsals (telencèfal, tàlem, sostre mesencefàlic i cerebel) i això provocarà un creixement desproporcionat d'aquests respecte dels ventrals. D'altra banda, la migració tangencial de grans poblacions neuronals des del llavi

ròmbic (la vora més dorsal del rombencèfal) cap a diverses posicions secundàries de la regió ventral del tub neural generarà els relleus corresponents als nuclis pontins i l'oliva bulbar.

La forma final del cervell també es veurà afectada pels feixos de fibres que creixeran a prop de la superfície (cos callós, tracte òptic, peduncles cerebrals, pons, o piràmides bulbars).

En determinats llocs del tub neural, l'aprimament del tub neural formarà les teles coroides, fenomen considerat un procés de morfogènesi secundària.

1.4. PROLIFERACIÓ I MIGRACIÓ NEURONAL

El sistema nerviós té més varietat de tipus cel·lulars que qualsevol òrgan del cos. Durant el desenvolupament embrionari, les cèl·lules del tub neural generen una enorme varietat de neurones que poblaran els CNS adult. En la majoria de regions del sistema nerviós central les zones germinals es troben adjacents a la superfície de les cavitats que esdevindran el sistema ventricular del cervell. A l'interior de l'epiteli de la zona germinal s'hi troben els progenitors en activa divisió, els quals, en el transcurs del cicle cel·lular, es veuen sotmesos a uns moviments oscil·latoris que acaben conduint a la divisió cel·lular. Durant el cicle cel·lular, el nucli de la cel·lula migra en direcció a la superfície de l'epiteli (o zona marginal) per a després retornar a la superfície ventricular. Es només quan la cèl·lula s'allunya de la zona ventricular que duplica el seu material genètic i en retornar-hi té lloc la divisió cel·lular (Sauer, 1935; Fujita, 1960; Takahashi et al., 1995). Durant la mitosi, està establert que el pla pel qual es divideix la cèl·lula pot ser horitzontal, vertical o intermig respecte la superfície ventricular. Chenn i McConnell (1995) demostraren que una escisió vertical dóna lloc a dues cèl·lules filles aparentment equivalents que podran continuar proliferant, mentre que l'escisió horitzontal genera una filla basal que continuarà proliferant i a una apical que migrarà de la regió proliferativa. Així, podem parlar de dues fases en la neurogènesi: la primera en què els progenitors es divideixen simètricament i, per tant aquesta població doblarà el nombre, i la segona on els progenitors es divideixen asimètricament i, mentre que la cèl·lula filla basal es destina a la generació de nous població de progenitors, l'altra començarà el seu programa específic de migració i diferenciació. Posteriorment, s'han de produir neurones fenotípicament diverses, organitzades en unitats funcionals i interconnectades a través de la formació de contactes axonals i sinàptics específics. Més que utilitzar una única estratègia per a la generació de diversitat neuronal, el tub neural sembla emprar diverses d'estratègies cel·lulars i moleculars per a produir fenotips neuronals específics. Existeixen dos mecanismes generals que contribueixen a la determinació de destins neuronals específics: la determinació del destí cel·lular en funció del seu llinatge o bé un funció de les interaccions amb el seu entorn. En el primer, una cèl·lula heredarà de la seva progenitora

INTRODUCCIÓ

un potencial de desenvolupament restringit. En aquest cas pot succeir que el progenitor estigui predeterminat a produir un sol tipus de neurones, o bé a produir-ne diversos tipus, sempre seguint un pla intrínsec. En el segon cas, els precursors neuronals o la seva progènie serien pluripotents, o sigui, les cèl·lules podrien adquirir diferents fenotips en funció de les interaccions entre elles i el seu microentorn. Existeixen regions on la determinació del destí neuronal té lloc únicament mitjançant un del dos mecanismes, mentre que en d'altres zones coexisteixen els dos (McConnell 1991, 1995).

La gran majoria de les neurones dels vertebrats són generades en llocs diferents dels que ocuparan en el sistema nerviós adult. Les neurones immadures o neuroblasts posseeixen una elevada capacitat de moure's abans d'assolir la seva posició final i establir connexions sinàptiques permanents, de manera que seran capaces de migrar des de la zona de proliferació, on han sofert la seva darrera divisió cel·lular, fins a la seva posició definitiva en el cervell adult. Els diferents tipus de neuroblasts migren en etapes diferents, i mentre que alguns migren abans d'emetre els seus axons, d'altres ho fan després de l'extensió d'aquests. Aquesta migració s'establirà per unes rutes específiques, seguint un programa temporal molt ben definit i s'aturarà en uns punts concisament determinats. A més del pur desplaçament, la migració també cobrirà altres funcions essencials per a la diferenciació neuronal: servirà per a establir la identitat d'algunes neurones, definir-ne les seves propietats funcionals i, fins i tot, les connexions futures.

No es pot parlar d'un sistema bàsic de migració per a totes les regions del sistema nerviós, donat que es tracta d'un òrgan molt complex amb zones extremadament diverses amb funcions característiques. Ja d'entrada, les cèl·lules situades en regions dorsals formaran estructures laminades, com és el cas del córtex cerebral, el cerebel, l'hipocamp i el bulb olfatori, mentre que no ho faran les que es trobin en regions ventrals (el tàlam i el nucli geniculat lateral són excepcions a aquesta generalització). En l'apartat 2 descriuré amb més detall la migració que té lloc tant al córtex cerebral com en el cerebel.

1.5. AXOGÈNESI

Una vegada la neurona ha migrat fins a la seva posició definitiva, i en alguns casos fins i tot abans, comença a emetre un axó al final del qual s'hi localitza una estructura anomenada conus de creixement. Aquest posseeix una elevada motilitat i actua com a un sensor de l'ambient extern pel qual ha de créixer l'axó, gràcies a la projecció de filopodis i extensions lamelars (capes planes de citoplasma entre els filopodis) que s'extenen i retrauen contínuament. A efectes pràctics, el conus de creixement suposa un augment substancial de la superfície cel·lular exposada a l'ambient.

Els axons creixen travessant llargues distàncies a través de rutes específiques per a trobar les seves dianes correctes, i serà el conus de creixement l'encarregat d'anar examinant contínuament el terreny, integrant la informació provinent de diferents senyals que trobarà al llarg del camí. Existeixen quatre forces bàsiques de guia: atracció per contacte, quimioatracció, repulsió per contacte i quimiorepulsió (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Inicialment es pensà que la recerca de molècules de guia conduiria a famílies de proteïnes distintes que encaixarien amb cadascun d'aquests mecanismes. No obstant, ha resultat que la majoria de les molècules trobades són bifuncionals, essent capaces de mitjançar tant l'atracció com la repulsió depenent del context. Concretament, una de les primeres famílies implicades en la quimioatracció fou la de les Netrines (Hedgecock et al., 1990; Serafini et al., 1994), les quals s'han relacionat posteriorment amb la quimiorepulsió (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995; Winberg et al., 1998). El mateix sembla ocórrer amb la família de les Semaforines (Kolodkin et al., 1993; Luo et al., 1993; Wong et al., 1997; Bagnard et al., 1998). Més recentment, el descobriment de les proteïnes Slit també ha revelat múltiples funcions de guia per a aquestes molècules (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999; Li et al., 1999; Wang et al., 1999). Alhora, el repertori de comportaments del conus de creixement en diferents punts al llarg de la trajectòria augmenta encara més si tenim en compte la dinàmica de regulació de l'expressió dels receptors per a molècules senyalitzadores com a resposta a senyals extrínsecs.

Una vegada les neurones han assolit els seus llocs de projecció, ja podran començar a establir sinapsis funcionals, el nombre de les quals, inicialment, serà superior al necessari per a una fisiologia i comportament coherents i, sobretot, adaptats al medi ambient. També el nombre de dianes contactades estarà en excés, de manera que, en general, l'estabilització de sinapsis serà depenent de la seva activitat.

2. LA MIGRACIÓ NEURONAL

Tal i com hem esmentat anteriorment, la migració neuronal és un pas essencial en la gènesi del sistema nerviós central (Rakic, 1990; Hatten, 1993), ja que aquesta permetrà, en alguns casos, establir la identitat d'algunes neurones, definir-ne les seves propietats funcionals i, fins i tot, les connexions futures. En moltes estructures laminades del cervell de mamífer, com en el córtex cerebral o en el cerebel·lar, les darreres neurones generades hauran d'atravessar una capa de neurones generades amb anterioritat. En el córtex cerebral, concretament, les neurones postmitòtiques segueixen una seqüència de migració ordenada de dins cap enfora que determina

INTRODUCCIÓ

la laminació i la citoarquitectura normals (Angevine and Sidman, 1961; Marín-Padilla, 1971, 1998; Rakic, 1974, 1988). Per tant, la migració neuronal s'hauria de considerar una "necessitat biològica" en la que es permet la comunicació entre les neurones de formació primerenca i tardana en etapes crítiques del desenvolupament, abans que estableixin les connexions sinàptiques. La migració anòmala, que condueix a una posició errònia de les neurones corticals, provoca malformacions citoarquitectòniques severes amb conseqüències funcionals manifestades en forma de deficiències cognitives, retard mental i desordres motors (Caviness and Sidman, 1973; Barth, 1987; Goffinet, 1992; Eksioglu et al., 1996; Howell et al., 1997b, des Portes et al., 1998; Gleeson et al., 1998).

El desplaçament de les neurones immadures és particularment prominent en el cervell dels mamífers i es dona, majoritàriament, en estadis prenatals. La llargada de la ruta migratòria pot abarcar des de menys de 100µm en un petit cervell de ratolí fins a un quants milers de micròmetres en algunes àrees del cervell humà, tot i que la mida de les neurones migradores és aproximadament el mateix en la majoria de mamífers.

2.1. HISTOGÈNESI I MIGRACIÓ EN EL CÒRTEX CEREBRAL

2.1.1 El còrtex cerebral adult

El còrtex cerebral es desenvoluparà en el sostre (*pallium*) de les dues vesícules telencefàliques que es formen a la part rostral del tub neural. En l'animal adult, aquest còrtex és, amb diferència, la zona més extensa del cervell del mamífers i està dividida en diferents àrees que foren definides inicialment en funció de diferències citològiques i, posteriorment, s'esbrinà que també posseïen funcions diferents (Brodmann, 1909). Totes les àrees cerebrals presenten una organització bàsica similar, amb les neurones disposades en sis capes. La distinció entre capes és deguda a variacions de la densitat i el tamany dels cossos cel·lulars al llarg de tota la profunditat cortical (Krieg, 1946). Cada capa compta amb els dos tipus principals de neurones del còrtex: les cèl·lules piramidals i les no-piramidals (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1949; Szentágothai, 1973). Les cèl·lules piramidals, que estan clarament definides per la morfologia dels seus cossos cel·lulars i pel seu patró d'arborització dendrítica bastant estricte, són les neurones de projecció del còrtex que utilitzen un aminoàcid excitador, el glutamat, com a neurotransmissor (Parnavelas et al., 1984). Les cèl·lules no-piramidals, que són les interneurons corticals, pertanyen a un grup de cèl·lules més heterogeni que presenten diverses morfologies i semblances moleculars (Szentágothai, 1973; Fairén et al., 1984; Naegele and

Barnstable, 1989). Pràcticament totes les interneurons contenen el neurotransmissor inhibitor GABA i també poden expressar un o més neuropèptids (Parnavelas et al., 1989).

2.1.2 Formació de la preplaca

En estadis molt primerencs del desenvolupament, el *pallium*, que voreja els dos ventricles laterals, està constituït per cèl·lules germinals indiferenciades i, en general, ens referim a elles com a neuroepiteli o zona ventricular (VZ) (**Fig.3A**). Aquestes cèl·lules generen inicialment progenitors pluripotents que podran donar lloc tant a precursors neuronals com gials (Angevine and Sidman, 1961; Berry and Rogers, 1965; Hicks and D'Amato, 1968; Turner and Cepko, 1987; Bayer and Altman, 1991; Davis and Temple, 1995; Williams and Price, 1995; Lavdas et al., 1996). Les primeres cèl·lules postmitòtiques, que es generen l'onzè dia de gestació (E11) en el ratolí (Caviness 1982; Takahashi et al., 1995), sortiran del neuroepiteli migrant radialment (O'Leary and Borngasser 1992) per a formar la primera capa cortical reconeixible, la capa plexiforme primordial o preplaca (PP) (**Fig.3B**) (Marín-Padilla, 1971, 1972; Rickmann, 1977; Stewart and Pearlman, 1987; Uylings et al., 1990; Wood et al, 1992). Les neurones de la preplaca s'anomenen neurones pioneres ja que constitueixen una població heterogènia de cèl·lules corticals que són les primeres en diferenciar-se, madurar i rebre contactes sinàptics. Es considera que formen una organització cortical primitiva que és funcionalment activa durant la vida embrionària primerenca (Bayer and Altman, 1990; Kostovic and Molliver, 1974; Kostovic and Rakic, 1990; Marín-Padilla, 1971, 1978, 1988; Mrzljak et al., 1988, 1990; Rickmann and Wolf, 1981; Smart, 1983; Stewart and Pearlman, 1987; Uylings et al., 1990). Essencialment, la PP està constituïda per cèl·lules de Cajal-Retzius (CR) i per les neurones de la subplaca, de la qual en parlaré més avall. Just després d'aquesta primera onada de migració provinent de la VZ, apareix un grup d'axons entre la zona germinativa i la capa de cèl·lules postmitòtiques. Aquests axons pioners provenen d'aquestes primeres cèl·lules postmitòtiques i definiran la zona intermitja (IZ) (**Fig.3C**).

2.1.3 Formació de la placa cortical

La cèl·lules progenitores de la VZ, que es troben en contínua proliferació, generen una segona onada de neurones postmitòtiques que se situarà enmig de la PP en forma d'una densa capa de cèl·lules. D'aquesta manera la PP quedarà dividida en dues parts: la zona marginal (MZ) i la subplaca (SP). A la nova capa formada, la placa cortical (CP), s'hi acumularan les neurones que arribin de nou des de la VZ per acabar formant tot el gruix de córtex madur (**Fig.3D**). A mida que es vagin generant neurones postmitòtiques en la VZ, aquestes aniran migrant cap a la

INTRODUCCIÓ

placa cortical, atravessaran la capa de les seves predecessores i s'aturaran al capdamunt de la placa per sota de la zona marginal (Berry and Rogers, 1965; Rakic, 1974). Com ja he esmentat, el córtex adult de mamífers està organitzat en sis capes de neurones, essent la I la més superficial. Durant el seu desenvolupament, doncs, la primera capa en generar-se serà la més profunda, capa VI, i successivament, s'aniran formant totes les capes fins a la II, poblada per les neurones més joves. Així, el cortex es va desenvolupant seqüencialment de dins cap enfora (Angevine and Sidman, 1961; Rakic, 1974).

La generació de neurones (neurogènesi) que té lloc a la VZ és un procés altament regulat i, en el ratolí, consta de 11 cicles de divisió cel·lular que permetran poblar tot el córtex adult (Takahashi et al., 1995). Aquest interval neurogenètic comença a E11 i continua durant sis dies fins que, a E17, sorgeixen les darreres neurones formades. Tanmateix, la migració de les neurones dirigides a capes més altes continua fins al final de la primera setmana postnatal (Berry and Rogers, 1965; Lund and Mustari, 1977; Miller, 1988; Bayer and Altman, 1991).

2.1.4 La zona marginal i la subplaca

Marín-Padilla (1978) fou el primer que proposà que la CP divideix la preplaca. Així la part superior de la preplaca esdevindrà l'anomenada zona marginal (MZ), futura capa I en el córtex madur, i la part inferior es convertirà en la subplaca (SP) (**Fig.3D**). Experiments recents han confirmat i extès aquest model (Luskin and Shatz, 1985), permetent-nos saber que les neurones de la subplaca constitueixen una població heterogènia (Chun and Shatz, 1989; Mrzljak et al., 1988, 1990; Kostovic and Rakic, 1990; Meinecke and Rakic, 1992; Del Ríó et al., 1992; Uylings and Delalle, 1997), que neixen després de les neurones de la zona marginal i podrien estar parcialment co-generades amb les primeres neurones que poblaran la placa cortical (Mrzljak et al., 1990). En el desenvolupament cortical, les neurones de la subplaca juguen un paper essencial en la formació inicial de connexions. S'ha observat que aquestes cèl·lules atrauen els aferents corticals provinents del tàlam i podrien estar guiant i obrint camí a algunes rutes corticofugals (Ghosh et al., 1990; Ghosh and Shatz 1992a, 1992b; McConnell 1989; Mólnar and Blakemore, 1995). D'aquesta manera, la subplaca permetrà que els aferents corticals s'aproximin al córtex, arribant-hi cap a E15. Una vegada dins de la pròpia subplaca, els axons talàmics s'esperen fins a E17-E18, moment en el qual es pot observar com giren de cop i envaeixen radialment i en massa la placa cortical, arboritzant i acabant majoritàriament a la capa IV el dia del naixement. Al llarg del desenvolupament, aquests axons que entren i ascendeixen, juntament amb l'addició de noves neurones corticals, convertiran la densa placa cortical en un

córtex més expandit amb diferents capes i neurones diferenciades (Dehay et al., 1989, 1991; Mrzljak et al., 1988, Rakic, 1988; Windrem and Finlay, 1991).

Pel que fa a la MZ, està formada principalment per un tipus cel·lular anomenat neurona de Cajal-Retzius que es caracteritza pel seu gran i allargat perikarion (Del Río et al., 1995; Marín-Padilla, 1984, 1988). Aquesta tipus cel·lular fou descrit per primera vegada fa al voltant d'un segle per Ramon y Cajal i Retzius (Retzius, 1893; Ramon y Cajal, 1911). La seva funció, de rellevant importància per a la migració de les neurones cap a la CP, la revisaré en detall en l'apartat 3.3.2. També poblen la MZ un altre tipus de neurones més petites, GABA-positives i considerades neurones inhibidores locals (Marín-Padilla, 1982, 1984, 1988).

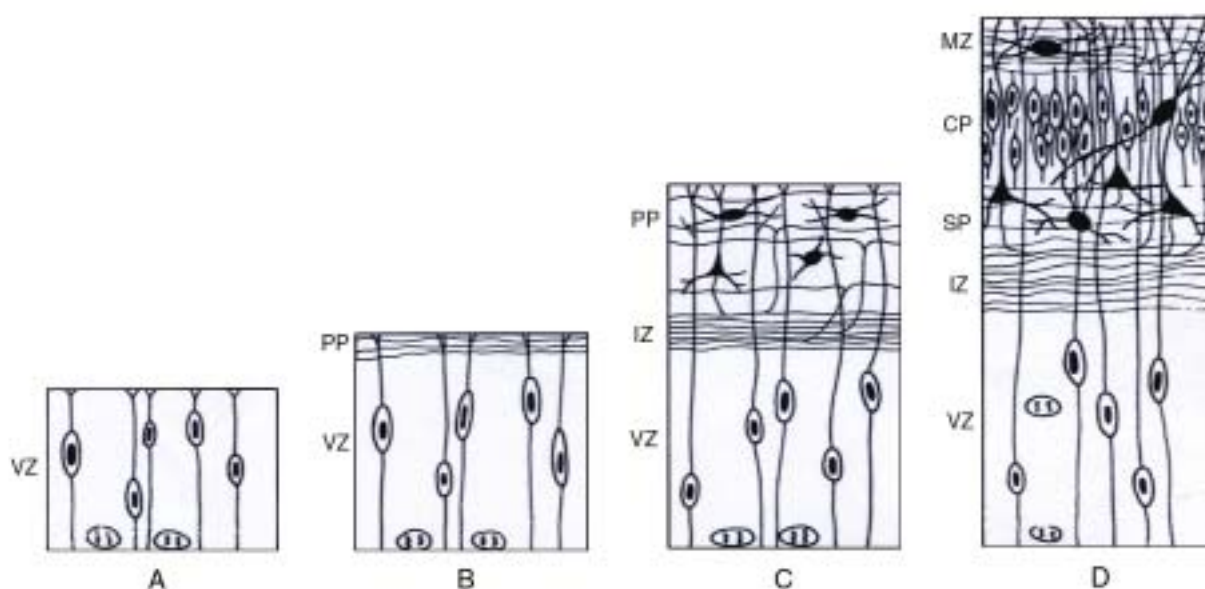


Figura 3. Representació esquemàtica de quatre fases en el desenvolupament fetal de la laminació cortical. **CP**, placa cortical; **IZ**, zona intermèdia; **MZ**, zona marginal; **PP**, preplaca; **SP**, subplaca; **VZ**, zona ventricular. Extret de Supèr et al. (1998).

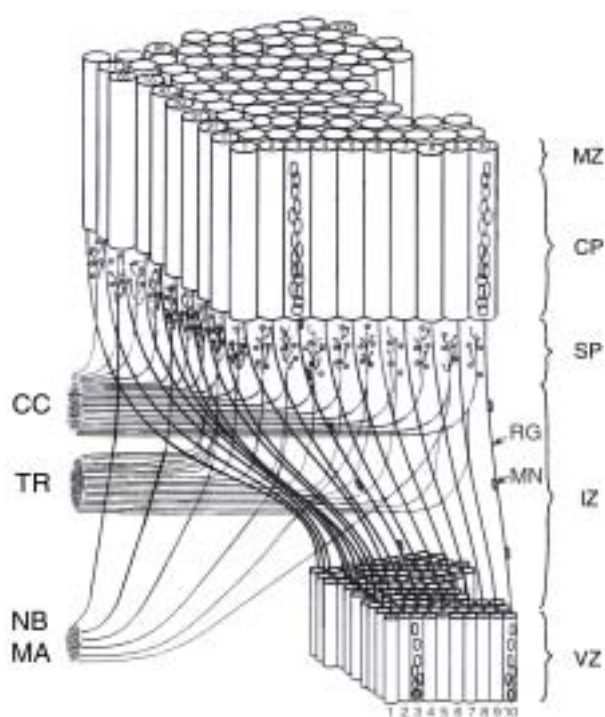
2.1.5 Hipòtesi de la unitat radial

Fins als anys 70, s'avançà relativament poc en els mecanismes cel·lulars i moleculars implicats en la migració del córtex. Fou a partir d'aquest moment que la combinació del microscopi electrònic i de les anàlisis autoradiogràfiques de ^3H -timidina revelaren que les neurones postmitòtiques migren seguint les fibres allargades d'uns elements no neurals anomenats cèl·lules de glia radial (Rakic 1972). Aquestes cèl·lules bipolars extenen els seus processos al través de la paret cerebral fetal des de la VZ fins a les membranes pials, i, durant el període de migració, grups de cèl·lules postmitòtiques originades a la zona proliferativa segueixen una ruta radial consistent en una sola o, més sovint, en múltiples fibres gials (Rakic 1985, 1994). Aquest desplegament de neurones migradores en forma de columnes radials en un individu aïllat i l'engrandiment de la superfície cortical per addició d'aquestes columnes al llarg de l'evolució del SNC poden ser explicats en el context de la *Hipòtesi de la unitat radial* (Rakic 1988) (**Fig.4**). Aquesta hipòtesi es basà inicialment en l'observació que, una vegada les cèl·lules postmitòtiques havien iniciat el moviment, romanien unides a un fascicle de glia radial donat preservant, així, les seves posicions al llarg de tot el recorregut (Rakic 1972, 1981). Més endavant, s'observà que el patró de distribució de cèl·lules marcades amb ^3H -timidina indicava que les columnes estaven constituïdes per diversos clons (Rakic 1988). La introducció de noves tècniques de transferència de gens retrovirals (Sanes 1989, Luskin et al., 1988) juntament amb estudis de ratolins quimèrics i transgènics (Nakatsuji et al., 1991; Tan and Breen 1993; Soriano et al., 1995; Kornack and Rakic 1995) han proporcionat evidències més directes que la majoria de neurones postmitòtiques provinents d'un mateix clon es mouen i romanen distribuïdes radialment en el córtex.

Existeixen, però, determinades poblacions de cèl·lules relacionades clonalment que no obeeixen les restriccions radials estrictes. Estudis en ratolins han suggerit la dispersió d'algunes cèl·lules corticals relacionades clonament (Walsh and Cepko 1988). En el cervell de la fura, s'han trobat al voltant d'un 15% de neurones que semblen no migrar radialment (O'Rourke et al., 1992). Existeix una àmplia controvèrsia respecte fins a quin punt aquesta migració no radial és minoritària, ja que sobre la hipòtesi de la unitat radial hi descansa una altra hipòtesi encara més complexa: *la hipòtesi del protomapa*. Formulada per Rakic el 1988, aquesta es planteja com és possible que sorgeixin les diferents àrees cerebrals a partir d'un neuroepiteli inicialment tant uniforme. S'hipotetitzava que aquesta zona germinal ja està predeterminada a donar unes certes regions corticals, com si ja portés una empremta de l'estructura adulta. Evidències experimentals han sorgit tant confirmant (Barbe and Levitt, 1991; Arimatsu et al., 1999; Cohen-Tannoudji et

al., 1994; Bulfone et al., 1995; Dehay et al., 1993; Polleux et al., 1997) com contradictent (Schlaggar and O'Leary, 1991; O'Leary 1989; Walsh and Cepko 1992, 1993) aquesta hipòtesi. Recentment, fins i tot, s'ha mostrat que determinades neurones corticals s'originen fora de la VZ, concretament a les eminències ganglionars subjacents (Anderson et al., 1997; Tamamaki et al., 1997; Lavdas et al., 1999; Zhu et al., 1999), i que migren tangencialment cap al córtex.

Figura 4. Esquema que explicaria la hipòtesi de la unitat radial, elaborat a partir d'observacions realitzades en primats. Les cèl·lules post-mitòtiques en migració (**MN**) utilitzen la glia radial (**RG**) per a sortir de la zona ventricular (**VZ**). Atravessen la zona intermèdia (**IZ**) i arriben a la subplaca (**SP**) on interactuen amb els aferents que es troben "en espera" (**NB**, **MA**, aferents dels centres subcorticals nucli basal i monoaminèrgic, respectivament; **TR**, radiació talàmica; **CC**, feixos d'axons cortico-corticals ipsilaterals i contralaterals). Les neurones de nova generació atravesen les que ja es trobaven a la placa cortical (**CP**) i se situen entre aquestes i la zona marginal (**MZ**), formant una columna radial de cèl·lules que comparteixen un lloc d'origen comú, però amb diferents temps de generació. Així, es preserva la distribució espacial que existia a la **VZ** en proliferació. Extret de Rakic (1988).



2.1.6 Progenitors d'origen extracortical

Ja he comentat amb anterioritat que els principals tipus de neurones del còrtex són les neurones piramidals excitadores i les interneurons no-piramidals inhibidores. Els primers estudis de llinatge (Parnavelas et al., 1991; Luskin et al., 1993a; Mione et al., 1994) suggeriren que aquests dos tipus sorgien de diferents progenitors a la VZ. Més recentment, s'ha demostrat que, mitjançant la migració radial, només les neurones piramidals mantenen una relació espacial estreta amb els seus parents clonals. Contràriament, les neurones no-piramidals es troben aïllades, o bé en parelles, relacionades clonalment (Mione et al., 1997; Tan et al., 1998) i es creu que formen part de clons més grans, essent, la seva isolació, resultat de la migració tangencial en el còrtex (Mione et al., 1997). A més, la presència d'un nombre relativament petit d'interneurons disperses, comparat amb els amplis clons piramidals, suggereix l'existència d'altres orígens potencials diferents de la VZ (Mione et al., 1994; Tan et al., 1998). D'altra banda, s'ha descobert que les eminències ganglionar lateral (LGE) i medial (MGE) del telencèfal ventral són fonts de neurones corticals (**Fig.5**). L'estudi d'aquestes zones des de diverses aproximacions experimentals (Porteus et al., 1994; De Carlos et al., 1996; Tamamaki et al., 1997; Anderson et al., 1997; Grigoriou et al., 1998; Zhu et al., 1999; Lavdas et al., 1999; Sussel et al., 1999; Wichterle et al., 1999; Parnavelas 2000) ha portat a concloure que la MGE és la principal font de neurones no-piramidals del neocòrtex, de manera que en estadis molt primerencs originarà la majoria de les neurones de la preplaca (**Fig.5A**), i ja en edats més avançades donarà lloc a neurones que poblaran la part inferior de la IZ i la CP (**Fig.5B,C**). D'altra banda també s'ha observat que la LGE proporciona algunes neurones del còrtex, tot i que el destí principal d'aquestes és el bulb olfactori. No se sap encara si les propietats morfològiques i moleculars de les neurones de la MGE que poblen la CP difereixen de les d'aquelles neurones no-piramidals provinents de la VZ. Se sap que les neurones corticals que s'originen a la MGE contenen el neurotransmissor GABA (Lavdas et al., 1999) i, en concret, la majoria de les que colonitzen la MZ (inicialment preplaca) mostren característiques de les cèl·lules de CR (Meyer et al., 1998; Supèr et al., 1998) i també expressen el gen de la reelina (característic d'aquestes cèl·lules).

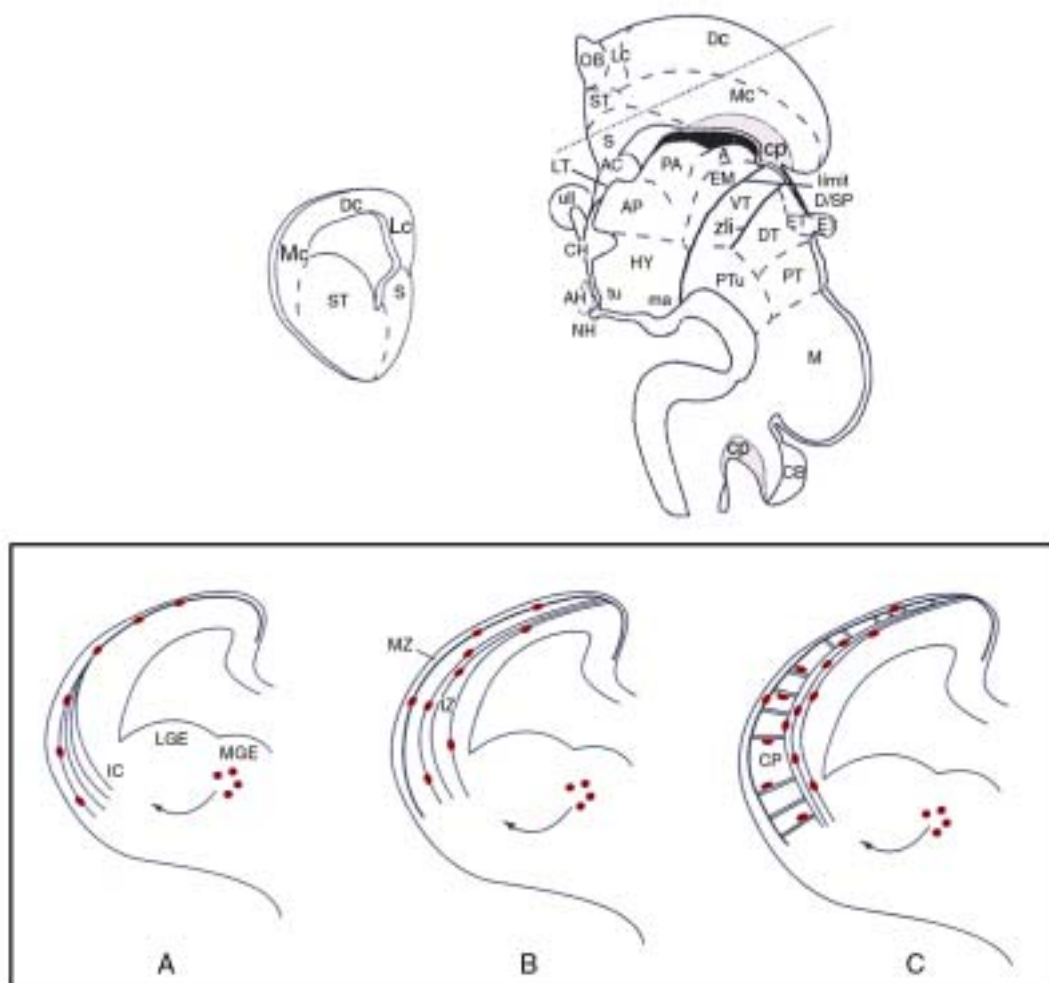


Figura 5. Dalt) Secció coronal del cervell anterior que mostra el nivell en què es localitzen les eminències ganglionar i medial (**MGE**) i lateral (**LGE**). Baix) Les neurones generades a la **MGE** (mostrades en **vermell**) migren cap al córtex associades als axons corticofugals. La migració inicial cap a la zona marginal (**MZ**) i a la zona intermèdia (**IZ**) es duria a terme al llarg dels axons del sistema corticofugal, mentre que les neurones destinades a la placa cortical (**CP**) continuarien al llarg dels axons radials emesos per les cèl·lules pioneres de la **MZ**. **A**, àrea amigdalina; **CA**, comissura anterior; **AH**, adenohipòfisi; **AP**, àrea preòptica; **C**, claustrum; **CH**, quiasma òptic; **CB**, cerebel; **cp**, plexe coroide; **Dc**, córtex dorsal; **D/SP**, límit diencèfal-prosencèfal secundari; **DT**, tàlem dorsal; **E**, epífisi; **EM**, eminència talàmica; **ET**, epitàlem; **ull**, vesícula òptica; **HYtu&HYma**, hipotàlem tuberal i mamil·lar; **IC**, càpsula interna; **Lc**, córtex lateral; **LT**, làmina terminal; **M**, mesencèfal; **Mc**, córtex medial; **NH**, neurohipòfisi; **OB**, bulb olfatori; **PA**, palidum; **PT**, preteetum; **PTu**, tubercle posterior; **S**, àrea septal; **VT**, tàlem ventral; **zli**, zona limitans intratalàmica.

Modificat de Parnavelas (2000) i Rubenstein et al. (1998).

2.2. HISTOGÈNESI I MIGRACIÓ CEREBEL·LAR

2.2.1 El córtex cerebel·lar

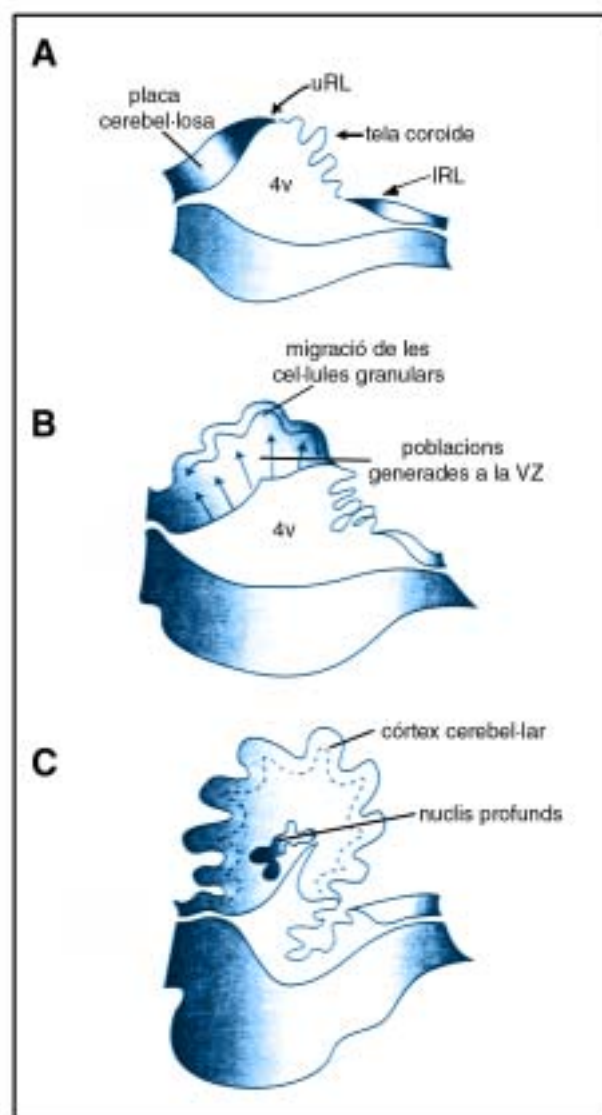
El cerebel, com ja he esmentat en el punt 1.2, deriva de la placa cerebel·losa dorsal situada en el tradicionalment anomenat metencèfal (**Fig.2**). En l'estadi E9, aquesta regió del tub neural encara no ha sofert el procés de neurulació, de manera que resta oberta per la seva part dorsal. Alhora, el tub neural també està sofrint una torsió per aquest punt, la flexura pontina, fet que provocarà que l'obertura dorsal es doblegui formant una estructura semblant a una boca, els extrems de la qual s'han anomenat llavi ròmbic (His, 1891; Harkmark, 1954; Hatten and Heintz, 1995). Tradicionalment, s'ha pensat que el cerebel emergia exclusivament d'una regió germinal situada en el metencèfal, delimitat anteriorment per l'istme i posteriorment pel plexe coroide (**Fig.2 i 6A**). Estudis recents demostren que la regió del tub neural que s'extén més enllà de l'istme cap al mesencèfal caudal també originarà cèl·lules que colonitzaran el cerebel (Martínez and Alvarado-Mallart, 1989; Hallonet et al., 1990; Alvarez Otero et al., 1993). El desenvolupament del sistema cerebel·lar implica la generació dels nuclis profunds del cerebel i l'establiment del córtex cerebel·lar al damunt d'aquests (**Fig.6B,C**). En el cerebel adult, aquest córtex cerebel·lar consta de quatre capes concèntriques: la capa molecular (ML), la capa de neurones de Purkinje (PCL), la capa granular interna (IGL) i la substància blanca (WM), essent la ML més superficial (**Fig.7D**). La cèl·lula de Purkinje, amb el seu arbre dendrític característic que ramifica només en el pla sagital del cerebel, és la neurona principal i l'únic camí de sortida de la informació del cerebel. La IGL alberga les neurones granulars, mentre que a la ML s'hi troben les interneurones, o neurones de circuit local. Alhora, entre d'altres tipus de cèl·lules glials, en el cerebel també hi apareixen unes cèl·lules astroglials especialitzades, anomenades cèl·lules epitelials de Golgi, que es troben a la capa de cèl·lules de Purkinje i extenen radialment un o més processos, anomenats fibres glials de Bergmann.

2.2.2 Les zones germinals del cerebel

A diferència d'altres àrees del CNS de vertebrats, el cerebel conté dues zones germinals separades: una zona germinal primària (zona ventricular; VZ) que revesteix el sostre del IV ventricle i una matriu germinal secundària (làmina germinal externa; EGL) que cobreix el córtex cerebel·lar (**Fig.7A**). Els progenitors que s'originaran en cadascuna de les matrius germinals migraran en direccions oposades cap a l'àrea que queda entre les dues zones germinals, interaccionant entre ells i diferenciant-se.

Figura 6. Esquema il·lustrant la morfogènesi del cerebel representada mitjançant talls sagitals (rostral a l'esquerra, dorsal a dalt). A) En estadis molt primerencs del desenvolupament (E13), en seccions sagitals de cervell posterior es diferencia clarament el llavi ròmbic superior (**uRL**) de l'inferior (**IRL**). B) El córtex cerebel·lar s'anirà expandint i formant a partir dels progenitors de cèl·lules de Purkinje i interneurons provinents de la zona ventricular (**VZ**), la migració dels quals tindrà lloc entre E13 i E17. Simultàniament, es va establir a la superfície cerebel·lar la làmina germinal externa, que anirà produint progenitors de cèl·lules granulars fins a P15. C) En el cerebel madur s'acabarà distingint una zona superior corresponent al córtex cerebel·lar i una zona inferior poblada pels nuclis profunds del cerebel.

Modificat del llibre: Manual de Neurociència, Eds. Delgado JM, Ferrús A, Mora F, Rubia FJ (1998).



En el neuroepiteli ventricular s'hi originaran totes les poblacions neuronals del cerebel menys les cèl·lules granulars. Recentment, i trencant amb la tradicional suposició que tant les interneurons de la ML com les cèl·lules granulars provenien de la EGL, s'ha demostrat que totes les neurones cerebel·lars estan relacionades clonalment exceptuant les cèl·lules granulars (Mathis et al., 1997), les quals són les úniques que provenen de la EGL (Alder et al., 1996; Hallonet et al., 1990; Gao and Hatten, 1994b; Zhang and Goldman, 1996).

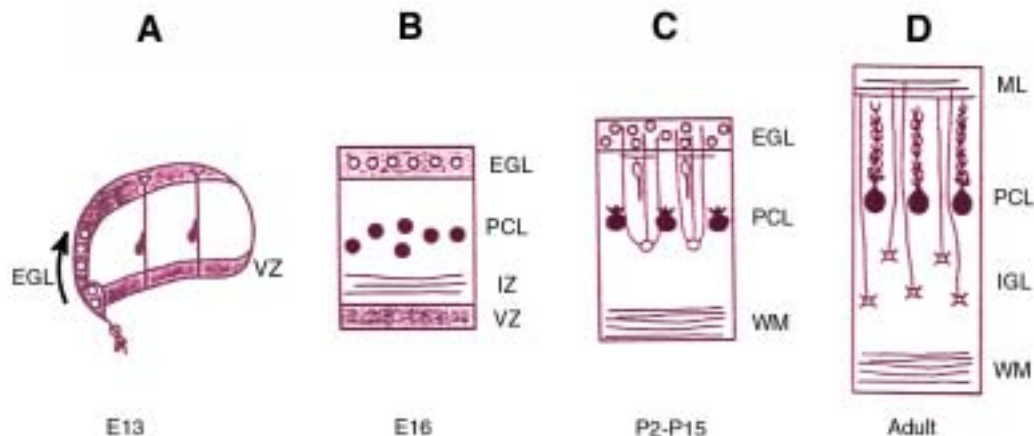


Figura 7. Esquema mostrant el programa de desenvolupament del còrtex cerebel·lar. A) A **E13** encara no es fa palesa l'existència de la làmina germinal externa (**EGL**) ja que tot just comencen a migrar els precursors de les cèl·lules granulars provinents del llavi ròmbic superior. Des de la zona ventricular (**VZ**), els precursors de les cèl·lules de Purkinje comencen a migrar radialment en direcció a la superfície cerebel·lar. B) A **E16** ja es diferencien la **EGL**, una densa capa rudimentària i irregular de cèl·lules de Purkinje (**PCL**), una zona intermèdia atravesada per fibres (**IZ**) i la **VZ**. C) Entre **P2** i **P15** comença la migració de les cèl·lules granulars cap a l'interior i les cèl·lules de Purkinje ja s'han establert com a monocapa més diferenciada. **WM**, substància blanca. D) Organització laminada del còrtex cerebel·lar **adult** amb una superficial capa molecular (**ML**) atravesada per les fibres paral·leles de les cèl·lules granulars, la **PCL** totalment diferenciada, la **IGL** i la **WM**. Modificat de Hatten (1999).

2.2.3 La capa de cèl·lules de Purkinje

Entre els estadis E10-E14, en el ratolí, la proliferació de precursors comença a engruixir la VZ (Miale and Sidman, 1961). La primera tongada de precursors que esdevenen postmitòtics en aquesta placa cerebel·lar estan destinats a generar els nuclis profunds del cerebel (Pierce, 1975) (**Fig.6C**). A mida que aquestes cèl·lules comencen a sortir del cicle cel·lular, entre els estadis E10-E11, formen un mantell al damunt de la zona ventricular (Altman and Bayer, 1985a). Durant els estadis E11-E13, s'ha anat generant una segona població de precursors i al final d'aquest període sortiran del cicle cel·lular i començaran a migrar en direcció radial. Aquests precursors, que donaran lloc a les cèl·lules de Purkinje (Altman and Bayer, 1985b), utilitzaran el sistema de fibres de la glia de Bergmann per a dirigir-se cap al còrtex cerebel·lar (Misson et al., 1988), d'una manera homòloga al que succeïa en el còrtex cerebral. Entre E14 i E17, atravessaran el mantell de precursors de neurones dels nuclis profunds (Chedotal and

Sotelo 1992; Altman and Bayer, 1985b) i seran les primeres cèl·lules en poblar el córtex cerebel·lar, on establiran una densa capa rudimentària i irregular de cèl·lules neuronals immadures (**Fig.7B**) (Yuasa et al., 1991; Hatten and Mason, 1990). Aquesta capa proporcionarà el suport per a la formació de l'altre capa neuronal del córtex cerebel·lar: la IGL (Altman and Bayer, 1985a). Mentre les cèl·lules corticals immadures es van situant, el mantell de cèl·lules destinades als nuclis profunds es mourà cap a la regió rostro-medial del primordi del cerebel (Hallonet and Le Douarin, 1993; Altman and Bayer, 1985b). Coincidint amb el moment que les neurones nuclears i les cèl·lules de Purkinje deixen de dividir-se, s'estableix la EGL a la superfície del córtex cerebel·lar, per sota de la qual s'aniran dipositant les cèl·lules de Purkinje.

2.2.4 La capa granular interna

Els precursors de les cèl·lules granulars neixen en el llavi ròmbic i migren cap a la superfície del cerebel on formaran una segona matriu germinal: la EGL (**Fig.7A**) (Ramón y Cajal, 1889; Miyake et al., 1993; Ryder and Cepko, 1994; Gao and Hatten, 1994b). Es pot parlar de dues zones diferenciades en el llavi ròmbic que donaran lloc a neurones amb diferents rutes de migració (Rakic, 1990): la part superior o rostral (uRL) i la part inferior o caudal (IRL) (Altman and Bayer, 1997) (**Fig.8A**). La uRL s'encarrega de produir els progenitors de les cèl·lules granulars, mentre que la IRL generarà els nuclis precerebel·lars, descrits en detall més endavant. En l'estadi E13 de ratolí, doncs, la uRL comença a generar progenitors, la migració dels quals es pot ser dividida en tres etapes. En la primera s'observa un desplaçament dels progenitors per la superfície cerebel·lar en direcció rostro-medial (fletxes negres de la **Fig.8C**), recobrint el córtex cerebel·lar en la seva totalitat cap allà E17 i establint-se així la segona matriu germinal secundària, la EGL, on continua la generació de més precursors (**Fig.7A**). Les cèl·lules que s'estan movent en aquesta capa no tenen, en la gran majoria, la forma allargada de fus típica de cèl·lules en activa migració, sinó que presenten una forma irregular i arrodonida. Aquesta observació ha fet pensar, més que en una migració activa, en un desplaçament passiu dels progenitors des d'una zona proliferativa amb excedent cel·lular a una zona lliure de cèl·lules (Ryder and Cepko, 1994; Altman and Bayer, 1997). Després del naixement i fins a la segona setmana postnatal, una ràpida proliferació a les capes superficials de la EGL provoca una expansió d'aquesta esdevenint una capa de vuit cèl·lules de gruix (Fugita 1967; Fugita et al., 1966). En aquesta segona part, les cèl·lules postmitòtiques inicien el descens cap a zones profundes de la EGL, extenen els seus axons, les fibres paral·leles (Ramón y Cajal, 1911; Miale and Sidman, 1961), i migren en el pla transversal del cerebel. En aquest cas, la morfologia bipolar horitzontal que adopta la cèl·lula en la direcció de la migració ja encaixa amb un procés

INTRODUCCIÓ

actiu (Gao and Hatten 1994b; Ryder and Cepko, 1994; Mathis et al., 1997). D'una banda, s'ha suggerit que aquest procés té lloc al llarg de feixos d'axons pre-existents (Hynes et al., 1986), tot i que no es descarta la migració homotípica que sembla mitjançar altres migracions paral·leles a la superfície cerebral (migració tangencial neurofíllica) (Rakic, 1985; Ono and Kawamura, 1989, 1990; Gray and Sanes, 1991). La generació de precursors a la EGL continua fins a la segona setmana postnatal i és a partir de P15 quan la EGL desapareix degut a la migració de les cèl·lules postmitotiques cap a l'interior, les quals establiran la làmina granular interna (IGL) (**Fig.7C**). Aquest segon tipus de migració té lloc al llarg de la glia de Bergmann i en direcció contrària a la seguida per les cèl·lules de Purkinje (migració radial gliofíllica). El moviment s'inicia quan els progenitors de les cèl·lules granulars desenvolupen un altre procés en la direcció descendent, adoptant una morfologia piramidal i llavors el soma s'orienta perpendicularment a la fibra paral·lela (**Fig.8D**). En conjunt, la cèl·lula granular adopta forma de T, on la fibra paral·lela s'extén per la superfície cerebel·lar i el soma migra radialment a través de la ML, unit a la glia de Bergmann (Ramón y Cajal, 1911; Miale and Sidman, 1961; Fujita et al., 1966; Fujita, 1967; Altman 1969; Mugnaini and Forstronen, 1967; Mugnaini, 1969; Larramendi, 1969; Rakic, 1970, 1971a, 1981, 1985; Hatten and Liem, 1981). Durant aquest trajecte radial, aquestes cèl·lules postmitòtiques s'aniran diferenciant: interactuaran amb la capa de cèl·lules de Purkinje en diferenciació, l'atravessaran i formaran la IGL sota de la PCL convertint-se en cèl·lules granulars madures (**Fig.7D i 8D**) (Miale and Sidman, 1961; Rakic 1971a). Es interessant d'observar que mentre els precursors de les cèl·lules de Purkinje, igual que els precursors del neocòrtex, migren just en sortir del cicle cel·lular i formen les connexions en una etapa tardana del desenvolupament, els precursors de les cèl·lules granulars extenen els seus axons just en sortir del cicle i migren al llarg de la glia de Bergmann posteriorment. Alhora, aquest llarg període d'expansió clonal de les cèl·lules precursors de la EGL, des de E13 fins a P15, genera una enorme població de cèl·lules, que sobrepassa el nombre de neurones de Purkinje en la proporció 250:1 en el córtex cerebel·lar adult.

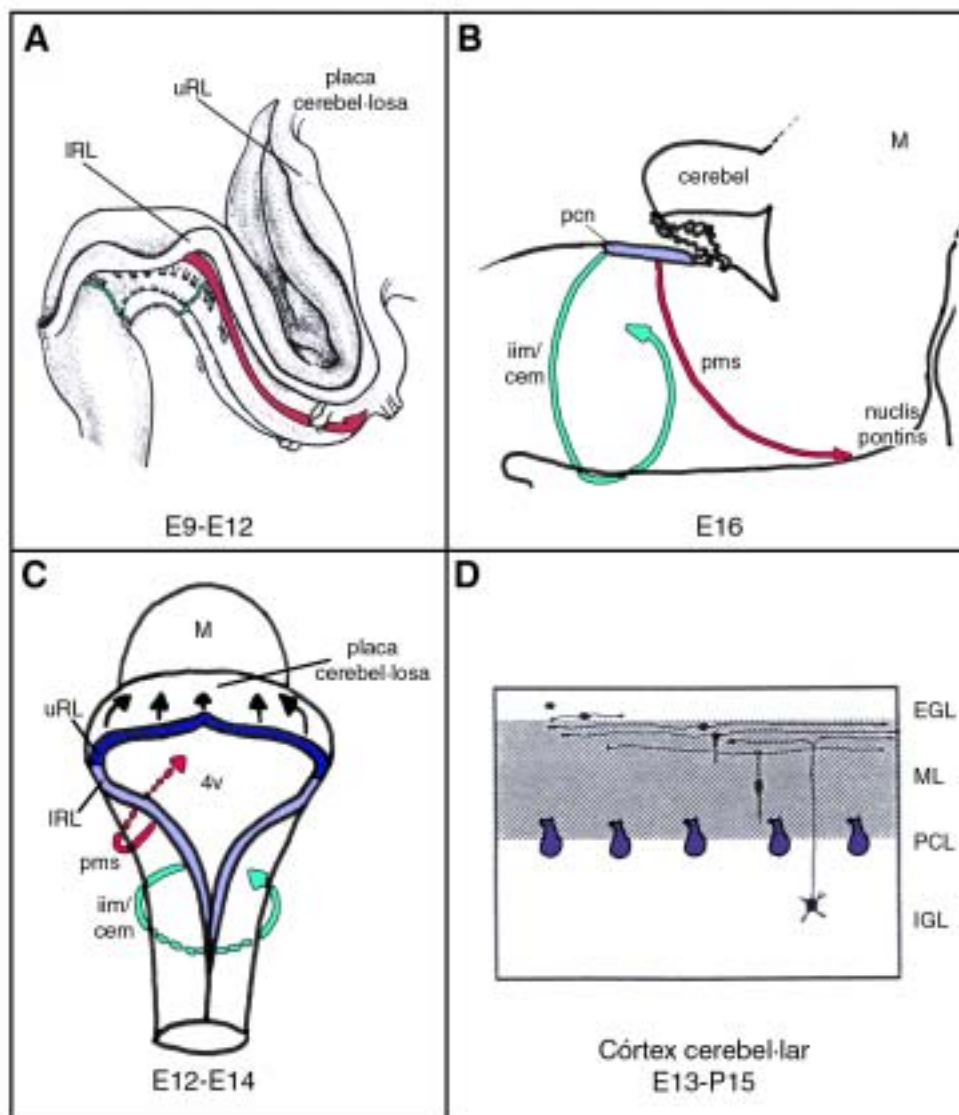


Figura 8. A) Dibuix de cervell posterior d'un embrió de 9-12 dies mostrant el llavi ròmbic (**uRL**, **IRL**), la via de migració pontomedul·lar (**fletxa vermella**) i la zona d'abast de les migracions circumferencials (delimitada **en verd**). B) Esquema d'una secció sagital de cervell posterior a E16; rostral a la dreta. Les fletxes indiquen el mateix que a A; els nuclis pontins inclouen el nucli reticular tegmental pontí (NRTP) i el pons basilar (BP). C) Esquema de cervell posterior a E12-E14 vist des d'una posició caudal mostrant les diferents direccions que segueixen els progenitors de les neurones derivades del llavi ròmbic. Les **fletxes negres** assenyalen la migració dels progenitors de les cèl·lules granulars. Les **fletxes vermella i blava** indiquen el mateix que a A. D) Patró espacio-temporal de la diferenciació i migració de les cèl·lules granulars. **cem**, migració extramural contralateral; **iim**, migració intramural ipsilateral; **IRL**, llavi ròmbic inferior; **M**, mesencèfal; **pcn**, neuroepiteli precerebel·lar; **pms**, via de migració pontomedul·lar; **uRL**, llavi ròmbic superior.

Modificat de Taber-Pierce (1966), Engelkamp et al. (1999), Hatten and Heintz (1995).

2.2.5 Les interneurons de la capa molecular

Simultàniament a la formació de la EGL, sorgeixen de la zona ventricular un tipus determinat d'interneurons (les neurones de Golgi) que finalitzen el seu cicle cel·lular entre E12 i E15 i migren cap a la ML per damunt de la PCL (Miale and Sidman, 1961). D'altra banda, com ja he esmentat anteriorment, la resta d'interneurons del cerebel (les neurones estrellades i les basket) també es generen a la VZ i colonitzen la ML postnatalment. Fins fa ben poc es creia que aquestes interneurons es generaven en la EGL junt amb les cèl·lules granulars i aquesta creença provenia del fet que la generació d'ambdós tipus de neurones era postnatal i l'única zona germinal a aquestes edats és la EGL. Encara més, recentment, s'ha vist que les interneurons de la ML provéien del neuroepiteli mesencefàlic i metencefàlic (Martínez and Alvarado-Mallart, 1989; Alvarez Otero, 1993; Hallonet and Alvarado-Mallart, 1997). Zhang i Goldman (1996) observaren que aquestes interneurons, junt amb diversos tipus de glia, sofrien un cicle de mitosi en la substància blanca. D'aquí hipotetitzaren que la generació d'interneurons és un procés en dos fases, amb una generació inicial dels precursors a la VZ i la subsegüent migració cap a la WM del córtex cerebel·lar, on sofreixen altres divisions cel·lulars, migren al llarg de la WM i transloquen a la ML abans de diferenciar-se a interneurons o a glia madura.

2.2.6 Els nuclis precerebel·lars

El sistema precerebel·lar consta d'una col·lecció de nuclis medul·lars i pontins les projeccions dels quals arriben principalment al cerebel. Els nuclis medul·lars es troben situats al bulb raquidi, per sota del cerebel, i els més estudiats són la oliva inferior (IO), el nucli reticular lateral (LRN) i el nucli cuneat extern (ECN) (**Fig.9A**). D'altra banda, els dos nuclis pontins principals, el nucli pontí tegmental reticular (NRTP) i el pons basilar (BP), es localitzen a la base del mesencèfal (**Fig.8B**). Tal i com hem esmentat anteriorment, la regió inferior del llavi ròmbic (IRL) s'encarrega de generar el precursors d'aquests nuclis. Tot i que existeix un solapament espacial i temporal en la generació i migració de les neurones de cada nucli, en general presenten patrons temporals de naixement i rutes de migració clarament diferenciats. Ja en el 1891, durant l'estudi d'embrions humans de 2 o 3 mesos, His distingí una densa concentració de cèl·lules lleugerament tenyides entre el llavi ròmbic i la oliva inferior en desenvolupament, inferint que es tractava de cèl·lules en migració cap a la oliva inferior. Més endavant, Essick (1912) ja diferencià dues rutes circumferencials de migració paral·leles, en direcció dorsoventral, una de parenquimal (profunda) i una de subpial (superficial).

