



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Nuevas funciones de moléculas de remodelación vascular durante el desarrollo y modulación de la corteza cerebral de ratón

Agata Mata Rodríguez

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universidad de Barcelona  
Facultad de Biología  
Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

## **Nuevas funciones de moléculas de remodelación vascular durante el desarrollo y modulación de la corteza cerebral de ratón**

Memoria presentada por Agata Mata Rodríguez, licenciada en Biología, para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido inscrita dentro del programa de doctorado de Biomedicina, bienio 2015-2016, de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados bajo la dirección de la Dra. Vanessa Gil Fernández, Investigadora Postdoctoral en el Instituto de Bioingeniería de Cataluña, y el Dr. José Antonio del Río Fernández, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, 2017

Directora de la tesis  
Dra. Vanessa Gil Fernández

Codirector y tutor de la tesis  
Dr. José Antonio del Río  
Fernández

La Doctoranda  
Agata Mata Rodríguez



# Índice



<b>Índice.....</b>	<b>3</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>9</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Desarrollo del sistema nervioso central</b>	<b>19</b>
1.1. Formación del tubo neural	19
1.2. Inducción neural	20
1.3. Definición de los ejes neurales antero-posterior y dorso-ventral	21
1.3.1. Eje antero-posterior	21
1.3.2. Eje dorso-ventral	22
1.3.3. Modelo prosomérico	23
1.4. Especificación del tejido neural: neurogénesis	24
1.5. Migración neuronal en el cerebro anterior	25
1.5.1. Migración radial	25
1.5.2. Migración tangencial	28
1.6. Neuritogénesis	34
1.6.1. Crecimiento y guía axonal	37
<b>2. Desarrollo del sistema neurovascular</b>	<b>41</b>
2.1. Células del frente de avance vascular vs cono de crecimiento axonal	42
<b>3. La formación hipocámpica</b>	<b>45</b>
3.1. Anatomía de la formación hipocámpica	45
3.2.1. Hipocampo propio	47
3.2.2. Giro dentado	48
3.2.3. Corteza entorrinal	49
3.2.4. Complejo subicular	50
3.3. Conexiones principales de la FH	50
3.3.1. Conexiones intrínsecas: el circuito trisináptico	50
3.3.2. Conexiones intrínsecas: Proyecciones asociativas/comisurales	53
3.3.3. Conexiones extrínsecas: aferencias y eferencias de la FH	54
3.4. Desarrollo del hipocampo	54
3.4.1. Neurogénesis y migración en el hipocampo	54
3.4.2. Desarrollo de las principales conexiones de la formación hipocámpica	57
3.5. Neurogénesis adulta	59
3.5.1. Neurogénesis en la zona subgranular del DG	59
<b>4. Las semaforinas</b>	<b>69</b>

4.1. Las semaforinas y sus receptores	69
4.2. Semaforinas de la clase 3:	72
4.3. Funciones de Sema3E/PlexinD1	73
<b>5. Las angiopoyetinas</b>	<b>75</b>
5.1. Angiopoyetinas y sus receptores	75
5.1.1. Estructura	75
5.1.2. Funciones de Angiopoyetinas a través de los receptores Tie e Integrina	77
<b>Objetivos.....</b>	<b>79</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>85</b>
<b>Capítulo 1: Estudio del papel de Sema3E/PlexinD1 en el desarrollo             de las conexiones del hipocampo</b>	<b>87</b>
1.1. Análisis del patrón de expresión de Sema3e y Plxnd1 en la formación hipocámpica (FH) en desarrollo	89
1.2. Estudio de las funciones de Sema3E/PlexinD1 sobre los axones de diferentes regiones de la FH en desarrollo	91
1.3. Estudio de la función de Sema3E/PlexinD1 en el establecimiento de la conexión entorrino-hipocámpica (EH)	97
<b>Capítulo 2: Estudio del papel de Sema3E/PlexinD1             en el hipocampo postnatal y adulto</b>	<b>103</b>
2.1. Caracterización citoarquitectónica del hipocampo postnatal y adulto en ausencia de Sema3E o PlexinD1	105
2.2. Análisis de las conexiones principales del hipocampo adulto en ausencia de Sema3E o PlexinD1	109
2.3. Análisis de la función de Sema3E/PlexinD1 en el proceso de neurogénesis de la zona subgranular del giro dentado	112
2.4. Análisis de la actividad eléctrica del hipocampo en ausencia de Sema3E	116
<b>Capítulo 3: Estudio del papel de ANG1 y sus receptores durante el             desarrollo del hipocampo</b>	<b>121</b>
3.1. Análisis del patrón de expresión de Ang1 y sus receptores en la FH en desarrollo	123
3.2. Análisis de la expresión de ANG1 y sus receptores en cultivos neuronales	124
3.3. Estudio del papel de ANG1 sobre la longitud neurítica y el crecimiento axónico en cultivos neuronales	127
<b>Discusión.....</b>	<b>131</b>
<b>Capítulo 1: Papel de Sema3E/PlexinD1 en el desarrollo de las conexiones del             hipocampo y en la FH postnatal y adulta</b>	<b>133</b>

---

1.1. Papel de Sema3E/PlexinD1 en el desarrollo de las conexiones del hipocampo	136
1.2 Papel de Sema3E/PlexinD1 en el hipocampo postnatal y adulto	141
<b>Capítulo 2: Papel de ANG1 y sus receptores durante el desarrollo del hipocampo</b>	<b>149</b>
2.1. <i>Ang1</i> y sus receptores se expresan en el hipocampo en desarrollo	151
2.2. ANG1 promueve el crecimiento neurítico	153
<b>Conclusiones.....</b>	<b>157</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>161</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>177</b>



# Abreviaturas



---

ABC	Avidina-Biotina peroxidase
ABPs	del inglés, <i>Actin-Binding Proteins</i>
Ang	Angiopoyetina
aRGs	del inglés, <i>Apical Radial Glial Cells</i>
AVE	del inglés, <i>Anterior Visceral Endoderm</i>
BDA	del inglés, Biotinylated Dextran Amine
BDNF	del inglés, Brain Derived Neurotrophic Factor
bHLH	del inglés, <i>bHelix-loop-helix</i>
BLBP	del inglés, <i>Brain Lipid-Binding Protein</i>
BMPs	del inglés, <i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
BrdU	del inglés, <i>Bromodeoxyuridine</i>
BSA-FITC	albúmina de suero bovino marcado con isotiocianato de fluoresceína
CA	del latín, <i>Cornu Ammonis</i>
CALB	Calbindina
CALR	Calretinina
CGE	del inglés, <i>Caudal Ganglionic Eminence</i>
CH	del inglés, <i>Cortical Hem</i>
Cing	Corteza Cingulada
coa	núcleo amigdaloides cortical anterior
CP	del inglés, <i>Cortical Plate</i>
Cpe	del inglés, <i>Choroid Plexus</i>
CPu	Caudado Putamen (estriado)
CR	Cajal-Retzius
CXCL12	del inglés, <i>C-X-C motif chemokine 12</i>
DAB	Diaminobenzina
DC	del inglés, <i>Dorsolateral Cortex</i>
DCX	Doblecortina
DEPC	Dietilpirocarbonato

## Abreviaturas

---

DG	del inglés, <i>Dentate Gyrus</i>
DiI	1,1', dioctadecyl-3,3,3'3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato
DIV	días in vitro
DLHPs	del inglés, <i>Dorsolateral Hinge Points</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNE	del inglés, <i>Dentate Neuroepithelium</i>
EC	del inglés, <i>Entorhinal Cortex</i>
ECs	del inglés, <i>Endothelial cells</i>
EDTA	del inglés, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	del inglés, <i>Epidermal Growth Factor</i>
EH	Entorrino-hipocámpica
Eth	del latín, <i>Eminentia thalami</i>
FBS	del inglés, <i>Fetal Bovine Serum</i>
FGFs	del inglés, <i>Fibroblast Growth Factors</i>
FH	Formación hipocámpica
FNIII	Fibronectina tipo III
GAPDH	Gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa
GAPs	del inglés, <i>GTPase-activating proteins</i>
GCL	del inglés, <i>Granular Cell Layer</i>
GDP	del inglés, <i>Guanosine Diphosphate</i>
GEFs	del inglés, <i>Guanine Nucleotide Exchange Factors</i>
GFAP	del inglés, <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFP	del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	del inglés, <i>Guanosine Triphosphate</i>
h	hilus
H	Hipocampo propio
HbN	del inglés, <i>Habenular Nucleus</i>
HCl	Ácido clorhídrico

---

HF	del inglés, <i>Hippocampal Fissure</i>
HNE	del inglés, <i>Hippocampal Neuroepithelium</i>
Ig	Inmunoglobulina
IGF	del inglés, <i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL-6	del inglés, <i>Interleukin-6</i>
IML	del inglés, <i>Internal Molecular Layer</i>
INVP	del inglés, <i>Intraneural Vasculas Plexus</i>
IPCs	del inglés, <i>Intermediate Progenitor Cells</i>
Itgb1	Integrina $\beta$ 1
IZ	del inglés, <i>Intermediate Zone</i>
LEA	del inglés, <i>Lateral Entorhinal Area</i>
LFP	del inglés, <i>Local Field Potential</i>
L-MPtA	del inglés, <i>Lateral and Medial Parietal Associational cortices</i>
LV	del inglés, <i>Lateral Ventricle</i>
MEA	del inglés, <i>Medial Entorhinal Area</i>
MGE	del inglés, <i>Medial Ganglionic Eminence</i>
MHP	del inglés, <i>Median Hinge Point</i>
ML	del inglés, <i>Molecular Layer</i>
MML	del inglés, <i>Medial Molecular Layer</i>
MZ	del inglés, <i>Marginal Zone</i>
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato sódico
NBT/BCIP	<i>Nitroblue tetrazolium</i> y 5-bromo-4-cloro-3-indóilfosfato
NCx	Neocorteza
NGS	del inglés, <i>Normal Goat Serum</i>
NHS	del inglés, <i>Normal Horse Serum</i>
NICD	del inglés, <i>Notch Intracellular Domain</i>
Np	Neuropilina
NT4	Neurotrofina-4

## Abreviaturas

---

OML	del inglés, <i>Outer Molecular Layer</i>
P/D	Ratio Proximal/Distal
PaS	del latín, <i>Parasubiculum</i>
PB	del inglés, <i>Phosphate Buffer</i>
PBS	del inglés, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCL	del inglés, <i>Pyramidal Cell Layer</i>
PFA	Paraformaldehido
PIPES	del inglés, <i>Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>
Pir	Corteza Piriforme
PlxnD1	PlexinaD1
PNVP	del inglés, <i>Perineural Vascular Plexus</i>
POA	del inglés, <i>Preoptic Area</i>
PP	Preplaca
PreS	del latín, <i>Presubiculum</i>
PSA-NCAM	del inglés, <i>Polysialylated Neuronal Cell Adhesion Molecule</i>
PSB	del inglés, <i>Pallial-Subpallial Boundary</i>
PSI	Plexina-Semaforina-Integrina
PV	Parvalbumina
RMTW	del inglés, <i>Rostral Medial Telencephalic Wall</i>
RSG	del inglés, <i>Retrosplenial Granular Cortex</i>
S	Septum
S1BF	del inglés, <i>First Somatosensory Barrel Field</i>
SDS	del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SGZ	del inglés, <i>Subgranular Zone</i>
SHH	del inglés, <i>Sonic Hedgehog</i>
SLM	del latín, <i>stratum lacunosum-moleculare</i>
SMCs	del inglés, <i>Smooth muscle cells</i>
SNC	Sistema Nervioso Central

SNP	Sistema Nervioso Periférico
Sox2	del inglés, <i>Sry-related HMG box transcription factor</i>
SP	Subplaca
SP	Subplaca
SPO	Sinaptorina
SSC	del inglés, <i>Saline Sodium Citrate</i>
Sub	del latín, <i>Subiculum</i>
SVZ	del inglés, <i>Subventricular Zone</i>
TBST	del inglés, <i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
TGF- $\beta$	del inglés, <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNF- $\alpha$	del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
VC	del inglés, <i>Ventrolateral Cortex</i>
VEGF	del inglés, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VZ	del inglés, <i>Ventricular Zone</i>
WM	del inglés, <i>White Matter</i>
Wnts	de la combinación de los genes <i>Wingless</i> e <i>Int</i>



# Introducción



## 1. Desarrollo del sistema nervioso central

### 1.1. Formación del tubo neural

Al inicio de la embriogénesis, aparecen en los embriones de mamíferos tres capas germinales denominadas ectodermo, endodermo y mesodermo. En el ratón, ya están presentes en el día embrionario 6.5 (E6.5). De estas tres capas germinales se originarán los diferentes tejidos y órganos. El ectodermo es la capa más externa y es la que da lugar a la epidermis, al sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). Durante el desarrollo, el ectodermo se diferencia en neuroectodermo (monocapa pseudoestratificada), cresta neural y epidermis (Gilbert, 2000; Kandel et al., 2000).

Una vez formado el neuroectodermo, los precursores neurales comienzan a proliferar para formar la placa neural (Figura 1), que se estrecha de forma mediolateral, y se alarga de forma rostrocaudal por un proceso de extensión convergente. Las células de la placa neural comienzan a engrosarse y se vuelven cilíndricas de forma que se elevan por encima del resto de células del neuroectodermo. A partir de la placa neural se originarán todas las células neurales y gliales del SNC, a excepción de la microglía, que tiene un origen mesodérmico (Kandel et al., 2000).

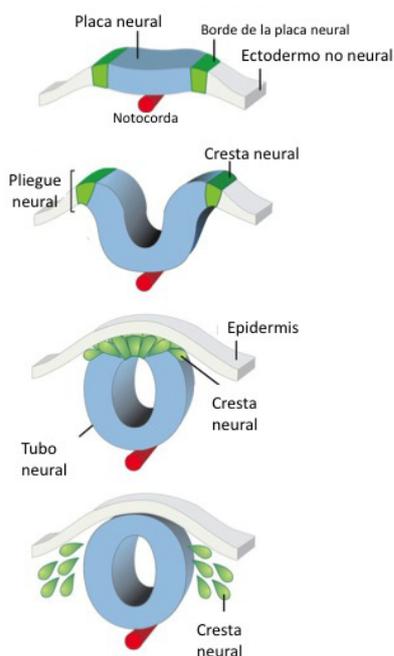


Figura 1. Desarrollo de la placa neural y formación del tubo neural por el proceso de inducción neural. Definición del eje dorsoventral y línea media dorsal del embrión (Adaptado de Simões-Costa and Bronner, 2015)

Posteriormente, ocurre el proceso de neurulación primaria por el cual la placa neural se invagina hacia la notocorda y origina unos pliegues neurales bilaterales que se elevan y acaban entrando en contacto en la línea media, donde se formará la placa del techo y la línea media dorsal del embrión (Figura 1). Durante este plegamiento se originan unos puntos bisagra situados en la parte medial y dorsolateral de la placa neural, que permiten dicho proceso: MHP (del inglés, *Median Hinge Point*) y DLHPs (del inglés, *Dorsolateral Hinge Points*). Se forma así el tubo neural, que a su vez acaba cubierto por la epidermis que en un principio flanqueaba la placa neural (Kandel et al., 2000), y se forma también la cresta neural (Figura 1). Las células de la cresta neural originan las neuronas y glía del SNP. En el proceso de elevación de los pliegues bilaterales se forma el surco neural que será el lumen del tubo neural y el origen del sistema ventricular del SNC.

Con la formación del tubo neural culmina el proceso de neurulación primaria que dará lugar a la formación del cerebro y gran parte de la médula espinal. Durante este proceso, el cierre del tubo neural en mamíferos comienza simultáneamente en varios puntos a lo largo del eje anteroposterior. Posteriormente tiene lugar un proceso de neurulación secundaria que ocurre en los niveles más caudales del tubo neural, y por el cual se termina originando la porción más baja de la médula espinal ((Copp et al., 2003) para revisión). Durante el proceso de neurulación no solo participa el neuroectodermo sino que también participan los tejidos que se encuentran alrededor, como la epidermis, el mesodermo y la notocorda ((Nikolopoulou et al., 2017) para revisión).

### 1.2. Inducción neural

La diferenciación del ectodermo en neuroectodermo, ocurre por un proceso denominado inducción neural, que en el ratón comienza a E7.5. Este proceso de inducción neural se ha estudiado sobre todo en *Xenopus*, siendo los estudios de Spemann y Mangold los primeros en demostrar este fenómeno (Spemann y Mangold, 1924). A partir de estos trabajos se definió en el embrión de *Xenopus*, una región denominada *Organizador*, que posteriormente se observó que también estaba presente en aves y mamíferos, en los cuales recibió el nombre de *Nodo*, presente en el mesodermo dorsal (Beddington, 1994; Rogers et al., 2009; Smith and Schoenwolf, 1998; Waddington, 1933, 1936).

Estas regiones liberan pequeñas moléculas difusibles, como son la *nogina*, *folistatina* y *cordina* (Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Lamb et al., 1993; Sasai et al., 1995; Sasai et al., 1994; Smith and Harland, 1992; Smith et al., 1993) que dan lugar a dicha inducción. Estas moléculas se unen a las proteínas morfogénicas BMPs (del inglés *Bone Morphogenetic Factor*) e inhiben su actividad, lo que se conoce como el *modelo por defecto* de inducción neural (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997). Según este modelo, las células del ectodermo tienden a diferenciarse en tejido neural, a no ser que las proteínas BMPs sean funcionales, ya que actúan como inductores de la epidermis (en particular BMP4) (Sasai et al., 1995; Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995; Xu et al., 1995). No obstante, el *modelo por defecto* no es suficiente para explicar el proceso de inducción neural puesto que se ha visto que también intervienen otros morfógenos, como son Wnts (nombre que proviene de la combinación de *Wingless* e *Int*, genes homólogos aislados de forma independiente) y FGFs (del inglés *Fibroblast Growth Factor*). Las proteínas Wnts, al igual que BMPs promueven el destino epidérmico, mientras que los FGFs promueven la inducción neural. Los FGFs promueven la expresión de antagonistas de BMPs como *Cordina* y *Nogina* y

la expresión de genes neurales tempranos. Por otro lado, inhiben la transcripción de *Bmps*, e inhiben la expresión de genes tempranos mesodérmicos (Sheng et al., 2003; Streit et al., 2000; Streit et al., 1998; Wilson et al., 2000).

### **1.3. Definición de los ejes neurales antero-posterior y dorso-ventral**

La definición de los ejes antero-posterior y dorso-ventral se da desde el momento en el que ocurre la inducción neural. Las células de la placa neural reciben distintas señales que la regionalizan progresivamente en ambos ejes. Dependiendo de la distancia de las células a las distintas señales y de su capacidad para responder a ellas, se van estableciendo en la placa neural territorios heterogéneos de progenitores neurales. Posteriormente, éstos formarán las distintas partes del tubo neural y finalmente darán lugar a todas las estructuras del SNC.

#### **1.3.1. Eje antero-posterior**

Trabajos realizados en *Xenopus* muestran que, durante el proceso de regionalización de la placa neural, intervienen moléculas que definen la parte rostral y caudal de la placa. Las moléculas anteriormente mencionadas como son la *nogina*, *folistatina* y *cordina* (Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Lamb et al., 1993; Sasai et al., 1995; Sasai et al., 1994; Smith and Harland, 1992; Smith et al., 1993) y también una molécula denominada *Cerberus* (Bouwmeester et al., 1996; Piccolo et al., 1999) determinan la identidad rostral de la placa neural. Mientras que moléculas como FGF (Cox and Hemmati-Brivanlou, 1995; Kolm et al., 1997; Pownall et al., 1996; Xu et al., 1997), Wnt3a (McGrew et al., 1997) y el ácido retinoico (Blumberg et al., 1997; Conlon, 1995; Marshall et al., 1992; Simeone et al., 1995) determinan la identidad caudal de la placa neural. En mamíferos, la formación de la parte rostral del SNC también depende de la presencia y correcta migración del AVE (del inglés *Anterior Visceral Endoderm*) (Thomas and Beddington, 1996). El AVE es una población de células extraembrionarias que se sitúa por debajo de la placa neural y expresa diferentes genes necesarios para la formación de las estructuras rostrales del sistema nervioso central, como *Cerberus*, y los factores de transcripción Hesx-1, Lim-1, y Otx-2 (Gilbert, 2000).

Posteriormente, una vez se forma el tubo neural, factores locales se encargan de refinar la organización antero-posterior del SNC. Durante este proceso siguen interviniendo FGFs (FGF2, 4 y 8) Wnts (3a y 8) y el ácido retinoico, además de otras proteínas ((Altmann and Brivanlou, 2001; Panchision and McKay, 2002) para revisión). También comienzan a expresarse los genes de segmentación *Hox* (Kandel et al., 2000; Purves et al., 2001). De forma que, en el ratón,

aproximadamente a E8.5, en la parte más anterior del tubo neural se forman las vesículas primarias (Figura 2) que son el cerebro anterior (prosencefalo), el cerebro medio (mesencefalo) y el cerebro posterior (rombocéfalo). En este momento el eje longitudinal del tubo se dobla para formar las flexuras cervical y ventral. Posteriormente, el prosencefalo se subdivide en telencefalo (o prosencefalo secundario) y diencefalo (Martínez et al., 2012; Purves et al., 2001). En la región más caudal del tubo se forma la médula espinal (Figura 2).

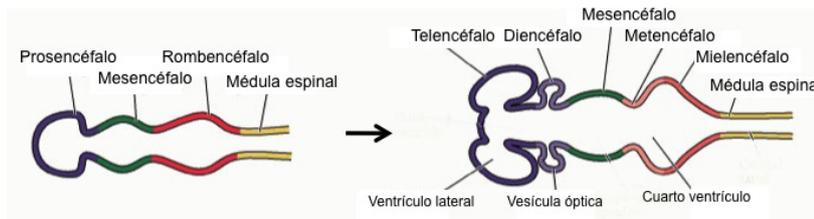


Figura 2. Definición del eje anteroposterior del tubo neural. Vesiculación primaria por la cual se forman el prosencefalo, el mesencefalo y el rombocéfalo que posteriormente se subdividirán para dar lugar a las diferentes regiones que forman el encéfalo. (Adaptado de Purves et al., 2001)

### 1.3.2. Eje dorso-ventral

Durante la inducción neural también se produce la regionalización dorso-ventral de la placa neural (Figura 3). Señales procedentes de la notocorda y la placa precordial, se encargan de inducir el destino ventral a lo largo de todo el tubo neural. Una de las moléculas secretadas por la notocorda es Shh (del inglés *Sonic Hedgehog*) (Echelard et al., 1993; Krauss et al., 1993). Otra molécula que interviene en la ventralización del tubo neural es el ácido retinoico procedente de las somitas adyacentes (Pierani et al., 1999). Shh, liberado desde la notocorda, lleva a cabo la inducción del MHP en la *placa del suelo*. Las células de la *placa del suelo* también secretan Shh, y se forma un gradiente de concentración decreciente en sentido ventro-dorsal (Gilbert, 2000). Por otra parte, las células que rodean a la placa neural y posteriormente las células más dorsales del tubo neural secretan moléculas que antagonizan la señal de Shh. Estas moléculas pertenecen a la superfamilia de los TGF- $\beta$  (del inglés, *Transforming Growth Factor beta*) como son BMP4, BMP5, BMP7, Dorsalina y Activina (Liem et al., 1997; Liem et al., 1995) (Figura 3). En primer lugar, BMP4 y BMP7 secretados desde la epidermis, inducen la formación de la *placa del techo* en la región más dorsal del tubo neural. Las células presentes en la placa del techo secretan BMP4, que inducen la activación de la expresión de miembros de la superfamilia TGF- $\beta$  en las células adyacentes. Es la acción combinada de estas dos vías de señalización, Shh en la placa del suelo y los BMP en la región dorsal, la que permite al tejido de la placa neural establecer una relación topográfica dependiente de la concentración de estas dos señales, que más tarde dividirá al tubo neural en dominios longitudinales que se extienden a lo largo de todo el tejido

neural: la placa del suelo, la placa basal, la placa alar y la placa del techo. Esta especialización regional resulta determinante para los procesos de migración posteriores. Así, las regiones dorsales formarán en la mayoría de casos estructuras laminadas, mientras que las regiones ventrales se estructurarán principalmente en núcleos (Hatten, 1999, 2002; Marin and Rubenstein, 2003; Wilson and Rubenstein, 2000).

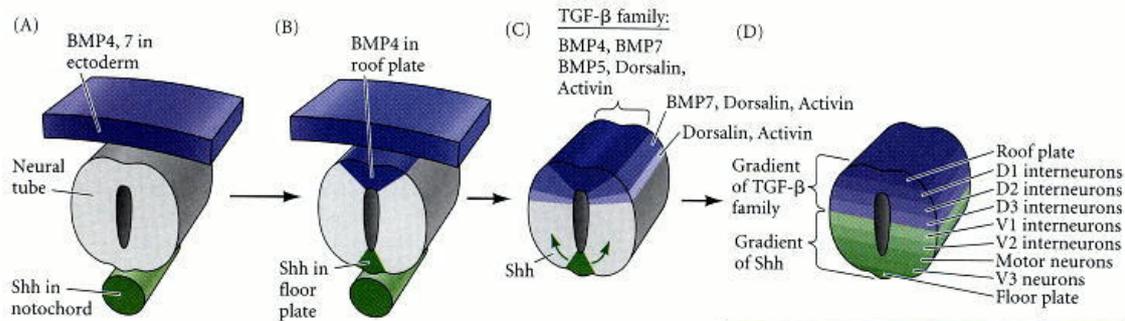


Figura 3. Sección transversal del embrión en el que se muestra la definición de su eje dorso-ventral. Liberación de BMP desde la placa del techo, y liberación de Shh desde la placa del suelo y notocorda, generando un gradiente de concentración. (Gilbert, 2000)

### 1.3.3. Modelo prosomérico

A lo largo de ambos ejes se originan gradientes de proteínas morfogénicas que actúan como claves posicionales que determinarán la identidad genética diferencial de las células a lo largo del tejido neural. Se forman por tanto diferentes regiones de expresión génica que muestran un crecimiento independiente que las lleva a abombarse en forma de vesículas, conocidas como segmentos neurales o neurómeros (Martínez et al., 2012; Puelles and Rubenstein, 1993). Según este modelo prosomérico, las vesículas primarias nombradas anteriormente se segmentan: el prosencéfalo en prosómeros y el rombencéfalo en rombómeros (Figura 4).

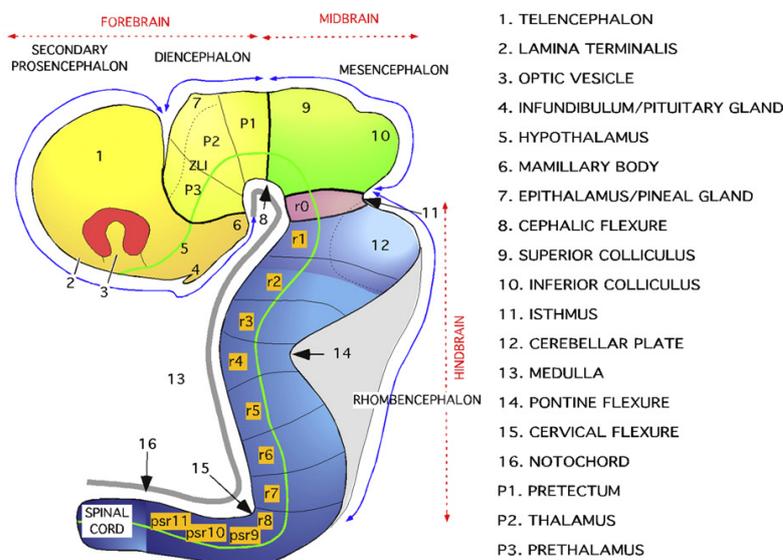


Figura 4a. Ilustración del modelo prosomérico (Adaptado de Martínez et al., 2012)

Además, entre los neurómeros se encuentran los organizadores secundarios que expresan genes con función morfogénica y se encargan de refinar la especificación antero-posterior de los tres segmentos principales: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo (Ruiz i Altaba et al., 1995). Los organizadores secundarios se definen, por tanto, como grupos de células localizados en regiones clave del tubo neural que emiten señales capaces tanto de inducir como de establecer el patrón del tejido que los rodea. Se han identificado tres organizadores secundarios en el tubo neural: la cresta neural anterior, la zona *limitans* intratálámica y el organizador ístmico (Figura 4).

#### **1.4. Especificación del tejido neural: neurogénesis**

Como se ha comentado anteriormente, las moléculas que intervienen tanto en la inducción de la placa neural, como en su regionalización, así como en la regionalización del tubo neural actúan como claves posicionales que determinarán la identidad genética de las células. No obstante, una vez determinada la identidad posicional, una célula decide diferenciarse según una especificación temporal que también depende de señales externas. De forma que estas células precursoras pueden sufrir apoptosis o diferenciarse en células neuronales o gliales. La apoptosis suele darse sobre todo al principio de la gestación, la diferenciación neuronal a mitad de la gestación, y la diferenciación glial al final de la gestación y tras el nacimiento ((Panchision and McKay, 2002) para revisión).

Durante la inducción neural, los precursores neurales ectodérmicos comienzan a expresar factores de transcripción que incluyen miembros de las familias *Fox*, *Geminin*, *Sox*, *Zic* e *Irx*. Estos factores de transcripción se expresan de forma diferencial desde el proceso de inducción neural hasta el momento en el que ocurre la diferenciación de los progenitores neurales. Asimismo, un conjunto inicial de factores de transcripción expresados por los precursores neurales ectodérmicos (p.e. *FoxD4*, *Geminin* y *Zic2*), se encargan de mantener a las células en un estado estable y proliferativo para dar lugar a la formación de una placa neural de tamaño adecuado (Brewster et al., 1998; Kroll et al., 1998; Moody et al., 2013; Seo et al., 2005; Seo and Kroll, 2006; Sullivan et al., 2001). Posteriormente, la expresión de este conjunto inicial de factores de transcripción disminuye, y comienzan a actuar un segundo conjunto de factores (p.e. *Sox11*, *Sox2*, *Sox3*) que se encargan de promover la formación de los progenitores neurales que forman la placa neural (transición precursor neural ectodérmico > progenitor neural) (Bergsland et al., 2006; Bylund et al., 2003; Kishi et al., 2000; Mizuseki et al., 1998a; Penzel et al., 1997; Uwanogho et al., 1995; Wegner and Stolt, 2005). Por último, la actuación de este segundo

conjunto de factores disminuye, y comienzan a expresarse factores de transcripción (p.e. *Irx1-3*, *Zic1*, *Zic3*) que iniciarán la diferenciación neural (Aruga et al., 2002; Bellefroid et al., 1998; Mizuseki et al., 1998b; Nakata et al., 1997, 1998). Para que ocurra la diferenciación neural, la célula debe salir del ciclo celular y comenzar a expresar los genes de diferenciación neural *bHLH* (del inglés *bHelix-loop-helix*), como son *Math1/2*, *Ngn1/2*, *Mash1* y *NeuroD* ((Panchision and McKay, 2002) para revisión).

## **1.5. Migración neuronal en el cerebro anterior**

Una vez que los progenitores neurales se diferencian a neuronas, éstas comienzan a migrar hasta alcanzar su destino final. El proceso de migración ocurre a lo largo de todo el sistema nervioso, a distintos tiempos según el tipo neuronal. El correcto posicionamiento de las neuronas es esencial para la correcta formación de los circuitos neurales durante el desarrollo embrionario y postnatal. A su vez, el correcto establecimiento de los circuitos cerebrales dará lugar a un buen funcionamiento cognitivo. Alteraciones en el establecimiento de las conexiones, debido a una inapropiada migración y localización neuronal resultará en malformaciones cerebrales, disfunción cognitiva o convulsiones ((Marin and Rubenstein, 2003; Moffat et al., 2015) para revisión).

Los procesos de migración que ocurren en el cerebro anterior son el radial y el tangencial. Como se ha mencionado anteriormente, el cerebro anterior está formado por el telencéfalo y diencefalo. El telencéfalo a su vez está formado por el palio, que dará lugar a la corteza cerebral e hipocampo, y el subpalio ((Marin and Rubenstein, 2003) para revisión).