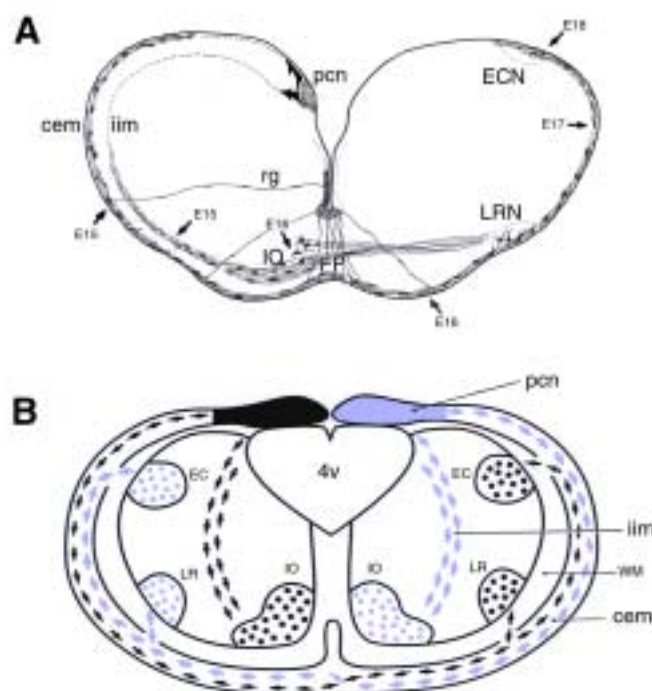


Figura 9. A) Representació esquemàtica de la migració en el sistema precerebel·lar del tronc de l'encèfal. Les neurones que poblaran els nuclis cuneat extern (**ECN**), lateral reticular (**LRN**) i de la oliva inferior (**IO**) neixen totes al neuroepiteli precerebel·lar (**pcn**). Les cèl·lules que es dirigeixen a la **IO** seguiran la ruta de migració intramural ipsilateral (**iim**) i les destinades als nuclis **ECN** i **LRN** segueixen la de migració extramural contralateral (**cem**), que queda situada a nivell dels peus de la glia radial (**rg**). Les edats entre **E15** i **E18** indiquen quina és la posició dels fronts de les diferents onades de migració a l'edat assenyalada. Així, els somes de les neurones de **IO** no creuen la *floor plate* (**FP**) i comencen a agregar-se a **E16**, mentre que les cèl·lules de **LRN** i **ECN** creuen la **FP** i comencen a agregar-se a **E17** i **E18** respectivament. B) Esquema didàctic de les migracions indicades a A. **WM**, substància blanca; **4v**, quart ventricle. Modificat de Bourrat and Sotelo (1990) i Altman and Bayer (1997).

Gràcies a estudis posteriors realitzats per Harkmark (1954), Ellenberger (1969), Altman and Bayer (1978b, 1987b, 1997) i Bourrat and Sotelo (1988, 1991) s'ha arribat a concloure que la ruta de migració parenquimal [ara també anomenada intramural ipsilateral (**iim**) o submarginal segons els autors] és el camí cap a la oliva inferior, mentre que la ruta subpial [extramural contralateral (**cem**) o marginal] suporta la migració cap als nuclis **LRN** i **ECN** (fletxes verdes de la **Fig.8** i **Fig.9**). Alhora, existeix una altra gran diferència entre les dues rutes: mentre que les neurones olivars s'aturen ipsilateralment en l'hemisferi on s'han generat (Ellenberger et al., 1969; Bourrat and Sotelo, 1988, 1990), les neurones destinades a **LRN** i **ECN** no s'aturen en les seves prospectives zones al llarg de la seva ruta dorsoventral sinó que atravessen la línia mitja per la

INTRODUCCIÓ

regió més ventral de la *floor plate* (placa del terra: regió situada a la zona ventral del tub neural) per a donar lloc als respectius nuclis en l'hemisferi contralateral (Bourrat and Sotelo, 1991; Altman and Bayer, 1997). D'altra banda, les neurones destinades als nuclis pontins (NRTP i BP) segueixen una ruta migratòria rostral subpial (o extramural) en direcció a les seves respectives zones, anomenada via pontomedul·lar (pms), pontobulbar, o via extramural anterior (Harkmark, 1954; Rakic 1985; Ono and Kamura, 1990) i s'aturen ipsilateralment a l'hemisferi on s'han generat (Taber-Pierce 1966). (fletxes vermelles de la **Fig.8**). Tot i les diferències que existeixen entre les rutes de migració esmentades, el tret que les caracteritza és el tipus de migració que en tots els casos té lloc mitjançant interaccions neurofílques (Ono and Kawamura, 1989, 1990) i que discutiré més detalladament en el següent apartat. Pel que fa als estadis de generació dels diversos precursors, l'estudi de Taber-Pierce (1966) mostra que les neurones destinades a la IO neixen en el període E10-E11, les que es dirigeixen als nuclis LRN i ECN esdevenen postmitòtiques a E11-E12 i les neurones pontines (NRTP i BP) s'originen durant un període perllongat que s'extén des de E12 fins a E16, assolint un màxim tardà de generació a E14-E15.

3. MECANISMES DE MIGRACIÓ

En els apartats anteriors he descrit la formació de dues zones laminades del cervell, el córtex cerebral i el cerebel·lar, fent palesa la importància dels processos migratoris en el seu desenvolupament. Una vegada establertes quines són les rutes de migració que recorren les neurones, cal esbrinar quins són els mecanismes moleculars subjacents que permeten aquests moviments tan extremadament organitzats i regulats tant espacialment com temporalment. Com hem pogut observar, la migració implica el desprendiment de les cèl·lules postmitòtiques de la resta d'elements de la zona proliferativa i el desplaçament actiu de les neurones indiferenciades pel medi que les envolta (Rakic, 1971b, 1972). Diferents línies d'investigació, tant d'anàlisi *in vivo* com *in vitro*, indiquen que la interacció entre les neurones migradores i la superfície de les cèl·lules veïnes juga un paper clau en la selecció d'un substrat de migració, en l'orientació, desplaçament i aturada de les neurones. En funció del suport físic que permet la migració, es parla de tres categories de cèl·lules: gliofílques, neurofílques i bifílques (Rakic 1985). Les cèl·lules gliofílques utilitzen selectivament les fibres de la glia radial, sense ancorar-se a les neurones o processos neuronals que puguin apareixen al llarg de la seva trajectòria. En canvi, les neurofílques seguiran preferencialment la superfície de neurones, en concret la dels seus axons. Existeixen, no obstant, cèl·lules que presenten, temporalment o regionalment, afinitats per superfícies tant glials com neuronals en les diferents fases de la seva diferenciació i, fins i tot,

posseeixen dues classes de neurites que mostren diferents afinitats superficials. Es en aquests casos que es parla de migració bifílica.

En termes d'orientació i direcció del moviment cel·lular, la migració pot ser classificada en dos eixos bàsics, el radial i el tangencial, ambdós tipus presents, tal i com he descrit, en el córtex cerebral i en el cerebel·lar. A grans trets, en la migració radial els precursors emergeixen de la zona ventricular, perpendicularment a aquesta, en direcció a la superfície pial i utilitzant de suport els processos de la glia radial (Rakic 1971a, 1972; Hatten and Liem 1981), mentre que la migració tangencial es caracteritza perquè té lloc, en la seva majoria, paral·lela a la superfície cerebral i als ventricles. La migració radial, particularment prominent en estadis primerencs del desenvolupament, és la responsable de l'organització columnar bàsica de la majoria d'estructures cerebrals del sistema nerviós central, assegurant la distribució columnar de les neurones clonalment relacionades per tal de preservar el protomapa ventricular (Rakic 1971b, 1972, 1988). Pel que fa a la migració tangencial, permet el trànsit de neurones des d'un compartiment cerebral a un altre i sovint té lloc en estadis més tardans del desenvolupament.

3.1. LA MIGRACIÓ RADIAL

La migració al llarg de la glia radial és la més ben estudiada. Nombrosos estudis que donen suport a aquest model han estat realitzats (Edmonson and Hatten 1987; Fishell and Hatten 1991; Hatten 1993; Gao and Hatten 1994a,b; Anton et al., 1996) demostrant que entre el 80 i 90% dels precursors del córtex dels mamífers migren al llarg de les fibres de la glia. La direcció exacta d'aquesta migració depèn de la trajectòria de les fibres de la glia radial (Austin and Cepko, 1990; Misson et al., 1991a), conjunt de cèl·lules típicament bipolars, allargades, amb el soma situat a la zona ventricular i que formen uns fascicles que abasten tot el gruix del córtex cerebral. En la zona marginal, la fibra radial ramifica i forma un peu que connecta amb la làmina basal de la superfície pial (Misson et al., 1991a,b; Schmechel and Rakic, 1979a). Entre les primeres cèl·lules que poblen el cervell hi ha incloses les cèl·lules astroglials, les quals es transformaran transitòriament en cèl·lules de glia radial mentre duri el procés de la migració. Una vegada finalitzat aquest procés, la majoria de les cèl·lules glials retrauran el peu de la superfície pial, canviaran la seva morfologia i esdevindran altra vegada astròcits (Rakic 1972; Schmechel and Rakic, 1979a,b). En determinades àrees cerebrals, les cèl·lules de glia radial poden diferenciar a cèl·lules no-neuronals especialitzades com és el cas de la glia de Bergmann, ja esmentada en el cerebel, la glia septal o les cèl·lules de Müller (Rakic 1984). A nivell molecular, s'ha vist que les molècules que permeten la unió entre cèl·lules veïnes, o entre les cèl·lules i el substrat controlen una gran quantitat d'esdeveniments bàsics per al

INTRODUCCIÓ

desenvolupament (Edelman et al., 1990). La majoria d'aquestes molècules són glicoproteïnes i s'anomenen molècules d'adhesió cel·lular (CAMs). Així, la migració de les neurones per uns substrats o uns altres pot ser explicada per la diferència d'afinitat per aquests, mitjançada per les molècules d'adhesió (Rakic 1981). El mecanisme molecular de migració, no obstant, és molt més complexe i inclou un reconeixement cel·lular inicial, seguit de l'adhesió mitjançant les CAMs, per acabar amb la senyalització transmembrana. Durant la darrera dècada, s'han identificat un gran nombre de possibles CAMs i molècules de senyalització transmembranal (Cameron and Rakic 1994; Fishell and Hatten 1991; Hatten 1993; Hatten and Mason 1990; Nadarajah et al., 1997; Rakic 1981, 1990; Rakic et al., 1994; Sheppard et al., 1995; Sotelo et al., 1994). Un gran avanç en aquesta àrea ha estat la identificació de l'Astrotactina, glicoproteïna present a la superfície de les neurones en migració, el bloqueig de la qual atura la migració de les neurones al llarg de la glia radial *in vitro* (Fishell i Hatten, 1991). Encara més, l'obtenció d'imatges de cèl·lules granulars en migració ha revelat uns dominis especialitzats d'unió als processos de la glia radial (Anton et al., 1996), la disrupció funcional dels quals inhibeix la motilitat cel·lular interferint amb el citoesquelet de microtúbuls de la neurona en migració (Gregory et al., 1998; Anton et al., 1996). S'han proposat diversos elements de la matriu extracel·lular com a influenciadors de la migració granular. D'entre ells, s'ha trobat que la Thrombospondina (O'Shea et al., 1990) i la Tenascina (Husmann et al., 1992) influencien la migració granular actuant sobre la velocitat de producció de la fibra paral·lela. Resultats similars s'han obtingut per les glicoproteïnes axonals NCAM i L1 l'efecte de les quals, tot i la seva importància en la migració, també és indirecte i tampoc intervénen en la translocació del nucli al llarg de les fibres gials sinó que només actuen a nivell de les fibres paral·leles. També s'ha implicat en la migració granular el factor de creixement GGF, o neuregulina, el qual es troba expressat en les cèl·lules granulars durant el seu trajecte per les fibres gials (Anton et al., 1997; Rio et al., 1997). La neuregulina s'uneix a erb4 que es troba en la superfície de la glia de Bergmann. Altres anàlisis també han relacionat molècules tals com el receptor NMDA per glutamat (Komuro and Rakic, 1993), la proteïna d'unió a lípids cerebral (BLBP; Feng et al., 1994) i la Netrina-1 (Serafini et al., 1996; Ackerman et al., 1997) amb la migració. El paper d'aquesta darrera serà analitzat en detall en el punt 3.3.

3.1.1 Els mutants neurològics i la migració radial

L'estudi de ratolins mutants neurològics amb malformacions cerebrals (Sidman 1968, 1973, 1983; Hatten and Heintz 1995; Heintz et al., 1993) ha permès el descobriment dels *loci* genètics que contribueixen a la migració neuronal del cervell en desenvolupament. De fet,

juntament amb l'estudi de desordres de migració neuronal en humans, s'han arribat a distingir quatre esdeveniments clarament diferenciats de la migració neuronal cortical. En la iniciació del moviment s'ha implicat a la Filamina 1 (FLN1), una proteïna d'unió a actina la mutació de la qual està associada a l'heterotòpia ventricular humana (Eksioglu et al., 1996; Fox et al., 1998). La relació d'aquesta proteïna amb les fibres d'estrés d'actina ha suggerit que aquest primer pas dependria de mecanismes mitjançats pels filaments d'actina. A més, la FLN1 s'uneix a altres proteïnes que possiblement també estan implicades en la migració neuronal, incloent integrines (Loo et al., 1998; Sharma et al., 1995), Ral A (Ohta et al., 1999) i la Presenilina1 (Zhang et al., 1998). Una segona fase del moviment es correspondria amb la migració pròpiament dita, i en aquest hi encaixarien diversos tipus de lissencefàlies. Es coneixen almenys dos gens que produeixen dues formes relacionades de lissencefàlia: la proteïna LIS1 (Dobyns et al., 1991; Reiner et al., 1993) i la doublecortina (DCX) (Pinard et al., 1994). Ambdues s'han relacionat amb els microtúbuls (Sapir et al., 1997; Morris et al., 1998; Gleeson et al., 1999; Francis et al., 1999; Horesh et al., 1999) suggerint que aquesta segona fase vindria governada per l'acció d'aquests. En tercer lloc, les neurones en migració del córtex cerebral s'han d'insertar a la preplaca, i en aquest punt s'ha demostrat la intervenció de diverses proteïnes: Reelina, Dab1, els receptors per les proteïnes VLDL (Vldlr) i ApoE (Apoer2) i una proteïna d'estructura semblant a les cadherines (Caviness 1973; Goffinet 1984; Ogawa et al., 1995; Howell et al., 1997a,b; Sheldon et al., 1997; Ware et al., 1997; Trommsdorff et al., 1998; D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999; Senzaki et al., 1999). En aquest cas, han estat mutants neurològics de ratolí els que han proporcionat molta informació respecte aquesta tercera fase i les proteïnes implicades. El més estudiat ha estat el mutant que presenta una alteració en la Reelina, el ratolí *reeler* (D'Arcangelo et al., 1995), i, gràcies a la similitud amb el seu fenotip, s'han pogut identificar dos mutants per la proteïna de transducció de senyal Dab1, *scrambler* i *yotari* (Sweet et al., 1996; Yoneshima et al., 1997; Gonzalez et al., 1997). S'ha hipotetitzat que la Reelina actua de senyal de stop per a les neurones en migració (Pearlman and Sheppard, 1996; Frotsher 1997; Lambert de Rouvroit and Goffinet, 1998), mentre que les altres proteïnes esmentades semblen implicades en la transducció del senyal de la Reelina (Gonzalez et al., 1997; Ware et al., 1997; Sheldon et al., 1997; Howell et al., 1997, 1999a,b; Rice et al., 1998; Trommsdorf et al., 1999; Hiesberger et al., 1999; D'Arcangelo et al., 1999; Senzaki et al., 1999). Els detalls que tenen a veure amb aquesta tercera fase i la implicació de les diverses proteïnes seran discutits en el punt 3.3. Finalment, els mutants de dos gens que codifiquen per proteïnes del cicle cel·lular, Cdk5 i p35, han fet pensar en una quarta fase. En aquests s'ha detectat un problema de migració una vegada els precursors ja es troben en la subplaca i sembla que el defecte es correspongui

INTRODUCCIÓ

més amb la impossibilitat d'atravessar la placa cortical. Aquests mutants presenten un fenotip semblant al *reeler* però no del tot idèntic (Gilmore et al., 1998; Kwon and Tsai, 1998) i, tot i que no està clar quin és el seu paper en la migració, sembla que tots els efectes vénen mitjançats per canvis en el citoesquelet (Shetty et al., 1993; Sun et al., 1996; Pant et al., 1997; Hosoi et al., 1995; Baumann et al., 1993; Sengupta et al., 1997; Paudel 1997).

Deixant una mica de banda aquestes quatre fases, però relacionat també amb defectes de la migració, existeixen unes alteracions cerebrals humanes anomenades col·lectivament lissencefàlies de tipus II on existeix una migració de neurones fora del sistema nerviós central, concretament cap a la membrana subaracnoide. En humans, un d'aquests tipus de lissencefàlies s'ha associat a mutacions en un nou gen, la fukutina (Kobayashi et al., 1998), mentre que en ratolins existeixen diverses mutacions que provoquen fenotips semblants a la lissencefàlia de tipus II. Mutacions induïdes en la integrina $\alpha 6$ (Georges-Labouesse et al., 1998) o la Presenilina 1 (Psen1; Hartmann et al., 1999) produeixen defectes en la superfície pial associades a migracions fora del córtex. És interessant de notar que el ratolí *knockout* per Psen1 mostra alteracions de la síntesi de Reelina en la zona marginal (Hartmann et al., 1999), per tant alguns gens associats amb la lissencefàlia de tipus II podrien estar indirectament implicats en la senyalització de la Reelina.

3.2. LA MIGRACIÓ TANGENCIAL

Determinats tipus neuronals en diverses subdivisions cerebrals migren en una direcció que no coincideix amb les guies formades per la glia radial, i, de fet, passen tocant a la glia sense formar cap tipus d'unió permanent. Les neurones que es dirigeixen cap al pons o la oliva inferior per a poblar aquests nuclis són un bon exemple d'aquest cas, ja que migren en aposició a la superfície de les fibres en desenvolupament que van corrent paral·leles a la superfície cerebral (Ono and Kawamura, 1989, 1990; Bourrat and Sotelo, 1988; Rakic 1985). Pel que fa al córtex cerebral, són estudis molt recents els que demostren que existeix migració tangencial al llarg d'axons que atravessen perpendicularment el sistema de fibres de glia (O'Rourke et al., 1992, 1997), com molt recent és també el coneixement que la MGE és la principal font de neurones no-piramidals del neocórtex (Porteus et al., 1994; De Carlos et al., 1996; Tamamaki et al., 1997; Anderson et al., 1997; Grigoriou et al., 1998; Zhu et al., 1999; Lavdas et al., 1999; Sussel et al., 1999; Wichterle et al., 1999; Parnavelas 2000). Cada vegada sembla més clar que les cèl·lules de l'eminència ganglionar utilitzarien el sistema d'axons corticofugals per a accedir al córtex tangencialment (Anderson et al., 1997, 1999; Lavdas et al., 1999; Métin and Godement, 1996). Actualment, els mecanismes que guien les neurones al llarg dels axons són objecte

d'investigacions intensives i, de moment, només s'ha trobat una molècula que podria estar implicada en la guia de les cèl·lules GABAèrgiques des del telencèfal ventral cap al neocòrtex. Es tracta de Slit, una proteïna implicada en guia axonal i migració (Brose et al., 1999; Yuan et al., 1999) que, produïda i secretada en regions de l'eminència ganglionar (Zhu et al., 1999, Wu et al., 1999), sembla proporcionar una activitat quimiorepulsiva que provoca que les neurones GABAèrgiques abandonin l'eminència ganglionar per anar al neocòrtex. D'altra banda, si que s'han aclarit alguns mecanismes per a un tipus de migració molt concreta, la ruta de migració rostral (RMS), la qual es dona en el cervell anterior de rosegadors neonats i adults (**Fig.10A**). (Luskin, 1993b; Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Els precursors neuronals nascuts a la zona subventricular (SVZ) dels ventricles laterals (**Fig.10B**) migren tangencialment entre 3 i 8mm al llarg de l'extensió anterior de la SVZ (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996), l'anomenada RMS, per arribar al bulb olfatori on diferencien a cèl·lules granulars i periglomerulars. Aquestes cèl·lules semblen arrossegar-se les unes sobre les altres formant llargues cadenes al llarg de la RMS i, ja en edats postnatales, aquesta migració en cadenes té lloc per uns canals creats per cèl·lules especialitzades (Lois et al., 1996). S'ha vist que el mecanisme de migració en cadenes depèn d'una molècula d'adhesió cel·lular específica de neurones, NCAM, la qual s'expressa en les cèl·lules migradores de la SVZ en la seva forma polisialitzada, en conjunt anomenada PSA-NCAM (Bonfanti and Theodosis, 1994; Rousselot et al., 1995; Jankovski and Sotelo, 1996). Estudis genètics moleculars demostren que aquesta és imprescindible per a la migració neuronal cap al bulb (Tomasiewicz et al., 1993; Cremer et al., 1994; Ono et al., 1994; Hu et al., 1996). En l'estudi de Wu et al. (1999) es demostra que, altra vegada, és la proteïna Slit l'encarregada de guiar la migració exercint una acció quimiorepulsiva en forma de gradient. Anderson i col·laboradors (1999) proposen que existeixen dues rutes per les quals les interneurons generades en la LGE i la MGE arriben al córtex cerebral. Un camí lateral, on les cèl·lules emergeixen de la MGE, atravessen la LGE i es dirigeixen cap a córtex i un camí medial on les cèl·lules sorgeixen de la LGE i del septum per anar a la base del bulb olfatori, ruta que esdevé la RMS en etapes tardanes de la gestació i postnatalment (**Fig. 10A,C**) (Hinds 1968; Luskin 1993b). Semblaria, doncs, que Slit intervé en la quimiorepulsió de les interneurons d'ambdues vies de migració (Zhu et al., 1999, Wu et al., 1999; Anderson et al., 1999; Parnavelas 2000).

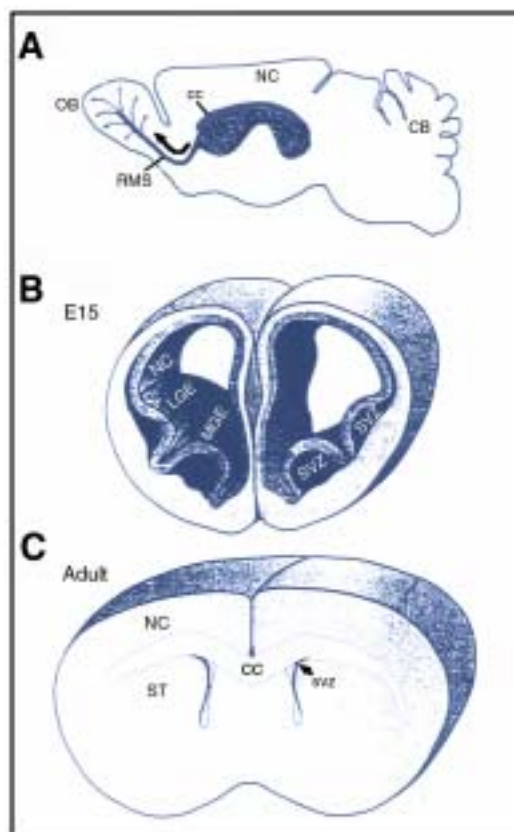


Figura 10. A) Secció sagital de cervell adult mostrant la ruta de migració rostral (**RMS**). B) Secció coronal del cervell anterior d'un embrió de ratolí de 15 dies mostrant la prominent zona subventricular (**SVZ**) que existeix sota de la zona ventricular (**VZ**), tant del córtex com de les eminències ganglionars lateral (**LGE**) i medial (**MGE**). C) Secció coronal del telencèfal de ratolí adult. La **VZ** embrionària es transforma en una zona endodimal diferenciada que envolta els ventricles i la **SVZ** proliferativa roman adjacent a la primera només per la paret lateral dels ventricles laterals. Es creu que aquesta **SVZ** deriva de la **SVZ** de la **LGE**. **CB**, cerebel; **cc**, cós callós; **NC**, neocórtex; **OB**, bulb olfatori; **ST**, estriat. Modificat de García-Verdugo et al. (1998).

3.3. LA REELINA EN LA MIGRACIO

En els darrers quatre anys s'ha progressat molt en la identificació i caracterització de gens indispensables per al correcte posicionament cel·lular durant el desenvolupament cerebral de ratolins i humà (D'Arcangelo and Curran 1998; Walsh 1999). Existeixen diversos estudis on s'han implicat diverses molècules difusibles, atractives i repulsives, com la Netrina-1 o la Semaphorina III, en la guia de les neurones en migració (Behar et al., 1996; Hu and Rutishauser, 1996; Serafini et al., 1996; Ackerman et al., 1997). No obstant, el mutant atàxic *reeler*, que presenta mutacions en la proteïna Reelina, ha servit durant molts anys com a prototip per a la investigació de les mutacions neurològiques que afecten la migració neuronal i l'organització del CNS.

3.3.1 El mutant *reeler*

Descrit per primera vegada per Falconer (1951), el mutant *reeler* presenta severes anomalies en moltes àrees cerebrals, particularment en regions laminades com el neocòrtex, l'hipocamp i el cerebel (Caviness i Sidman, 1973; Mariani et al., 1977; Goffinet, 1980,1992; Derer, 1985; Rakic and Caviness, 1995), desorganització que condueix a disfuncions d'aprenentatge i motores. En el cerebel, el qual presenta un tamany molt reduït, les cèl·lules de Purkinje es troben agrupades i distribuïdes ectòpicament per sota de la capa granular, enlloc de formar una capa uniforme per sobre d'elles (Mariani et al., 1977). En el córtex cerebral, així com en l'hipocamp, les neurones no aconsegueixen establir el patró correcte de migració de dins cap enfora, de manera que les làmines del córtex queden aproximadament invertides (Caviness 1973, 1982). Com ja he esmentat amb anterioritat, el defecte fonamental del mutant *reeler* sembla ser que les neurones en migració no es poden insertar a la preplaca, i enlloc d'això s'apilen desordenadament per sota d'ella, deixant-la a la superfície en forma del que s'ha anomenat la superplaca (**Fig.11**) (Caviness 1973; Goffinet 1984; Ogawa et al., 1995). Aquest fenotip es reproduïx quan s'incuben cultius en rotació de neurones *reeler* o bé incubant neurones normals amb l'anticòs CR-50, el qual inhibeix la funció de la Reelina (Ogawa et al., 1995; Nakajima et al., 1997). Donat que la Reelina es troba a la preplaca i posteriorment a la zona marginal (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995), s'ha hipotetitzat el seu paper com a repel·lent per a les neurones de la subplaca, deixant espai perquè les neurones corticals es distribueixin per la preplaca. Alternativament, la Reelina es podria unir directament a les neurones corticals senyalitzant el final del procés migratori, o bé modificant les interaccions entre neurones i les fibres de la glia radial o les interaccions entre les neurones corticals. S'ha

INTRODUCCIÓ

observat, a més, que les neurones corticals generades en els ratolins *reeler* són més adhesives que les neurones normals suggerint que les interaccions cèl·lula-cèl·lula són defectuoses en l'absència de Reelina (Hoffarth et al., 1995). Tot i que el mecanisme exacte encara no s'ha identificat, està clar que la Reelina en la zona marginal proporciona un senyal local que dirigeix l'organització laminar del córtex cerebral.

En el cerebel, la Reelina és produïda ja en estadis molt primerencs per les cèl·lules presents a la superfície cerebel·lar (Miyata 1996), just quan comencen a migrar les primeres cèl·lules de Purkinje, suggerint un paper com a senyal de stop es troba per a aquestes (Sheppard and Pearlman 1997, Pearlman and Sheppard 1996). La Reelina, doncs, interrompria la migració inicial de la primera capa de cèl·lules que es forma en el córtex cerebel·lar. Aquesta acció mantindria els precursors de les cèl·lules de Purkinje en una zona àmplia zona, on interaccionarien amb els afferents que van arribant (Mason et al., 1990) i esperarien l'arribada de les cèl·lules granulars (Miyata et al., 1997). En el ratolí *reeler* aquesta PCL no es forma i el que s'observa en zones profundes del córtex cerebel·lar és una distribució d'agregats de cèl·lules de Purkinje. Pel que fa a les cèl·lules granulars, s'ha vist que expressen Reelina (Miyata et al., 1996; Schiffman et al., 1997), però que aquesta no afecta la seva migració (Soriano et al., 1997).

També s'han detectat altres anomalies anatòmiques del mutant *reeler* en altres estructures cerebrals importants com el tàlem, el mesencèfal, el bulb raquidi i la medul·la espinal (Goffinet 1984; Frost et al., 1986; Yip et al., 1998).

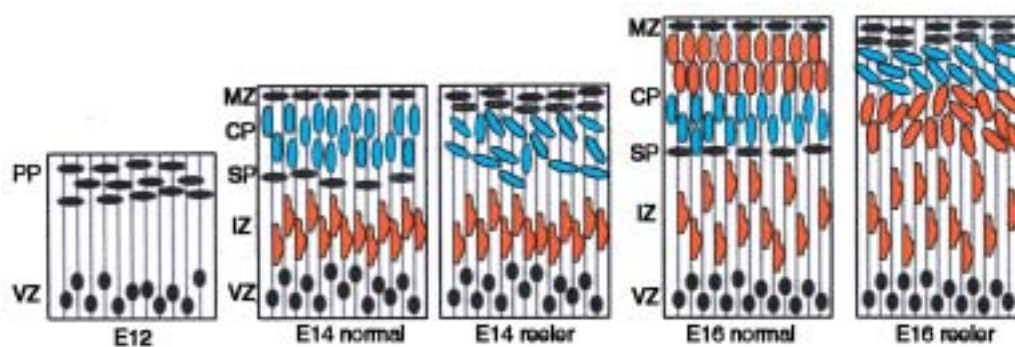


Figura 11. Desenvolupament cortical primerenc en el **ratolí normal** i en el **mutant *reeler***. A **E12**, el desenvolupament del córtex *reeler* no presenta cap alteració. A **E14**, s'observa com les primeres cèl·lules postmitòtiques s'apilen per sota de la preplaca en el córtex *reeler* i posteriorment, a **E16**, són incapaces d'atravesar les seves predecessores de la placa cortical. Modificat de Bar et al. (2000).

3.3.2 Les cèl·lules de Cajal-Retzius

Al llarg del desenvolupament, la reelina és produïda i secretada per poblacions neuronals clarament diferenciades. En el córtex cerebral, concretament, la utilització de tècniques immunocitoquímiques i d'hibridacions *in situ* realitzades amb sondes específiques per la Reelina revela una capa discreta de cèl·lules marcades distribuïdes per tota la superfície del neuroepiteli telencefàlic (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995). Aquestes cèl·lules es corresponen amb les cèl·lules de Cajal-Retzius (CR), esmentades ja en anteriors apartats, que pertanyen a un dels primers tipus de neurones generades en el córtex dels mamífers. Es localitzen a la part superficial de la preplaca, la seva naturalesa és transitòria i, donat que són les màximes responsables de la producció de Reelina, han de jugar un paper en la corticogènesi (Marín-Padilla, 1971, 1972, 1984, 1998; König et al., 1977; Edmuns and Parnavelas, 1982; Derer and Derer, 1990, 1992; Soriano et al., 1994, 1997; D'Arcangelo et al., 1995; Hirotsune et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Del Río et al., 1995, 1997; Nakajima et al., 1997; Meyer and Goffinet 1998). En concret, les neurones de CR regulen el fenotip de les cèl·lules de la glia radial i el patró de desenvolupament de la placa cortical de dins cap enfora, ja que, quan s'eliminen les cèl·lules de CR del neocórtex de ratolins nounats, es pot observar una interrupció de la migració neuronal i una laminació cortical desorganitzada acompanyada d'una transformació prematura de les cèl·lules de la glia radial en astròcits (Supèr et al., 1997). Fet que encaixa amb la desorganització del sistema de la glia que presenta el mutant *reeler*, amb unes fibres de menor llargada que desapareixen prematurament (Pinto-Lord et al., 1982; Hunter-Schaedle 1997). Encara més, experiments *in vitro* demostren que les cèl·lules de CR indueixen la morfologia radial de les cèl·lules astroglials del cerebel i, fins i tot, dirigeixen la migració de les cèl·lules granulars (Soriano et al., 1997).

3.3.3 La Reelina

La base molecular del fenotip *reeler* fou descoberta gràcies a la inserció fortuïta d'un transgen *fos* en el locus *reeler*, fet que comportà la identificació directa del gen de la Reelina (D'Arcangelo et al., 1995). La caracterització del gen mutat mostrà que està conservat en un gran nombre de vertebrats, de manera que la similitud de la seqüència nucleotídica entre els ratolins i els humans és d'un 87% i les respectives proteïnes són idèntiques en un 94% (D'Arcangelo et al., 1995; DeSilva et al., 1997). La proteïna presenta un elevat pes molecular (385kD) i codifica per una proteïna extracel·lular que conté regions de similitud amb diverses proteïnes d'adhesió cel·lular. L'extrem amino terminal s'assembla al de la F-spondina, una proteïna que és secretada per la *floor plate* de la medul·la espinal, que dirigeix la migració de les

INTRODUCCIÓ

cèl·lules de la cresta neural i podria funcionar com a senyal inhibidor durant la formació de les fronteres entre neuròmers (Klar et al., 1992; Burstyn-Cohen et al., 1999; Debby-Brafman et al., 1999). L'estructura principal de la Reelina ve donada per una sèrie de vuit repeticions d'uns 350-390 aminoàcids (característics de la Reelina), dins de les quals s'hi distingeix un domini semblant al factor de creixement epidèrmic (*EGF-like*) (**Fig.12A**). La repetició d'aquests motius *EGF-like* també s'observa en altres proteïnes de matriu extracel·lular com la tenascina C, la tenascina X, la restrictina i la família d'integrines de cadena β (D'Arcangelo 1995, 1997; Hirotsune et al., 1995). També s'ha descobert recentment que la Reelina és proteolíticament processada en dues proteïnes de pes molecular més baix, de 180 i 250kD, mitjançant una metal·loproteïnasa (de Rouvroit et al., 1999).

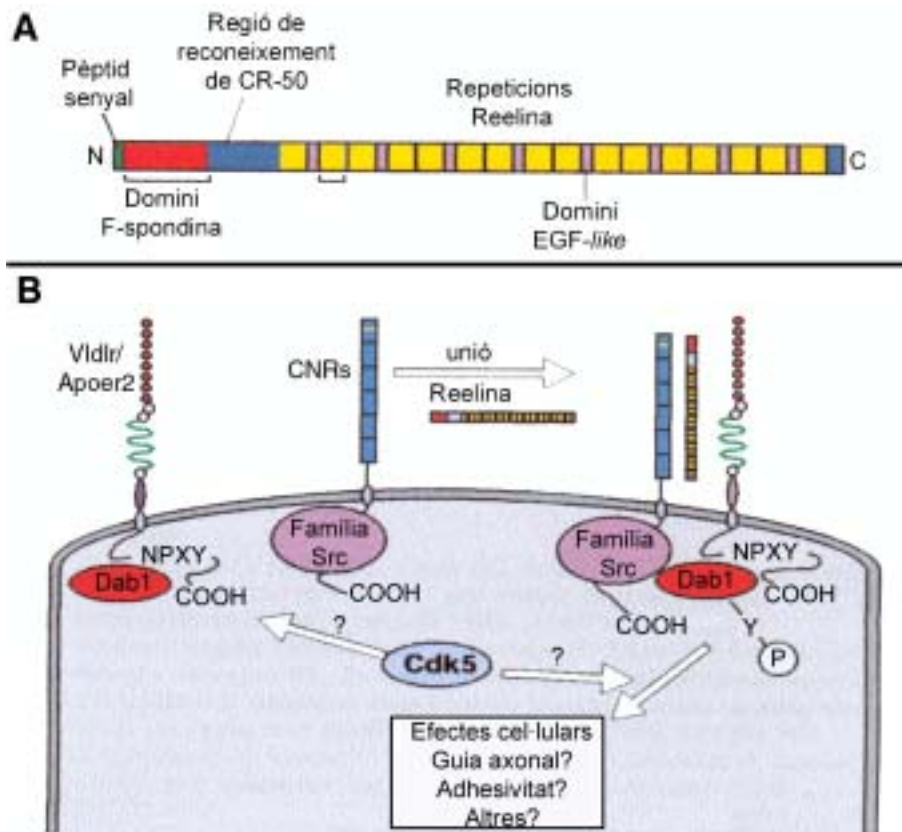


Figura 12. A) Estructura modular de la **Reelina**. La zona marcada en blau és la reconeguda per l'anticòs CR-50, que bloqueja la funció de la Reelina. B) Model hipotetitzat per a la senyalització de la Reelina, sense tenir en compte la integrina $\alpha3\beta1$ recentment implicada en el mecanisme. Els receptors per **VLDL** i **ApoE2** comparteixen una estructura similar incloent el domini **NPXY** amb capacitat d'unió a Dab1. Les **CNRs** estan representades en blau. Modificat de Gilmore and Herrup (2001).

Adicionalment, s'ha vist que la Reelina influencia el creixement i el *targeting* dels aferents hipocàmics, implicant-la d'aquesta manera en el creixement i guia axonal (Del Río et al., 1997; Borrell et al., 1999). Referent al seu patró d'expressió durant el desenvolupament del cervell, s'han publicat dos estudis (Ikeda and Terashima, 1997; Schiffmann et al., 1997) que emfatitzen la falta de correlació entre els llocs d'expressió de reelina i el fenotip *reeler*. Alhora, també s'ha observat, més recentment, que el mRNA de reelina es troba en cèl·lules GABAèrgiques del córtex cerebral adult (Pesold et al., 1998).

3.3.4 Hipòtesi del mecanisme d'actuació de la Reelina

No està clar quin és el mecanisme a través del qual la Reelina exerceix el seu efecte. El fet que els ratolins deficients pels gens *cdk-5*, *p35* i *dab1*, els quals codifiquen per proteïnes de transducció de senyal, presentin deficiències en la migració semblants a les observades en el *reeler* (Ohshima et al., 1996; Chae et al., 1997; Howell et al., 1997a,b; Sheldon et al., 1997; Ware et al., 1997) suggerí, inicialment, que les funcions de la Reelina havien d'estar mitjançades per receptors o proteïnes d'unió a Reelina. La Reelina actuaria en les neurones migradores a través d'aquests receptors, idea que s'ha vist reforçada pel fet que aquesta proteïna es troba associada a neurones que no expressen el mRNA de reelina (Ogawa et al., 1995; Miyata et al., 1996) i, més recentment, per la publicació d'estudis on s'han caracteritzat altres molècules amb la capacitat d'unir Reelina. Al cap de poc d'identificar la Reelina, es descrigueren dos mutants que presentaven un fenotip semblant al *reeler*, anomenats *scrambler* i *yotari* (Sweet et al., 1996; Gonzalez et al., 1997; Sheldon et al., 1997; Yoneshima et al., 1997), els quals tenien una alteració en el gen *dab1* i no mostraven alteracions en els nivells de Reelina (Goldowitz et al., 1997). *Dab1* fou identificada com a una proteïna fosforilable en residus de tirosina i aquesta fosforilació era necessària per a la seva unió a proteïnes de transducció de senyal com *Src*, *Fyn* i *Ab1* (Howell et al., 1997a,b). D'altra banda, es veié que *Dab1* s'expressa de forma elevada en els ratolins *reeler* i la seva fosforilació està regulada per la Reelina (Howell et al., 1997a,b; Sheldon et al., 1997; Rice et al., 1998). Totes aquestes dades condueixen a pensar que ambdues proteïnes comparteixen la mateixa ruta de senyalització i que *Dab1* actua a l'interior de les neurones en migració com a resposta a la senyal provocada per la Reelina (Howell et al., 1999). L'expressió de Reelina i *Dab1* en poblacions de cèl·lules adjacents (cèl·lules de CR i neurones de la placa cortical, o bé cèl·lules granulars i de Purkinje, respectivament), abans del moment en què els defectes neuroanatòmics esdevinguin aparents en els ratolins deficients en Reelina o *Dab1*, semblen indicar que les neurones que expressen *Dab1* responen a Reelina just en el moment que interrompen la migració i es desenganxen de la glia radial (Rice et al., 1998; Rice

INTRODUCCIÓ

and Curran 1999). Encara més, s'han descobert uns ratolins amb una mutació doble per al receptor de les VLDL (Vldlr) i el de l'ApoE (Apoer2), que presenten un fenotip indistingible dels mutants *reeler* i *scrambler* (Trommsdorff et al., 1999). Ambdós receptors formen part de la superfamília de receptors per a les lipoproteïnes de baixa densitat i, a més, s'ha vist que tenen la capacitat d'unir Dab1 (Howell et al., 1997a, Trommsdorff et al., 1998). Per acabar d'entendre com funcionaria el mecanisme de transducció de senyal iniciat per la Reelina, estudis molt recents han demostrat que tant Apoer2 com Vldlr s'uneixen a la Reelina i que aquesta unió condueix a la fosforilació de Dab1 i, en el cas de Vldlr, a la internalització del receptor juntament amb la Reelina (D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999). Per tant, existeixen evidències convincents per a concloure que la Reelina, el Vldlr, el Apoer2 i la proteïna Dab1 funcionen en una mateixa ruta de senyalització entre les cèl·lules de CR i les neurones de la placa cortical. No obstant, ha aparegut una altra família sencera de proteïnes amb capacitat d'unir Reelina, es tracta de les anomenades cadherines (CNRs; Senzaki et al., 1999). El fet que aquestes actuessin de co-receptor suposa una idea atractiva ja que s'ha demostrat que el domini intracel·lular d'aquestes és capaç d'unir Fyn, i aquest (o un altre) membre de la família Src podria ser la kinasa responsable de la fosforilació de Dab1. Considerant aquests dos receptors, la Reelina els posaria en contacte de manera que Vldlr/Apoer2 uniria Dab1 per la part citoplasmàtica i les CNRs unrien la kinasa encarregada de fosforilar Dab1 (**Fig.12B**). Un estudi encara més recent, però, ha acabat de complicar l'assumpte amb el descobriment que també una integrina, la $\alpha3\beta1$, té capacitat d'unio a Reelina (Dulabon et al., 2000). Pel que fa a aquesta integrina, s'ha vist que la seva inhibició és suficient per a provocar que les neurones migradores s'alliberin de la glia radial. Basant-se en aquest fet, Dulabon i col·laboradors han hipotetitzat un model d'actuació de la Reelina. Segons aquest, la migració al llarg de les cèl·lules de la glia radial estaria mitjançada per la $\alpha3\beta1$ integrina acompanyada d'altres molècules d'adhesió o de senyalització (Komuro and Rakic, 1998; Maeda and Noda, 1998). Durant la translocació des de la zona ventricular fins a la placa cortical, la integrina $\alpha3\beta1$ neuronal interactuaria amb lligands com la laminina, que està distribuïda per totes les cadenes de la glia (Liesi 1990). Una vegada a la placa cortical, les neurones migradores trobarien la Reelina i la preferència de la integrina $\alpha3\beta1$ cap als seus lligands canviaria, de manera que disminuiria l'afinitat cap a les molècules de la superfície de la glia radial i augmentaria l'afinitat cap a la Reelina. Llavors aquesta uniria la integrina $\alpha3\beta1$ en un complex que inclouria també el Vldlr/Apoer2 i les CNRs, la formació del qual conduiria a una alteració de l'adhesió mitjançada per la integrina, potser degut a la internalització de aquesta integrina junt amb els altres receptors (D'Arcangelo et al., 1999). Tant

el canvi d'afinitat de la integrina $\alpha 3 \beta 1$ per la laminina com la seva endocitosi induïda pel Vldlr, podrien ser la causa de la ràpida dissociació de la glia radial que pateixen les neurones migradores. Indubtablement, la Reelina també té efectes cap a l'interior cel·lular que serien crucials per assolir els seus efectes inhibidors de la migració (Hiesberger et al., 1999). Està per determinar encara si la kinasa Cdk5 es troba implicada d'alguna manera en la ruta de senyalització de la Reelina. La regulació de l'afinitat per als lligands i l'endocitosi induïda podrien ser mecanismes generals per a una eliminació ràpida i específica de regió de les molècules de senyalització i d'adhesió situades en el *leading process* (part capdavantera de la neurona que dirigeix la migració) de les neurones migradores en el moment que aquestes deixen de migrar i comencen la seva agregació a les diferents capes del córtex cerebral.

3.4. LA NETRINA EN LA MIGRACIO

3.4.1 El paper de la Netrina-1 en l'axogènesi

Les netrines són una família de proteïnes secretables d'estructura semblant a la laminina que poden actuar tant com a quimioatracients com a quimiorepel·lents per diferents axons en desenvolupament (**Fig.13A**) (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994; Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995a). Els membres d'aquesta família es trobaren independentment en invertebrats i vertebrats (Ishii *et al.*, 1992; Kennedy *et al.*, 1994; Collamarino and Tessier-Lavigne, 1995a; Serafini *et al.*, 1996; Wadsworth *et al.*, 1996). Inicialment, un *screening* genètic a *C.elegans* revelà tres gens, anomenats *unc6*, *unc5* i *unc40*, els quals estaven involucrats en la migració cel·lular i axonal al llarg de l'eix dorsoventral del tub neural (Hedgecock et al., 1987, 1990; Ishii et al., 1992; Wadsworth et al., 1996; Hedgecock and Norris 1997). En els animals mutants per aquests gens, s'observa una desorganització de les migracions circumferencials dutes a terme tant pels axons pioners i com per les cèl·lules del mesoderm. D'altra banda, en una aproximació experimental dissenyada per a la detecció de molècules de guia, Tessier-Lavigne i col·laboradors aïllaren dues proteïnes que mimetitzaven l'efecte quimioatracient derivat de la *floor plate*, la Netrina-1 i la Netrina-2. Les netrines aïllades en vertebrats, en *Drosophila* i la proteïna UNC-6 de *C. elegans* són homòlogues i defineixen la família de les netrines (Ishii et al., 1992; Serafini et al., 1994; Mitchell et al., 1996; Harris et al., 1996). Comparteixen un elevat grau d'homologia amb la laminina (Tessier-Lavigne and Goodman 1996), un conegut constituent de les membranes basals i potent estimulador del creixement neurític (Martin and Timpl 1987). L'estudi de la seva estructura ha suggerit que les netrines són proteïnes secretades

INTRODUCCIÓ

que possiblement interactuen amb components de la matriu extracel·lular i de la superfície cel·lular (Serafini et al., 1994; MacLennan et al., 1997).

En els animals bilateralment simètrics, un dels primers passos que es donen en l'axogènesi és la formació de les connexions comissurals. Les comissures, o feixos d'axons que connecten les dues meitats del cos de l'animal i que estan presents al llarg de tot l'eix anteroposterior, depenen de la guia i organització d'uns grups de cèl·lules especialitzades situades a la línia mitja ventral (Colamarino and Tessier-Lavigne 1995b). La *floor plate*, situada a la part més ventral d'aquests grups de cèl·lules de la línia mitja, és la diana intermitja dels axons comissurals de la medul·la espinal embrionària. Assatjos *in vitro* han demostrat que explants de *floor plate* són capaços d'atraure i redirigir axons comissurals provinents de les zones dorsals dels tub neural (Tessier-Lavigne et al., 1988; Placzek et al., 1990; Shirashaki et al., 1995, 1996). S'ha vist que les netrines es troben expressades al llarg d'aquesta la línia mitja ventral, tant en invertebrats com en vertebrats, (Kennedy et al., 1994; Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996; Wadsworth et al., 1996; Hedgecock and Norris 1997) i que estan involucrades tant en l'atracció de d'algunes poblacions axonals cap a la línia mitja ventral com en la repulsió d'altres. En el cervell anterior, s'ha demostrat que la Netrina-1 intervé en la guia dels axons corticofugals i també en la dels axons retinals en el disc òptic (Kennedy et al., 1994; Colamarino and Tessier-Lavigne 1995a; Shirasaki et al., 1995; Deiner et al., 1997; Métin et al., 1997; Richards et al., 1997; de la Torre et al., 1997; Varela-Echevarria et al., 1997). També s'ha observat, no obstant, que els axons comissurals requereixen la interacció d'almenys dues molècules d'adhesió, Axonina /TAG-1 i Ng-CAM /L1, per assolir les seves dianes (Stoeckli and Landmesser, 1995).

3.4.2 Els receptors de la Netrina-1

Tornant a l'espècie *C.elegans*, he esmentat que les mutacions dels gens *unc-6*, *unc-5* i *unc-40* provoquen una desorganització de les migracions circumferencials que tenen lloc en el tub neural embrionari. Existeixen, però, diferències en l'alteració de les migracions en funció del gen mutat (**Fig.13B**). En el cas de la mutació en *unc-6* (homòleg de les netrines que es trobaria a la *floor plate*), tant les migracions en la direcció dorsal com ventral es veuen afectades, mentre que pels mutants d'*unc-5* l'alteració és en les migracions dorsals, i pels mutants d'*unc-40* l'anomalia es detecta majoritàriament en les ventrals (Hedgecock et al., 1987, 1990; Ishii et al., 1992; Chan et al., 1996). L'anàlisi genètic d'*unc-5* i *unc-40* en *C. elegans* revelà que aquests gens codificaven per proteïnes transmembrana de la superfamília de les immunoglobulines (Ig-CAMs; Leung-Hagesteijn et al., 1992; Hamelin et al., 1993) i se'ls proposà com a candidats a

INTRODUCCIÓ

al.,1996; Fazeli et al., 1997). En concret, en ratolí, aquests mutants presenten unes projeccions comissurals aberrants acompanyades de la manca del nucli pontí i d'una severa atròfia del complex olivar inferior (Hedgecock et al., 1990; Serafini et al.,1996; Kolodziej et al., 1996; Fazeli et al., 1997). Les evidències més directes que demostren que el DCC i la neogenina són receptors de la Netrina-1 són d'una banda la seva capacitat d'unió a Netrina-1 amb una afinitat que concorda amb l'activitat específica de la Netrina-1 *in vitro*, i de l'altra els assatjos *in vitro* on la presència d'anticossos contra DCC inhibeix el creixement que experimenten els axons comissurals quan són estimulats per la Netrina (Keino-Masu et al., 1996). Segons totes aquestes dades, el DCC seria un component del receptor-complex que mitjançaria la resposta quimioattractiva a Netrina-1 (Keino-Masu et al., 1996; Fazeli et al., 1997). La funció de la Neogenina encara resta desconeguda, tot i que en un estudi dels patrons d'expressió dels mRNAs del DCC i la Neogenina s'ha suggerit que el DCC actuaria en estadis molt primerencs del desenvolupament del CNS i la Neogenina funcionaria de molècula de guia en estadis més tardans continuant la feina començada pel DCC (Gad et al., 1997).

Hem esmentat que la Netrina-1 presenta un comportament bifuncional, actuant també com quimiorepulsiu per a determinats axons (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995a; Varela-Echevarria et al., 1997). Aquest efecte està mitjançat per l'altra família de receptors de la Netrina-1, les proteïnes emparentades amb Unc-5 (Hedgecock et al., 1990; Leung-Hagesteijn et al., 1992; Hamelin et al., 1993; Leonardo et al., 1997). S'han clonat tres homòlegs del gen *unc5* en vertebrats: *unc5h1*, *unc5h2* en rata (Leonardo et al., 1997) i *unc5h3* (inicialment anomenat *rcm*, degut a la seva implicació en la Malformació Cerebel·lar Rostral de ratolí; Ackerman et al., 1997). S'ha demostrat que s'uneixen a la Netrina-1 amb constants de dissociació coherents amb la dosi de Netrina-1 necessària per a promoure el creixement axonal (Leonardo et al., 1997). El mutant per *unc5h3* presenta anomalies en el cerebel postnatal, entre elles destaquen un patró de foliació anormal acompanyat de la localització ectòpica de les cèl·lules de Purkinje i de les granulars en el col·licle inferior del cervell. Aquests defectes fan pensar en una migració aberrant d'aquestes cèl·lules en la direcció rostral i en una pèrdua dels límits cerebel·lars rostrals (Ackerman et al., 1997; Leonardo et al., 1997; Przyborski et al., 1998). Tenint en compte aquest mutant i els ratolins mutants per *netrina-1* i *dcc*, caracteritzats per la manca del nucli pontí i una atròfia severa del complex de la oliva inferior (Serafini et al.,1996; Fazeli et al., 1997), sembla que la Netrina estaria funcionant tant de guia per a la navegació axonal com per la migració neuronal (Keino-Masu et al., 1996; Bloch-Gallego et al., 1999). Concretament, existeixen evidències per pensar que la *floor plate*, a través de la secreció de Netrina-1, podria estar implicada en els passos inicials de la migració de les neurones olivars inferiors des del llavi

ròmbic. Els precursors de les neurones olivars inferiors expressen algun dels receptors de Netrina-1, sols o bé en determinades combinacions, en funció de l'etapa de migració en què es troben, mentre que la Netrina-1 és expressada per la *floor plate* al llarg de tot el desenvolupament de la IO (Bloch-Gallego et al., 1999). Cada vegada sembla més evident que, tant en vertebrats com en invertebrats, les senyals que governen el creixement axonal podrien també estar implicades en migració neuronal (Culotti and Kolodkin, 1996; Goodman 1996; Hu and Rutishauser, 1996; Tessier-Lavigne and Goodman 1996). Tot i la clara implicació dels receptors Unc5 en la quimiorepulsió, a *C. elegans* Unc-40 és necessari no tan sols en les migracions ventrals (on seria atret per la Netrina-1 secretada per la *floor plate*), sinó que en menor proporció també afecta a les migracions dorsals (on seria repel·lit per la Netrina-1) (Hedgecock et al., 1990). Molt recentment, s'han realitzat assatjos *in vitro* proporcionant evidències de la formació d'un complex entre el DCC i Unc5, induït per la Netrina-1, que convertiria l'acció quimioattractiva del DCC en quimiorepulsiva (Hong et al., 1999).

Existeixen encara pocs estudis funcionals destinats a esbrinar la possible funció de la Netrina-1 i dels seus receptors en les migracions neuronals que tenen lloc en el sistema nerviós central. En un estudi general on s'analitzava l'expressió dels mRNAs de Netrina-1 i del seu receptor DCC en el sistema nerviós central i perifèric, posaren de relleu la seva expressió en zones de diferenciació neuronal i, pel que fa a la migració neuronal, sembla que podria estar actuant a nivell de les interneurons del cerebel (que expressen DCC en el seu pas per la substància blanca) que es dirigeixen cap a les zones superficials del córtex cerebel·lar (que expressen la Netrina-1) (Livesey and Hunt 1997). Sim i col·laboradors han suggerit, a més, que la Netrina-1 actuaria de molècula de guia global per a totes les migracions circumferencials dirigides cap a la línia mitja, en tots els nivells de l'eix del del sistema nerviós on existeix la *floor plate* (Sim et al., 1999).

4. LA MIGRACIO NEURONAL EN ANIMALS HIPOTIROIDEUS

Molt poc se'n sap dels factors fisiològics que regulen l'expressió de Reelina; únicament s'ha descrit que el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF) regula a la baixa l'expressió del mRNA de reelina (Ringstedt et al., 1998). D'altra banda se sap que l'hormona tiroïdea [3,5,3'-triiodotironina (T3) i tiroxina (T4)] regula un nombre important de gens cerebrals, incloent aquells que codifiquen per proteïnes mielíniques principals, proteïnes de citoesquelet, neurotrofines i els seus receptors, factors de transcripció i proteïnes de senyalització intracel·lular (Oppenheimer and Schwartz 1997; Bernal and Guadaño-Ferraz, 1998). No obstant,

cap d'aquests gens diana està directament relacionat amb la migració neuronal. Si que es coneix, tanmateix, que la deficiència d'hormona tiroidea durant el període perinatal, condueix al cretinisme, un síndrome associat a retard mental i deficiències neurològiques, (DeLong 1990; Porterfield and Hendrich 1993).

4.1. L'HIPOTIROÏDISME EN ANIMALS EXPERIMENTALS

4.1.1 Característiques generals dels animals hipotiroïdeus

En animals experimentals, l'hipotiroïdisme provoca un seguit d'anomalies en el sistema nerviós central, entre les quals les alteracions en la migració cel·lular són de rellevant importància. Els primers estudis sistemàtics dels efectes de l'hipotiroïdisme en el desenvolupament del cervell de les rates foren duts a terme per Eayrs i col·legues (Eayrs and Taylor 1951; Eayrs and Horne 1955; Eayrs 1955; Eayrs and Lishman 1955). La característica que distingeix el córtex cerebral de les rates hipotiroïdees és el desenvolupament tardà del neuropil. Tant els cossos cel·lulars del sistema nerviós central com del perifèric de les rates hipotiroïdees presenten un tamany més petit i estan més empaquetades que els de les rates control. Així mateix, també mostren defectes en el creixement axonal i la sinaptogènesi, una reduïda mielinització (Balazs et al., 1951, 1971; Rosman et al., 1972) i una expressió retardada d'enzims específics (Hamburgh and Flexner 1957; Garcia et al., 1967; Cocks et al., 1970). Aquestes deficiències s'observen en neurones del córtex cerebral, del córtex visual i auditiu, l'hipocamp i el cerebel, les quals es poden relacionar amb els problemes d'aprenentatge i motors manifestats pels animals hipotiroïdeus (Stein et al., 1991). Totes aquestes anomalies, juntament amb una marcada disminució en el nombre de microtúbuls i la retardada maduració d'aquests en les zones esmentades, assenyalen cap a possibles canvis profunds en el CNS (Legrand 1967; Faivre et al., 1984). Si s'administra hormona tiroïdea a les rates hipotiroïdees experimentals abans del final de la segona setmana de vida extrauterina, totes aquestes alteracions es poden revertir. Com més es retardi la suplementació, menys possibilitats de recuperació existeixen (Eayrs 1971; Legrand 1986). Recordem que el desenvolupament cerebel·lar en ratolí era majoritàriament postnatal i això fa que l'hipotiroïdisme perinatal afecti dràsticament a l'estructura i funcionament cerebel·lars (Legrand 1979; Koibuchi and Chin 1999). Les alteracions anatòmiques induïdes per l'hipotiroïdisme perinatal han estat àmpliament estudiades i inclouen una migració i proliferació retardades de les neurones granulars del cerebel, alteracions en la posició de les cèl·lules de Purkinje i una reducció en la seva arborització, acompanyada d'una reducció de les connexions amb les cèl·lules granulars i de canvis en les

connexions aferents (Nicholson and Altman 1972a, b, c; Lauder 1978; Legrand 1967, 1979; Hajós et al., 1973). En el telencèfal, també s'observen anomalies en la laminació del córtex cerebral, i localitzacions ectòpiques de neurones (Patel et al., 1976; Legrand, 1984; Berbel et al., 1993; Lucio et al., 1997).

Un dels motius pels quals s'utilitza la rata com a model experimental per a l'hipotiroïdisme és la relativa facilitat amb què es pot induir en la femella gestant, els fetus intrauterins i els neonats. L'administració tant de 2-mercapto-1-metilimidazol com de propiltiouracil en l'aigua per beure o el menjar bloqueja la oxidació del iodur a iode impeding la formació de T3 a partir de T4 en la tiroïdes maternal. Donat que aquests fàrmacs atravessen la barrera placentar i també són transmeses en l'alletament, tant els fetus com els neonats esdevéne hipotiroïdeus profunds.

4.1.2 Els defectes de migració en els animals hipotiroïdeus

En l'hipotiroïdisme, el cerebel neonatal mostra alteracions en la migració; concretament, la migració que experimenten les cèl·lules granulars des de la EGL cap a la IGL es veu retardada com a conseqüència d'una reducció en la seva velocitat quan travessen la capa molecular i la glia de Bergmann (Lauder 1979; Legrand 1984)). D'altra banda, una anomalia típica del cerebel hipotiroïdeu és la localització ectòpica de les cèl·lules de Purkinje que, recordem, també ocorre d'una manera més exagerada, en el ratolí mutant *reeler* (Mariani et al., 1977; Legrand, 1984; Miyata et al., 1997). Amb tot, la migració neuronal cerebral s'ha considerat tradicionalment no alterada en l'hipotiroïdisme, possiblement pel fet que aquest procés finalitza majoritàriament abans del naixement, i també pel presupòsit que el cervell fetal és insensible a l'hormona tiroïdea (Schwartz et al., 1997). No obstant això, dades recents han conduït a la reconsideració d'aquesta idea. S'ha detectat una distribució laminar anòmala en el córtex auditiu de les rates hipotiroïdees, que inclou un augment en el nombre de neurones en les capes V i VI, una concomitant disminució en les capes de la II a la IV, i la presència anormal de neurones en la substància blanca subcortical (Berbel et al., 1993; Lucio et al., 1997). Aquestes anomalies citoarquitectòniques molt probablement reflecteixen defectes de migració en el córtex. També s'ha mostrat recentment que la deficiència de iode altera la maduració de les cèl·lules gials hipocàmiques, que estan implicades en la migració neuronal (Martínez-Galán et al., 1997). Addicionalment, l'hipotiroïdisme afecta la migració de les cèl·lules que van des de les zones germinatives cap al bulb olfatori i cap a la regió del caudat-putamen (Patel et al., 1976; Lu and Brown, 1977).

4.2. L'HORMONA TIROÏDEA

L'hormona tiroïdea exerceix els seu ampli ventall d'accions reguladores controlant l'expressió gènica. Una vegada dins de la cèl·lula s'uneix al seu receptor nuclear (TR), el qual és un factor de transcripció regulat per lligand i amb capacitat d'unió a seqüències específiques de DNA conegudes com a elements de resposta a l'hormona tiroïdea (TREs). La regulació de la transcripció gènica es pot dur mitjançant l'activació dels TREs positius o la repressió dels TREs negatius, o mitjançant la interferència amb altres factors de transcripció (Muñoz and Bernal, 1997). Addicionalment, diversos estudis han mostrat efectes reguladors posttranscripcionals de T3 en l'estabilització, el processament i la traducció del mRNA, o en mecanismes posttraduccional (Aniello et al., 1991). Normalment, TR s'uneix al receptors retinoïdes (RXRs) formant heterodímers, els quals es poden unir a diversos co-reguladors actuant així com a co-repressors o co-activadors (Lazar, 1993; Muñoz and Bernal, 1997). El complex TR-RXR-coregulador determinarà en darrera instància l'acció nuclear de l'hormona tiroïdea (Chin and Yen 1997).

El model de funcionament acceptat en general assumeix que T3 és la hormona que exerceix l'efecte, mentre que T4 serveix de precursor ja que té la capacitat d'entrar més fàcilment en el cervell, on és convertit localment en T3 mitjançant les iodotironina 5'-deiodinases (Oppenheimer 1983; Calvo et al., 1990). La iodotironina 5'-deiodinasa tipus II és abundant en el cervell i és la màxima responsable d'aquesta conversió en aquest òrgan (Croteau et al., 1996; Leonard et al., 1981; Leonard and Koehle 1996). Es troba majoritàriament en astròcits, fet que suggereix que T4 és agafada dels capil·lars pels astròcits, convertida a T3, i transferida a les neurones a través del contacte directe cèl·lula-cèl·lula per a que pugui interactuar amb el seu receptor (Guadaño-Ferraz et al., 1999). S'ha vist que l'activitat de la deionidasa està regulada a l'alta en l'hipotiroïdisme, probablement per a protegir al cervell de la deficiència d'hormona tiroïdea (Guadaño-Ferraz et al., 1997).

S'han clonat dos gens que codifiquen per receptors de T3, T3R α i T3R β , cadascun dels quals posseeix dues isoformes T3R α 1, T3R α 2 i T3R β 1, T3R β 2, respectivament. Es de destacar que, mentre que tota l'activitat d'unió a T3 en el cervell fetal ve donada per la isoforma T3R α 1 (Schwartz et al., 1992; Strait et al., 1990, 1991), en el moment del naixement la concentració de mRNA de T3R β 1 augmenta quaranta vegades i arriba a nivells màxims al voltant del dia postnatal 10 (Strait et al., 1990; North and Fisher 1990). Aquest augment de receptor és d'especial d'interès perquè coincideix amb un augment de T3 a nivell del sèrum, suggerint que ambdós fenòmens podrien ser un reflexe d'un programa de desenvolupament coordinat. Tot i

l'elevada activitat d'unió a T3 que presenten diverses regions del cervell en desenvolupament (Mellström et al., 1991), els gens diana de T3 que desenvoluparien importants papers en la formació del cervell no estan ben definits.

4.3. GENS DIANA DE L'HORMONA TIROIDEA

En els darrers anys, ja s'han descrit un elevat nombre de gens que es troben sota el control de l'hormona tiroïdea en el CNS (Bernal and Guadaño-Ferraz, 1998). Tot i això, encara no s'han identificat les dianes directes claus per al correcte desenvolupament del CNS. Muñoz i col·laboradors (Muñoz et al., 1991) han comprovat l'efecte de l'hipotiroïdisme en l'expressió de diversos mRNAs del cervell en desenvolupament. D'una banda, han trobat una acusada disminució dels mRNAs de dos gens neuronals, la neurogranina (RC3) i la calbindina, en rates hipotiroïdes, tot i que no s'hi ha pogut identificar una regió TRE que indiqui una possible regulació per part de T3 (Iniguez et al., 1993, 1994). D'altra banda si que s'ha vist que els nivells de mRNA dels gens associats a mielina, que inclouen la proteïna bàsica de la mielina (MBP), la glicoproteïna associada a la mielina (MAG) i la proteïna proteolipídica (PLP) es veuen reduïts en un 50% en els cervells hipotiroïdeus i a més s'ha vist que aquest gen està directament regulat per T3 (Nuñez et al., 1992; Farsetti et al., 1991, 1992). El cas de la MBP, específicament expressada per l'oligodendroglia, ha estat el més ben estudiat i concorda amb els defectes de mielinització observats en animals hipotiroïdeus, ja que és la responsable de la regulació d'aquest procés. Amb tot, aquesta alteració no pot explicar completament totes les anomalies detectades en cervells hipotiroïdeus (Farsetti et al., 1992). Les concentracions de proteïnes associades a microtúbuls (MAP) i tau també es veuen afectades en estats d'hipotiroïdisme, tot i que no s'ha vist un canvi en nivells de mRNA (Nuñez et al., 1991; Silva and Rudas 1990). Aquestes dades, juntament amb un estudi que demostra que T3 està implicada en la regulació del *splicing* que sofreix el mRNA de tau per passar de formes joves a formes adultes, fan pensar en una funció extranuclear de l'hormona tiroïdea, en la qual aquesta actuaria a nivell posttranscripcional (Aniello et al., 1991). Relacionat amb aquesta possible funció, existeix un enzim, la monodeiodinasa de tipus II, l'acció del qual es veu ràpidament disminuïda per la presència de T4. Mitjançant certes aproximacions experimentals, s'ha arribat a la conclusió que l'hormona tiroïdea influenciaria l'activitat del citoesquelet, que provocaria la internalització de l'enzim cap a compartiments endosomals, disminuint així l'activitat d'aquest (Leonard et al., 1990; Farwell et al., 1993). La capacitat de l'hormona tiroïdea per a influenciar l'activitat del citoesquelet obre la possibilitat que existeixin mecanismes similars que

INTRODUCCIÓ

involucrarien proteïnes citoplasmàtiques en la migració neuronal, l'elongació axonal i dendrítica i la diferenciació neuronal (Lauffenburger and Horwitz 1996; Mitchison and Cramer 1996).

Estudis molt recents parlen de la possibilitat que les neurotrofines, com el BDNF i la neurotrofina-3 (NT-3), estiguin regulades directament per T3. Aquests factors pertanyen a un grup de proteïnes, que inclouen també a factor de creixement nerviós (NGF), que desenvolupen un paper essencial en la diferenciació neuronal, el creixement neurític i la sinaptogènesi (Lewin and Barde 1996). Concretament, s'ha observat que, durant el desenvolupament del cervell de rata, l'hormona tiroïdea augmenta l'expressió del factor NGF, del gen *trkA* que codifica pel seu receptor d'elevada afinitat, i del gen del factor NT-3 (Walker et al., 1982; Lindholm et al., 1993; Alvarez-Dolado et al., 1994). A més, les anomalies observades en el cerebel de les rates hipotiroïdees concorden amb les observades en condicions de baixos nivells de mRNA de NT3 i BDNF (Koibuchi and Chin 1999; Neveu and Arenas 1996; Lindholm et al., 1993; Koibuchi et al., 1999) i el sumministre d'aquests factors evita, en part, el desenvolupament cerebel·lar anormal induït per l'hipotiroïdisme (Neveu and Arenas 1996). Contràriament, en el cervell hipotiroïdeu s'expressen uns nivells anormalment elevats del receptor de baixa afinitat per les neurotrofines $p75^{LNGFR}$ (Figueiredo et al., 1993; Alvarez-Dolado et al., 1994). Aquestes dades concorden amb la interacció funcional descrita entre l'hormona tiroïdea i el NGF en el cervell en desenvolupament dels rosegadors i en les cèl·lules PC12 de *pheochromocytoma in vitro* (Patel et al., 1988; Clos and Legrand, 1990; Muñoz et al., 1993). Amb tot, no s'han identificat TREs en les regions promotores dels gens de NT3 i BDNF, tot i que s'ha vist que contenen múltiples llocs de començament de transcripció associats a diferents promotors i l'expressió d'aquests gens és regulada per T3 d'una manera específica de promotor (Koibuchi et al., 1999; Leingartner and Lindholm 1994).

Recentment s'ha mostrat que un receptor nuclear orfe relacionat amb l'àcid retinoic ($ROR\alpha$), membre de la superfamília de receptors nuclears d'hormones esteroïdees, podria estar relacionat amb el desenvolupament cerebel·lar mitjançat per T3 (Koibuchi and Chin 1998; Koibuchi et al., 1999). Degut a les alteracions cerebel·lars que presenten els ratolins mutants per $ROR\alpha$, s'ha hipotetitizat que T3 podria estar regulant l'expressió d'aquest, el qual controlaria els gens essencials per al desenvolupament normal del cerebel, o, alternativament, $ROR\alpha$ podria estar regulant l'acció del receptor de l'hormona tiroïdea (Hamilton et al., 1996; Sidman et al., 1962; Messer and Hatch 1982). Existeixen altres factors influenciats per l'hormona tiroïdea, com Hr o Krox24, que podrien estar regulant alhora altres gens, o bé modulant el receptor de T3. Aquest és el cas de COUP-TF, un gen que es troba regulat al llarg del desenvolupament i

que s'ha vist que modula l'acció del receptor de T3 (Thompson and Bottcher 1997; Thompson 1996; Ghorbel et al. 1999; Anderson et al., 1998; Schwartz et al., 1997).

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat el d'aprofundir en la funció de les molècules que fan possible que la migració neuronal es dugui a terme, permetent així un correcte desenvolupament de sistema nerviós central. Per assolir aquesta fita, ens hem centrat en les molècules de guia Reelina i Netrina-1, la proteïna adaptadora Dab1, i l'hormona tiroïdea, els mutants de les quals presenten greus alteracions en el cervell degudes a migracions neuronals aberrants en les primeres etapes de desenvolupament.

Concretament,

1.-Per aprofundir en les funcions de la Reelina hem analitzat el patró d'expressió que presenten els transcrits de reelina en el cervell anterior del ratolí, ja des d'estadis embrionaris primerencs fins a l'adult. Els anàlisis s'han basat en la tècnica d'hibridació *in situ* d'elevada resolució mitjançant una ribosonda contra reelina marcada amb digoxigenina.

2.-Donada la naturalesa poc clara d'algunes de les poblacions cel·lulars que expressen el mRNA de la reelina hem fet ús de tècniques de doble marcatge d'una banda pel mRNA de la reelina i de l'altra utilitzant anticossos contra diferents marcadors neuroquímics per tal de caracteritzar el tipus de cèl·lules neuronals que expressen reelina en ratolí. També hem utilitzat la hibridació *in situ* doble, amb una sonda freda contra l'enzim sintetitzador del neurotransmissor GABA i una de radioactiva contra la reelina, per acabar de caracteritzar l'heterogènia població cel·lular que sorgí dels anàlisis anteriors.

3.-Pel que fa a la regulació de l'expressió del gen de la reelina i donada la importància de l'hormona tiroïdea en el desenvolupament del cervell i, concretament, en la migració neuronal, hem volgut investigar si aquesta hormona podria estar regulant l'expressió de la Reelina. Així, hem dispost d'un model experimental en rata que reproduïx els efectes de l'hipotiroïdisme i hem dut a terme un estudi comparatiu entre rates hipotiroïdees i control on hem analitzat els patrons d'expressió dels transcrits de reelina i de la proteïna Reelina.

4.-Ja que l'acció intracel·lular de la Reelina estaria mediatitzada per la proteïna adaptadora Dab1, hem volgut comprovar si els nivells tant del seu mRNA com de la seva proteïna es veuen alterats en els animals hipotiroïdeus.

5.-Finalment, i per tal d'estudiar directament si l'hormona tiroïdea és capaç de restituir el patró normal d'expressió de reelina en els animals hipotiroïdeus, hem realitzat experiments *in vitro* i *in vivo* on tant els animals hipotiroïdeus com els cultius extrets d'aquests s'han tractat amb hormona tiroïdea i hem analitzat els seus efectes.

6.-Referent al paper que podria desenvolupar la Netrina-1 en la migració neuronal, no ens hem centrat en el cervell anterior, sinó en el posterior, ja que és en aquesta zona on s'han detectat les alteracions que apuntarien cap a errors de migració en els mutants per Dcc i Netrina-

OBJECTIUS

1. La complexitat de les rutes de migració i de les diferents destinacions seguides per les neurones originades en el llavi ròmbic, ens porta a pensar que en aquest procés han d'estar-hi implicats múltiples factors de guia i d'aturada. Per tal d'entendre la base molecular de la migració neuronal en el llavi ròmbic, hem estudiat els efectes de la Netrina-1 *in vitro* en explants extrets de llavi ròmbic de E12-E14, i del seu derivat postnatal, la EGL.

7.-Donada l'existència de diversos receptors per a la Netrina-1, hem analitzat els seus respectius patrons d'expressió per a veure si concorden amb els resultats dels estudis funcionals esmentats més amunt. Hem analitzat, doncs, mitjançant la hibridació *in situ* amb sondes marcades amb digoxigenina, els patrons d'expressió dels transcrits de netrina-1 i dels seus receptors dcc, neogenina, unc5h2 i unc5h3 en el tronc encefàlic inferior i en el cerebel en desenvolupament. Pel que fa a la proteïna DCC també n'hem analitzat el seu patró d'expressió.

1. ORIGEN I UTILITZACIÓ D'ANIMALS EXPERIMENTALS

Tant per l'anàlisi d'expressió del gen reelina al llarg del desenvolupament com per a l'estudi de la funció de la Netrina-1 en les migracions cerebel·lars hem utilitzat ratolins albins embrionaris i postnatsals OF1 (Iffa Credo, Lyon, França) mantinguts a l'estabulari de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. D'altra banda, per als experiments destinats a comprovar els efectes de l'hormona tiroïdea sobre l'expressió de reelina i dab1 hem utilitzat rates wistar mantingudes en l'estabulari del *Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"* de la Universitat Autònoma de Madrid. En tots els casos, el dia d'acoblament i el dia de naixement dels animals s'han considerat, respectivament, dia embrionari zero (E0) i dia postnatal zero (P0).

S'han realitzat tots els esforços possibles per tal de minimitzar el sofriment dels animals utilitzats i per fer ús d'alternatives a les tècniques *in vivo*. Per al manteniment i manipulació dels animals hem seguit les recomanacions de *European Communities Council Directive* del 24 de novembre de 1986 (86/609/EEC).

2. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE REELINA

2.1. TRACTAMENT I PREPARACIÓ DEL TEIXIT

S'utilitzaren ratolins albins OF1 de les següents edats: E10, E11, E12, E14, E16, E18, P0, P5, P10, P15, P21 i adult (de tres a nou animals cadascun). Els embrions E10-E12 s'extragueren de les femelles prenyades després de l'anestèsia d'aquestes amb éter, i es fixaren per immersió amb paraformaldèhid al 4% en tampó fosfat 0.1M, pH 7.3 (PFA). Els embrions més grans d'E14 i postnatsals es perfongueren transcardiacament amb PFA i els seus cervells foren postfixats. Posteriorment, es crioprotegiren els cervells amb sacarosa al 30% i es congelaren en gel sec. Es recolliren seccions coronals, sagitals i horitzontals (de gruix: 80µm, E10-E12; 60µm, E14-E18; 50µm, P0-P5; 30µm, P15-adult) en una solució crioprotectora (30% glicerol, 30% etilenglicol, 40% PBS 0.1M) i es guardaren a -30°C fins el dia d'ús.

2.2. HIBRIDACIÓ *IN SITU* I IMMUNOCITOQUÍMICA

La hibridació *in situ* fou realitzada en seccions en flotació essencialment com ha estat descrit (de Lecea et al., 1994, 1997). Les seccions foren permeabilitzades amb Triton X-100 al 0.2-0.5% (15min), tractades amb H₂O₂ al 2% (15min), desproteïnitzaes amb HCl 0.2N (10min), acetilades amb anhídrid acètic (0.25% en hidrociorur de trietanolamina 0.1M; pH 8), fixades en PFA 4% (10min) i bloquejades amb glicina 0.2% (5min). Després, les seccions es

prehibridaren a 60°C durant 3h en una solució que contenia el 50% de formamida, el 10% de sulfat de dextrà, 5X de solució de Denhardt's, NaCl 0.62M, EDTA 10mM, PIPES 20mM, pH 6.8, DTT 50mM, 250µg /ml de tRNA de llevat i 250µg /ml de DNA desnaturalitzat d'esperma de salmó. Es marcà una ribosonda de reelina amb digoxigenina-dUTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanya) mitjançant la transcripció *in vitro* d'un fragment de cDNA que codificava per a la Reelina de ratolí (D'Arcangelo 1995) utilitzant la RNA polimerasa T3 (Ambion, Austin, TX). El RNA complementari al missatger (*antisense*) marcat fou afegit a la solució de prehibridació (500ng /ml) i la hibridació es dugué a terme a 60°C, durant tota la nit. Llavors, les seccions es rentaren amb SSC 2X (30min, temperatura ambient), realitzàrem una digestió amb 20mg /ml de RNAsa A (37°C, 1h), i les rentàrem amb 0.5X de SSC /50% de formamida (55°C, 4h) i amb 0.1X de SSC /0.1% de sarkosil (60°C, 1h). Posteriorment, canviàrem el tampó per un de salí tamponat amb Tris (TBS) /0.1% de Tween 20 (15min), bloquejàrem amb sèrum normal de cabra al 10% (2h) i incubàrem les seccions amb un anticòs contra digoxigenina conjugat amb fosfatasa alcalina durant tota la nit (1:2000; Boehringer Mannheim). Després de ser rentades, revelàrem les seccions amb *nitroblue tetrazolium* (NBT) i 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfat (BCIP) (Life Technologies, Gaithersburg, MD) i les muntàrem en porta-objectes gelatinitzats amb Mowiol com a medi de muntatge.

Alternativament, després del revelat amb NBT/BCIP, les seccions hibridades foren immunotenyides amb diferents anticossos marcadors de cèl·lules. Després de diversos rentats amb una solució de salí amb tampó fosfat 0.1M, pH 7.3 (PBS), s'incubaren tota la nit amb anticossos de conill contra calbindina (1:6000), calretinina (1:3000), parvalbúmina (1:6000) (tots de Swant antibodies, Bellizona, Switzerland), neuropèptid Y (NPY; 1:2000), pèptid vasoactiu intestinal (VIP; 1:2000) (ambdós de CRB, Northwich Cheshire, UK), somatostatina (1:1000; Dakkopats, Santa Barbara, CA) i colecistoquinina (CCK; 1:2000, CRB). Els anticossos primaris foren visualitzats mitjançant un anticòs biotinilat de cabra anti-conill (1:200) i el complex streptavidina-peroxidasa (1:400) (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La reacció de la peroxidasa es realitzà utilitzant diaminobenzidina i H₂O₂.

2.3. HIBRIDACIÓ *IN SITU* DE DOBLE MARCATGE

Duguérem a terme hibridacions *in situ* de doble marcatge essencialment com ha estat descrit (de Lecea et al., 1994, 1997). Breument, un fragment de cDNA codificant per la reelina de ratolí (D'Arcangelo et al., 1995) fou transcrit *in vitro* utilitzant la RNA polimerasa T3 (Ambion) i ³⁵S-UTP (Amersham Ibérica). Les dues isoformes de l'àcid glutàmic decarboxilasa [GAD65 i GAD67, generosament cedides pel Dr. Allan Tobin (University of California, Los

Angeles)] foren marcades amb digoxigenina-dUTP (Boehringer Mannheim) mitjançant la RNA polimerasa T3. El teixit fou pretractat com s'ha descrit més amunt i s'hi afegí 1.5×10^7 cpm /ml de mRNA de reelina marcat amb ^{35}S juntament amb 50ng /ml de GAD65 o GAD 67. Després de rentar amb elevada astringència en presència de β -mercaptoetanol 10mM, les seccions foren incubades amb un anticòs anti-digoxigenina conjugat amb fosfatasa alcalina com s'ha descrit abans. Llavors, les seccions es muntaren en porta-objectes gelatinitzats i se submergiren en emulsió autoradiogràfica Ilford K5, per a ser exposades durant 5 setmanes a 4°C i revelades amb Kodak D10.

La sonda de GAD67 sempre donà un major senyal que GAD65. Tot i així, els patrons d'expressió foren tant similars que ambdós es consideraren com a expressió de GAD65/67.

2.4. EXPERIMENTS CONTROL

Les hibridacions control amb ribosondes de seqüència codificant (*sense*) marcades amb digoxigenina o ^{35}S , o la digestió amb RNasa A abans de la hibridació, evitaren el marcatge de la fosfatasa alcalina o el senyal autoradiogràfic per sobre del soroll de fons. Pel que fa als controls immunocitoquímics, l'omissió dels anticossos primaris evità el marcatge de la diaminobenzidina.

2.5. ANÀLISI DE DADES

Les seccions foren examinades en un microscopi Zeiss Axiophot (Oberkochen, Germany). La delimitació de les fronteres regionals i laminars es realitzà d'acord amb Sidman et al. (1971), Zilles (1985) i Paxinos et al. (1994). La distribució radial de les cèl·lules que expressaven reelina i les neurones doblement marcades fou determinada en bandes verticals (de $500\mu\text{m}$ d'ample), abastant tot el gruix cortical de l'àrea somatosensorial primària i de l'hipocamp. Les cèl·lules immunoreactives per cada marcador neuroquímic que presentaven hibridacions positives i negatives per reelina foren comptades en vuit bandes verticals de dos ratolins adults. Els resultats s'expressaren com a la mitja \pm SD i en forma de percentatge de colocalització. Les dades foren comparades mitjançant un test ANOVA i un *post hoc t*.

3. EFECTE DE L'HORMONA TIROÏDEA SOBRE L'EXPRESSIÓ DE REELINA I DAB1

3.1. TRACTAMENT I PREPARACIO DEL TEIXIT

En aquest cas, s'utilitzaren rates wistar a les quals s'induí hipotiroïdisme fetal i neonatal (E18, P0, P5) administrant-los 2-mercapto-1-metilimidazol (MMI; 0.02%, Sigma, St.Louis, MO) en l'aigua per beure de les femelles prenyades, des del novè dia després de la concepció, i es continuà l'administració fins que els animals foren sacrificats. El MMI bloqueja la síntesi tant de l'hormona tiroïdea materna com de la fetal, inhibint la iodació de la tiroglobulina (Yamada et al., 1974; Marchant et al., 1977). Addicionalment, es realitzà una tiroïdeotomia a P5 tal com ha estat prèviament descrit (Rodríguez-Peña et al., 1993; Alvarez-Dolado et al., 1994). Aquest protocol assegura que els animals són hipotiroïdeus durant tot el període neonatal (Muñoz et al., 1991; Alvarez-Dolado et al., 1998). Els animals P0 se sacrificaren de 8 a 12 hores després del naixement. La T4 fou utilitzada pel tractament hormonal *in vivo* perquè té la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica d'una manera més eficient que la T3, i és convertida a T3 en el cervell (Dickson et al., 1987). La T4 s'administrà en forma d'injecció intraperitoneal diària de 1.8µg /100g de pes, començant 4 dies abans del sacrifici de l'animal. Les rates se sacrificaven 24h després de la darrera injecció de T4. Almenys s'estudiaren tres animals per grup experimental per tal d'obtenir valors representatius.

3.2. EXTRACCIÓ DE RNA I ANÀLISI MITJANÇANT NORTHERN BLOT

Per a preparar RNA total utilitzàrem el procediment de l'isotiocianat de guanidina i fenol-cloroform (Chomczynsky and Sacchi, 1987). El RNA poli(A)⁺ es purificà per cromatografia d'afinitat utilitzant oligo-dT-cel·lulosa (Vennström and Bishop, 1982). Se separaren els RNAs en funció dels diferents pesos moleculars mitjançant un gel d'agarosa-formaldèhid i es transferiren a una membrana de nylon tot seguint les tècniques estàndar (Sambrook et al., 1989). Com a controls de la quantitat i integritat de RNA present en els filtres, es tenyiren les membranes amb una solució de blau de metilè al 0.02% preparat amb acetat de sodi 0.3M i rehibridats amb una sonda de cDNA de ciclofilina (Cy) (Muñoz et al., 1991). Les sondes radioactives es prepararen utilitzant el procediment d'unió a l'atzar d'encebadors amb seqüència múltiple o *random priming* (Feinberg and Vogelstein, 1983). Es carregaren a cada carril 10µg de RNA poli(A)⁺ de diferents regions cerebrals. La sonda de reelina era un fragment de 1540 bp (de la posició 1532 a la 3071) del cDNA de ratolí (D'Arcangelo et al., 1995). La sonda de Cy fou cedida pel Dr. J.G. Sutcliffe (*Scripps Research Institute*, San Diego, CA).

3.3. HIBRIDACIÓ *IN SITU* I IMMUNOCITOQUÍMICA

S'utilitzaren embrions E18 de rata o rates postnats P0, P5 i P15. Se seguí el tractament per a l'obtenció i hibridació de les seccions de cervell descrit en el punt 2.2. d'aquest capítol de resultats, només que aquesta vegada s'utilitzaren sondes per a detectar els missatgers de reelina i dab1. D'altra banda, la immunocitoquímica també es dugué a terme amb el protocol del punt 2.2., amb la diferència que aquests animals es perfongueren amb PFA al 2% i s'incubaren unes seccions amb l'anticòs monoclonal CR50 (1:2000), que reconeix la regió N-terminal de la Reelina (Ogawa et al., 1995; D'Arcangelo et al., 1997), i unes altres amb un anticòs policlonal contra Dab1 obtingut en conill (B3; 1:2000; Howell et al. 1997a).

3.4. CULTIUS ORGANOTÍPICS

Es prepararen cultius de seccions d'hipocamp de rates control (n=10) i hipotiroïdees (n=10) essencialment com ha estat descrit (Del Río et al., 1996, 1997). Animals P0 foren anestesiats per hipotèrmia i en disseccionàrem l'hipocamp i el futur córtex parietal. S'obtingueren seccions transversals (300 a 350µm de gruix) tallant el teixit en una *McIlwain tissue chopper* (Mickle Laboratory Engineering, Gomshall, UK). Les seccions seleccionades es mantingueren en Medi Essencial Minim (MEM) suplementat amb L-glutamina (2mM) durant 45min a 4°C. Posteriorment, es cultivaren les seccions utilitzant la tècnica de la membrana porosa Millicell (Stoppini et al., 1991). El medi d'incubació fou 50% de MEM, 25% de sèrum de cavall, 25% de HBSS, suplementat amb L-glutamina (2mM). Els grups experimentals constaven de cultius provinents d'animals hipotiroïdeus incubats en sèrum normal (n=24) o en sèrum mancat de T3/T4 (n=24) amb o sense T3 afegit diàriament (150nM, n=24, o 500nM, n=24). Els cultius organotípics de rates nounates controls es distribuïren en grups semblants: sèrum normal (n=24), sèrum sol mancat de T3/T4 (n=24), o suplementat diàriament amb T3 (150nM, n=24, o 500nM, n=24). Després de 6 dies *in vitro* (DIV), els cultius es fixaren amb PFA al 4% en tampó fosfat 0.1M i es guardaren. Després de diversos rentats, s'obtingueren seccions de 50µm de gruix utilitzant un vibràtom i es processaren per a la detecció del mRNA de reelina i la seva proteïna mitjançant la hibridació *in situ* i la immunocitoquímica, respectivament, tal i com s'ha descrit més amunt.

3.5. RT-PCR QUANTITATIU

S'extragué el RNA total de 6 seccions organotípiques mitjançant mètodes no-desnaturalitzants (Sambrook et al., 1989) i es resuspengué en 20µl d'aigua destil·lada. Es retrotranscrivieren aliquotes de 4µl i s'amplificaren utilitzant el kit *Retrotools cDNA/DNA*

MATERIALS I MÈTODES

polymerase (Biotools, Madrid, Spain) d'acord amb les instruccions del fabricant (el marcatge es dugué a terme a una T_m de -3°C i l'amplificació constà de 25 cicles, amb la Taq polimerasa). Pels assatjos de reelina l'encebador amb seqüència codificant (*forward primer*) fou ATACGTGGATCCCTGTATCTACTTGCTGTGTTGC i l'encebador complementari a la seqüència codificant (*reverse primer*) fou ATACGTC-TAGACAAGTCACTTTGTTACCACAG, corresponent a la seqüència terminal de 342 bp de la regió 3' no traduïda de la reelina de ratolí (D'Arcangelo et al., 1995). Per als assatjos de la gliceraldehid fosfat deshidrogenasa (GAPDH), el *forward primer* fou GGCCCCTCT-GGAAAGCTGTGG, i el *reverse primer* fou CCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT, cobrint la seqüència codificant de 435 bp entre els nucleòtids 608 i 1043 del cDNA de GAPDH de ratolí (Sabath et al., 1990). Els productes de PCR es corregeren en gels d'agarosa al 1.2%, es transferiren a membranes de nylon i s'hibridaren amb el *forward primer* marcat amb ^{32}P mitjançant procediments estàndar (Sambrook et al., 1989). Els resultats s'analitzaren en un aparell *Instant Imager* (Packard, Meridian, CT) i les dades s'expressaren en comptes per minut.

3.6. PREPARACIÓ D'EXTRACTE DE CERVELL I ANÀLISI PER IMMUNOBLOT

Es prepararen extractes de proteïna de córtex cerebral i cerebel de rates P0 i P5 control i hipotiroïdes, i de cervell total d'animals E17 i nounats de soca salvatge i *reeler*. S'homogeneïtzà el teixit que fou congelat sobtadament en nitrogen líquid amb 500 μl de tampó de lisi fred (0.1% NP-40, NaCl 250mM, Tris-HCl 50mM, pH7.4, EDTA 1mM, PMSF 2mM, leupeptina 20 μM o NaF 50mM) per 100mg de teixit. Els extractes es clarificaren per centrifugació a 14000rpm durant 30min. Es carregaren 100 μg d'extracte de proteïna per carril en un gel al 4-12% de poliacrilamida en gradient (Novagen, Madison, WI), es transferiren a membranes de nitrocel·lulosa, s'incubaren amb un anticòs policlonal contra conill dirigit contra el domini d'unió a fosfotirosina (PTB) del mDab1 (anticòs PTB31) i es visualitzaren mitjançant quimioluminiscència intensificada (Boehringer Mannheim). Amb la intenció de tornar a hibridar la membrana es retiraren els anticossos (*stripping*) i es procedí a una segona incubació amb un anticòs anti-ref-1 (Xanthoudakis et al., 1992) com a control intern de càrrega de quantitats iguals de proteïna.

3.7. EXPERIMENTS CONTROL

Els controls utilitzats per la hibridació *in situ* i la immunocitoquímica es dugueren a terme de la mateixa manera que s'ha explicat més amunt. Pel que fa a les anàlisis mitjançant RT-PCR, les mostres de RNA foren digerides amb DNasa I fent ús de procediments estàndar

(Sambrook et al., 1989) i, després de practicar la transcripció reversa, foren exposades a anàlisis de PCR.

3.8. ANÀLISI DE DADES

Les seccions foren examinades en un microscopi Reichert Polyvar. La delimitació de les fronteres regional i laminar es dugué a terme d'acord amb Sidman et al. (1971), Zilles (1985) i Paxinos et al. (1994). El nombre de neurones marcades presents a la capa I neocortical (futur córtex parietal) i en el stratum lacunosum-moleculare de l'hipocamp fou determinat en bandes horitzontals (400µm de llargada) cobrint tota l'amplada de les capes (Del Río et al., 1995). Per les quantificacions en les capes V-VI, es comptà el nombre de neurones marcades presents en $9 \times 10^4 \mu\text{m}^2$. Per a cada grup i edat els comptatges es realitzaren en quatre fins a sis seccions per animal (de dos a cinc animals per grup). Les dades (expressades com a mitja de cèl·lules comptades \pm SEM) foren comparades amb els tests ANOVA i *post hoc t*.

4. ESTUDI DELS EFECTES DE LA NETRINA-1 EN LA MIGRACIÓ

4.1. TRACTAMENT I PREPARACIÓ DEL TEIXIT

Per aquest bloc d'experiments utilitzarem ratolins OF1. A diferència del punt 2.1., després de l'anestèsia amb éter de les femelles prenyades, s'extragueren els embrions i els seus cervells es recolliren en una solució de PBS 0.1M i D-glucose al 0.6% per a extreure'n explants o, alternativament, es fixaren amb PFA. El processament dels cervells fixats d'embrions més grans de E14 i dels ratolins postnatsals fou el mateix que el descrit en el punt 2.1. excepte que se n'obtingueren seccions coronals d'un gruix de 50µm, les quals es recolliren en la solució crioprotectora i es guardaren a -30°C fins a ser utilitzats.

4.2. CULTIU D'EXPLANTS

La uRL i la IRL d'embrions E12-E15 es disseccionà d'una sola peça i es tallà en petits troços de 150-300µm mitjançant agulles de tungstè afilades (Fig.35A). D'altra banda, la EGL postnatal s'obtingué a partir de seccions parasagitals de cerebel postnatal de 250µm tallades amb un *McIlwain tissue chopper* (Mickle Laboratory Engineering, Gomshall, UK) de les quals, després de treure'n les meninges, en sortiren troços d'EGL d'uns 150-300µm (Fig. 35B).

Els explants foren cultivats a una distància de 200-600µm dels agregats de cèl·lules EBNA-293 establement transfectades amb un plasmidi codificant per Netrina-1-c-myc o amb el vector sol (Keino-Masu et al., 1996). Els explants i els agregats cel·lulars s'inclogueren en una

matriu de col·làgena de cua de ratolí tal i com ha estat descrit (Lumsden and Davies, 1986) i cultivats amb DMEM (Seromed) suplementat amb L-glutamina, NaHCO₃, D-glucosa i els suplementes B-27 i N2 (tots provinents de Gibco Life Technologies), durant 24-72 hores en un incubador amb un 5% de CO₂ i un 95% d'humitat a 37°C. Per a monitoritzar l'expressió de Netrina-1 i la distància coberta pel gradient format per aquesta, alguns cultius foren fixats i immunotenyits amb l'anticòs monoclonal 9E10 anti-c-myc (Santa Cruz). La Netrina-1-c-myc secretada fou detectada en un gradient que abastava uns 300-400µm des dels agregats cel·lulars de EBNA-293 després de 2 DIV, indicant que, en les nostres condicions experimentals, es forma un gradient de Netrina-1 de llarg abast. En alguns experiments, els explants s'incubaren en medi condicionat durant 36h per cèl·lules EBNA-293 transfectades amb Netrina-1 o amb el vector sol diluït 1:1 amb medi fresc.

Es realitzaren 28 experiments i s'analitzaren al voltant de 2000 explants.

4.3. IMMUNOCITOQUÍMICA

Els explants es fixaren amb PFA al 4% durant 1 hora i es processaren per a la visualització de cossos neuronals i dendrites. Després de diversos rentats amb PBS, s'incubaren els cultius amb anticossos monoclonals contra la β -tubulina de tipus III específica de neurones (1:3000; clon Tuj-1 Babco; Moody et al., 1989), el DCC intracel·lular humà (1:500; clon GA7 499, Pharmigen), el C-myc (1:200, Santa Cruz) o amb anticossos policlonals fets en conill contra el DCC intracel·lular humà (1:1000; Fabre et al., 1999), la proteïna L1 (1:2000; Persohn and Schachner, 1987), la TAG-1 (1:2000; Karagogeos et al., 1991), la calbindina D28k (1:10000, Swant) i el GFAP (1:1000; DAKO). La incubació amb anticossos secundaris (1:200; Vector Laboratories Burlingame, CA) fou seguida per la del complex streptavidina-peroxidasa (1:400; Amersham). La reacció de la peroxidasa fou duta a terme utilitzant diaminobenzidina i H₂O₂. Alternàrem la utilització d'anticossos secundaris conjugats amb FITC o Texas-Red associat a streptoavidina, juntament amb marcadors nuclears fluorescents (bisbenzimidida o bromur d'etidi) per visualitzar tant els cossos cel·lulars com les neurites.

4.4. HIBRIDACIÓ IN SITU

Es realitzà com s'ha comentat en el punt 2.2., però en aquest cas s'utilitzaren ribosondes per a detectar netrina-1, dcc, unc5h2, unc5h3 i neogenina, marcades amb digoxigenina-dUTP (Boehringer Mannheim). La transcripció del fragment de cDNA de 2.7Kb codificant per a la regió 3' no traduïda de la Netrina-1 de ratolí (Serafini et al., 1996) fou duta a terme per la polimerasa T3 (Ambion). Amb la polimerasa SP6 (Promega) transcriguérem un fragment de

cDNA corresponent a la regió citoplasmàtica de 0.85Kb del dcc de rata i un fragment de 0.72Kb codificant per la regió citoplasmàtica de la neogenina de rata (Keino-Masu et al., 1996). Els fragments de cDNA corresponents a unc5h2 (1.5Kb) i unc5h3 (1.6Kb) de rata (Leonardo et al., 1997) foren transcrits amb la polimerasa T7 (Ambion). Els cRNAs *antisense* marcats s'afegiren a la solució de pre-hibridació a una concentració de 250-500ng/ml.

4.5. EXPERIMENTS CONTROL

Els controls utilitzats per a la hibridació *in situ* i la immunocitoquímica es dugueren a terme de la mateixa manera que s'ha explicat anteriorment.

4.6. ANÀLISI DE DADES

Les seccions hibridades i immunotenyides foren examinades amb un microscopi *Zeiss axiophot*. La delimitació de les fronteres regional i laminar es realitzà d'acord amb Jacobowitz i Abbot (1998). Si es cultivaven explants de llavi ròmbic o d'EGL aïlladament mostraven un patró de creixement neurític radial. La quantificació neurítica s'obtingué d'explants immunotenyits amb Tuj-1, mentre que la quantificació de migració neuronal es realitzà amb explants tenyits amb bisbenzimida. En ambdós casos, els explants es fotografiaren (augment final de 75X) i el camp es dividí en quatre quadrants com està mostrat a la Fig. 35C. Per cada explant, les àrees cobertes tant per les neurites Tuj-1-positives com per les cèl·lules tenyides amb bisbenzimida (des de l'extrem dels explants fins al perímetre exterior dels processos en expansió o neurones) es mesuraren en els quadrants distal i proximal utilitzant el programa d'anàlisi d'imatges IMA_t (Serveis Científic-Tècnics, Universitat de Barcelona). Aquestes dades es presentaren com a una mitja \pm SD. Per a l'anàlisi estadística de les àrees, es realitzaren els tests d'ANOVA i LSD amb el programa d'estadística *Statgraphic*. Per a determinar la direcció preferencial del creixement, s'obtingué el quocient entre la superfície del quadrant proximal i la del distal per a cada explant, el qual dona un valor de 1 per a un creixement radial. Els quocients que divergien de la mitja obtinguda per explants cultivats amb cèl·lules control per més d'una SD foren assignats, per tant, al grup d'atrets o bé repel·lits per la Netrina-1.

1. PATRO D'EXPRESSIONI DEL mRNA DE LA REELINA EN EL CERVELL DE RATOLÍ AL LLARG DEL DESENVOLUPAMENT

Ja a l'estadi embrionari primerenc E10, detectarem trànscripats de reelina, tant a nivell de telencèfal com de diencèfal. Més endavant, a E11-E12, s'observà un increment generalitzat d'expressió de reelina en la majoria de regions telencefàliques i diencefàliques (Taula 1, Fig.14). Els nivells màxims d'expressió s'apreciaren entre E14 i P5, edats en les quals es detectà un marcatge prominent en el córtex cerebral, l'hipocamp, l'estriat i el bulb olfactori, i en nuclis discrets de la part basal de cervell anterior, tàlem i hipotàlem (Taula 2, Fig. 15). No obstant, els nivells d'expressió sempre foren més elevats en el córtex cerebral i en el bulb olfactori que en la resta de regions del cervell anterior. En concret, en el córtex, l'expressió es localitzà bàsicament a la zona marginal-cap a I, encara que les cèl·lules de la placa cortical també presentaven marcatge. Entre P5 i P21, l'expressió de reelina disminuï en totes les regions del cervell anterior (Fig. 15) i, ja en l'adult, només perdurà un senyal feble en el córtex cerebral, el bulb olfactori i en alguns nuclis basals del cervell anterior.

1.1. EXPRESSIÓ PRIMERENCA EN EL CERVELL ANTERIOR

La distribució del mRNA de reelina en estadis embrionaris primerencs ha estat descrita segons el model prosomèric d'organització del cervell anterior (Taula 1) (Puelles and Rubenstein, 1993). A nivell general, els trànscripats de reelina sempre s'han detectat en camps de diferenciació, mentre que no s'han trobat mai en matrius germinals.

L'estadi embrionari 10 (E10) fou el punt de partida del nostre estudi al llarg del desenvolupament. En aquesta edat s'observava una feble expressió de missatger a la superfície de la placa alar de la part rostral del prosencèfal secundari (Prosòmers 4-6), la qual donarà lloc, en l'adult, al bulb olfactori, al neocórtex, a l'arquicórtex i al rinencèfal (Taula 1, Fig. 14A). A E11-E12, l'expressió de reelina es tornà més intensa en el bulb olfactori i telencèfal, zones on s'observava una banda de cèl·lules fortament marcades que recobrien tota la superfície de les vesícules telencefàliques, incloent-ne els aspectes més ventrals i l'arquicórtex. Alhora, es trobaren nivells variables d'expressió en zones diferenciades del futur septum medial /complexe de la cinta diagonal, estriat i amígdala. En el primordi hipotalàmic, que correspon aproximadament al cordó cel·lular hipotalàmic i a l'àrea entopeduncular posterior, es detectà un domini longitudinal de forta expressió de reelina. També es trobaren cèl·lules reelina-positives a l'àrea supraòptica /paraventricular i a l'hipotàlem anterior (Taula 1, Fig. 14B-F).

RESULTATS

En el diencèfal, a E10-E12, mentre que el tàlem dorsal apareixia mancat de trànscrips de reelina, en el tàlem ventral s'observava una intensa expressió en dues zones, la que esdevindrà el nucli geniculat lateral i la zona limitans intratalàmica (Fig. 14B,E,F). Semblava, doncs, que l'expressió de reelina estava deliniant toscament les fronteres transversals entre prosòmers ja que aquestes dues regions delimiten el tàlem dorsal (Prosòmer 2) del tàlem ventral (Prosòmer 3). Alhora, es detectà marcatge d'hibridació en el futur nucli reticular i en la zona incerta (tàlem ventral) i una molt dèbil expressió en zones de diferenciació de l'epitàlem (regió dorsal del Prosòmer 2) (Taula 1).

En el pretectum, a E11-E12, aparegueren dos dominis transversals d'expressió que corresponien a la frontera entre el futur tàlem dorsal (Prosòmer 2) i el pretectum (Prosòmer 1), i a la frontera entre el pretectum i el mesencèfal (límit entre el diencèfal i el mesencèfal). En aquesta darrera zona, a més, el missatger de la reelina es trobava en una banda de neurones superficials al llarg de la comissura posterior (Mastick i Easter, 1996) (Fig. 14B,C).

A tall de resum, durant els estadis embrionaris E10-E12 els trànscrips de reelina s'han detectat en dominis transversals i longitudinals restringits a la placa alar del prosencèfal secundari (Prosòmers 4-6) i en el futur diencèfal (Prosòmers 1-3).

1.2. EXPRESSIÓ EN LA ZONA MARGINAL-CAPA I DEL NEOCÓRTEX EN DESENVOLUPAMENT

Pel que fa al córtex cerebral, la zona de més elevada expressió de reelina fou la zona marginal-capa I (D'Arcangelo et al. 1995; Hirotsune et al. 1995). Al llarg de E11-E12 (etapa de la preplaca), els trànscrips de reelina es detectaren en una fina capa de cèl·lules de la superfície cortical, a la part més externa de la preplaca, just on es localitzen les cèl·lules de CR (Marin-Padilla, 1972; Derer and Derer, 1990; De Carlos and O'Leary, 1992; Del Río et al., 1995). Aquestes cèl·lules reelina-positives estaven organitzades en forma d'una banda contínua que cobria tota la superfície de la vesícules telencefàliques, incloent el futur neocórtex, la regió hipocàmpica, el córtex entorrinal i l'àrea piriforme i també el primordi de la regió septal (Fig. 14B-E). A E14, estadi en què ja ha sorgit la placa cortical, les cèl·lules que expressaven reelina es trobaren, exclusivament, a la meitat externa de la zona marginal-capa I (Fig. 15A). Aquestes cèl·lules intensament marcades presentaven un gran pericarió orientat horitzontalment. Des d'aquesta edat fins al naixement del ratolí, el patró d'hibridació en la zona marginal-capa I romangué essencialment similar, amb cèl·lules intensament marcades en la meitat externa d'aquesta capa (Figs. 15B,C, 16A).

Per tal de comprovar que aquestes neurones eren cèl·lules de CR, es tractaren seccions de cervell ja hibridades amb la sonda de reelina amb anticossos contra calretinina, un marcador per cèl·lules de CR de ratolí (Del Río et al., 1995, 1997). A E14, la majoria de neurones reelina-positives també presentaven un marcatge per calretinina, tret d'una petita proporció de cèl·lules que, exclusivament, mostraven marcatge per reelina, suggerint que l'expressió de reelina precedeix en el temps a l'expressió de calretinina (dades no mostrades). Ja a E16-P0, s'observà una colocalització del 100% entre el mRNA de reelina i la calretinina, on les neurones doblement marcades presentaven característiques típiques dels cèl·lules CR (Fig. 17A,B,E). També es dugué a terme un doble marcatge de les seccions hibridades amb reelina utilitzant anticossos contra calbindina, la qual està present en una població intrínseca de neurones GABAèrgiques de la zona marginal-cap a I localitzades en la meitat inferior d'aquesta capa (Del Río et al., 1992, 1995; Brunstrom et al., 1997). En cap estadi del desenvolupament (E14-P0) les neurones calbindina-positives de la capa I expressaren reelina (Fig. 17C). Aquesta hipòtesi fou corroborada per la doble hibridació amb ribosondes per a reelina i GAD65/67 que mostrà que, en estadis prenatals, GAD65/67 marcava lleugerament una banda de neurones de la part interior de la zona marginal (Fig. 17D), lluny de la capa de neurones de la part exterior que expressaven la reelina. Així doncs, en estadis embrionaris i perinatals, els transcrits de reelina en la zona marginal del neocòrtex estan expressats exclusivament per les cèl·lules de CR.

1.3. EXPRESSIÓ EN LA ZONA MARGINAL DE L'HIPOCAMP EN DESENVOLUPAMENT

A E12-E14, la regió hipocàmica també presentava expressió de reelina (Figs. 14D,15A). A aquestes edats, en les quals la placa hipocàmica (futura capa piramidal) (Soriano et al., 1994) encara no ha emergit, s'observaren neurones marcades a la capa més superficial. A E16, etapa en què ja s'intueixen la típica distribució en capes de l'hipocamp i també el primordi del gir dentat, es detectà una gran quantitat de neurones fortament tenyides que poblaven la part exterior de la zona marginal (futur stratum lacunosum-moleculare) just per sota de la fissura hipocàmica. Alhora, aparegué una segona població de cèl·lules dèbilment marcades en altres capes hipocàmiques, com la zona marginal interna i la subplaca (futurs stratum radiatum i stratum oriens, respectivament).

A E18-P0 i en edats postnatales primerenques, el patró d'expressió de la reelina romangué essencialment igual, amb algunes excepcions. Primer, i coincidint amb l'inici del desenvolupament del gir dentat, es detectà un elevat nombre de neurones intensament marcades a la capa molecular externa i més tard, al llarg de P5-P10, període en què emergeix la làmina

RESULTATS

infrapiramidal del gir dentat, aparegué una banda de cèl·lules reelina-positives a la capa molecular externa d'aquesta làmina, sota de la pia. Segon, el nombre de neurones que expressaven reelina en el stratum radiatum i oriens augmentà en estadis perinatals, i també es pogueren observar cèl·lules marcades a l'hilus del gir dentat des de P0 en endavant (Figs. 15B-D, 16B,D).

Les anàlisis de doble marcatge mitjançant anticossos contra calretinina revelaren un complex patró de colocalitzacions en l'hipocamp prenatal. A E14, tres capes de cèl·lules es distingien a la preplaca: una banda externa formada per cèl·lules que únicament expressaven el mRNA de reelina, una capa central composta per neurones que coexpressaven reelina i calretinina i una banda interna de neurones positives només per la calretinina (Fig. 18D). Aquestes cèl·lules reelina-negatives/calretinina-positives podrien correspondre a neurones calretinina-immunoreactives diferents de les cèl·lules CR (per exemple: neurones de subplaca o piramidals de CA3). A E16-P0, d'altra banda, existia una completa colocalització de reelina amb calretinina a la part externa de la zona marginal, on les neurones doblement marcades presentaven cossos cel·lulars horitzontals i dendrites típiques de les cèl·lules de CR (Fig. 18E) (Soriano et al., 1994; Del Río et al., 1995, 1996).

Les seccions d'embrions E18 hibridades simultàniament amb ribosondes per reelina (marcada radioactivament) i GAD 65/67 (marcada amb digoxigenina) revelaren neurones feblement marcades amb GAD65/67 en el stratum radiatum i en el stratum oriens, però no en la zona marginal externa. En concordança amb les hibridacions no isotòpiques per reelina (vegeu més amunt), les neurones GAD65/67-positives en el stratum radiatum i en el stratum oriens presentaven senyals autoradiogràfics febles pel que fa al mRNA de reelina (Fig. 18A-C). Algunes d'aquestes neurones reelina-positives eren immunoreactives per la calbindina i la calretinina, les quals marquen subpoblacions de neurones no-piramidals en aquestes capes (vegeu més avall). Tots aquests resultats ens porten a concloure que la reelina està altament expressada en cèl·lules GAD65/67-negatives de l'hipocamp i que, de manera semblant al córtex, l'inici de l'expressió de reelina en aquestes neurones precedeix a l'aparició de la calretinina. Alhora, algunes neurones GAD65/67-positives situades en els futurs stratum radiatum i stratum oriens expressaven baixos nivells de reelina des de E16 en endavant.

1.4. EXPRESSIÓ A LA CAPA I I STRATUM LACUNOSUM-MOLECULARE EN ESTADIS POSTNATALS I EN L'ADULT

1.4.1 Neocórtex

A P5, la reelina encara estava fortament expressada en la majoria de cèl·lules de la capa I (Fig. 16C). Contràriament al que succeïa en edats anteriors, els estudis de doble marcatge revelaren un complex patró d'expressió en el qual les neurones reelina/calretinina positives constituïen al voltant de la meitat de la població de les neurones reelina-positives de la capa I (104 de 181 cèl·lules, 57%), i les neurones restants expressaven només reelina (Fig. 17F). Encara més, les anàlisis de doble marcatge revelaren expressió de reelina tant en neurones positives com negatives per GAD65/67 (Fig. 17G,H). Aquestes observacions ens estarien indicant que a P5, l'edat en què es comença a detectar la desaparició de cèl·lules de CR (Derer and Derer, 1990; Del Ríó et al., 1995,1996), els missatgers de reelina estan expressats en cèl·lules CR i en una subpoblació de neurones GABAèrgiques de capa I.

A mida que s'avançava en l'edat (P10, P15, P21 i adult), el senyal de reelina anava decreixent uniformement, tot i que s'observava un nombre considerable de neurones feblement marcades a la capa I (Fig. 16E). Estudis immunocitoquímics per la detecció de calretinina mostraren una progressiva disminució de neurones doblement marcades en aquests estadis postnatsals, on la majoria expressaven únicament reelina. En canvi, a P21 i en l'adult, totes les neurones de la capa I que expressaven reelina coexpressaven alhora el mRNA de GAD65/67 (Fig.17I-K). Aquests fets indiquen que les neurones reelina-positives de capa I, en edats postnatsals avançades i en l'adult, pertanyen a les neurones GABAèrgiques intrínseques a aquesta capa.

1.4.2 Hipocamp

Uns canvis similars, però retardats, s'observaren en el patró d'expressió de reelina en la capa molecular/stratum lacunosum-moleculare de l'hipocamp en estadis postnatsals. Així, l'expressió de reelina encara era elevada a P5-P15 en les cèl·lules de CR hipocàmiques, mentre que a P21 s'observà una important reducció tant de la intensitat de marcatge de reelina com del nombre de neurones doblement marcades amb calretinina en la capa molecular externa/stratum lacunosum-moleculare (Figs. 16D,F, 18F,K). La majoria d'aquestes neurones doblement marcades, presumiblement cèl·lules de CR, presentaven un tamany petit i persistiren en l'hipocamp adult.