### **1.5.1. Migración radial**

Durante el desarrollo del SNC, las neuronas que se generan presentan una tendencia a migrar de forma radial. Esto se debe a que existe una relación estrecha entre la zona ventricular del tubo neural y la superficie pial. De forma que durante el desarrollo se generan andamios celulares formados por glía radial que permiten la conexión física entre estas dos estructuras, y que sirven como guías por las cuales las neuronas podrán migrar para alcanzar su destino (Rakic, 1972; Ramón y Cajal, 1981).

#### **1.5.1.1. Migración radial en la corteza cerebral**

El proceso de migración radial está ampliamente estudiado durante el desarrollo de la corteza cerebral (Figura 5). La corteza cerebral es una estructura compleja formada por seis capas

neuronales donde cada una contiene un subtipo concreto de neuronas que contactan con regiones específicas corticales y subcorticales (Gupta et al., 2002; Hevner et al., 2003). La mayoría de las neuronas presentes en la corteza cerebral son glutamatérgicas de proyección, e interneuronas GABAérgicas ((Godin and Nguyen, 2014) para revisión).

En las etapas tempranas del desarrollo de la corteza, los progenitores neurales a partir de los cuales se generan las neuronas se encuentran formando un neuroepitelio columnar, donde las células entran en contacto con las superficies ventricular (apical) y pial (basal) del tubo neural. Estas células se dividen de forma simétrica para aumentar en número (Bayer and Altmann, 1991; Sidman and Rakic, 1973). En el ratón, aproximadamente a E10.5, cuando comienza la neurogénesis, los progenitores neurales comienzan a presentar características de astroglia, y terminan transformándose en glía radial apical (aRGCs, del inglés *Apical Radial Glial Cells*). Las aRGCs son las células progenitoras primarias de la corteza cerebral y originan directa o indirectamente todas las neuronas glutamatérgicas (Malatesta et al., 2003; Malatesta et al., 2000; Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2001). Éstas siguen manteniendo el contacto con las zonas basal y apical de la corteza cerebral en desarrollo. En su zona apical, las aRGCs extienden un único proceso que contacta con la superficie ventricular, y presentan un cilio que sale hacia el lumen ventricular para detectar señales presentes en el líquido cefalorraquídeo que modulan la biología de estos progenitores (Gotz and Huttner, 2005; Lehtinen and Walsh, 2011; Lehtinen et al., 2011; Paridaen and Huttner, 2014; Paridaen et al., 2013). En cuanto a su zona basal, presentan también un único proceso denominado fibra radial que termina en la superficie externa del cerebro (superficie pial) y que sirve como guía para la posterior migración neuronal (Javaherian and Kriegstein, 2009; Sidman and Rakic, 1973; Takahashi et al., 1990). La fibra radial se alarga a medida que la corteza se engrosa (Bayer and Altmann, 1991; Sidman and Rakic, 1973). El cuerpo celular de las aRGCs se encuentra en la zona basal y constituyen la capa germinal primaria cortical, la zona ventricular (VZ, del inglés *Ventricular Zone*; Fig. 5b) ((De Juan Romero and Borrell, 2015) para revisión).

Las aRGCs pueden seguir un proceso de *división simétrica proliferativa* (una aRGC da lugar a dos aRGCs), de *división asimétrica neurogénica* (se genera una aRGC y una neurona) o de *división asimétrica proliferativa* (se genera una aRGC y un progenitor celular diferente) (Gotz and Huttner, 2005). La división simétrica proliferativa es más frecuente en estadios tempranos del desarrollo, mientras que la división asimétrica proliferativa es más frecuente en los estadios tardíos (Bayer and Altmann, 1991; Takahashi et al., 1993, 1994). Los progenitores celulares que surgen de la división asimétrica proliferativa se terminan situando de forma basal a la VZ, donde sufrirán divisiones mitóticas y formarán la capa germinal secundaria denominada zona

subventricular (SVZ, del inglés *Subventricular Zone*; Fig. 5b) (Haubensak et al., 2004; Kowalczyk et al., 2009; Noctor et al., 2004). A estos progenitores se les reconoce como progenitores basales y son la principal fuente de generación de las neuronas de la corteza cerebral de ratón ((De Juan Romero and Borrell, 2015) para revisión).

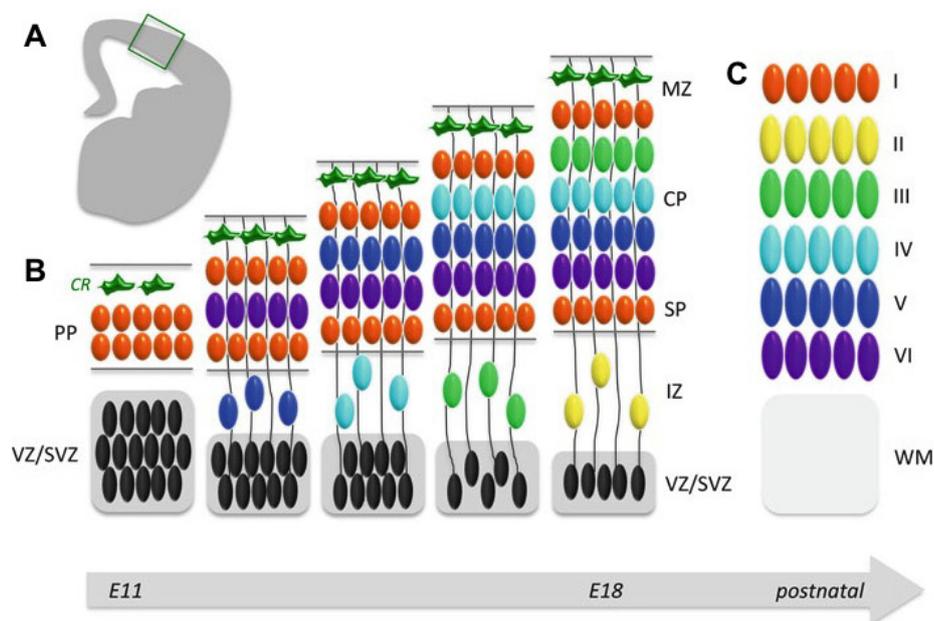


Figura 5. Desarrollo cortical en el embrión de ratón. (A) Sección coronal de un hemisferio del telencéfalo a E14.5. (B) Secuencia temporal del desarrollo de la corteza (recuadro representado en (A)). Los neuroblastos que se generan en la zona ventricular (VZ, siglas en inglés) migran de forma radial, insertándose en la preplaca (PP) y dividiéndola en subplaca (SP) y zona marginal (MZ, siglas en inglés). Las siguientes cohortes de neuronas que se van generando migran siguiendo una distribución de dentro hacia fuera por la fibra glial (líneas en negro), de forma que las células más jóvenes se sitúan cerca de la superficie pial. (C) Finalmente, al nacer el animal presenta una corteza formada por seis capas celulares, molecularmente distintas (representado por los diferentes colores). CR: células de Cajal-Retzius; PP: Preplaca; VZ/SVZ: zona ventricular/ zona subventricular; SP: Subplaca; MZ: Zona marginal; WM: sustancia blanca. (Adaptado de *Godin and Nguyen, 2014*)

La primera cohorte de neuronas que se generan y migran fuera de la VZ, lo hacen de forma radial por un proceso de translocación somática, independiente de la glía radial y terminan formando la preplaca (PP en Fig. 5b), también denominada capa externa plexiforme (Nadarajah and Parnavelas, 2002). La segunda cohorte de neuronas que se genera migran de forma radial a lo largo de la aRGC y terminan formando la placa cortical, dividiendo la preplaca en zona marginal y en subplaca (MZ, del inglés *Marginal Zone* y SP en Fig. 5b) ((Marin and Rubenstein, 2003) para revisión). El desarrollo de la corteza cerebral continúa a medida que se van generando las siguientes cohortes de neuronas, las cuales van migrando a lo largo de la fibra radial y se van situando en la placa cortical en desarrollo siguiendo una localización de dentro hacia fuera (*inside-out*). De forma que en la placa cortical las primeras células que se generan quedan en la región más basal mientras que las que se originan posteriormente se van depositando en capas superiores (Chun et al., 1987; Kostovic and Rakic, 1980; Luskin and Shatz, 1985) (Fig.

5b, c). Durante este proceso es imprescindible la acción de unas células que se sitúan en la MZ denominadas células de Cajal-Retzius (CR) (ver apartado 1.5.2.2) y la proteína que secretan, Reelina. Estas células participan activamente en la regulación de la migración y modulación de la maduración cortical (Marin-Padilla, 1998).

La participación de la glía radial es básica en la formación de estructuras laminadas, por lo que también se pueden encontrar células con fenotipo de glía radial en el cerebelo, hipocampo y bulbo olfativo. El proceso de migración radial es parecido en dichas estructuras ((Gotz and Huttner, 2005) para revisión).

### **1.5.2. Migración tangencial**

Existen diferentes tipos de migración tangencial en el SNC en desarrollo, que tienen en común el hecho de no usar la glía radial como soporte para la migración. La migración tangencial en roedores ocurre de forma paralela a la superficie ventricular, y de forma ortogonal a la fibra radial glial. En algunos casos, existen grupos de neuronas que migran cooperativamente promoviendo y controlando su propia migración, mediante uniones homofílicas (Lois et al., 1996). En otros casos, las neuronas pueden usar como sustrato axones (migración axonofílica (Wray et al., 1994; Yoshida et al., 1995)), o incluso vasos sanguíneos (migración vasofílica (Won et al., 2013)), que se están prolongando para alcanzar su destino final. Finalmente, algunas neuronas se dispersan de una forma individual, como es el caso de las interneuronas que migran del subpalio al palio ((Marin and Rubenstein, 2003) para revisión). El proceso de migración tangencial es llevado a cabo por diversas poblaciones neuronales, como son las neuronas del locus coeruleus (Aroca et al., 2006), neuronas granulares del cerebelo (Gilthorpe et al., 2002; Komuro et al., 2001; Ryder and Cepko, 1994), neuronas del bulbo olfativo (Lois and Alvarez-Buylla, 1994) y células de Cajal-Retzius (García-Moreno et al., 2007; Takiguchi-Hayashi et al., 2004). Pero sin duda, el ejemplo más estudiado es el de las interneuronas de la corteza cerebral (Anderson et al., 1997; de Carlos et al., 1996; Marin and Rubenstein, 2003; Martini et al., 2009; Yokota et al., 2007).

#### **1.5.2.1. Migración tangencial del subpalio al palio**

El subpalio, región localizada en la base del telencéfalo, origina un gran número de células que migran de forma tangencial hacia la corteza cerebral e hipocampo en desarrollo. Estas células son mayoritariamente interneuronas y migran desde zonas alejadas como son la eminencia ganglionar medial (MGE, del inglés *Medial Ganglionic Eminence*), la eminencia ganglionar caudal

(CGE, del inglés *Caudal Ganglionic Eminence*) y el área preóptica (POA, del inglés *Preoptic Area*) (Figura 6) (Anderson et al., 1997; Corbin et al., 2001; de Carlos et al., 1996; Flames et al., 2007; Gelman and Marin, 2010; Gelman et al., 2009; Lavdas et al., 1999; Pleasure et al., 2000; Rubin et al., 2010; Wichterle et al., 1999). Estas interneuronas suelen ser GABAérgicas y son muy variadas, por lo que se clasifican según sus propiedades fisiológicas y moleculares. De forma general, podemos distinguir las interneuronas que expresan neuropéptidos (Neuropéptido Y, Somatostatina o el Péptido Vasointestinal), proteínas de unión a calcio (Calretinina o Parvalbúmina) o Reelina (Freund and Buzsaki, 1996; Peyre et al., 2015).

Las interneuronas migran desde su lugar de origen hasta el límite entre el subpalio y el palio, para posteriormente entrar en la corteza cerebral en desarrollo (Figura 6). La entrada a la corteza en desarrollo ocurre por regiones de ésta que presentan abundante matriz extracelular, enriquecida en laminina, fibronectina y colágeno tipo IV, y que se denominan *canales extracelulares* (Bayer and Altmann, 1991; Derer and Nakanishi, 1983). De forma que entre E11.5 y E16.5 se distinguen tres fases diferentes, parcialmente solapadas, en la migración de estas interneuronas. A E11.5, las interneuronas que llegan a la corteza en desarrollo se integran en la zona marginal y la subplaca (líneas discontinuas azul y verde en Fig. 6A; Fig. 6b) (Anderson et al., 2001; Lavdas et al., 1999). La segunda onda de interneuronas penetran en la subplaca y en la parte inferior de la zona intermedia (Anderson et al., 2001; DeDiego et al., 1994; Lavdas et al., 1999; Wichterle et al., 2001). Finalmente, las interneuronas que llegan en las fases finales del desarrollo cortical (línea discontinua roja en Fig. 6A), a E14.5-E16.5 se sitúan en las regiones proliferativas de la corteza, es decir en la SVZ (Fig. 6b) (Anderson et al., 2001; Del Rio et al., 1992; Wichterle et al., 1999). Posteriormente, las interneuronas dejan de migrar de forma tangencial, y comienzan a migrar de forma radial para invadir la placa cortical (Fig. 6C) (Rymar and Sadikot, 2007).

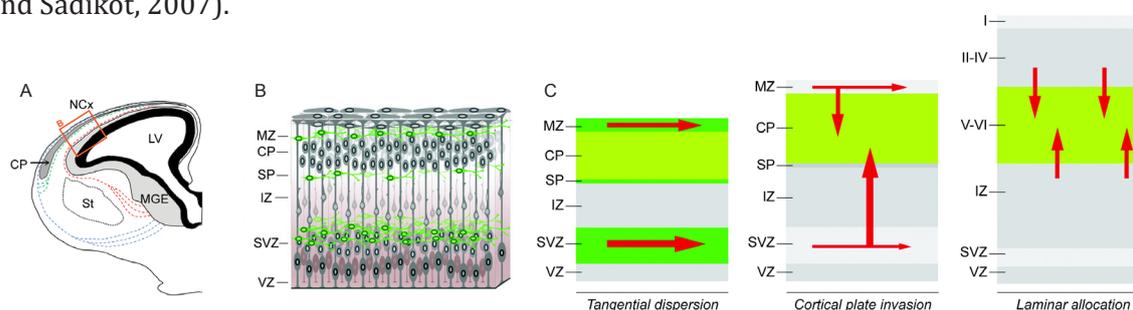


Figura 6. A) Ilustración de una sección coronal de un cerebro de ratón a E15. Se muestran las rutas de migración seguidas por las interneuronas, desde las eminencias ganglionares hasta la corteza en desarrollo, en las fases tempranas del desarrollo (línea azul discontinua) y tardías (línea roja discontinua). B) Ilustración que muestra las rutas de migración que siguen las interneuronas dentro de la corteza en desarrollo, preferencialmente por la zona marginal (MZ), y la zona subventricular (SVZ), aunque algunas también migran por la subplaca (SP). C) Ilustraciones que muestran cómo las interneuronas dejan de migrar de forma tangencial, para migrar de forma radial e invadir la placa cortical (CP). IZ: zona intermedia; LV: ventrículo lateral; MGE: eminencia ganglionar medial; NCx: Neocorteza; St: estriado; VZ: zona ventricular. (Adaptado de *Marín, 2013* y *Hernández-Miranda et al., 2010*)

### 1.5.2.2. Células de Cajal-Retzius

Las células de Cajal-Retzius (CR) son las primeras células que migran de forma tangencial a la corteza cerebral en desarrollo. Situadas primero en la preplaca, y posteriormente en la MZ, se encargan de regular la migración radial de las neuronas piramidales y la formación de las capas de la corteza cerebral gracias a la secreción de una proteína de matriz extracelular denominada Reelina (Barber and Pierani, 2015; D'Arcangelo, 2006; Ogawa et al., 1995). Asimismo, estas células generan contactos transitorios con las neuritas apicales de otras neuronas presentes en la zona marginal, estableciendo un tono basal de activación necesario para el desarrollo de la corteza (Aguilo et al., 1999). Al estar estas células tan próximas al proceso basal de la glía radial se piensa que Reelina pueda estar promoviendo la maduración morfológica y molecular de la glía radial, así como regulando la neurogénesis (Soriano et al., 1997; Super et al., 2000). Además, las células de CR influyen en la diferenciación de las neuronas de las capas altas de la corteza (Kupferman et al., 2014), en la invasión de interneuronas GABAérgicas en la corteza (Caronia-Brown and Grove, 2011; Hevner et al., 2004; Yabut et al., 2007), en la regionalización cortical (Barber and Pierani, 2015; Griveau et al., 2010), y también participa en el correcto posicionamiento de los axones comisurales y entorrinales en el hipocampo (Borrell et al., 1999; Del Rio et al., 1997; Super et al., 1998).

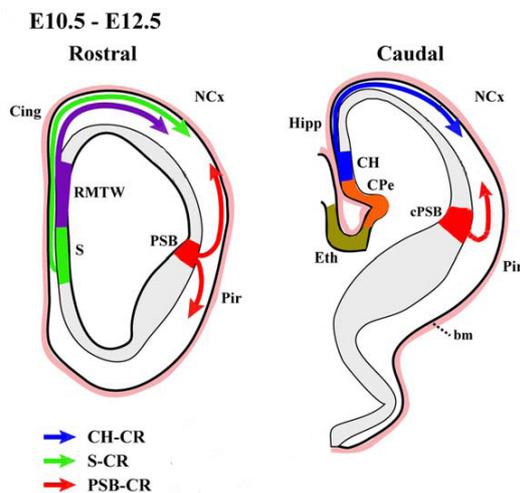


Figura 7. Ilustración del origen y rutas de migración de las células de Cajal-Retzius (CR) a nivel rostral y caudal. En azul se muestran las células de CR derivadas del cortical hem (CH-CR), en verde las derivadas del septum (S-CR), en rojo las derivadas del límite palio-subpalio (PSB-CR) y en lila las derivadas de la pared telencefálica rostral medial (RMTW). Cing, corteza cingulada; NCx, neocorteza; Pir: corteza piriforme; Hipp, hipocampo; CPe: plexo coroideo; Eth: eminencia talámica. (Adaptado de Barber and Pierani, 2015)

Las células de CR se generan en el ratón entre E8.5-E13.5, y presentan un pico de generación máximo entre E9.5 y E12.5 (del Río et al., 1995; Super et al., 1998). Se originan a partir de diferentes puntos localizados en los bordes del palio en desarrollo y asociados con centros organizadores del cerebro anterior. Estos puntos, a partir de los cuales se generan la mayoría de las células de CR, son el *cortical hem* (CH) (Gu et al., 2011; Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Tissir et al., 2009; Yoshida et al., 2006), el *septum* (S) del palio (Bielle et al., 2005; Zimmer et al., 2010) y el límite palio-subpalio (PSB, del inglés *Pallial-subpallial Boundary*) (Bielle et al., 2005)

(Figura 7). Además, se han localizado otras zonas extrapaliales como son el plexo coroideo (Cpe, del inglés *Choroid plexus*) (Imayoshi et al., 2008), la eminencia talámica (Eth, del latín *Eminentia thalami*) y la pared telencefálica rostral medial (RMTW, del inglés *Rostral medial telencephalic wall*) ((Barber and Pierani, 2015) para revisión).

Las células de CR procedentes de CH, S y PSB migran desde su foco de origen de forma tangencial para cubrir toda la superficie cortical, aunque presentan diferencias en el momento en el que comienzan a migrar y en la dirección y cinética de la migración ((Barber and Pierani, 2015) para revisión). Los diferentes subtipos de células de CR se distribuyen a lo largo de la superficie cortical de una manera complementaria (Figura 8): las células de CR derivadas del septum (S-CRs) invaden el palio rostral-medial, las derivadas del CH (CH-CRs) el palio caudo-medial, y las derivadas de PSB (PSB-CRs) el palio lateral (Bielle et al., 2005; Griveau et al., 2010; Yoshida et al., 2006) (Fig. 8a). De forma que a lo largo de la superficie cortical se van estableciendo zonas compuestas por diferentes subtipos de células de CR que actúan como unidades móviles que van a determinar el patrón espacial y la regionalización de las áreas corticales (Fig. 8b) (Griveau et al., 2010). Se desconocen las razones que dan lugar a esta forma de dispersión, se piensa que los diferentes subtipos de células de CR presentan procesos de repulsión celular que favorecerían este proceso (Borrell and Marin, 2006; Villar-Cervino et al., 2013).

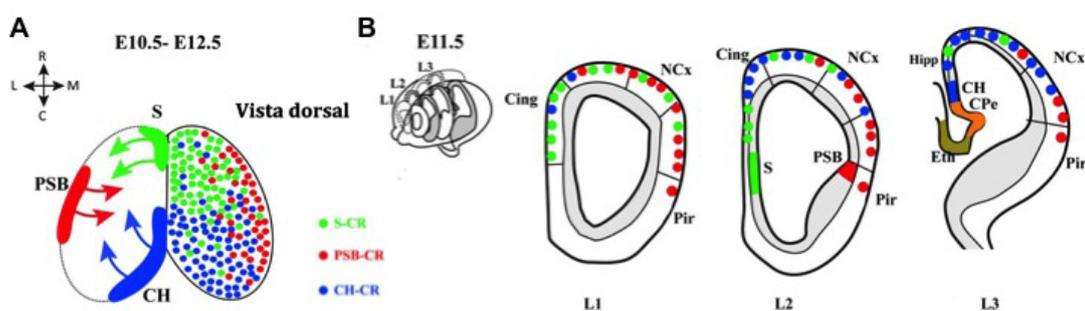


Figura 8. Ilustración de la dispersión de las células de Cajal-Retzius. A) Vista dorsal del telencefalo que muestra la distribución de las células de CR por la superficie cortical. B) Vistas coronales de la distribución de las células de CR a diferentes niveles rostro-caudales. PSB, límite palio-subpalio; S, septum; CH, cortical hem; Cing, corteza cingulada; NCx, neocorteza; Pir: corteza piriforme; Hipp, hipocampo; CPe: plexo coroideo; Eth: eminencia talámica. (Adaptado de Barber and Pierani, 2015)

En el ratón, la mayoría de las células de CR mueren por apoptosis durante la primera semana postnatal (del Río et al., 1995). No obstante, algunas permanecen en la neocorteza y en el hipocampo adulto, y esto puede deberse a que los diferentes subtipos de células de CR presenten diferencias en su supervivencia, como se ha podido determinar *in vitro* mediante cultivos organotípicos (Del Río et al., 1996). Por otro lado, algunas células de CR terminan transformándose en neuronas no piramidales en el adulto (del Río et al., 1995; Parnavelas and Edmunds, 1983).

### **Regulación de la migración de las células de CR**

Se conocen diferentes mecanismos moleculares que intervienen en el proceso de migración de las células de CR. Estos mecanismos moleculares intervienen a diferentes niveles: en el confinamiento de las células en sus posiciones subpiales, y en el proceso de invasión tangencial que estas células llevan a cabo de la corteza en desarrollo.

### **Regulación del posicionamiento subpial de las células de CR**

Las células de CR migran de forma tangencial a la corteza cerebral en desarrollo por la membrana subpial. Esta membrana se forma a partir de la piamadre, que es la capa más interna de las meninges. La piamadre está formada por una red de vasos sanguíneos, por una capa de células piales y por fibroblastos que secretan proteínas de la matriz extracelular que forman una membrana basal continua en la superficie del cerebro. Estas proteínas son fibronectina, colágeno (I, II, IV, VI), nidogen y miembros de la familia de las laminina y proteoglicanos heparán sulfatos (perlecano y agrina) (Arikawa-Hirasawa et al., 1999; Costell et al., 1999; Li et al., 2012b; Libby et al., 2000; Luo et al., 2011; Sievers et al., 1994). Además, las meninges generan proteínas secretables que son esenciales para el desarrollo de la corteza cerebral: el ácido retinoico, la quimiocina CXCL12 (del inglés *C-X-C motif chemokine 12*), BMPs 4 y 7, TGFβ (Borrell and Marin, 2006; Choe et al., 2014; Kusakawa et al., 2015; Segklia et al., 2012; Siegenthaler et al., 2009; Smith et al., 2001; Yoshida and Gage, 1991), BDNF (del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*), la neurotrofina-4 (NT4) (Alcantara et al., 2006; Brunstrom et al., 1997; Fukumitsu et al., 1998; Maisonpierre et al., 1990; Ringstedt et al., 1998) y las semaforinas 3A y 3C (Marin et al., 2001; Niclou et al., 2003; Shearer et al., 2003; Tamamaki et al., 2003).

Se conoce bastante bien la función de CXCL12 como regulador del posicionamiento subpial de las células de CH-CRs y PSB-CRs (Figura 9), ya que éstas son capaces de responder a la quimiocina gracias a que expresan sus receptores CXCR4 y CXCR7. CXCL12 señala a través de CXCR4, y también es capaz de unirse a CXCR7. Se piensa que CXCR7 actúa como competidor de CXCR4, modulando así la respuesta de CXCR4 a CXCL12 (Abe et al., 2014; Sanchez-Alcaniz et al., 2011) ó regulando los niveles de CXCL12 disponibles en el ambiente para generar gradientes que den lugar a una migración direccional (Boldajipour et al., 2008; Donà et al., 2013; Memi et al., 2013; Venkiteswaran et al., 2013). Mientras la expresión de CXCR4 se mantiene a lo largo de la corticogénesis, la expresión de CXCR7 va disminuyendo (Berger et al., 2007; Borrell and Marin, 2006; Paredes et al., 2006; Tiveron et al., 2010; Trousse et al., 2015). Se piensa que este patrón de expresión dinámico de los receptores es el responsable de las diferencias en la

respuesta a CXCL12 y, por tanto, de la migración tangencial de las células. *In vitro* se ha podido determinar que CXCL12 promueve la quimioatracción de las células de CH-CR a través de CXCR4 (Borrell and Marin, 2006; Stumm et al., 2003), no obstante, cuando se inactiva el receptor *in vivo*, las células de CH-CR siguen migrando de forma tangencial, pero salen de la zona marginal para invadir la placa cortical (Paredes et al., 2006). Este descarrilamiento también ocurre cuando falta el ligando o CXCR7. De forma que la señalización mediada por CXCL12/CXCR4/CXCR7 promueve la quimioatracción local de las células de CR hacia las meninges (Borrell and Marin, 2006; Paredes et al., 2006; Trousse et al., 2015), pero no parece imprescindible para la migración tangencial de éstas.

Otro componente que regula el posicionamiento subpial de las células de CR es la glía radial (Kwon et al., 2011). Como se ha comentado anteriormente, las células de CR se encuentran próximas al proceso basal de la glía radial, de forma que un posicionamiento incorrecto o la retracción de este proceso desencadena el descarrilamiento de estas células de CR ((Barber and Pierani, 2015) para revisión).

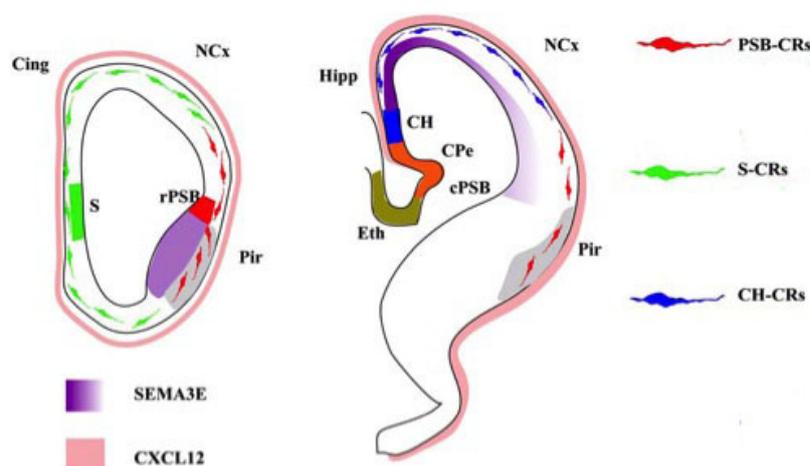


Figura 9. Ilustración de la intervención de CXCL12 y Sema3E en el posicionamiento subpial y en la migración tangencial, respectivamente, de las células de CR. Secciones coronales rostral y caudal del telencéfalo de ratón a E11.5. Se muestra en lila la expresión en gradiente de Sema3E en el parénquima cortical. Sema3E presenta una expresión decreciente desde la región dorsal-medial hacia el lateral, y hacia niveles más caudales del telencéfalo. CXCL12 se expresa de forma homogénea en las meninges (rosa). (Adaptado de Barber and Pierani, 2015)

### Regulación de la migración tangencial de las células de CR

Como se ha comentado anteriormente, los diferentes subtipos de células de CR presentan una migración tangencial complementaria. Una forma sugerida por la cual los diferentes subtipos de CR consiguen invadir la superficie cortical en regiones específicas es mediante la locomoción inhibida por contacto o *contact repulsion* mediado por efrinas (Eph/ephrin) (Borrell and Marin, 2006; Villar-Cervino et al., 2013). Este proceso de migración da lugar a la dispersión

de las células desde regiones donde se encuentran más concentradas hasta regiones de menor concentración, sin necesidad de intervención de moléculas exógenas. Esto se debe a que una vez las diferentes células entran en contacto, cambian su dirección de migración, por lo que nunca llegan a ocupar el mismo espacio ni a migrar unas encima de otras.

Por otro lado, existen dos vías de señalización diferentes capaces de modular de forma negativa la motilidad y velocidad de la migración de las células de CR. Estas vías son las mediadas por la Semaforina 3E y su receptor PlexinD1 (Sema3E/PlexinD1) y por la proteína de tráfico vesicular VAMP3 (Figura 9). La proteína Sema3E se expresa en el parénquima neocortical entre E12.5-E13.5 presentando un gradiente caudo-medial a lateral, mientras que las células CH-CRs expresan su receptor, PlexinD1. Este binomio Sema3E/PlexinD1 es capaz de llevar a cabo las funciones anteriormente comentadas debido a que modulan diferentes aspectos de la señalización mediada por CXCL12/CXCR4: retrasan la activación de la señalización de ERK1/2 y potencian la fosforilación de ADF/cofilina que da lugar a la desestabilización de los filamentos de actina (Bribian et al., 2014) (Figura 9). En cuanto a la proteína VAMP3, ésta es una proteína de tráfico vesicular expresada por las células S-CRs y CH-CRs. Se ha observado que cuando la función de VAMP3 se ve inhibida, tiene lugar un aumento en la velocidad de migración de estas células, sin que haya alteración en la direccionalidad de éstas (Barber et al., 2015).

### 1.6. Neuritogénesis

Una vez se generan los neuroblastos, comienzan a migrar hasta alcanzar su destino final. No obstante, antes de que comiencen a migrar, éstos desarrollan una única prolongación, que recibe el nombre de neurita. Esta única neurita, que normalmente pasará a ser el futuro axón, sirve como guía para la migración. Una vez alcanzan el destino final, las células terminan de especializarse, y esta especialización viene determinada por el destino al que han llegado, y por la función que éstas células ejercerán en él. Para terminar de especializarse, las neuronas generan más neuritas, que serán las futuras dendritas (da Silva and Dotti, 2002). El desarrollo de las dendritas y del axón permitirán a las células comunicarse unas con otras a través del establecimiento de contactos sinápticos. La formación y extensión de dichas prolongaciones en el momento adecuado y en la dirección correcta son las bases de la conectividad neuronal y por tanto de la función cerebral.

Este proceso de formación de neuritas, que recibe el nombre de *neuritogénesis* (da Silva and Dotti, 2002), se ha estudiado sobretodo *in vitro*, ya que la observación espacial y temporal es más fácil. No obstante, este proceso *in vitro*, sigue una secuencia algo distinta a la observada *in*

*vivo*. En cultivos primarios corticales e hipocámpicos se han podido distinguir diferentes fases del desarrollo neuronal (Figura 10) (Dotti et al., 1988). Cuando las células se adhieren a la superficie, éstas presentan una morfología esférica (fase 0) aunque al cabo de pocos minutos comienzan a extender protrusiones de lamelipodios y filopodios (fase 1, 0-6h). Posteriormente, las neuritas emergen del cuerpo celular y comienzan a extenderse, lo que se conoce como neuritogénesis (fase 2, 6-24h). Estas neuritas son protrusiones que presentan un tamaño igual o mayor que el diámetro de la célula, y son indistinguibles puesto que cualquiera podría formar el axón. Seguidamente, una de las neuritas comienza a alargarse a un ritmo más rápido que el resto para terminar formando el axón por lo que la neurona se polariza (fase 3, 24-72h). El resto de neuritas posteriormente crecen y se arborizan para formar las dendritas (fase 4, 3-7d). Lo último en formarse son las espinas dendríticas y los contactos sinápticos (fase 5, 7-28d) (da Silva and Dotti, 2002; Flynn, 2013).