Com en el neocórtex, l'expressió de reelina també fou detectada des de P5 en endavant en cèl·lules calretinina-negatives, no CR de la capa molecular/stratum lacunosum-moleculare.

RESULTATS

Aquestes cèl·lules expressaven el mRNA de GAD65/67 tant en edats postnatsals com en l'adult (Fig. 18G-J). En l'adult, les neurones reelina/GAD65/67-positives representaven al voltant d'un 25% de la població de cèl·lules que expressava reelina en la capa molecular/stratum lacunosum-moleculare (34 de 138 cèl·lules). Tot això ens indica que des de P5 en endavant els trànscrips de reelina estan expressats en una població de neurones GABAèrgiques presents en les àrees derivades de la zona marginal hipocàmpica i que, en contrast amb el neocòrtex, l'expressió de reelina persisteix en una petita subpoblació de cèl·lules CR que semblen sobreviure en els estadis adults.

1.5. EXPRESSIÓ EN ZONES DERIVADES DE LA PLACA CORTICAL

1.5.1 Neocòrtex

A E18, emergí una banda de neurones que expressaven reelina a les capes V i VI del neocòrtex (Fig. 16A). Aquesta estava formada per neurones dèbilment marcades que es distribuïen àmpliament per tot el córtex cerebral, al llarg del eixos rostrocaudal i mediolateral. A P0-P5, l'expressió de reelina esdevingué més prominent en les capes V-VI i es podien observar algunes neurones positives en la densa placa cortical (capes II-IV) (Figs. 15C,16C). En edats postnatsals primerenques, anticossos contra calbindina i calretinina marcaven subpoblacions tant de cèl·lules piramidals en les capes V-VI com no-piramidals de tot el córtex (Del Río et al., 1995, 1996). Tot i així, ambdós grups podien ser distingits segons la forma dels seus cossos cel·lulars i l'orientació dendrítica. Estudis de colocalització mostraren que a P0-P5, els trànscrips de reelina estaven expressats en grups de neurones immunoreactives per calretinina i calbindina que exhibien formes multipolars corresponents a neurones no-piramidals. Existien, tanmateix, moltes neurones no-piramidals immunoreactives que no expressaven el mRNA de reelina. Per contra, aquest mRNA no fou mai detectat en neurones piramidals immunoreactives (Fig. 19A-C), fet que encaixaria amb la troballa que virtualment totes les cèl·lules reelina-positives en les capes II-VI expressaven GAD65/67 a P5 (no mostrat).

Posteriorment, a P10, P15, P21 i en l'adult, es notà un progressiu descens en els nivells d'expressió de reelina. Tanmateix, per totes les capes corticals es podien observar moltes neurones reelina-positives, amb densitats més elevades en les capes I, V i VI de P21 i adult (Fig. 16E). No es detectaren diferències destacables entre les diverses àrees neocorticals del cervell adult. Les anàlisis de colocalització mostraren que virtualment cada neurona reelina-positiva present a les capes II-VI també expressava el mRNA de GAD65/67, confirmant que els trànscrips de reelina en el neocòrtex adult estan expressats en grups d'interneurones GABAèrgiques (Figs.17J,K, 19G,H).

Per tal de determinar si la reelina estava expressada en tipus concrets de neurones no-piramidals del neocòrtex adult, es realitzaren anàlisis de colocalització detallats utilitzant anticossos contra les proteïnes segrestadores de calci parvalbúmina, calretinina i calbindina, així com anticossos per detectar els neuropèptids NPY, somatostatina, VIP i CCK (Figs. 19D-20). Aquests marcadors detecten diferents, tot i que parcialment solapades, subpoblacions d'interneurones corticals (de Felipe, 1993; Freund and Buzsáki, 1996; Cauli et al., 1997). Els estudis es centraren en el córtex de la zona somatosensorial primària dels *barrels*, però es detectaren patrons de colocalització similars en altres àrees corticals. En les cèl·lules granulars de la capa IV o les piramidals de les capes II-III, les quals estaven feblement marcades pels anticossos contra calbindina, no s'observaren trànscrips de reelina. Alhora, la reelina rarament apareixia expressada en interneurones positives per parvalbúmina, colecistokina o VIP (per exemple: 2 de 710 cèl·lules parvalbúmina-positives). En canvi, les cèl·lules reelina-positives mostraven nivells variables de colocalització amb subpoblacions de neurones immunoreactives per calretinina, calbindina, NPY i somatostatina. Així com la reelina i la calretinina o el NPY colocalitzaven majoritàriament en les capes supragranulars, la major part de les neurones calbindina-positives doblement marcades estaven localitzades en les capes V i VI (Fig.20).

El mRNA de la reelina no colocalitzà amb la població sencera de neurones immunoreactives per qualsevol dels anticossos marcadors. Així, la reelina fou trobada en baixos percentatges (<20%) en neurones immunoreactives per la calbindina i la somatostatina, mentre que aproximadament la meitat de les neurones positives per NPY i somatostatina co-expressaven reelina en les capes II-III i IV (Fig. 20). En cap capa cortical, la suma de les neurones doblement marcades coincidia amb el nombre total de neurones Reelina-positives. Per exemple, en les capes II-III i IV, en total només un al voltant d'un 80% de les neurones Reelina-positives estaven doblement marcades amb els diferents anticossos. Totes aquestes dades ens demostren que els trànscrips de reelina estan expressats en una població heterogènia de neurones corticals no-piramidals.

1.5.2 Hipocamp

A P5-P15, a la part exterior de la capa molecular/stratum lacunosum-moleculare de l'hipocamp s'hi podien trobar moltes neurones reelina-positives feblement marcades, que hi romangueren fins als estadis P21 i adult. També se'n trobaren de distribuïdes per totes les capes, essent més abundants a l'hilus i al stratum oriens (Fig. 16F). Com en el neocòrtex, aquestes neurones coexpressaven els trànscrips de GAD65/67 (no mostrat), tot indicant que són

RESULTATS

interneurones no-piramidals GABAèrgiques. Els trànscrips de reelina no foren detectats en les cèl·lules piramidals ni granulars de l'hipocamp, en cap etapa postnatal ni en l'adult.

Es dugueren a terme anàlisis de doble marcatge en seccions hipocàmiques de ratolins P21 i adults que mostraren que, d'una manera semblant al neocòrtex, la reelina rarament estava expressada en subpoblacions de neurones immunoreactives per la parvalbúmina, CCK i VIP (1-6% co.localització). En canvi, sí que expressaven reelina un nombre variable de neurones immunoreactives per calretinina (104 de 140, 58%), calbindina (25 de 185, 14%), somatostatina (138 de 185, 75%) i NPY (20 de 66, 30%) (Figs. 19I, 21). Aquestes neurones doblement marcades es trobaven disperses per totes les capes de l'hipocamp, però eren especialment abundants al stratum oriens i a l'hilus. En aquestes capes, la majoria de les neurones immunoreactives per somatostatina presentaven senyals de reelina. Aquestes observacions mostren que tant en l'hipocamp en desenvolupament com en l'adult, la reelina està expressada en diferents subpoblacions de neurones no-piramidals GABAèrgiques.

1.6. EXPRESSIÓ EN ELS CÒRTEX PIRIFORME I ENTORRINAL

El patró d'expressió de reelina durant el desenvolupament de les àrees piriforme i entorrinal (paleocòrtex) resulta ser paral·lel, en gran mesura, a l'observat en el neocòrtex tant des d'un punt de vista temporal com laminar (Taules 1,2). Així, durant l'embriogènesi, el mRNA de reelina fou detectat majoritàriament en la zona marginal-capa I, on, mitjançant anàlisis immunocitoquímics realitzats amb anticossos contra calretinina, es confirmà l'expressió de reelina en cèl·lules de CR (no mostrat). Des de E16 en endavant, la reelina s'expressà en neurones disperses per totes les capes corticals i aquesta expressió continuà en l'adult. Com succeïa en el còrtex adjacent, aquestes neurones expressaven marcadors típics d'interneurones corticals, incloent els mRNAs de GAD65/67 i proteïnes segrestadores de calci (no mostrat).

Una característica singular d'aquestes regions corticals fou l'expressió del mRNA de reelina en una estreta banda de neurones situades sota de la capa I, que correspondria a la capa II. L'expressió de reelina en aquestes neurones començà a E16, presentà un màxim en edats postnatsals primerenques i persistí en el cervell adult (Figs. 15B,C, 22G). En cap moment aquestes neurones expressaren GAD65/67, ni foren positives per cap dels anticossos que marcaven interneurones corticals. Així doncs, concloguerem que, conjuntament amb les interneurones GABAèrgiques, les neurones piramidals situades en la capa II dels còrtex piriforme i entorrinal expressen trànscrips de reelina tant en el cervell en desenvolupament com en l'adult.

1.7. EXPRESSIÓ EN EL BULB OLFACTORI, EL CERVELL ANTERIOR BASAL I L'HIPOTÀLEM

1.7.1 Bulb olfactori

El bulb olfactori resultà ser una zona amb una important expressió de reelina. Des de E12 en endavant, trobarem que el mRNA de reelina estava expressat a nivells molt elevats en una banda circular de cèl·lules, que corresponia a la capa de cèl·lules mitrals (Fig. 22A-C). Aquests nivells es mantingueren alts durant el període prenatal i la primera setmana postnatal, a partir de la qual començaren a disminuir fins a mantenir-se a un nivell constant en l'adult. Experiments de doble marcatge confirmaren que les cèl·lules reelina-positives d'aquesta capa no expressaven el mRNA de GAD65/67 (Fig. 22D-F) i que la majoria d'elles eren immunoreactives per calretinina, com correspon a les cèl·lules mitrals (no mostrat).

A partir de P5, aparegué una segona zona d'expressió de reelina en el bulb olfactori a la part més interna de la capa glomerular (lamina granular externa) (Fig. 22B,C) i els experiments de doble marcatge demostraren que aquest tipus de neurones tampoc expressava el mRNA del GAD65/67 (Fig. 22E,F), ni presentava immunotinció per a proteïnes segrestadores de calci. En el bulb olfactori adult, continuà l'expressió de reelina, tot i que més feble que en edats anteriors, en neurones mitrals i en un tipus de neurones periglomerulars ubicades a la làmina granular externa. En cap estadi del desenvolupament es detectà reelina a la zona subventricular olfactiva, a la via de migració rostral o a la zona subventricular caudal, les quals generen les interneurons olfactives al llarg de tota la vida, postnatal i adulta (Luskin, 1993b; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Jankovski and Sotelo, 1996; Lois et al., 1996).

1.7.2 Cervell anterior basal

En els estadis embrionaris primerencs, E11-E12, es trobaren cèl·lules reelina-positives intensament marcades exteses per tota la superfície del telencèfal ventral, incloent la futura àrea septal (Fig. 14D,E). Des de E14 en endavant, l'expressió de reelina augmentà uniformement en moltes àrees del cervell anterior basal per arribar a un màxim a E18-P0 i disminuir a P5-P10 (Fig. 15A-D). Les àrees de més expressió incloïen el futur caudat-putamen, el complex amigdalí, el septum medial /complexe de la cinta diagonal i la taenia tecta /tubercle olfactori. Observarem que el senyal d'hibridació de reelina no estava uniformement distribuït en el caudat-putamen, el qual mostrava clapes d'expressió més elevada, especialment a prop de la substància blanca subcortical. També es trobaren moltes altres àrees del cervell anterior basal que expressaven reelina d'una manera transitòria, com el septum lateral, el nucli accumbens, l'àrea preòptica, el nucli basal i l'estria terminalis o l'àrea entopeduncular /càpsula interna. En canvi,

RESULTATS

altres regions, com el globus pallidus, mai presentaren marcatge. En l'adult, tot i l'extensa presència del mRNA de reelina durant el desenvolupament, només es detectaren algunes neurones que exhibien un senyal feble de reelina en el septum medial /complexe de la cinta diagonal i en la regió amigdalina.

1.7.3 Hipotàlem

Des de E14 en endavant, s'observà que l'expressió de reelina augmentava uniformement en moltes de les estructures hipotalàmiques. El nucli hipotalàmic paraventricular resultà ser un lloc d'important expressió de reelina, tot i que també es trobà marcatge en les divisions anterior, lateral i supraòptica de l'hipotàlem. En aquestes regions, es detectà un màxim d'expressió al voltant del naixement que disminuï a partir de P5 fins a l'adult, edat en la qual ja no se n'observà més.

1.8. EXPRESSIÓ EN EL DIENCÈFAL EN DESENVOLUPAMENT

A l'epitàlem, el nucli epitalàmic paraventricular mostrava nivells mitjans d'expressió de reelina des d'edats primerenques (E12) fins a P5, similars als nivells observats pel complex habenular medial, tot i que en aquest darrer es mantingueren fins a P21 (Taula 2). En el tàlem dorsal, en canvi, no es detectaren senyals d'hibridació a cap edat.

A E12-E14, el tàlem ventral mostrava una important expressió de reelina en el nucli reticular, la zona incerta, la zona limitans intratalàmica i el nucli geniculat lateral ventral (Figs. 14B, F, 23A,B). En edats més avançades del desenvolupament, el marcatge es restringí, bàsicament, a la zona limitans intratalàmica (futura lamina medullar externa) i al nucli geniculat lateral ventral, assolint un màxim entre E18 i P5. En el nucli reticular i en la zona incerta es detectaren nivells baixos d'expressió fins a E16 i fins a P10, respectivament, edats a partir de les quals l'expressió desaparegué. Des de P5 en endavant, s'observà una disminució generalitzada del marcatge en el tàlem ventral de manera que, a P21, només es podien veure algunes cèl·lules Reelina-positives en el nucli geniculat lateral ventral. En l'adult, ja no es detectaren trànscrips de reelina en cap zona del tàlem ventral.

En el pretectum, els nuclis pretectals anterior i olivar i el nucli relacionat amb la comissura posterior mostraren una prominent expressió de reelina durant el desenvolupament embrionari i postnatal (Figs. 15C, 23E). A partir de P10, no obstant, l'expressió en aquestes regions disminuï i, ja en l'adult, només es detectaren algunes cèl·lules feblement marcades.

Taula 1

Expressió del mRNA de reelina en el cervell anterior de ratolí a E10-E12, d'acord amb el model prosomèric (Puelles i Rubenstein, 1993)			
	E10	E11	E12
Prosencèfal secundari			
Prosòmer 6			
Bulb olfactori	+	++	+++
Septum lateral	-	-	-
Septum medial/cinta diagonal	-	+	+
Prosòmer 5			
Neocòrtex	+	++	+++
Camp diferenciat de l'estriat	-	+	+
Amígdala	-	+	+
Hipotàlem anterior	-	+	+
Cordó cel·lular hipotalàmic	-	++	++
Prosòmer 4			
Arquicòrtex	+	++	+++
Supraòptic / paraventricular hipotalàmics	-	+	+
Àrea entopeduncular posterior	-	++	++
Diencèfal			
Prosòmer 3			
Tàlem ventral	-	++	++
Zona limitans intratalàmica	-	++	+++
Prosòmer 2			
Tàlem dorsal	-	-	-
Epitàlem	-	+	+
Prosòmer 1			
Pretectum	-	++	++

Es mostren nivells baixos (+), moderats (++) i elevats (+++) d'expressió de reelina. També s'indiquen els nivells no detectables d'expressió (-).

RESULTATS

Taula 2

Distribució del mRNA de reelina en el cervell anterior de ratolí des de E14 fins a l'edat adulta

	E14	E16	E18	P0	P5	P10	P15	P21	AD
Telencèfal									
Bulb olfactori									
Cèl·lules mitrals	+++	++++	++++	++++	+++	++	++	++	+
Cèl·lules granulars externes	-	-	-	-	++	++	++	++	+
Neocòrtex									
Capa I	+++	++++	++++	++++	+++	+	+	+	+
Capes II-IV	-	-	-	-	+	++	+	+	+
Capes V-VI	-	-	+	++	+++	++	+	+	+
Paleocòrtex									
Capa I	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+
Capa II	-	+	+	+++	+++	++	++	++	+
Resta de capes	-	-	+	++	+++	++	+	+	+
Hipocamp									
Stratum lacunosum moleculare	+++	++++	++++	++++	+++	++	++	+	+
Stratum oriens	-	+	++	+++	+++	++	+	+	+
Stratum radiatum	-	+	++	+++	+++	++	+	+	+
Hilus	-	-	-	-	+++	++	++	+	+
Cervell anterior basal									
Septum medial/cinta diagonal	+	+	+	++	++	++	+	+	+
Septum lateral	-	-	+	++	+	+	+	-	-
Nucli basal de l'estria terminalis	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Tubercle olfactori/taenia tecta	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	-
Caudat-putàmen	+	++	+++	+++	++	+	+	+	-
Nucli acumbens	-	+	+++	+++	++	-	-	-	-
Amígdala	+	+	++	++	++	++	++	++	+
Substantia innominata	+	+	+	++	+	+	+	+	-
Àrea entopeduncular/càpsula interna	++	++	++	++	++	+	+	+	-
Hipotàlem									
Nucli anterior	++	++	++	+	+	+	+	-	-
Zona lateral	++	++	++	++	++	+	-	-	-
Nucli paraventricular	++	++	+++	+++	++	+	+	+	-
Àrea supraòptica	++	++	++	++	+	+	+	+	-
Diencèfal									
Epiràlem									
Nucli paraventricular	++	+	+	+	+	-	-	-	-
Habènula	+	++	++	++	+	+	+	+	-
Tàlem ventral									
Nucli geniculat lateral ventral	++	++	+++	+++	+++	++	+	+	-
Nucli reticular	++	+	-	-	-	-	-	-	-
Zona incerta	++	+	+	+	+	+	-	-	-
Làmina medial-lar externa	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
Pretectum									
Nuclis de la commissura posterior	++	++	+++	+++	++	++	+	+	+
Nuclis anterior i olivar	++	++	++	++	++	++	+	+	+

Es mostren nivells baixos (+), moderats (++) i elevats (+++) d'expressió de reelina. També s'indiquen els nivells no detectables d'expressió (-).

Figura 14

Expressió del mRNA de reelina al llarg del desenvolupament embrionari primerenc. A) Secció parasagital del telencèfal a E10, mostrant expressió de reelina en la zona més superficial de la preplaca (**PPL**) del neocòrtex (**NC**). B) Secció parasagital mostrant la distribució del mRNA de reelina en el telencèfal i diencèfal a E11.5. La reelina es troba fortament expressada en la **PPL**, en el primordi del septum (**S**) i en el complex de la cinta diagonal (**DB**), en una banda longitudinal que cobreix l'àrea entopeduncular posterior (**PEP**) i en el cordó cel·lular hipotalàmic (**HCC**) i en tres dominis diencefàlics transversals que es corresponen amb la zona limitans intratàlmica (**zli**), el límit entre el tàlem dorsal (**DT**) i el pretectum (**PT**), i amb la comissura posterior (**pc**), a la frontera entre el mesencèfal (**M**) i el **PT**. C) Fotomicrografia ampliada de la zona de la comissura posterior (**pc**) mostrant les cel·lules marcades. D-F) Seccions coronals d'un embrió E12 mostrant la distribució dels transcrits de reelina a tres nivells rostrocaudals diferents (D, rostral; F, caudal). Es destaca la prominent expressió de reelina associada al tracte olfatori lateral (**lo** a D, E) i les cel·lules marcades en el primordi del caudat-putamen (**CPu**), amígdala (**Amg**) i el tàlem ventral (**VT**). **DT**, tàlem dorsal; **ET**, epitàlem; **GE** eminència ganglionar; **H**, hipocamp; **lv**, ventricle lateral; **LGE**, eminència ganglionar lateral; **MGE**, eminència ganglionar medial; **3v**, tercer ventricle; **4v**, quart ventricle. Barres d'escala: A,C 150µm; B,D-F, 500µm.

Figura 15

Figura 15. Fotomicrografies a pocs augments il·lustrant les principals característiques de la distribució del mRNA de reelina des de E14 fins a edats postnatsals primerenques. A) Secció coronal mostrant nivells elevats de reelina en la preplaca (**PPL**), la zona marginal (**MZ**) i l'amígdala (**Amg**) a E14. B) Secció coronal a E18 mostrant un fort marcatge de reelina en la **MZ**. A aquesta edat, es detecta un marcatge molt feble a la placa cortical (**CP**). C) Secció horitzontal a P0; el bulb olfactori (**OB**), la capa cortical I (**I**), la zona marginal hipocàmica i el nucli geniculat lateral ventral (**VLG**) mostren els més alts nivells d'expressió. També s'observa un marcatge prominent en el caudat-putamen (**CPu**), en algunes divisions septals (**S**), en el pretectum (**PT**) a nivell de la comissura posterior i en diferents capes corticals i hipocàmiques. D) Secció coronal mostrant la distribució dels transcrits de reelina a P10. Es poden veure cèl·lules marcades per totes les capes corticals **I-VI**, l'hipocamp (**H**) i l'**Amg**. **ac**, comissura anterior; **CA1**, **CA2**, **CA3**, zones de l'hipocamp; **cc**, cos callós; **DG**, gir dentat; **DT**, tàlem dorsal; **eml**, estria medullaris; **fi**, fimbria; **HY**, hipotàlem; **i**, càpsula interna; **IZ**, zona intermèdia; **LGE**, eminència ganglionar lateral; **LH**, hipotàlem lateral; **lo**, tracte olfactori lateral; **LV**, ventricle lateral; **mfb**, fascicle longitudinal medial; **MGE**, eminència ganglionar medial; **mi**, làmina de cèl·lules mitrals; **Pir**, córtex piriforme; **PO**, àrea preòptica; **RT**, nucli reticular talàmic; **SP**, subplaca; **VZ**, zona ventricular; **ZI**, zona incerta. Barra d'escala: 500µm.

Figura 16

Figura 16. Fotomicrografies il·lustrant el patró d'expressió de reelina en el neocòrtex i l'hipocamp des d'estadis embrionaris tardans fins a P21. A) En el neocòrtex, a E18, l'expressió de reelina és màxima a la zona marginal (**MZ**); també es poden observar cèl·lules reelina-positives dispersades per les capes V i VI. B) A l'hipocamp de E18, els nivells més elevats d'expressió corresponen a la zona marginal externa (**OMZ**), però també es veuen cèl·lules positives en la zona marginal interna (**IMZ**) i al voltant de la placa hipocàmica (**HP**). C) A P5, l'expressió de reelina augmenta en el neocòrtex, amb les cèl·lules marcades situades majoritàriament a les capes corticals **I**, **V** i **VI**. D) A l'hipocamp de P5, s'observa un elevat nombre de cèl·lules positives a prop de la fissura hipocàmica [stratum lacunosum moleculare (**SLM**)], al stratum oriens (**SO**) i a l'hilus (**H**). E,F) A P21, l'expressió de reelina experimenta una important davallada tant en el neocòrtex (E) com en l'hipocamp (F). **CA1**, **CA3**, zones de l'hipocamp; **CP**, placa cortical; **DG**, gir dentat; **IZ**, zona intermèdia; **SG**, stratum granular; **SP**, stratum piramidale; **SR**, stratum radiatum; **VZ**, zona ventricular; **WM**, substància blanca. Barra d'escala: 200µm.

Figura 17

Figura 17. Caracterització de les cèl·lules que expressen reelina en la zona marginal-capa I a diferents estadis del desenvolupament. A) Patró d'expressió de reelina en una secció tangencial de la zona marginal a E16 il·lustrant nombroses neurones marcades. B) Colocalització del mRNA de reelina (**blau**) i la immunoreactivitat per calretinina (**marró**) en les cèl·lules de Cajal-Retzius a la capa I, en una secció obliqua de P0. C) Secció tangencial a E16 mostrant la no colocalització de reelina (**blau**) i la calbidina (**marró**) a la zona marginal. D) Hibridació *in situ* doble (ISH; radioactiva i no radioactiva) mostrant la manca de colocalització entre en mRNA de reelina (**grans de plata, fletxes buides**) i el de GAD67 (**blau**) a la zona marginal (**MZ**) a E18. L'expressió de reelina té lloc a la meitat superficial (subpial) de la **MZ**, mentre que GAD67 s'expressa a nivells baixos en la meitat profunda de la **MZ**. E) Fotomicrografia mostrant la completa colocalització del mRNA de reelina (**blau**) i la immunoreactivitat per la calretinina (**marró**) a P0 en la capa I, indicant que la reelina és expressada exclusivament per les cèl·lules de Cajal-Retzius (algunes assenyalades amb **fletxes gruixudes**). F) Colocalització del mRNA de reelina i de la proteïna calretinina a la capa I de P5; algunes neurones expressen ambdós marcadors (**fletxes gruixudes**), però existeix una població de cèl·lules positives per la reelina i negatives per la calretinina (**fletxes buides**). G,H) Parella de fotomicrografies realitzades en diferent pla de focus il·lustrant la colocalització del mRNA de reelina (**grans de plata, fletxes buides** a G) i del de GAD67 (**cèl·lules blaves, fletxes primes**) a la capa I de P5; algunes neurones o bé expressen trànscrips de reelina (**fletxes buides**) o bé expressen els de GAD67 (**fletxes primes**); les **fletxes gruixudes** assenyalen les cèl·lules doblement marcades. I) Cèl·lules reelina-positives (**color blau, fletxes buides**) i cèl·lules calretinina (**color marró, fletxes primes**) a la capa I de P21, il·lustrant la manca de colocalització entre elles. A la capa II s'observa una cèl·lula doblement marcada assenyalada amb una **fletxa gruixuda**. J,K) Parella de fotomicrografies realitzades en camp fosc amb el corresponent camp clar d'una preparació doble radioactiva i no-radioactiva mostrant l'expressió de reelina (**grans de plata** a J) i la de GAD65 (**blau** a K) a la capa I de P21. Noteu que virtualment totes les cèl·lules que expressen reelina també expressen GAD65 (**fletxes gruixudes**). Les cèl·lules GAD65-positives/reelina-negatives estan assenyalades per **fletxes primes**. CP, placa cortical; SP, subplaca; I, II-III, capes corticals. Barra d'escala: 50µm.

Figura 18

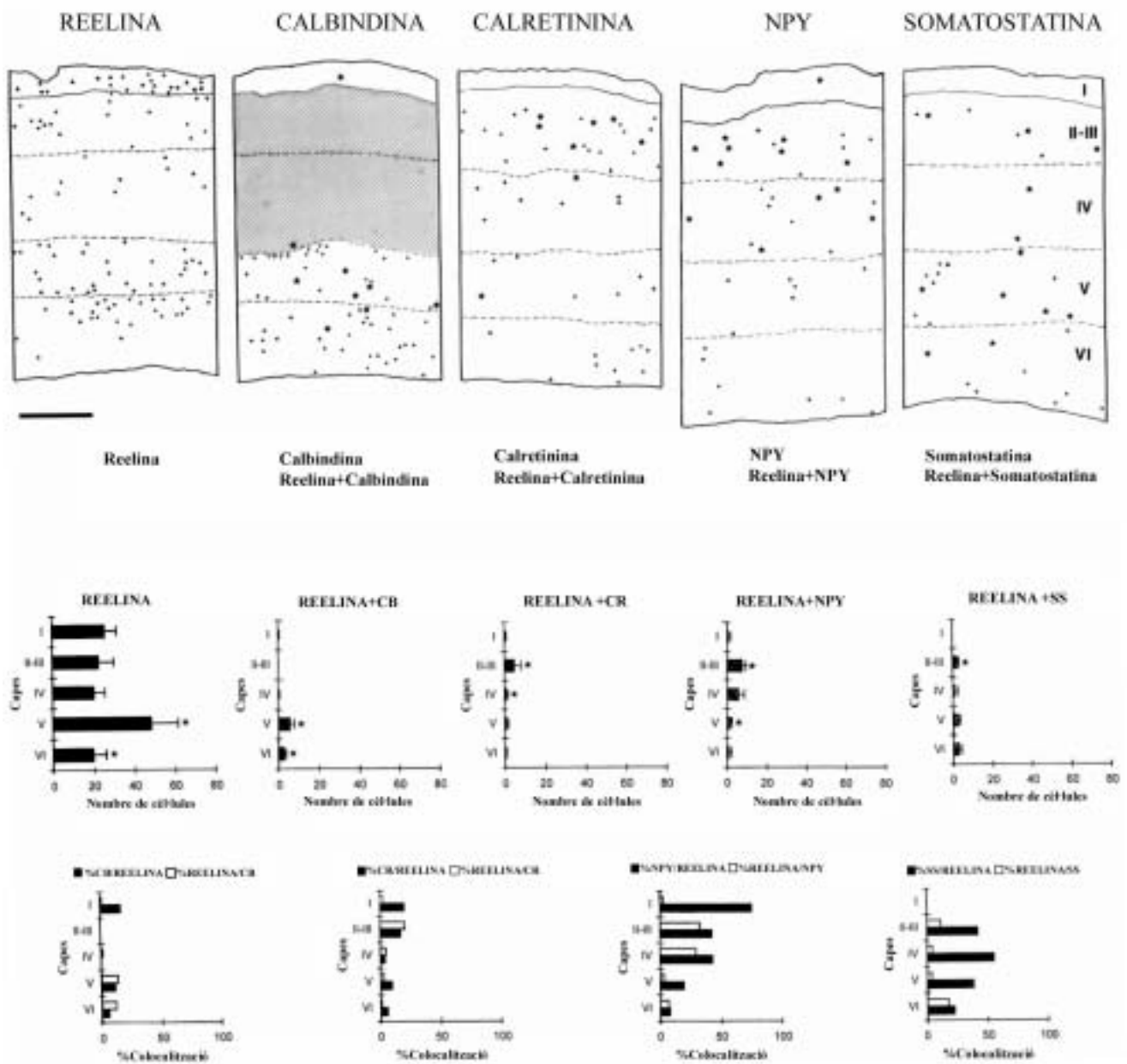
Figura 18. Caracterització de les cèl·lules que expressen reelina a la zona marginal-stratum lacunosum moleculare hipocàmpica a diferents estadis del desenvolupament. A, B) Fotomicrografies en camp fosc i en camp clar d'una secció doblement marcada (ISH radioactiva i no-radioactiva) mostrant l'expressió dels transcrits de reelina (**grans de plata** a A) i els de GAD67 (**blau** a B) a E18; noteu la manca de colocalització dels mRNAs en la zona marginal externa (**OMZ**). A la zona marginal interna (**IMZ**) s'observa una dèbil expressió dels transcrits de reelina. C) Distribució del mRNA de reelina (**blau**) i de la immunoreactivitat per calretinina (**marró**) a la **OMZ** i a l'hipocamp a P0. D) Colocalització del mRNA de reelina (**blau**) de la immunoreactivitat per calretinina (**marró**) a la preplaca hipocàmpica (**PPL**) a E14. Noteu la presència de cèl·lules que expressen només reelina (**fletxes buides**) a la zona més superficial de la preplaca. E,F) Colocalització del mRNA de reelina (**blau**) i de la immunoreactivitat per calretinina (**marró**) a les cèl·lules de Cajal-Retzius (algunes assenyalades amb **fletxes gruixudes**) a prop de la fissura hipocàmpica a P0 (E) i a P5 (F). Noteu la colocalització virtualment completa d'ambdós marcatges. G,H) Parella de fotomicrografies preses a diferents plans de focus il·lustrant la colocalització del mRNA de reelina (**grans de plata, fletxes buides**) i de GAD67 (**cèl·lules blaves**) al stratum lacunosum moleculare (**SLM**) a P5. Tot i que la majoria dels transcrits de reelina (**fletxes buides**) es troben fora de les cèl·lules positives per GAD67, en algunes neurones hi colocalitzen ambdós transcrits (**fletxes gruixudes**); les **fletxes primes** assenyalen les neurones que només expressen GAD67. I,J) Parella de fotomicrografies realitzades a diferents plans de focus mostrant la colocalització del mRNA de reelina (**grans de plata, fletxes buides**) i del de GAD67 (**cèl·lules blaves**) al **SLM** de P21 a prop de la fissura hipocàmpica; les fletxes assenyalen el mateix que en G,H; noteu la presència de neurones reelina-positives/GAD67-negatives (**fletxes buides**). K) Distribució del mRNA de reelina (**blau**) i de la immunoreactivitat per calretinina (**marró**) al voltant de la fissura hipocàmpica a P21; algunes cèl·lules de Cajal-Retzius reelina/calretinina-positives estan assenyalades per **fletxes gruixudes**; la **fletxa buida** assenyalava una neurona reelina-positiva/calretinina-negativa. **DG**, gir dentat; **HP**, placa hipocàmpica; **IMZ**, zona marginal interna; **SLM**, stratum lacunosum moleculare; **SM**, stratum moleculare; **VZ**, zona ventricular. Barres d'escala: A-C, 100µm; D-K, 50µm.

Figura 19

Figura 19. Les cèl·lules que expressen reelina en les zones derivades de la placa cortical en el córtex cerebral i en l'hipocamp adults són neurones no-piramidals GABAèrgiques. A,B) Distribució del mRNA de reelina (**blau, fletxes buides**) i de la immunoreactivitat per calretinina (**marró** a A) o per calbindina (**marró** a B) a les capes corticals IV i V del neocórtex de P5; les neurones doblement marcades estan assenyalades per **fletxes gruixudes**; les neurones piramidals calretinina-positives (**fletxes primes**) no expressen transcrits de reelina. B,C) Les neurones reelina-positives/calbindina-positives de la capa V a P5 presenten formes no-piramidals (**fletxes gruixudes**). La **fletxa prima** assenjala una neurona immunoreactiva per calbindina. D-F) Fotomicrografies de la capa II-III del neocórtex de P21 mostrant expressió de reelina (**color blau, fletxes buides**) i immunoreactivitat (**marró, fletxes primes**) per calretinina (D), neuropèptid Y(E) i somatostatina (F); les neurones no-piramidals doblement marcades s'indiquen amb **fletxes gruixudes**. G,H) Parella de fotomicrografies realitzades a diferents plans de focus mostrant la colocalització del mRNA de reelina (**grans de plata** a G) i del de GAD67 (cèl·lules **blaves**) a la capa V del neocórtex de P21; les **fletxes gruixudes** assenyalen les cèl·lules doblement marcades. I) Colocalització dels mRNA de reelina (**blau**) i de la immunoreactivitat per calretinina (**marró**) a l'hipocamp de P21; les neurones doblement marcades del stratum oriens estan assenyalades amb **fletxes gruixudes**. **SO**, stratum oriens; **SP**, stratum pyramidale; **IV, V**, capes corticals. Barres d'escala: 50µm.

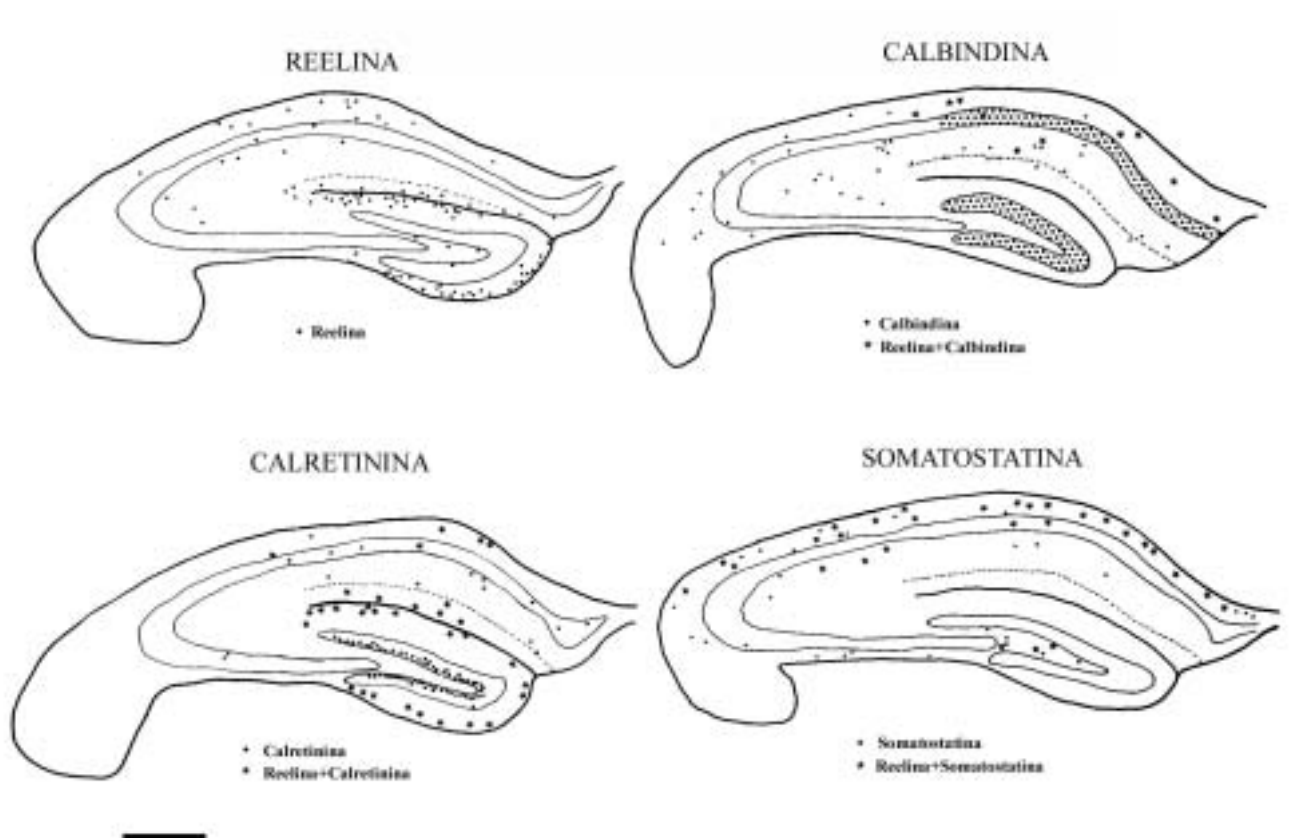
RESULTATS

Figura 20



Dibuixos realitzats a la cambra clara (**dalt**) i histogrames mostrant la distribució de cèl·lules que expressen reelina i els percentatges de colocalització amb diverses proteïnes d'unió a calci i neuropèptids, per les diferents capes del neocòrtex somatosensorial adult. En el **centre**, els histogrames ens mostren el nombre de cèl·lules positives trobades a cada capa (mitja+SD). Les diferències estadísticament significatives entre les capes també estan indicades (*p=0.01). Els histogrames de **baix** mostren percentatges de colocalització en les diferents capes corticals. Barres d'escala: 300µm.

Figura 21



Dibuixos de seccions d'hipocamp realitzats a la cambra clara mostrant la distribució de cèl·lules que expressen reelina a l'adult, i la colocalització amb diverses proteïnes d'unió a calci i neuropèptids. Barres d'escala: 350µm.

Figura 22

Figura 22. A-C) Fotomicrografies realitzades a pocs augments mostrant els patrons d'expressió de la reelina en el bulb olfatori a P0, P5 i P21. D) Secció doblement marcada (ISH radioactiva i no radioactiva) il·lustrant la manca de colocalització entre el mRNA de reelina (**grans de plata**, cèl·lules mitrals) i el de GAD67 (**negre**, cèl·lules granulars) en el bulb olfatori a E18. E) Fotomicrografia mostrant la distribució bilaminar de les cèl·lules que expressen reelina en el bulb olfatori a P21. F) Imatge realitzada en camp fosc d'una preparació doblement marcada (ISH radioactiva i no radioactiva) d'un camp semblant al mostrat a E, on s'observa la manca de colocalització entre el mRNA de reelina (**marcatge blanc, grans de plata**) i el de GAD67 (**negre**) en el bulb olfatori a P21. G,H) Distribució de les cèl·lules que expressen reelina en el cervell anterior basal a P0. **Acb**, nucli acumbens; **Amg**, amigdala; **AOB**, bulb olfatori accessori; **CPu**, caudat-putamen; **fi**, làmina fibrosa; **gl**, lamina glomerulosa; **GP**, globus pàl·lid; **gre**, làmina granular externa; **gri**, làmina granular interna; **HDB**, braç horitzontal de la cinta diagonal; **lmi**, làmina medul·lar interna; **lo**, tracte olfatori lateral; **LS**, septum lateral; **mfb**, fascicle longitudinal medial; **mi**, làmina de cèl·lules mitrals; **MS**, septum medial; **obn**, neuroepiteli del bulb olfatori; **Pir**, córtex piriforme; **ple**, làmina plexiforme externa; **pli**, làmina plexiforme interna; **PO**, àrea preòptica; **Tu**, tubercle olfatori; **VDB**, braç vertical de la cinta diagonal. Barres d'escala: A-C, G,H, 500µm; D-F, 100µm.

Figura 23

Figura 23. Patró d'expressió del mRNA de reelina en el diencèfal i l'hipotàlem al llarg del desenvolupament. A,B) Fotomicrografies il·lustrant dos nivells rostrocaudals a E14, mostrant una expressió de reelina prominent a l'amígdala (**Amg**), al fascicle longitudinal medial (**mfb**), l'àrea entopeduncular (**EP**), nucli reticular/zona incerta (**RT/ZI**), nucli geniculat lateral ventral (**VLG**) i el nucli hipotalàmic anterior (**AH**). C) A E16, la reelina s'expressa en el **VLG**, la zona limitans intratalàmica (**zli**) i en el nucli hipotalàmic paraventricular (**PA**). D) A E18, el mRNA de reelina s'expressa a l'habènula medial (**MHb**), al **VLG**, a la zona limitans intratalàmica/lamina medullar externa (**zli/eml**) i al **PA**; nivells d'expressió més baixos es detecten en molts d'altres nuclis. E) Expressió de reelina en el pretegmentum a P0. **APT**, nucli pretegmental anterior; **CPu**, caudat-putamen; **DT**, tàlem dorsal; **ic**, càpsula interna; **LH**, hipotàlem lateral; **LHb**, habènula lateral; **lo**, tracte olfactori lateral; **lv**, ventricle lateral; **OPT**, nucli pretegmental olivar; **pc**, comissura posterior; **PrC**, nucli de la comissura posterior; **PV** nucli talàmic paraventricular; **RCh**, àrea retroquiàmica; **VT**, tàlem ventral; **3v**, tercer ventricle. Barres d'escala: 250µm.

2. PATRÓ D'EXPRESSIONI DE REELINA I DAB1 EN EL CERVELL DE LA RATA. ESTUDI COMPARATIU ENTRE RATES HIPOTIROÏDEES I CONTROL

2.1. EXPRESSIONI DEL mRNA DE REELINA EN EL CÒRTEX CEREBRAL I L'HIPOCAMP DE RATES CONTROL I HIPOTIROÏDEES

Amb l'objectiu de determinar si la manca d'hormona tiroïdea durant el desenvolupament del cervell de la rata alterava l'expressió dels transcrits de reelina, inicialment analitzàrem els nivells de missatger mitjançant la hibridació per Northern blot. Com es pot observar a la Figura 24, l'expressió del mRNA de reelina estava clarament regulada a la baixa en el còrtex cerebral de les rates hipotiroïdees a P0 (50-60% de disminució). Tal i com hem pogut observar en els resultats anteriors realitzats en ratolí i com també s'ha mostrat en estudis recents (Schiffman et al., 1997; Rice et al., 1998), la reelina es troba diferencialment expressada en diverses regions del cervell en desenvolupament. Per tal d'aprofundir en l'efecte que l'hormona tiroïdea exerceix sobre l'expressió de la reelina en les diferents regions cerebrals realitzàrem anàlisis d'hibridació in situ tant en rates hipotiroïdees com en controls. Donat que tant el neocòrtex com l'hipocamp són regions diana de l'acció de l'hormona tiroïdea, començàrem analitzant el patró d'expressió en aquestes zones durant el desenvolupament.

En les rates controls, a E18-P0, els transcrits de reelina es localitzaven a nivells elevats en neurones de la zona marginal del primordi neocortical i hipocàmpic (futurs capa I i stratum lacunosum-moleculare, respectivament) (Figs. 25A,G, 26). Aquestes neurones estaven intensament marcades i presentaven un pericarió allargat, orientat horitzontalment, típic de les cèl·lules de CR (Soriano et al., 1994; Del Ríó et al., 1995, 1997). Coincidint amb l'anàlisi realitzat en ratolí i també amb estudis anteriors (Schiffman et al., 1997), les cèl·lules de CR reelina-positives eren més nombroses a l'hipocamp que al neocòrtex (no mostrat). En la capa I/stratum lacunosum-moleculare, el patró d'expressió de la reelina resultà ser similar a E18 i P0 i, a més, en aquesta darrera edat, es detectà una segona població de neurones reelina-positives en les capes V i VI del neocòrtex (Fig. 25A) i en les capes plexiformes de l'hipocamp.

En les rates hipotiroïdees, els patrons d'expressió regional i laminar de la reelina a E18-P0 resultaren ser similars als de les rates control. Així i tot, el nombre de neurones marcades a la capa I del neocòrtex i al stratum lacunosum-moleculare de l'hipocamp era significativament inferior, en especial a P0 (Figs. 25B, 26). Encara més, les neurones de CR reelina-positives presentaven senyals d'hibridació clarament més febles en les rates hipotiroïdees que en les

control (Fig. 25H). De la mateixa manera, tant el nombre de neurones positives com la seva intensitat de marcatge resultaren ser inferiors a les capes V i VI del neocòrtex i a les capes plexiformes de l'hipocamp a P0 (Figs. 25B, 26).

A P5, els nivells de mRNA de reelina de les rates control a les capes I/stratum lacunosum-moleculare eren lleugerament inferiors a edats anteriors, tot i que encara s'observés un nombre substancial de neurones positives, especialment a l'hipocamp (Fig. 25C,I). No es trobaren diferències significatives en el nombre de neurones positives d'aquestes capes entre les rates control i les hipotiroïdees (Fig. 26), tot i que en aquestes darreres les neurones mostraven un senyal d'hibridació més feble (Fig. 25, compareu I amb J). En canvi, es veié disminuït el nombre de neurones reelina-positives en les capes II-VI de les rates hipotiroïdees (Fig. 26).

A P15, els trànscrips de reelina foren detectats en algunes neurones de la capa I del neocòrtex i en neurones disperses per les capes II-VI (Fig. 25E), que correspondrien a neurones interneurons GABAèrgiques, com succeïa en ratolí. A l'hipocamp, encara es detectava expressió del mRNA de reelina en les cèl·lules de CR, així com també en algunes interneurons distribuïdes per les capes plexiformes (Fig. 25K). En el cas de les rates hipotiroïdees, el patró d'expressió resultà ser similar al de les control (Figs. 25F, 26). A tall de resum, doncs, totes aquestes dades demostren que l'expressió del missatger de la reelina, en estadis tardans prenatals i postnatals de la corticogènesi, està regulada a la baixa en l'hipotiroïdisme.

2.2. EXPRESSIÓ DE LA PROTEÏNA REELINA EN EL CÒRTEX CEREBRAL I L'HIPOCAMP DE RATES CONTROL I HIPOTIROÏDEES

Per tal d'investigar si la distribució de la proteïna Reelina també estava alterada en les rates hipotiroïdees, es realitzaren immunotincions de seccions de cervell amb l'anticòs CR50, que reconeix la regió N-terminal de la Reelina (Ogawa et al., 1995; D'Arcangelo et al., 1997). A E18-P0, la immunoreactivitat per CR50 era molt prominent en les capes I/stratum lacunosum-moleculare de les rates control, marcant el pericarió i les dendrites de les cèl·lules CR (Fig. 27A,E). A més, les capes I/stratum lacunosum-moleculare presentaven un marcatge difús, probablement corresponent a la distribució extracel·lular de Reelina. En el còrtex cerebral de les rates hipotiroïdees, la immunoreactivitat per CR50 era molt més feble en les capes I/stratum lacunosum-moleculare, especialment a P0 (Fig. 27B,F). En aquestes capes, les neurones que presentaven marcatge eren difícils d'identificar en rates hipotiroïdees noutates, i la senyal difosa observada en les rates control es veié dràsticament reduïda (Fig. 27B,F). Addicionalment, a les capes V i VI del còrtex i a les plexiformes de l'hipocamp de les rates control, només

RESULTATS

s'observaven algunes cèl·lules Reelina-positives, que no podien ser detectades en les rates hipotiroïdees (no mostrat).

A P5, el patró d'immunoreactivitat per Reelina en les capes I/stratum lacunosum-moleculare de les rates control era semblant a la d'estadis anteriors (Fig. 27C,G). A diferència de les edats perinatals, un elevat nombre de neurones CR50-positives apareixia a les capes I/stratum lacunosum-moleculare de rates P5 hipotiroïdees, amb un marcatge difús, similar a l'extracel·lular, molt accentuat (Fig. 27D,H). De fet, la intensitat de l'immunomarcatge a P5 era lleugerament superior en les rates hipotiroïdees que en les control.

A P15, les capes I/stratum lacunosum-moleculare i les restants capes neocorticals i hipocàmiques estaven poblades per només algunes neurones Reelina-positives en les rates control. No s'observaren diferències paleses en la distribució de neurones Reelina-positives de les rates hipotiroïdees (Fig. 27I-L), tot i que les cèl·lules mostraven un marcatge més feble en aquests animals experimentals. En resum, aquestes dades mostren que els nivells de Reelina estan disminuïts als voltants dels estadis perinatals en les rates hipotiroïdees, mentre que semblarien assolir nivells normals a edats postnatales més avançades.

2.3. EXPRESSIÓ DE REELINA EN EL CEREBEL I EL BULB OLFATORI DE RATES CONTROL I HIPOTIROÏDEES

Posteriorment, examinarem la distribució de reelina, tant dels transcrits com de la proteïna, durant el desenvolupament del cerebel i el bulb olfactori, ambdues regions d'elevada expressió de reelina i on, alhora, s'han descrit deficiències en la migració per les rates hipotiroïdees (Patel et al., 1976; Legrand, 1984). A E18-P0, en el cerebel, els transcrits de reelina i la immunoreactivitat per CR50 aparegueren en l'EGL i en una població de neurones de la futura capa granular interna (IGL), que es correspondrien amb les primeres cèl·lules granulars postmigratòries (Miyata et al., 1996). En el cerebel de les rates hipotiroïdees, s'observà un marcatge inferior tant pel que fa als senyals d'hibridació com als immunocitoquímics (Fig. 28A,B). A aquestes edats, en canvi, no es detectaren diferències destacables en els nivells d'expressió o immunocitoquímics en el primordi del bulb olfactori (no mostrat).

A P5-P15, ambdós tipus de marcatge esmentats eren prominents tant en l'EGL com en la IGL del cerebel (Fig. 28C,E,G,I). Tot i que el cervell de les rates hipotiroïdees presenta una EGL més gruixuda degut a un retard en la migració de les cèl·lules granulars, la distribució del mRNA de la reelina i de la proteïna era similar en les rates control i en les hipotiroïdees (Fig. 28D,F,H,J). No obstant, els nivells de marcatge eren clarament més elevats en el cerebel de les rates hipotiroïdees. A l'estadi P5, en el bulb olfactori de les rates hipotiroïdees concretament, es

detectà una disminució dels nivells de mRNA i proteïna (Fig. 28K,L), mentre que no es notà cap canvi a P15.

2.4. EXPRESSIÓ DEL mRNA I PROTEÏNA DEL GEN DAB1 EN RATES CONTROL I HIPOTIROÏDEES

Donada la relació que s'ha establert entre la Reelina i la proteïna adaptadora Dab1 (Sheldon et al., 1997; Howell et al 1997b, 1999; Rice et al., 1998, Rice and Curran 1999) vam voler determinar si l'expressió de *dab1* es veia alterada en les rates hipotiroïdees i per a comprovar-ho realitzàrem anàlisis d'hibridació *in situ*. A E18 i P0, els trànscrips de *dab1* es trobaven àmpliament extesos per la proliferativa zona ventricular, així com també en neurones postmitòtiques del córtex cerebral. Tant a la placa cortical del neocórtex com a les capes piramidal i granular de l'hipocamp detectàrem un intens marcatge. En altres regions cerebrals, com el cerebel, també hi apareixia una expressió generalitzada (no mostrat) coincidint amb troballes recents (Rice et al., 1998). No s'observaren canvis en la distribució de trànscrips o en la intensitat del senyal d'hibridació en les rates hipotiroïdees a E18-P0 (Fig. 29A,B). A P5-P15, l'expressió de *dab1* estava també àmpliament distribuïda pel neocórtex i l'hipocamp i es podien distingir clarament moltes cèl·lules marcades (Fig. 29C,D). En el cerebel, *dab1* estava expressat en les cèl·lules de Purkinje, la IGL, i en la part interior de l'EGL (no mostrat). Altra vegada, no s'observaren diferències notables en les rates hipotiroïdees, excepte per una lleugera disminució del senyal a P5. En conjunt, aquestes dades indiquen que la síntesi del mRNA de *dab1* o la seva estabilitat no estan substancialment alterades per la manca d'hormona tiroïdea.

Posteriorment, examinàrem la distribució de la proteïna Dab1, la qual, en absència de Reelina, s'acumula a nivells anormalment elevats en el mutant de ratolí *reeler* (Rice et al., 1998). A P0, es detectà immunoreactivitat per Dab1 en el pericarion i dendrites de moltes neurones post-mitòtiques del neocórtex i de l'hipocamp, així com també en feixos de fibres en rates control (Fig. 29E; no mostrat). A aquesta edat, els cervells hipotiroïdeus mostraven una distribució similar de Dab1, no obstant, la intensitat del marcatge era més elevada que la de els controls (Fig. 29E,F). A P5, la proteïna Dab1 romangué àmpliament extesa per tot el córtex cerebral tant d'animals control com dels hipotiroïdeus. Tot i així, i contràriament a l'edat anterior, els nivells d'immunotinció eren més elevats en els controls que en les rates hipotiroïdees (Fig. 29, compareu G,H). Aquesta mateixa diferència d'expressió es repetí en el cerebel, a P5 (Fig. 29I,J). Amb tot, ja a edats més avançades com P15 o P25, no s'observaren diferències entre les rates control i les hipotiroïdees (no mostrat).

RESULTATS

Per acabar de confirmar aquestes dades, analitzàrem per Western blotting la quantitat de proteïna Dab1 present en el córtex i en el cerebel d'animals control i hipotiroïdeus. Com es pot observar a la figura 30, a P5, Dab1 era més abundant en les rates control. Aquests resultats indiquen que els nivells de Dab1 estan inversament relacionats amb els nivells de Reelina en les rates hipotiroïdees, com s'ha demostrat recentment en el mutant de ratolí *reeler* (Rice et al., 1998). Aquest fet també implica que la proteïna Dab1 no aconsegueix ser degradada en absència del senyal provocat per la Reelina. Mostres de cervell de ratolins de la soca salvatge i dels mutants *reeler* s'incloueren com a controls, mostrant així la regulació a l'alta de l'expressió de Dab1 en els animals mutants deficients en Reelina.

2.5. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE REELINA PER L'HORMONA TIROÏDEA *IN VIVO* I *IN VITRO*

Amb la finalitat de comprovar si l'expressió de reelina estava directament regulada per l'hormona tiroïdea, s'incubaren seccions de cultius organotípics d'hipocamp de rates P0, control i hipotiroïdees, en medi de cultiu que contenia o sèrum normal o sèrum mancat de T3/T4 o sèrum mancat de T3/T4 suplementat amb T3 (150 o 500nM). Després de 6 dies en cultiu, s'analitzà l'expressió del mRNA de reelina mitjançant una hibridació *in situ*. Les seccions d'hipocamps control incubades amb sèrum normal o mancat de T3/T4 mostraven el típic patró d'expressió de neurones positives pel mRNA de reelina. Així, apareixien cèl·lules CR intensament marcades en el stratum lacunosum-moleculare a prop de la fissura hipocàmpica, i en les restants capes s'hi podien trobar, addicionalment, algunes neurones disperses (Fig. 31A,D; no mostrat). Les seccions tractades amb T3 no exhibiren un increment estadísticament significatiu del nombre de neurones reelina-positives (Fig. 32). Aquestes dades suggereixen que l'efecte del sèrum mancat d'hormona *in vitro* podria no ser tant sever com l'hipotiroïdisme a llarg termini *in vivo*.

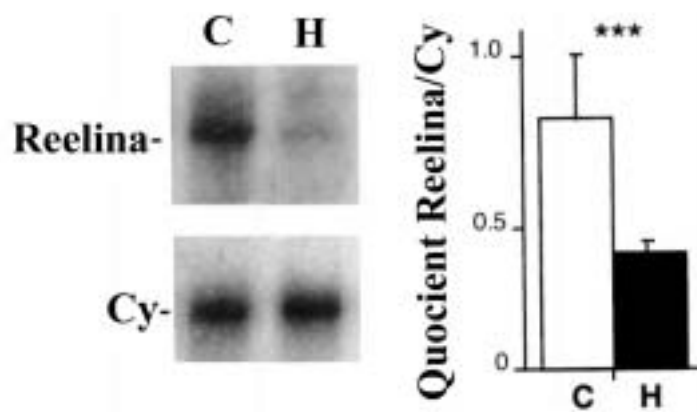
Les seccions d'hipocamp de rates hipotiroïdees noutates incubades amb sèrum normal o mancat d'hormona presentaven una important reducció en el nombre de cèl·lules reelina-positives després de 6 dies en cultiu (Figs. 31B,E, 32). Aquest resultat contrastava amb el nombre similar de cèl·lules que expressaven reelina en l'hipocamp de rates control i hipotiroïdees a P5 (Fig. 26), tot indicant que haurien d'existir factors sistèmics addicionals reguladors de l'expressió de reelina que no es troben en els cultius de seccions d'hipocamp. A més, les neurones marcades exhibien senyals febles d'hibridació. Per contra, les seccions hipocàmpiques d'animals hipotiroïdeus tractades amb T3 mostraven un patró d'expressió indistingible al dels cultius control, indicant que l'hormona tiroïdea reestableix l'expressió de reelina als seus nivells normals (Fig. 31C,F). Aquest resultat fou corroborat pel comptatge de

cèl·lules positives (Fig. 32). Addicionalment, l'efecte de l'hormona T3 en l'expressió del mRNA de la reelina en els cultius organotípics fou estimat utilitzant anàlisis de RT-PCR semiquantitativa. En la mateixa línia dels resultats anteriors, el tractament amb T3 restablí l'expressió del mRNA de reelina fins a nivells normals en rates hipotiroïdees i augmentà unes tres vegades els nivells en els animals control (Fig. 33).

Per tal d'examinar si la regulació de l'expressió del mRNA de reelina estava correlacionada amb els nivells de proteïna, les seccions de cultius organotípics d'hipocamp foren tractades amb l'anticòs CR50. Com es pot observar a la Figura 31 (compareu plafons G i J amb H i K), el fort immunomarcatge de les seccions control es veié dràsticament reduït en les seccions d'hipocamps de rates hipotiroïdees. Altra vegada, el patró d'immunotinció de CR50 retornà a l'estat normal en els cultius que foren tractats amb T3 durant 6 dies (Fig. 31I,L).

Amb la intenció de determinar si els nivells reduïts d'hormona en rates hipotiroïdees eren la causa de l'observada disminució en l'expressió de reelina, administràrem T4 a aquests animals. Coincidint amb els resultats anteriors, el patró de distribució del mRNA de reelina a P15 no diferia excessivament entre les rates control i les hipotiroïdees i, malgrat tot, la intensitat de marcatge es veia reduïda en aquests darrers (Fig. 34A). Les rates hipotiroïdees tractades amb T4 mostraren un increment en el nombre de neurones reelina-positives presents a la capa I/stratum lacunosum-moleculare i a les capes V i VI (Fig. 34B). Alhora, el tractament amb T4 provocà un senyal d'hibridació més intens en les neurones marcades. Tots aquests resultats junts indiquen que el mRNA de reelina i l'expressió de la seva proteïna estan regulats per l'hormona tiroïdea *in vivo*.

Figura 24

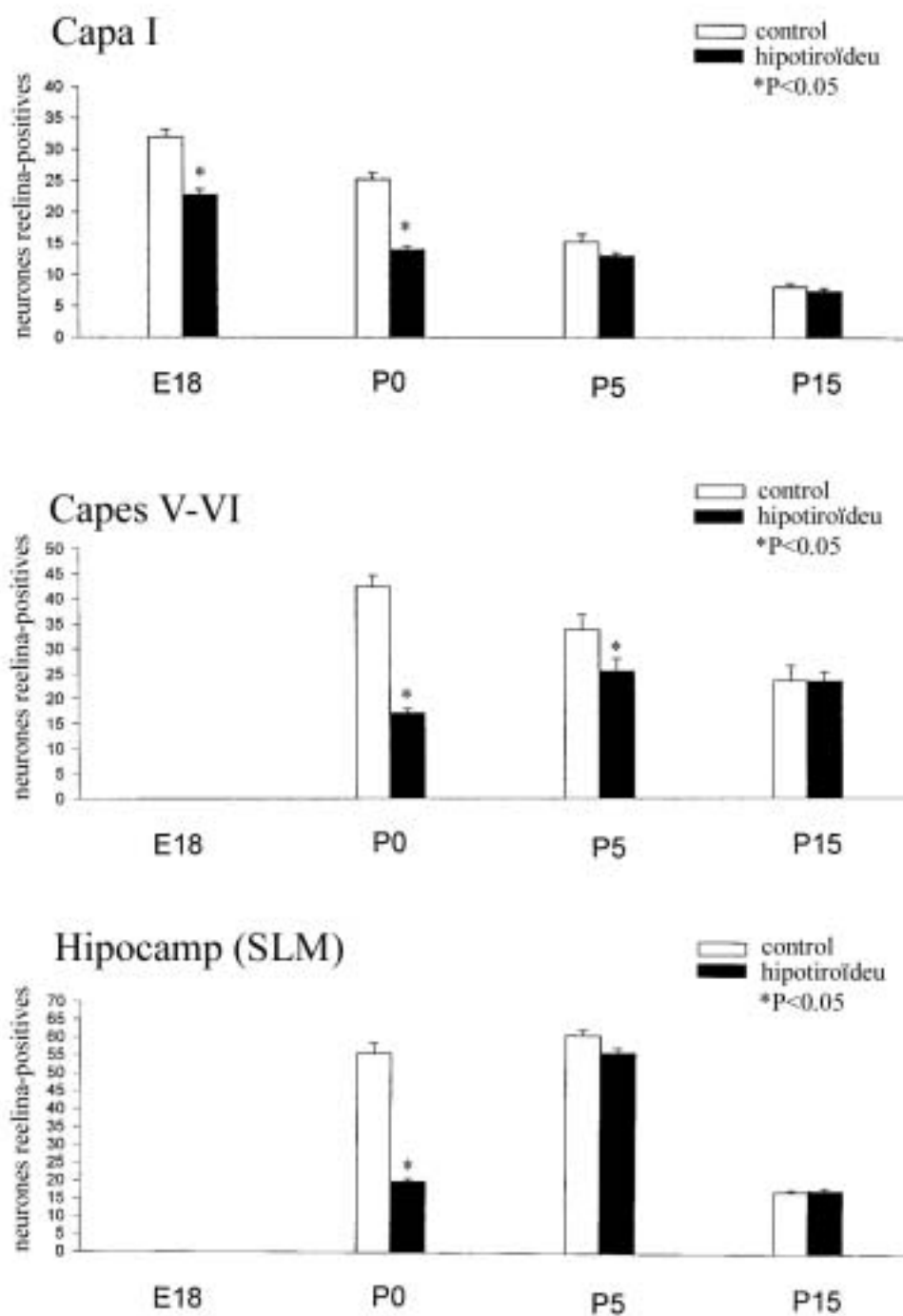


Anàlisi per Northern blot de l'expressió de reelina en rates hipotiroïdeses nounates. S'analitzaren deu micrograms de poli(A)+ RNA del córtex cerebral de rates nounates (P0) control (C) i hipotiroïdeses (H) (cada mostra correspon a tres animals del mateix tipus) mitjançant una sonda de cDNA de reelina com ha estat descrit en els Materials i Mètodes. La ciclofilina (Cy) s'utilitzà com a gen control. Els nivells de RNA de reelina es quantificaren mitjançant la utilització d'un aparell *Instant Imager* (Packard). Es mostren les dades de tres experiments independents com a la mitja \pm SEM; *** $p < 0.001$.

Figura 25

Figura 25. Efectes de l'hipotiroïdisme sobre l'expressió del mRNA de reelina en el córtex cerebral. A-F) Patró d'expressió del mRNA de reelina en el neocórtex de rates control (A,C,E) i hipotiroïdees (B,D,F) a P0 (A,B) i a P15 (E,F). Les capes corticals estan indicades a la **dreta**. Noteu els nivells reduïts de mRNA en les rates hipotiroïdees a P0 i a P5. Les **puntes de fletxa** a A i B assenyalen cèl·lules de Cajal-Retzius. G,H) Fotomicrografies ampliades il·lustrant cèl·lules de Cajal-Retzius positives pel mRNA de reelina a la capa I del neocórtex de rates control (G) i hipotiroïdees (F). I,J) Distribució de cèl·lules positives pel mRNA de reelina a l'hipocamp de rates control (I) i hipotiroïdees (J) a P5, mostrant la disminució dels nivells de mRNA tant al stratum lacunosum-moleculare com a la resta de capes hipocàmiques. K) Distribució de les cèl·lules que expressen el mRNA de reelina a l'hipocamp d'una rata control a P15. A aquesta edat i en aquesta regió, no es detectàren diferències amb les rates hipotiroïdees. **C**, control; **H**, hipotiroïdeu; **I-VI**, capes corticals; **CP**, placa cortical; **DG**, gir dentat; **GL**, capa de cèl·lules granulars; **ML**, capa molecular; **CA3**, **CA1**, subdivisions hipocàmiques CA3 i CA1; **SLM**, stratum lacunosum-moleculare. Barres d'escala: A, 200µm (aplicable a B-D, I, J); E, 100µm (aplicable a F,K); G, 40µm (aplicable a H).

Figura 26



Nombre de neurones positives pel mRNA de reelina en rates control i hipotiroides a les capes I i V/VI del neocòrtex i al stratum lacunosum-moleculare de l'hipocamp. Les dades es quantificaren com ha estat descrit en els Materials i Mètodes (mitja \pm SEM; $*p < 0.05$). Per la capa cortical I i el stratum lacunosum-moleculare, analitzarem quatre bandes de tres animals diferents, i per les capes V/VI, mesurarem cinc seccions de tres animals diferents.

Figura 27

Figura 27. Expressió de reelina en el còrtex cerebral de rates control i hipotiroïdees. A-D) Fotomicrografies mostrant la distribució de la immunoreactivitat per CR50 a la capa I de rates control (A,C) i hipotiroïdees (B,D) a P0 (A,B) i a P5 (C,D). Les **puntes de fletxa** assenyalen algunes cèl·lules de Cajal-Retzius CR50-positives. Noteu el feble marcatge en els animals hipotiroïdeus a P0. E-H) Patró d'immunoreactivitat per CR50 a l'hipocamp de rates control (E,G) i hipotiroïdees (F,H) a P0 (E,F) i a P5 (G,H), il·lustrant una clara reducció del marcatge en les rates hipotiroïdees a P0. La fissura hipocàmica s'indica amb **puntes de fletxa**. I-L) Patró d'immunoreactivitat per CR50 al neocòrtex (I,J) i l'hipocamp (K,L) de rates control (I,K) i hipotiroïdees (J,L) a P15. No s'observaren diferències destacables entre ambdues regions corticals a aquesta edat. La fissura hipocàmica s'indica amb **puntes de fletxa**. C, control; H, hipotiroïdeu; EC, còrtex entorrinal; les altres abreviatures són les mateixes que les de la **Figura 25**. Barres d'escala: A, 40µm (aplicable a B-D); E, 200µm (aplicable a F); G, 200µm (aplicable a H); I, 100µm (aplicable a J-L).

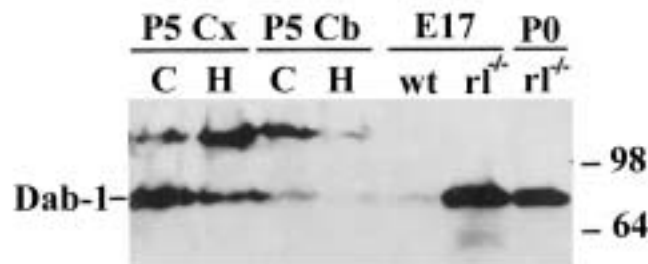
Figura 28

Figura 28. Patrons d'expressió del mRNA i proteïna reelina en el cerebel i bulb olfatori de rates hipotiroïdees. A-F) Distribució del mRNA de reelina en el cerebel de rates control (A,C,E) i hipotiroïdees (B,D,F). Noteu la disminució en els nivells de mRNA en les rates hipotiroïdees a P0 i l'augment d'aquests a P5 i P15 en els mateixos animals. G-J, Patró d'immunoreactivitat per CR50 en el cerebel de rates control (G,I) i hipotiroïdees (H,J) a P5 (G,H) i a P15 (I,J). S'observa un augment dels nivells de Reelina en les rates hipotiroïdees. Les **puntes de fletxa** assenyalen la EGL. K,L) Immunoreactivitat per CR50 en el bulb olfatori de rates control (K) i hipotiroïdees (L) a P5, il·lustrant la disminució de la immunoreactivitat en les cèl·lules mitrals i en les neurones glomerulars en les rates hipotiroïdees. **EGL**, làmina germinal externa; **IGL**, làmina granular interna; **ML**, capa molecular; **WM**, substància blanca; **MCL**, capa de cèl·lules mitrals; **GCL**, capa de cèl·lules granulars; **GL**, capa de cèl·lules glomerulars. Barres d'escala: : A, 200µm (aplicable a B-J); K, 40µm (aplicable a L).

Figura 29

Figura 29. Distribució del mRNA i proteïna dab1 en els córtex cerebral i cerebel de rates control (C) i hipotiroïdes (H). A-D) Patró d'expressió del mRNA de dab1 a P0 i P5 en rates control(A,C) i hipotiroïdes (B,D) a l'hipocamp (A,B) i al neocórtex (C,D). dab1 està àmpliament expressat per tot el córtex cerebral i no s'observen diferències significatives entre les rates hipotiroïdes i les control. E-H) Distribució de la proteïna Dab1 en el neocórtex de rates control (E,G) i hipotiroïdes (F,H) a P0 i a P5. S'observa un augment dels nivells d'immunoreactivitat per Dab1 en les rates hipotiroïdes a P0, mentre que a P5 ocorre el contrari. I,J) Fotomicrografies il·lustrant una disminució en els nivells d'immunoreactivitat en el cerebel de rates hipotiroïdes (J) en comparació amb les control (I) a P5. Les abreviatures són les mateixes que les de les **Figures 25 i 28**. Barres d'escala: A, 200µm (aplicable a B-H); I, 100µm (aplicable a J).

Figura 30



Anàlisi per Western blot de l'expressió de Dab1 en el córtex (Cx) i cerebel (Cb) de rates control (C) i hipotiroïdes (H) a P5. Com a controls s'utilitzaren extractes de cervell total de ratolins de soca salvatge (wt) i *reeler* ($rl^{+/+}$) de les edats indicades, mostrant un important augment en el contingut de Dab1 en els mutants reeler. Els nombres la **dreta** indiquen el pes dels marcadors moleculars.

Figura 31

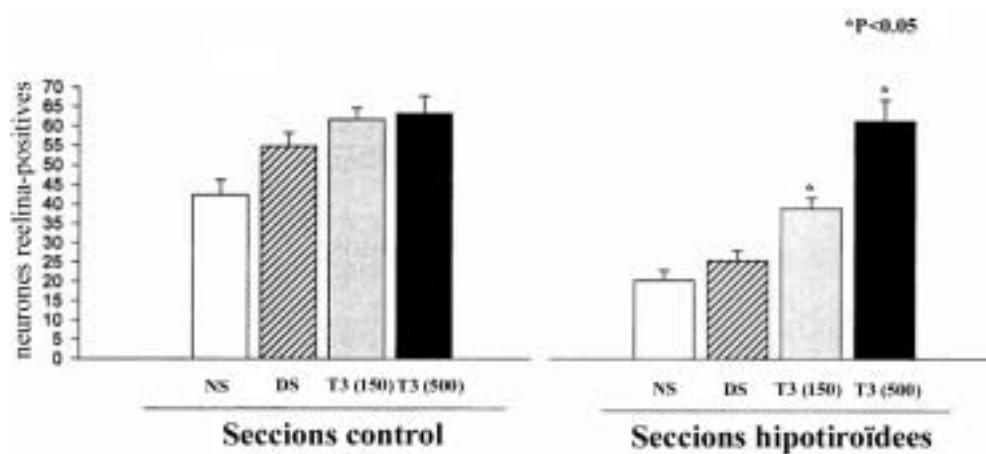
CONTROL

HIPO

HIPO+T3

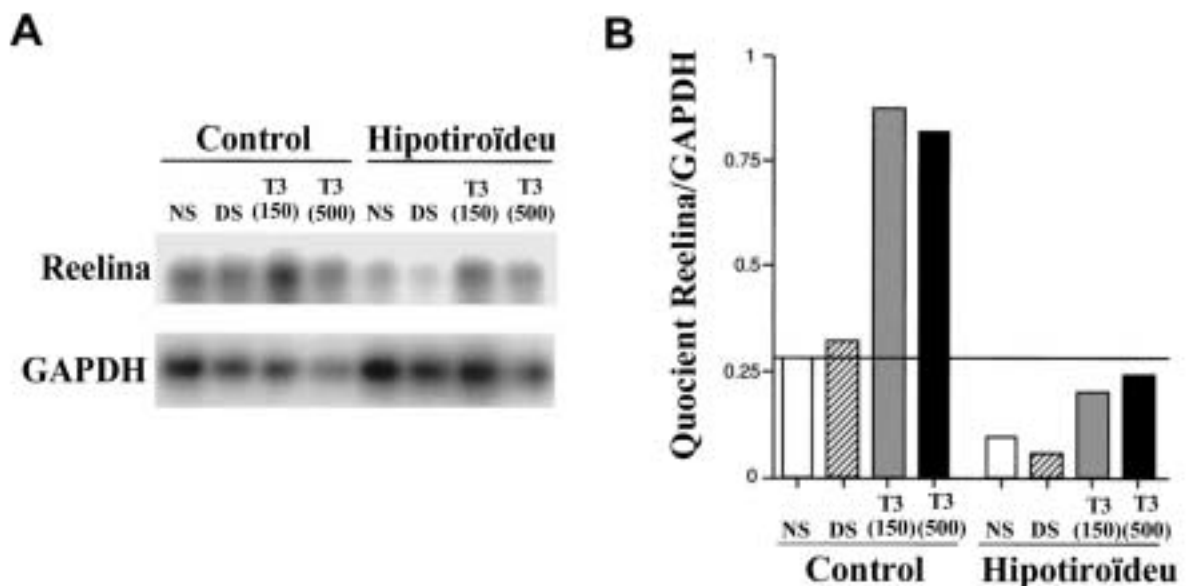
Expressió del mRNA de reelina (A-F) i proteïna (G-L) en cultius organotípics de seccions d'hipocamp. **Plafons de l'esquerra**, (A-J), cultius de seccions de rates eutiroides incubats durant 6 dies en sèrum estàndard. **Plafons del mig**, (B-K), cultius de seccions de rates hipotiroïdes incubats durant 6 dies en sèrum mancat d'hormona tiroïdea. **Plafons de la dreta**, (C-L), cultius de seccions de rates hipotiroïdes incubats durant 6 dies en sèrum mancat de T3/T4 suplementat amb T3 500nM. Noteu que els reduïts nivells d'expressió de les rates hipotiroïdes es recuperen mitjançant el tractament amb T3. Fotomicrografies ampliades mostrant l'expressió del mRNA de reelina (D-F) i proteïna (J-L) a les cèl·lules de Cajal-Retzius de l'hipocamp. Les abreviatures són les mateixes que a la **Figura 25**; S, subiculum. Barres d'escala: A, 300µm (aplicable a B, C i G-I); D, 75µm (aplicable a E, F); J, 50µm (aplicable a K,L).

Figura 32



Densitat de neurones positives pel mRNA de reelina al SLM de cultius de seccions d'hipocamp de rates control i hipotiroidees nounates (P0). Els cultius organotípics s'incubaren en sèrum normal estàndard (NS) o en sèrum mancat de T3/T4 (DS) suplementat o no amb T3 tal i com s'indica. Per als anàlisis estadístics, els cultius tractats amb T3 es compararen amb els cultius DS. Noteu l'increment de cèl·lules reelina-positives causat pel tractament amb T3. Les dades es quantificaren com ha estat descrit en els Materials i Mètodes (mitja ± SEM; *p<0.05). Cada valor correspon a cinc bandes de dos cultius diferents.

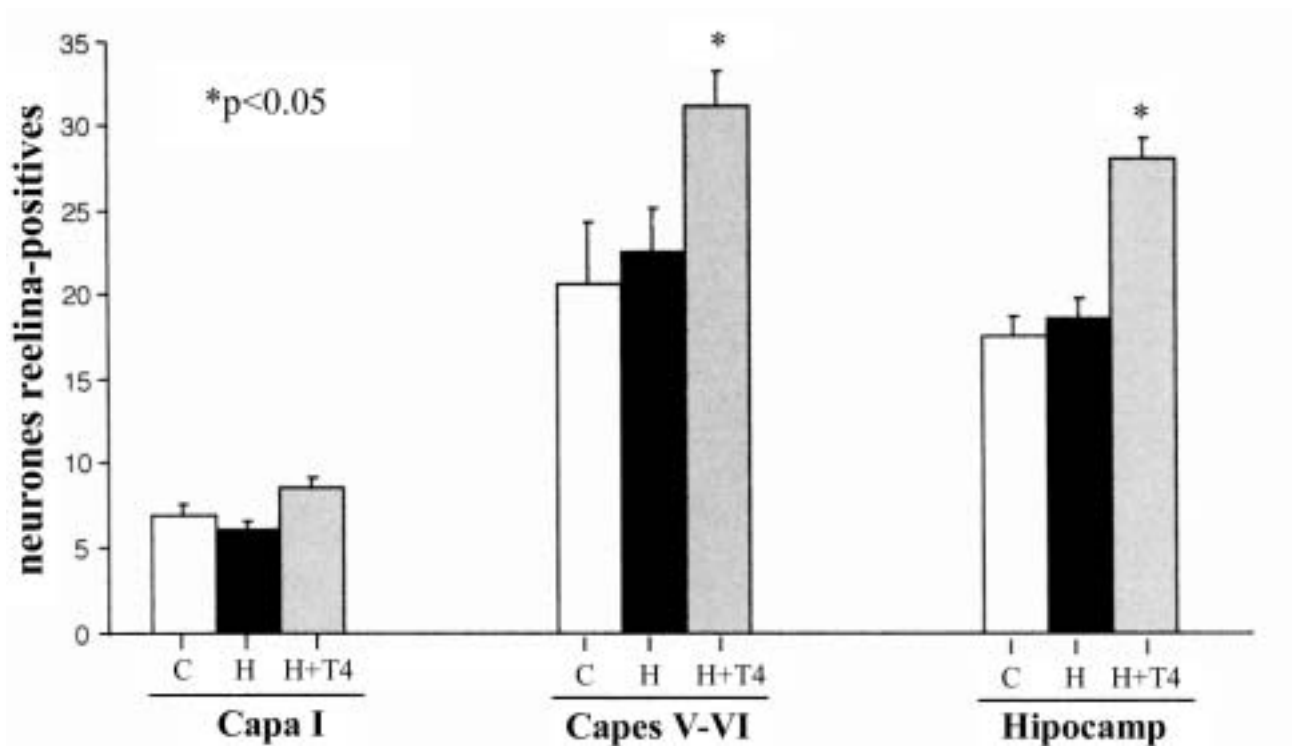
Figura 33



Anàlisi per RT-PCR de l'expressió del mRNA de reelina en cultius organotípics. A) Els RNAs totals es prepararen dels mateixos quatre tipus de cultius que s'esmenten al peu de la **Figura 32** i posteriorment es retrotranscrivieren i analitzaren com s'ha descrit en els Materials i Mètodes per a estimar-ne l'expressió del mRNA de reelina. El gen GAPDH s'utilitzà com a control intern. B) Quantificació del quocient d'expressió de mRNA reelina/GAPDH.

Figura 34

B



Efecte del tractament *in vivo* amb hormona tiroïdea sobre el nombre de cèl·lules reelina-positives presents en rates P15. A) Fotomicrografies il·lustrant el nivell d'expressió de reelina en el còrtex parietal de rates control (C), hipotiroïdees (H) i hipotiroïdees tractades amb T4 (H+T4), tal i com s'ha descrit en els Materials i Mètodes. B) Nombre de neurones reelina-positives al neocòrtex (capes I i V/VI) i a l'hipocamp (SLM) per tres grups d'animals. Les dades es quantificaren tal i com s'ha descrit en els Materials i Mètodes (mitja \pm SEM; $*p < 0.05$). Per la capa cortical I i el SLM cada valor correspon a tres bandes de quatre animals diferents, i per les capes corticals V/VI a quatre seccions de tres animals. Les abreviatures són les mateixes que les de la **Figura 25**. Barra d'escala: 100 μ m.

3. PAPER DE LA NETRINA-1 EN LA MIGRACIÓ DELS PRECURSORS GENERATS EN EL LLAVI RÒMBIC

3.1. EFECTE EN NEURONES I NEURITES PROVINENTS DEL LLAVI RÒMBIC INFERIOR

La seqüència temporal de proliferació de precursors neuronals en el IRL, ens permet concretar el tipus de neurones precerebel·lars afectades per la Netrina-1 en la seva migració. En els nostres experiments, seleccionarem explants de llavi ròmbic extrets d'embrions E12-E14. A E12, totes les neurones de IO han abandonat el IRL així doncs, la majoria de cèl·lules en aquests explants correspondrien a neurones del LRN i del ECN. En canvi, les neurones generades a E14 estan exclusivament destinades als nuclis pontins (Taber Pierce 1966, veure punt 3.1. de la Discussió).

Primer, comprovarem si la Netrina-1 actuava com a senyal atractiva o repulsiva per les neurones del LRN i del ECN, mitjançant el cocultiu d'explants de IRL amb agregats de cèl·lules secretores de Netrina-1. Els explants cultivats amb agregats de cèl·lules EBNA-293 durant 2 dies *in vitro* (DIV) no mostraven cap orientació preferencial en el creixement de les neurites immunotenyides amb l'anticòs Tuj-1; presentaven un creixement radial (Taula 3; Fig. 36). El més rellevant fou la manca, gairebé total, de cossos cel·lulars en migració entre les neurites. Per contra, quan els explants de IRL de E12 eren cultivats amb cèl·lules secretores de Netrina-1, el 91% dels explants (Taula 3) mostraven un patró de creixement neurític marcadament asimètric, amb molts menys processos en el quadrant distal que en el proximal (no mostrat). Aquest comportament diferencial segons el quadrant, desapareixia quan els explants se situaven a llargues distàncies (al voltant de 600µm) dels agregats cel·lulars. Encara més, les neurites del quadrant proximal formaven uns fascicles gruixuts i compactes que es trobaven associats a cadenes de neurones en migració.

Després intentarem analitzar l'efecte de la Netrina-1 sobre la migració de les neurones precerebel·lars pontines i amb aquest motiu duguerem a terme experiments *in vitro* similars utilitzant IRL de E14. En els cocultius amb agregats de cèl·lules control, les neurites de IRL creixien simètricament en un 75% dels explants després de 1 DIV i en un 100% dels explants després de 2 DIV (Taula 3; Fig. 37A). En ambdós casos, les neurites radials emergents estaven pobrement fasciculades (Fig. 37A) i les poques neurones Tuj-1-positives que abandonaven els explants mostraven una morfologia toscament bipolar i uns llargs processos neurítics, probablement corresponents al *leading process* de les neurones pontines en migració (Ono i

RESULTATS

Kawamura, 1990) (Fig. 37C,E). Aquestes neurones es mantenien molt a prop de l'explant, el qual apareixia envoltat per un estret anell de cèl·lules d'un gruix aproximat de 100µm (Taula 3; Figs. 37A, 38A). En canvi, el 59% dels explants de 1 DIV i el 100% dels de 2 DIV cocultivats amb els agregats secretors de Netrina-1 (Taula 3A; Fig. 37B) mostraven un prominent creixement neurític dirigit cap als agregats cel·lulars. La majoria d'aquests processos s'havien fasciculat i assolien la massa cel·lular productora de Netrina-1 (Fig. 37B,F). Els cultius tractats amb marcadors nuclears, ens permeteren observar l'existència de les poques neurones en migració que es trobaven aïllades, tot i que la majoria es col·locaven en aposició, seguint-se les unes a les altres i formant gruixudes cadenes neuronals, que emergien, bàsicament, dels quadrants proximals dels explants (Taula 3B; Fig. 37B,D) i, ocasionalment, dels quadrants laterals (Fig. 38B). En cocultius doblement tenyits, la majoria de les cadenes de cèl·lules en migració se situaven entremig dels processos fasciculats (Fig. 37B,D,F), com ocorre en la via migratòria pontina *in vivo* (Ono and Kawamura, 1990), i recorrien la distància entre els explants de IRL i els agregats cel·lulars de EBNA-293 transfectades (Fig. 37B). A partir d'aquestes observacions podem concloure que les neurones precerebel·lars utilitzen un tipus de migració neurofíllica (Rakic, 1990). Encara més, les poques neurites que creixien en el quadrant distal no es veien mai associades a una migració neuronal en massa (Figs. 37B, 38B), suggerint que, en els cocultius, el creixement neurític i la migració neuronal no conformen un procés unitari. Aquests resultats, doncs, mostren que la Netrina-1 actua com a senyal quimiotàctica per les neurones precerebel·lars, perquè imposa direccionalitat a la seva migració.

Amb la intenció de confirmar que les neurones que migraven en els explants de IRL a E14 eren neurones pontines, els cultius foren immunotenyits amb anticossos contra TAG-1 (Wolfer et al., 1994). Com està mostrat a la Figura 38C,D, aquests anticossos marcaven cadenes gruixudes de neurones en migració amb llargs *leading processes*, els quals estaven dirigits cap als agregats de Netrina-1. D'altra banda, la potent migració provocada per la Netrina-1 sobre les neurones precerebel·lars pontines postmitòtiques fou reproduïda cultivant explants aïllats de IRL de E14 en un medi condicionat durant 36 hores amb cèl·lules EBNA-293 secretores de Netrina-1 (Fig. 38E-H). Alguns dels explants de IRL cultivats o bé amb agregats de cèl·lules secretores de Netrina-1 o bé en medi condicionat foren immunotenyits amb anticossos contra GFAP. No es detectaren cèl·lules GFAP-positives en els explants, fet que suggeria que la migració no podia ser gliofíllica.

Tots aquests experiments demostren que la Netrina-1 no és només un quimioatracent per les neurites provinents de les neurones del LRN, del ECN, del NRTP o del BP generades al IRL,

sinó que, alhora, és capaç d'atraure i promoure la migració cel·lular massiva d'aquestes neurones.

3.2. EFECTE EN NEURONES I NEURITES DEL LLAVI RÒMBIC SUPERIOR I DE LA CAPA GERMINAL EXTERNA

Volguérem comprovar, també, l'efecte que exercia de la Netrina-1 en els dos tipus de migració que experimenten les cèl·lules cerebel·lars al llarg de la seva diferenciació i amb aquesta finalitat duguérem a terme experiments *in vitro* tant amb explants de uRL de E14 com amb explants d'EGL de P0-P6. Els provinents de E14 (uRL) que es cocultivaren amb cèl·lules control emetien neurites sense cap orientació preferencial després de 1 o de 2 DIV (Taula 4), mentre que en exposar-los a cèl·lules productores de Netrina-1 experimentaven un creixement neurític menys homogeni (Fig. 39A,B). Amb tot, no es detectaren canvis significatius en l'àrea ocupada pels processos emesos (Fig. 40; Taula 4).

Alhora de disseccionar explants d'EGL en seccions parasagitals de cerebel postnatal utilitzàrem el pla de més fàcil ruptura, que passa just per sota de la capa de cèl·lules de Purkinje, multicel·lular en les edats P0-P2 i monocel·lular a P4-P6. Així, aquests explants d'EGL contenen, inicialment, les làmines basal subpial i glial, l'EGL sencera, la capa molecular naixent i la majoria de les cèl·lules de Purkinje (Fig. 35B). Per afavorir el creixement radial tant dels processos de les cèl·lules granulars com de les neurones, els explants es col·locaren en una matriu de gel de colagen tridimensional, orientant la superfície subpial de l'explant cara amunt o cara avall. Fruit d'aquesta orientació, el creixement dels explants d'EGL fou simètric i radial, fet que ens permeté monitoritzar els efectes de la Netrina-1.

Incubàrem els explants amb anticossos contra diferents marcadors cel·lulars per així poder identificar els tipus de neurones cerebel·lars i els processos que creixien dels explants d'EGL. Utilitzàrem l'anticòs contra Tuj-1 per observar les neurites, anti-TAG-1 o L1 per visualitzar els cossos de les cèl·lules granulars, anti-calbindina per les cèl·lules de Purkinje i anti-GFAP per la glia de Bergmann (Wassef et al., 1985; Buttiglione et al., 1996; Soriano et al., 1997). Quan els explants d'EGL, a P0, foren cocultivats des de 1 fins a 3 dies amb cèl·lules secretores de Netrina-1, un 67% dels explants mostrava neurites positives per Tuj-1 que creixien preferencialment cap al quadrant distal (Taula 4; Fig. 39C,D). Els explants provinents d'animals de més edat (P2, P4 o P5) mostraven un efecte repulsiu similar, però més dràstic (Figs. 40, 41A-D). A tall d'exemple, els explants d'EGL de P4 i P5 presentaven un creixement preferencial en el quadrant distal en un 90% dels casos (Taula 4). L'efecte repulsiu de la Netrina-1 en l'extensió neurítica es manifestà en forma d'un creixement preferencial en el quadrant distal més que no

pas en forma d'un canvi de direcció per defugir de la font de Netrina-1. Aquest comportament es reproduí quan s'incubaren explants d'EGL en medi condicionat per cèl·lules secretores de Netrina-1, fet que provocà un creixement neurític reduït (Fig. 39E,F).

La utilització de diferents marcadors cel·lulars mostrà que les cèl·lules de Purkinje calbindina-positives no sobreviuen en aquestes condicions i degeneraven durant el segon dia en cultiu (no mostrat). La immunotinció amb GFAP revelà cossos cel·lulars positius dins dels explants, que molt probablement corresponien a cèl·lules de la glia de Bergmann, però no es trobaren processos GFAP-positius que haguessin crescut fora dels explants. Contràriament, els anticossos contra TAG-1 (Fig. 41E) i L1 (no mostrat), els quals marquen, respectivament, les fibres paral·leles més immadures i les madures en el cerebel en desenvolupament (Buttiglione et al., 1996), tenien la majoria de les fibres emergents dels explants d'EGL. Això ens indica que la majoria, sinó totes, les neurites repel·lides per la Netrina-1 en el nostre assaig corresponen a fibres paral·leles. D'altra banda, juntament amb les fibres paral·leles, s'observà com els cossos cel·lulars TAG-1- o L1-positius s'allunyaven dels explants (Fig. 41E). En presència de cèl·lules EBNA-293 control, es detectaven alguns cossos cel·lulars marcats a prop dels explants, enmig dels feixos de fibres paral·leles que emergien radialment. Contràriament, en presència de cèl·lules secretores de Netrina-1, els cossos cel·lulars positius per TAG-1 o L1 eren més abundants i es trobaven exclusivament en el quadrant distal a l'agregat cel·lular secretor de Netrina-1 (Fig. 41E). Aquests cossos cel·lulars eren molt petits (6-8µm) i per tant corresponien a cèl·lules granulars en migració.

Tots junts, aquests resultats mostren que la Netrina-1 no té cap efecte sobre explants de uRL de E14, indicant que aquest factor no juga cap paper en la iniciació de la migració tangencial dels progenitors de les cèl·lules granulars. En canvi, la Netrina-1 sí que exerceix un fort efecte repulsiu en el creixement de les fibres paral·leles (axons de les cèl·lules granulars) i en la translocació intraneurítica de les cèl·lules granulars per aquests axons. La repulsió generada per la Netrina-1 es fa evident ja en el naixement (P0) i augmenta dràsticament en estadis postnatsals més tardans.

3.3. PATRÓ D'EXPRESSIÓ DE LA NETRINA-1 I DELS SEUS RECEPTORS EN EL TRONC ENCEFÀLIC INFERIOR I CEREBEL EN DESENVOLUPAMENT

Amb la intenció d'esbrinar si, *in vivo*, la Netrina-1 mediatitza els efectes repulsius i atractius observats *in vitro*, examinarem els patrons d'expressió de la netrina-1 i dels seus receptors en el tronc de l'encèfal inferior i en el cerebel de ratolins embrionaris i postnatsals. Per a dur a terme aquest anàlisi s'utilitzaren les tècniques d'hibridació *in situ* i la

immunocitoquímica. A E12, el mRNA de netrina-1 es trobava expressat a nivells elevats en les cèl·lules epitelials a l'origen de la *floor plate*. L'expressió s'extenia mediolateralment, en forma de gradient decreixent, travessava la placa basal i ascendia cap al sulcus limitans. El mRNA de dcc i la seva proteïna no estaven expressats a la zona ventricular, però sí en la zona subventricular tant de la placa basal com de la placa alar. La proteïna DCC marcava fibres al llarg de les vies de migració marginal i submarginal. A aquesta edat del desenvolupament, els senyals d'hibridació per unc5h2 i unc5h3 no es podien gairebé detectar (no mostrat; Bloch-Gallego et al., 1999).

A E14, l'expressió del missatger de netrina-1 era similar a l'observada per E12 (Fig. 42A). L'expressió de dcc es mantenia elevada en la zona subventricular i al llarg de la via migratòria pontomedul·lar, que es dirigeix cap al pons. Un marcatge menys intens es detectava en el nucli del tracte solitari en la regió vestibular (Fig. 42C,D). El mRNA de neogenina estava altament expressat en les cèl·lules de la zona ventricular de la placa basal i menys intensament en la zona ventricular de la placa alar, fins a arribar al IRL (Fig. 42B). Els trànscrips de dcc i neogenina, doncs, mostraven uns patrons d'expressió no solapats. D'altra banda, el mRNA de unc5h2 mostrava un senyal elevat i ocupava la major part de les plaques ventriculars alars, incloent el IRL, mentre el senyal corresponent a unc5h3 era pràcticament absent (Fig. 42E,F). L'expressió de unc5h2, per tant, era complementària a la de netrina-1 i estava parcialment solapada amb la distribució del mRNA de neogenina (Fig. 42A,B,E). En seccions coronals a l'alçada del nucli pontí, es podia observar com la netrina-1 estava expressada en la línia mitja (Fig. 42G) i el senyal corresponent a dcc era intens en la via migratòria pontina (Fig. 42H). Tant unc5h2 com unc5h3 s'expressaven suaument en el nucli pontí a E14 i amb l'edat aquesta expressió augmentava (Fig. 42I).

En la placa cerebel·lar en desenvolupament, a E14, tant l'expressió de netrina-1 com la dels seus receptors era feble. La netrina-1 estava gairebé absent, amb l'excepció d'un lleu marcatge en les regions nuclears profundes (Fig. 43A). El mRNA de dcc i la seva proteïna es trobaven en el neuroepiteli primari cerebel·lar, en el trígon germinal i en l'EGL. La proteïna estava present, a més, en feixos de fibres que podrien correspondre a les vestibulars, les quals són les primeres projeccions extracerebel·lars en arribar (Fig. 43C,D). La distribució de neogenina colocalitzava amb la de dcc, majoritàriament en la regió mitja de la zona ventricular. Alhora, la neogenina estava expressada en neurones nuclears profundes (Fig. 43B). A mida que avançàvem en el desenvolupament, l'expressió cerebel·lar de la netrina-1 i dels seus receptors anava variant. Així, a P5, l'expressió de netrina-1 era prominent en l'EGL i en les cèl·lules basket i estrellades (les interneurons inhibidores de la capa molecular), però estava gairebé

RESULTATS

absent de la capa granular interna (Fig. 44A). El mRNA de la neogenina estava expressat per les cèl·lules granulars tant de l'EGL com de la IGL (Fig. 44B). El missatger del dcc es trobava per tota l'EGL, mentre que la seva proteïna només estava expressada en les fibres paral·leles a la interfase entre l'EGL profunda i la capa molecular naixent. També s'observaven fibres DCC-positives en la IGL i en la substància blanca (Fig. 44C,D). Els mRNAs de unc5h2 i unc5h3 es trobaven confinats als precursors de cèl·lules granulars (EGL) i en les cèl·lules granulars postmigradores (IGL) (Fig. 44E,F).

Taula 3

Condicions de cultiu	Àrea mitja ± SD (mm ²)		Significància estadística	Nombre d'explants	Orientació			
	Quadrant proximal	Quadrant distal			+	=	-	% +
(A) Creixement neurític (immunotinció per Tuj-1)								
IRL E12 net 1 2 div	0.302±0.103	0.110±0.072	**	23	21	2	0	91
IRL E12 cont 2 div	0.129±0.058	0.211±0.128		7	1	4	2	29
IRL E14 net 1 1 div	0.072±0.052	0.024±0.018	**	17	10	7	0	59
IRL E14 cont 1 div	0.031±0.001	0.025±0.004		4	1	3	0	25
IRL E14 net 1 2 div	0.296±0.178	0.097±0.039	**	23	23	0	0	100
IRL E14 cont 2 div	0.115±0.073	0.131±0.083		7	0	7	0	0
(B) Migració neuronal (tinció nuclear amb bisbenzimidà)								
IRL E14 net 1 2 div	0.380±0.177	0.056±0.025	**	6	6	0	0	100
IRL E14 cont 2 div	0.056±0.018	0.045±0.014		6	0	6	0	0

L'àrea ocupada per la gran massa de processos neurítics i/o pels cossos cel·lulars en els quadrants proximal i distal dels explants co-cultivats amb agregats de cèl·lules control EBNA-293 o amb cèl·lules transfectades amb la construcció netrina-1-e-myc es mesurà i expressà com a mitja ± SD. Les diferències significatives entre els quadrants proximal i distal es calcularen a partir de les dades inicials utilitzant el test LSD. **p<0.01.

L'orientació preferencial del creixement es determinà per a cada explant dividint l'àrea ocupada pel creixement neurític o la migració cel·lular en el quadrant proximal per la del quadrant distal, que dona un quocient de 1 per al creixement radial. Els límits entre les diferents categories es calcularen a partir del SD obtingut en els quocients d'explants co-cultivats amb cèl·lules control.

div, dies in vitro; -, radial; quocient 1+SD; +, atracció; quocient > 1+SD; -, repulsió; quocient < 1-SD; %+, percentatge d'explants atrets per la Netrina-1

Taula 4

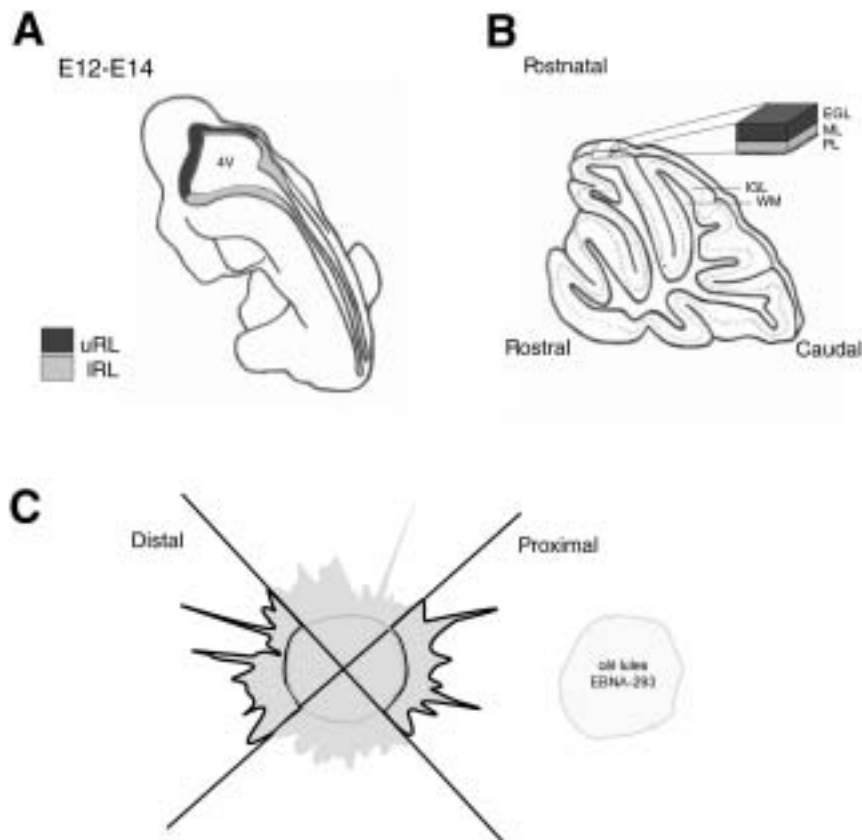
Condicions de cultiu	Àrea mitja ± SD (mm ²)		Significància estadística	Nombre d'explants	Orientació			
	Quadrant proximal	Quadrant distal			+	=	-	% -
uRL E14 net 1 1 div	0.058±0.017	0.059±0.023		22	5	8	9	41
uRL E14 cont 1 div	0.073±0.036	0.062±0.027		5	1	3	1	20
uRL E14 net 1 2 div	0.083±0.052	0.115±0.043		11	1	4	6	55
uRL E14 cont 2 div	0.133±0.053	0.149±0.062		5	1	3	1	20
EGL P0 net 1 3 div	0.069±0.025	0.099±0.030	*	18	2	4	12	67
EGL P0 cont 3 div	0.112±0.040	0.122±0.045		8	1	6	1	13
EGL P2 net 1 2 div	0.065±0.023	0.103±0.024	**	22	0	3	19	86
EGL P2 cont 2 div	0.087±0.033	0.077±0.030		9	1	7	1	11
EGL P4 net 1 2 div	0.050±0.018	0.095±0.042	**	32	0	3	29	91
EGL P4 cont 2 div	0.173±0.047	0.172±0.042		7	0	6	1	14
EGL P5 net 1 2 div	0.062±0.026	0.131±0.051	**	31	1	3	27	87
EGL P5 cont 2 div	0.119±0.026	0.130±0.037		11	2	7	2	18

L'àrea ocupada per la gran massa de processos neurítics i pels cossos cel·lulars en els quadrants proximal i distal dels explants co-cultivats amb agregats de cèl·lules control EBNA-293 o amb cèl·lules transfectades amb la construcció netrina-1-e-myc es mesurà i expressà com a mitja ± SD. Les diferències significatives entre els quadrants proximal i distal es calcularen a partir de les dades inicials utilitzant el test LSD. *p<0.05; **p<0.01.

L'orientació preferencial del creixement es determinà per a cada explant dividint l'àrea ocupada pel creixement neurític o la migració cel·lular en el quadrant proximal per la del quadrant distal, que dona un quocient de 1 per al creixement radial. Els límits entre les diferents categories es calcularen a partir del SD obtingut en els quocients d'explants co-cultivats amb cèl·lules control.

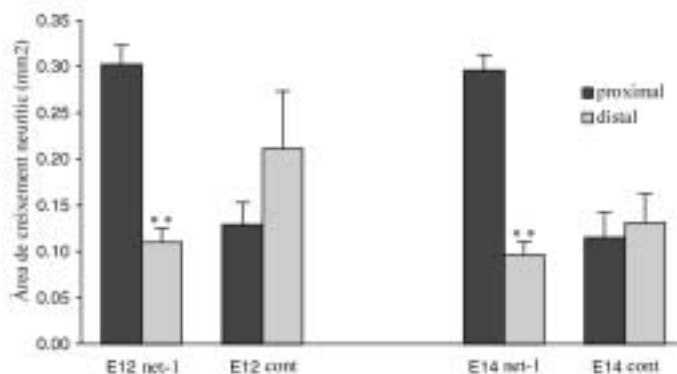
div, dies in vitro; -, radial; quocient 1+SD; +, atracció; quocient > 1+SD; -, repulsió; quocient < 1-SD; %+, percentatge d'explants repel·lits per la Netrina-1

Figura 35



Dibuixos esquemàtics mostrant la localització anatòmica dels diferents tipus d'explants utilitzats i les anàlisis que s'han aplicat. A) Visió dorsal d'un embrió E12-E14 mostrant la localització del llavi ròmbic al voltant del quart ventricle (4v). La zona de color **granat** correspon a la regió superior o trígona germinal (**uRL**) i la zona de color **groc** correspon a la regió inferior (**IRL**). B) Secció sagital d'un cerebel postnatal mostrant les capes utilitzades en els explants d'EGL. C) Esquema il·lustrant el mètode utilitzat per la quantificació del creixement neurític i la migració neuronal. Per cada explant, l'àrea ocupada respectivament pels processos neurítics i pels cossos cel·lulars es mesurà en els quadrants (**contornejat amb negre**) proximal i distal dels agregats cel·lulars.

Figura 36



Histogrames il·lustrant l'Àrea de creixement neurític i els cossos cel·lulars en els quadrants proximal i distal dels explants de llavi ròmbic de E12 i E14 co-cultivats amb cèl·lules EBNA-293 control o amb cèl·lules secretores de Netrina-1 durant 48h. Les dades representen la mitja \pm SEM; **p=0.01, test LSD.

Figura 37

La Netrina-1 és un quimioattractant per les neurites i les cèl·lules originades en els explants de IRL de E14. Aquests es co-cultivaren 48h amb agregats de cèl·lules EBNA-293 control (A,C,E) o amb cèl·lules transfectades amb el vector d'expressió netrina-1-c-myc (B,D,F). Les imatges de microscopi confocal a nivell del pla mig dels explants mostren els processos neuronals immunotenyits amb anticossos anti- β -tubulina III, en **verd**, i els nuclis cel·lulars tenyits amb bromur d'etidi, en **vermell**. (C,E) i (D,F) són respectivament ampliacions de les zones emmarcades a A i B i il·lustren la curta distància i l'orientació aleatòria de les neurones en migració enfrontades a les cèl·lules control (E) i les llargues cadenes de cèl·lules en migració que s'orienten cap a la font de Netrina-1 (F). **c**, agregat de cèl·lules control; **n**, agregat de cèl·lules secretores de netrina-1. Barres d'escala, 200 μ m (A,B) i 40 μ m (C-F).

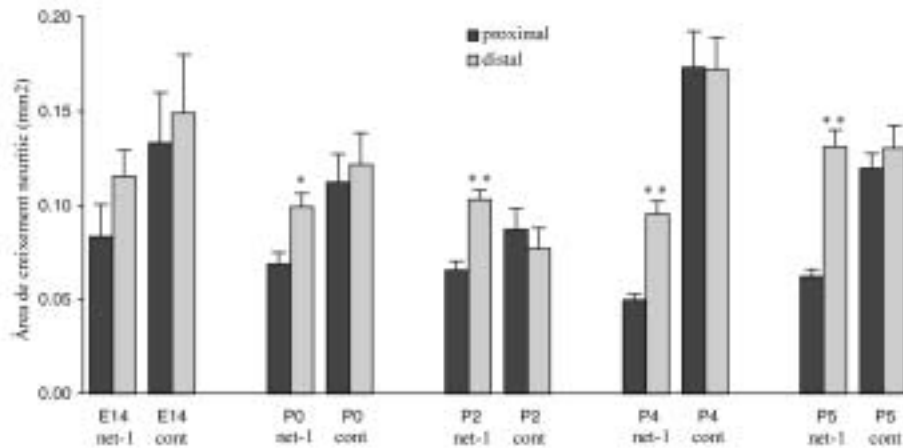
Figura 38

Les cèl·lules i neurites atretes per la Netrina-1 a E14 són immunoreactives per TAG-1. A-D) Explants de IRL de E14 co-cultivats durant 48h amb agregats de cèl·lules EBNA-293 control (A,C) o amb cèl·lules secretores de Netrina-1 (B,D). A,B) Explants tenyits amb bisbenzimidida que il·lustren la distribució de les cèl·lules en migració i el destacable efecte de la Netrina-1 en la migració neuronal. C,D) Explants similars immunoreactius per anticossos contra TAG-1 mostren que, en absència de Netrina-1, són escasses les neurites i els cossos cel·lular que, organitzats d'una manera simètrica, abandonin els explants; mentre que són molt més nombrosos en els cas que es co-cultivin amb cèl·lules secretores de Netrina-1 i alhora s'orienten cap a la font de Netrina-1. En comparar C i D s'observa que la Netrina-1 regula a l'alta la immunoreactivitat per TAG-1. E-H) Explants de IRL de E14 cultivats durant 72h tant en medi condicionat per cèl·lules EBNA-293 control (E,G) o per cèl·lules transfectades amb el vector netrina-1-c-myc (F,H) i immunotenyits amb anticossos contra TAG-1. En presència de Netrina-1, la immunoreactivitat per TAG-1 augmenta i les cèl·lules migren de l'explant formant llargues cadenes cel·lulars. (G,H) són ampliacions de les zones emmarcades a E i F, il·lustrant les cadenes de cèl·lules en migració. **c**, control; **n**, netrina-1. Barres d'escala: 200µm (A-F) i 75µm (G-H).

Figura 39

Efectes de la Netrina-1 sobre els progenitors de les cèl·lules granulars i sobre cèl·lules granulars neonatals. A-D) Es cultivaren explants de uRL de E14 (A,B) i EGL de P0 (C,D) durant 36-72h amb cèl·lules EBNA-293 control (A,C) o cèl·lules transfectades amb el vector netrina-1-c-myc (B,D) i foren immunotenyides amb anticossos anti-β-tubulina III. Noteu que la Netrina-1 exerceix un efecte inhibitor sobre el creixement neurític en els explants de EGL de P0 (D). E,F) Es cultivaren explants de EGL de P5 durant 24h amb medi condicionat per cèl·lules EBNA-293 (E) o amb cèl·lules transfectades amb el vector netrina-1-c-myc (F) i foren immunotenyides amb anticossos anti-β-tubulina III. Noteu que les fibres immunoreactives disminueixen en presència de Netrina-1. El perímetre dels agregats de cèl·lules control (**c**) i secretores de Netrina-1 (**n**) està contornejat amb **punts negres** i el perímetre dels explants de uRL i EGL està contornejat amb **punts blancs**. Barres d'escala: 200µm.

Figura 40



Histogrames il·lustrant l'àrea de creixement neurític en els quadrants distal i proximal del uRL de E14 i de la EGL postnatal cultivats durant 48-72h amb cèl·lules EBNA-293 control o amb cèl·lules transfectades amb el vector netrina-1-c-myc. Les dades estan representades com a mitja \pm SEM; *p=0.05; **p=0.01, test LSD.

Figura 41

La Netrina-1 repel el creixement neurític dels explants de EGL de ratolins postnats. Es cultivaren explants de EGL de P2 (A,B), P4 (C,D) i P6 (E) durant 48h amb cèl·lules EBNA-293 control (A,C) o amb cèl·lules transfectades amb el vector netrina-1-c-myc (B,D,E) i s'immunotenyiren amb anticossos contra anti- β -tubulina III (A-D) o TAG-1 (E). Noteu la forta repulsió exercida per la Netrina-1 a B,D, E) Fotomicrografia mostrant cèl·lules granulars TAG-1-positives (**fletxes**) migrant al llarg de fibres en el quadrant distal a la font de Netrina-1. Els perímetres d'agregats de cèl·lules control (**c**) i de cèl·lules secretores de Netrina-1 (**n**) estan contornejats amb **punts blancs**. Barres d'escala: 250 μ m (A-D), 25 μ m (E).

Figura 42

Patró d'expressió embrionari del mRNA de netrina-1 i dels seus receptors en el tronc encefàlic inferior i el pons. A-F) Seccions coronals del tronc encefàlic mostrant el IRL i l'origen de la via migratòria pontomedul·lar a E14. A) El mRNA de netrina-1 (**NET-1**) es troba fortament expressat a la *floor plate* i a la zona ventricular de la placa basal. B) El mRNA de la neogenina (**NEOG**) s'expressa a la zona ventricular de la placa basal incloent la IRL. C) El mRNA de dcc (**DCC**) i D) la proteïna (**DCC-P**) es troben expressats a les neurones pontines postmitòtiques primerenques de la zona subventricular de la IRL i més intensament a les cèl·lules que migren al llarg de la via migratòria pontomedul·lar. E) El mRNA de unc5h2 (**UNC5H2**) està expressat a la zona ventricular de la placa alar incloent la IRL. Noteu que els nivells més elevats d'expressió es troben adjacents a l'àrea d'expressió de netrina-1 i també l'expressió puntejada de unc5h2 delimitant la via migratòria pontomedul·lar. F) El mRNA de unc5h3 (**UNC5H3**) no s'expressa a aquesta edat. G-I) Seccions coronals a nivell del pons a E14 (G,H) i E17 (I). G) La netrina-1 està expressada prominentment a les cèl·lules de la línia mitja. H) La proteïna DCC està present a la via migratòria pontomedul·lar a nivell del pons. I) A E17, unc5h2 s'expressa a les neurones pontines. **AP**, placa alar; **BP**, placa basal; **FP**, *floor plate*; **IRL**, llavi ròmbic inferior; **MFN**, nucli facial motor; **PN**, nuclis pontins; **PMS**, via migratòria pontomedul·lar; **SL**, sulcus limitans; **SVZ**, zona subventricular; **VL**, nucli del lemnisc ventral; **VZ**, zona ventricular; **IV**, quart ventricle. Barres d'escala: 250µm.