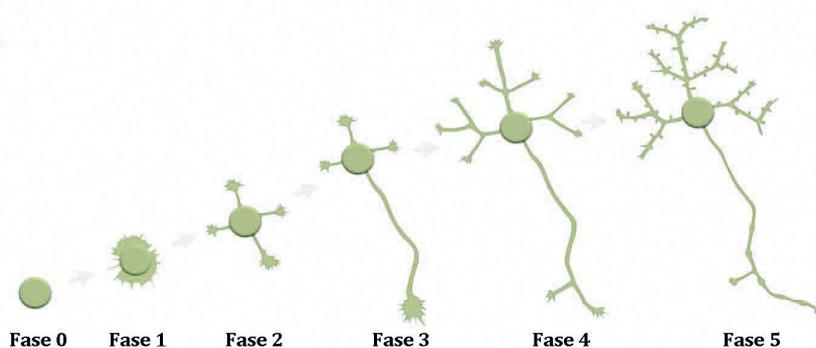


Figura 10. Fases del desarrollo neuronal y neuritogénesis (Adaptado de Flynn, 2013)

Durante el proceso de neuritogénesis ocurren modificaciones del citoesqueleto de actina y de microtúbulos (Figura 11). Antes de que comiencen a formarse las neuritas, el cuerpo neuronal presenta un citoesqueleto de filamentos de actina submembranar, mientras que los microtúbulos se forman en el centrosoma perinuclear y se dirigen hacia la periferia. Los filamentos de actina comienzan a organizarse para formar protrusiones de filopodios y lamelipodios desde la periferia del cuerpo celular, que es el primer paso para la extensión de neuritas y la formación de estructuras sinápticas (Kater and Rehder, 1995; Sobue, 1993). Existen ciertas diferencias entre los filopodios y los lamelipodios. Mientras los filopodios son proyecciones citoplasmáticas delgadas (0.1 $\mu$ m-0.3 $\mu$ m), en forma de espina y formados por filamentos paralelos de F-actina ((Mattila and Lappalainen, 2008) para revisión), los lamelipodios son prolongaciones finas (0.1 $\mu$ m-0.2 $\mu$ m) y planas de la membrana, transitorias, y formadas por una red entrelazada de filamentos de actina ((Dent et al., 2011) para revisión). Posteriormente, los microtúbulos y los orgánulos comienzan a extenderse a lo largo de los filopodios (del inglés, *engorgement*) y las

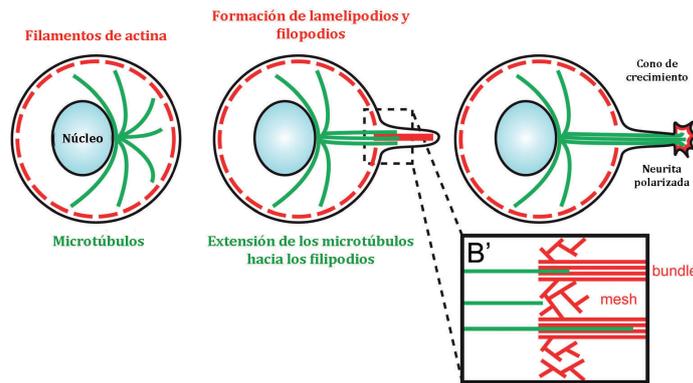


Figura 11. Dinámica y organización del citoesqueleto durante la formación de la neurita. (Adaptado de Sainath and Gallo, 2015)

protrusiones terminan adquiriendo polaridad, puesto que desarrollan un cono de crecimiento en su extremo. El cono de crecimiento es una estructura dinámica y motil que permitirá la extensión de las dendritas y el axón (Sainath and Gallo, 2015). En este momento, la protrusión se considera neurita.

Durante la formación de los filopodios, es importante la acción de las pequeñas GTPasas de la superfamilia Rho (Figura 12). Estas proteínas son interruptores moleculares intracelulares que ciclan entre su forma activa (unida a guanosina trifosfato (GTP)) y su forma inactiva (unida a guanosina difosfato (GDP)) en respuesta a la acción de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) o inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs). Estas proteínas se encuentran íntimamente ligadas al citoesqueleto, regulando la morfología y dinámica celular (Arimura and Kaibuchi, 2007; Luo, 2000; Ridley, 2006). Entre las Rho GTPasas más estudiadas encontramos Rac1 (del inglés, *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), implicada en la formación de lamelipodios; RhoA (del inglés, *Ras-homologous member A*), relacionada con la formación de fibras de estrés, adhesiones focales y crecimiento neurítico; y Cdc42 (del inglés *Cell-division cycle 42*), con un papel clave en la formación de filopodios y el establecimiento de la morfología del cono de crecimiento.

La inducción de los cambios morfológicos que llevan a la formación de filopodios, y posteriormente neuritas, depende de señales extracelulares que dan lugar a la activación o inhibición de las proteínas reguladoras (GEFs, GAPs y GDIs) y las vías de señalización asociadas al citoesqueleto de actina (RhoA, Rac, Cdc42). Estas vías actúan sobre las proteínas de soporte (p.e. Dia2) y las proteínas de unión a actina (ABPs), modulando la dinámica de los microfilamentos de actina. Dentro de las ABPs se incluyen las proteínas de anclaje a membrana (Ena/Mena/VASP); proteínas nucleadoras de actina (Arp2/3); proteínas de unión o *cross-linking* (filamina

o fascina); proteínas de ensamblaje y desensamblaje de filamentos de actina (timosina- $\beta$ 4); y proteínas despolimerizadoras de actina (ADF-cofilina) ((Dent et al., 2011; Mattila and Lappalainen, 2008) para revisión). Cuando ocurre la formación neurítica, el citoesqueleto de actina se desestabiliza y reorganiza: las proteínas Dia2 y ENA/VASP, con la ayuda de los motores de miosina, llevan a cabo la elongación de los extremos libres de los filamentos de actina. Seguidamente, proteínas adaptadoras como IRSp53 permiten la deformación de la membrana y finalmente, la incorporación de proteínas de cross-linking como la filamina dan rigidez a los microfilamentos de actina, a medida que se produce la elongación de la estructura ((Mattila and Lappalainen, 2008) para revisión).

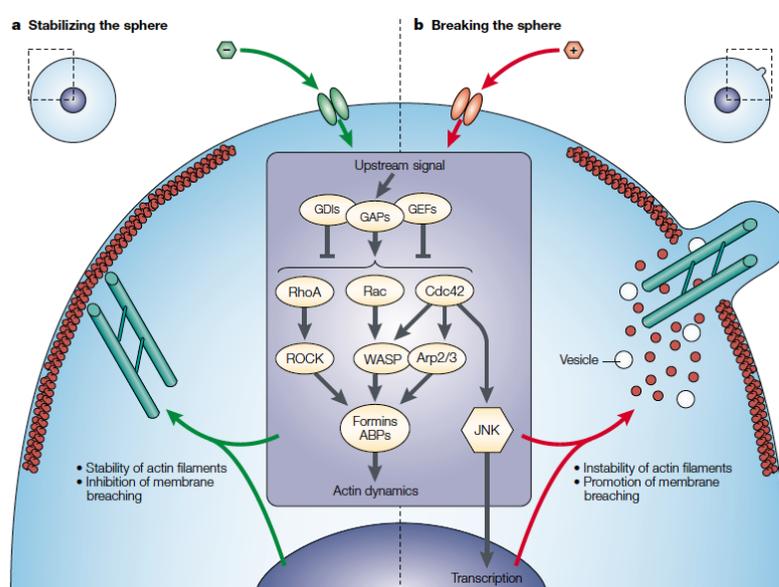


Figura 12. Ilustración que muestra la acción de las Rho GTPasas, y vías de señalización durante la formación de filopodios. (Adaptado de *da Silva and Dotti, 2002*)

### 1.6.1. Crecimiento y guía axonal

Una vez se forma el axón, éste se extiende para alcanzar diferentes zonas donde establecerá contactos sinápticos con otras neuronas o células efectoras. El correcto establecimiento de las conexiones cerebrales requiere que los diferentes axones en crecimiento alcancen de forma adecuada sus destinos. Que el axón alcance su diana depende de la capacidad que tiene para responder a diferentes señales locales que se encuentra por el camino, y que le guía hasta su destino final. El extremo del axón presenta una estructura especializada en reconocer y dar respuesta a esas señales, que se denomina *cono de crecimiento* axonal (Dickson, 2002; Huber et al., 2003; Kalil and Dent, 2005; Mueller, 1999; Song and Poo, 1999). Los procesos de crecimiento y guía axonal mantienen grandes similitudes con los procesos de migración, incluso algunas de las moléculas que participan en estos procesos son las mismas ((Marin and Rubenstein, 2003) para revisión).

El cono de crecimiento axonal es capaz de detectar y responder a un elevado número de señales guía que pueden ser tanto atractivas como repulsivas (Figura 13). Como su nombre indica, las señales atractivas ejercen sobre el cono de crecimiento un proceso de atracción y por tanto crecimiento del axón. Por otro lado, las señales repulsivas provocan el colapso del cono de crecimiento y por tanto la retracción del axón (Huber et al., 2003). No obstante, estas señales guía pueden tener actividad dual según la composición de receptores que presente el cono de crecimiento en su membrana, y según otros factores (Ej. Efrinas y Semaforinas) (Robichaux and Cowan, 2013). Las señales atractivas y repulsivas pueden tener una naturaleza soluble y actuar así a grandes distancias generando gradientes de concentración, o pueden ser transmembranas o estar unidas a la matriz extracelular, y actuar por tanto a cortas distancias (Huber et al., 2003).

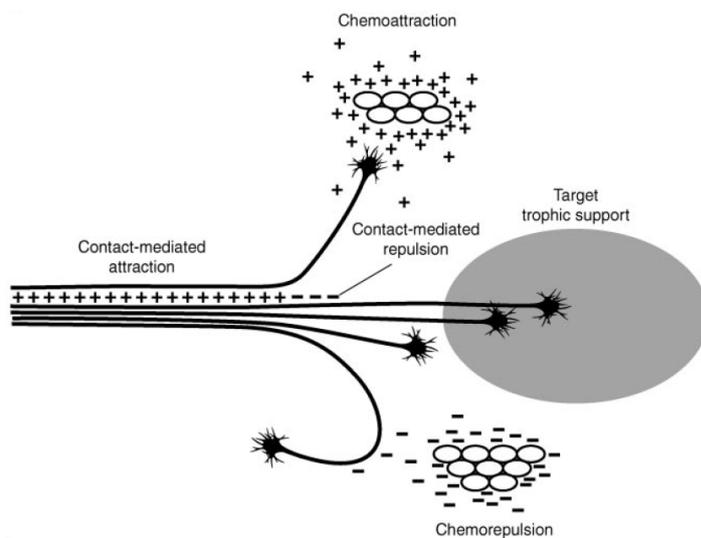


Figura 13. Moléculas que afectan a la guía axonal. La guía axonal se regula por la acción de moléculas extracelulares que atraen o repelen los axones y que actúan a cortas y largas distancias (Adaptado de Huber et al., 2003)

El cono de crecimiento es una estructura motil compleja y dinámica que presenta un citoesqueleto formado por una estructura central rica en microtúbulos y en una periferia estructurada en filopodios de filamentos de actina. Aunque el cono de crecimiento axonal utilice la misma maquinaria básica que los conos de crecimiento de las neuritas, existen diferencias entre ambos (Flynn, 2013). Como se ha comentado anteriormente, la membrana del cono de crecimiento axonal presenta diferentes receptores o complejos de receptores a los que se unen esas señales guía, así como a moléculas de adhesión celular, que son a su vez capaces de interactuar con el citoesqueleto subyacente para poder controlar la forma del cono, así como su extensión o retracción. Por lo general, tanto las señales atractivas como repulsivas desencadenan cascadas de señalización intracelular en el cono de crecimiento que dan lugar a la remodelación de los filamentos de actina (Robichaux and Cowan, 2013) (Figura

14). Las señales atractivas aumentan el número de filopodios y el alargamiento de los filamentos de actina, así como la estabilización de los microtúbulos en la zona del cono de crecimiento donde se detecta la señal. Las señales de repulsión desorganizan los filamentos de actina en la zona del cono de crecimiento afectada, provocan la pérdida de microtúbulos en esa región, y da lugar a una parada en el crecimiento axonal o colapso axonal (Kalil and Dent, 2005).

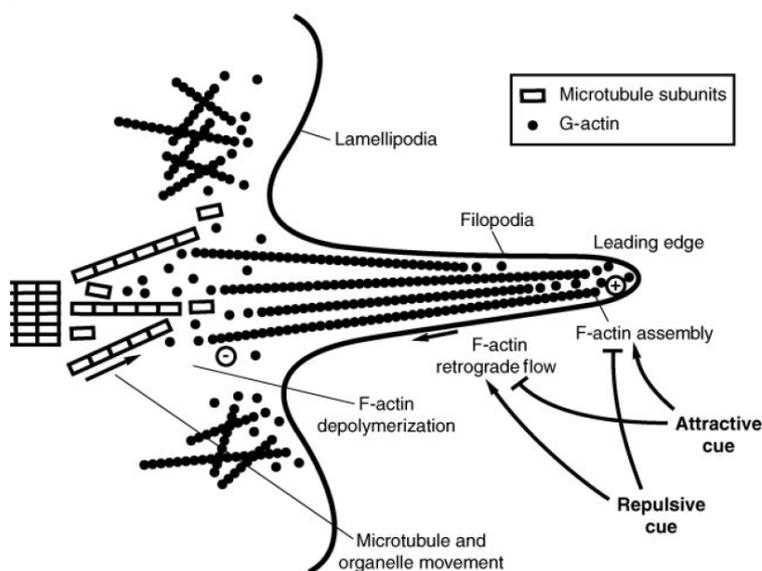


Figura 14. Modificación del citoesqueleto del cono de crecimiento tras la detección de las moléculas guía. (Adaptado de Huber et al., 2003)

Las principales familias de proteínas que participan en la guía y crecimiento axonal son la Netrina-1, las Semaforinas, las Efrinas y los Slits (Barallobre et al., 2005; Dickson, 2002; Huber et al., 2003; Kruger et al., 2005; Martinez and Soriano, 2005). Se hará en la presente tesis una explicación más extensa de la familia de las Semaforinas más adelante.

Por otra parte, los axones que presentan el mismo origen y destino se unen formando fibras y contactan entre sí a través de un proceso denominado *fasciculación* (Raper et al., 1983). Estas fibras se desarrollan a lo largo de las rutas previamente establecidas por los axones pioneros al inicio del desarrollo. Son las fibras que formarán la sustancia blanca del cerebro, como son el cuerpo calloso, el tracto talamocortical y la comisura anterior. Un incorrecto establecimiento de los axones pioneros provocará un establecimiento de las fibras aberrante (Robichaux and Cowan, 2013).



## 2. Desarrollo del sistema neurovascular

El sistema nervioso central se vasculariza durante el desarrollo para proporcionar oxígeno y nutrientes a las neuronas que se van generando, antes de que extiendan sus axones y dendritas. Antes del nacimiento del animal, el SNC adquiere su propia red vascular ((Ruhrberg and Bautch, 2013) para revisión). Al igual que ocurre con el SNC, el correcto funcionamiento del sistema neurovascular depende de que los elementos celulares que lo componen se diferencien y localicen de forma adecuada ((Walchli et al., 2015b) para revisión). Es por ello que algunos factores que regionalizan el SNC y determinan el destino de las diferentes células que lo componen, también actúan, de forma similar, en el desarrollo del sistema neurovascular.

Las células endoteliales (ECs, del inglés *Endothelial Cells*) son el elemento principal que compone los vasos sanguíneos. Los capilares, que son los vasos sanguíneos más pequeños, están formados básicamente por ECs y pericitos, mientras que los vasos sanguíneos más grandes como las arterias presentan una pared vascular formada por tres capas. La capa interna está formada por una monocapa de ECs (endotelio), la capa media por células de músculo liso (SMCs, del inglés *Smooth Muscle Cells*) y tejido conectivo elástico, y la capa externa o adventicia, formada por tejido conectivo ((Jeltsch et al., 2013) para revisión). En el sistema neurovascular, las ECs se originan a partir de angioblastos derivados del mesodermo, mientras que las SMCs se originan mayoritariamente de la cresta neural.

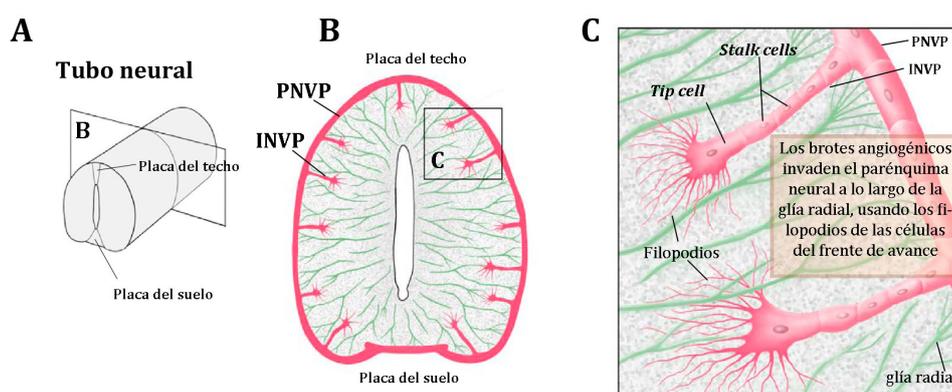


Figura 15. Desarrollo del sistema vascular por vasculogénesis y angiogénesis. A) Tubo neural de un ratón en desarrollo. B) Sección transversal del tubo neural en el que se ha formado el plexo perineural vascular (PNVP) por vasculogénesis, y en el que se está formando el plexo intraneural vascular (INVP) por angiogénesis. C) Ampliación de los brotes angiogénicos para distinguir las células del frente de avance (*Tip cells*) y las células pedunculares (*Stalk cells*). (Adaptado de Wälchli et al., 2015)

Durante el desarrollo embrionario del ratón, a E8.5 se origina alrededor del tubo neural una estructura denominada plexo perineural vascular (PNVP, de inglés *Perineural Vascular Plexus*)

a partir de angioblastos derivados del mesodermo, por un proceso denominado *vasculogénesis* (Figura 15). A E9.5, a partir del PNVP se originan brotes endoteliales que invaden el parénquima del sistema nervioso central para formar, por un proceso denominado *angiogénesis*, el plexo intraneural vascular (INVP, del inglés *Intraneural Vascular Plexus*) (De Smet et al., 2009; Mancuso et al., 2008). Estos brotes angiogénicos migran hacia el ventrículo gracias a unas células que se encuentran en la punta denominadas *células del frente de avance* (o *tip cells* en inglés) capaces de detectar señales presentes en el medio. A estas células le siguen las *células pedunculares* (o *stalk cells* en inglés) que proliferan para dar lugar a la elongación del vaso en crecimiento y son las que formarán el lumen del vaso (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005; Gerhardt et al., 2003; Marin-Padilla, 1985).

Los brotes angiogénicos se fusionan entre sí por un proceso denominado *anastomosis* para dar lugar a una red vascular extensa (Potente et al., 2011; Wacker and Gerhardt, 2011; Walchli et al., 2015a). Este proceso angiogénico ocurre sin perturbar la arquitectura del sistema nervioso central gracias a la relación que existe entre el compartimento neural y los vasos invasores ((Ruhrberg and Bautch, 2013) para revisión). La expansión y remodelación de esta red vascular extensa desde la etapa postnatal en adelante ocurre por angiogénesis. Para ello, las células endoteliales tienen que pasar de un estado quiescente e inmóvil a un estado proliferativo y móvil. Un inductor de angiogénesis es la hipoxia o falta de oxígeno que se genera cuando el tejido crece ((Jeltsch et al., 2013) para revisión). Otro dato a tener en cuenta es que el PNVP posteriormente dará lugar a las arterias y venas presentes en las leptomeninges (piamadre y aracnoidea) ((Walchli et al., 2015b) para revisión).

### **2.1. Células del frente de avance vascular vs cono de crecimiento axonal**

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, es evidente que existe una estrecha relación, a diferentes niveles, entre el SNC y el sistema neurovascular desde el desarrollo hasta el adulto. Ambos sistemas presentan estructuras capaces de detectar la presencia de diferentes moléculas guía en el ambiente. Es el caso del cono de crecimiento axonal en el SNC, y de las células del frente de avance en el sistema neurovascular (Figura 16). En comparación con el cono de crecimiento axonal, la composición y organización del citoesqueleto de las células del frente de avance no está tan descrito. No obstante, se conoce que también presentan lamelipodios y filopodios de filamentos de actina que le proporcionan un aspecto parecido al cono de crecimiento axonal.

A lo largo del tiempo se ha descubierto que ambas estructuras son capaces de reconocer y responder a las mismas moléculas guía. De forma que moléculas que inicialmente se vieron que

ejercían un papel sobre el cono de crecimiento, posteriormente se ha visto que también actúan en las células del frente de avance, y viceversa. De esta manera, moléculas como la Netrina-1, las Semaforinas, las Efrinas y los Slits y sus receptores no solamente guían a los axones, sino que también son capaces de guiar a los vasos en crecimiento (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005; Quaegebeur et al., 2011). También proteínas morfogénicas como son Wnts, SHH y BMPs ejercen funciones similares atractivas o repulsivas en ambas estructuras (Charron and Tessier-Lavigne, 2007; Zacchigna et al., 2008). Por otro lado, factores angiogénicos clásicos como VEGF (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*), Angiopoyetinas, FGF-2, Endotelina-3, y Artemina también son capaces de dirigir el desarrollo neuronal (Honma et al., 2002; Quaegebeur et al., 2011; Zacchigna et al., 2008). Por ende, estas moléculas capaces de actuar en los dos sistemas se han llegado a definir como *angioneurinas* (Segura et al., 2009; Zacchigna et al., 2008).

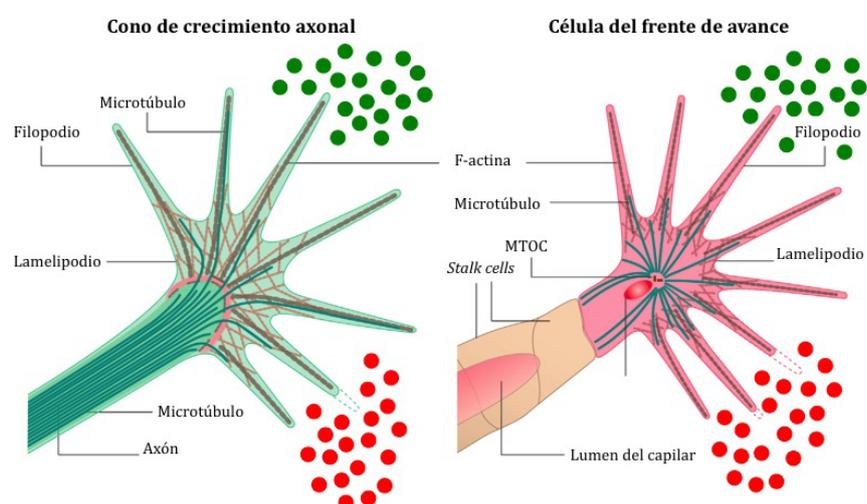


Figura 16. Comparación entre el cono de crecimiento axonal y la célula del frente de avance. (Adaptado de Wälchli et al., 2015)

Durante el desarrollo del sistema neurovascular, la migración de las células endoteliales hacia el parénquima nervioso para formar el INVP está regulado por diferentes vías de señalización. No obstante, cabe destacar la señalización mediada por el VEGF-A y sus receptores VEGFR2 y Neuropilina1 (Np1). El complejo formado por VEGF-A-VEGFR2-Np-1 es necesaria para que el ingreso en el parénquima ocurra adecuadamente. Posteriormente, la angiogénesis y la remodelación vascular también está regulada por diferentes vías de señalización entre las cuales distinguimos otra vez VEGF-A-VEGFR2-Np-1 y las angiopoyetinas y sus receptores Tie. Durante el proceso de angiogénesis intervienen muchos factores de crecimiento, y se requiere de la interacción coordinada entre las células endoteliales y adyacentes ((Reiss, 2010; Walchli et al., 2015b) para revisión).



### 3. La formación hipocámpica

#### 3.1. Anatomía de la formación hipocámpica

La formación hipocámpica (FH) es una estructura que ha sido ampliamente estudiada y que ha atraído la atención de numerosos neuroanatomistas. Es por ello que la mayor parte de la información que se conoce sobre su organización celular, así como de sus conexiones intrínsecas procede de los estudios clásicos con tinción de Golgi por Santiago Ramón y Cajal y Lorente de Nó (Lorente de Nó, 1933, 1934; Ramón y Cajal, 1911). La FH presenta una estructura citoarquitectónica compleja, donde las células principales que lo forman, así como sus conexiones, presentan una organización laminar. Estas características, junto con su intrincado patrón de conectividad van a determinar y posibilitar su funcionalidad.

La FH interviene en procesos mentales superiores como la memoria y el aprendizaje. En cuanto a la memoria, la FH participa en procesos de memoria de trabajo y espacial (Morris et al., 1982; O'Keefe and Conway, 1978; O'Keefe and Speakman, 1987), en la adquisición de memoria declarativa a corto plazo (Squire, 1987; Watanabe and Niki, 1985) y, en definitiva en el mapeo cognitivo. En el aprendizaje participa en la detección de estímulos novedosos y por tanto, en los procesos de habituación, sensibilización y en el condicionamiento clásico (Berger, 1984; Segal and Olds, 1972). También participa en la conducta de búsqueda y respuesta al estrés (Lynch et al., 1988). Cuando se produce una lesión en esta región, ocurre incapacidad para formar nuevas memorias (amnesia anterógrada), pero también puede afectar a memorias formadas antes de la lesión (amnesia retrógrada). No obstante, no afecta al aprendizaje de nuevas tareas o habilidades motoras o cognitivas.

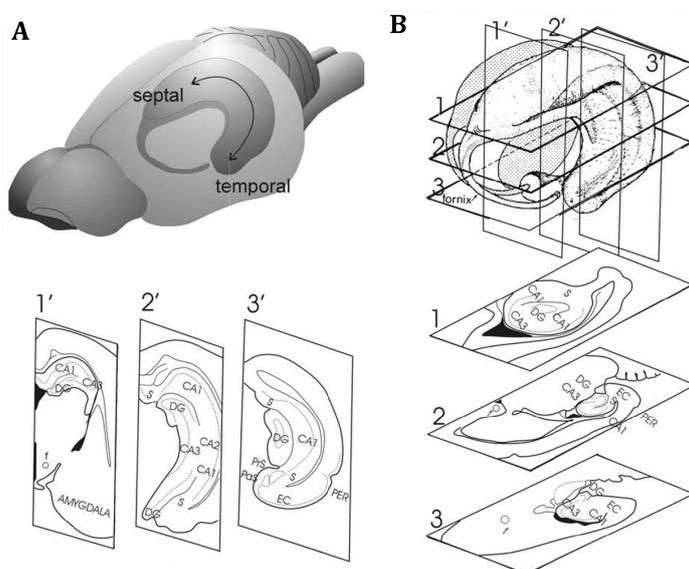
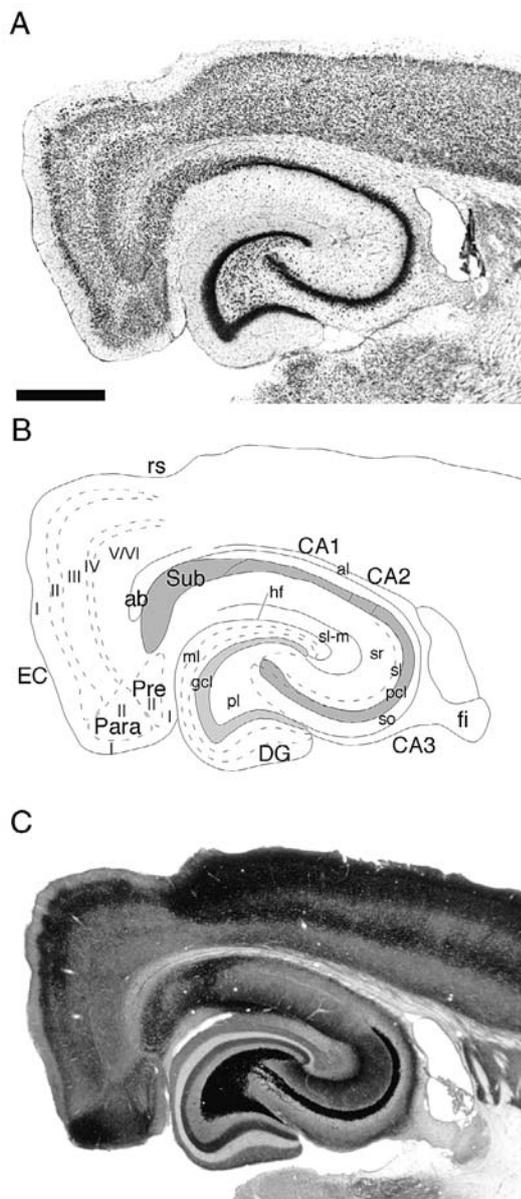


Figura 17. Organización tridimensional de la formación hipocámpica de rata. A) Ilustración de la forma en "C" característica de la formación hipocámpica de ratón y rata. Presentación del eje longitudinal septotemporal. B) Ilustración de la formación hipocámpica. Las secciones coronales (1', 2' y 3') y horizontales (1, 2, 3) muestran los diferentes componentes de la formación hipocámpica que van apareciendo a distintos niveles del eje septotemporal. CA: cornu ammonis; DG, giro dentado; f: fornix; S: Subiculum; EC: corteza entorrinal; PaS: Parasubiculum; PrS: Presubiculum. (Adaptado de *Witter and Amaral, 2004*)

En el cerebro de ratón, la FH aparece como una estructura alargada, con forma de C, con su eje longitudinal extendiéndose desde la zona medial del cerebro, próximo al núcleo septal (rostródorsal), por encima y por detrás del tálamo en el incipiente lóbulo temporal (caudoventral) (Figura 17). Es por esta situación que el eje longitudinal recibe el nombre de eje septotemporal (con el polo septal localizado de forma dorsal y rostral), y al eje transversal como eje ortogonal. Aunque existe controversia en la nomenclatura de la FH, en la presente tesis se referirá a ésta como un sistema funcional formado por un conjunto de regiones cerebrales contiguas y citoarquitectónicamente diferentes que son: el hipocampo propio (CA1, 2



y 3; CA: *cornu ammonis*), el giro dentado (DG, del inglés *Dentate Gyrus*), el complejo subicular (*subiculum*, *presubiculum* y *parasubiculum*) y la corteza entorrinal (EC, del inglés *Entorhinal Cortex*) (Figura 18). No obstante, en la presente tesis, cuando se hable de hipocampo se referirá al conjunto de hipocampo propio y giro dentado. Estas regiones están presentes en la FH a diferentes niveles del eje septotemporal (Figura 17). A niveles más septales, solo están presentes el hipocampo propio y el giro dentado, y a medida que se discurre hacia los niveles más temporales van apareciendo el subiculum primero, y el presubiculum y parasubiculum después, y por último la corteza entorrinal, localizada de forma muy caudal y ventral. El límite dorsolateral de la corteza entorrinal se encuentra en el surco rinal.

Figura 18. Sección horizontal en el que se muestran las diferentes regiones que forman la formación hipocámpica. A) Tinción de Nissl B) Esquema de la FH C) Tinción de Timm. DG, giro dentado; CA: cornu ammonis; S: Subiculum; PaS: Parasubiculum; PrS: Presubiculum; EC: corteza entorrinal; fi: fimbria. En CA: so (stratum oriens), pcl (capa piramidal), sl (stratum lucidum), sr (stratum radiatum), slm (stratum lacunosum moleculare). En DG: ML (capa molecular), GL (capa granular), PoDG (capa polimórfica del giro dentado ó hilus). Escala 500um. (Adaptado de Witter and Amaral, 2004)

## 3.2. Neuroanatomía de la formación hipocámpica

Las secciones horizontales del cerebro de ratón, así como las tinciones como el Nissl o el Timm permiten ilustrar la organización citoarquitectónica de la formación hipocámpica.

### 3.2.1. Hipocampo propio

El hipocampo propio está formado por tres regiones denominadas CA1, CA2 y CA3 (Figura 18). Estas regiones presentan una estructura laminada, compuesto por una capa celular principal denominada capa piramidal, entre otras. Las células que componen la capa piramidal son las neuronas piramidales de tipo excitatorio. No obstante, tanto en el hipocampo propio como en el DG existen otras neuronas no piramidales, con características inhibitorias que se distribuyen por todas las regiones y capas de estas estructuras. Estas neuronas son inmunoreactivas para GABA (Freund and Buzsaki, 1996; Pettit and Augustine, 2000; Ribak et al., 1978) por lo que se consideran interneuronas que forman circuitos locales inhibitorios.

Desde la parte más profunda a la más superficial del hipocampo propio encontramos:

- *Alveus*: Es una fina capa libre de células que contiene los axones de las neuronas piramidales que se dirigen hacia la fimbria/fornix. Es la sustancia blanca del hipocampo.
- *Stratum oriens*: Es la capa que se encuentra entre el alveus y el estrato piramidal, y contiene las dendritas basales de las neuronas piramidales. También se encuentran diferentes clases de interneuronas.
- Capa piramidal (*stratum pyramidale*): Es la capa celular principal del hipocampo propio y está formada por los somas de neuronas piramidales. Estas células presentan un mayor tamaño en la CA3 que en la CA1. Este estrato también contiene el soma de unas células inhibitorias que reciben el nombre de células en cesto y que presentan diferentes tamaños y formas. Los axones de estas células en cesto se extienden formando un plexo en forma de cesto que inervan los somas de las células piramidales (Seress and Ribak, 1984).
- *Stratum lucidum*: Es una capa estrecha acelular que se encuentra adyacente y superficial a la capa piramidal, pero solo está presente en la región CA3, marcando el límite entre CA3-CA2. Contiene las fibras musgosas, que son los axones de las células granulares del DG, aunque las sinapsis de éstas ocurren en la capa piramidal.
- *Stratum radiatum*: Se localiza de forma superficial al *stratum lucidum* en CA3, y a la capa

piramidal en CA2 y CA1 y contiene las dendritas apicales de las neuronas piramidales.

- *Stratum lacunosum moleculare*: Es la capa más superficial del hipocampo propio, y en ella termina, entre otras, la conexión procedente de la corteza entorrinal, la vía entorrino-hipocámpica o vía perforante. También contiene, al igual que el *stratum radiatum*, las dendritas apicales de las neuronas piramidales.
- Fisura hipocámpica: Es una región acelular que separa la región CA1 del DG.

### 3.2.2. Giro dentado

El DG también es una estructura laminada formada por tres capas diferenciadas (Figura 18):

- Capa molecular o *stratum moleculare*: Es la capa más externa, próxima a la fisura hipocámpica. Contiene los árboles dendríticos de las células granulares así como diferentes tipos de interneuronas. Además, se divide en tres substratos: interno, medio y externo, en función al origen de los axones aferentes que contactan con los árboles dendríticos de las células granulares. La capa molecular interna (IML, del inglés *Inner Molecular Layer*) recibe aferencias asociativas/comisurales de las células musgosas, la capa molecular medial (MML, del inglés *Medial Molecular Layer*) recibe aferencias de la corteza entorrinal y septum, mientras que la capa molecular externa (OML, del inglés *Outer Molecular Layer*), recibe las proyecciones de la corteza entorrinal.
- Capa granular o *stratum granulosum*: Está formada por los somas de las neuronas granulares que son las células principales del DG. Estas células se empaquetan en filas de cuatro a ocho células. A las capas granular y molecular se le denominan en conjunto como *fascia dentata* y presentan forma de U o V dependiendo de la posición septotemporal. La *fascia dentata* encierra el hilus, la tercera capa que compone el giro dentado. La región de la *fascia dentata* que se encuentra entre CA3 y CA1 se denomina *hoja suprapiramidal*, la región opuesta se denomina *hoja infrapiramidal*, y la zona que queda entre las dos hojas se denomina *cresta*. En la capa granular también se encuentran otros tipos celulares, la mayoría interneuronas inhibitorias (Amaral and Witter, 1995). Los axones de las células granulares, que reciben el nombre de *fibras musgosas*, se encuentran de forma opuesta a las dendritas y atraviesan el hilus para contactar con las dendritas de las células piramidales de la CA3. En la CA3 forman botones sinápticos de gran tamaño conocidos como terminales musgosos (Amaral and Witter, 1995; Freund and Buzsaki, 1996). Por otro lado, la zona de la capa granular más

cercana al hilus recibe el nombre de *zona subgranular* y constituye una zona donde ocurre neurogénesis en estadios adultos (Amaral and Lavenex, 2007; Amaral and Witter, 1995) (ver apartado 3.5).

- Hilus o capa polimórfica: Es la capa más interna del DG, y su principal componente son las células musgosas, aunque también presenta otros tipos celulares minoritarios. Las células musgosas establecen contactos sinápticos con las dendritas de las células granulares presentes en la capa molecular interna, siendo la inervación tanto ipsi como contralateral. La inervación contralateral, junto con las fibras musgosas que van hacia la CA3 reciben el nombre de *proyección comisural* del DG (Amaral and Witter, 1995).

### 3.2.3. Corteza entorrinal

La EC también es una estructura laminada que presenta las seis capas típicas de la corteza cerebral (Figura 18). Presenta dos capas prácticamente acelulares (I y IV) y cuatro capas celulares (II, III, V y VI) (Amaral and Lavenex, 2007).

- Capa I: Es la capa más superficial y presenta pocas neuronas. Contiene células GABAérgicas que proyectan al DG y al hipocampo propio. No obstante, es una capa rica en fibras orientadas de forma transversal.
- Capa II: Contiene unas células denominadas células estrelladas y células piramidales pequeñas que tienden a agruparse para formar islas celulares. Estas células son la principal fuente de fibras que forman la vía perforante, y distribuyen sus dendritas entre las capas I y III.
- Capa III: Presenta mayoritariamente neuronas piramidales que proyectan hacia el *subiculum* y la región CA1 del hipocampo propio mediante la vía perforante. También está formada por neuronas estrelladas, fusiformes horizontales y bipolares que a su vez contribuyen a la vía perforante.
- Capa IV: Es una capa acelular también denominada *lamina dissecans*, localizada entre las capas III y V, que es más aparente en aquellas zonas de la EC próximas a la fisura renal, particularmente a niveles caudales de la EC.
- Capa V: Capa celular que se divide en dos. La parte superior o capa Va, formada por neuronas piramidales de gran tamaño, células multipolares, horizontales y estrelladas; y la parte inferior o capa Vb formada por neuronas piramidales más pequeñas y tipos

celulares polimórficos que pueden contribuir a la proyección hacia el hipocampo.

- Capa VI: Formada por una población celular heterogénea en cuanto a tamaño y forma. La densidad de estas células disminuye hacia el borde, donde se encuentra la sustancia blanca. Parte de esta población celular también proyecta al hipocampo. No obstante, las capas V y VI también proyectan a áreas fuera de la FH, principalmente a estructuras corticales.

La EC también presenta interneuronas GABAérgicas distribuidas por todas sus capas, siendo más abundantes en las capas superficiales.

Por otro lado, la EC se subdivide en dos regiones según sus propiedades histoquímicas, fisiológicas, sus patrones de terminación en el hipocampo y de sus aferencias (ver Figura 20a, más adelante). Son el área entorrinal medial (MEA, del inglés *Medial Entorhinal Area*), adyacente al hipocampo, y el área entorrinal lateral (LEA, del inglés *Lateral Entorhinal Area*), adyacente a la corteza peririnal (Amaral and Witter, 1995; Kerr et al., 2007).

#### **3.2.4. Complejo subicular**

Como se ha mencionado anteriormente, el complejo subicular está formado por el *parasubiculum* (PaS), *presubiculum* (PreS) y *subiculum* (Sub) (Figura 18). El *subiculum* se sitúa adyacente a la región CA1, por lo que sus capas piramidal y molecular son continuas a la capa piramidal y al *stratum radiatum* de la CA1. No obstante, el *stratum oriens* no presenta continuidad con el *subiculum*, quedando así interrumpido. El *subiculum* recibe aferencias de la CA1 y de las neuronas piramidales presentes en la capa III de la EC a través de la vía perforante, y constituye la eferencia principal del hipocampo.

### **3.3. Conexiones principales de la FH**

#### **3.3.1. Conexiones intrínsecas: el circuito trisináptico**

El motivo por el que se denominan a las cuatro regiones que forman la FH como tal, es porque éstas están asociadas entre sí gracias a la presencia de vías neuronales unidireccionales excitatorias que reciben el nombre de *circuito trisináptico* (Figura 19). Las conexiones unidireccionales que forman este circuito trisináptico son: la *vía perforante*, las *fibras musgosas* y las *fibras colaterales de Schaffer*.

La EC es el punto de partida del circuito puesto que por dicha estructura llega al resto de la FH

la mayor parte de la información procedente de diferentes zonas neocorticales. Las células presentes mayoritariamente en las capas más superficiales de la EC, y minoritariamente en las capas más profundas, proyectan hacia el hipocampo formando lo que se denomina la *conexión entorrino-hipocámpica* o *vía perforante*. En el hipocampo, establecen conexiones sinápticas con las células principales del DG y del hipocampo propio de forma predominantemente ipsilateral, aunque también existen conexiones contralaterales. Esta vía recibe su nombre debido a que los axones entorrinales, una vez abandonan la EC, atraviesan la sustancia blanca, el haz angular, la capa de células piramidales del *subiculum* y la fisura hipocámpica (Amaral and Witter, 1995; van Groen et al., 2003). Se trata de una proyección glutamatérgica.

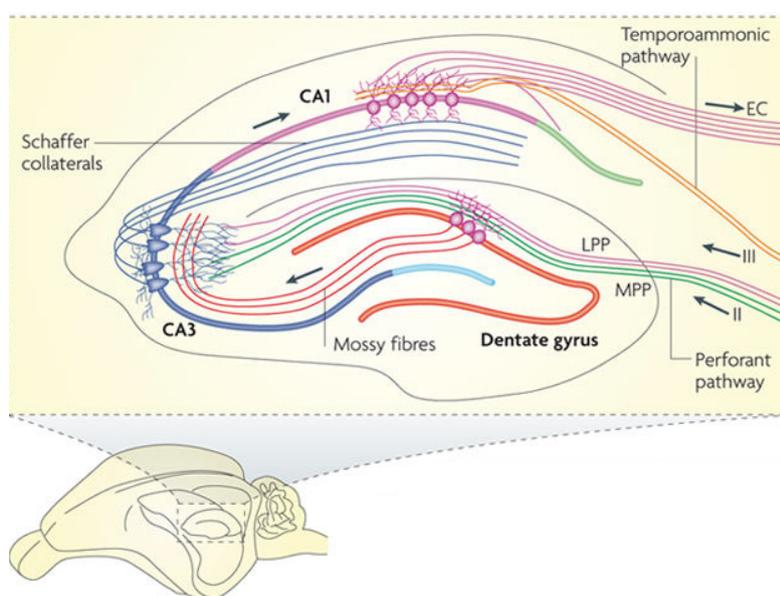


Figura 19. Circuito trisináptico del hipocampo. Entrada de información desde la EC a través de la vía perforante (*perforant pathway*) hacia DG, CA1 y CA3. El DG envía conexiones a CA3 mediante fibras musgosas (*mossy fibres*). La CA3 envía a CA1 mediante *colaterales de Schaffer* (comisurales/asociativas). Por último, la CA1 proyecta a subiculum y EC, cerrándose así el bucle. (Adaptado de Deng et al., 2010).

Por un lado, los axones procedentes de las neuronas situadas en la capa II de la EC contactan con las dendritas de las células granulares presentes en la capa molecular, no obstante, también pueden contactar con neuronas GABAérgicas. Aquellos axones procedentes del LEA inervan de forma muy específica el substrato OML del DG, mientras que los que proceden del MEA terminan en el MML (Figura 20). Por otro lado, la proyección de la EC en el hipocampo propio finaliza en la parte más distal de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3 y CA1. Así, los axones originados mayoritariamente en la capa III de la EC quedan confinados en el *stratum lacunosum-moleculare* siguiendo un patrón topográfico característico: el LEA inerva principalmente la región correspondiente a la interfases de CA1-*subiculum* y CA2-CA3, mientras que MEA inerva el resto del estrato de CA1 (Amaral and Lavenex, 2007; Amaral and Witter, 1995).

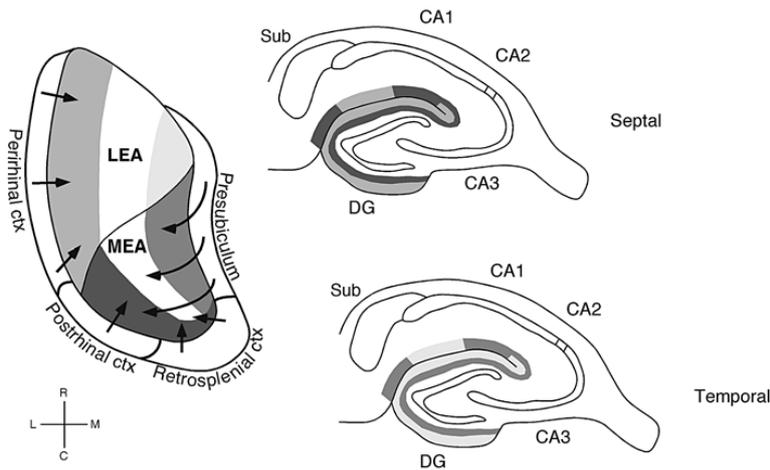


Figura 20. Organización laminar y topográfica de la proyección entorrinal al giro dentado (DG), al hipocampo propio (CA) y al subículo. (Amaral and Lavenex, 2007)

Posteriormente, los axones de las células principales del giro dentado, las células granulares, forman las *fibras musgosas*, que contactan con las dendritas (situadas en el *stratum lucidum*) de las células piramidales de la CA3 del hipocampo propio. Además, pueden establecer sinapsis con interneuronas inhibitorias llamadas células en cesto presentes en este estrato. Las *fibras musgosas* constituyen la conexión principal del DG con el hipocampo propio. Por otro lado, a lo largo de su recorrido por el hilus, las fibras musgosas desarrollan proyecciones colaterales que establecen contactos con las células musgosas, así como con interneuronas y otros tipos celulares formando un extenso plexo en dicha zona (Amaral and Witter, 1995).

Por último, los axones de las células piramidales de la CA3 proyectan a distintas partes del hipocampo propio y fuera de él. La principal conexión que forman se denomina *fibras colaterales de Schaffer* o *asociativa*, e inervan esencialmente el *stratum oriens* y el *stratum radiatum* de la CA1 del mismo hemisferio (Witter and Amaral, 2004). También se denomina asociativa porque se establece entre los niveles transversales del eje septotemporal del hipocampo, de forma ipsilateral. Simultáneamente, las mismas neuronas de CA3 inervan el *stratum oriens* y el *stratum radiatum* de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo contralateral, formando así las conexiones comisurales (Blackstad, 1956).

A su vez, las células piramidales de la CA1 proyectan también de forma unidireccional hacia el *subiculum*. No obstante, una vez llegados a la CA1 y al *subiculum*, este patrón de conexiones intrínsecas comienza a ser más elaborado. La CA1, no sólo proyecta hacia el *subiculum*, sino que también lo hace hacia la EC. Por otro lado, el *subiculum* proyecta al *presubiculum*, *parasubiculum* y corteza entorrinal, siendo ésta última la proyección más prominente. Las conexiones procedentes tanto de la CA1 como del *subiculum* cierran el bucle de procesamiento hipocámpico que comienza en las capas más superficiales de la corteza entorrinal, y que finaliza en sus capas más profundas.

A pesar de que históricamente el circuito trisináptico adquiriese cierta importancia, actualmente se considera que solo es una porción de la circuitería funcional de la FH (Witter and Amaral, 2004) ya que en la conectividad intrínseca del hipocampo existen más conexiones que suman complejidad. En este aspecto, se han propuesto otros circuitos que incluyen a la región CA2, una región hasta ahora poco explorada, puesto que se conoce que interviene en procesos de memoria social (Hitti and Siegelbaum, 2014; Smith et al., 2016; Stevenson and Caldwell, 2014) y se ve alterada en trastornos como la esquizofrenia (Benes et al., 1998) y la epilepsia (Williamson and Spencer, 1994). Uno de los circuitos propuestos es un circuito disináptico, que se establece entre las siguientes estructuras: EC (capas II y III) → CA2 → CA1. En este circuito, los axones entorrinales establecen contactos sinápticos excitatorios con las dendritas distales de las neuronas piramidales de la CA2, que a su vez establecen contactos sinápticos excitatorios con las dendritas de las neuronas piramidales de la CA1. No obstante, las neuronas de la CA2 también reciben contactos inhibitorios desde la CA3, por las colaterales de Schaffer (Chevalyere and Siegelbaum, 2010). De forma que la corteza entorrinal es capaz de llevar a cabo tanto la activación como la inhibición de este circuito disináptico. Por otro lado, desde la observación de que las fibras musgosas también contactan con las dendritas apicales de la CA2, se ha propuesto otro circuito trisináptico constituido por las siguientes estructuras: EC (capa II) → DG → CA2 → CA1 (Kohara et al., 2014).

### 3.3.2. Conexiones intrínsecas: Proyecciones asociativas/comisurales

Las proyecciones asociativas son aquellas que se establecen entre los diferentes niveles transversales a lo largo del eje antero-posterior del hipocampo, mientras que las proyecciones comisurales son las que contactan con el hipocampo contralateral. El DG recibe, en la parte más interna de su capa molecular (IML), proyecciones que parten exclusivamente de células musgosas del hilus, tanto de las situadas en el mismo hipocampo como en el contralateral (Blackstad, 1956; Witter and Amaral, 2004; Zimmer, 1971). De hecho, una misma célula musgosa puede formar a la vez una proyección asociativa y otra comisural. La mayoría de estas células forman contactos excitadores con las dendritas más proximales de las células granulares, pero además contactan también con las interneuronas inhibitorias llamadas células en cesto (Seress and Ribak, 1984). Mediante este sistema se establece una retroalimentación positiva de la activación de las células granulares y también la posibilidad de regulación del proceso mediante la intervención de células en cesto (Amaral and Witter, 1995).

En cuanto al hipocampo propio, y como se ha comentado anteriormente, las fibras colaterales de Schaffer inervan la región CA1 tanto de forma ipsi como contralateral, formando así conexiones

asociativas y comisurales respectivamente.

### **3.3.3. Conexiones extrínsecas: aferencias y eferencias de la FH**

Como se ha comentado anteriormente, la principal vía de entrada de información al hipocampo es a través de la vía perforante. Dicha información procede de regiones corticales y subcorticales (Amaral and Witter, 1995; Kerr et al., 2007). No obstante, también existe otra vía de entrada de información importante a la FH, procedente de regiones subcorticales como son el núcleo medio del *septum* y el núcleo de Banda Diagonal de Broca. Esta vía se denomina *proyección septo-hipocámpica* e inerva al DG y a las regiones CA1 y CA3. Esta inervación es mayoritariamente colinérgica, aunque también contiene proyecciones GABAérgicas y es recíproca.

Por otro lado, a partir de la FH se generan eferencias tanto corticales como subcorticales. Entre las subcorticales están las que inervan regiones como la amígdala, el núcleo septal, el núcleo *accumbens*, el tálamo e hipotálamo.

## **3.4. Desarrollo del hipocampo**

### **3.4.1. Neurogénesis y migración en el hipocampo**

Como se ha mencionado anteriormente, el hipocampo, al igual que la corteza, se forma a partir del palio del telencéfalo. Las células principales que forman el hipocampo, las células piramidales y las granulares, se generan a partir del neuroepitelio situado en la zona ventricular del palio medial. Una región del neuroepitelio dará lugar a las células piramidales (neuroepitelio del hipocampo (HNE, del inglés *Hippocampal Neuroepithelium*)), mientras que otra región dará lugar a las células granulares (neuroepitelio el giro dentado (DNE, del inglés *Dentate Neuroepithelium*)). De forma que desde estadios muy tempranos del desarrollo en ratón se encuentran en la zona ventricular del palio medial, y en dirección medial-dorsal el *cortical hem* (CH), el DNE y el HNE ((Urban and Guillemot, 2014) para revisión) (Figura 21).

La generación de las células piramidales ocurre en el ratón a partir de E10 y se prolonga hasta E18. Las primeras células que se generan a E10 se sitúan en las capas más profundas de la CA1 y CA2. Por otro lado, aquellas que forman la CA3 se generan un día más tarde, a E11, y también se sitúan en las capas más profundas de la CA3. A E14-E15, ocurre un pico de generación de neuronas de la CA3, mientras que el pico de generación de neuronas de la CA1 y CA2 ocurre más tarde (E15-E16), a pesar de que se generaron un día antes (Soriano et al., 1986, 1989a).

Una vez generadas, las células piramidales migran hacia el primordio hipocampal de forma radial tal y como se ha descrito previamente que ocurre en la corteza cerebral. Siguen una translocación somática seguida por una migración dependiente de glía radial y forman la placa cortical hipocampal. No obstante, una vez ocurre la translocación somática, estas células permanecen en una zona denominada zona intermedia durante dos o tres días en el caso de las células que forman la CA1, y cuatro días en el caso de las células de la CA3, antes de continuar con su proceso de migración ((Khalaf-Nazzal and Francis, 2013) para revisión). De forma que la capa piramidal del hipocampo propio se genera siguiendo un gradiente desde la CA3 a la CA1 y las células se van posicionando siguiendo un gradiente *dentro-fuera*. Este gradiente de generación que va desde la CA3 a la CA1 también se observa en las interneuronas GABAérgicas. La glía radial permanece hasta el día postnatal 9 (P9).

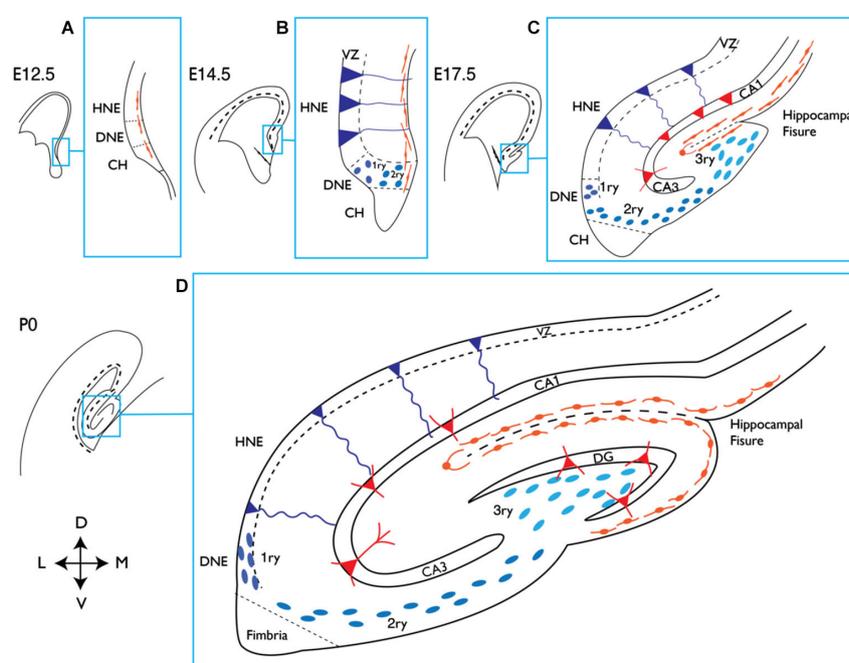


Figura 21. Desarrollo de las células principales del hipocampo, las neuronas piramidales y las células granulares. A) Presunta localización, a E12.5, de los neuroepitelios del hipocampo (HNE) y del giro dentado (DNE) próximos al cortical hem (CH) a partir del cual se originan las células de Cajal-Retzius (naranja). B) E14.5: Formación de las matrices primarias y secundarias que darán lugar a las células granulares (1ry, 2ry). Formación de la glía radial y migración de las células piramidales para formar la capa piramidal. C) E17.5: Formación de la matriz terciaria (3ry) que también dará lugar a las células granulares. Los precursores granulares migran a través de la glía radial tangencial (no mostrado). Formación de la fisura hipocámpica. Se comienza a observar la capa piramidal. D) P0: En el nacimiento, las dos hojas que forman el giro dentado comienzan a formarse. Los precursores de las matrices primarias y secundarias desaparecerán pero la terciaria permanecerá generando células granulares durante el desarrollo postnatal. VZ: zona ventricular; DG: giro dentado; CA: cornus ammonis. (Urbán and Guillemot, 2014)

Las interneuronas GABAérgicas se generan antes que las células piramidales, y se alcanzan sus cotas máximas a E12-E13 en la CA3, y entre E12-E15 en la CA1 (Soriano et al., 1986; Soriano and Frotscher, 1989). Además se generan antes las interneuronas que formarán parte de la

subplaca (futuro *stratum oriens*) y zona marginal interna (futuro *stratum radiatum*) que las que formarán parte de la capa piramidal (Soriano et al., 1989a; Soriano et al., 1994). Al igual que las células piramidales, también se sitúan en la placa hipocampal siguiendo un gradiente *dentro-fuera*.

En cuanto a la generación de células granulares, el proceso empieza a E10 y se prolonga hasta la primera semana postnatal, presentando un pico de generación de células a E16. Las células que se generan van migrando desde la zona ventricular hacia la superficie pial, hasta llegar al lugar donde se formará el giro dentado, y se va formando la matriz primaria, secundaria y terciaria de progenitores neurales, a partir de las cuales se generarán las células granulares que forman la capa granular (Figura 21). Las interneuronas GABAérgicas que formarán parte del giro dentado se originan entre E12-E16 (Soriano et al., 1989b).

Estas células progenitoras migran por las fibras de glía radial que se orientan de forma tangencial y que se extienden desde el CH hasta la fisura hipocámpica y la superficie pial. Una vez generadas las células granulares a partir de las tres matrices, éstas migran para formar las hojas suprapiramidal e infrapiramidal que componen el giro, siguiendo la glía radial. Existe un gradiente en la formación de las dos hojas que componen el giro dentado en sentido suprapiramidal a infrapiramidal. Es decir, las células granulares presentes en el extremo medial de la hoja suprapiramidal son las primeras que se generan. De forma que la hoja suprapiramidal se distingue cuando nace el animal, mientras que la hoja infrapiramidal se forma en la etapa postnatal temprana. Además, las células granulares se van situando siguiendo un gradiente *fuera-dentro*, al contrario de lo que ocurre en el hipocampo propio, complejo subicular y corteza entorrinal (Khalaf-Nazzal and Francis, 2013; Nakahira and Yuasa, 2005; Soriano et al., 1989b; Urban and Guillemot, 2014).

En las etapas postnatales tempranas, la matriz terciaria es la única fuente de células progenitoras y granulares. A la segunda semana postnatal, la proliferación en el giro dentado queda más restringida y confinada a la zona subgranular, que permanece hasta el adulto ((Urban and Guillemot, 2014) para revisión).

Durante el proceso de migración dependiente de glía radial tanto de las células piramidales como granulares es importante la función de las células de CR derivadas del *cortical hem*, y la proteína que secretan, Reelina (ver apartado 1.5.2.2). También son éstas células las que dictan la forma característica que presenta el giro dentado de U o V, ya que se encuentran en la zona marginal externa de lo que será el *stratum lacunosum moleculare* y la capa molecular externa del giro dentado, y junto con las meninges secretan CXCL12 que atrae a las células granulares

(Bagri and Tessier-Lavigne, 2002; Frotscher et al., 2001; Khalaf-Nazzal and Francis, 2013). Las células de CR también juegan un papel importante en el desarrollo de las conexiones del hipocampo (Del Rio et al., 1997; Del Rio et al., 1996; del Río et al., 1995; Soriano et al., 1994).

En cuanto a la formación de la corteza entorrinal y el complejo subicular, éste ocurre tal y como se ha descrito para la neocorteza (ver apartado 1.5.1.1), generándose antes las neuronas que formarán la corteza entorrinal que las que formarán el complejo subicular (Stanfield and Cowan, 1979).

### 3.4.2. Desarrollo de las principales conexiones de la formación hipocámpica

Las conexiones de la formación hipocámpica están ampliamente analizadas, y se conoce en detalle tanto el patrón final de éstas como los plazos en los que se establecen (Super and Soriano, 1994). Aun así, quedan incógnitas por resolver respecto al desarrollo de estas conexiones, sobre todo relacionadas con las moléculas guía responsables de su formación, y los mecanismos de señalización intracelular que desencadenan.

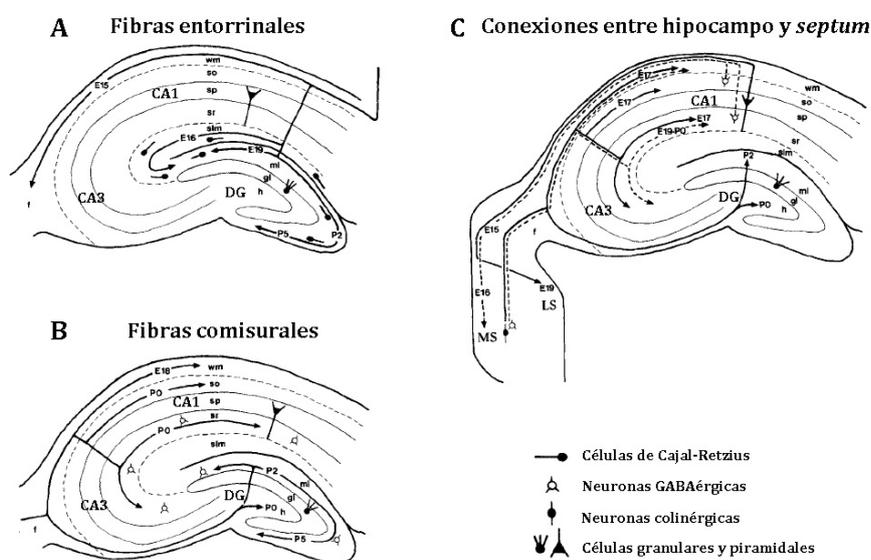


Figura 22. Desarrollo de las conexiones principales del hipocampo. (Supér and Soriano, 1994)

#### La conexión entorrino-hipocámpica o vía perforante:

Los primeros axones entorrinales que alcanzan el hipocampo lo hacen a E15 y llegan a la zona intermedia (futura sustancia blanca) y la fimbria (Figura 22a). Estos axones proceden principalmente del LEA. A partir de E16- E17, los axones siguen una trayectoria ascendente y atraviesan la placa hipocámpica e invaden lo que será el futuro *stratum lacunosum-moleculare*. A partir de E19, los axones también se observan en la zona externa de la capa molecular del

giro dentado, en la hoja suprapiramidal. La inervación de la hoja infrapiramidal ocurre un poco más tarde, a partir de P2-P5.

Durante el desarrollo de esta conexión, los axones entorrinales establecen contactos transitorios con las células de CR, antes de alcanzar sus dianas (Ceranik et al., 2000; Super et al., 1998; Super and Soriano, 1994). De hecho, la eliminación de las células de CR en cultivos organotípicos impide el crecimiento de los axones entorrinales hacia el hipocampo (Del Rio et al., 1997). El desarrollo de la conexión continúa con el aumento de la ramificación y densidad de la innervación a la vez que se establecen los contactos con las células diana definitivas, las neuronas piramidales de la CA y las neuronas granulares del giro dentado.