Figura 43

Expressió de la netrina-1 i dels seus receptors al primordi del cerebel a E14. A) El mRNA de netrina-1 (**NET-1**) està gairebé absent del primordi del cerebel. B) El mRNA de neogenina (**NEOG**) es troba fortament expressat a la VZ en forma de gradient medio-lateral i també a la EGL i en els nuclis profunds del cerebel. C) El mRNA de dcc (**DCC**) i D) la proteïna (**DCC-P**), igual que la neogenina, estan localitzats a la VZ i a la EGL. Noteu que diversos tractes de fibres, probablement aferents cerebel·lars i el nervi troclear (**fletxa**), són extremadament immunoreactius pel DCC. **DN**, nucis profunds; **EGL**, làmina germinal externa; **IRL**, llavi ròmbic inferior; **VZ**, zona ventricular; **uRL**, llavi ròmbic superior; **IV**, quart ventricle. Barres d'escala: 250µm.

Figura 44

Expressió de netrina-1 i dels seus receptors en el cerebel a P5. A) El mRNA de netrina-1 (**NET-1**) està expressat a la EGL i a les interneurons de la capa molecular. B) El mRNA de neogenina (**NEOG**) està exclusivament expressat a les cèl·lules granulars de la EGL i la IGL. C) El mRNA de dcc (**DCC**) i D) la proteïna (**DCC-P**) estan expressats a dels cèl·lules premigratòries de la EGL i de la substància blanca. Les **fletxes** a D indiquen les fibres paral·leles. E) unc5h2 i F) unc5h3 es troben expressats a les cèl·lules granulars tant de la EGL com de la IGL. **EGL**, làmina germinal externa; **IGL**, làmina granular interna; **ML**, capa molecular; **PL**, capa de cèl·lules de Purkinje; **WM**, substància blanca. Barres d'escala: 250µm (A-C, E-F), 50µm (D).

1. LA REELINA EN EL DESENVOLUPAMENT CEREBRAL

Els factors que guien el desenvolupament del neocòrtex encara segueixen essent un misteri, tot i la intensa investigació que se'ls ha dedicant durant dècades. Recentment, com en moltes àrees de la recerca biomèdica, s'han realitzat molts progressos en el descobriment dels gens necessaris per a executar el programa sencer de la corticogènesi. Sens dubte, el més ben estudiat d'aquests gens és aquell que la seva mutació genera el mutant neurològic de ratolí *reeler*. Un dels motius d'aquest elevat interès en aquest mutant atàxic és que el fenotip *reeler* posa en evidència la major part dels esdeveniments més importants que es duen a terme en el desenvolupament cortical normal. Tot i clara desorganització que presenten les zones laminades del cervell del ratolí *reeler* (Caviness i Sidman, 1973; Mariani et al., 1977; Goffinet, 1980,1992; Derer, 1985; Rakic and Caviness, 1995), la publicació de dos estudis que emfatitzen la falta de correlació entre els llocs d'expressió de *reelina* i el fenotip *reeler* (Ikeda and Terashima, 1997; Schiffmann et al., 1997), ens ha donat peu a estudiar exhaustivament el patró d'expressió de la reelina des d'estadis molt primerencs del desenvolupament i així aprofundir en aquestes aparents incoherències. D'entrada hem trobat l'expressió reelina associada freqüentment amb feixos d'axons en desenvolupament, troballa que ens podria estar indicant que la Reelina desenvolupa un paper en el creixement o guia axonal, tal i com ha estat proposat per altres proteïnes de matriu extracel·lular (Dorries et al., 1996; Gotz et al., 1996, 1997; Faissner et al., 1997) i això concordaria amb estudis que s'han realitzat en paral·lel en el nostre laboratori on es mostra que la Reelina influencia el creixement i la destinació dels aferents hipocàmpics, implicant-la directament en la guia axonal (Del Río et al., 1997; Borrell et al., 1999). Alhora, investigacions recents en animals adults han posat de manifest la inesperada expressió de reelina en cèl·lules GABAèrgiques del córtex cerebral adult (Pesold et al., 1998), fet que ens ha impulsat a intentar caracteritzar el tipus d'interneurons que podrien estar expressant reelina amb la intenció d'esbrinar la funció d'aquesta proteïna en l'adult.

1.1. EXPRESSIÓ PRIMERENCA DEL mRNA DE REELINA I LA REGIONALITZACIÓ DEL PROSENCÈFAL

L'anàlisi del patró d'expressió de reelina en estadis embrionaris primerencs ens ha portat a concloure que els dominis d'expressió de reelina en el diencèfal coincideixen amb tres dels límits neuromèrics proposats en el model prosomèric de la regionalització del cervell anterior (Puelles and Rubenstein, 1993). L'inici de l'expressió de reelina en aquests límits (observada ja a E10) concideix amb l'etapa de formació de l'esboç del patró de regionalització neuronal i també

de les primeres connexions neurals en el diencèfal, fet que podria estar suggerint la intervenció de la Reelina en aquests processos.

En diversos estudis s'ha suggerit que els límits neuromèrics proporcionen, en darrer terme, la informació posicional necessària per a la migració de les neurones i per a la navegació dels seus axons, actuant com a barreres o com a regions de creixement preferencial (Wilson et al., 1993; Chedotal et al., 1995; Mastick and Easter, 1996; Kitamura et al., 1997; Mastick et al., 1997). De fet un dels gens que forma part del grup de gens reguladors del desenvolupament primerenc del CNS, *pax6*, regula l'expressió de molècules d'adhesió específiques i proteïnes extracel·lulars com L1 i R-cadherina (Chalepakis et al., 1994; Stoykova et al., 1997) i, més recentment, també s'ha vist que controla l'expressió del receptor quimiorepulsiu de la Netrina-1, *Unc5h3* (Engelkamp et al., 1999). Així, tot i l'aparent manca d'unes anomalies morfològiques pronunciades en el diencèfal del ratolí *reeler* adult (Caviness et al., 1988), farien falta més anàlisis d'embrions mutants per tal de determinar la contribució de la Reelina a la regionalització primerenca del cervell, donada la funció d'aquesta proteïna en el creixement axonal (veure el punt 1.4. d'aquesta Discussió). Precisament, s'ha trobat que es requereix la cooperació de la Semaforina3F i de la Netrina-1 per a la correcta extensió de fibres que surten del nucli habenular i creuen pel límit neuromèric p1-p2 del diencèfal (Funato et al., 2000). Mentre que el senyal quimiorepulsiu de la Semaforina 3F apareix en el neuròmer p1, el senyal quimioattractiu de la Netrina-1 es troba a la part ventral del diencèfal caudal de manera que ambdues proteïnes fan possible l'extensió d'axons des de l'habènula al llarg del límit neuromèric p1-p2, que, recordem, expressa Reelina. Basant-nos en aquests fets, es podria hipotetitzar, fins i tot, una possible cooperació entre les tres proteïnes per a una correcta extensió axonal d'aquest nucli.

1.2. EXPRESSIÓ DEL mRNA DE REELINA EN LES CÈL·LULES DE CAJAL-RETZIUS

Les nostres dades de colocalització mostren que, en estadis prenatals, l'expressió de la reelina a la capa I queda restringida a les cèl·lules de CR. Des de P5 en endavant, l'expressió de reelina en aquesta capa disminueix en les cèl·lules calretinina-positives, mentre que augmenta en neurones positives per GAD65/67. Existeixen almenys dues explicacions possibles per aquestes troballes: o bé les cèl·lules de CR desapareixen per mort cel·lular en començar l'expressió de reelina a les neurones positives per GAD65/67, o bé les cèl·lules de CR perden l'expressió de calretinina i adopten un nou fenotip GABAèrgic. Donant suport a la primera opció, l'edat de pèrdua de reelina de les cèl·lules de CR (P5-P15) coincideix amb el període de mort cel·lular d'aquestes (Derer and Derer. 1992; Del Río et al., 1995, 1996). A més, si les neurones

GABAèrgiques de la capa I adulta fossin cèl·lules de CR transformades, haurien d'haver nascut en edats primerenques de la corticogènesi (E10-E11 en el ratolí), ja que les cèl·lules CR són de les primeres cèl·lules corticals que esdevenen postmitòtiques (Derer and Derer. 1992; Del Ríó et al., 1995). En canvi, les neurones GABAèrgiques de la capa I es van generant uniformement durant tot el període de neurogènesi (E11-E17 en ratolí) (Fairén et al., 1986). Per tant, aquestes dades recolzen la hipòtesi que la majoria de les cèl·lules CR reelina-positives desapareixen per mort cel·lular i que són les interneurons GABAèrgiques les que expressen reelina postnatalment.

Un procés similar de desaparició, tot i que menys dràstic, podria succeir en les cèl·lules CR de l'hipocamp. En aquesta zona, en estadis postnats tardans (P15-P21) encara s'observen de manera prominent cèl·lules reelina-positives en el stratum lacunosum-moleculare, les quals disminueixen en nombre a l'hipocamp adult. Un tipus de pèrdua tan tardana d'expressió de reelina concorda amb estudis quantitius previs els quals, utilitzant marcatge amb BrdU i immunotinció per calretinina, indicaren que les cèl·lules de CR hipocàmiques desapareixien entre els estadis P15 i adult (Del Ríó et al., 1996; Supèr et al., 1998b). Alhora, la persistència d'un nombre tan relativament elevat de neurones calretinina-positives que expressen reelina en el stratum lacunosum-moleculare adult concorda amb les dades quantitatives que mostren que més d'un 30% de cèl·lules CR hipocàmiques podrien sobreviure en l'hipocamp adult (Supèr et al., 1998b). Donat que les cèl·lules de CR expressen receptors per neurotrofines i semblen respondre a BDNF (Marty et al., 1996; Brunstrom et al., 1997), la reduïda i retardada pèrdua de cèl·lules de CR a l'hipocamp podria estar relacionada amb l'elevada expressió de factors neurotròfics observada en aquesta regió o amb certes peculiaritats del seu desenvolupament, com ara la perllongada neurogènesi postnatal de cèl·lules granulars (Bayer et al., 1980).

1.3. LA REELINA I LA MIGRACIÓ NEURONAL EN EL CÓRTEX CEREBRAL

El fet que la Reelina estigui expressada en la majoria de les regions laminades del cervell anterior es correspon amb la noció que la Reelina és essencial per a la migració neuronal ordenada i la seva posterior organització en capes (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995). El present estudi mostra que a E11-E18, la reelina està expressada exclusivament a les cèl·lules de CR de la capa I, mentre que a estadis més tardans apareix també una expressió important a les capes corticals intermèdies, especialment les capes V i VI. El període d'expressió de reelina en aquestes capes (d'E18 en endavant) concideix amb el de migració neuronal de les capes IV i II-III (Angevine and Sidman, 1961; Caviness, 1982; Fairén et al., 1986; Bayer and

Altman, 1991), fet que indicaria que aquest segon lloc de producció de Reelina podria estar contribuint també a la generació del fenotip *reeler*.

Les cèl·lules de CR s'han implicat en la regulació del fenotip de la glia radial (Soriano et al., 1997; Supèr et al., 2000), no obstant, la Reelina no és un factor essencial per a aquesta regulació (Pinto-Lord et al., 1982; Hunter and Hatten, 1995; Hunter-Schaedle, 1997; Soriano et al., 1997). Les deficiències de migració observades en el córtex cerebral *reeler* són bastant diferents d'altres anomalies cerebrals com la lissencefàlia com ja hem esmentat en la Introducció (Reiner et al., 1995; Ecksloglu et al., 1996; des Portes et al., 1998; Gleeson et al., 1998). De fet, en el ratolí *reeler*, les neurones migradores semblen migrar amb èxit a través de la IZ abans d'arribar a la CP (Goffinet, 1979; Caviness, 1982; Pinto-Lord et al., 1982; Rakic and Caviness, 1995) de manera que la sortida de les neurones migradores de la VZ i la seva migració inicial a través de la IZ semblen, en gran mesura, independents de l'acció de la Reelina.

S'ha suggerit que la Reelina podria proporcionar una senyal d'arrest durant el desenvolupament, evitant que les cèl·lules neocorticals assoleixin la superfície pial (Ogawa et al., 1995; Frotscher, 1997). Aquest atur, però, no significa simplement el final de la migració, sinó que comporta l'alliberament neuronal de la glia radial (Anton et al., 1996) seguit del creixement dels processos neuronals, primer del creixement axonal i després de la dendrita apical. Tenint en consideració aquest fet, sembla que fins i tot el creixement de la dendrita cap a la zona marginal també es veuria aturat per la Reelina i acabaria conduint a una reorientació horitzontal de la ramificació dendrítica. La Reelina, doncs, no només estaria actuant de senyal d'atur per a la migració, sinó també com a inhibidor del creixement dendrític i promotor de la diferenciació neuronal postmigratòria. A mida que el desenvolupament cortical aniria avançant, el gruix del córtex augmentaria, degut al creixement dendrític i a l'arribada de fibres aferents, i la zona superficial portadora de Reelina s'allunyaria de la superfície ventricular de manera que les neurones generades amb posterioritat podrien migrar cap a zones més superficials, abans de ser aturades per la Reelina (Frotscher, 1997). Si aquesta hipòtesi fós real, les neurones primerenques generades en el mutant *reeler* podrien envair la superfície pial, on s'anirien reunint i diferenciant, i les neurones generades amb posterioritat només es podrien situar per sota de les primeres, conduint així a la laminació inversa típica del córtex *reeler*. Amb tot, l'expressió de Reelina a les capes intermèdies sembla no quadrar amb què la Reelina jugui aquest paper, almenys per a les neurones migradores. Donant suport a aquesta idea, ha aparegut un estudi *in vitro* molt recent en el qual, mitjançant l'anàlisi de la migració neuronal en seccions de córtex embrionari en cultiu, s'ha constatat que la Reelina expressada a la zona marginal no impedeix la sortida dels precursors neuronals i de la glia fora dels límits del teixit original, és

més, aquests precursors estableixen un nou teixit organitzat extern al neocòrtex (Hedin-Pereira et al., 2001). S'ha de matitzar, no obstant, que els experiments s'han realitzat en etapes de neurogènesi tardana del hamster i, per tant, aquests resultats no exclouen la possibilitat que la Reelina funcioni de senyal d'arrest exclusivament durant l'etapa primerenca de formació de la placa cortical.

D'altra banda, el nostre grup ha demostrat prèviament que, en experiments en cultiu, les cèl·lules de CR exerceixen una influència quimioattractiva sobre les cèl·lules granulars cerebel·lars migradores (Soriano et al., 1997). Donat que totes les neurones corticals migradores es dirigeixen cap a la capa I, les cèl·lules de CR que secreten Reelina es troben estratègicament situades per a exercir aquesta influència direccional. Encara que la Reelina és probablement massa gran per a difondre llargues distàncies, el seu processament proteolític demostrat recentment (de Rouvroit et al., 1999) podria proporcionar pèptids solubles actius de mides més petites. Si aquest fós el cas, l'expressió de reelina a les capes corticals intermèdies des de E18 en endavant podria contribuir eficientment a la generació d'un gradient de Reelina, especialment rellevant a mida que la corticogènesi avança i el còrtex augmenta de gruix (D'Arcangelo and Curran, 1998).

En un treball publicat molt recentment es descriuen dos tipus de migració observats en les neurones postmitòtiques que aniran a poblar les diferents capes del còrtex (Nadarajah et al., 2001). En aquest, es postula que en etapes primerenques de la formació cortical, les neurones migrarien únicament mitjançant un mecanisme de translocació somal pel qual no necessitarien del suport de la glia radial. Ja en etapes més avançades del desenvolupament, la glia radial sí que passaria a ser imprescindible per a un altre mecanisme de migració, la locomoció, que seria utilitzada per les neurones en migració fins arribar a una determinada regió del còrtex on s'alliberarien de la glia i passarien a moure's mitjançant la translocació per arribar a la seva capa corresponent. En aquest context, si la Reelina fós un senyal necessari per a una translocació somal satisfactòria i no pas un senyal d'arrest, aquesta seria requerida per al mecanisme de translocació somal que té lloc en etapes primerenques i per a la que succeeix a la locomoció en etapes més tardanes del desenvolupament cortical. Entrant en detall en el mecanisme de translocació, el soma és precedit per un *leading process* que resta adherit a la MZ, de manera que el soma es va movent en direcció a la MZ i el *leading process* va esdevenint més curt i gruixut fins a desaparèixer en el moment que la neurona ha arribat al seva capa. La ràpida conversió que experimenten les cèl·lules migradores quan el *leading process* arriba a la MZ, en els casos en què les neurones estaven migrant per locomoció, fa pensar en l'existència d'un senyal a la MZ que induiria a la desconexió de la glia radial i la translocació. Una possible

explicació al fet que la Reelina aparegui en capes intermèdies durant el desenvolupament cortical seria que, en aquesta zona, la Reelina donaria el senyal d'alliberament de la glia radial per a induir el mecanisme de translocació. Relacionat també amb aquesta hipòtesi, la foliació relativament normal en les capes corticals inicials (MZ, SP i capa VI) observada en els mutants Cdk5/p35 podria ocórrer degut a què la locomoció, i no la translocació, fós un procés depenent de Cdk5/p35 (Nadarajah et al., 2001). Les neurones generades més tardanament se situarien en localitzacions anòmales degut o bé a les interaccions aberrants entre Cdk5/p35 i el citoesquelet (Dulabon et al., 2000; Pinto-Lord et al., 1982) que conduirien a una locomoció anormal o bé perquè la ruta de locomoció estaria obstruïda degut a interaccions cèl·lula-cèl·lula anormals (Kwon et al., 2000).

Donat l'elevat pes molecular i la multitud de dominis que conté la Reelina, és raonable de proposar que aquesta proteïna participi en processos múltiples i variats utilitzant, en cada cas, receptors diferents i, fins i tot, simultàniament. Tampoc es pot descartar la possibilitat que aquesta molècula actui indirectament en xarxes perineuronals, com a aglutinant o presentador d'altres senyals extracel·lulars necessàries per a la migració, i més encara després del descobriment recent que les molècules de Reelina s'uneixen entre elles per a formar un gran complex proteic, la formació del qual és inhibida per l'anticòs CR-50 evitant així la fosforilació de Dab1 (Utsunomiya-Tate et al., 2000). Alhora, les dades recents que demostren que la Reelina sofreix una proteòlisi parcial una vegada és secretada per les cèl·lules, donant lloc a fragments N-terminal de 250kDa i 180kDa tant *in vitro* i *in vivo* (D'Arcangelo et al., 1999; Lambert de Rouvroit., 1999) encara obren més possibilitats per a les diferents funcions que s'atribueixen a aquesta proteïna. Fins i tot, com succeeix en el cas de la proteïna Slit-2, els fragments generats podrien posseir funcions clarament contraposades fins al punt, com és el cas de Slit-2, que un dels dos fragments podria arribar a bloquejar l'activitat de l'altre (Brose and Tessier-Lavigne, 2000; Nguyen Ba-Charvet et al., comunicació personal). Estudis funcionals amb Reelina, encara no publicats (V. Borrell, L. Pujadas, J.A. del Río, E. Soriano), que s'han realitzat molt recentment en el nostre laboratori, semblen apuntar en aquesta direcció.

1.4. ALTRES POSSIBLES FUNCIONS DE LA REELINA EN EL DESENVOLUPAMENT NEURAL: CREIXEMENT AXONAL

D'acord amb l'estudi publicat per Schiffmann et al. (1997), existeix una falta de correlació entre algunes regions cerebrals que expressen reelina i les anomalies morfològiques descrites en els ratolins *reeler*. Per exemple, l'expressió de reelina és prominent a l'estriat, el septum i l'hipotàlem, regions en les quals estudis previs han fracassat alhora de trobar

alteracions citoarquitectòniques en el mutant de ratolí *reeler* (Caviness et al., 1988). Una explicació podria ser que les alteracions d'organització cel·lular en aquestes zones fossin massa subtils per a ser detectables. L'altra possibilitat seria que, en aquestes àrees, la Reelina exercís unes altres funcions diferents de les relacionades amb la migració cel·lular.

En aquest treball mostrem que, tant en els períodes embrionaris com en els estadis postnats primers, l'expressió de reelina es troba freqüentment associada a feixos d'axons en desenvolupament. Per exemple, hem detectat expressió en el límit tàlem dorsal/tàlem ventral (zona limitans intratalàmica), que donarà lloc a la làmina medul·lar externa i el tracte mamil·lotalàmic, i en el límit diencèfal/mesencèfal, que conté les neurones que promouran la formació de la commissura posterior (Mastick and Easter, 1996; Kitamura et al., 1997). D'una manera semblant, en el telencèfal, els transcrits de reelina estan presents a les cèl·lules situades en les rutes en desenvolupament relacionades amb l'olfacte, que inclouen el tracte olfatori lateral, la taenia tecta, el nucli basal de l'estria terminal i el fascicle longitudinal medial i també en l'àrea entopeduncular que forma la càpsula interna. Per tant, els patrons d'expressió descrits en el present estudi estan d'acord amb què la Reelina desenvolupi un paper en el creixement o guia axonal, tal i com ha estat proposat per altres proteïnes de matriu extracel·lular (Dorries et al., 1996; Gotz et al., 1996, 1997; Faissner et al., 1997). Pel que fa a creixement i guia axonal, recentment el nostre grup ha demostrat que la Reelina modula el desenvolupament d'algunes connexions hipocàmiques (Del Río et al., 1997; Borrell et al., 1999). Donat que aquestes es formen en els ratolins *reeler*, la Reelina sembla no ser essencial per al seu creixement, tot i que sí que regula la ramificació i extensió axonals i la sinaptogènesi. El que sí que s'ha observat és que les cèl·lules de CR hipocàmiques són un factor clau en la quimioatracció dels aferents entorrinals cap a l'hipocamp; no obstant, el procés no és dependent de Reelina de manera que la cèl·lules de CR han d'estar secretant algun factor difusible diferent de la Reelina capaç de provocar aquesta quimioatracció. Així, en l'establiment de les connexions entorrino-hipocàmiques, el paper de la Reelina se centraria en la terminació capa-específica dels aferents entorrinals, funcionant com a senyal de posició, indicant als axons que han arribat al seu destí i inhibint el seu creixement a partir d'aquell punt (Borrell et al., 1999). Un anàlisi detallat realitzat pel nostre grup del ratolí mutant *reeler*, tant a nivell de microscopia òptica com electrònica, ha permès veure que la Reelina és important per a l'establiment de contactes sinàptics (Del Río et al., 1996, 1997; Supèr et al., 1998b). En aquest sentit, diversos estudis recents realitzats amb animals adults mostren que, tant a les cèl·lules granulars del cerebel com a les interneurons corticals, la Reelina és transportada des del soma cel·lular cap als terminals axonals, on és secretada al medi extracel·lular. Tot i que aquesta secreció no es produeix mitjançant vesícules

sinàptiques, la Reelina sí que passa a acumular-se a les proximitats de les densitats post-sinàptiques de les espines dendrítiques, les quals pertanyen probablement a cèl·lules que expressen mDab1 (Impagnatiello et al., 1998; Pesold et al., 1998, 1999; Rodríguez et al., 2000). Un d'aquests treballs també demostra, mitjançant microscopia electrònica, que la Reelina és internalitzada en aquestes espines dendrítiques, i que allà colocalitza amb la subunitat $\alpha 3$ de la integrina. Aquests autors proposen que la Reelina és secretada pels terminals axònics i és reconeguda i internalitzada per les integrines localitzades a les espines dendrítiques. Seguidament, s'activa la fosforilació de Dab1 que modula l'expressió de proteïnes del citoesquelet, que en darrer terme controlen la plasticitat sinàptica (Rodríguez et al., 2000). Encara més, en un estudi en vies de publicació realitzat en col·laboració amb el nostre grup (Rice et al., 2001) es demostra que les proteïnes Reelina i Dab1 són importants per a la organització i funció fisiològica dels circuits sinàptics de les cèl·lules bastó de la retina.

1.5. L'EXPRESSIÓ DE REELINA EN NEURONES GABAÈRGIQUES DEL CÒRTEX CEREBRAL ADULT

Una troballa rellevant d'aquest estudi ha estat el fet que l'expressió de reelina continuï en el cervell anterior adult, suggerint la participació de la Reelina en altres funcions a part del desenvolupament neural. A l'hipocamp, l'expressió de reelina es restringeix a una subpoblació de neurones GABAèrgiques de circuit local, coincidint amb l'estudi de Pesold et al. (1998). Les interneurons GABAèrgiques corticals estan subdividides en un gran nombre de diferents tipus cel·lulars (de Felipe et al., 1993; Freund and Buzsáki, 1996; Cauli et al., 1997). En el nostre treball hem observat una manca de colocalització de reelina i parvalbúmina que ens indica que la reelina no està expressada en cèl·lules basquet ni cèl·lules canelobre. Contràriament, un percentatge significatiu, tot i que variable, d'interneurones immunoreactives per calbindina, calretinina i els neuropèptids NPY i somatostatina expressen reelina. Aquestes interneurons constitueixen una població bastant heterogènia, tot i que se sap que la majoria d'elles formen contactes sinàptics inhibidors en els dominis dendrítics de les neurones principals i, per tant, es creu que exerceixen un paper modulador en aquestes darreres.

Referent a les funcions de la Reelina en el còrtex cerebral adult, només en podem emetre hipòtesis especulatives. Algunes de les propietats de la Reelina esmentades amb anterioritat podrien ser vàlides també com a funció de la Reelina en l'edat adulta. Així, en un estudi realitzat per Celio i Blumcke (1994) s'ha observat que els cossos cel·lulars de determinades interneurons corticals estan recoberts d'una rica matriu extracel·lular que podria servir per ancorar molècules solubles com factors tròfics. És interessant d'esmentar que alguns factors

neurotròfics, com el NGF (factor neurotròfic neural) i el NT-3 (neurotrofina-3) es troben preferencialment expressats en interneurons GABAèrgiques en el córtex cerebral adult, i que subpoblacions d'aquestes neurones també expressen receptors per TrkB i TrkC (Marty et al., 1996; Rocamora et al., 1996). A més, cada vegada sembla més clar que la maquinària bioquímica responsable de la plasticitat sinàptica en interneurons GABAèrgiques és substancialment diferent a la de les cèl·lules piramidals (Maccaferri et al., 1998; Sik et al., 1998).

Així mateix, altres treballs que demostren l'existència de Reelina en terminals axònics i espines dendrítiques de les interneurons corticals d'animals adults indiquen que la Reelina també podria estar participant en la formació i/o estabilització de sinapsis o en plasticitat sinàptica de les neurones GABAèrgiques (Pesold et al., 1998, 1999; Rodríguez et al., 2000).

1.6. EXPRESSIÓ PERMANENT DEL mRNA DE REELINA EN EL BULB OLFACTORI

Una altra regió d'important expressió de reelina en l'adult és el bulb olfatori, el qual presenta senyal d'hibridació en les neurones mitrals i en algunes neurones periglomerulars. Se sap que les neurones olfactivas es generen durant el període postnatal i al llarg de tota la vida de l'animal. Recordem que els progenitors destinats al bulb olfatori estan situats a la SVZ telencefàlica caudal, de manera que les neurones migradores es mouen cap al bulb olfatori al llarg de la RMS (Luskin, 1993; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Jankovski and Sotelo, 1996; Wichterle et al., 1997). La manca d'expressió de reelina en aquesta ruta suggereix que aquesta migració és independent de Reelina, i això concordaria amb estudis que han demostrat la presència de cèl·lules granulars i neurones periglomerulars en el bulb olfatori de ratolins *reeler* (Caviness and Sidman, 1972). Amb tot, algunes d'aquestes neurones semblen erròniament situades en aquests mutants, suggerint que, en la darrera fase de la migració radial de les neurones destinades al bulb olfatori adult, la Reelina que s'expressa en aquesta zona estaria actuant localment.

El bulb olfatori adult també és un lloc d'elevat creixement sinàptic i remodelació degut al recanvi cel·lular neuroepitelial i a la reinnervació inherent als glomèruls. Per tant, és possible que la Reelina produïda per les neurones periglomerulars jugui un paper en el creixement axonal adult, sinaptogènesi i plasticitat.

A tall de resum, hem mostrat uns complexos patrons regionals i cel·lulars d'expressió de reelina en el cervell anterior de ratolí, que concorden amb què la Reelina exerceixi diferents papers en el desenvolupament neural. Addicionalment, la troballa que la reelina està expressada en una subpoblació de neurones GABAèrgiques de circuit local en el córtex cerebral adult

suggereix noves funcions per a la Reelina, que tot just comencen a ser esbrinades i que contribuirien al funcionament normal i a la plasticitat neural del cervell adult.

2. L'HORMONA TIROÏDEA EN LA MIGRACIÓ NEURONAL

Si la funció de la Reelina en el desenvolupament del sistema nerviós central encara no està prou establerta, encara menys ho estan els factors que regulen l'expressió d'aquesta proteïna. Tret del BDNF que, com ja he esmentat a la Introducció, regula a la baixa l'expressió de la reelina (Ringstedt et al., 1998), no s'ha pogut descobrir cap més factor que afecti els nivells de Reelina. Degut als ben sabuts defectes de migració neuronal que apareixen en casos d'hipotiroïdisme, hem analitzat si els nivells tant de proteïna com de transcrit de reelina es veuen afectats en un model experimental d'hipotiroïdisme en rata i, així mateix, també hem estudiat els nivells de la proteïna adaptadora Dab1 i del seu missatger. Els experiments realitzats *in vitro* i *in vivo* on hem afegit hormona tiroïdea en el medi de cultiu de seccions d'hipocamp d'animals hipotiroïdeus o directament l'hem administrada a rates hipotiroïdees, ens han acabat de confirmar que l'hormona tiroïdea és capaç de modificar els nivells de Reelina i del seu missatger.

2.1. L'HORMONA TIROÏDEA REGULA ELS NIVELLS D'EXPRESSIÓ DE REELINA

En aquest estudi hem mostrat que l'hormona tiroïdea, un agent conegut per l'ampli ventall d'accions reguladores que exerceix durant la maduració del cervell (Legrand, 1984; Dussault and Ruel, 1987; Porterfield and Hendrich, 1993), augmenta els nivells reelina, tant dels transcrits com de la proteïna. El mecanisme exacte d'actuació de T3, tant a nivell transcripcional com posttranscripcional, sobre l'expressió de reelina encara està per determinar. L'únic que podem suggerir és que la manca d'una correlació estricta entre els canvis en els nivells de mRNA i de proteïna podria estar indicant que l'expressió de reelina està regulada a diversos nivells, potser per l'hormona tiroïdea. A més, com que l'efecte de l'hormona tiroïdea presenta moltes diferències en funció de la regió cerebral que s'estudiï, pensem que T3 podria estar cooperant amb factors locals, o bé que la seva acció podria estar modulada per proteïnes específiques de regió o de cèl·lula. El fet que el BDNF reguli negativament l'expressió de reelina en les cèl·lules de CR del córtex cerebral (Ringstedt et al., 1998) també ens suggereix que l'efecte de l'hormona tiroïdea sobre l'expressió de reelina podria estar regulada a través del control de l'expressió de BDNF, no obstant també podria succeir que l'efecte de l'hormona fós directe. Estudis previs han indicat que l'expressió de BDNF, mesurada per assatjos de protecció

de RNA, es veu disminuïda des de P15 en endavant en el cerebel de rates hipotiroïdes (Neveu and Arenas,1996) i, malgrat tot, els nivells en el córtex i l'hipocamp romanen constants (Alvarez-Dolado et al., 1994). Per tant, l'augment de l'expressió de reelina en el cerebel a P5-P15 podria ser secundari a la modulació dels nivells de BDNF en aquesta regió.

Hem mostrat, també, que el nombre de cèl·lules Reelina-positives i la intensitat de marcatge per cèl·lula es veuen reduïts en rates hipotiroïdes. Amb tot, no podem assegurar que el nombre de cèl·lules de CR estigui afectat perquè no es coneixen marcadors cel·lulars per a la població sencera de cèl·lules de CR en el córtex de la rata. Tot i que la calretinina sembla marcar tota la població de cèl·lules CR en ratolí, en la rata, els anticossos contra diferents proteïnes d'unió a calci, incloent la calretinina i la calbindina, només són capaços de marcar subpoblacions de cèl·lules de CR (Meyer et al., 1998). Quan es tractaren cultius de seccions d'hipocamp de rates hipotiroïdes noutates (que mostraven un nombre reduït de cèl·lules Reelina-positives) amb T3 *in vitro*, el nombre de cèl·lules de CR Reelina-positives augmentà dràsticament, tot suggerint que l'hipotiroïdisme no afecta el nombre de cèl·lules de CR. Aquest fet indicaria que les cèl·lules estaven presents a P0, però no mostraven nivells d'expressió detectables. Així, tot i que no podem descartar la possibilitat que la manca d'hormona tiroïdea pugui afectar al nombre de cèl·lules de CR o a la seva viabilitat, aquestes dades semblen suggerir que el nombre de cèl·lules de CR no està alterat en l'hipotiroïdisme.

2.2. L'HORMONA TIROÏDEA AFECTA DIRECTAMENT O INDIRECTA ELS NIVELLS DE PROTEÏNA DAB1

Es interessant d'adonar-se que, contràriament al comportament de la Reelina, els nivells de mRNA de dab1 no es veuen afectats en l'hipotiroïdisme. Amb tot, sí que es modifiquen els nivells de proteïna Dab1 en les rates deficientes en hormona tiroïdea. Aquest efecte podria ser causat per una acció directa de T3 sobre la traducció del mRNA de dab1 o sobre l'estabilitat de la proteïna Dab1. Alternativament, els canvis en el contingut de proteïna Dab1 podrien ser una conseqüència indirecta de la reducció de l'expressió de reelina per la manca d'hormona. De fet, el mutant de ratolí *reeler* mostra nivells de mRNA de dab1 normals, mentre que els nivells de proteïna Dab1 es veuen augmentats (Rice et al., 1998).

La possibilitat que l'hormona tiroïdea controli inicialment els nivells de Dab1 i, com a conseqüència, s'afectin l'expressió del mRNA de reelina i de la seva proteïna no es pot descartar, tot i que no sembla gaire probable ja que l'expressió de Reelina no es veu alterada en mutants de ratolí com *scrambler* i *yotari* (Yoneshima et al., 1997; Rice et al., 1998) i l'expressió del mRNA de dab1 no varia en les rates hipotiroïdes. Donat que tant la Reelina com Dab1 són proteïnes de

rellevant importància per a la migració neuronal, sembla congruent que la profunda alteració dels seus nivells pugui ser la causa de les anomalies observades en el cervell hipotiroïdeu.

2.3. L'HORMONA TIROÏDEA CONTROLA LA MIGRACIÓ NEURONAL A TRAVÉS DE LA REGULACIÓ DELS NIVELLS DE REELINA

Diferents estudis han mostrat defectes de migració en diverses regions del cervell hipotiroïdeu com el cerebel, el córtex, l'hipocamp, l'estriat o el bulb olfactori (Lauder, 1979; Mariani et al., 1977; Legrand, 1984; Miyata et al., 1997; Berbel et al., 1993; Lucio et al., 1997; Martínez-Galán et al., 1997; Patel et al., 1976; Lu and Brown, 1977), els quals es poden correlacionar amb la reducció del contingut de Reelina durant el període perinatal del cervell hipotiroïdeu. Hem esmentat, no obstant que la migració neuronal cerebral s'havia considerat tradicionalment no alterada en l'hipotiroïdisme, possiblement pel fet que aquest procés finalitza majoritàriament abans del naixement, i també pel presupòsit que el cervell fetal és insensible a l'hormona tiroïdea (Schwartz et al., 1997). L'expressió anormal de reelina en edats properes al naixement és un argument en contra de la suposada resistència a l'hormona tiroïdea del cervell fetal i indica, clarament, que la reelina és una de les primeres dianes d'acció de l'hormona tiroïdea durant el desenvolupament fetal tardà.

Aquest treball proporciona la primera demostració que l'hormona tiroïdea regula l'expressió de reelina, un gen implicat en el control de la migració neuronal. Treballs anteriors a aquest, han descrit canvis en l'expressió de gens implicats en l'adhesió cel·lular, com la tenascina-C i la molècula d'adhesió cel·lular neural (NCAM), que podrien estar contribuint a les alteracions de la migració cel·lular (Iglesias et al., 1996; Alvarez-Dolado et al., 1998) i, més recentment, també s'ha descrit que altres conegudes molècules d'adhesió, com la L1 i la Laminina o el glicolípid CD15 (localitzat tant en neurones com en astròcits del cervell en desenvolupament) també presenten nivells alterats en animals hipotiroïdeus (Farwell and Dubord-Tomasetti, 1999; Sajdel-Sulkowska and Koibuchi, 2000; Alvarez-Dolado et al., 2000). La complexitat dels processos responsables de la migració cel·lular (els canvis dinàmics en el citoesquelet i en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu, el moviment actiu o la degradació de la matriu extracel·lular) suggereix l'existència de múltiples llocs de possible regulació. D'entre tots ells, i donat el dramàtic fenotip que causa la seva absència, la Reelina sembla jugar un paper de rellevant importància. La troballa que l'hormona tiroïdea influencia l'expressió de reelina suggereix un mecanisme molecular que podria ser fonamental per a entendre les alteracions que tenen lloc en el cervell hipotiroïdeu durant el desenvolupament.

Recordem també l'existència d'altres mutants de ratolí, com els mancats dels gens *cdk5* o *p35*, que presenten deficiències en la migració que provoquen la desorganització de la laminació cortical normal (Ohshima et al., 1996; Chae et al., 1997; Kwon and Tsai, 1998). Tot i que el patró d'alteracions del cervell d'aquests ratolins suggereix que *Cdk5/p35* i la Reelina probablement actuen a través de rutes de senyalització diferents, com ja s'ha començat a fer palès en estudis molt recents on s'apunta més aviat cap a una contribució sinèrgica entre *Cdk5/p35* i Reelina/*Dab1* (Ohshima et al., 2001), creiem que seria interessant d'analitzar si *p35/cdk5* es troben també sota el control de l'hormona tiroïdea.

3. LA NETRINA-1 EN EL DESENVOLUPAMENT DEL CEREBEL I NUCLIS PRECEREBEL·LOSOS

D'una manera semblant a la Reelina, implicada tant en processos de migració neuronal com de guia axonal, a la Netrina-1 també se li han associat ambdues funcions. Diversos estudis comencen a fer cada vegada més palès que els senyals que governen el creixement axonal també poden estar implicats en guia axonal (Culotti and Kolodkin, 1996; Goodman 1996; Hu and Rutishauser, 1996; Tessier-Lavigne and Goodman 1996). A diferència de la Reelina, no obstant, a la Netrina-1 se li han atribuït funcions en la guia axonal més que no pas en la migració neuronal, i són pocs els estudis funcionals que s'han realitzat per tal d'esbrinar el seu possible paper en aquest darrer procés (Livesey and Hunt 1997; Sim et al., 1999). En aquest estudi, hem realitzat assatjos *in vitro* per a veure l'efecte de la proteïna Netrina-1 sobre explants extrets de la zona germinal que donarà lloc al cerebel i als nuclis precerebel·lars i així estudiar la influència d'aquesta proteïna en la migració dels progenitors continguts en aquesta zona.

3.1. LA NETRINA-1 ÉS UNA MOLÈCULA DE SENYALITZACIÓ PER LA MIGRACIÓ DE LES NEURONES DESTINADES AL NUCLI PONTÍ

En una primera aproximació, hem intentat esbrinar el paper de la Netrina-1 en la migració de les neurones precerebel·lars mitjançant el cultiu d'explants extrets del IRL durant els estadis E12-E14. Tot i que no podem descartar la possibilitat que els nostres explants puguin contenir algunes neurones olivars, els diversos arguments que esmentarem a continuació indiquen que hem monitoritzat la migració de les neurones destinades als nuclis precerebel·lars pontins. En primer lloc, tot i que algunes cèl·lules olivars es generen d'una manera tardana a E12 en la IRL, aquest estadi contribueix majoritàriament a la generació de neurones precerebel·lars destinades al ECN, al LRN i al nucli rafe (Taber-Pierce, 1966; Bourrat and Sotelo, 1988; Altman and Bayer, 1997). A E14 les úniques neurones que es generen són les destinades als

nuclis pontins (Taber-Pierce, 1966; Altman and Bayer, 1997). En segon lloc, durant la formació del sistema precerebel·lar, la glicoproteïna de superfície TAG-1/Axonina1 està fortament expressada al llarg de la via de migració extramural que conté les neurones destinades als nuclis ECN, LRN i nuclis pontins, però no al llarg la via de migració intramural seguida per les neurones olivars migradores (Wolfer et al., 1994), fet que concorda amb les dades que hem mostrat en què s'observa que les neurones que responen a Netrina-1 presenten una forta immunotinció per TAG-1. Per tant, concloem que els explants de IRL seleccionats en els nostres experiments corresponen al neuroepiteli precerebel·lar que dona lloc als nuclis ECN i LRN a E12, i al BP a E14 (Taber-Pierce, 1966).

L'anàlisi dels nuclis precerebel·lars en ratolins deficients per l'expressió de Netrina-1 ha revelat la manca de neurones en el BP (Serafini et al., 1996) i també que menys d'un 14% de les neurones de la IO assoleixen la seva posició ventromedial (Bloch-Gallego et al., 1999). No obstant, l'origen d'aquestes deficiències resta desconegut. Les nostres dades suggereixen que la Netrina-1 actua com quimioatracient de llarg abast per les neurones migradores dels nuclis pontins representant, juntament amb un estudi paral·lel de Yee i col·laboradors (1999), la primera evidència en què s'implica la Netrina-1 en la guia de neurones en migració. Els nostres experiments indueixen a pensar que l'absència de nuclis pontins en els ratolins hipomòrfics per la Netrina-1 reflecteix directament una migració neuronal anòmala des de la IRL causada per la manca de Netrina-1. Donat que el ratolí *knockout* per *dcc* comparteix defectes similars en les estructures pontines (Fazeli et al., 1997), és probable que sigui aquest receptor el que està implicat en aquesta quimioatracció. A més, l'anàlisi de les neurones olivars inferiors de ratolins deficients per *netrina-1* afavoreix aquesta conclusió. La identificació d'aquestes neurones mitjançant l'expressió de *Brn-3b* (Bloch-Gallego et al., 1999) suggerí que l'atròfia de la IO era majoritàriament el resultat d'una migració alterada ja que les cèl·lules que expressaven *Brn-3b* estaven distribuïdes al llarg de la via migratòria intramural. Per tant, els nostres resultats, junt amb els relacionats amb la IO (Bloch-Gallego et al., 1999) i el treball de Yee i col·laboradors (1999), ens permeten de concloure que la Netrina-1 és una senyal essencial per la migració circumferencial de les neurones precerebel·lars.

No obstant, al fenotip mutant hi podrien contribuir altres mecanismes que impliquessin a la Netrina-1. Per exemple, el DCC podria induir apoptosi en absència de la unió al seu lligand, però bloquejar la mort cel·lular quan s'unís a Netrina-1 (Mehlen et al., 1998). Llavors, a mida que les primeres cèl·lules postmitòtiques de la IRL expressessin DCC, la interacció Netrina-1/DCC podria regular la supervivència de cèl·lules primerenques dels nuclis pontins (Cho and Fearon, 1995). A banda del fort efecte quimioattractiu observat en els nostres explants incubats

en medi condicionat amb Netrina-1, també veiem com aquest factor promou una sortida prominent de neurones migradores des del neuroepiteli, fins i tot en absència de gradients ben definits. Per tant, encara que les nostres troballes mostrin que la Netrina-1 actua com a una senyal quimioattractiva per la migració de les cèl·lules dels nuclis pontins al llarg de la via extramural anterior, tal com ocorre per al creixement dels axons que es dirigeixen ventralment (Kennedy et al., 1994; Shirasaki et al., 1995, 1996), no es pot descartar l'existència de mecanismes addicionals en l'acció de la Netrina-1 que podrien contribuir a la generació del fenotip del ratolí mutant per la netrina-1.

Les observacions descrites en aquest treball també mostren que la Netrina-1 indueix la formació de cadenes i fascicles gruixuts, tant de neurones migradores com de neurites, on les cèl·lules s'uneixen les unes a les altres d'una manera compacta. Aquest mecanisme de migració recorda a la neurofíllica que s'observa en les vies de migració extramural *in vivo* (Rakic, 1985; Ono and Kawamura, 1989, 1990) o en la ruta de migració rostral del bulb olfatori (Jankovski and Sotelo, 1996; Lois et al., 1996; Wichterle et al., 1997). En estudis previs s'havia demostrat la presència de TAG-1 en els axons en desenvolupament que responen a Netrina-1 (Placzek et al., 1990; Serafini et al., 1994; Wolfer et al., 1994; Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995; Guthrie and Pini, 1995; Tamada et al., 1995; Shirasaki et al., 1996) i s'havia hipotetitzat la participació de TAG-1 en la transducció dels senyals derivats de la *floor plate* (Shirasaki et al., 1996). En el present estudi hem pogut observar que els nivells de proteïna TAG-1 a les cèl·lules migradores es veien augmentats en presència de Netrina-1, essent aquesta la primera relació directa que es descriu entre l'expressió de TAG-1 i una proteïna de guia secretada per la *floor plate*. Se sap que TAG-1 estableix interaccions homofíllics en *trans* i interaccions heterofíllics amb altres IgCAMs, com F3 o L1, les quals provoquen canvis en l'adhesivitat i la fasciculació (Lemmon et al., 1989; Felsenfeld et al., 1994; Buttigione et al., 1998). Així doncs, TAG-1 podria estar contribuint a la formació de fascicles neurítics i, en concret, de cadenes de neurones pontines migradores, d'una manera similar a la participació del PSA-NCAM a la formació de cadenes neuronals en la ruta de migració rostral en el bulb olfatori (Hu et al., 1996).

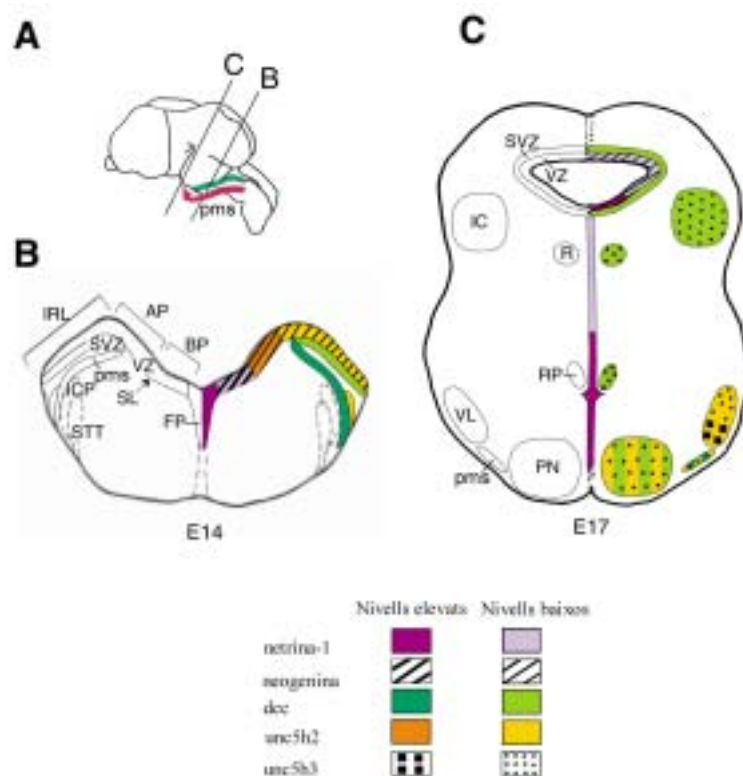
3.2. CORRELACIÓ DELS EFECTES DE LA NETRINA-1 AMB EL PATRÓ D'EXPRESSIÓ *IN VIVO*

El patró d'expressió dels trànscrips de la netrina-1 i dels seus receptors durant el desenvolupament primerenc dels nuclis pontins està esquematitzat a la Figura 45. Com he explicat en la Introducció, part de les neurones precerebel·lars originades en la IRL migren al llarg de la via extramural, atravessen la línia mitja i s'estableixen en els nuclis LRN i ECN

contralaterals al seu lloc d'origen. D'altra banda, el grup de cèl·lules que migraran per les vies intramural (neurons de la IO) i pontomedul·lar (neurons dels nuclis pontins), aniran a poblar els nuclis ipsilaterals al seu lloc d'origen sense haver d'atravessar la línia mitja (Taber-Pierce, 1966; Bourrat and Sotelo, 1990). Aquí mostrem que els progenitors de les cèl·lules que poblen els nuclis pontins expressen els RNAs missatgers dels receptors *unc5h2* i *neogenina* però no del *dcc*, mentre que les neurones postmitòtiques pontines localitzades al llarg de la ruta pontomedul·lar expressen exclusivament *dcc* a nivells elevats. Finalment, quan aquestes neurones finalitzen la seva migració circumferencial a prop de la línia mitja, tornen a expressar el mRNA d'*unc5h2* i també d'*unc5h3* a nivells baixos. D'altra banda, els trànscrips de *netrina-1* s'expressen per l'àrea de la línia mitja a prop de la regió diana (nuclis pontins), fet que suggereix que un gradient de *Netrina-1* generat en aquesta zona podria ser el responsable de la migració unidireccional de les neurones cap als nuclis precerebel·lars. Així, el patró d'expressió de receptors *in vivo* és consistent amb el punt de vista actual sobre el DCC, considerat un component del complex receptor que mediatitza les respostes quimioattractives a la *Netrina-1* al llarg de la ruta migratòria. A més, la reexpressió dels trànscrips d'*unc5h2* i *unc5h3* quan les neurones migradores s'apropen a la regió diana suggereix que aquests receptors podrien evitar que aquestes neurones creuessin la línia mitja, de manera que la *Netrina-1* estaria actuant de senyal d'arrest, d'una manera anàloga a la proposada per les neurones olivars (Bloch-Gallego et al., 1999).

No obstant, també apareixen trànscrips de *netrina-1* a la regió de la *floor plate* a prop del neuroepiteli precerebel·lar, per tant han d'existir mecanismes addicionals que evitin que les neurones postmitòtiques joves migrin cap a aquesta font de *Netrina-1*. Els possibles mecanismes podrien incloure el segrest de la *Netrina-1* mitjançant l'associació amb la matriu extracel·lular o amb receptors com la *neogenina* (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994; Keino-Masu et al., 1996) que es troben altament expressats a prop de la zona d'expressió de *Netrina-1*, o bé la presència d'un substrat no permissiu per la migració neuronal en aquesta àrea del tronc de l'encèfal.

Figura 45



Dibuixos esquemàtics il·lustrant la via migratòria pontomedul·lar en relació amb la **distribució espacio-temporal del mRNA de netrina-1 i dels seus receptors**. A) **Vista dorso-lateral d'un cervell** de E14-E17 mostrant la localització de la via migratòria pontomedul·lar en **verd** i el nivell de les seccions que apareixen a B i C. La **fletxa** a A indica la direcció caudo-rostral de la migració pontina. B) Esquema d'una secció coronal a E14 il·lustrant la distribució de netrina-1 i dels seus receptors a l'origen de la via migratòria pontomedul·lar (**pms**). Noteu que la pms només expressa dcc i que les àrees de baixa expressió de unc5h2 i neogenina envolten aquesta ruta de migració. C) Esquema d'una secció coronal a nivell del cervell mitjà i del pons a E17 mostrant el destí de les neurones que migren al llarg de la pms cap als nuclis pontins. Les neurones pontines comencen a expressar els receptors unc5h2 i unc5h3 i regulen a la baixa l'expressió de dcc al final de la seva migració. **AP**, placa alar; **BP**, placa basal; **FP**, *floor plate*; **IC**, col·licle inferior; **ICP**, peduncle cerebel·lar inferior; **IRL**, llavi ròmbic inferior; **pms**, via migratòria pontomedul·lar; **PN**, nuclis pontins; **R**, nucli vermell; **RP**, nucli de rafe; **SL**, sulcus limitans; **STT**, tracte espinal trigemin; **SVZ**, zona subventricular; **VL**, nuclis del lemnisc ventral; **VZ**, zona ventricular.

3.3. LA QUIMIOREPLUSIÓ QUE EXERCEIX LA NETRINA-1 SOBRE ELS PROGENITORS DE LES CÈL·LULES GRANULARS I ELS SEUS AXONS ÉS DEPENDENT DE L'EDAT

Recordem que, durant el desenvolupament embrionari, els progenitors de les cèl·lules granulars es generen a la uRL i migren tangencialment per la superfície del primordi cerebel·lar per a formar la EGL, on entraran altra vegada en el cicle de mitosi. Les dades que presentem amb explants de uRL a E14 mostren que els progenitors embrionaris de les cèl·lules granulars no responen a Netrina-1, tot i que expressin els gens dels receptors DCC i Neogenina. Aquestes dades s'adiuen amb les observacions fetes en cerebel de ratolins noutats deficientes en netrina-1 que mostren una gairebé intacta EGL (Bloch-Gallego et al., 1999). Donat que no s'expressen trànscrips de netrina-1 en el primordi cerebel·lar en estadis embrionaris primerencs, el fet que els progenitors de cèl·lules granulars derivats de la uRL presentin missatgers de dcc podria estar indicant una acció d'aquest receptor independent de la Netrina-1. S'ha suggerit que els progenitors de les cèl·lules granulars migren al llarg de feixos d'axons pre-existents (Hynes et al., 1986). En estadis embrionaris, la superfície dorsal del primordi cerebel·lar està atravesada per axons positius per DCC que se solapen i corren en paral·lel amb els progenitors de les cèl·lules granulars en migració (Fig. 44D). Tal i com succeeix amb d'altres IgCAMs com L1 o NCAM (revisió: Walsh and Doherty, 1997), les interaccions de DCC homofílques en *trans* entre axons i neurones podrien contribuir a la migració tangencial dels precursors embrionaris de les cèl·lules granulars.

D'altra banda, els mutants nuls per *unc5h3* semblen indicar que el receptor *Unc5h3* transdueix una senyal quimiorepulsiva que impedeix que els progenitors de cèl·lules granulars que migren tangencialment sobrepassin els límits cerebel·lars (Przyborski et al., 1998). Aquestes dades observades *in vivo* i els nostres resultats negatius de resposta a Netrina-1 *in vitro* en estadis embrionaris primerencs suggereixen que els receptors *Unc5h3* podrien estar unint altres lligands, tal i com s'ha postulat per *Caenorhabditis elegans* (Colavita et al., 1998). Publicacions recents (Wu et al., 1999; Hu 1999) han mostrat que els progenitors neuronals que migren tangencialment per la RMS i les neurones GABAèrgiques provinents de la MGE que poblaran el córtex cerebral podrien estar guiades per factors repulsius de llarg abast, les proteïnes Slit. Aquests resultats, junt amb els presentats aquí per les neurones precerebel·lars, suggereixen clarament que els mecanismes quimiotàctics exerceixen un efecte de guia en les neurones que migren tangencialment. Donat que no hem observat efectes quimiotròpics de la Netrina-1 sobre els progenitors de cèl·lules granulars, seria interessant de determinar si altres factors difusibles, com les proteïnes Slit, els estan guiant.

A P0, les cèl·lules granulars postmitòtiques inicien el descens cap a la part profunda de la EGL i extenen els seus axons, les fibres paral·leles (Ramón y Cajal, 1911; Miale and Sidman, 1961). Llavors, els somes de les cèl·lules granulars s'orienten perpendicularment als axons i migren radialment a través de la capa molecular, unides a la glia de Bergmann, per a formar la IGL (Rakic 1971a, 1981, 1985; Hatten and Liem, 1981). Les dades presentades mostren que la Netrina-1 exerceix un fort efecte quimiorepulsiu sobre els axons que creixen d'explants de EGL postnatal, els quals s'han identificat com a fibres paral·leles degut a la seva immunoreactivitat per les proteïnes L1 i TAG-1 (Persohn and Schachner, 1987; Yamamoto et al., 1990). Hem observat que aquest efecte quimiorepulsiu depèn de l'edat, essent més intens a P5 que a P0, període que coincideix amb el de formació de fibres *in vivo* (Altman and Bayer, 1997). Com que en el cerebel postnatal, els transcrits de netrina-1 es troben a la EGL i en interneurons de la ML, nosaltres suggerim que la Netrina-1 contribueix a iniciar una correcta extensió de fibres paral·leles, fet que podria ser un requisit per la sortida ordenada de les cèl·lules granulars premigratòries postmitòtiques de la EGL (Engelkamp et al., 1999). Així, la coexpressió dels gens dels receptors dcc, unc5h2 i unc5h3 que trobem en els precursors de les cèl·lules granulars així com en cèl·lules granulars postmitòtiques quadraria amb l'actual hipòtesi que sosté que es requereix la coparticipació dels receptors DCC i dels Unc5 perquè la Netrina-1 exerceixi una resposta quimiorepulsiva (Hong et al., 1999).