La formación de la vía perforante está regulada por la Semaforina 3A (Sema3A) que repelen los axones entorrinales *in vitro* (Steup et al., 1999). Sema3A se expresa en la corteza entorrinal, donde repele a los axones entorrinales, empujándolos hacia el hipocampo. También se expresa en las células granulares del giro dentado donde actúa de barrera, repeliendo los axones que se terminan extendiendo por las capas molecular externa y medial y el *stratum lacunosum moleculare* ((Skutella and Nitsch, 2001) para revisión). Otras moléculas que también participan en el desarrollo de la conexión son la Efrina3A o la Reelina (Borrell et al., 1999; Stein et al., 1999).

### **Las conexiones comisurales:**

Los axones comisurales alcanzan el hipocampo contralateral a E18 y se encuentran en la fimbria y en el alveus (sustancia blanca del hipocampo) (Figura 22b). A partir de P0, los axones comisurales inervan el *stratum radiatum* y el *stratum oriens* del hipocampo propio y el hilus del DG. A partir de P2-P5, los axones comisurales inervan también la IML del DG (Super and Soriano, 1994). Esta conexión también se verá modificada durante el desarrollo postnatal, donde habrá incrementos en la ramificación y en la densidad de la inervación, y procesos de refinamiento.

Diferentes moléculas regulan el desarrollo de las conexiones comisurales, siendo la Netrina-1 una de las más importantes. La Netrina-1 se expresa desde estadios embrionarios tempranos en la fimbria, desde donde atrae a los axones comisurales de la CA3 y del hilus (Skutella and Nitsch, 2001; Steup et al., 1999). Otras moléculas que intervienen en este proceso son Sema3C, Sema3F, Slit2 o la Efrina3A ((Skutella and Nitsch, 2001) para revisión).

### **Conexiones entre el hipocampo y el septum:**

A E15, invaden el *septum* medial las primeras fibras hipocámpicas derivadas de células no piramidales (Figura 22c). Estos primeros axones hipocamposeptales posiblemente actúen como axones pioneros guiando a los axones septohipocámpicos colinérgicos que se originan a partir del *septum* medial y que alcanzan el hipocampo dos días más tarde, a E17. No obstante, las fibras septohipocámpicas GABAérgicas no invaden el hipocampo hasta E19-P0. En los estadios perinatales, se forma la conexión hipocamposeptal que se originan en las neuronas piramidales del hipocampo y terminan en el *septum* lateral (Super and Soriano, 1994).

### **3.5. Neurogénesis adulta**

La neurogénesis adulta es el proceso por el cual se generan nuevas neuronas en el cerebro adulto y que se integran en los circuitos existentes. La neurogénesis en adultos ha sido descrita en diferentes regiones del cerebro a lo largo de la escala zoológica. Fue inicialmente identificada en pájaros cantores (Nottebohm et al., 1976), y posteriormente se ha observado en otras especies de aves, reptiles y peces (Zupanc, 2001). En mamíferos, la neurogénesis adulta está más limitada, y ocurre mayoritariamente en la zona subgranular del DG (SGZ, del inglés *Subgranular Zone*) (Altman and Das, 1965) y la zona subventricular del ventrículo lateral. Se ha descrito generación de nuevas neuronas en otras áreas como el neocortex (Cameron and Dayer, 2008; Gould, 2007) y el hipotálamo (Kokoeva et al., 2005), aunque no está del todo establecido. En el cerebro humano adulto, está aceptado que ocurre neurogénesis en el DG (Eriksson et al., 1998; Spalding et al., 2013), al contrario de lo que ocurre en la zona subventricular, donde la situación es más controvertida (Bergmann et al., 2012; Curtis et al., 2007; Sanai et al., 2004).

La neurogénesis adulta es la forma más robusta de plasticidad que ocurre en el cerebro adulto y contribuye a los procesos de memoria y aprendizaje. Además, se han asociado alteraciones en este proceso con enfermedades neurológicas y psiquiátricas en el humano ((Goncalves et al., 2016) para revisión). Las neuronas que se generan, a diferencia de las que se generan durante el desarrollo, deben integrarse en un circuito neuronal que ya está presente. Es por ello que éstas pueden verse influenciadas por numerosos factores y a la vez pueden modificar los circuitos ya existentes.

#### **3.5.1. Neurogénesis en la zona subgranular del DG**

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de neurogénesis en adultos en el DG ocurre

en la SGZ, que es una delgada capa que se encuentra entre la capa granular y el hilus. Esta SGZ contiene nichos celulares que presentan progenitores neurales, otras células que actúan de soporte para la neurogénesis (Mercier et al., 2002) y una red vascular densa altamente asociada a estos progenitores (Palmer et al., 2000). La SGZ permite la proliferación de los progenitores neurales y promueve la especificación y diferenciación a células granulares ((Goncalves et al., 2016) para revisión).

### Progenitores del nicho

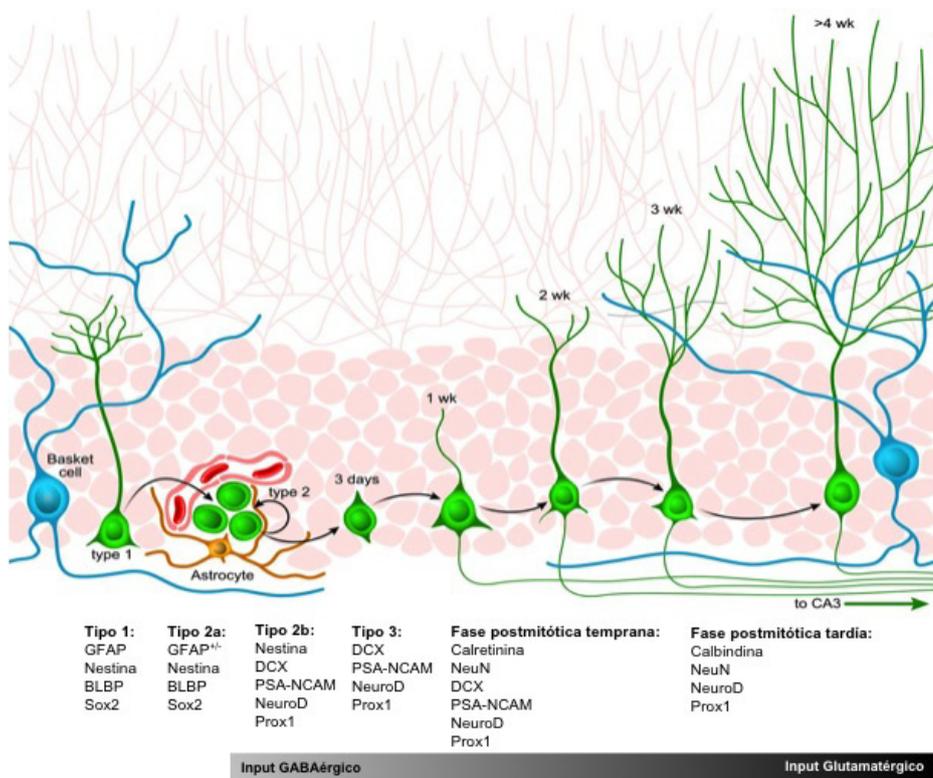


Figura 23. Proceso de neurogénesis adulta en la zona subgranular del giro dentado. Las células tipo 1 (type 1) dan lugar a las células de tipo 2 (type 2) que a su vez generan neuroblastos o células de tipo 3. Los neuroblastos van madurando para formar células granulares maduras que se integrarán en la red neuronal existente. Se muestran los marcadores que éstas células comienzan a expresar, y los inputs GABAérgicos y glutamatérgicos que comienzan a recibir. (Adaptado de Aimone et al., 2014 y Kempermann et al., 2015)

En la SGZ encontramos dos tipos de progenitores que se diferencian en la morfología y la expresión de marcadores (Zhao et al., 2006). Están los de tipo 1 o células tipo glía radial (RGLs, del inglés *Radial Glia-Like*) y los de tipo 2 o células progenitoras intermedias (IPCs, del inglés *Intermediate Progenitor Cells*) (Figura 23). Las células de tipo 1 son las células madre del nicho, y como tal tienen capacidad de dividirse y diferenciarse a células especializadas. Además, presentan un proceso radial que se extiende hacia la capa molecular interna, donde se acaba ramificando. Se dividen lentamente y expresan GFAP (del inglés *Glial Fibrillary Acidic*

*Protein*), Sox2 (de inglés *Sry-related HMG box transcription factor*), BLBP (del inglés *Brain Lipid-Binding Protein*) y Nestina. Las células de tipo 1 son las que generan a las células de tipo 2, que tienen un proceso más corto y dejan de expresar la GFAP. Las células de tipo 2 presentan un proceso de división rápido y son más prolíferas, y se subdividen en 2a (las que todavía expresan marcadores de progenitor) y en 2b (las que comienzan a expresar marcadores neuronales como doblecortina (DCX), PSA-NCAM (del inglés *Polysialylated Neuronal Cell Adhesion Molecule*), NeuroD y Prox1) (Steiner et al., 2006). A partir de las células de tipo 2 se generan las células de tipo 3 o neuroblastos que se diferenciarán a neurona granular. La expresión de DCX comienza desde la etapa proliferativa (tipo 2a) y se mantiene hasta el periodo de maduración postmitótica que dura de una a dos semanas, por lo que se utiliza como marcador de neurogénesis adulta ((Kempermann et al., 2015) para revisión).

### **Proceso de neurogénesis adulta**

El proceso de neurogénesis ocurre cuando una célula de tipo 1 (célula madre) se divide de forma asimétrica y genera una célula de tipo 2 (célula progenitora), que se amplifica (Figura 23). Llegados a este punto, la célula decide qué linaje seguir, puesto que, aunque la gran mayoría siguen un linaje neuronal, algunas siguen un linaje glial (Cameron et al., 1993; Steiner et al., 2004). Cuando siguen el linaje neuronal, se transforman en células de tipo 3 (neuroblasto), que todavía presentan capacidad para dividirse, pero no expresan ningún marcador de célula madre (Toni and Sultan, 2011). Aunque su capacidad proliferativa es muy reducida, en situaciones patológicas como en convulsiones experimentales, presentan un aumento desproporcionado de la división celular ((Kempermann et al., 2015) para revisión).

Todo el proceso dura aproximadamente ocho semanas (Deng et al., 2010). El neuroblasto se genera durante la primera semana, y migra una corta distancia hacia la parte interior de la capa granular donde comienza a diferenciarse. En este momento extiende un proceso apical hacia la capa molecular que formará las dendritas, y un proceso basal hacia el hilus que formará el axón (Esposito et al., 2005; Zhao et al., 2006). Las nuevas neuronas que se generan en el adulto siguen el mismo patrón de formación de la capa granular que ocurre durante el desarrollo. De forma que las nuevas neuronas que se generan quedan en la parte interna o medial de la capa granular, mientras que las células granulares más antiguas se quedan en la parte externa de la capa (Mathews et al., 2010). Durante la segunda semana, las células consiguen el fenotipo neural, las dendritas alcanzan la capa molecular externa y se detectan las primeras espinas dendríticas (Zhao et al., 2006). A partir de la tercera semana, la densidad de espinas aumenta considerablemente, hasta alcanzar el máximo a las ocho semanas. Es en esta tercera semana

cuando comienzan a recibir contactos excitatorios por parte de los axones de la vía perforante (Toni et al., 2007; Zhao et al., 2006). Durante todo este proceso las espinas son altamente plásticas, dinámicas, y están reguladas por actividad neuronal (Zhao et al., 2006). En cuanto al axón, éste alcanza la CA3 antes de que se detectan las primeras espinas dendríticas. Para llegar a la CA3 primero atraviesa el hilus, por lo que se encuentran botones sinápticos tanto en el hilus como en la CA3 (Faulkner et al., 2008; Toni et al., 2008; Toni et al., 2007). Al igual que ocurre con las espinas dendríticas, el tamaño de estos axones, así como el número de vesículas presinápticas y el número de zonas activas va aumentando hasta pasadas las ocho semanas. En un principio, una célula puede establecer contactos multisinápticos con diferentes estructuras a través de sus botones axónicos y sus espinas dendríticas. No obstante, a medida que la célula madura, la proporción de botones multisinápticos disminuye (Faulkner et al., 2008; Toni et al., 2008). El proceso de formación de espinas en las neuronas que se generan en el adulto es algo distinto al proceso que ocurre durante el desarrollo puesto que, en el adulto, las espinas se generan en contactos sinápticos preexistentes. Se piensa que la liberación de glutamato por las sinapsis preexistentes ejerce un papel quimioatractivo, induciendo la formación de filopodios. Por otro lado, también se piensa que los astrocitos locales pueden contribuir en este proceso (Toni and Sultan, 2011; Toni et al., 2007).

Por lo tanto, en el proceso de neurogénesis adulta en la SGZ del giro dentado podemos distinguir cuatro fases: una *fase de célula progenitora* donde ocurre la expansión de las células progenitoras que posteriormente se diferenciarán; una *fase de supervivencia temprana*, donde las células progenitoras salen del ciclo celular para diferenciarse y donde muchas de las nuevas neuronas que se generan son eliminadas; una *fase de maduración postmitótica*, donde ocurre el crecimiento de axones y dendritas, sinaptogénesis y establecimiento de conexiones funcionales; y una última *fase de supervivencia tardía*, donde se dan procesos de refinamiento ((Kempermann et al., 2015) para revisión).

Para que las neuronas se integren en los circuitos del giro dentado, éstas siguen el siguiente proceso: *sinapsis silentes, respuesta excitatoria a GABA, inputs glutamatérgicos, y respuesta inhibitoria a GABA* (Figura 23) (Esposito et al., 2005). Cuando se generan las nuevas neuronas, antes de recibir contactos sinápticos, éstas son activadas tónicamente por GABA liberado de zonas extrasinápticas, que actúa regulando el umbral de excitabilidad de estas células (Demarque et al., 2002; Ge et al., 2006). Cuando las neuronas tienen una semana, ocurre un proceso crítico para su maduración por el cual la liberación de GABA provoca despolarización en vez de hiperpolarización de la membrana (Glykys and Mody, 2006; Walker and Semyanov, 2008). A las tres semanas, las neuronas comienzan a recibir inputs glutamatérgicos que

también modifican el umbral de excitabilidad de la membrana de estas células, favoreciendo así la formación de los contactos con los axones de la vía perforante (Ge et al., 2007). Cuando las neuronas ya son adultas, reciben inputs locales inhibitorios de GABA desde la capa granular, la capa molecular y el hilus (Li et al., 2012a). El conjunto de inputs GABAérgicos y glutamatérgicos que recibe la neurona son importantes para su funcionamiento en la codificación de la memoria (Aimone et al., 2009; Deng et al., 2010).

### Regulación de la neurogénesis en la SGZ

El proceso de neurogénesis está regulado a distintos niveles (Figura 24). En un principio, el microambiente del nicho constituye un primer punto de regulación, donde se generan gradientes de morfógenos que pueden tener efectos acumulativos u opuestos y que conducen a la expresión de diferentes genes. En segundo lugar, otro punto de regulación lo constituyen los diferentes componentes de señalización (morfógenos, factores de crecimiento, citoquinas y neurotransmisores), factores de transcripción y componentes metabólicos que actúan sobre las células durante las diferentes etapas de la transición desde que nacen hasta que son adultas. Por otro lado, factores como el ejercicio físico, el enriquecimiento ambiental o el estrés pueden tener un efecto regulatorio sobre la neurogénesis adulta ((Aimone et al., 2014; Kempermann et al., 2015) para revisión).

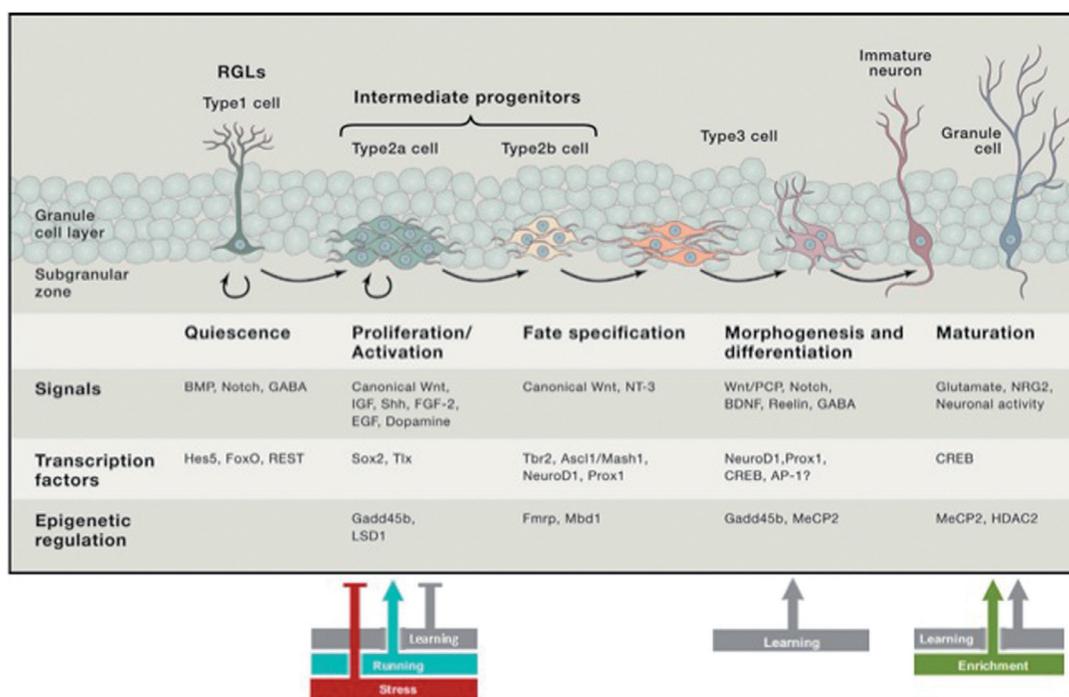


Figura 24. Factores que intervienen en la regulación de las diferentes fases de la neurogénesis adulta (Adaptado de Gonçalves et al., 2016 y Aimone et al., 2014)

### **Vía de señalización Notch:**

La vía de señalización de Notch1 puede llevar a cabo funciones opuestas según el contexto en el que se encuentre. Se ha observado que Notch1 se requiere para la expansión de los progenitores neurales que expresan Nestina (Tipo1, 2a y 2b), y para el mantenimiento del estado quiescente de las células de tipo 1. En este aspecto, la inactivación de la vía de señalización de Notch da lugar a un incremento inicial en la neurogénesis y a una diferenciación prematura de los progenitores Sox2+. Estos eventos conducen a una disminución en el número de células progenitoras presentes en el nicho, y por ende a la supresión de la neurogénesis (Ehm et al., 2010). Por otro lado, se ha observado que la sobreexpresión de uno de los componentes de la cascada de señalización de Notch (NICD, del inglés *Notch Intracellular Domain*), da lugar a un aumento en la proliferación y expansión de los progenitores neurales del nicho. En este mismo estudio también se ha observado que la señalización de Notch1 modula la morfogénesis dendrítica, puesto que la sobreexpresión de Notch1 da lugar a un aumento en la complejidad dendrítica (Breunig et al., 2007). Se piensa que el mantenimiento del estado quiescente de las células de tipo 1 a través de Notch ocurre porque la actividad de Notch promueve la expresión de unas proteínas denominadas Hes en estas células. Estas proteínas son factores de transcripción bHLH que reprimen la expresión génica, incluso la de otros factores bHLH (Imayoshi and Kageyama, 2014). Las proteínas Hes presentan una expresión oscilatoria debido a que ellas mismas inhiben su propia transcripción, y debido a que presentan una vida media corta (Imayoshi et al., 2013; Shimojo et al., 2008). Al ser proteínas que reprimen la expresión génica, hacen que sus proteínas dianas también se expresen de forma oscilatoria, pero opuesta. Entre estas proteínas dianas se encuentran proteínas proneurales como son Neurog2 y Ascl, algunas de las cuales se comentarán más adelante (Imayoshi et al., 2013; Shimojo et al., 2008).

### **Vía de señalización de Sonic Hedgehog (Shh):**

La vía de señalización de Shh presenta funciones importantes en la formación de los nichos neurogénicos. Se ha observado que los progenitores neurales presentes en el DG adulto se originan a partir de progenitores presentes en el hipocampo ventral embrionario y con capacidad de responder a Shh (Ahn and Joyner, 2005; Li et al., 2013). Componentes de la vía de señalización Shh como son el receptor Patched (Ptc) y la proteína transmembrana Smoothed (Smo) se expresan en el hipocampo adulto, y en los progenitores derivados del hipocampo ventral embrionario (Lai et al., 2003). Se conoce que Shh promueve, directamente, la proliferación de los progenitores neurales *in vitro*. En este aspecto, la sobreexpresión de Shh en el DG da lugar a un aumento en la proliferación de los progenitores neurales *in vivo*. Asimismo, la inhibición

farmacológica de Shh conduce a una disminución en la proliferación de los progenitores (Lai et al., 2003). Por otro lado, se ha observado que la disrupción del cilio primario, necesario para la señalización de SHH, en las células de tipo 1, disminuye la producción de células de tipo 2 (Amador-Arjona et al., 2011; Breunig et al., 2008).

#### **Vía de señalización de BMPs:**

La función de BMPs depende del contexto en el que se encuentre. En el hipocampo postnatal, BMPs se secretan por las células granulares, progenitores neurales tipo 1 y por otras células presentes en el nicho, y son esenciales en la regulación del equilibrio entre proliferación y quiescencia (Bonaguidi et al., 2008; Bond et al., 2014; Mira et al., 2010; Yousef et al., 2015). No solo son necesarios para mantener el estado quiescente de las células de tipo 1 (Mira et al., 2010), sino que también juegan papeles importantes en la diferenciación y maduración de las células granulares (Bond et al., 2014). Esta función dual se piensa que se debe a una expresión diferencial de los receptores de BMP, puesto que las células de tipo 1 expresan el receptor BMPR-Ia, cuya expresión disminuye en las células de tipo 2, mientras que los neuroblastos y las neuronas expresan el receptor BMPR-Ib (Mira et al., 2010). Por lo que las células tipo 1 interpretan las señales de BMP como señales de quiescencia, mientras que los neuroblastos las interpretan como señales de diferenciación. Por otro lado, inhibidores de BMPs como son *Cordina*, *Nogina* y *Neurogenesis-1* se encuentran en el nicho neural, y se piensa que podrían estar regulando, de forma local, los niveles de señalización mediada por BMP (Bonaguidi et al., 2008). También se ha observado que la señalización de BMPs interviene en la asociación entre el ejercicio físico y cambios en la neurogénesis. Por último, también se ha detectado un incremento de la señalización BMP asociado a la edad, que contribuye al declive de la neurogénesis que se observa en los animales de edad avanzada (Yousef et al., 2015).

#### **Vía de señalización de Wnt**

Las proteínas Wnts presentan funciones muy importantes durante el desarrollo de la corteza e hipocampo, donde participan promoviendo la proliferación de los progenitores neurales, así como su diferenciación. En el hipocampo adulto, las proteínas Wnts se secretan por astrocitos y células de tipo 1 y se piensa que actúan de forma paracrina y autocrina (Lie et al., 2005; Okamoto et al., 2011; Qu et al., 2010). Se ha observado que Wnt3, producido por los astrocitos, promueve la diferenciación neural de los progenitores presentes en el nicho (Kuwabara et al., 2009; Lie et al., 2005). Asimismo, se ha observado que la activación de la señalización de Wnt3 en la SGZ incrementa la neurogénesis, mientras que su inhibición da lugar a una disminución en

la proliferación y diferenciación neuronal (Lie et al., 2005). Por otro lado, la vía de señalización Wnt/b-Catenin-TCF/LEF regula la expresión transcripcional de Prox1 y NeuroD1, que a su vez regulan la expresión de genes involucrados en la diferenciación neuronal, por lo que juega un papel importante en la diferenciación, formación de sinapsis y en la maduración neuronal (Gao et al., 2009; Kuwabara et al., 2009; Lavado et al., 2010). La vía de señalización de Wnt también está implicada en los cambios que ocurren en la neurogénesis adulta relacionados con la edad y con la actividad neuronal (Fortress et al., 2013; Seib et al., 2013).

### **Factores de crecimiento, factores neurotróficos, citoquinas y neurotransmisores**

Numerosos factores de crecimiento, factores neurotróficos y neurotransmisores intervienen en la regulación de la neurogénesis. Los factores neurotróficos son proteínas de señalización extracelular que se unen a los receptores tirosina quinasa, conocidos como receptores Trk, y sus correceptores p75NTR. Se conoce bastante bien las funciones que desempeña el factor neurotrófico BDNF. Se ha observado que la administración exógena de BDNF promueve la proliferación de las células de tipo 2 en el hipocampo de rata (Scharfman et al., 2005). Por otro lado, la ausencia del receptor TrkB en las células de tipo 2, en el hipocampo de ratón, disminuye la capacidad proliferativa de estas células (Li et al., 2008). También se ha observado que BDNF promueve el crecimiento y la complejidad del árbol dendrítico de las nuevas células granulares tras el ejercicio físico y la exposición a ambientes enriquecidos (Wang et al., 2015b).

Los factores de crecimiento forman un grupo de proteínas extracelulares extenso que controlan el crecimiento celular. Varios factores de crecimiento participan en la regulación de la neurogénesis adulta en el hipocampo, entre estos factores se encuentran FGF2, VEGF e IGF1 (del inglés *Insulin-like Growth Factor*). Se ha observado que estos factores promueven la proliferación de las células de tipo 2 (Jin et al., 2002; Kang and Hebert, 2015; Schanzer et al., 2004). Además, se conoce que IGF1 interviene en la diferenciación de los progenitores neurales a oligodendrocitos al inhibir la señalización mediada por BMP (Hsieh et al., 2004).

La neurogénesis adulta también está altamente regulada por microglia e inflamación. La inflamación inhibe la neurogénesis en el cerebro adulto (Ekdahl et al., 2003) a través de la liberación microglial de citoquinas inflamatorias como IL-6 (del inglés *Interleukin-6*) y TNF- $\alpha$  (del inglés *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ). No obstante, la microglía también puede promover la neurogénesis si en el nicho neurogénico se liberan moléculas anti-inflamatorias (Battista et al., 2006). Por otro lado, la muerte selectiva de las células de tipo 2, otro mecanismo de regulación de la neurogénesis en el DG, es llevada a cabo, mayoritariamente por la microglia (Sierra et al.,

2010).

Algunos neurotransmisores también participan en la regulación de la neurogénesis adulta en el hipocampo, como es el caso del neurotransmisor GABA (Giachino et al., 2014; Masiulis et al., 2011; Song et al., 2012). Se ha observado que la ausencia de dos receptores a través de cuales señala GABA ( $GABA_A$ R y  $GABA_B$ R) da lugar a un incremento en la proliferación de las células de tipo 1 (Duveau et al., 2011; Giachino et al., 2014; Song et al., 2012). Por otro lado, la liberación tónica de GABA por las interneuronas Parvalbúmina positivas mantienen el estado quiescente de las células tipo 1 al señalar a través de los receptores  $GABA_A$ R (Song et al., 2012). Otro neurotransmisor que interviene en la regulación de la neurogénesis es la acetilcolina, la cual presenta funciones opuestas a GABA, ya que promueve la proliferación de las células de tipo 1 (Itou et al., 2011). Puesto que el ejercicio físico aumenta la liberación de acetilcolina en el hipocampo, este neurotransmisor puede estar contribuyendo al efecto estimulante que tiene el ejercicio sobre la neurogénesis adulta (Itou et al., 2011; Mitsushima et al., 2009; Suh et al., 2007). También se conoce que el neurotransmisor serotonina promueve la proliferación de los progenitores neurales, al actuar a través de sus receptores  $5-HT_{1A}$ ,  $5-HT_{1B}$  y  $5-HT_{2A}$  (Banasz et al., 2004; Radley and Jacobs, 2002).

### **Factores de transcripción**

Los factores de transcripción son esenciales para la regulación de la expresión génica y juegan un papel central en la especificación del linaje celular. Puesto que estos factores se expresan de forma diferencial a lo largo del proceso neurogénico, muchos de ellos se han utilizado como marcadores. Uno de los factores de transcripción más estudiado es Sox2, que se expresa en las células de tipo 1 y 2a, y que controla las capacidades multipotentes y proliferativas de estas células (Favaro et al., 2009; Steiner et al., 2006). Este factor de transcripción controla la expresión de diversos genes como Tlx, que su vez, promueve la proliferación de los progenitores a través de la vía de señalización de Wnt (Shimozaki et al., 2012). Tlx también controla la proliferación de los progenitores al suprimir las vías de señalización que promueve la quiescencia, como son las vías de p53 y p21, entre otras (Niu et al., 2011). Por otro lado, se conoce que Sox2 regula la expresión de Shh, controlando, por tanto, la señalización mediada por dicha proteína (Favaro et al., 2009). Sox2 también inhibe la transcripción de NeuroD1 mediada por la vía de señalización Wnt, y por tanto la diferenciación neuronal (Kuwabara et al., 2009).

Otros factores de transcripción que regulan el proceso de neurogénesis en el adulto son los que pertenecen a la familia Hes, como FoxO, NF1, Hmga3 y Bmi-1. Estos factores se expresan

en las células tipo 1 y se encargan de mantenerlas en un estado quiescente, e impiden su diferenciación (Gao et al., 2011; Kim et al., 2015). Otros factores, miembros de la familia bHLH, también intervienen en la regulación de la neurogénesis, como es el caso de *Ascl/Mash1*, expresado por las células tipo 2a (Uda et al., 2007). *Ascl/Mash1* lleva a cabo dos funciones opuestas ya que por un lado promueve la proliferación, y por otro, la salida del ciclo celular y la diferenciación. Debido a que su expresión está regulada por las proteínas *Hes*, este factor se puede expresar de forma oscilatoria o estable y se ha observado que cuando se expresa de forma oscilatoria, promueve la proliferación de los progenitores neurales, mientras que cuando se expresa de forma estable, promueve la diferenciación (Imayoshi et al., 2013). Otro factor de transcripción importante en el proceso de neurogénesis es *Tbr2*, puesto que se ha observado que la eliminación de dicho gen promueve la proliferación de los progenitores neurales e inhibe la diferenciación (Hodge et al., 2008). También se ha observado que *Tbr2* presenta un papel importante en la determinación del linaje neuronal (Hodge et al., 2012).

El factor de transcripción *Prox1* también es importante en la regulación de este proceso. Se ha observado que la sobreexpresión de *Prox1* promueve la diferenciación neuronal de los progenitores neurales, y su eliminación resulta en una disminución en la generación de las neuronas inmaduras *DCX+* (Lavado et al., 2010). *Prox1* comienza a expresarse en las células tipo 2b y su expresión se mantiene hasta el adulto. Se piensa que *Prox1* es necesario para mantener la identidad de neurona granular madura (Iwano et al., 2012), de hecho, la eliminación condicional de *Prox1* en las nuevas neuronas granulares da lugar a una disminución en los niveles de calbindina y a la expresión aberrante de genes específicos de las células piramidales de la CA3.

### **Factores externos**

Existen diferentes factores externos que presentan un impacto tanto negativo como positivo, en el proceso de neurogénesis adulta a lo largo de la vida del individuo (Figura 24). Entre los factores positivos, que favorecen la neurogénesis, se encuentran el enriquecimiento ambiental, el ejercicio voluntario y la dieta. Entre los factores negativos, que disminuyen drásticamente los niveles de neurogénesis, se encuentran el envejecimiento y el estrés ((Aimone et al., 2014; Kempermann et al., 2015) para revisión).

## 4. Las semaforinas

Las semaforinas son una superfamilia de proteínas secretables y de membrana inicialmente conocidas por sus funciones en el sistema nervioso. La función mejor caracterizada de las semaforinas es la de actuar como moléculas guía, tanto atractivas como repulsivas, para las células que migran y para las neuritas (axón y dendritas) en crecimiento. No obstante, actualmente se conoce que también pueden intervenir en otros procesos celulares como son la división celular; la diferenciación y la supervivencia, y no solo en el tejido neural ((Jongbloets and Pasterkamp, 2014) para revisión). Es por ello que estas proteínas intervienen en procesos tan diversos como la conectividad neural, la angiogénesis, la inmunoregulación y el cáncer ((Jongbloets and Pasterkamp, 2014; Yazdani and Terman, 2006) para revisión).

Las semaforinas se expresan en la mayoría de tejidos, aunque esta expresión varía según la edad. El patrón de expresión de estas proteínas está muy bien caracterizado en el sistema nervioso, particularmente durante el desarrollo, donde prácticamente todas las semaforinas se están expresando tanto en células neuronales como no neuronales. En el sistema nervioso, la expresión de semaforinas está normalmente asociado con el crecimiento de axones durante la formación de los tractos axonales, y esta expresión suele disminuir tras la formación de éstos. Actuando de forma atractiva o repulsiva, las semaforinas permiten que los axones alcancen su destino ((Yazdani and Terman, 2006) para revisión).

Por otro lado, algunas semaforinas siguen expresándose en el adulto e intervienen en procesos tanto fisiológicos como patológicos. En el SNC, a nivel fisiológico, las semaforinas se encargan del mantenimiento de las conexiones existentes, así como de la formación y estabilización de las sinapsis ((de Wit and Verhaagen, 2003; Mann et al., 2007) para revisión). A nivel patológico, se han asociado las semaforinas con epilepsia, degeneración retinal, enfermedad de Alzheimer, degeneración de motoneuronas, esquizofrenia y Parkinson ((Yazdani and Terman, 2006) para revisión).

### 4.1. Las semaforinas y sus receptores

Se conocen más de veinte proteínas de la superfamilia de las Semaforinas, que se han categorizado en ocho subfamilias dependiendo de la similitud que presentan en cuanto a su secuencia de aminoácidos y estructura ((Jongbloets and Pasterkamp, 2014; Yazdani and Terman, 2006) para revisión) (Figura 25). Las Semaforinas de las subfamilias 1 y 2 se encuentran en invertebrados. En vertebrados se encuentran las subfamilias 3 hasta la 7, con excepción de

la 5c que se encuentra en invertebrados. Por último, las Semaforinas de la clase V se encuentran en el genoma de algunos virus de DNA (Jongbloets and Pasterkamp, 2014).

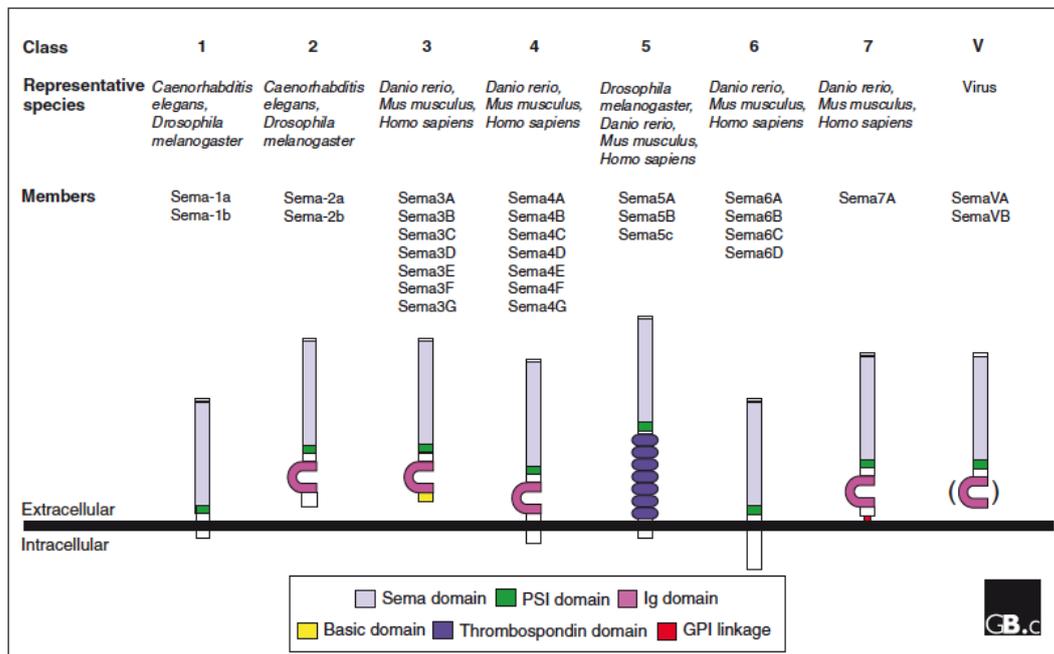


Figura 25. Representación de las diferentes clases de semaforinas y los dominios que las forman. (Yazdani and Terman, 2006)

Estas ocho clases difieren en cuanto a su secuencia y características estructurales (Figura 25), pero todas presentan un dominio extracelular conservado denominado dominio semaforina (sema) de unos 500 aminoácidos. El dominio sema es importante para la función de la proteína ya que facilita la homodimerización y la unión a sus receptores. Estas proteínas también presentan un dominio plexina-semaforina-integrina (PSI), rico en cisteínas. Todas las semaforinas presentan este dominio PSI, a excepción de algunas semaforinas víricas. Por otro lado, las semaforinas pueden presentar otros dominios que las distinguen entre ellas. Estos son los dominios tipo inmunoglobulina (Ig) y los dominios trombospondina, que son partícipes de las funciones llevadas a cabo por la proteína ((Yazdani and Terman, 2006) para revisión). Además, las semaforinas también se diferencian en si están unidos a membrana o no, de esta forma, se distinguen las semaforinas secretables, las transmembrana y las ancladas a membrana mediante GPI (glicosilfosfatidilinositol).

Las semaforinas llevan a cabo sus funciones actuando como ligandos que se unen a receptores de membrana. Los receptores principales de las semaforinas son las plexinas, que son proteínas transmembrana que se dividen en cuatro clases (A-D) (Figura 26). En vertebrados se han identificado nueve plexinas (A1-A4, B1-B3, C1, D1) y en invertebrados se han identificado dos (PlexA and PlexB). La región extracelular de las plexinas está formada por diferentes dominios, entre los cuales se distingue un dominio *sema*, importante para la unión a semaforinas, mientras

que la región intracelular contiene un dominio de activación de GTPasa (GAP, siglas en inglés).

La mayoría de las semaforinas se unen directamente a plexinas, a excepción de las semaforinas de la clase 3, que necesitan de la presencia de otras proteínas asociadas a membranas que actúen como receptores o co-receptores. En este caso, se requiere la presencia de las neuropilinas (Np) (Figura 26), que en vertebrados se conocen dos: Np1 y Np2, y que, a su vez, también se unen a plexinas. Las Nps presentan una cola citoplasmática muy corta, innecesaria para mediar la señalización desencadenada por las semaforinas de la clase 3, de forma que se asocian a plexinas para que éstas se encarguen de desencadenar la cascada de señalización.

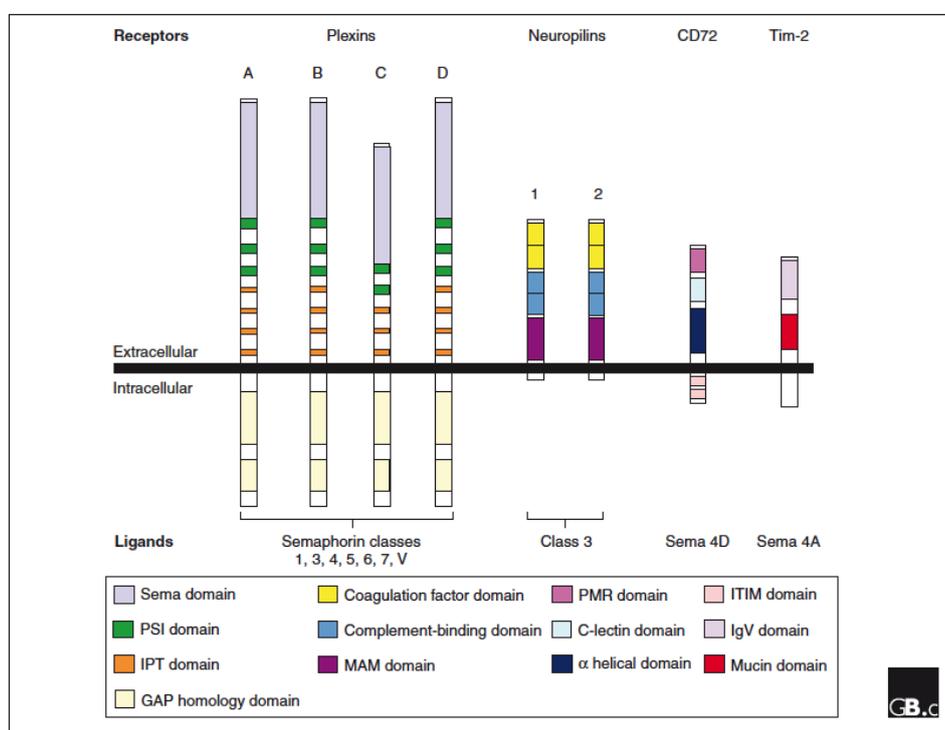


Figura 26. Representación de los receptores principales de las semaforinas y los dominios que los forman. (Yazdani and Terman, 2006)

No obstante, las plexinas se pueden asociar con otros co-receptores como son los receptores tirosina quinasa (como el VEGFR2), miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y proteoglicanos (Jongbloets and Pasterkamp, 2014). Por lo que dependiendo de la combinación de receptores que se forme, la función de la semaforina puede variar (Gu et al., 2005; Huber et al., 2003; Jongbloets and Pasterkamp, 2014; Yazdani and Terman, 2006).

En cuanto a la señalización intracelular desencadenada por las semaforinas, no existe una cascada de señalización intracelular canónica, aunque, en general, la unión de la semaforina a la plexina provoca la fosforilación de ésta en su dominio citoplasmático y la activación de su dominio GAP. A partir de aquí, se desencadena una cascada de señalización en la que intervienen

una gran variedad de proteínas intracelulares y de membrana, que darán lugar a diferentes efectos. Las cascadas de señalización de las semaforinas que están mejor caracterizadas son las que intervienen en los procesos de guía axonal y migración celular.

### **4.2. Semaforinas de la clase 3:**

Las semaforinas de la clase 3 son las únicas que son secretables, y se incluyen dentro de esta clase las que van desde la 3A hasta la 3G. Se conocen sobre todo por su función como moléculas de guía axonal de larga distancia. Aunque inicialmente se conociesen como moléculas repelentes de axones, en algunos casos también actúan como atrayentes, siendo por tanto bifuncionales y controlando así la formación de las conexiones neuronales *in vivo*. Las semaforinas de la clase 3 también se expresan en tejidos no neuronales e intervienen en otros procesos tal y como se ha comentado anteriormente.

Las semaforinas de la clase 3 se unen a complejos de receptores formados por un componente de unión a ligando (Np1 y Np2), y un componente transductor de la señal (plexinas de la clase A) (Bagri and Tessier-Lavigne, 2002; Tamagnone et al., 1999). De forma que los diferentes componentes del receptor se asocian entre sí formando distintas combinaciones. No obstante, en algunos casos, este complejo receptor también puede necesitar de otros co-receptores como son IgCAMs, L1 o NrCAM (Zhou et al., 2008). Las neuropilinas y las plexinas se expresan en algunas poblaciones neuronales de forma simultánea durante el desarrollo embrionario, y la formación del complejo receptor neuropilina-plexina ocurre antes de que se de la unión del ligando (Tamagnone et al., 1999).

Diferentes semaforinas se pueden unir a una misma neuropilina, no obstante, éstas suelen presentar más afinidad por una que por otra. Así mismo, la Np1 presenta mayor afinidad por la Sema3A, mientras que la Np2 presenta más afinidad por la Sema3F (Chen et al., 1997; Kolodkin et al., 1997). La respuesta a estas semaforinas suele ser de repulsión. Sin embargo, existe una semaforina que es la Sema3E capaz de unirse directamente a la PlexinD1, sin necesidad de que se formen complejos de receptores con neuropilinas (Gu et al., 2005) y dar lugar a una respuesta de repulsión como ocurre con los axones estriatonigrales y corticofugales (Chauvet et al., 2007). Por otro lado, también se puede unir a complejos de receptores formados por PlexinD1, Np1 y VEGFR2, y dar lugar a una respuesta de atracción como ocurre en el caso de los axones subículo-mamilaes (Bellon et al., 2010). En este último caso, Sema3E se une a PlexinD1 y la señal es transducida por VEGFR2, actuando Np1 como punto de unión entre ambos receptores. Por otro lado, se conoce que, en el sistema vascular, Sema4a también se

puede unir directamente a PlexinD1 (Gay et al., 2011), y se ha observado que ésta es capaz de llevar a cabo un proceso de quimiorrepulsión en neuronas hipocámpicas y corticales *in vitro* (Ishii et al., 2010; Yukawa et al., 2005).

Algunas semaforinas de la clase 3 se expresan junto con las neuropilinas en la FH en desarrollo. Se ha determinado que éstas, a través de procesos de repulsión, están involucradas en el desarrollo de algunas conexiones del hipocampo. Se ha visto que Sema3A repele axones hipocámpicos, septales y entorrinales; mientras que Sema3F repele axones hipocámpicos y septales (Chedotal et al., 1998; Pascual et al., 2004; Pozas et al., 2001; Steup et al., 1999).

### 4.3. Funciones de Sema3E/PlexinD1

La función biológica de Sema3E/PlexinD1 fue descubierta por primera vez durante la formación de los vasos sanguíneos intersomáticos y desde entonces, se ha visto que participa en muchos sistemas biológicos, a parte del sistema vascular, llevando a cabo diferentes funciones (Oh and Gu, 2013).

En el sistema vascular de ratón, PlexinD1 se expresa en las células endoteliales de todo el cuerpo desde muy temprano en el desarrollo. Se comienza a detectar a E9.5 y continúa expresándose durante todo el desarrollo hasta que su expresión disminuye al nacer (van der Zwaag et al., 2002). De hecho, los ratones carentes de *Plxnd1* mueren prematuramente (alrededor de E16.5) debido a defectos en el corazón, a problemas vasculares periféricos y déficits en la morfogénesis esquelética y osificación (Gu et al., 2005). En el proceso de vascularización intersomática, la Sema3E se expresa formando un gradiente caudal-rostral en las somitas, y actúa repeliendo los vasos en formación, limitando el crecimiento de éstos al espacio intersomático. Sema3E, también llevando a cabo procesos de repulsión a través de PlexinD1, interviene en la formación inicial de la aorta dorsal. El binomio Sema3E/PlexinD1 también interviene en la vascularización de la retina. En este caso, Sema3E se expresa de forma uniforme por las células ganglionares de la retina, mientras que PlexinD1 se expresa de forma dinámica en los brotes angiogénicos, actuando VEGF como modulador de los niveles de PlexinD1. A la vez, la señalización mediada por Sema3E/PlexinD1 regula de forma negativa las acciones mediadas por VEGF.

En el sistema nervioso, *Plxnd1* comienza a expresarse a E12.5 en ciertas regiones del SNC y SNP. Al contrario de lo que ocurre en el sistema vascular, en el sistema nervioso los niveles de expresión se mantienen hasta las etapas postnatales tempranas. Dos de las funciones desencadenadas por este binomio se han comentado previamente, se trata de la actividad

dual que presenta Sema3E sobre diferentes axones según el receptor o complejo receptor al que se una (Bellon et al., 2010; Chauvet et al., 2007). Por otro lado, la señalización mediada por Sema3E/PlexinD1 juega un papel importante en la especificidad y formación de sinapsis, dependiendo de la localización pre- y postsináptica del ligando y del receptor. Por último, y como se ha comentado previamente, el binomio Sema3E/PlexinD1 modula de forma negativa la motilidad y la velocidad de las células de CR derivadas del *cortical hem* (Bribian et al., 2014).

Por otro lado, el binomio Sema3E/PlexinD1 está implicado en cáncer, promoviendo la invasión y la metástasis (Casazza et al., 2012); en el sistema inmune, modulando la migración de los timocitos a la médula, al inhibir las vías de CXCR4 y CCR9 (Choi et al., 2008), y regulando la respuesta de los linfocitos B a las quimiocinas (Holl et al., 2011); y también interviene en el correcto desarrollo del esqueleto axial.

## 5. Las angiopoyetinas

Las angiopoyetinas son factores de crecimiento vascular involucradas en el proceso de angiogénesis (ver apartado 2). Actúan en las etapas tardías del desarrollo vascular y en el adulto, donde se encargan de controlar la remodelación y estabilización vascular ((Reiss, 2010) para revisión). Constituyen una familia de proteínas formada por cuatro miembros que van desde la ANG1 hasta la ANG4. Mientras las ANG1 y ANG4 son las responsables de la maduración, estabilización y quiescencia de los vasos, las ANG2 y ANG3 dan lugar a la regresión vascular, muerte celular e inflamación (Yuan et al., 2009). No obstante, las funciones llevadas a cabo por ANG3 y ANG4 en angiogénesis no están tan descritas como las llevadas a cabo por ANG1 y ANG2 ((Salajegheh, 2016) para revisión). En el sistema vascular, las angiopoyetinas llevan a cabo su función actuando mayoritariamente a través de los receptores Tie, no obstante, también pueden actuar a través de receptores de integrinas. Por otro lado, las angiopoyetinas forman parte del grupo de moléculas que se han llegado a denominar angioneurinas (Segura et al., 2009; Zacchigna et al., 2008), ya que también presentan funciones en el sistema nervioso, donde también se ha determinado que actúan a través de los receptores Tie e integrinas.

### 5.1. Angiopoyetinas y sus receptores

#### 5.1.1. Estructura

Las angiopoyetinas son glicoproteínas formadas por cuatro dominios (Figura 27a): un dominio N-terminal por donde pueden multimerizar, un dominio helicoidal, un dominio de unión, y un dominio fibrinogenoide responsable de la unión ligando-receptor.

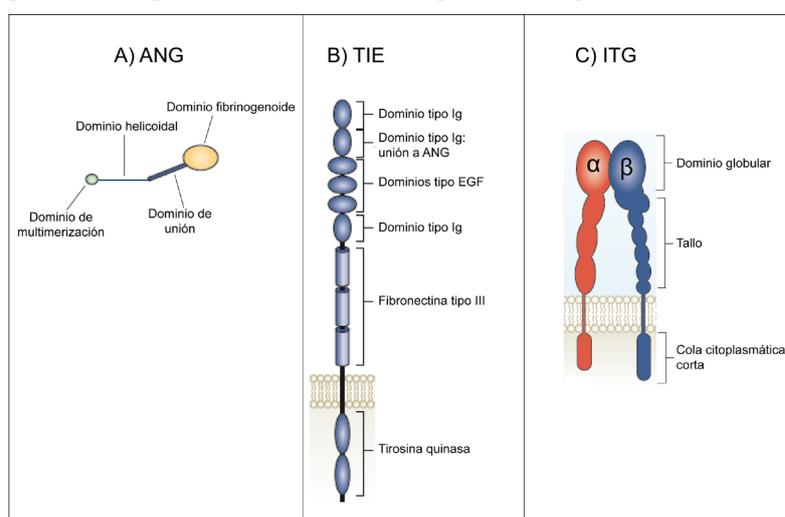


Figura 27. Propiedades estructurales de angiopoyetina (A: ANG), TIE (B) e integrina (C: ITG) (Adaptado de Augustin et al., 2009 y Shattil et al., 2010)

Se conocen dos receptores tirosina quinasa TIE: TIE1 y TIE2. Los receptores TIE están formados por un ectodominio que contiene tres dominios tipo inmuglobulinas (Ig), tres repeticiones del factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés Epidermal Growth Factor) y tres repeticiones de la fibronectina tipo III (FNIII). Y un dominio citoplasmático catalítico con actividad tirosina quinasa (Barton et al., 2006). El receptor TIE2 (Figura 27b), puede unirse directamente a ANG1, ANG2 y ANG4 a través de su región Ig-EGF. No obstante, TIE1 no se une directamente a ninguna angiopoyetina, pero actúa como co-receptor de TIE2 modulando la señalización de éste y por tanto la respuesta a las diferentes angiopoyetinas (Seegar et al., 2010). ANG1, en forma de multímeros, activa al receptor Tie2, mientras que ANG2 actúa como antagonista o agonista parcial (Kim et al., 2016; Maisonpierre et al., 1997; Moore et al., 2017; Yuan et al., 2009).

Por otro lado, las integrinas son heterodímeros de glicoproteínas transmembrana de tipo I formados por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Las subunidades están formadas por un dominio extracelular que presenta una parte en forma de tallo y una cabeza globular por donde reconoce y se une al ligando. También presenta un dominio transmembrana sencillo, y una cola citoplasmática corta (Figura 27c). En mamíferos se expresan 18 subunidades  $\alpha$  diferentes y 8 subunidades  $\beta$ , y se ha determinado la existencia de 24 combinaciones de heterodímeros. La heterogeneidad que existe entre los diferentes tipos de integrinas refleja la heterogeneidad de ligandos extracelulares que pueden reconocer, siendo la subunidad  $\alpha$  la que determina la especificidad de unión al ligando (Figura 28).

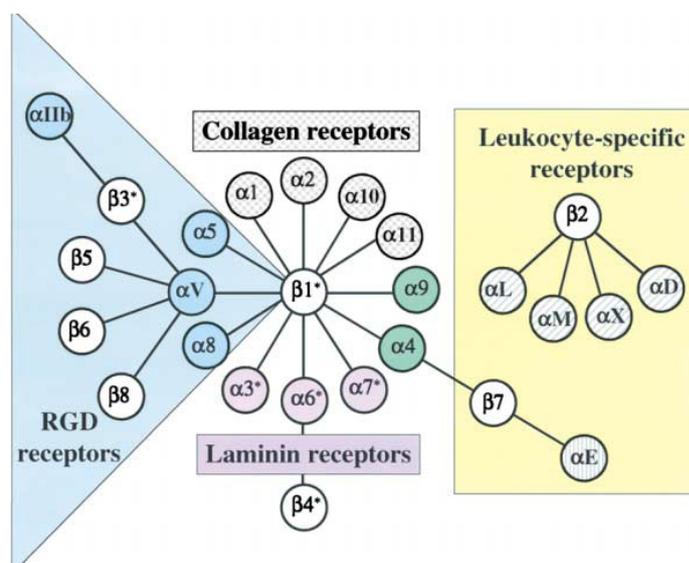


Figura 28. Clasificación de las integrinas según las subunidades que las forman y los ligandos que reconocen (Hynes et al., 2002)

### 5.1.2. Funciones de Angiopoyetinas a través de los receptores Tie e Integrina

En el sistema vascular, se conoce bastante bien la función que desempeñan las angiopoyetinas, sobre todo ANG1, a través del receptor TIE2. Ang1 se expresa en las células perivasculares, es decir en pericitos y células de músculo liso (Singh et al., 2011). Una vez multimeriza, ANG1 se une al receptor TIE2 que se expresa en las células endoteliales. En los vasos que se encuentran quiescentes, la unión de los multímeros de ANG1 a los receptores TIE2 hace que éstos se transloquen rápidamente hacia las uniones que hay entre las células endoteliales para formar complejos homoméricos de TIE2 que se asocian en trans. Estos complejos ANG1-TIE2 activan principalmente la vía de las quinasas fosfatidilinositol 3 y Akt (PI3K/Akt) para promover la supervivencia celular y la estabilidad de las células endoteliales (Fukuhara et al., 2008; Saharinen et al., 2008). En las células endoteliales que se encuentran en movimiento, ANG1 asociada a matriz extracelular activa al receptor TIE2 que se encuentra en los contactos célula endotelial-matriz. Una vez activado, se inicia una cascada de señalización en la que intervienen las quinasas ERK y MAPK y la proteína adaptadora DokR para dar lugar a la adhesión célula endotelial-matriz extracelular y a la migración (Fukuhara et al., 2008; Saharinen et al., 2008). ANG2 también se une al receptor TIE2 y media su translocación hacia las uniones entre células endoteliales, no obstante, no lo activa, actuando así como antagonista de ANG1 ((Jeltsch et al., 2013) para revisión). ANG2 se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade presentes en las células endoteliales, estando por tanto rápidamente disponible frente a varios estímulos (Fiedler et al., 2004). Cuando ANG2 compite con ANG1 por la unión a TIE2, ocurre la desestabilización de las células endoteliales y la regresión de los vasos. No obstante, en otros casos como en células tumorales, ANG2 actúa como agonista de TIE2 promoviendo la angiogénesis ((Jeltsch et al., 2013) para revisión).

Por otro lado, en el sistema vascular, las integrinas también pueden formar parte del sistema ANG/TIE2. En este aspecto, actualmente se conoce que ANG1 puede unirse a las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v$  y  $\alpha 5$ , mientras que ANG2 puede unirse a  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  y  $\alpha 5\beta 1$  (Augustin et al., 2009; Carlson et al., 2001; Felcht et al., 2012). Se ha observado que las angiopoyetinas se pueden unir directamente a las integrinas cuando la expresión de TIE2 en las células endoteliales es baja (del Toro et al., 2010; Felcht et al., 2012). Por otro lado, el receptor TIE2 también puede interactuar con integrinas cuando las células endoteliales se adhieren a fibronectina (Cascone et al., 2005). Y por último, ANG2 es capaz de regular la localización de TIE2 de forma dependiente a integrinas (Pietila et al., 2012) e inducir la agrupación de TIE2 e integrinas  $\beta 3$  en las uniones célula-célula en células endoteliales (Thomas et al., 2010).

El sistema ANG/TIE2 también se ha visto que participa en células no vasculares, sobretodo en células de la médula ósea y en células neuronales. Se ha determinado que interviene en el proceso de repoblación de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea, promoviendo el mantenimiento del nicho de células madre. En células neuronales, *in vitro*, se ha visto que ANG/TIE2 presenta un efecto neuroprotector ya que previene la apoptosis neuronal (Valable et al., 2003); promueve el crecimiento de neuritas en las células ganglionares de la raíz dorsal (Kosacka et al., 2005), en neuronas corticales (Cui et al., 2013) y en precursores neurales (Bai et al., 2009); promueve la diferenciación neuronal (Bai et al., 2009; Rosa et al., 2010); y estimula la proliferación de progenitores neurales (Rosa et al., 2010). No obstante, no está del todo definido que las neuronas expresen TIE2 *in vivo*, de forma que se piensa que las funciones llevadas a cabo por las angiopoyetinas en el sistema nervioso ocurren a través de integrinas (Augustin et al., 2009; Ward et al., 2005). En un ratón que sobreexpresa *Ang1* en el cerebro anterior se han observado alteraciones en la organización dendrítica de las neuronas de capa II de la corteza motora, de las células granulares del giro dentado y de las células piramidales de la CA1. Estos resultados sugieren que ANG1 está involucrada en la elaboración del árbol dendrítico de estas neuronas, y esta función la lleva a cabo a través de la integrina  $\beta 1$  (ITGB1) y no de TIE2 (Ward et al., 2005), ya que *Tie2* solo se expresa en las células endoteliales mientras que *Itgb1* se expresa tanto en células endoteliales como en neuronas corticales e hipocámpicas. Por otro lado, se ha determinado que ANG1 a través de ITGB1 promueve el crecimiento neurítico de las células PC12 (Chen et al., 2009) y de células ganglionares de la raíz dorsal (Ward and Lamanna, 2004).

# Objetivos



Como se ha comentado previamente, la existencia de una estrecha relación entre el SNC y sistema neurovascular es evidente. Solo con observar la distribución de los vasos sanguíneos y de los nervios en un organismo adulto, podemos ver cómo ambos discurren de forma paralela. Esto ocurre gracias a que, desde el desarrollo, ambos sistemas son capaces de responder a las mismas moléculas. De esta manera, los conocimientos que se van adquiriendo sobre las funciones de estas moléculas en uno de los sistemas, son de gran utilidad para conocer sus funciones en el otro sistema. Un ejemplo es la proteína Sema3E, puesto que a pesar de que la función de las semaforinas como moléculas de guía axonal se conociera desde hace tiempo, no fue hasta que se estudió su función en el desarrollo del sistema vascular cuando se conoció que es capaz de unirse directamente a PlexinD1 sin la necesidad de unirse a neuropilinas (Gu et al., 2005). Este conocimiento, a su vez, ha permitido ahondar más sobre sus posibles funciones durante el desarrollo del SNC (Bellon et al., 2010; Chauvet et al., 2007; Ding et al., 2012). De esta forma, no es de extrañar que cada vez se conozcan más moléculas capaces de actuar en ambos sistemas. Asimismo, ANG1, una molécula inicialmente conocida por su función en el sistema vascular durante el desarrollo y en el adulto, se conoce que interviene cada vez más en aspectos neurales. Es por ello que en la presente tesis se quiere conocer las posibles funciones del binomio Sema3E/PlexinD1 y ANG1 y sus receptores en el desarrollo de la formación hipocámpica (FH).

La formación hipocámpica es una estructura que está arquitectónicamente muy bien organizada. Las neuronas principales que lo forman, así como las conexiones aferentes principales (fibras entorrinales y comisurales/asociativas) y las conexiones intrínsecas más relevantes (fibras musgosas) se organizan formando una estructura laminar que ha sido usada como modelo de estudio fundamental en neurociencias (van Groen et al., 2003). La especificación axonal que ocurre en el hipocampo es un proceso que está altamente regulado por numerosos factores que se han ido descubriendo a lo largo de los años (Deller et al., 2001; Savaskan and Nitsch, 2001; Skutella and Nitsch, 2001). Uno de estos factores que intervienen son las semaforinas de la clase III, que junto con sus receptores las neuropilinas, y sus co-receptores las plexinas intervienen en procesos claves para el desarrollo como son la migración neuronal y la guía axonal (Bagri and Tessier-Lavigne, 2002; Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011; Yu and Kolodkin, 1999).

Los trabajos publicados previamente al inicio de la presente tesis demostraron la participación de algunas semaforinas de clase III en el crecimiento y maduración de las conexiones entorrino-hipocámpicas (principalmente Sema3A y Sema3F), septo-hipocámpicas (Sema3C), subiculares y estriatales (Sema3E) y de las fibras musgosas (Sema3F) (Bellon et al., 2010; Chauvet et al.,

2007; Chedotal et al., 1998; Chen et al., 2000; Cheng et al., 2001; Ding et al., 2012; Pozas et al., 2001; Rubio et al., 2011; Sahay et al., 2003; Steup et al., 1999). No obstante, la participación de Sema3E y su receptor PlexinD1 en el desarrollo de las conexiones del hipocampo no había sido analizada en detalle, y los resultados obtenidos hasta la fecha resultaron ser algo contradictorios. En efecto, se había demostrado que Sema3E solo afectaba a los axones del hipocampo de manera exclusiva en el estadio embrionario 14.5 (E14.5), sin presentar efectos en estadios embrionarios posteriores (Pozas et al., 2001). Por el contrario, Chauvet et al., mostraron que la Sema3E también lleva a cabo el colapso de los axones corticales a E17.5 (Chauvet et al., 2007), hecho este no observado por Pozas et al., 2001. Además, tal y como se ha comentado en la introducción, se conoce que las semaforinas de la clase III intervienen en otros procesos tanto en el desarrollo como en el adulto, y no solo en el tejido neural, como son la angiogénesis, la inmunoregulación y el cáncer (Casazza et al., 2012; Chauvet et al., 2013; Gu et al., 2005; Kim et al., 2016; Oh and Gu, 2013; Sabag et al., 2012; Yazdani and Terman, 2006). De esta forma, se quiere conocer qué papel desempeña el binomio Sema3E/PlexinD1 en la FH en desarrollo y adulta.

Por otro lado, desde el inicio de la presente tesis hasta la actualidad, se han ido conociendo cada vez más las funciones que ANG1 desempeña en el SNC. ANG1 presenta un papel neuroprotector y participa en diferentes aspectos como el crecimiento neurítico y la proliferación y diferenciación neural (ver apartados 5.1.2 de introducción). Estas funciones se ha observado que las ejerce al actuar a través de los receptores TIE2 o ITGB1. La mayoría de estos trabajos se han llevado a cabo mediante estudios *in vitro*, y existe cierta controversia en cuanto a los receptores, puesto que la detección de TIE2 en el parénquima neural *in vivo* ha resultado difícil. Además, resultados previos obtenidos en el grupo mostraron, mediante *microarrays*, que *Ang1* se expresa en el *stratum lacunosum moleculare* del hipocampo, perinatalmente. Asimismo, se ha observado que la sobreexpresión de *Ang1* en el cerebro adulto da lugar a alteraciones en la distribución de árbol dendrítico de las neuronas granulares del DG, y de las células piramidales de la CA1 (Ward et al., 2005). Por ello, y al no disponer de una pintura de las funciones en la FH en desarrollo, la presente tesis se centrará en esclarecer las funciones de ANG1 durante el desarrollo de la FH, concretamente del hipocampo.