A més dels axons, també observem neurones en migració, identificades com a cèl·lules granulars per la seva immunotinció amb anticossos contra L1 i TAG-1, que abandonen els explants pels quadrants distals a la font de Netrina-1. Creiem que aquesta observació reflecteix una acció de la Netrina-1 sobre les neurones en migració per les següents raons. La primera és que només s'observen els cossos cel·lulars de les cèl·lules granulars en els quadrants distals fora de l'explant, però no en els quadrants proximals on els axons de les cèl·lules granulars també creixen, fet que exclou la possibilitat que les cèl·lules en migració es moguin passivament per les fibres paral·leles. En segon lloc, la malformació cerebel·lar rostral, fruit de la disrupció del gen unc5h3, comporta una migració i localització de les cèl·lules granulars anòmales, fet que podria implicar la Netrina-1 en la migració cerebel·lar senyalitzant a través del receptor Unc5h3, en estadis postnatals primerencs. La tercera raó és que els receptors unc5h2 i unc5h3 es troben expressats a nivells elevats en els cossos cel·lulars de les cèl·lules granulars premigratòries. A més, com que les fibres de Bergmann no surten dels explants i les cèl·lules granulars migren al llarg de fascicles de les fibres TAG-1-positives que pertanyen a les fibres paral·leles, interpretem que la migració no-gliofílica observada *in vitro* imita la migració tangencial de les cèl·lules granulars per les zones profundes de la EGL just abans de la seva migració radial cap a l'interior

(Ryder and Cepko, 1994) i que, aquesta migració tangencial, es troba sota el control de la Netrina-1 i els seus receptors.

Recentment, un estudi realitzat amb ratolins quimèrics mutants pel gen *unc5h3* ha establert que les cèl·lules granulars serien el tipus cel·lular clau per l'establiment dels límits cerebel·lars. Així, tot i que la malformació cerebel·lar rostral es caracteritzi per migracions ectòpiques tant per part de les cèl·lules de Purkinje com de les granulars (Przyborski et al., 1998) i que el gen *unc5h3* es trobi expressat en ambdós tipus cel·lulars, la diana primària de la mutació serien les cèl·lules granulars i, per tant, serien aquestes les responsables del manteniment de les fronteres cerebel·lars (Goldowitz et al., 2000), fet que implicaria indirectament a la Netrina-1 en el manteniment d'aquests límits. Recentment, s'ha trobat un altre gen implicat directament en la migració de les cèl·lules granulars. Es tracta del gangliòsid 9-O-acetil GD3, el bloqueig del qual impedeix la migració granular gliofílica cap a l'interior cerebel·lar d'una manera dosi-dependent (Santiago et al., 2001). Es de destacar que aquest gangliòsid també s'ha relacionat amb la migració tangencial neurofílica que té lloc en la RMS (Miyakoshi et al., 2001).

3.4. LA NETRINA-1 ESTÀ IMPLICADA EN EL CREIXEMENT AXONAL I LA MIGRACIÓ NEURONAL

En aquest estudi hem demostrat que la Netrina-1 està implicada en el creixement i reconeixement de dianes dels circuits cerebel·lars intrínsecs, els quals són independents de la línia mitja, proporcionant un senyal quimiorepulsiu per les fibres paral·leles en desenvolupament. Així, conjuntament amb treballs previs realitzats en fibres corticofugals (Métin et al., 1997; Richards et al., 1997) i anàlisis duts a terme al nostre laboratori amb ratolins deficientes per Netrina-1 que mostren un desenvolupament aberrant dels circuits hipocàmpics i una activitat neuronal alterada en aquests animals (Barallobre et al., 2000), les nostres dades indiquen que la Netrina-1 també està implicada en la guia d'algunes projeccions ipsilaterals i en la selecció de la capa diana. Confirmant aquestes funcions per a la Netrina-1, dos estudis recents han demostrat la importància de la Netrina-1 en la guia de la projecció talamocortical i en el creixement axonal de les neurones del nucli habenular (en aquest darrer cas, a més, s'ha demostrat una cooperació entre la Semaforina 3F i la Netrina-1) (Braisted et al., 2000; Funato et al., 2000).

4. MECANISMES DE MIGRACIÓ NEURONAL

En termes generals, hem pogut observar que el procés de migració es podria desglossar en tres etapes en què hi intervindran diverses molècules de senyalització i adhesió. En la primera etapa, han d'existir molècules que s'encarreguin de dirigir el *leading process* en un determinat sentit. A mida que aquest avança integrant la informació de les senyals permissives, atractives, inhibidores o repulsives que va trobant pel camí, el nucli cel·lular es va desplaçant mitjançant la translocació o locomoció somals. Finalment, en la zona on s'ha de situar el neuroblast ha d'haver-hi una molècula que li indiqui que s'aturi.

En el cas del córtex, la migració és dirigida a la capa I, la translocació del nucli té lloc des de la VZ fins a aquesta capa i finalment existeix un senyal d'arrest que atura la migració. Si observem el que s'esdevé en les migracions circumferencials que donaran lloc al sistema precerebellar també existeix una migració unidireccional cap a la *floor plate*, la translocació dels nuclis des del llavi ròmbic per les vies extramurals i intramurals i finalment l'arrest a la zona d'arribada que, en aquest cas, consta de diversos nuclis.

El paper de la Netrina-1 com a quimioattractant o quimiorepellent axonal ha estat àmpliament documentat (revisat en Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Respecte l'efecte de la Netrina-1 en la migració neuronal, els resultats d'aquest estudi juntament amb estudis previs (Yee et al., 1999; Bloch-Gallego et al., 1999) mostren que la Netrina-1 funciona de senyal quimioattractant per al *leading process* de la neurona en migració i alhora també de senyal d'arrest impedit que la neurona, una vegada arribada a la línia mitja, la creui. Amb tot, la Netrina-1, probablement no és l'única molècula implicada en aquestes migracions per tres motius. Primer, en ratolins *knock-out* per netrina-1 i dcc les migracions circumferencials tenen lloc parcialment fins que el *leading process* arriba al límit ventrolateral del cervell posterior. Segon, aquests mateixos mutants, l'absència de Netrina-1 o DCC no impedeix el moviment al llarg de l'eix anteroposterior. Tercer, al llarg de la migració circumferencial, les cèl·lules es mantenen fasciculades i en la zona parenquimal o subpial, de manera que hi ha d'haver implicades molècules d'adhesió i senyals que restringeixin la migració en aquestes zones. Pel que fa a la translocació nuclear, sí que és improbable que en sigui responsable la Netrina-1, ja que aquest procés ocorre fins i tot en experiments de bloqueig de l'acció de Netrina-1 (Yee et al., 1999).

Del nostre estudi es desprèn, doncs, que la Netrina-1 exerceix una influència quimioattractiva sobre les neurones precerebellars migradores al llarg de la via extramural circumferencial, fa que augmentin els nivells de proteïna TAG-1 podent, així, estar induint la

seva fasciculació i migració en cadenes i també realitza una acció quimiorepulsiva sobre la migració de les cèl·lules granulars. Aquestes dades, conjuntament amb estudis previs focalitzats en el nucli olivar (Bloch-Gallego et al., 1999) i en el pont basilar (Yee et al., 1999), mostren un nou paper per a la Netrina-1 en la migració neuronal, que, així com en el creixement axonal, pot ser tant quimioattractiu com quimiorepulsiu. Així, de manera semblant a altres molècules que intervénen en la migració neuronal i el creixement axonal, com la ja estudiada Reelina, la Semaforina III o bé les proteïnes Slit (D'Arcangelo et al., 1995; Del Río et al., 1997; Eickholt et al., 1999; Hu et al., 1999; Wu et al., 1999; Zhu et al., 1999), és probable que la Netrina-1 realitzi un paper dual en la construcció de les xarxes neurals i en la guia de les neurones en migració cap als seus nuclis i capes diana. De fet, la idea proposada per Singer i Kupfer (1986) que hipotetitza que l'extensió axonal és una forma de migració cel·lular en què el soma cel·lular roman quiet, comença a guanyar adeptes a partir d'aquests descobriments que estan implicant a molècules relacionades amb la guia axonal, també en la migració neuronal.

Tot i que al llarg de l'estudi s'ha considerat que el DCC és el receptor que transduiria un senyal quimioattractiu per a la Netrina-1, en cas que no es coexpressi amb cap dels receptors de la família unc5, no s'ha pogut demostrar una interacció directa entre ambdues proteïnes (Meyerhardt et al., 1999) i això suggeriria l'existència d'altres receptors o co-receptors. Efectivament, s'ha demostrat que la funció promotora del creixement axonal duta a terme per la Netrina-1 requeriria la unió a un receptor complex format per DCC i A2b, un receptor d'adenosina associat a membrana (Corset et al., 2000). Es tracta d'un receptor acoblat a proteïnes G que indueix l'acumulació de cAMP quan uneix adenosina (Feoktistov and Biaggioni, 1997). Ja se sabia que l'atracció mitjançada per la Netrina-1 estava modulada per la concentració intracel·lular de cAMP (Ming et al., 1997) i que la Netrina-1 induïa un augment de cAMP en els conus de creixement que responien a ella (Hopker et al., 1999), per tant, el fet que A2b pugui ser un receptor per a la Netrina-1 és la primera connexió que es realitza entre el senyal de guia extracel·lular Netrina-1 i l'acumulació intracel·lular de cAMP (Corset et al., 2000).

Pel que fa a la Reelina, no existeix cap demostració funcional concloent que expliciti el paper d'aquesta proteïna en la migració i només es poden emetre hipòtesis. Una d'elles defensa una acció quimioattractiva de la Reelina sobre de les neurones corticals en migració. No obstant, segons els estudis realitzats fins ara no existeix cap experiment determinant pel qual la Reelina desenvolupi aquest paper. Sabem que, en experiments en cultiu, les cèl·lules de CR són quimioattractives per les cèl·lules granulars cerebel·lars migradores (Soriano et al., 1997), tanmateix, considerant que l'acció reguladora del fenotip de glia radial per part de les cèl·lules

de CR és independent de Reelina, podria ser que aquesta suposada atracció també fós un procés Reelina-independent (Pinto-Lord et al., 1982; Hunter and Hatten, 1995; Hunter-Schaedle, 1997; Soriano et al., 1997; Supèr et al., 2000). D'altra banda, la funció més atribuïda a la Reelina ha estat la d'arrest de les neurones corticals, juntament amb una funció inhibidora del creixement dendrític i promotora de la diferenciació neuronal postmigratòria (Ogawa et al., 1995; Frotscher, 1997). Existeixen, però, dos arguments en contra de la hipòtesi de l'arrest neuronal. Primer, la Reelina també s'expressa a capes corticals intermèdies i no suposa cap impediment per a la migració de les neurones que aniran a poblar les capes altes del córtex; segon, en experiments realitzats *in vitro* en etapes de neurogènesi tardana del hamster s'ha constatat que la Reelina expressada a la zona marginal no impedeix la sortida dels precursors neuronals i de la glia fora dels límits del teixit (Hedin-Pereira et al., 2001). Podria ser, com ja he assenyalat amb anterioritat, que aquesta funció d'arrest per part de la Reelina només tingués lloc en etapes primerenques del desenvolupament, quan encara no ha aparegut en capes intermèdies. A més, donat el recent descobriment de la proteòlisi que experimenta la Reelina (D'Arcangelo et al., 1999; Lambert de Rouvroit., 1999) es podria donar el cas que només un dels fragments, o la proteïna sencera, tinguessin la capacitat d'aturar la migració i fós el fragment que es troba a les capes intermèdies el mancat d'aquesta funció. Així, fins que no apareguin anticossos específics contra aquests fragments no podrem esbrinar si aquest és el cas. En darrer terme, queda la recent funció atribuïda a la Reelina provinent dels indicis de coexistència de dos tipus de migració radial durant el desenvolupament cortical (Nadarajah et al., 2001). En aquest cas s'ha especulat que la Reelina podria actuar de senyal per a que es pogués dur a terme la translocació somal, tant en les etapes primerenques del desenvolupament cortical, en què és l'únic tipus de migració que existeix, com en les etapes més tardanes, on s'ha observat un canvi sobtat de la morfologia de les neurones en migració que passen de moure's per locomoció a moure's per translocació. Una funció d'aquest tipus per a la Reelina permetria donar explicació a les observacions fetes en hamster on les neurones poden sobrepassar la capa I productora de Reelina (Hedin-Pereira et al., 2001) i també al fet que, en estadis avançats del desenvolupament cortical, la Reelina s'expressi a capes intermèdies i, no obstant, no suposi un atur per a la migració neuronal, sinó que, més aviat, podria estar induint a un canvi en el mecanisme de migració.

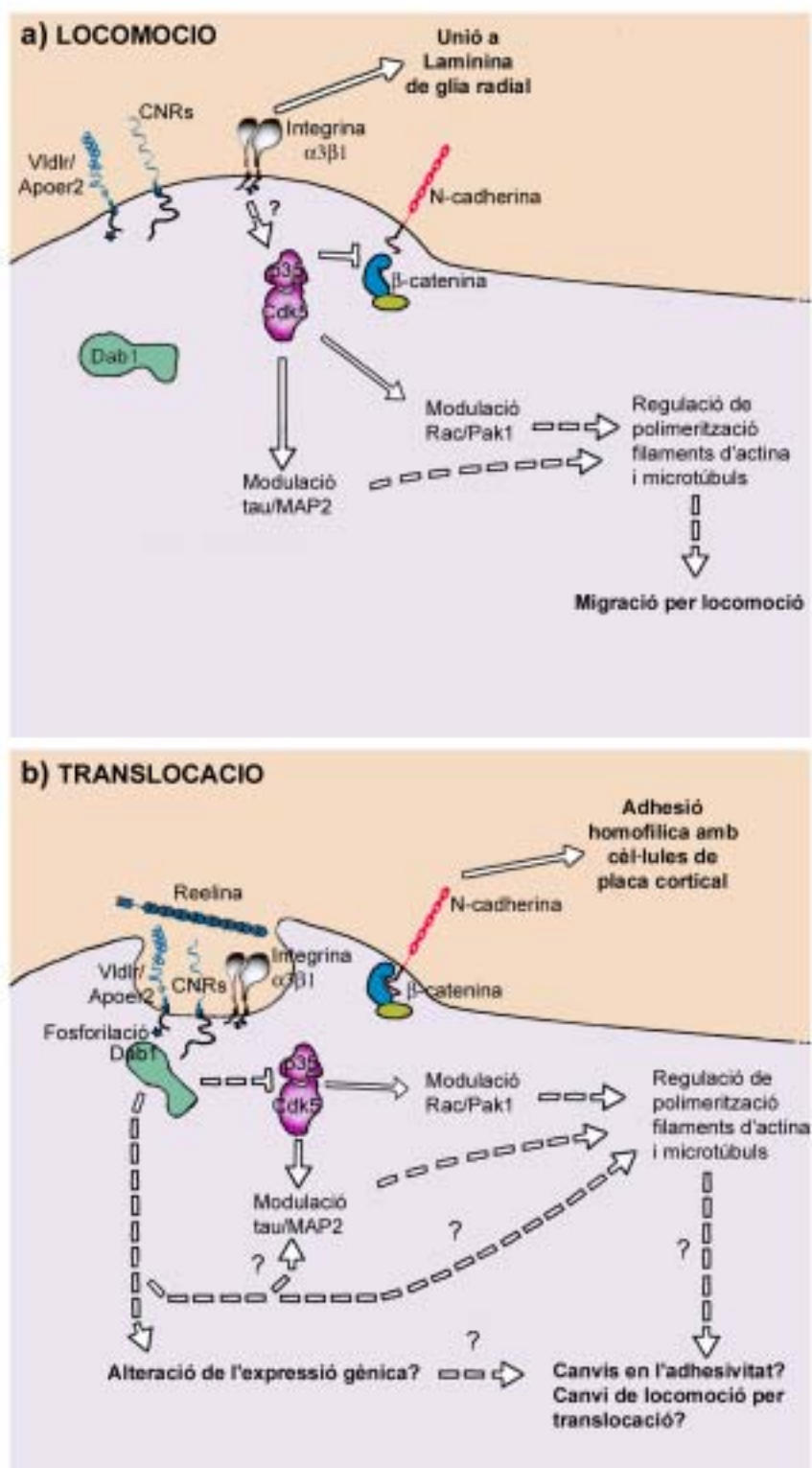
Referent al mecanisme de transducció de senyal de la Reelina proposat en la Introducció i relacionant-lo amb aquests dos tipus de migració, el fet que la inhibició de la integrina $\alpha3\beta1$ sigui suficient per a provocar que les neurones migradores s'alliberin de la glia radial (Dulabon et al., 2000) podria estar relacionat amb aquest canvi brusc de locomoció a translocació. Així, aquesta integrina seria la responsable de la locomoció, unint la neurona en migració a la

DISCUSSIÓ

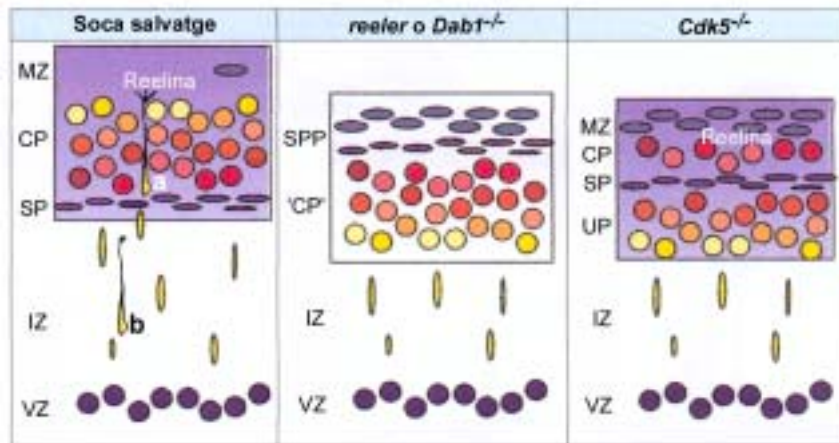
Laminina de la glia radial i, possiblement, cooperant amb d'altres molècules d'adhesió o de senyalització (Komuro and Rakic, 1998; Maeda and Noda, 1998). En interaccionar amb la Reelina, formaria un complex que inclouria també els receptors Vldlr/Apoer2 i les CNRs i que seria internalitzat, provocant una alteració de l'adhesió mitjançada per la integrina (D'Arcangelo et al., 1999). Tant el canvi d'afinitat de la integrina $\alpha3\beta1$ (de Laminina cap a Reelina) com la seva endocitosis induïda pel Vldlr, podrien ser la causa de la ràpida dissociació de la glia radial que pateixen les neurones migradores i del pas cap al mecanisme de translocació (Figura 46A,Bb). D'altra banda, s'ha suggerit que els grups de proteïnes Reelina/Dab1 i Cdk5/p35 que no actuen en la mateixa via de senyalització sinó que contribueixen sinèrgicament a la ubicació de diferents tipus de neurones corticals (Ohshima et al., 2001). A més, existeix la recent troballa que p35/Cdk5 regulen l'adhesió mitjançada per N-cadherines en les neurones corticals, de manera que l'activitat kinasa de Cdk5 disminueix l'adhesió cel·lular (Kwon et al., 2000). Sembla, doncs, que Reelina/Dab1 i p35/Cdk5 actuen per rutes paral·leles i, fins i tot, Homayouni i Curran (2000) han suggerit que la Reelina podria estar inhibint la ruta de transducció de senyal de Cdk5/p35, reactivant d'aquesta manera l'adhesió cel·lular mitjançada per les N-cadherines i induint el final de la migració i el començament de les unions homotípiques entre les cèl·lules arribades de nou i les residents a la placa cortical. A tall de resum, en una primera etapa del desenvolupament cortical només funcionaria la translocació i els mecanismes induïts per la Reelina i, en etapes posteriors, primer s'activaria la ruta de p35/Cdk5 que inhibiria l'adhesió mitjançada per les N-cadherines, donant lloc a la locomoció (Figura 46A,Ba). En aquesta hi intervindria la unió de la integrina $\alpha3\beta1$ amb la Laminina associada a la glia radial, però en arribar a la capa Reelina-positiva hi hauria un canvi d'afinitat, la integrina $\alpha3\beta1$ seria endocitada mitjançant el complex Vldlr/Apoer2 i les CNRs, s'activaria l'adhesió mitjançada per les N-cadherines i s'induiria el mecanisme de translocació. Aquesta hipòtesi explicaria les diferències observades entre els mutants *reeler/dab1^{-/-}* i *cdk5^{-/-}*, ja que els defectes en aquest darrer grup apareixen una vegada s'ha començat a formar la CP, mentre que els defectes en el primer apareixen alhora de formar-se aquesta capa (Figura 46A).

Figura 46

A



B



Dibuixos esquemàtics representant els dos tipus de migració que s'especula que tenen lloc en el córtex cerebral. A) Esquema integrador de les molècules que podrien estar implicades en la **locomoció** (a) i la **translocació** (b). B) Migració i organització de capes en un animal de soca salvatge, un ratolí *reeler*, o el mutant per al gen *dab1* (-/-), i un mutant per al gen *cdk5* (-/-). En el ratolí de soca salvatge (**esquerra**), onades successives de neurones en migració poblen la placa cortical (**CP**) seguint el típic gradient de dins cap enfora, separant la preplaca en la subplaca (**SP**) i la zona marginal (**MZ**). Les cèl·lules en migració estan representades per òvals grocs i en el lloc on s'aturen per a formar la placa cortical es mostren com a cercles colorejats. **a** i **b** corresponen a dues cèl·lules que experimenten els dos tipus de migració esquematitzats a A, representats també per **a** i **b**. En el mutant *reeler* o *dab1*^{-/-} (**centre**), les cèl·lules en migració són incapaces de separar la preplaca, que roman en forma d'una sola capa superficial, la "superplaca" (**SPP**). Les neurones s'apilen seguint un ordre invers respecte de la seva darrera divisió (indicat pel color de les cèl·lules). Val a dir que en els mutants per *dab1* es produeixen quantitats normals de Reelina. Els mutants *cdk5*^{-/-} (**dreta**) presenten un córtex cerebral amb diferències subtils respecte dels mutant *reeler* o *dab1*^{-/-}. Les primeres neurones emigrants de la zona ventricular (**VZ**) travessen la zona intermèdia (**IZ**), aconseguen separar la preplaca i es localitzen en una zona semblant al de les cèl·lules de la capa VI. No obstant, les darreres cèl·lules en arribar s'apilen d'una manera similar al *reeler* en una capa que s'ha anomenat "sotaplaca" (**UP**, *underplate*).

Modificat de Gilmore and Herrup 2000 i Homayouni and Curran 2000.

1. L'expressió del mRNA del gen *reelina* comença ja des d'estadis molt primerencs del desenvolupament neural, trobant-se freqüentment associada a feixos d'axons que comencen a desenvolupar-se i, en el cas del diencèfal, la seva expressió coincideix amb límits neuromèrics. Aquestes dades junt amb estudis molt recents suggereixen un paper de la *Reelina* en el creixement i guia axonal.
2. Les cèl·lules de Cajal-Retzius expressen *reelina* al llarg de tot el desenvolupament fins a la seva desaparició. Donat que, aproximadament, un 30% de les cèl·lules de Cajal-Retzius sobreviu en l'hipocamp adult, també es perllonga l'expressió de *reelina* en aquesta zona.
3. La troballa que, en l'edat adulta, la *reelina* s'expressa en una heterogènia població de neurones GABAèrgiques de circuit local del córtex i l'hipocamp, juntament amb una expressió permanent en el bulb olfactori i a les cèl·lules de Cajal-Retzius hipocàmiques suggereix la possibilitat de funcions noves per a la *Reelina*, en l'adult, diferents de les del desenvolupament.
4. L'hormona tiroïdea regula els nivells d'expressió de *reelina* i altera els nivells de proteïna *Dab1*. En ser ambdues molècules factors clau per a la migració neuronal, la seva alteració podria explicar els profunds defectes de migració observats en cervells hipotiroïdeus.
5. La *Netrina-1* actua com a quimioatracent de llarg abast per les neurones migradores dels nuclis pontins, fet que, unit a altres estudis, ens permet concloure que la *Netrina-1* és un senyal essencial per la migració circumferencial de les neurones precerebel·lars. A més, l'anàlisi dels patrons d'expressió dels receptors per *Netrina-1*, *dcc*, *unc5h2* i *unc5h3*, fa pensar en la implicació d'aquests en el procés de guia.
6. La *Netrina-1* indueix la formació de cadenes compactes de neurones migradores i fascicles gruixuts de neurites que recorden a la migració neurofíllica que es dona en les vies de migració extramural *in vivo*. Donat que els nivells de proteïna *TAG-1* d'aquestes cèl·lules augmenten en presència de *Netrina-1* sembla que *TAG-1* podria estar contribuint a l'adhesió.
7. A estadis embrionaris primerencs, la *Netrina-1* no afecta la migració dels progenitors de les cèl·lules granulars, i, per tant, no intervé en la migració tangencial que es dona inicialment per la superfície dorsal del primordi cerebel·lar. En canvi, sí que té un efecte quimiorepulsiu sobre les fibres paral·leles i la migració de les cèl·lules granulars postnatsals, suggerint que la migració tangencial no gliofíllica que té lloc per capes profundes de la EGL, abans de la migració cap a l'interior cerebel·lar, sí que és un procés dependent de *Netrina-1*.
8. Tant en la migració pontobulbar com en la tangencial no gliofíllica que es dona a capes profundes de la EGL, l'anàlisi dels patrons d'expressió dels receptors de *Netrina-1*, *dcc*, *unc5h2* i *unc5h3*, fa pensar en la implicació d'aquests en el procés de guia.

- Ackerman S**, Kozak LP, Przyborski SA, Rund LA, Boyer BB, Knowles BB (1997) The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an unc-5-like protein. *Nature* 386, 838-842.
- Alder J**, Cho NK, Hatten ME (1996) Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule neuron identity. *Neuron* 17, 389-399.
- Altman J** (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. III. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J. Comp. Neurol.* 136, 269-294.
- Altman J** (1982) Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. *Exp. Brain Res.* 16, 8-49.
- Altman J and Bayer SA** (1985a) Embryonic development of the rat cerebellum. II. Translocation and regional distribution of the deep neurons. *J. Comp. Neurol.* 231, 27-41.
- Altman J and Bayer SA** (1985b) Embryonic development of the rat cerebellum. III. Regional differences in the time of origin, migration, and settling of Purkinje cells. *J. Comp. Neurol.* 231, 42-65.
- Altman J and Bayer SA** (1997) Development of cerebellar system in relation to its evolution, structure and functions. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Alvarez-Dolado M**, Iglesias T, Rodríguez-Peña A, Bernal J, Muñoz A (1994) Expression of neurotrophins and the trk family of neurotrophin receptors in normal and hypothyroid rat brain. *Mol. Brain Res.* 27, 249–257.
- Alvarez-Dolado M**, González-Sancho J, Bernal J, Muñoz A (1998) Developmental expression of tenascin-C is altered by hypothyroidism in the rat brain. *Neuroscience* 84, 309–322.
- Alvarez-Dolado M**, Cuadrado A, Navarro-Yubero C, Sonderegger P, Furley AJ, Bernal J, Muñoz A (2000) Regulation of the L1 cell adhesion molecule by thyroid hormone in the developing brain. *Mol. Cell Neurosci.* 16, 499-514.
- Anderson SA**, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JLR (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *DLX* genes. *Science* 278, 474-476.
- Anderson GW**, Larson RJ, Oas DR, Sandhofer CR, Schwartz HL, Mariash CN, Oppenheimer JH (1998) Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) modulates expression of the Purkinje cell protein-2 gene. *J. Biol. Chem.* 273, 16391-16399.
- Anderson SA**, Mione M, Yun K, Rubenstein JLR (1999) Differential origins of neocortical projection and local circuit neurons: role of *Dlx* genes in neocortical interneuronogenesis. *Cereb. Cortex* 9, 646-654.
- Angevine JB and Sidman RL** (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192, 766-768.

BIBLIOGRAFIA

- Aniello F**, Couchie D, Bridoux AM, Gripois D, Nunez J (1991) Splicing of juvenile and adult tau mRNA variants is regulated by thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4035-4039.
- Anton ES**, Cameron RS, Rakic P (1996) Role of neuron-glia junctional domain proteins in the maintenance and termination of neuronal migration across the embryonic wall. *J. Neurosci.* 16, 2283-2293.
- Anton ES**, Marchioni MA, Lee K-F, Rakic P (1997) Role of GGF/neuroregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development* 124, 3501-3510.
- Arimatsu Y**, Ishida M, Takiguchi-Hayashi K, Uratani Y (1999) Cerebral cortical specification by early potential restriction of progenitor cells and later phenotype control of postmitotic neurons. *Development* 126, 629-638.
- Austin CP and Cepko CL** (1990) Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex. *Development* 110, 713-732.
- Bagnard D**, Lohrum M, Uziel D, Püschel A, Bolz J (1998) Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125, 5043-5053.
- Balazs R**, Brooksbank BW, Davison AN, Eayrs JT, Wilson DA (1969) The effect of neonatal thyroidectomy on myelination in the rat brain. *Brain Res.* 15, 219-232.
- Balazs R**, Kovacs S, Cocks WA, Johnson AL, Eayrs JT (1971) Effect of thyroid hormone on the biochemical maturation of rat brain: postnatal cell formation. *Brain Res.* 25, 555-570.
- Bar I**, Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM (2000) The evolution of cortical development. An hypothesis based on the role of the Reelin signaling pathway. *Trends Neurosci.* 23, 633-638.
- Barallobre MJ**, del Río JA, Alcántara S, Borrell V, Aguado F, Ruiz M, Carmona MA, Martín M, Fabre M, Yuste R, Tessier-Lavigne M, Soriano E (2000) Aberrant development of hippocampal circuits and altered neural activity in *netrin-1* deficient mice. *Development* 127, 4797-4810.
- Barbe MF and Levitt P** (1991) The early commitment of fetal neurons to the limbic cortex. *J. Neurosci.* 11, 519-533.
- Barth PG** (1987) Disorders of neuronal migration. *Can. J. Neurol. Sci.* 14, 1-16.
- Baumann K**, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett.* 336, 417-424.
- Bayer SA** (1980) Development of the hippocampal region in the rat. I Neurogenesis examined with ³H-thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 190, 87-114.

- Bayer SA and Altman J** (1991) Neocortical development. Raven Press, New York.
- Bayer SA and Altman J** (1990) Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Exp. Neurol.* 107, 48-62.
- Behar O**, Golden JA, Mashimo H, Schoen FJ, Fishman MC (1996) Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* 383, 525-528.
- Berbel P**, Guadaño-Ferraz A, Martínez M, Quiles J, Balboa R, and Innocenti G (1993) Organization of auditory callosal connections in hypothyroid rats. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1465–1478.
- Bernal J and Guadaño-Ferraz A** (1998) Thyroid hormone and the development of the brain. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* 5, 296–302.
- Berry M and Rogers AW** (1965) The migration of neuroblast in the developing cerebral cortex. *J. Anat* 99, 691-709
- Bloch-Gallego E**, Ezan F, Tessier-Lavigne M and Sotelo C. (1999) Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J. Neurosci.* 19, 4407-4420.
- Bonfanti L and Theodosis DT** (1994) Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb. *Neuroscience* 62, 291-305.
- Borrell V**, Del Río JA, Alcántara S, Derer M, D’Arcangelo G, Nakajima K, Mikoshiba K, Derer P, Curran T, Soriano E (1999) Reelin regulates the development and synaptogenesis of layer-specific hippocampal connections. *J. Neurosci.* 19, 1345–1358.
- Bourrat F and Sotelo C** (1988) Migratory pathways and neuritic differentiation of inferior olivary neurons in the rat embryo: Axonal tracing study using the in vitro slab technique. *Developmental Brain Research* 39, 19-37.
- Bourrat F and Sotelo C** (1990) Early development of the precerebellar system: Migratory routes, Selective aggregation and neuritic differentiation of the inferior olive and lateral reticular nucleus neurons. An overview. *Archives Italiennes de Biologie* 128, 151-170.
- Bourrat F and Sotelo C** (1991) Relationships between neuronal birthdates and cytoarchitecture in the rat inferior olivary complex. *J. Comp. Neurol.* 313, 509-521.
- Braisted JE**, Catalano SM, Stimac R, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Shatz CJ, O’Leary DDM (2000) Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J. Neurosci.* 20, 5792-5801.
- Brodmann K** (1990) Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues, J.A.Barth

BIBLIOGRAFIA

- Brose K**, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T (1999) Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96, 795-806.
- Brunstrom JE**, Gray-Swain MR, Osborne PA, Pearlman AL (1997) Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4. *Neuron* 16, 505-517.
- Bulfone A**, Smiga S, Shimamura K, Peterson A, Puellas L, Rubenstein JL (1995) *T-brain-1*: a homolog of *Brachyury* whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron* 15, 63-78.
- Burstyn-Cohen T**, Tzarfaty V, Frumkin A, Feinstein Y, Stoeckli E, Klar A (1999) F-spondin is required for accurate pathfinding of commissural axons at the *floor-plate* plate. *Neuron* 23, 233-246.
- Buttiglione M**, Revest JM, Pavlov O, Karagogeos D, Furley A, Rougon G and Faivre-Sarrailh (1998) A functional interaction between the neuronal adhesion molecules TAG-1 and F3 modulates neurite outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 17, 6853-6870.
- Buttiglione M**, Revest JM, Rougon G, Faivre-Sarrailh C (1996) F3 neuronal adhesion molecule controls outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cell neurites: a cell type specific mediated by the Ig-like domains. *Mol. Cell Neurosci.* 8, 53-69.
- Calvo R**, Obregon MJ, Ruiz de Ona C, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G (1990) Congenital hypothyroidism, as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not of 3,5,3'-triiodothyronine in the protection of fetal brain. *J. Clin. Invest.* 86, 889-899.
- Cameron RS and Rakic P** (1994) Identification of membrane proteins that compromise the plasmalemmal junction between migrating neurons and radial glial cells. *J. Neurosci.* 14, 3139-3155.
- Cauli B**, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* 17, 3894-3906.
- Caviness VS Jr and Sidman RL** (1972) Olfactory structures of the forebrain in the *reeler* mutant mouse. *J. Comp. Neurol.* 145, 85-104.
- Caviness Jr VS and Sidman RL** (1973) Time of origin of corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and mutant *reeler* mice: an autoradiographic analysis. *J. Comp. Neurol* 148, 141-152.
- Caviness VS Jr** (1982) Neocortical histogenesis in normal and *reeler* mice: a developmental study based upon [³H]thymidine autoradiography. *Develop Brain Res* 4, 293-302.

- Caviness VS Jr**, Crandall JE, Edwards MA (1988) The *reeler* malformation. Implications for neocortical development: A view from mutations in mice. In: Cerebral cortex, Vol 7, Plenum Press, New York, pp. 59-89
- Celio MR and Blumcke I** (1994) Perineuronal nets: a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. Brain Res. Brain Res. Rev. 19, 128-145.
- Chae T**, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH (1997). Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. Neuron 18, 29-42.
- Chalepakis G**, Wijnholds J, Giese P, Schachner M, Gruss P (1994) Characterization of pax-6 and Hoxa-1 binding to the promoter region of the neural cell adhesion molecule L-1. DNA Cell Biol. 13, 891-900.
- Chédotal A and Sotelo S** (1992) Early development of olivocerebellar projections in the fetal rat using CGRP immunocytochemistry. Eur. J. Neurosci. 4, 1159-1179
- Chédotal A**, Pourquié O, Sotelo S (1995) Initial tract formation in the brain of the chick embryo: Selective expression of the BEN-GRASP cell adhesion molecule. European J. Neurosci. 7, 198-212.
- Chan SSY**, Zheng H, Su MW, Wilk R, Killeen MT, Hedgecock EM, Culotti JG (1996) UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (deleted in colorectal cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. Cell 87, 187-196.
- Chen WJ**, Goldstein JL, Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. J. Biol. Chem. 265, 3116-3123.
- Chenn A and McConnell SK** (1995) Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of *Notch 1* immunoreactivity in mammalian neurogenesis. Cell 82, 631-641.
- Chin WW and Yen PM** (1997) Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. In: LE Braverman (Ed.) Diseases of the Thyroid, Humana Press, pp. 1-15.
- Cho KR and Fearon ER** (1995) DCC: linking tumor suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer?. Curr. Opin. Genet. Dev. 5, 72-78.
- Chomczynski P and Sacchi N** (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156 –159.
- Chun JJM and Shatz CJ** (1989) The earliest-generated neurons of the cat cerebral cortex: characterization by MAP2 and neurotransmitter immunohistochemistry during fetal life. J. Neurosci. 9, 1648-1667.

BIBLIOGRAFIA

- Clos J and Legrand CH** (1990) An interaction between thyroid hormone and nerve growth factor promotes the development of hippocampus, olfactory bulbs and cerebellum: a comparative biochemical study of normal and hypothyroid rats. *Growth Factor* 3, 205–220.
- Cocks JA**, Balazs R, Johnson AL, Eayrs JT (1970) Effect of thyroid hormone on the biochemical maturation of rat brain: conversion of glucose-carbon into amino acids. *J. Neurochem.* 17, 1275-1285.
- Cohen-Tannoudji M**, Babinet C, Wassef M (1884) Early determination of a mouse somatosensory cortex marker. *Nature* 368, 460-463.
- Colamarino SA and Tessier-Lavigne M** (1995a) The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81, 621-629.
- Colamarino SA and Tessier-Lavigne M** (1995b) The role of the *floor plate* in axon guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 497-529.
- Colavita A**, Krishna S, Zheng H, Padgett RW, Culotti JG (1998) Pioneer axon guidance by unc-129, a *C. elegans* TGF- β . *Science* 281, 706-709.
- Corset V**, Nguyen-Ba-Charvet KT, Forcet C, Moysse E, Chédotal A, Mehlen P (2000) Netrin-1-mediated outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature* 407,747-750.
- Cremer H**, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S, Barthels D, Rajewsky K, Wille W (1994) Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367, 455-459.
- Croteau W**, Davey JC, Galton VA, St Germain DL (1996) Cloning of the mammalian type II iodotironine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J. Clin. Invest.* 98, 405-417.
- Culotti JG and Kolodkin AL** (1996) Functions of netrins and semaphorins in axon guidance. *Current Opinion in Neurobiology* 6, 81-88.
- D'Arcangelo G**, Miao GG, Chen S-C, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature* 374, 719-723.
- D'Arcangelo G**, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T (1997) Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J. Neurosci.* 17, 23-31.
- D'Arcangelo G**, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T (1999) Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24, 471-479.
- D'Arcangelo G and Curran T** (1998) Reeler: new tales on an old mutant mouse. *BioEssays* 20, 235-244.

- Davis AA and Temple S** (1995) Self-renewing multiple potential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372, 263-266.
- Debby-Brafman A**, Burstyn-Cohen T, Klar A, Kalcheim C (1999) F-spondin, expressed in somite regions avoided by neural crest cells, mediates inhibition of distinct somite domains to neural crest migration. *Neuron* 22, 475-488.
- de Carlos JA and O'Leary DDM** (1992) Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *J. Neurosci.* 12, 1194-1211.
- de Carlos JA**, López-Mascaraque L, Valverde F (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J. Neurosci.* 16, 6146-6156.
- de Felipe J** (1993) Neocortical neuronal diversity: Chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb. Cortex* 3, 273-289.
- Dehay C**, Horsburgh G, Berland M, Killackey H, Kennedy H (1989) Maturation and connectivity of the visual cortex is altered by prenatal removal of retinal input. *Nature* 337, 265-267.
- Dehay C**, Horsburgh G, Berland M, Killackey H, Kennedy H (1991) The effects of bilateral enucleation in the primate fetus on the parcellation of visual cortex. *Dev. Brain Res.* 62, 137-141.
- Dehay C**, Giruod P, Bernald M, Smart I, Kennedy H (1993) Modulation of the cell cycle contributes to the parcellation of the primate visual cortex. *Nature* 366, 464-466.
- Deiner MS**, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, Sretavan DW (1997) Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: Loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19, 575-589.
- de la Torre JR**, Höpker VH, Ming G, Poo M, Tessier-Lavigne M, Hemmati-Brivanlou A, Holt CE (1997) Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptors DCC. *Neuron* 19, 1211-1224.
- de Lecea L**, Del Río JA, Criado JR, Alcántara S, Morales M, Henriksen SJ, Soriano E, Sutcliffe JG (1997) Cortistatin is expressed in a distinct subset of cortical interneurons. *J. Neurosci.* 17, 5868-5880.
- de Lecea L**, Soriano E, Criado JR, Steffensen SL, Henriksen SJ, Sutcliffe JG (1994) Transcripts encoding a neural membrane CD26 peptidase-like protein are stimulated by synaptic activity. *Mol. Brain Res.* 25, 286-296.
- Delgado JM, Ferrús A, Mora F, Rubia FJ** (1998) *Manual de Neurociencia*. Editorial Síntesis.

BIBLIOGRAFIA

- Del Río JA**, Soriano E, Ferrer I (1992) Development of GABA-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *J. Comp. Neurol.* 326, 501-526.
- Del Río JA**, Martínez A, Fonseca M, Auladell C, Soriano E (1995) Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb. Cortex* 5, 13–21.
- Del Río JA**, Heimrich B, Supèr H, Borrell V, Frotscher M, Soriano E (1996) Differential survival of Cajal-Retzius cells in organotypic slice cultures of neocortex and hippocampus. *J. Neurosci.* 16, 6896-6907.
- Del Río JA**, Heimrich B, Borrell V, Forster E, Drakew A, Alcántara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba M, Derer P, Frotscher M, Soriano E (1997) A role for Cajal-Retzius cells and Reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385, 70 –74.
- DeLong GR** (1990) The effect of iodine deficiency on neuromuscular development. *I DD Newsletter* 6, 1–12.
- Derer P** (1985) Comparative localization of Cajal-Retzius cells in the neocortex of normal and *reeler* mutant mice fetuses. *Neurosci. Lett* 54, 1-6.
- Derer P and Derer M** (1990) Cajal-Retzius cell ontogenesis and death in mouse brain visualized with horseradish peroxidase and electron microscopy. *Neuroscience* 36, 839-856.
- Derer P and Derer M** (1992) Development and fate of Cajal-Retzius cells *in vivo* and *in vitro*. In: S.C. Sharma and A.M. Goffinet (Eds.) *Development of the central nervous system in vertebrates*, Plenum Press, New York, pp. 113-127.
- De Robertis EM**, Oliver G, Wright CVE (1990) Homeobox genes and the vertebrate body plan. *Scientific American*, 263, 26-33.
- de Rouvroit CL**, de Bergeyck V, Cortvrindt C, Bar I, Eeckhout Y, Goffinet AM (1999) Reelin, the extracellular matrix protein deficient in *reeler* mutant mice, is processed by a metalloproteinase. *Exp. Neurol.* 156, 214-217.
- DeSilva U**, D'Arcangelo G, Braden VV, Chen J, Miao GG, Curran T, Green ED (1997) The human reelin gene: Isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7. *Genome Res.* 7, 157-164.
- des Portes V**, Pinaud JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrié A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y, Catala M, Kahn A, Beldjord C, Chelly J (1998) A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* 92, 51-61.
- Dickson PW**, Aldred AR, Menting JGT, Marley PD, Sawyer WH, Schreiber G (1987) -Thyroxine transport in choroid plexus. *J. Biol. Chem.* 262, 13907–13915.

- Dobyns WB**, Curry CJ, Hoyme HE, Turlington I, Ledbetter DH (1991) Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker syndrome. *Am. J. Human Genet.* 48, 584-594.
- Doetsch F and Alvarez-Buylla A** (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14895-14900.
- Dorries U**, Taylor J, Xiao Z, Lochter A, Montag D, Schachner M (1996). Distinct effects of recombinant Tenascin-C domains in neural cell adhesion, growth cone guidance, and neuronal polarity. *J. Neurosci. Res.* 43, 420-438.
- Dulabon L**, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh CA, Kreidberg JA, Anton ES (2000) Reelin binds $\alpha 3\beta 1$ integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27, 33-44.
- Dussault JH and Ruel J** (1987) Thyroid hormones and brain development. *Annu. Rev. Physiol.* 49, 321-334.
- Eayrs JT and Taylor SH** (1951) The effect of thyroid deficiency induced by methylthiouracil on the maturation of the central nervous system. *J. Anat.* 85,350-358.
- Eayrs JT and Horne G** (1955) The development of cerebral cortex in hypothyroid and starved rats. *Anat. Rec.* 121, 53-61.
- Eayrs JT** (1955) The cerebral cortex of normal and hypothyroid rats. *Acta Anat. (Basel)* 25, 160-183.
- Eayrs JT and Lishman WA** (1955) The maturation of behavior in hypothyroidism and starvation. *Br. J. Anim. Behav.* 3, 17-24.
- Eayrs JT** (1971) Thyroid and developing brain: anatomical and behavioral effects. In: M. Hamburg and E. Barrington (Eds.) *Hormones in Development*, Appleton-Century-Crofts, New York, pp. 345-355.
- Edelman GM**, Cunningham BA, Thiery JP (Eds.) (1990) *Morphoregulatory Molecules*. Wiley and Sons, New York.
- Edmondson JC and Hatten ME** (1987) Glial-guided granule neuron migration *in vitro*: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J. Neurosci.* 7, 1928-1934.
- Edmunds SM and Parnavelas JG** (1982) Retzius-Cajal cells: an ultrastructural study in the developing visual cortex of the rat. *J. Neurocytol* 11, 427-446.
- Eksioglu YZ**, Scheffer IE, Cardenas P, Knoll J, DiMario F, Ramsby G, Berg M, Kamuro K, Berkovic SF, Duyk GM, Parisi J, Huttenlocker PR, Walsh CA (1996) Periventricular heterotopia: An X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. *Neuron* 16, 77- 87.

BIBLIOGRAFIA

- Ellenberger C**, Hanaway J, Netsky MG (1969) Embryogenesis of the inferior olivary nucleus in the rat: A radioautographic study and reevaluation of the rhombic lip. *J. Comp. Neurol.* 137, 71-88.
- Engelkamp D**, Rashbass P, Seawright A, van Heyningen V (1999) Role of Pax-6 in development of the cerebellar system. *Development* 126, 3585-3596.
- Essick CR** (1912) The development of the nuclei pontis and the nucleus arcuatus in man. *American Journal of Anatomy* 13, 25-54.
- Fabre M**, Martin M, Ulloa F, Real FX (1999) In vitro analysis of the role of DCC in mucous-secreting intestinal differentiation. *Int. J. Cancer* 81, 799-807.
- Fairén A** et al. (1984) Nonpyramidal neurons: general account. In: A. Peters and E.G. Jones (Eds.), *Cerebral Cortex (Vol 1) Cellular Components of the Cerebral Cortex*, Plenum Press, pp. 201-253.
- Fairén A**, Cobas A, Fonseca M (1986) Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol* 251, 67-83.
- Faissner A** (1997). The Tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res* 290, 331-341.
- Faivre C**, Legnard C, Rabie A (1984) In Purkinje cell dendrites of the young rat, thyroid hormone controls the resistance of microtubules to fixation at low temperature. *International Journal of Developments in Neuroscience* 2, 427-436.
- Falconer DS** (1951) Two new mutants trembler and *reeler*, with neurological actions in the house mouse. *J. Genet.* 50, 192-201.
- Farsetti A**, Mitsuhashi T, Desvergne B, Robbins J, Nikodem VM (1991) Molecular basis of thyroid hormone regulation of myelin basic protein gene expression in rodent brain. *J. Biol. Chem.* 266, 23226-23232.
- Farsetti A**, Desvergne B, Hallenbeck P, Robbins J, Nikodem VM (1992) Characterization of myelin basic protein thyroid hormone response element and its function in the context of native and heterologous promoter. *J. Biol. Chem.* 267, 15784-15788.
- Farwell A**, DiBenedetto D, Leonard J (1993) Thyroxine targets different pathways of internalisation of type II iodothyronine 5'-deiodinase in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 5055-5062.
- Farwell A and Dubord-Tomasetti SA** (1999) Thyroid hormone regulates the expression of laminin in the developing rat cerebellum. *Endocrinology* 140, 4221-4227.
- Fazeli A**, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small RG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg

- RA (1997) Phenotype of mice lacking functional *Deleted in colorectal cancer (DCC)* gene. *Nature* 386, 796-804.
- Feinberg PA and Vogelstein B** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Bio-chem* 137, 266–267.
- Felsenfeld DP**, Hynes MA, Skoler KM, Furley AJ, Jessel TM (1994) TAG-1 can mediate homophilic binding but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and $\beta 1$ integrins. *Neuron* 12, 257-267.
- Feng L**, Hatten ME, Heintz N (1994) Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12, 895-908.
- Feoktistov I and Biaggioni I** (1997) Adenosine A2B receptors. *Pharmacol. Rev.* 49, 381-402.
- Figueiredo BC**, Almazán G, Ma Y, Teztlaff W, Miller FD, Cuello AC (1993) Gene expression in the developing cerebellum during perinatal hypo- and hyperthyroidism. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 17, 258–268.
- Fishell G and Hatten ME** (1991) Astrotactin provides a receptor system for glia-guided neuronal migration. *Development* 113, 755-765.
- Fox JW**, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR, Walsh CA (1998) Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heteropia. *Neuron* 21, 1315-1325.
- Francis F**, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J (1999) Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23, 247-256
- Freund TF and Buzsáki G** (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347-470.
- Frost DO**, Edwards MA, Sachs GM, Caviness VS Jr (1986) Retinotectal projection in *reeler* mutant mice: Relationships among axon trajectories, arborization patterns and cytoarchitecture. *Brain Res.* 393, 109-120.
- Frotscher M** (1997). Dual role of Cajal-Retzius cells and Reelin in cortical development. *Cell Tissue Res* 290, 315-322.
- Fugita S** (1960) Mitotic pattern and histogenesis of the central nervous system. *Nature* 185, 702-703.
- Fugita S**, Shimada M, Nakanuna T (1966) ^3H -thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and internal granular layers of the mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 128, 191-209.

BIBLIOGRAFIA

- Fugita S** (1967) Quantitative analysis of cell proliferation and differentiation in the cortex of the postnatal mouse cerebellum. *J. Cell Biol.* 32, 277-287.
- Funato H**, Saito-Nakazato Y, Takahashi H (2000) Axonal growth from the habenular nucleus along the neuromere boundary region of the diencephalon is regulated by Semaphorin 3F and Netrin-1. *Mol. Cel. Neurosci.* 16, 206-220.
- Gad JM**, Keeling SL, Wilks AF, Tan S-S, Cooper HM (1997) The expression patterns of guidance receptors, DCC and neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* 192, 258-273.
- Gao WQ and Hatten ME** (1994a) Neuronal differentiation rescued by implantation of weaver granule cell precursors into wild-type cerebellar cortex. *Science* 260, 367-370.
- Gao WQ and Hatten ME** (1994b) Immortalizing oncogenes subvert the establishment of granule cell identity in developing cerebellum. *Development* 120, 1059-1070.
- García Argiz CA**, Pasquini JM, Kaplun B, Gomez CJ (1967) Hormonal regulation of brain development. II. Effect of neonatal thyroidectomy on succinate dehydrogenase and other enzymes in developing cerebral cortex and cerebellum of the rat. *Brain Res.* 6, 635-646.
- Georges-Labouesse E**, Mark M, Messaddeq N, Gansmuller A (1998) Essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination. *Curr. Biol.* 8, 983-986.
- Ghorbel MT**, Seugnet I, Hadj-Sahraoui N, Topilko P, Levi G, Demeneix B (1999) Thyroid hormone effects on Krox-24 transcription in the post-natal mouse brain are developmentally regulated but are not correlated with mitosis. *Oncogene* 18, 917-924.
- Ghosh A**, Anatonini A, McConnell SK, Shatz CJ (1990) Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature* 347, 179-181.
- Ghosh A and Shatz CJ** (1992a) Involvement of subplate neurons in the formation of ocular dominance columns. *Science* 255, 1441-1443.
- Ghosh A and Shatz CJ** (1992b) Pathfinding and target selection by development geniculocortical axons. *J. Neurosci.* 12, 39-55.
- Gilmore EC**, Ohshima T, Goffinet AM, Kulkarni AB, Herrup K (1998) Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J. Neurosci.* 18, 6370-6377.
- Gilmore EC and Herrup K** (2000) Cortical development: Receiving Reelin. *Curr. Biol.* 10, R162-R166.
- Gleeson JG**, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnath SR, Ross ME, Walsh CA (1998) *doublecortin*, a brain-specific gene mutated in

human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 92, 63-72.

Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23, 257-271.

Gleeson JG and Walsh CA (2000) Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. *Trends Neurosci.* 23, 352-359.

Goffinet AM (1979) An early developmental defect in the cerebral cortex of the *reeler* mouse. A morphological study leading to a hypothesis concerning the action of the mutant gene. *Anat. Embryol.* 157, 205-216.

Goffinet AM (1980) The cerebral cortex of the *reeler* embryo (an electron microscopic analysis). *Anat. Embryol.* 159, 199-210.

Goffinet AM (1984) Events governing organization of postmigratory neurons: Studies on brain development in normal and *reeler* mice. *Brain Res.* 319, 261-296.

Goffinet AM (1992) The *reeler* gene: a clue to brain development and evolution. *Int. J. Dev. Biol.* 36, 101-107.

Goldowitz D, Cushing RC, Laywell E, D'Arcangelo G, Sheldon M, Sweet HO, Davisson M, Steindler D, Curran T (1997) Cerebellar disorganization characteristic of *reeler* in scrambler mutant mice despite presence of reelin. *J. Neurosci.* 17, 8767-8777.

Goldowitz D, Hamre KM, Przyborski SA, Ackerman SL (2000) Granule cells and cerebellar boundaries: analysis of *Unc5h3* mutant chimeras. *J. Neurosci.* 20, 4129-4137.

Gonzalez JL, Russo CJ, Goldowitz D, Sweet HO, Davisson MT, Walsh CA (1997) Birthdate and cell marker analysis of scrambler: a novel mutation affecting cortical development with a *reeler*-like phenotype. *J. Neurosci.* 17, 9204-9211.

Goodman CS (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 341-377.

Gotz B, Scholze A, Clement A, Joester A, Schutte K, Wigger F, Frank R, Spiess E, Ekblom P, Faissner A (1996) Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *J. Cell Biol.* 132, 681-699.

Gotz M, Bolz J, Joester A, Faissner A (1997) Tenascin-C synthesis and influence on axonal growth during rat cortical development. *Eur. J. Neurosci.* 9, 496-506.

Gould SJ (1977) *Ontogeny and Phylogeny*. The Belknap Press of Harvard University Press.

Gray GE and Sanes JR (1991) Migratory paths and phenotypic choices of clonally related cells in the avian optic tectum. *Neuron* 6, 211-225.

BIBLIOGRAFIA

- Gregory W**, Edmondson J, Hatten ME, Mason C (1988) Cytology and neuron-glia apposition of migrating cerebellar granule cells *in vitro*. *J. Neurosci.* 8, 1728-1738.
- Grigoriou M**, Tucker AS, Sharpe PT, Pachnis V (1998) Expression and regulation of *Lhx6* and *Lhx7*, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development* 125, 2063-2074.
- Guadaño-Ferraz A**, Obregon MJ, St Germain DL, Bernal J (1997) The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10391-10396.
- Guadaño-Ferraz A**, Escamez MJ, Rausel E, Bernal J (1999) Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J. Neurosci.* 19, 3430-3439.
- Guthrie S and Pini A** (1995) Chemorepulsion of developing motor axons by the floor plate. *Neuron* 14, 1117-1130.
- Guthrie S** (1997) Axon guidance: Netrin receptors are revealed. *Curr. Biol.* 7, R6-9.
- Hajós F**, Patel AJ, Balazs R (1973) Effect of thyroid deficiency on the synaptic organization of the rat cerebellar cortex. *Brain Res.* 50, 387-401.
- Hallonet MER**, Teillet MA, Le douarin NM (1990) A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. *Development* 108, 19-31.
- Hallonet MER and Le douarin NM** (1993) Tracing neuroepithelial cells of the mesencephalic and metencephalic alar plates during cerebellar ontogeny in quail-chick chimaeras. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1145-1155.
- Hallonet M and Alvarado-Mallart RM** (1997) The chick / quail chimeric system: a model for early cerebellar development. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 5, 17-31.
- Hamburgh M and Flexner LB** (1957) Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis. XXI. Effect of hypothyroidism and hormone therapy on enzyme activities of the developing cerebral cortex of the rat. *J. Neurochem.* 1, 279-288.
- Hamelin M**, Zhou Y, Su MW and Culotti JG (1993) Expression of the unc-5 guidance receptor in the touch neurons of *C. elegans* steers their axons dorsally. *Nature* 364, 327-330.
- Hamilton BA**, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, Fitzhugh W, Kusumi K, Russel LB, Mueller KL, van Berkel V, Birren BW, Kruglyak L, Lander ES (1996) Disruption of the nuclear hormone receptor ROR α in staggerer mice. *Nature* 379, 736-739.
- Harkmark W** (1954) Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons. A morphological and experimental investigation on chick embryos. *J. Comp. Neurol.* 100, 115-205.