Los objetivos que se quieren abordar en este trabajo son:

Objetivo 1: Estudio del papel de Sema3E/PlexinD1 en el desarrollo de las conexiones del hipocampo

- Analizar el patrón de expresión de *Sema3e* y *Plxnd1* en la FH en desarrollo

- Estudiar las funciones de Sema3E/PlexinD1 sobre los axones de diferentes regiones de la FH en desarrollo
- Estudiar la función de Sema3E/PlexinD1 en el establecimiento de la conexión EH

Objetivo 2: Estudio del papel de Sema3E/PlexinD1 en la FH postnatal y adulta

- Caracterizar la citoarquitectura del hipocampo postnatal y adulto en ausencia de Sema3E o PlexinD1
- Analizar la función de Sema3E/PlexinD1 en el proceso de neurogénesis de la zona subgranular del giro dentado
- Analizar la actividad eléctrica del hipocampo en ausencia de Sema3E

Objetivo 3: Estudio del papel de ANG1 y sus receptores durante el desarrollo del hipocampo

- Analizar el patrón de expresión de *Ang1* y sus receptores en la FH en desarrollo
- Analizar la expresión de ANG1 y sus receptores en cultivos neuronales
- Estudiar el papel de ANG1 sobre la longitud neurítica en cultivos neuronales



# Resultados



# **Capítulo 1:**

**Estudio del papel de Sema3E/PlexinD1 en el desarrollo de las conexiones del hipocampo**

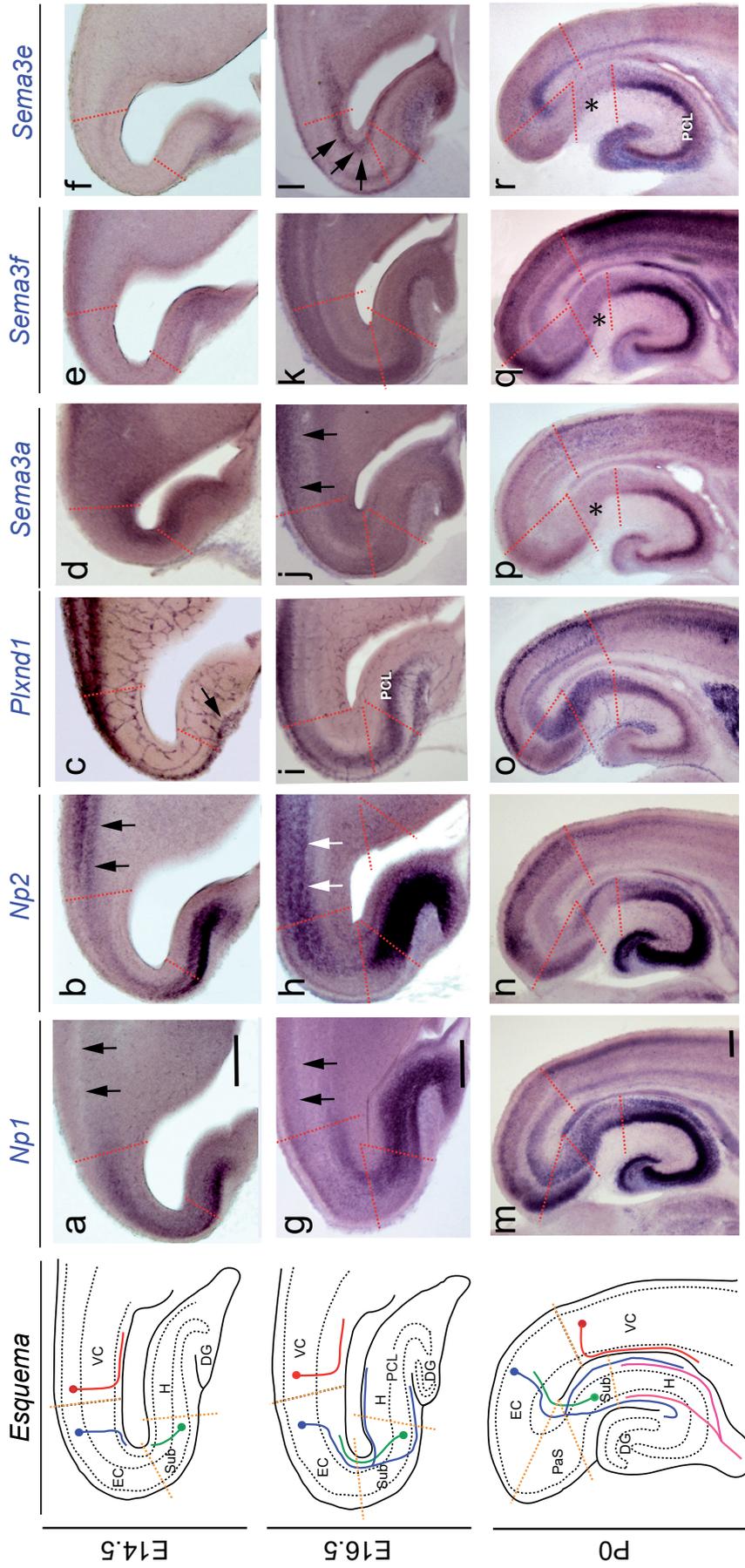


### 1.1. Análisis del patrón de expresión de *Sema3e* y *Plxnd1* en la formación hipocámpica (FH) en desarrollo

Para estudiar el papel de Sema3E/PlexinD1 en el desarrollo de las conexiones del hipocampo nos centramos en la vía entorrino-hipocámpica, la principal vía de entrada de información al hipocampo. Para conocer si el binomio Sema3E/PlexinD1 desempeña alguna función en el desarrollo de dicha vía, en primer lugar, procedimos a analizar si ambas proteínas se expresan en la FH en desarrollo. Para determinar el patrón de expresión de *Sema3e* y *Plxnd1*, llevamos a cabo la detección de sus RNA mensajeros (mRNAs) mediante hibridación *in situ*. También analizamos el patrón de expresión de *Sema3a* y *Sema3f* y sus respectivos receptores, *Np1* y *Np2*. Los estadios analizados fueron los días embrionarios 14.5 (E14.5) y 16.5 (E16.5), y el día postnatal 0 (P0) (Figura 1). Debido a la distribución anatómica que los axones entorrinales presentan cuando entran al hipocampo, los cerebros se procesaron en secciones histológicas horizontales (Amaral and Witter, 1989; Burwell et al., 1995; Isaacson and Pribram, 1975; Witter et al., 1989).

Los resultados obtenidos mostraron que la distribución de los mRNAs de *Sema3a* y *Sema3f* y de sus receptores *Np1* y *Np2* presenta un patrón semejante al ya descrito, aunque con algunas diferencias (Chedotal et al., 1998). Respecto a las neuropilinas, detectamos que ambas presentan altos niveles de expresión a E14.5 en el hipocampo, con un patrón de expresión decreciente hacia la corteza entorrinal donde *Np1* se expresa más que *Np2* (Fig. 1a-b). Por otro lado, observamos expresión de *Np2*, pero no de *Np1*, en la neocorteza ventrolateral (flechas en Fig. 1a-b). A E16.5, el patrón de expresión de ambas *Nps* es parecido al observado a E14.5, aunque la expresión de *Np1* en la corteza entorrinal es menor a E16.5, que a E14.5 (Fig. 1g), y los niveles de *Np2* en hipocampo son mucho más elevados que los de *Np1*. Ambas *Nps* se expresan, a P0, en el giro dentado, en la capa piramidal del hipocampo propio y en el complejo subicular, expresándose más *Np1* en el *subiculum* que *Np2*. En cuanto a la corteza entorrinal, la expresión de *Np1* es ligeramente más baja que la de *Np2*, mientras que en la neocorteza ventrolateral, *Np1* presenta mayor expresión que *Np2* (Fig. 1m y n).

Respecto a los ligandos, Sema3A y Sema3F, observamos que ambos presentan un patrón de expresión parecido en el hipocampo desde E14.5 a P0. Ambas semaforinas se expresan a P0, en el giro dentado y en la capa piramidal del hipocampo propio (Fig. 1p-q). Fuera del hipocampo, *Sema3a* se expresa de forma relevante en la neocorteza ventrolateral desde E14.5 a P0 (Fig. 1 d, j, p), mientras que *Sema3f* presenta un patrón de expresión creciente en la corteza entorrinal desde E14.5 a P0 (Fig. 1 e, k, q).

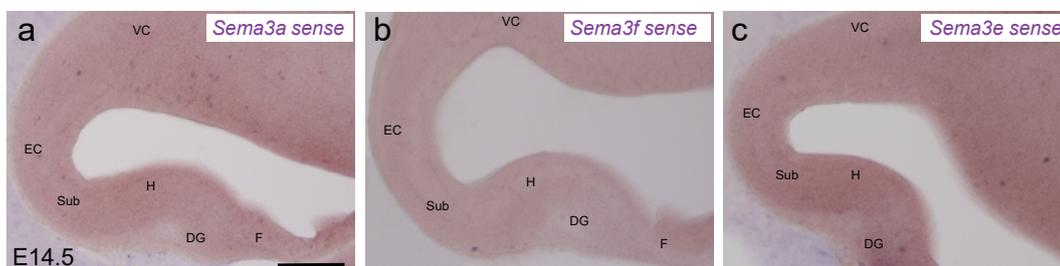


**Figura 1.** Microfotografías que ilustran el patrón de expresión de *Np1* (a, g, m), *Np2* (b, h, n), *Plxnd1* (c, i, o), *Sema3a* (d, j, p), *Sema3f* (e, k, q) y *Sema3e* (f, l, r) en la FH y la corteza adyacente ventrolateral (VC) durante el desarrollo, a E14.5 (a-f), E16.5 (g-l) y P0 (m-r). A la izquierda se muestra de forma esquematizada cómo se encuentra la FH y la VC en los estadios analizados, así como la progresión del desarrollo de las conexiones corticofugal (rojo), entorrino-hipocámpica (azul), subículo-entorrinal (verde), y comisural (rosa). Las diferentes regiones que forman la FH están señaladas por las líneas punteadas de color amarillo. Se observa ausencia de *Np1* en la VC a E14.5 y E16.5 (flechas en a y g), en comparación a *Np2* (flechas en b y h), y *Plxnd1* (c, i). Se detecta un marcaje intenso de *Sema3a* en la VC a E16.5 (flechas en j). Además, se detecta marcaje de *Sema3e* en las capas bajas de la VC y EC desde E16.5 en adelante (flechas en l). Se observa ausencia de marcaje de las tres semaforinas en la región subicular (asterisco en p, q, r). Abreviaturas: DG, giro dentado; EC, corteza entorrinal; H, hipocampo propio; PaS, *Parasubiculum*; Sub, *subiculum*; VC, capa piramidal del hipocampo; PCL, capa piramidal del hipocampo. Barras de escala: a-f=250µm; g-l=250µm; m-r=100µm.

En cuanto a *Plxnd1*, observamos que se expresa a E14.5 en las células de Cajal-Retzius (flecha en Fig. 1c) y en las capas corticales altas de las cortezas ventrolateral y entorrinal, siguiendo un gradiente de mayor a menor intensidad lateral-medial (Fig. 1c). *Plxnd1* mantiene su expresión a E16.5 en las cortezas ventrolateral y entorrinal, aunque en menor medida en ésta última. También detectamos expresión del receptor en la capa piramidal del *subiculum*-CA1, tal y como se había descrito previamente (Bribian et al., 2014; Chauvet et al., 2007) (Fig. 1i). *Plxnd1* mantiene su expresión a P0 en las cortezas ventrolateral y entorrinal (aunque en menor medida en la primera), en el complejo subicular, en la capa piramidal del hipocampo propio y en el giro dentado (Fig. 1o).

Por último, también observamos expresión de *Sema3e* en el giro dentado desde E14.5 a P0 (Fig. 1f, l, r). A partir de P0 también se expresa en la capa piramidal del hipocampo propio (Fig. 1r). También se expresa, desde E16.5 a P0, en las capas bajas de la corteza entorrinal (flechas en Fig. 1l, r).

Si observamos el patrón de expresión de las tres semaforinas, podemos ver que a penas se expresan en el subiculum a P0 (asteriscos en Fig. 1 p-r). Por otro lado, las secciones de cerebro incubadas con la sonda *sense* de *Sema3a*, *Sema3f* y *Sema3e* no generaron ninguna señal (Figura 2 a-c).



**Figura 2.** Microfotografías que ilustran la distribución de las sondas *sense* de *Sema3a* (a), *Sema3f* (b) y *Sema3e* (c) en la FH y VC en a E14.5. Se observa ausencia de marcaje. Abreviaturas: DG, giro dentado; EC, corteza entorrinal; F, fimbria; H, hipocampo propio; Sub, *subiculum*; VC, corteza ventrolateral. Barra de escala: a-c= 250µm.

En conclusión, estos resultados indican que las semaforinas estudiadas y sus receptores se expresan en la formación hipocámpica en desarrollo, en el momento en el que comienzan a establecerse las diferentes conexiones, y que el patrón de expresión varía a lo largo del proceso.

## 1.2. Estudio de las funciones de Sema3E/PlexinD1 sobre los axones de diferentes regiones de la FH en desarrollo

A continuación, nos centramos en determinar si los cambios detectados en los patrones de expresión, sobre todo de los receptores, correlacionaba con alguna acción quimiotrófica

por parte de las semaforinas estudiadas a E14.5 y E16.5. Se tomaron estos estadios ya que correlacionan con la entrada de axones entorrinales al hipocampo propio, y con la salida de los axones eferentes de las neuronas piramidales hipocámpicas (Super and Soriano, 1994).

Para llevar a cabo nuestro objetivo, realizamos co-cultivos de explantes de diferentes regiones de la FH (hipocampo propio (CA), *subiculum* (Sub), corteza entorrinal (EC), corteza ventrolateral (VC)) y de la corteza dorsolateral (DC), enfrentados a agregados de células COS1 previamente transfectadas por separado con los plásmidos que codifican para cada una de las tres semaforinas y con el plásmido SEAP como control.

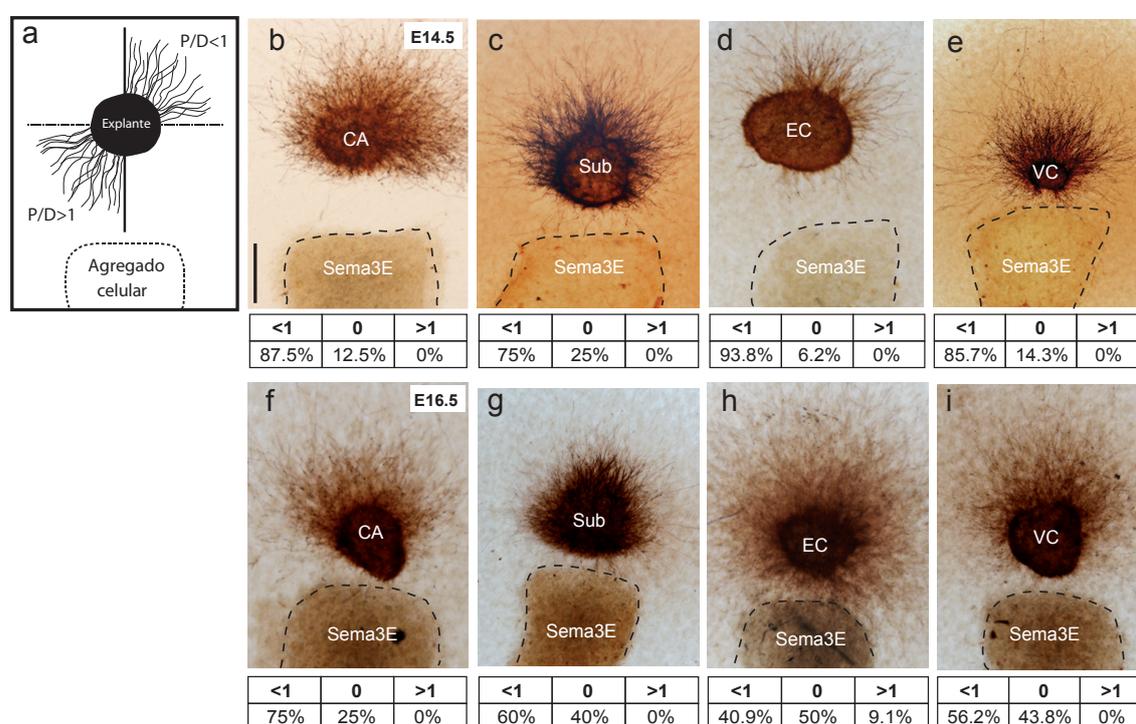
Como se indica en el esquema de la Figura 3a, los explantes que presentan un mayor número de axones en la zona distal en comparación con la zona proximal indican que han sido sometidos a un proceso de quimiorrepulsión, y por tanto la ratio proximal/distal que presentan es menor a 1 ( $P/D < 1$ ). Por el contrario, aquellos explantes que presentan un mayor número de axones en la zona proximal en comparación con la distal indican que han sido quimioatraídos y la ratio  $P/D$  es mayor a 1 ( $P/D > 1$ ). Por último, los explantes en los que las semaforinas no tienen ningún efecto, presentan un crecimiento de forma radial y una ratio  $P/D$  igual a 1 ( $P/D = 1$ ) (Gil and del Rio, 2012).

		CA			SUB			EC			VC			DC		
P/D		<1	1	>1	<1	1	>1	<1	1	>1	<1	1	>1	<1	1	>1
S3A	E14.5	5 (71.4%)	1 (14.3%)	1 (14.3%)	2 (18.18%)	2 (18.18%)	7 (63.63%)	3 (23.08%)	4 (30.77%)	6 (46.15%)	4 (30.77%)	8 (61.54%)	1 (7.69%)	4 (25%)	9 (56.25%)	3 (18.75%)
	E16.5	6 (42.85%)	6 (42.85%)	2 (14.3%)	10 (66.66%)	5 (33.33%)	0 (0%)	5 (41.66%)	6 (50%)	1 (8.33%)	4 (33.33%)	6 (50%)	2 (16.67%)	3 (23.08%)	7 (53.84%)	3 (23.08%)
S3F	E14.5	6 (54.54%)	2 (18.18%)	3 (27.27%)	2 (14.28%)	8 (57.14%)	4 (28.57%)	3 (21.43%)	7 (50%)	4 (28.57%)	7 (63.63%)	3 (27.27%)	1 (9.1%)	6 (40%)	6 (40%)	3 (20%)
	E16.5	11 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (60%)	5 (33.33%)	1 (6.67%)	14 (77.7%)	3 (16.67%)	1 (5.56%)	14 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (18.18%)	6 (54.54%)	3 (27.27%)
S3E	E14.5	14 (87.5%)	2 (12.5%)	0 (0%)	12 (75%)	4 (25%)	0 (0%)	15 (93.75%)	1 (6.25%)	0 (0%)	12 (85.71%)	2 (14.29%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (90.9%)	1 (9.1%)
	E16.5	12 (75%)	4 (25%)	0 (0%)	9 (60%)	6 (40%)	0 (0%)	9 (40.9%)	11 (50%)	2 (9.1%)	9 (56.25%)	7 (43.75%)	0 (0%)	4 (33.33%)	3 (25%)	5 (41.67%)
SEAP	E14.5	4 (66.66%)	2 (33.33%)	0 (0%)	5 (71.43%)	2 (28.57%)	0 (0%)	2 (66.66%)	1 (33.33%)	0 (0%)	2 (66.66%)	1 (33.33%)	0 (0%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)	0 (0%)
	E16.5	3 (30%)	7 (70%)	0 (0%)	5 (50%)	4 (40%)	1 (10%)	1 (10%)	7 (70%)	2 (20%)	3 (33.33%)	4 (44.44%)	2 (22.23%)	3 (42.86%)	4 (57.14%)	0 (0%)

**Tabla 1.** Efectos de las semaforinas 3A, 3F y 3E, sobre diferentes regiones de la FH, a E14.5 y E16.5. Los efectos se muestran como  $P/D < 1$ ,  $P/D = 1$ ,  $P/D > 1$ , indicando quimiorrepulsión, crecimiento radial y quimioatracción, respectivamente. Para cada condición se muestra el número de explantes, así como el porcentaje de casos. Abreviaturas: CA, *cornu ammonis* o hipocampo propio; DC, corteza dorsolateral; EC, corteza entorrinal; SUB, *subiculum*; VC, corteza ventrolateral

Los resultados obtenidos (Tabla 1 y figuras 3-7) indicaron que a E14.5, Sema3E repele los axones del hipocampo ( $\approx 87.5\%$ ;  $P/D$  ratio  $< 1$ ;  $n=16$ ; Fig. 3b), *subiculum* ( $P/D$  ratio  $< 1$ ;  $\approx 75\%$ ;

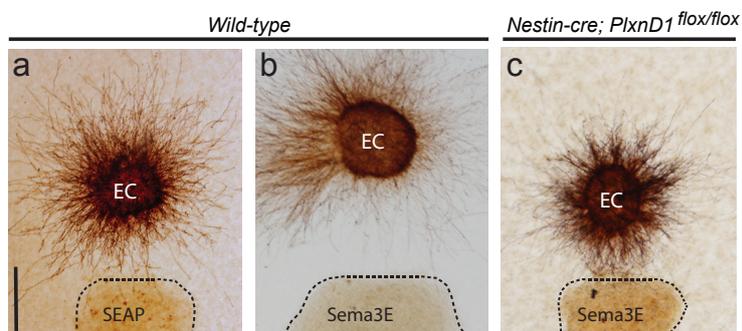
n=16; Fig. 3c), corteza entorrinal (P/D ratio <1;  $\approx$  93.75%; n=16; Fig. 3d), y corteza ventrolateral (P/D ratio <1;  $\approx$  85.71%; n=14; Fig. 3e); no obstante, no tiene ningún efecto sobre los axones de la corteza dorsolateral (parietal) ( $\approx$  90.9%; P/D ratio =1; n=11; Fig. 7c). El efecto quimiorrepulsivo de Sema3E disminuye a E16.5, en todas las regiones, sobre todo en la corteza entorrinal y ventrolateral: CA ( $\approx$  75%; P/D ratio <1; n=16; Fig. 3f), *subiculum* ( $\approx$  60%; P/D ratio <1; n=15; Fig. 3g), corteza entorrinal ( $\approx$  40.9%; P/D ratio =1; n=22; Fig. 3h), corteza ventrolateral ( $\approx$  56.25%; P/D ratio <1; n=16; Fig. 3i). Sema3E sigue sin ejercer ningún efecto a E16.5 sobre los axones de la corteza dorsolateral (Fig. 7f). Estas diferencias en la respuesta a Sema3E correlacionan con el patrón de expresión de su receptor, PlexinD1 (Fig. 1c, i).



**Figura 3.** Microfotografías que muestran el efecto de Sema3E sobre los axones hipocámpicos (CA: **b, d**), subiculares (Sub: **c, d**), entorrinales (EC: **d, h**) y de la VC (**e, i**) a E14.5 (**b-e**) y E16.5 (**f-i**). A la izquierda se muestra de forma esquematizada (**a**) la manera de cuantificar el crecimiento axonal en los experimentos de co-cultivos. La línea punteada separa el cuadrante proximal (P) del distal (D) y la cuantificación se lleva a cabo calculando el ratio P/D. Si hay la misma cantidad de axones alrededor de todo el explante, el crecimiento es radial y el ratio P/D=1. Si hay más axones por la parte distal, el ratio P/D<1 y la respuesta es de quimiorrepulsión y si hay más axones por la parte proximal, el ratio P/D>1 y la respuesta es de quimioatracción. Se observa como Sema3E lleva a cabo la repulsión de todas las áreas comentadas a E14.5 (**b-e**) y este efecto se mantiene a E16.5 (**f, g**), aunque en menor medida en la EC (**h**), y en la VC (**i**), donde disminuye. Debajo de cada microfotografía se muestran los resultados presentados en la Tabla 1, correspondientes para cada caso. Abreviaturas: CA, *cornu ammonis* o hipocampo propio; EC, corteza entorrinal; Sub, *subiculum*; VC, corteza ventrolateral. Barra de escala **b-i**= 150 $\mu$ m.

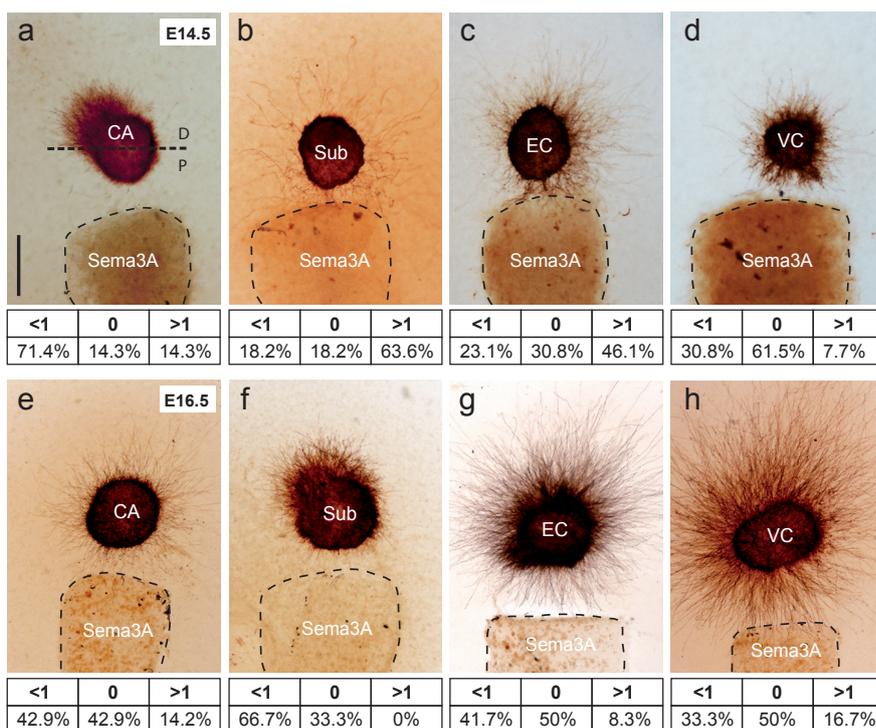
Por otro lado, para determinar si en la repulsión llevada a cabo por Sema3E interviene PlexinD1, analizamos la respuesta frente Sema3E de explantes de corteza entorrinal procedentes de un animal mutante para PlexinD1 (*Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/flox</sup>*) a E14.5 (Fig. 4a-c). En este caso,

observamos que en ausencia del receptor los axones entorrinales presentan una menor respuesta de repulsión a Sema3E ( $\approx 54.5\%$ ; P/D ratio  $< 1$ ;  $\approx 45.5\%$ ; P/D ratio = 1;  $n=22$ ; Fig. 4c) en comparación con un animal *wild-type* (Fig. 3d, 4b).



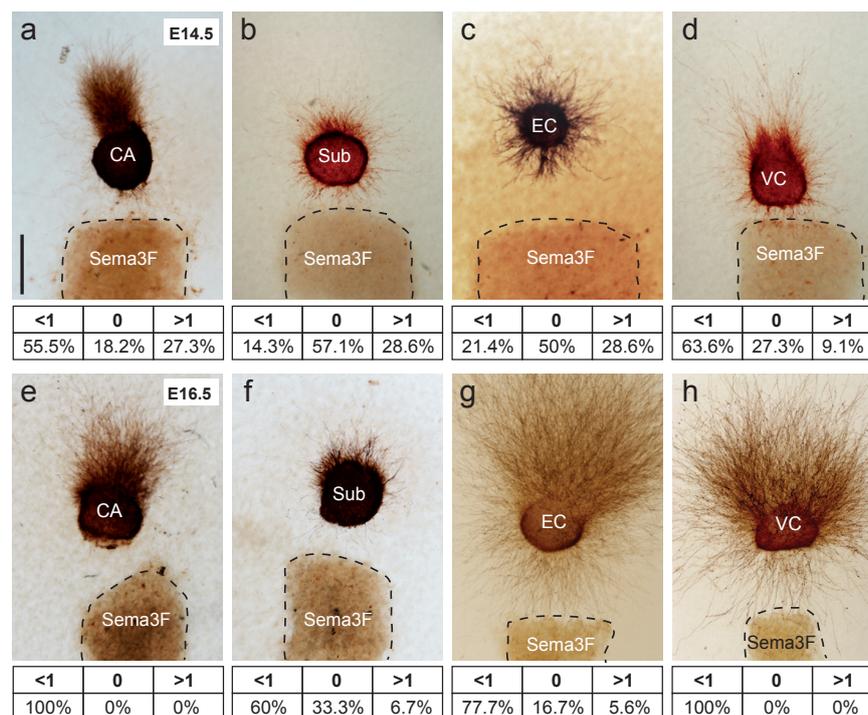
**Figura 4.** Microfotografías que muestran cómo el efecto quimiorrepulsivo que presenta Sema3E sobre los axones entorrinales (**b**) disminuye en ausencia de *PlxnD1* (**c**) a E14.5. Abreviaturas: EC, corteza entorrinal. Barra de escala **a-c**= 150 $\mu$ m.

En cuanto a Sema3A, los ensayos con explantes mostraron que repele los axones hipocámpicos a E14.5, aunque este efecto disminuye a E16.5 (E14.5:  $\approx 71.4\%$ ; P/D ratio  $< 1$ ;  $n=7$  Fig. 5a; E16.5:  $\approx 42.9\%$ ; P/D ratio  $< 1$ ;  $n=14$  Fig. 5e). Por otro lado, también detectamos un cambio creciente en la capacidad repulsiva de Sema3A sobre los axones subiculares a E16.5, puesto que no parece ejercer ningún efecto a E14.5 (E14.5:  $\approx 18.2\%$ ; P/D ratio  $< 1$ ;  $n=11$  Fig. 5b; E16.5:  $\approx 66.7\%$ ; P/D ratio  $< 1$ ;  $n=15$  Fig. 5f). Este hecho también se observa en los axones entorrinales (E14.5:  $\approx 23.1\%$ ; P/D ratio  $< 1$ ;  $n=15$  Fig. 5c; E16.5:  $\approx 41.7\%$ ; P/D ratio  $< 1$ ;  $n=12$  Fig. 5g). No obstante, no observamos ningún efecto de Sema3A sobre los axones de las cortezas ventrolateral y dorsolateral, en ninguno de los dos estadios embrionarios analizados (Fig. 5d, h; Fig. 7a, d).



**Figura 5.** Microfotografías que muestran el efecto de Sema3A sobre los axones hipocámpicos (CA: **a**, **e**), subiculares (Sub: **b**, **f**), entorrinales (EC: **c**, **g**) y de la VC (**d**, **h**) a E14.5 (**a-d**) y E16.5 (**e-h**). Se observa como Sema3A repele a los axones hipocámpicos a E14.5, y como esta repulsión disminuye a E16.5. También se observa una capacidad repulsiva creciente sobre los axones subiculares, desde E14.5 a E16.5. Debajo de cada microfotografía se muestran los resultados presentados en la Tabla 1, correspondientes para cada caso. Abreviaturas como en Fig. 3. Barra de escala **a-h**= 150 $\mu$ m.