- Harris R**, Sabatelli LM, Seeger MA (1996) Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline; identification and characterization of two *Drosophila* netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* 17, 217-228.
- Hartmann D**, De Strooper B, Saftig P (1999) Presenilin-1 deficiency leads to loss of Cajal-Retzius neurons and cortical dysplasia similar to human type 2 lissencephaly. *Curr. Biol.* 9, 719-727.
- Hatten ME and Liem RKH** (1981) Astroglia provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons in vitro. *J. Cell Biol.* 90, 622-630.
- Hatten ME and Mason CA** (1990) Mechanisms of glial-guided neuronal migration *in vitro* and *in vivo*. *Experientia* 46, 907-916.
- Hatten ME** (1993) The role of migration in central nervous system neuronal development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 38-44.
- Hatten ME and Heintz N** (1995) Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 385-408.
- Hatten ME**, Alder J, Zimmerman K, Heintz N (1997) Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 40-47.
- Hatten ME** (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 511-539.
- Hedgecock EM**, Culotti JG, Hall DH, Stern BD (1987) Genetics of cell and axon migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 100, 365-382.
- Hedgecock EM**, Culotti JG, Hall DH (1990) The *unc5*, *unc6*, and *unc40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 2, 61-85.
- Hedgecock EM and Norris CR** (1997) Netrins evoke mixed reactions in motile cells. *Trends Genet.* 13, 251-253.
- Hedin-Pereira C**, deMoraes ECP, Santiago MF, Méndez-Otero R, Lent R (2000) Migrating neurons cross a reelin-rich territory to form an organized tissue out of embryonic cortical slices. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4536-4540.
- Heintz N**, Norman DJ, Gao WQ, Hatten ME (1993) Neurogenetic approaches to mammalian brain development. In: Davies, Tilghman (Eds.), *Genome Maps and Neurological Disorders*, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Press, pp. 19-44
- Hicks SP and D'Amato** (1968) Cell migration in the isocortex of the rat. *Anat. Rec.* 160, 619-634.

BIBLIOGRAFIA

- Hiesberger T**, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J (1999) Direct binding of reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled 1 and modulated tau phosphorylation. *Neuron* 24, 481-489.
- Hinds JW** (1968) Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. II. Cell proliferation and migration. *J. Comp. Neurol.* 134, 305-322.
- Hirotsune S**, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T, Kusakabe M, Murakami Y, Muramatsu M, Watanabe S, Nakao K, Katsuki M, Hayashizaki Y (1995) The *reeler* gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nature Genet.* 10, 77-83.
- His W** (1891) Die Entwicklung des menschlichen Rautenhirns vom Ende des ersten bis zum Beginn des dritten Monats. I. Verlängertes Mark. Abhandlung der königlicher sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften, Mathematischephysikalische Klasse 29, 1-74.
- Hoffarth RM**, Johnston JG, Krushel LA, van der Kooy D (1995) The mouse mutation *reeler* causes increased adhesion within a subpopulation of early postmitotic cortical neurons. *J. Neurosci.* 15, 4838-4850.
- Homayouni R and Curran T** (2000) Cortical development: Cdk5 gets into sticky situations. *Curr. Biol.* 10, R331-R334.
- Hong K**, Hinck L, Nishiyama M, Poo M, Tessier-Lavigne M, Stein E (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of unc5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97, 927-942.
- Hopker VH**, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C (1999) Growth cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401, 69-73.
- Horesh D**, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, Chelly J, Reiner O (1999) Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1599-1610.
- Hosoi T**, Uchiyama M, Okumura E, Saito T, Ishiguro K, Uchida T, Okuyama A, Kishimoto T, Hisanaga S (1995) Evidence for cdk5 as a major activity phosphorylating tau protein in porcine brain extract. *J. Biochem. (Tokyo)* 117, 741-749.
- Howell BW**, Gertler FB, Cooper JA (1997a) Mouse disabled (*mdab1*): a Src-binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J.* 16, 121-132.
- Howell BW**, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA (1997b) Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389, 733-737.
- Howell BW**, Herrick TM, Cooper JA (1999a) Reelin-induced tyrosine phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev.* 13, 643-648.

- Howell BW**, Lainer LM, Frank R, Gertler FB, Cooper JA (1999b) The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoproteins and to phospholipids. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5179-5188.
- Hu H and Rutishauser U** (1996) A septum-derived chemorepulsive factor for migrating olfactory interneuron precursors. *Neuron* 16, 933-940.
- Hu H**, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1996) The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16, 735-743.
- Hu H** (1999) Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 23, 701-711.
- Hunter KE and Hatten ME** (1995) A diffusible signal which regulates radial glial cell differentiation: identification and analysis using wild type and *reeler* mice. *Soc. Neurosci.* 21, 315.6 (Abstract).
- Hunter-Schaedle KE** (1997) Radial glial cell development and transformation are disturbed in *reeler* forebrain. *J. Neurobiol.* 33, 459-472.
- Husmann K**, Faissner A, Schachner M (1992) Tenascin promotes cerebellar granule cell migration and neurite outgrowth by different domains in the fibronectin type II repeats. *J. Cell Biol.* 116, 1475-1486.
- Hynes RO**, Patel R, Miller RH (1986) Migration of neuroblasts along preexisting axonal tracts during prenatal cerebellar development. *The Journal of Neuroscience* 6, 867-876.
- Iglesias T**, Caubín J., Stunnenberg HG, Zaballos A, Bernal J., Muñoz A (1996) Thyroid hormone-dependent transcriptional repression of neuronal cell adhesion molecule during brain maturation. *EMBO J.* 15, 4307-4316.
- Ikeda Y and Terashima T** (1997) Expression of *reelin*, the gene responsible for the *reeler* mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev. Dynamics* 210, 157-172.
- Impagnatiello F**, Guidotti A, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN, Pappas GD, Tueting P, Sharma RP, Costa E (1998) A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15718-15723.
- Iñiguez MA**, Rodriguez-Peña A, Ibarrola N, Aguilera M, Muñoz A, Bernal J (1993) Thyroid hormone regulation of RC3, a brain specific gene encoding a protein kinase-C substrate. *Endocrinology* 133, 467-473.

BIBLIOGRAFIA

- Iñiguez MA**, Morte B, Rodriguez-Peña A, Muñoz A, Gerendasy D, Sutcliffe JG, Bernal J (1994) Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Brain Res. Mol. Brain Res.* 27, 205-214.
- Ishii N**, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG, Hedgecock EM (1992) UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9, 873-881.
- Jacobowitz DM and Abbott LC** (1998) Chemoarchitectonic atlas of the developing mouse brain. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Jankovski A and Sotelo C** (1996) Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J. Comp. Neurol* 371, 376-396.
- Kandel E, Jessel TM, Schwartz JH** (1997) Neurociencia y conducta, Ed. Prentice Hall.
- Karagogeos D**, Morton SB, Casano F, Dodd J, Jessell TM (1991) Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: Differential regulation by central and peripheral neurons in vitro. *Development* 112, 51-67.
- Keino-Masu K**, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SSY, Culotti JG, Tessier-Lavigne M (1996) Deleted in colorectal cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175-185.
- Kennedy TE**, Serafini T, de la Torre J, Tessier-Lavigne M (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-435.
- Kidd T**, Bland KS, Goodman CS (1999) Slit is the midline repellent for the Robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96, 785-794.
- Kitamura K**, Miura H, Yanazawa M, Miyashita T, Kato K (1997) Expression patterns of Brx1 (Rieg gene), Sonic hedgehog, Nkx2.2, Dlx1 and Arx during zona limitans intrathalamica and embryonic ventral lateral geniculate nuclear formation. *Mech. Dev.* 67, 83-96.
- Klar A**, Baldassare M, Jessell TM (1992) F-spondin: A gene expressed at high levels in the *floor-plate* plate encodes a secreted protein that promotes neural cell adhesion and neurite extension. *Cell* 69, 95-110.
- Kobayashi K**, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Londo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshiyoka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara Y, Nonaka I, Nakagome Y, Kanazawa I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T (1998) An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394, 388-392.
- Koibuchi N and Chin WW** (1998) ROR α gene expression in the perinatal rat cerebellum: ontogeny and thyroid hormone regulation. *Endocrinology* 139, 2335-2341.
- Koibuchi N and Chin WW** (1999) Mechanisms underlying neurological abnormalities resulting from developmental hypothyroidism. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabet.* 6, 26-32.

- Koibuchi N**, Liu Y, Fukuda H, Takeshita A, Yen PM, Chin WW (1999) ROR α augments thyroid hormone receptor-mediated transcriptional activation. *Endocrinology* 140, 1356-1360.
- Kolodkin AL**, Matthes DJ, Goodman CS (1993) The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.
- Kolodziej PA**, Timpe LC, Mitchell KJ, Fried SR, Goodman CS, Jan LY, Jan YN (1996) Frazzled encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87, 197-204.
- Komuro H and Rakic P** (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260, 95-97.
- Komuro H and Rakic P** (1998) Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations. *J. Neurobiol.* 37, 110-130.
- König N**, Valet J, Fulcrand J, Marty R (1977) The time of origin of cajal-retzius cells in the rat temporal cortex, an autoradiographic study. *Neurosci. Lett.* 4, 21-26.
- Kornack DR and Rakic P** (1995) Radial and horizontal deployment of clonally related cells in the primate neocortex: relationship to distinct mitotic lineages. *Neuron* 15, 311-321.
- Kostovic I and Molliver ME** (1974) A new interpretation of the laminar development of cerebral cortex: synaptogenesis in different layers of the neopallium in the human fetus. *Anat. Rec.* 178, 395.
- Kostovic I and Rakic P** (1990) Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J. Comp. Neurol.* 297, 441-470.
- Krumlauf R** (1993) Hox genetic functions. *Curr. Opin. in Genetics of Development*, 3, 621-625.
- Kreig WJS** (1946) Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. B. Structure of the cortical areas. *J. Comp. Neurol.* 84, 277-324.
- Kwon YT and Tsai LH** (1998) A novel disruption of cortical development in p35 ^{-/-} mice distinct from *reeler*. *J. Comp. Neurol* 395, 510–522.
- Kwon YT**, Gupta A, Zhou Y, Nikolic M, Tsai LH (2000) Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35-cdk5 kinase. *Curr. Biol.* 10, 363-372.
- Lambert de Rouvroit C and Goffinet AM** (1998) *The Reeler Mouse as a Model of Brain Development*, Springer-Verlag.

BIBLIOGRAFIA

- Larramendi LMH** (1969) Analysis of synaptogenesis in the cerebellum of mouse. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. R. Llinás, ed. Am. Med. Assn. Educ. and Res. Fdn., Chicago, pp. 803-843.
- Lavdas AA**, Mione MC, Parnavelas JG (1996) Neuronal clones in the cerebral cortex show morphological and neurotransmitter heterogeneity during development. *Cereb. Cortex* 6, 490-497.
- Lauder JM** (1978) Effects of early hypo- and hyperthyroidism on development of rat cerebellar cortex. IV. The parallel fibers. *Brain Res.* 142, 25-39.
- Lauder JM** (1979) Granule cell migration in the developing rat cerebellum. Influence of neonatal hypo- and hyper-thyroidism. *Dev. Biol.* 70, 105.
- Lauffenburger DA and Horwitz AF** (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
- Lavdas AA**, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999) The medial ganglionic eminence give rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 99, 7881-7888.
- Lazar MA** (1993) Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* 14:184–193.
- Legrand J** (1967) Variations, en fonction de l'age, de la reponse du cervelet a l'action morphogenetique de la thyroide chez le rat. *Archives of Anatomy and Microscopic Morphology Experiments* 56, 291-307.
- Legrand J** (1979) Morphogenetic actions of thyroid hormones. *Trends Neurosci.* 2, 234-236.
- Legrand J** (1984) Effects of thyroid hormones on central nervous system. In: *Neurobehavioural teratology* (Yanai J., ed), pp. 331–363. Amsterdam: Elsevier/ North Holland.
- Legrand J** (1986) Thyroid hormone effects on growth and development. In: G. Henneman (Ed.) *Thyroid Hormone Metabolism*, M. Dekker, Inc., New York, pp. 503-534.
- Leingartner A and Lindholm D** (1994) Two promoters direct transcription of the mouse NT-3 gene. *Eur. J. Neurosci.* 6, 1149-1159.
- Lemmon V**, Farr KL, Lagenaur C (1989) L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2, 1597-1603.
- Leonard JL**, Kaplan MM, Visser TJ, Silva JE, Larsen PR (1981) Cerebral cortex responds rapidly to thyroid hormones. *Science* 214, 571-573.
- Leonard JL**, Siegrist-Kaiser CA, Zuckerman CJ (1990) Regulation of type II iodothyronine 5'-deionidase by thyroid hormone: inhibition of actin polymerization blocks enzyme activation in cAMP-stimulated glial cells. *J. Biol. Chem.* 265, 940-946.

- Leonard JL and Koehrle J** (1996) Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: L Braverman and R Utiger (Eds.) *The Thyroid*, ed 7, Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 125-161.
- Leonardo ED**, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M (1997) Vertebrate homologues of *C. elegans* unc-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386, 833-837.
- Leung-Hagesteijn C**, Spence, AM, Stern BD, Zhou Y, Su M-W, Edgecock EM, Culotti JG (1992) unc-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type I domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71, 289-299.
- Lewin GR and Barde YA** (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 289-317.
- Li HS**, Chen JH, Wu W, Fagaly T, Zhou L, Yuan W, Dupuis S, Jiang ZH, Nash W, Gick C, Ornitz DM, Wu JY, Rao Y (1999) Vertebrate Slit, a secreted ligand for the transmembrane protein Roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* 96, 807-818.
- Liesi P** (1990) Extracellular matrix and neuronal movement. *Experientia* 46, 900-907.
- Lindholm D**, Castrén E, Tsoulfas P, Kolbel R, Berzaghi MP, Leingärtner A, Heisenberg CP, Tesarollo L, Parada LP, Thoenen H (1993) Neurotrophin-3 induced by triiodothyronine in cerebellar granule cells promotes Purkinje cell differentiation. *J. Cell Biol.* 122, 443– 450.
- Livesey FJ and Hunt SP** (1997) Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal nigral, and cerebellar development. *Mol. Cel. Neurosci.* 8, 417-429.
- Lois C and Alvarez-Buylla A** (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.
- Lois C**, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978-981.
- Loo DT**, Kanner SB, Aruffo A (1998) Filamin binds to the cytoplasmic domain of the β 1-integrin. Identification of aminoacids responsible for this interaction. *J. Biol. Chem.* 273, 23304-23312.
- Lorente de Nó R** (1949) Cerebral cortex: architecture, intracortical connections and motor projections. In: J.F. Fulton (Ed.), *Physiology of the Nervous System* (3rd edn), Oxford University Press, pp. 288-330.
- Lu E and Brown W** (1977) The developing caudate nucleus in the euthyroid and hypothyroid rat. *J. Comp. Neurol* 171, 261–284.
- Lucio RA**, García JV, Cerezo JR, Pacheco P, Innocenti GM, Berbel P (1997) The development of auditory callosal connections in normal and hypothyroid rats. *Cereb. Cortex* 7, 303–316.

BIBLIOGRAFIA

- Lumsden AGS and Davies AM** (1986) Chemotropic effect of specific target epithelium in the development of the mammalian central nervous system. *Nature* 323, 538-539.
- Lund RD and Mustari MJ** (1977) Development of the geniculocortical pathways in rats. *J. Comp. Neurol.* 173, 289-306.
- Luo Y, Raible D, Raper JA** (1993) Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217-227.
- Luskin MB and Shatz CJ** (1985) Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex. Cogeneration of subplate and marginal zones. *J. Neurosci.* 5, 1062-1075.
- Luskin MB, Pearlman AL, Sanes JR** (1988) Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied *in vivo* and *in vitro* with a recombinant retrovirus. *Neuron* 1, 635-647.
- Luskin MB, Parnavelas JG, Barfield JA** (1993a) Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J. Neurosci.* 13, 1730-1750.
- Luskin MB** (1993b) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189.
- Maccaferri G, Toth K, McBain CJ** (1998) Target-specific expression of presynaptic mossy fiber plasticity. *Science* 279, 1368-1370.
- MacLennan AJ, McLaurin DL, Marks L, Vinson EN, Pfeifer M, Szulc SV, Heaton MB, Lee N** (1997) Immunohistochemical localization of netrin-1 in the embryonic chick nervous system. *J. Neurosci.* 15, 5466-5479.
- Maeda N and Noda M** (1998) Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTP beta and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in neuronal migration. *J. Cell Biol.* 142, 203-216.
- Marchant B, Brownlie BEW, Hart DM, Horton PW, Alexander WD** (1977) The placental transfer of propylthiouracil, methimazole and carbamidazole. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45, 1187-1193.
- Mariani J, Crepel F, Mikoshiba K, Changeux JP, Sotelo C** (1977) Anatomical, physiological and biochemical Studies of the cerebellum from *reeler* mutant mouse. *Philosoph. Trans. Royal Soc. London* 281, 1-28.
- Marín-Padilla M** (1971) Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the *Felix domestica*. A Golgi study. I. The primordial neocortical organization. *Z Anat Entwicklungsgesch* 134, 117-145.

- Marín-Padilla M** (1972) Prenatal ontogenic history of the principal neurons of the neocortex of the cat (*Felix domestica*). A Golgi study. II. Developmental differences and their significances. *Z Anat Entwicklungsgesch* 136, 125-142.
- Marín-Padilla M** (1978) Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat. Embryol.* 152, 109-126.
- Marín-Padilla M and Marín-Padilla MT** (1982) Origin, prenatal development and structural organization of layer I of the human cerebral (motor) cortex: a Golgi study. *Anat. Embryol.* 164, 161-206.
- Marín-Padilla M** (1984) Neurons of layer I. A developmental analysis. In: A. Peters and E.G. Jones (Eds.) *Cerebral Cortex, Vol I, Cellular Components of the Cerebral Cortex*, Plenum Press, New York, pp. 447-478.
- Marín-Padilla M** (1988) Early ontogenesis of the human cerebral cortex. In: A. Peters and E.G. Jones (Eds.) *Cerebral Cortex*, Plenum Press, New York, pp. 1-30.
- Marín-Padilla M** (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci.* 21, 64-71.
- Martin GR and Timpl R** (1987) Laminin and other basement membrane components. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, 57-85.
- Martínez S and Alvarado-Mallart RM** (1989) Rostral cerebellum originates from the caudal portion of the so-called mesencephalic vesicle: a study using chick/quail chimeras. *Eur. J. Neurosci.* 1, 549-560.
- Martínez-Galán J, Pedraza P, Santacana M, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G, Ruiz-Marcos A** (1997) Early effects of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus. A model of neurological cretinism. *J. Clin. Invest.* 99, 2701-2709.
- Marty S, Carroll P, Cellerino A, Castren E, Staiger V, Thoenen H, Lindholm D** (1996) Brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of various hippocampal nonpyramidal neurons, including Cajal-Retzius cells, in organotypic slice cultures. *J. Neurosci.* 16, 675-687.
- Mason CA, Christakos S, Catalano SM** (1990) Early climbing fibers interactions with Purkinje cells in postnatal mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 297, 77-90.
- Mastick GS and Easter Jr SS** (1996) Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain. *Dev. Biol.* 173, 79-94.
- Mastick GS, Davis NS, Andrews GL, Easter Jr SS** (1997) Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain. *Development* 124, 1985-1997.
- Mathis L, Bonnerot C, Puelles L, Nicolas JF** (1997) Retrospective clonal analysis of the cerebellum using genetic lac Z/lacZ mouse mosaics. *Development* 124, 4089-4104.

BIBLIOGRAFIA

- McConnell SK**, Ghosh A, Shatz CJ (1989) Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245, 978-982.
- McConnell SK** (1991) The generation of neuronal diversity in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 269-300.
- McConnell SK** (1995) Strategies for the generation of neuronal diversity in the developing central nervous system. *J. Neurosci.* 15, 6987-6998.
- Mehlen P**, Rabizadeh S, Snipas SJ, Ass-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE (1998) The *DCC* gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395, 801-804.
- Meinecke DL and Rakic P** (1992) Expression of GABA and GABA_a receptors by neurons of the subplate zone in developing primate occipital cortex: evidence for transient local circuit. *J. Comp. Neurol.* 317, 91-101.
- Mellström B**, Naranjo JR, Santos A, Gonzalez AM, Bernal J (1991) Independent expression of the α and β c-erbA genes in developing rat brain. *Mol. Endocrinol.* 5, 1339-1350.
- Messer A and Hatch K** (1984) Persistence of cerebellar thymidine kinase in staggerer and hypothyroid mutants. *J. Neurogenet.* 1, 239-248.
- Métin C**, Deléglise D, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M (1997) A role for netrin-1 in the guidance of cortical efferents. *Development* 124, 5063-5074.
- Métin C and Godement P** (1996) The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons. *J. Neurosci.* 16, 3219-3235.
- Meyer G**, Soria JM, Martínez-Galán JR, Martín-Clemente B, Fairén A (1998) Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex. *J. Comp. Neurol.* 397, 493-518.
- Meyer G and Goffinet AM** (1998) Prenatal development of reelin-immunoreactive neurons in the human neocortex. *J. Comp. Neurol.* 397, 29-40.
- Meyerhardt JA**, Caca K, Eckstrand BC, Hug G, Lengauer C, Banavali S, Look AT, Fearon ER (1999) Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas. *Cell Growth Differ.* 10, 35-42.
- Miale I and Sidman RL** (1961) An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Experimental Neurology* 4, 277-296.
- Miller MW** (1988) Development of projection and local circuit neurons in neocortex. In: A. Peters and E.G. Jones (Eds.), *Cerebral Cortex*, Vol 7, New York, London, Plenum Press, pp. 133-175.

- Ming G**, Song H, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo M (1997) cAMP-dependent growth cone guidance by Netrin-1. *Neuron*, 19, 1225-1235.
- Mione MC**, Danevic C, Boardman P, Harris B, Parnavelas JG (1994) Lineage analysis reveals neurotransmitter (GABA or glutamate) but not calcium-binding protein homogeneity in clonally related cortical neurons. *J. Neurosci.* 14, 107-123.
- Mione MC**, Cavanagh JFR, Harris B, Parnavelas JG (1997) Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 17, 2018-2029.
- Misson JP**, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS Jr (1988) Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 44, 95-108.
- Misson JP**, Austin CP, Takahashi T, Cepko CL, Caviness VS Jr (1991a) The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cerebr. Cortex* 1, 221-229.
- Misson JP**, Takahashi T, Caviness VS Jr (1991b) Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia* 4, 138-148.
- Mitchell KJ**, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ (1996) Genetic analysis of netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17, 203-215.
- Mitchison TJ and Cramer LP** (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84, 371-379.
- Miyake T**, Fujiwara T, Fukunaga T, Takemura K, Kitamura T (1993) Allocation of mouse cerebellar granule cells derived from embryonic ventricular progenitors: a study using recombinant virus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 74, 245-252.
- Miyakoshi LM**, Mendez-Otero R, Hedin-Pereira C (2001) The 9-O-acetyl GD3 gangliosides are expressed by migrating chains of subventricular zone neurons in vitro. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 669-673.
- Miyata T**, Nakajima K, Aruga J, Takahashi S, Ikenaka K, Mikoshiba K, Ogawa M (1996) Distribution of *reelin*-gene related antigen in the developing cerebellum: an immunohistochemical study with an allogenic antibody CR-50 on normal and *reeler* mice. *J. Comp. Neurol.* 372, 899–912.
- Miyata T**, Nakajima K, Aruga J, Mikoshiba K, Ogawa M (1997) Regulation of Purkinje cell alignment by reelin as revealed with CR-50 antibody. *J. Neurosci.* 15, 3599–3609.

BIBLIOGRAFIA

- Molnár Z and Blakemore C** (1995) How do thalamic axons find their way to the cortex? *Trends Neurosci.* 18, 389-397.
- Moody SA**, Quigg MS, Frankfurter A (1989) Development of the peripheral trigeminal system in the chick revealed by an isotype-specific anti-beta-tubulin monoclonal antibody. *J. Comp. Neurol.* 279, 567-580.
- Morris SM**, Albrecht U, Reiner O, Eichele G, Yu-Lee LY (1998) The lissencephaly gene product *Lis1*, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, *NudC*. *Curr. Biol.* 8, 603-606.
- Mrzljak L**, Uylings HBM, Kostovic I, van Eden CG (1988) Prenatal development of neurons in the human prefrontal cortex: I. a qualitative Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 271, 355-386.
- Mrzljak L**, Uylings HBM, van Eden CG, Judás M (1990) Neuronal development in human prefrontal cortex in prenatal and postnatal stages. In: H.B.M. Uylings, C.G. van Eden, J.P.C. de Bruin, M.A. Corner, M.G.P. Feenstra (Eds.), *Progress in Brain Research*, Vol. 85, The Prefrontal Cortex: its Structure, Function and Pathology, Amsterdam, Elsevier, pp. 185-222.
- Mugnaini E and Forstronen PF** (1967) Ultrastructural studies on the cerebellar histogenesis. I. Differentiation of granule cells and development of glomeruli in the chick embryo. *Z. Zellforsch.* 77, 115-143.
- Mugnaini E** (1969) Ultrastructural studies on the cerebellar histogenesis II. Maturation of the nerve cell populations and establishment of synaptic connections in the cerebellar cortex of the chick. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*, R. Llinás, ed. American Medical Association Education and Research Foundation, Chicago, pp. 749-782.
- Muñoz A**, Rodríguez-Peña A, Pérez-Castillo A, Ferreiro B, Sutcliffe JG, Bernal J. (1991) Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression. *Mol Endocrinol* 5:273–280.
- Muñoz A**, Wrighton C, Seliger B, Bernal J, Beug H (1993) Thyroid hormone receptor/c-erbA: control of commitment and differentiation in the neuronal/chromaffin progenitor line PC12. *J. Cell Biol.* 121:423–438.
- Muñoz A and Bernal J** (1997) Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur J. Endocrinol* 137:433–445.
- Nadarajah B**, Jones AM, Evans WH, Parnavelas JG (1997) Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. *J. Neurosci.* 17, 3096-3111.
- Nadarajah B**, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong ROL, Pearlman AL (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature Neurosci.* 4, 143-150.

- Naegele J** and Barnstable JC (1989) Molecular determinants of GABAergic local-circuit neurons in the visual cortex. *Trends Neurosci.* 12, 28-34.
- Nakajima N**, Mikoshiba K, Miyata T, Kudo C, Ogawa M (1997). Disruption of hippocampal development *in vivo* by CR-50 mAb against Reelin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8196-8201.
- Nakatsuji M**, Kadokawa Y, Suemori H (1991) Radial columnar patches in the chimeric cerebral cortex visualized by use of mouse embryonic stem cells expressing β -galactosidase. *Dev. Growth Differ.* 33, 571-578
- Neveu I and Arenas E** (1996) Neurotrophins promote the survival and development of neurons in the cerebellum of hypothyroid rats *in vivo*. *J. Cell Biol.* 133, 631– 646.
- Nicholson JL and Altman J** (1972a) The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. *Brain Res.* 44, 13-23.
- Nicholson JL and Altman J** (1972b) The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. II. Synaptogenesis in the molecular layer. *Brain Res.* 44, 25-36.
- Nicholson JL and Altman J** (1972c) Synaptogenesis in the rat cerebellum: effects of early hypo- and hyperthyroidism. *Science* 176, 530-532.
- North D and Fisher DA** (1990) Thyroid hormone receptor and receptor-related RNA levels in developing rat brain. *Pediatr. Res.* 28, 622-625.
- Nuñez J**, Couchie D, Aniello F, Bridoux A (1991) Regulation by thyroid hormone of microtubule assembly and neuronal differentiation. *Neurochem. Res.* 16, 975-982.
- Nuñez J**, Couchie D, Aniello F, Bridoux A (1992) Thyroid hormone effects on neuronal differentiation during brain development. *Acta Med. Austriaca* 19, 36-39.
- Ogawa M**, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K (1995) The *reeler* gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14, 899-912.
- Ohshima T**, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11173–11178.
- Ohshima T**, Ogawa M, Veeranna, Hirasawa M, Longenecker G, Ishiguro K, Pant HC, Brady RO, Kulkarni AB, Mikoshiba K (2001) Synergistic contributions of cyclin-dependant kinase 5/p35 and Reelin/Dab1 to the positioning of cortical neurons in the developing mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2764-2769.

BIBLIOGRAFIA

- Ohta Y**, Suzuki N, Nakamura S, Hartwig JH, Stossel TP (1999) The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2122-2128.
- O'Leary DDM** (1989) Do cortical areas emerge from a protocortex? *Trends Neurosci.* 12, 400-406.
- O'Leary DDM and Borngasser DJ** (1992) Minimal dispersion of neuroepithelial cells and their progeny during generation of the cortical preplate. *Soc. Neurosci. Abstr.* 18, 925.
- Ono K and Kawamura K** (1989) Migration of immature neurons along tangentially oriented fibers in the subpial part of the fetal mouse medulla oblongata. *Exp. Brain Res.* 78, 290-300.
- Ono K and Kawamura K** (1990) Mode of neuronal migration of the pontine stream in fetal mice. *Anat. Embryol.* 182, 11-19.
- Ono K**, Tomaszewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1994) N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13, 595-609.
- Oppenheimer JH** (1983) The nuclear receptor-thyroid hormone complex: relationship to thyroid hormone distribution, metabolism, and biologic action. In: JH Oppenheimer and HH Samuels (Eds.) *Molecular Basis of Thyroid Hormone Action*. Academic Press, New York, pp. 1-32.
- Oppenheimer JH and Schwartz HL** (1997) Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr. Rev.* 18, 462-475.
- O'Rourke NA**, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK (1992) Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258, 299-302.
- O'Rourke NA**, Chen A, McConnell SK (1997) Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone. *Development* 124, 997-1005.
- O'Shea KS**, Rheinheimer JST, Dixit VM (1990) Deposition and role of thrombospondin in the histogenesis of the cerebellar cortex. *J. Cell Biol.* 110, 1275-1283.
- Otero RA**, Sotelo C, Alvarado-Mallart RM (1993) Chick-quail chimeras with partial cerebellar grafts: an analysis of the origin and migration of cerebellar cells. *J. Comp. Neurol.* 33, 579-615.
- Pant AC**, Veeranna, Pant HC, Amin N (1997) Phosphorylation of human high molecular weight neurofilament protein (hNF-H) by neuronal cyclin-dependent kinase 5 (cdk5). *Brain Res.* 765, 259-266.
- Parnavelas JG** et al. (1989) The central visual pathways. In: A. Björklund et al. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy (Vol.7) Integrated systems of the CNS (Part 2)*, Elsevier, pp.1-164.

- Parnavelas JG**, Barfield JA, Franke E, Luskin MB (1991) Separate progenitor cells give rise to pyramidal and nonpyramidal neurons in the rat telencephalon. *Cereb. Cortex* 1, 463-468.
- Parnavelas JG** (2000) The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci.* 23, 126-131.
- Patel AJ**, Hayashi M, Hunt A (1988) Role of thyroid hormone and nerve growth factor in the development of choline acetyltransferase and other cell-specific marker enzymes in the basal forebrain of the rat. *J. Neurochem.* 50, 803– 811.
- Patel AJ**, Rabie A, Lewis P, Balazs R (1976) Effects of thyroid deficiency on postnatal cell formation in the rat brain. A biochemical investigation. *Brain Res.* 104, 33– 48.
- Paudel HK** (1997) Phosphorylation by neuronal cdc2-like protein kinase promotes dimerization of Tau protein *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 272, 28328-28334.
- Paxinos G**, Törk I, Tecott LH, Valentino KL (1994) Atlas of the developing rat brain. Academic Press, Inc.
- Pearlman AL and Sheppard AM** (1996) Extracellular matrix in early cortical development. In: *Progress in Brain Research*, Elsevier, Vol. 108, pp. 117-134.
- Pearlman AL**, Faust PL, Hatten ME and Brunstrom JE (1998). New directions for neuronal migration. *Curr. Op. Neurobiol.* 8, 45-54.
- Pershon E and Schacner M** (1987). immunoelectron microscopic localization of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM during postnatal development of the rat cerebellum. *J. Cell. Biol.* 105, 569-576.
- Pesold C**, Impagnatiello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A, Caruncho HJ (1998) *reelin* is preferentially expressed in neurons synthesizing γ -aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 3221-3226.
- Pesold C**, Liu WS, Guidotti A, Costa E, Caruncho HJ (1999) Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineural nets, nonsynaptically modulating gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3217-3222.
- Pierce ET** (1975) Histogenesis of the deep cerebellar nuclei in the mouse, an autoradiographic study. *Brain Res.* 95, 503-518.
- Pinard JM**, Motte J, Chiron C, Brian C, Andermann E, Dulac O (1994) Subcortical laminar heterotopia and lissencephaly in two brain families: a single X linked dominant gene. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57, 914-920.
- Pinto-Lord MC**, Evrard P, Caviness VS Jr (1982) Obstructed neuronal migration along radial glial fibers in the neocortex of the *reeler* mouse: A Golgi-EM analysis. *Brain Res* 4, 379-393.

BIBLIOGRAFIA

- Pirceau WE**, Cho KR, Getzenberg RH, Reale MA, Hedrick, L. (1994) NIH 3T3 cells expressing the deleted in colorectal carcinoma (*DCC*) tumour suppressor gene product stimulates neurite outgrowth in PC12 pheochromocytoma cells. *J. Cell Biol.* 124, 1017-1027.
- Placzek M**, Tessier-Lavigne M, Jessell T, Dodd J (1990) Orientation of commissural axons in vitro in response to a floor plate-derived chemoattractant. *Development* 110, 19-30.
- Polleux F**, Dehay C, Kennedy H (1997) The timetable of laminar neurogenesis contributes to the specification of cortical areas in mouse isocortex. *J. Comp. Neurol.* 384, 1-22.
- Porterfield SP**, Hendrich CE (1993) The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development. Current perspectives. *Endocr. Rev.* 14, 94 –106.
- Porteus MH**, Bulfone A, Liu JK, Lo LC, Rubenstein JLR (1994) DLX-2, MASH-1 and MAP-2 expression and bromodeoxyuridine incorporation define molecularly distinct cell populations in the embryonic mouse forebrain. *J. Neurosci.* 44, 6370-6383.
- Przyborski SA**, Knowles BB, Ackerman SL (1998) Embryonic phenotype of *unc5h3* mutant mice suggest chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary. *Development* 125, 41-50.
- Puelles L and Rubenstein JLR** (1993) Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* 16, 472-479.
- Raedler E and Raedler A** (1978) Autoradiographic study of early neurogenesis in rat neocortex. *Anat. Embryol.* 154, 267-284.
- Rakic P** (1970) Golgi and electronmicroscopic cytology of migrating granule cells during late stages of histogenesis of macaque cerebellar cortex. *Anat. Rec.* 166, 364.
- Rakic P** (1971a) Neuron-glia relationship during cell migration in developing cerebellar cortex: A Golgi and electron microscopic study in *Macacus rhesus*. *J. Comp. Neurol.* 141, 283-312.
- Rakic P** (1971b) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.* 33, 471-476.
- Rakic P** (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145, 61-84.
- Rakic P** (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time and origin and eventual disposition. *Science* 183, 425-427.
- Rakic P** (1981) Neuron-glia interaction during brain development. *Trends Neurosci.* 4, 184-187.
- Rakic P** (1984) Emergence of neuronal and glial cell lineages in primate brain. In: I.B. Black (Ed.) *Cellular and Molecular biology of Neural Development*, Plenum, New York, pp. 29-50.

- Rakic P** (1985) Contact regulation of neuronal migration. In: G.E. Edelman and J.P. Thiery (Eds.) *The Cell in Contact: Adhesions and Junctions as Morphogenetic Determinants*, Neurosciences Research Foundation, Cambridge, pp. 67-91.
- Rakic P** (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241, 170-176.
- Rakic P** (1990) Principles of neural cell migration. *Experientia* 46, 882-891.
- Rakic P**, Cameron RS, Komuro H (1994) Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 63-69.
- Rakic P and Caviness VS Jr** (1995) Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron* 14, 1101-1103.
- Ramón y Cajal S** (1889) Sobre las fibras nerviosas de la capa granulosa del cerebelo. *Rev. Trim. de Histol. Norm. y Patol.* 3, 4-5.
- Ramón y Cajal S** (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Maloine, Paris, p. 519.
- Reiner O**, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364, 717-721.
- Reiner O**, Albrecht U, Gordon M, Chianese KA, Wong C, Gal-Gerber O, Sapir T, Siracusa LD, Buchberg AM, Caskey CT, Eichele G (1995) Lissencephaly gene (LIS1) expression in the CNS suggests a role in neuronal migration. *J. Neurosci.* 15, 3730-3738.
- Retzius G** (1893) Die Cajalschen Zellen der Grosshirnrinde beim Menschen und bei Säugetieren, *Biol. Untersuch.* 5, 1-9.
- Rice DS**, Sheldon M, D'Arcangelo G, Nakajima K, Goldowitz D, Curran T (1998) Disabled-1 acts downstream of *Reelin* in a signaling pathway that controls laminar organization in the mammalian brain. *Development* 125, 3719–3729.
- Rice DS and Curran T** (1999) Mutant mice with scrambled brains: understanding the signaling pathways that control cell positioning in the CNS. *Genes and Development* 13, 2758-2773.
- Rice DS**, Nusinowitz S, Azimi AM, Martínez A, Soriano E, Curran T (2001) Reelin signaling modulates retinal synaptic circuitry. (enviat a *Neuron*).
- Richards LJ**, Koester SE, Tuttle R, O'Leary DDM (1997) Directed growth of early cortical axons is influenced by a chemoattractant released from an intermediate target. *J. Neurosci.* 17, 2445-2458.
- Rickmann M**, Chronwall BM, Wolff JR (1977) On the development of non-pyramidal neurons and axons outside the cortical plate: the early marginal zone as a pallial anlage. *Anat. Embryol.* 151, 285-307.

BIBLIOGRAFIA

- Rickmann M and Wolff JR** (1981) Differentiation of "preplate" neurons in the pallium of the rat. *Bibliotheca Anat.* 19, 142-146.
- Ringstedt T**, Linnarsson S, Wagner J., Lendahl U, Kokaia Z, Arenas E, Ernfors P, Ibañez CF (1998) BDNF regulates reelin expression and cajal-retzius cell development in the cerebral cortex. *Neuron* 21, 305–315.
- Rio C**, Rieff HI, Qi PM, Corfas G, (1997) Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19, 39-50.
- Rocamora N**, Pascual M, Acksády L, de Lecea L, Freund TF, Soriano E (1996) Expression of NGF and NT3 mRNA in hippocampal interneurons innervated by the GABAergic septo hippocampal pathway. *J. Neurosci.* 16, 3991-4004.
- Rodríguez-Peña A**, Ibarrola N, Iñiguez MA, Muñoz A, Bernal J. (1993) Neonatal hypothyroidism affects the timely expression of myelin-associated glycoprotein in the rat brain. *J. Clin. Invest.* 91, 812– 818.
- Rodríguez MA**, Pesold C, Liu WS, Krio V, Guidotti A, Pappas GD, Costa E (2000) Colocalization of integrin receptors and reelin in dendritic spine postsynaptic densities of adult nonhuman primate cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3550-3555.
- Rosman NP**, Malone MJ, Helfenstein M, Kraft E (1972) The effect of thyroid deficiency on myelination of brain. *Neurology* 22, 99-106.
- Rousselot P**, Lois C, Alvarez-Buylla A (1995) Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J. Comp. Neurol.* 351, 51-61.
- Rubenstein JLR, Shimamura K, Martínez S, Puelles L** (1998) Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 445-477.
- Ryder EF and Cepko CL** (1994) Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* 12, 1011-1029.
- Sabath DE**, Broome HE, Prytowsky MB (1990) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA is a major interleukin 2-induced transcript in a cloned T-helper lymphocyte. *Gene* 91, 185–191.
- Sajdel-Sulkowska EM and Koibuchi N** (2000) Altered CD15 glycolipid expression in the developing cerebellum following treatment with antithyroid drug, propylthiouracil. *Endocr. J.* 47, 353-358.
- Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Ed 2, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbour Laboratory.

- Sanes JR** (1989) Analyzing cell lineages with a recombinant retrovirus. *Trends Neurosci.* 12, 21-28.
- Santiago MF**, Berredo-Pinho M, Costa MR, Gandra M, Cavalcante LA, Mendez-Otero R (2001) Expression and function of ganglioside 9-O-acetyl GD3 in postmitotic granule cell development. *Mol. Cell Neurosci.* 17, 488-499.
- Sapir T**, Elbaum M, Reiner O (1997) Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J.* 16, 6977-6984.
- Sauer FC** (1935) Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* 62, 377-405.
- Schmechel DE and Rakic P** (1979a) A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol.* 156, 115-132.
- Schmechel DE and Rakic P** (1979b) Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. *Nature* 227, 303-305.
- Schiffmann SN**, Bernier B, Goffinet A (1997) *reelin* mRNA expression during mouse brain development. *Eur J. Neurosci.* 9, 1055-1071.
- Schlaggar BL and O'Leary DDM** (1991) Potential of visual-cortex to develop an array of functional units unique to somatosensory cortex. *Science* 252, 1556-1560.
- Schwartz H**, Strait K, Ling N, Oppenheimer J (1992) Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J. Biol. Chem.* 267, 11794-11799.
- Schwartz HL**, Ross M, Oppenheimer JH (1997) Lack of effect of thyroid hormone on late fetal rat brain development. *Endocrinology* 138, 3119-3124.
- Sengupta A**, Wu K, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh TJ (1997) Potentiation of GSK-3-catalysed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol. Cell Biochem.* 167, 99-105.
- Senzaki K**, Ogawa M, Yagi T (1999) Protein of the CNR family are multiple receptors for reelin. *Cell* 99,635-647.
- Serafini T**, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM and Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* unc-6. *Cell* 78, 409-424.
- Serafini T**, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, and Tessier-Lavigne M (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87, 1001-1014.
- Sharma CP**, Ezzel RM, Arnaout RM (1995) Direct interaction of filamin (ABP-280) with the β 2-integrin subunit CD18. *J. Immunol.* 154, 3461-3470.

BIBLIOGRAFIA

- Sheldon M**, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, Howell BW, Cooper JA, Goldowitz D, Curran T (1997). *Scrambler* and *yotari* disrupt the disabled gene and produce a *reeler*-like phenotype in mice. *Nature* 389, 730-733.
- Sheppard AM**, Brunstrom JE, Thornton TN, Gerfen RW, Broekelmann TJ, McDonald JA, Pearlman (1995) Neuronal production of fibronectin in the cerebral cortex during migration and layer formation is unique to specific cortical domains. *Dev. Biol.* 172, 504-518.
- Sheppard AM and Pearlman AL** (1997) Abnormal reorganization of preplate neurons and their associated extracellular matrix: an early manifestation of altered neocortical development in the *reeler* mutant mouse. *J. Comp. Neurol.* 378, 173-179.
- Shetty KT**, Link WT, Pant HC (1993) cdc2-like kinase from rat spinal cord specifically phosphorylates KSPXK motifs in neurofilament proteins: isolation and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6844-6848.
- Shirasaki R**, Tamada A, Katsumata R and Murakami F (1995) Guidance of cerebellofugal axons in the rat embryo: Directed Growth toward the floor plate and subsequent elongation along the longitudinal axis. *Neuron* 14, 961-972.
- Shirasaki R**, Tamada A, Katsumata R, Murakami F (1995) Guidance of cerebellofugal axons in the rat embryo: Directed growth toward the *floor plate* and subsequent elongation along the longitudinal axis. *Neuron* 14, 961-972.
- Shirasaki R**, Mirzayan C, Tessier-Lavigne M and Murakami F (1996) Guidance of circumferentially growing axons by netrin-dependent and -independent floor plate chemotropism in the vertebrate brain. *Neuron* 17, 1079-1088.
- Shirasaki R**, Katsumata R and Murakami F (1998) Change in chemoattractant responsiveness of developing axons at an intermediate target. *Science* 279, 105-107.
- Sidman RL** (1962) Staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science* 137, 610-612.
- Sidman RL** (1968) Development of interneuronal connections in brains of mutant mice. In: F. Carlson (Ed.), *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*, pp. 163-193.
- Sidman RL**, Angevine JB Jr, Taber-Pierce E (1971) *Atlas of the mouse brain and spinal cord*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Sidman RL and Rakic P** (1973) Neuronal migration with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.* 62, 1-35.
- Sidman RL** (1983) Experimental neurogenetics. In: E. Kety, L.P. Rowland, R.L Sidman, S.W. Mathysse (Eds.) *Genetics of Neurological and Psychiatric Disorders*, New York, Raven, pp. 19-46.

- Sik A**, Hajos N, Gulacsi A, Mody I, Freund TF (1998) The absence of a major Ca²⁺ signaling pathway in GABAergic neurons of the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3245-3250.
- Silva JE and Rudas P** (1990) Effects of congenital hypothyroidism on microtubule-associated protein-2 expression in the cerebellum of the rat. *Endocrinology* 126, 1276-1282.
- Sim HJ**, Cho KH, Chung HS (1999) mRNA expression of netrin-1, an axon guidance protein in chick and rat embryos. *Mol. Cells* 9, 245-251.
- Singer SJ and Kupfer A** (1986) The directed migration of eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2, 337-365.
- Smart IHM** (1983) Three dimensional growth of the mouse isocortex. *J. Anat.* 137, 683-694.
- Soriano E**, Del Río JA, Martínez A, and Supèr H (1994) Organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterization of neuronal populations in the subplate and marginal zone. *J. Comp. Neurol.* 342, 571-595.
- Soriano E**, Dumesnil N, Auladell C, Cohen-Tannoudji M, Sotelo C (1995) Molecular heterogeneity of progenitors and radial migration in the developing cerebral cortex revealed by transgenic expression. *Proc. Acad. Sci. USA*, 92, 11676-11680.
- Soriano E**, Alvarado-Mallart RM, Dumesnil N, Del Rio JA, Sotelo C (1997) Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron* 18, 563-577.
- Sotelo C**, Alvarado-Mallart RM, Frain M, Vernet M (1994) Molecular plasticity of adult Bergmann fibers is associated with radial migration of grafted Purkinje cells. *J. Neurosci.* 14, 124-133.
- Stein SA**, Adams PM, Shanklin DR, Mihailoff GA, Palnitkar MB (1991) Thyroid hormone control of brain and motor development: molecular, neuroanatomical, and behavioral studies. In: B. Bercu, D. Shulman (Eds.) *Advances in Perinatal Thyroidology*. Plenum Press, New York, pp. 47-105.
- Stewart GR and Pearlman AL** (1987) Fibronectin-like immunoreactivity in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 7, 3325-3333.
- Stoeckli ET and Landmesser LT** (1995) Axonin-1, Nr-CAM and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 14, 1165-1179.
- Stoppini L**, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 37, 173-182.

BIBLIOGRAFIA

- Stoykova A**, Götz M, Gruss P, Price J. (1997) *Pax-6*-dependent regulation of adhesive patterning, R-Cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. *Development* 3765-3777.
- Strait KA**, Schwartz HL, Pérez-Castillo A, Oppenheimer JH (1990) Relationship of c-erbA mRNA content to tissue triiodothyronine nuclear binding capacity and function in developing and adult rats. *J. Biol. Chem.* 265, 10514-10521.
- Strait KA**, Schwartz HL, Seybold VS, Ling NC, Oppenheimer JH (1991) Immunofluorescent localization of thyroid hormone receptor protein $\beta 1$ and variant $\alpha 2$ in selected tissues: cerebellar Purkinje cells as a model for $\beta 1$ receptor mediated developmental effects of thyroid hormone in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3887-3891.
- Sun D**, Leung CL, Liem RKH (1996) Phosphorylation of the high molecular weight neurofilament protein (NF-H) by Cdk5 and p35. *J. Biol. Chem.* 271, 14245-14251.
- Supèr H**, del Río JA, Martínez A, Pérez-Sust P, Soriano E (2000) Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb. Cortex* 10, 602-613.
- Supèr H**, Soriano E, Uylings HBM (1998a) The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Research Reviews* 27, 40-64.
- Supèr H**, Martínez A, Del Río JA, Soriano E (1998b). Involvement of distinct pioneer neurons in the formation of layer-specific connections in the hippocampus. *J. Neurosci.* 18, 4616-4626.
- Sussel L**, Marin O, Kimura S, Rubenstein JL (1999) Loss of Nkx 2.1 homeobox gene function results in ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126, 3359-3370.
- Sweet HO**, Bronson RT, Johnson KR, Cook SA, Davisson MT (1996) Scrambler, a new neurological mutation of the mouse with abnormalities of neuronal migration. *Mamm. Genome* 7, 798-802.
- Szentágothai J** (1973) Synaptology of the visual cortex. In: R. Jung (Ed.), *Handbook of Sensory Physiology (Vol VII/3) Central Processing of Visual Information (Part B)*, Springer-Verlag, pp. 141-176.
- Taber-Pierce E** (1966) Histogenesis of the nuclei griseum pontis, corporis pontobulbaris and reticularis tegmenti pontis (Bechterew) in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 129, 219-240.
- Takahashi T**, Nowakowski RS, Caviness VS Jr (1995) The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic cerebral wall. *J. Neurosci.* 15, 6046-6057.
- Tamada A**, Shirasaki R, Murakami F (1995) Floor plate chemoattracts crossed axons and chemorepels uncrossed axons in the vertebrate brain. *Neuron* 14, 1083-1093.

- Tamamaki N**, Fujimori E, Takauji R (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J. Neurosci.* 17, 8313-8323.
- Tan S-S and Breen SJ** (1993) Radial mosaicism and tangential dispersion both contribute to mouse neocortex development. *Nature* 362, 638-640.
- Tan S-S**, Kalloniatis M, Sturm K, Tam PPL, Reese BE, Faulkner-Jones B (1998) Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron* 21, 295-304.
- Tessier-Lavigne M**, Placzek M, Lumsden A, Dodd J, Jessell T (1988) Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336, 775-778.
- Tessier-Lavigne M and Goodman CS** (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1132.
- Thompson CC** (1996) Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and hairless homologue. *J. Neurosci.* 16, 7832-7840.
- Thompson CC and Bottcher M** (1997) The product of a thyroid hormone-responsive gene interacts with thyroid hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8527-8532.
- Tomasiewicz H**, Ono K, Yee D, Thompson C, Goridis C, Rutishauser U, Magnuson T (1993) Genetic deletion of neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 11, 1163-1174.
- Trommsdorff M**, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J (1999) Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, 689-701.
- Turner D and Cepko C** (1987) Cell lineage in the rat retina: a common progenitor for neurons and glia persists late in the development. *Nature* 328, 131-136.
- Utsunomiya-Tate N**, Kubo K, Tate S, Kainosho M, Katayama E, Nakajima K, Mikoshiba K (2000) Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 9729-9734.
- Uylings HBM**, van Eden CG, Parnavelas JG, Kalsbeek A (1990) The prenatal and postnatal development of rat cerebral cortex. In: E. Kolb and R.C. Tees (Eds.), *The Cerebral Cortex of the Rat*, MIT Press, Cambridge, MA, pp. 35-76.
- Uylings HBM and Delalle I** (1997) Morphology of NPY-ir neurons and fibers in human prefrontal cortex during prenatal and postnatal development. *J. Comp. Neurol.* 397, 523-540.
- Varela-Echevarria A**, Tucker A, Püschell AW, Guthrie S (1997) Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 18, 193-207.

BIBLIOGRAFIA

- Vennström B and Bishop JM** (1982) Isolation and characterization of chicken DNA homologous to the two putative oncogenes of avian erythroblastosis virus. *Cell* 28, 135–143.
- Voigt T** (1989) Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J. Comp. Neurol.* 289, 74-88.
- Wadsworth WG, Bhatt H, Hedgecock EM** (1996) Neuroglia and pioneer neurons express UNC-6 to provide global and local netrin cues for guiding migrations in *C. elegans*. *Neuron* 16, 35-46.
- Walker P, Weichsel ME, Eveleth D, Fisher DA** (1982) Ontogenesis of nerve growth factor and epidermal growth factor in submaxillary glands and nerve growth factor in brains of immature male mice: correlation with ontogenesis of serum levels of thyroid hormones. *Pediatr. Res.* 16, 520–524.
- Walsh C and Cepko CL** (1988) Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241, 1342-1345.
- Walsh C and Cepko CL** (1992) Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* 255, 434-440.
- Walsh C and Cepko CL** (1993) Clonal dispersion in proliferative layers of developing cerebral cortex. *Nature* 362, 535-632.
- Walsh FS and Doherty P** (1997) Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in axon growth and guidance. *Annual Review Cell Development Biology* 13, 425-456.
- Walsh CA** (1999) Genetic malformations of the human cerebral cortex. *Neuron* 23, 19-29.
- Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, Tessier-Lavigne M** (1999) Biochemical purification of a mammalian Slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96, 771-784.
- Ware ML, Fox JW, Gonzalez JL, Davis NM, Deroubroit CM, Russo CJ, Chua SC, Goffinet AM, Walsh CA** (1997) Aberrant splicing of a mouse *disabled* homolog, *mdab1*, in the scrambler mouse. *Neuron* 19, 239-249.
- Wassef M, Zanetta JP, Brehier A, Sotelo C.** (1985) Transient biochemical compartmentalization of Purkinje cells during early cerebellar development. *Developmental Biology* 111, 129-137.
- Wichterle H, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.** (1997) Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18, 779-791.
- Wichterle H, García-Verdugo JM, Herrera DG, Alvarez-Buylla A** (1999) Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat. Neurosci.* 2, 461-466.
- Wilkins AS** (1993) Genetic analysis of animal development. Wiley-Liss. New York.

- Williams BP and Price J** (1995) Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex. *Neuron* 14, 1181-1188.
- Wilson SW**, Placzek M, Furley AJ (1993) Border disputes: do boundaries play a role in growth-cone guidance?. *Trends Neurosci.* 16, 316-323.
- Winberg ML**, Mitchell KJ, Goodman CS (1998) Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of Netrins, Semaphorins, and IgCAMs. *Cell* 93, 581-591.
- Windrem MS and Finlay BL** (1991) Thalamic ablations and neocortical development: alterations of cortical cytoarchitecture and cell number. *Cereb. Cortex* 1, 230-240.
- Wolfer DP**, Henehan-Beatty A, Stoeckli ET, Sondererger P, Lipp HP (1994) Distribution of TAG-1/axonin-1 in fibre tracts and migratory streams of the developing mouse nervous system. *J. Comp. Neurol.* 345, 1-32.
- Wong V**, Glass DJ, Arriaga R, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Conn G (1997) Hepatocyte growth factor promotes motor neuron survival and synergizes with ciliary neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* 272, 5187-5191.
- Wood JG**, Martin S, Price DJ (1992) Evidence that the earliest generated cells of the murine cerebral cortex form a transient population in the subplate and the marginal zone. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 66, 137-140.
- Wu W**, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y (1999) Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400, 331-336.
- Xanthoudakis S**, Miao G, Wang F, Pan YC, Curran T (1992) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* 11, 3323-3335.
- Yamada T**, Kajihara A, Takemura Y, Onaya T (1974) Antithyroid compounds. In: M.A. Greer and D.H. Solomon (Eds.), *Handbook of Physiology*, section 7, Vol. 3, Washington, American Physiology Society, pp. 345-357.
- Yamamoto M**, Hassinger L, Crandall JE (1990) Ultrastructural localization of stage-specific neurite associated proteins in the developing rat cerebral and cerebellar cortices. *J. Neurocytol.* 19, 619-627.
- Yee KT**, Simon HH, Tessier-Lavigne M, O'Leary DDM (1999) Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant Netrin-1. *Neuron*, 24, 607-622.
- Yip JW**, Yip YPL, Capriotti C, Nakajima K (1998) Migration of sympathetic preganglionic neurons in the *reeler* mutant mouse is abnormal. *Abs. Soc. Neurosci.* 24, 1771.

BIBLIOGRAFIA

- Yoneshima H**, Nagata E, Matsumoto M, Yamada M, Makajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K (1997) A novel neurological mutant mouse, *yotari*, which exhibits *reeler*-like phenotype but expresses CR-50 antigen/reelin. *Neurosci. Res.* 29, 217–223.
- Yuan W**, Zhou L, Chen J, Wu JY, Rao Y, Ornitz DM (1999) The mouse Slit family: secreted ligands for Robo expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev. Biol.* 212, 290-306.
- Yuasa S**, Kawamura K, Ono K, Yamakuni T, Takahashi Y (1991) Development and migration of Purkinje cells in the mouse cerebellar primordium. *Anat. Embryol.* 184, 195-212.
- Zhang L and Goldman JE** (1996) Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron* 16, 47-54.
- Zhang W**, Han SW, Mckeel DW, Goate A, Wu JY (1998) Interaction of presenilins with the filamin family of actin-binding proteins. *J. Neurosci.* 18, 914-922.
- Zheng C**, Heintz N, Hatten ME (1996) CNS gene encoding Astrotactin, which supports neuronal migration along glial fibers. *Science* 272, 417-419.
- Zhu Y**, Li HS, Zhou L, Wu JY, Rao Y (1999) Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* 23, 473-485.
- Zilles K** (1985) The cortex of the rat. A stereotaxic atlas. Springer Verlag, Berlin.