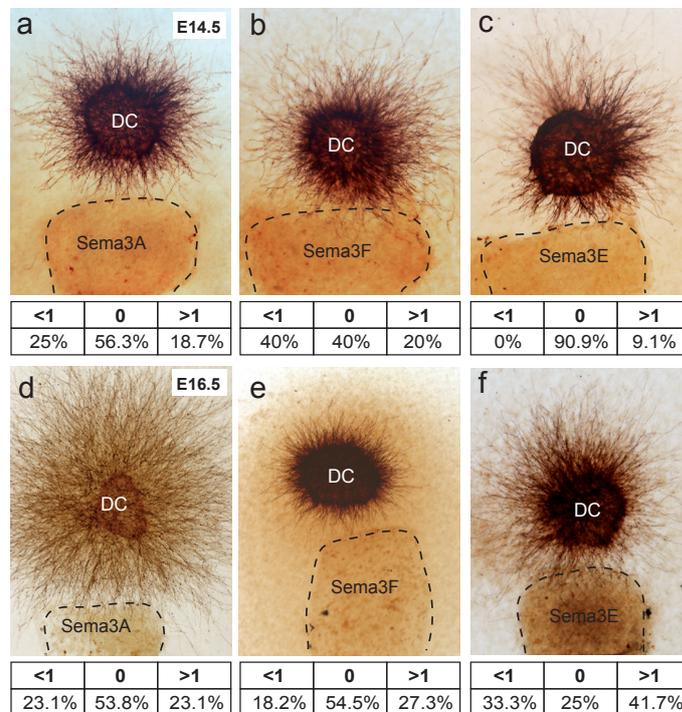
Respecto a Sema3F, y al contrario de lo que ocurre con Sema3A, observamos que su capacidad de repulsión de los axones hipocámpicos aumenta desde E14.5 a E16.5 (E14.5:  $\approx$  54.5%; P/D ratio  $<1$ ; n=11 Fig. 6a; E16.5:  $\approx$  100%; P/D ratio  $<1$ ; n=14 Fig. 6e). Este cambio de respuesta de repulsión creciente por parte de los axones a Sema3F, de E14.5 a E16.5, también ocurre en los explantes de la corteza ventrolateral (E14.5:  $\approx$  63.6%; P/D ratio  $<1$ ; n=11 Fig. 6d; E16.5:  $\approx$  100%; P/D ratio  $<1$ ; n=14 Fig. 6h), lo cual correlaciona con el aumento de expresión de *Np2* a E16.5 (flechas blancas en Fig. 1h). Por otro lado, también ocurre un cambio en la capacidad de respuesta de los axones entorrinales y subiculares de E14.5 a E16.5, donde se pasa de una situación en la que Sema3F no presenta ningún efecto, a una situación de repulsión ((EC: E14.5:  $\approx$  21.4%; P/D ratio  $<1$ ; n=14 Fig. 6c; E16.5: 77.7%; P/D ratio  $<1$ ; n=18 Fig. 6g) y (Sub: E14.5:  $\approx$  14.3%; P/D ratio  $<1$ ; n=14 Fig. 6b; E16.5: 60%; P/D ratio  $<1$ ; n=12 Fig. 6f)). Al igual que ocurrió con Sema3E y Sema3A, no detectamos que Sema3F ejerciera ningún efecto sobre los axones de la corteza dorsal en los estadios analizados (Fig. 7b, e).



**Figura 6.** Microfotografías que muestran el efecto de Sema3F sobre los axones hipocámpicos (CA: **a, e**), subiculares (Sub: **b, f**), entorrinales (EC: **c, g**) y de la VC (**i, h**) a E14.5 (**a-d**) y E16.5 (**e-h**). Se observa como la capacidad repulsiva de Sema3F aumenta sobre los axones hipocámpicos (**a, e**) y ventrolaterales (**d, h**), de E14.5 a E16.5. También se observa como Sema3F no ejerce ningún efecto sobre los axones subiculares y entorrinales a E14.5, y como esta situación cambia a E16.5, donde Sema3F lleva a cabo la repulsión de estos axones. Debajo de cada microfotografía se muestran los resultados presentados en la Tabla 1, correspondientes para cada caso. Abreviaturas como en Figs, 3 y 5. Barra de escala **a-h**= 150 $\mu$ m.

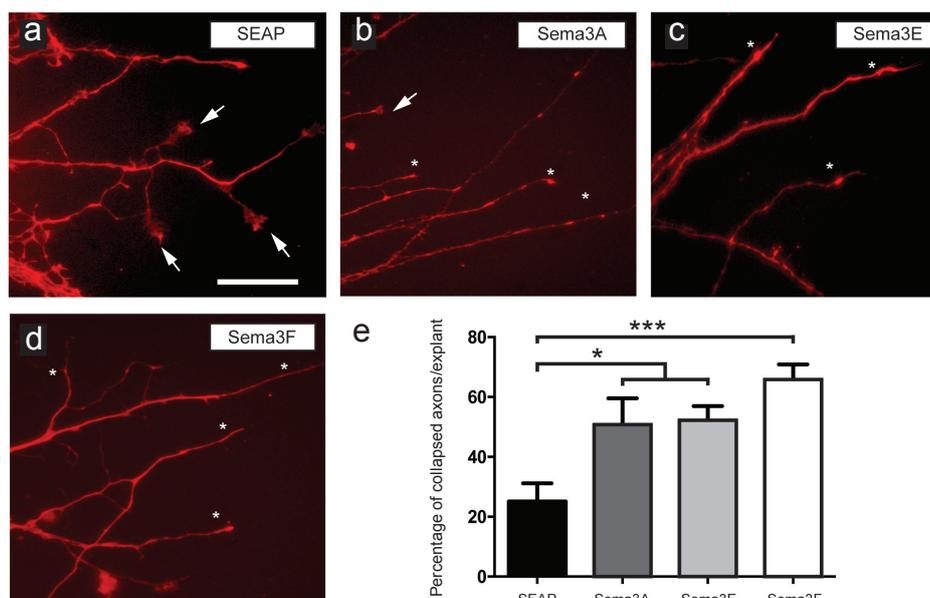
Por último, y como se ha ido comentando para cada caso, ninguna de las tres semaforinas analizadas presentan efecto sobre los axones de la corteza dorsolateral (Fig. 7). La corteza

dorsolateral es una zona en la que observamos la ausencia de expresión de los receptores PlexinD1, Np1 y Np2, por lo que hemos utilizado estos explantes como control de los efectos observados en aquellas regiones en las que sí se expresan los receptores.



**Figura 7.** Microfotografías que muestran cómo Sema3A (**a, d**), Sema3F (**b, e**) y Sema3E (**c, f**) no presentan ningún efecto sobre los axones de la corteza dorsolateral a E14.5 (**a-c**) ni a E16.5 (**d-f**). Debajo de cada microfotografía se muestran los resultados presentados en la Tabla 1, correspondientes para cada caso. Abreviaturas: DC, corteza dorsolateral. Barra de escala: **a-f**= 150µm.

Con estos resultados pudimos concluir que a E16.5, Sema3F es el ligando que mayor efecto repulsivo tiene sobre los axones entorrinales, seguido de Sema3E y Sema3A, los cuales presentan una tendencia repulsiva (S3F:  $\approx 77.7\%$ ; P/D ratio  $< 1$ ;  $n=18$ ; S3E:  $40.9\%$ ; P/D ratio  $< 1$  y  $\approx 50\%$ ; P/D ratio = 1;  $n=22$ ; S3A:  $\approx 41.6\%$ ; P/D ratio  $< 1$  y  $\approx 50\%$ ; P/D ratio = 1;  $n=12$ ). Pudimos corroborar este resultado mediante la realización de un experimento de colapso de axones (Figura 8), donde cultivamos los explantes sobre un sustrato que contiene Poli-L-Ornitina y laminina durante tres días. Al cuarto día, tratamos los explantes con medio condicionado concentrado de Sema3F, 3A, 3E o SEAP, durante una hora. Tras la fijación y el marcaje de los explantes con Faloidina-TRITC, llevamos a cabo la cuantificación del porcentaje de axones colapsados en cada situación. Tras la cuantificación, observamos que las tres semaforinas colapsan los conos de crecimiento de los axones entorrinales, siendo Sema3F la que mayor efecto tiene (Fig. 8e: Sema3F:  $66.94 \pm 3.68$ ; vs SEAP:  $28.95 \pm 6.210$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.;  $t = 4.954$ ;  $P=0.0005$ ; intervalo de confianza 95% = -60.57 a -15.42; ANOVA, Bonferroni *post hoc* test).



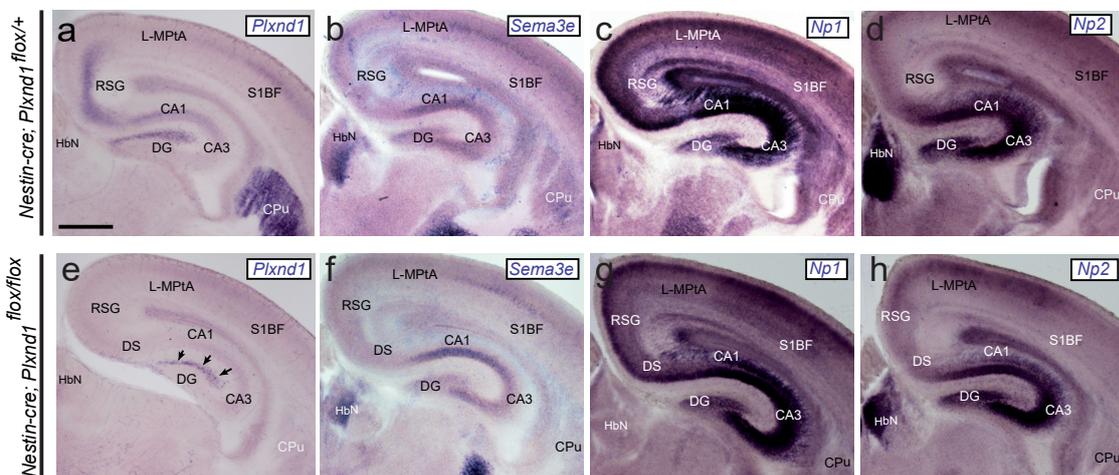
**Figura 8.** Microfotografías que muestran el efecto de las semaforinas sobre los conos de crecimiento de explantes de EC a E16.5, marcadas con faloidina-TRITC. **a** Se observan unos conos de crecimiento normales, con lamelipodios y filopodios (flechas), en presencia de un medio con SEAP. Asteriscos en **b-d** Ejemplos de conos de crecimiento colapsados tras la incubación con medios con Sema3A (**b**), Sema3E (**c**) y Sema3F (**d**). **e** Histograma representando el porcentaje de conos de crecimiento colapsado tras la incubación con las diferentes semaforinas. Los resultados muestran la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos diferentes. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticas entre los grupos de estudio (Sema3A, Sema3E y Sema3F) y el control (SEAP). \* $P \leq 0.05$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; ANOVA Bonferroni post hoc test. Barra de escala: **a-d** = 20 $\mu$ m.

### 1.3. Estudio de la función de Sema3E/PlexinD1 en el establecimiento de la conexión entorrino-hipocámpica (EH)

Los resultados experimentales de co-cultivos muestran que Sema3E repele los axones entorrinales a E14.5, y en menor medida a E16.5, momentos claves en el desarrollo de la vía entorrino-hipocámpica. Además, puesto que esta capacidad quimiorrepulsiva disminuye en ausencia de *Plxnd1*, parece ser que Sema3E lleva a cabo su función a través de dicho receptor. Teniendo esto en consideración, decidimos analizar como se desarrolla la vía en ausencia del ligando o del receptor. Para ello llevamos a cabo dos tipos diferentes de experimentos de trazado de conexiones, en dos cepas de ratón distintas. Por un lado, utilizamos una cepa de ratón mutante condicional en el sistema nervioso para *Plxnd1* (*Nestin-cre;Plxnd1<sup>fllox/fllox</sup>*) que supera la mortalidad prenatal de los animales *knock-out* total para *Plxnd1* (ver apartado *Animales de Materiales y Métodos*). Por otro lado, utilizamos una cepa de ratón mutante *knock-out* para Sema3E (*Sema3e<sup>0/0</sup>*). En todos los experimentos en los que estas dos cepas fueron utilizadas, se tomaron como control los hermanos de camada que presentaban los siguientes genotipos: *Nestin-cre;Plxnd1<sup>fllox/+</sup>* para el mutante condicional de PlexinD1, y *Sema3e<sup>+/-</sup>* y *Sema3e<sup>+/+</sup>* para el mutante de Sema3E. Puesto que los animales *Sema3e<sup>+/-</sup>* y *Sema3e<sup>+/+</sup>* presentan el mismo fenotipo (no mostrado), en la mayoría de experimentos se tomó como control los animales *Sema3e<sup>+/-</sup>*.

Para los experimentos de trazado de conexiones, utilizamos animales a P0, momento en el que los axones entorrinales están entrando en la capa molecular externa de la hoja suprapiramidal del giro dentado.

En primer lugar, comprobamos la ausencia de expresión de *Plxnd1* en el parénquima neural del animal mutante condicional (*Nestin-cre;Plxnd1<sup>flox/flox</sup>*), respecto al animal control (*Nestin-cre;Plxnd1<sup>flox/+</sup>*), mediante hibridación *in situ*. Para ello, analizamos secciones coronales de cerebro a P0. Los resultados mostraron que, en el animal control, *Plxnd1* se expresa en las siguientes zonas del parénquima neural: corteza granular retrosplenial (RSG, del inglés *Retrosplenial Granular cortex*), corteza somatosensorial primaria (en la región S1BF, del inglés *First Somatosensory Barrel Field*), capa piramidal de las CA1 y 3 y en las células de Cajal-Retzius presentes en capa I de corteza y en la zona marginal externa del hipocampo (Fig. 9a). Además, observamos expresión de *Plxnd1* en los vasos sanguíneos. Respecto al mutante condicional, solo observamos expresión de *Plxnd1* en los vasos sanguíneos (Fig. 9e), y en las células de Cajal-Retzius (flechas en Fig. 9e). Estos resultados se deben a que el promotor de *Nestina* comienza a expresarse en los progenitores neurales a partir de E12-E13, momento en el cual gran parte de las células de CR se han generado. Además, al expresarse solo en progenitores neurales, podemos seguir observando expresión de *Plxnd1* en los vasos sanguíneos del mutante condicional.

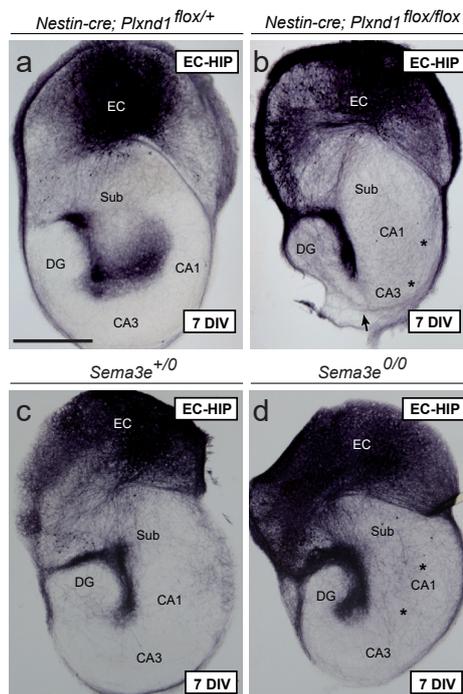


**Figura 9.** Microfotografías ilustrando el patrón de expresión de *Plxnd1* (a, e), *Sema3e* (b, f), *Np1* (c, g) y *Np2* (d, h) en animales control (a-d, *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/+</sup>*) y mutante (e-h, *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/flox</sup>*) a P0. Se observa expresión de *Plxnd1* en las células de CR en el hipocampo (flechas en e). No se observan cambios en el patrón de expresión de *Sema3e* (b, f), *Np1* (c, g) y *Np2* (d, h) en ausencia de *Plxnd1*. Abreviaturas: CA, *cornu ammonis*; Cpu, caudado putamen; DG, giro dentado; HbN, núcleo habenular; L-MPTA, corteza parietal asociacional; RSG: corteza retrosplenial granular; S1BF, corteza somatosensorial. Barra de escala: a-e: 150μm.

Por otro lado, también analizamos el patrón de expresión de *Sema3e* (Fig. 9.b, f), *Np1* (Fig. 9c, g) y *Np2* (Fig. 9d, h) en el mutante condicional, con el objetivo de conocer si la ausencia de *Plxnd1* provoca alteraciones en el patrón de expresión de las proteínas mencionadas. Los resultados

mostraron que tanto en ausencia (Fig. 9f-h) como en presencia (Fig. 9b-d) de *Plxnd1*, el patrón de expresión de estas proteínas no varía.

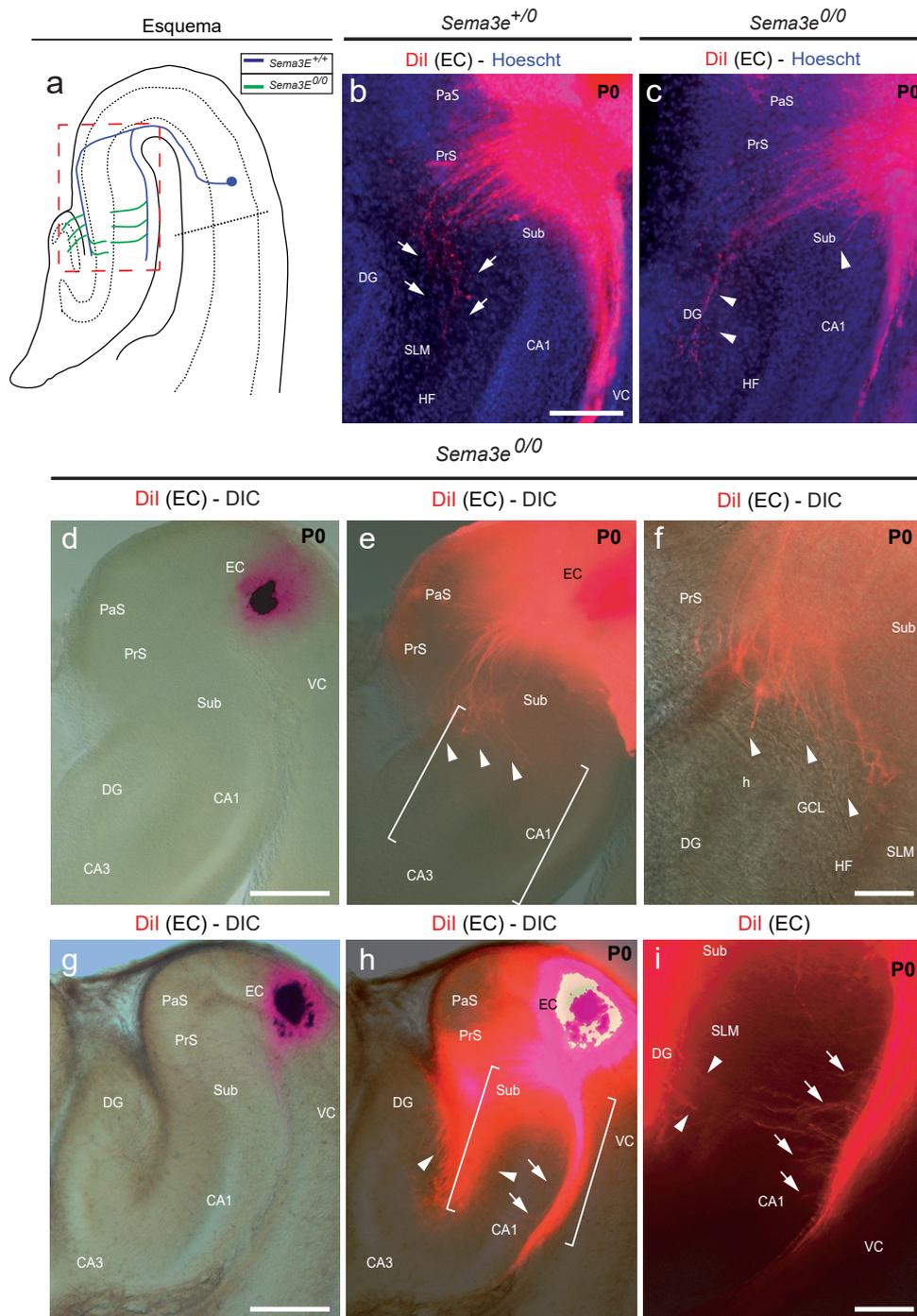
Respecto a los experimentos de trazado de conexiones, la primera aproximación que seguimos para estudiar el trazado de la vía fue mediante el uso de biocitina en cultivos organotípicos de la FH de ambas cepas (mutante condicional de PlexinD1 y mutante *knock-out* de Sema3E). Estos cultivos organotípicos se mantienen *in vitro* durante siete días, y posteriormente se inyecta el trazador, en este caso biocitina, en la corteza entorrinal. Un día más tarde procesamos el tejido para poder observar el trazado (ver *Materiales y Métodos*). Mediante esta técnica pudimos observar cómo en los animales control, tanto para PlexinD1 (Fig. 10a) como para Sema3E (Fig. 10c), los axones entorrinales atraviesan la sustancia blanca del hipocampo y el *subiculum* para alcanzar su región diana principal: la capa molecular externa del DG. Los mismos resultados fueron observados en los animales que carecen tanto del receptor como del ligando, sin embargo, estos animales también presentan una mayor presencia de axones ectópicos, invadiendo la CA1 y el DG (asteriscos en Fig. 10b, d) en comparación con sus hermanos control (Fig. 10a, c).



**Figura 10.** Microfotografías que muestran el trazado de la conexión EH con biocitina en animales control (**a**, *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/+</sup>*; **c**, *Sema3e<sup>+/0</sup>*) y mutante (**b**, *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/flox</sup>*; **d**, *Sema3e<sup>0/0</sup>*). Se observa la presencia de numerosas fibras ectópicas atravesando la CA1-3 (asteriscos y flecha en **b** y asteriscos en **d**), y en el hilus del mutante *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/flox</sup>* (**b**). Abreviaturas: CA, *cornu ammonis*; DG, giro dentado; EC, corteza entorrinal; Sub, *subiculum*. Barra de escala: a-d= 100µm.

Puesto que los resultados obtenidos para las dos cepas fueron muy parecidos, decidimos estudiar el trazado de la vía siguiendo una segunda aproximación utilizando únicamente los animales carentes de Sema3E (Fig. 11). De este modo trazamos la conexión con el trazador lipofílico DiI, situándolo en la corteza entorrinal de secciones horizontales fijadas de la FH, en las cuales, a comparación de lo que ocurre con los cultivos organotípicos, se mantiene mejor

la citoarquitectura (ver *Materiales y Métodos*). El trazado mostró como en los animales control (*Sema3e<sup>+/-</sup>*) la vía EH se forma adecuadamente, quedando los axones entorrinales restringidos al *stratum lacunosum-moleculare* (SLM) y sustancia blanca (flechas en Fig. 11b). Sin embargo, en ausencia de Sema3E (*Sema3e<sup>0/0</sup>*), observamos la presencia de axones ectópicos, atravesando la fisura hipocámpica, perforando la capa granular del giro dentado y alcanzando el hilus (puntas de flecha en Fig. 11c-i). Además, detectamos la presencia de axones ectópicos procedentes de la vía alveolar del hipocampo, cruzando el *subiculum*-CA1 hacia el SLM (flechas en Fig. 9h-i). Estos resultados se encuentran resumidos en el esquema de la Figura 11.



**Figura 11.** Microfotografías que muestran el trazado de la conexión EH con DiI en animales control (**b**, *Sema3e<sup>+/0</sup>*) y mutante (**c-i**, *Sema3e<sup>0/0</sup>*). **a** Representación esquemática del establecimiento de la conexión EH en presencia de Sema3E (azul) y en ausencia de Sema3E (verde). El recuadro punteado rojo (**a**) muestra aproximadamente la zona fotografiada (**b-c**). Se observa cómo en los animales control la vía EH queda restringida al stratum lacunosum moleculare (flechas en **b**) y a la sustancia blanca o alveus, al contrario de lo que ocurre en los animales mutante, donde la EH se establece, pero algunos axones atraviesan la fisura hipocámpica e invaden el DG y la CA (cabezas de flecha en **c-i**). También se observa cómo axones del alveus invaden la CA en ausencia de Sema3E (flechas en **h-i**). Abreviaturas: CA, *cornu ammonis*; DG, giro dentado; EC, corteza entorrinal; HF, fisura hipocámpica; PaS, parasubiculum; PrS, presubiculum; SLM, *stratum lacunosum moleculare*; Sub, *subiculum*; VC, corteza ventrolateral. Barra de escala: **b-e**, **g-h**=250  $\mu$ m; **f,i**= 100 $\mu$ m.

En conclusión, los resultados obtenidos en los experimentos de trazado de la vía EH nos permitieron determinar que el binomio Sema3E/PlexinD1 no es imprescindible para el establecimiento de la vía EH. No obstante, la ausencia tanto del ligando, como del receptor, provoca la aparición de axones ectópicos en regiones que normalmente no invaden.



## **Capítulo 2:**

**Estudio del papel de Sema3E/PlexinD1 en el  
hipocampo postnatal y adulto**

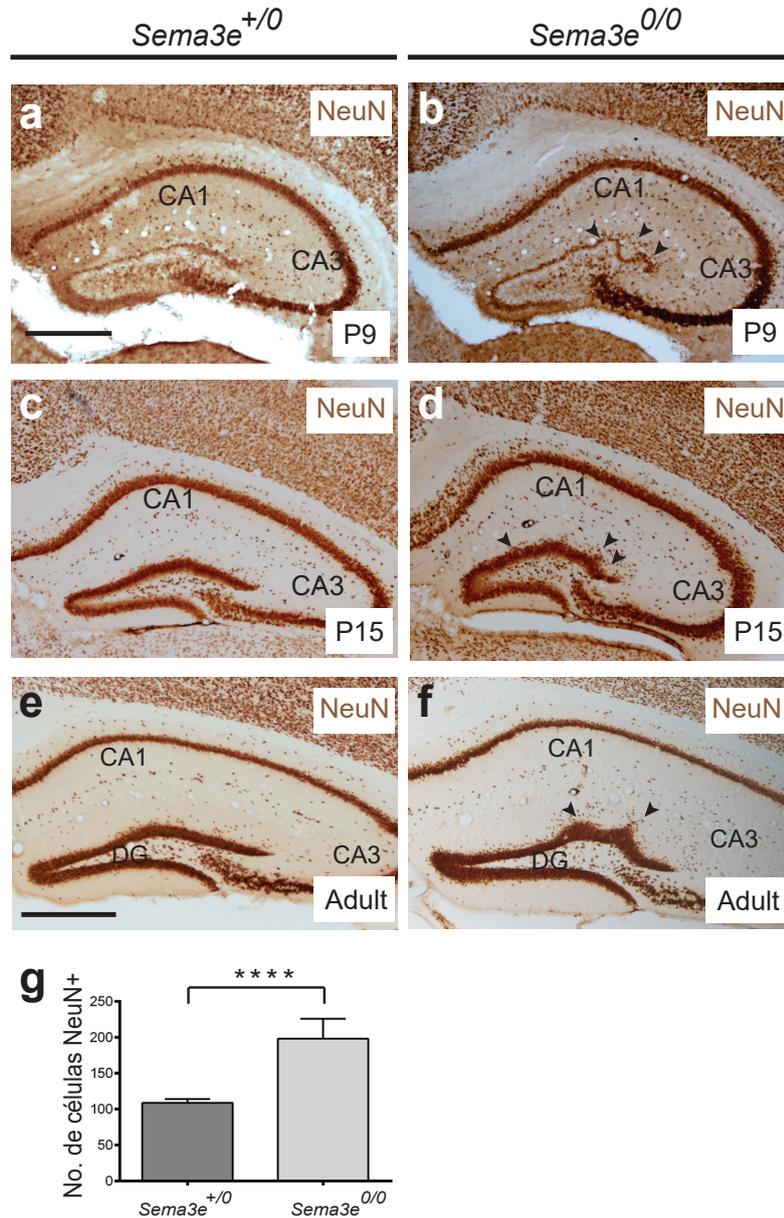


## 2.1. Caracterización citoarquitectónica del hipocampo postnatal y adulto en ausencia de Sema3E o PlexinD1

Los resultados obtenidos hasta el momento (Capítulo 1) indicaban que los animales que carecen de Sema3E o PlexinD1 presentan axones entorrinales ectópicos que se desvían de la vía perforante e invaden otras regiones. Para determinar si la ausencia de la señalización mediada por Sema3E/PlexinD1 da lugar a otras anomalías, decidimos estudiar la citoarquitectura de la región diana de la vía entorrino-hipocámpica, el giro dentado, a diferentes estadios postnatales (P9 y P15) y en adultos.

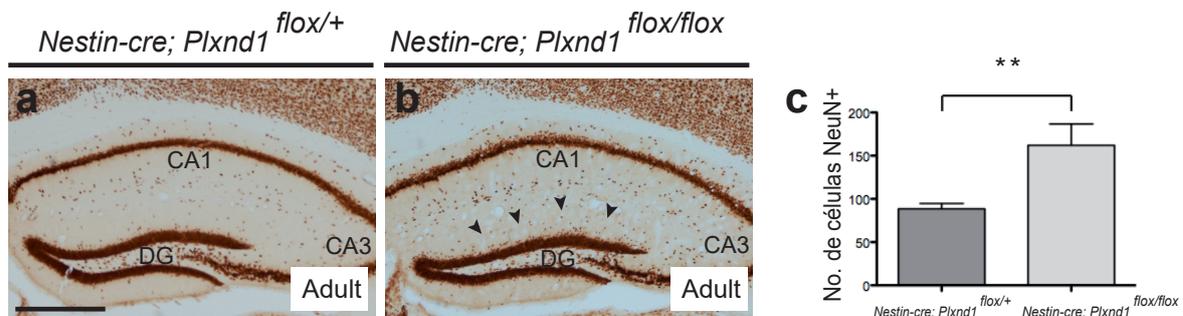
Para ello, analizamos por inmunohistoquímica la expresión de diferentes marcadores de neuronas, como NeuN (Fig. 12, 13), y de neuronas granulares como Prox1 (Fig. 14) y Calbindina (Fig. 15). Aunque NeuN es un marcador de núcleos neuronales general, y no específico de células granulares, con este marcador observamos que los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* presentan un desarrollo normal del giro dentado. Así, las células NeuN+, a P9 (Fig. 12a) comienzan a localizarse en la parte más externa de la capa granular del DG, puesto que el desarrollo de las células granulares sigue un gradiente *fuera-dentro*. A medida avanza el desarrollo, las células granulares maduras van aumentando en número y es por eso que a P15 observamos cómo prácticamente la totalidad de estas células expresan NeuN, a excepción de las células inmaduras que se encuentran en la parte más interna de la capa granular, formando una fina capa, y que en el adulto pasará a formar la zona subgranular del DG (Fig. 12c). En el adulto, observamos que prácticamente todas las células granulares son NeuN+ (Fig. 12e). Tanto a P9, como a P15 y en el adulto, las células granulares NeuN+ se encuentran prácticamente delimitadas en la capa granular, aunque también se pueden observar algunas células NeuN+ en la capa molecular interna del DG. En los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>*, también observamos características similares a las que presentan los animales control. No obstante, apreciamos como en ausencia de Sema3E (Fig. 12b, d, f) estos animales presentan irregularidades en la morfología del DG, en concreto en la hoja suprapiramidal. Ya desde P9, observamos la presencia de ondulaciones en el estrato granular de la hoja suprapiramidal, que se mantienen hasta el adulto (flechas en Fig. 12b, d, f). Además, detectamos como estos animales presentan un mayor número de células NeuN+ presentes la capa molecular del DG, sobre todo en las zonas donde se encuentran las ondulaciones. La presencia de células NeuN+ no solo se observa en la capa molecular interna del DG, sino que también las observamos en la capa molecular externa. Tras estas observaciones, decidimos cuantificar las células NeuN+ presentes en la capa molecular, centrándonos en la zona de la hoja suprapiramidal puesto que es donde se observan mayores alteraciones. Los

resultados obtenidos de la cuantificación muestran como los animales *Sema3e*<sup>0/0</sup> presentan un mayor número de células NeuN+ en la capa molecular de la hoja suprapiramidal del DG, en comparación con los animales *Sema3e*<sup>+/-</sup> (*Sema3e*<sup>0/0</sup>: 197.9 ± 7.38; vs *Sema3e*<sup>+/-</sup>: 108.7 ± 5.49; Mean ± S.E.M.;  $t = 9.699$ ;  $P < 0.0001$ ; intervalo de confianza 99% = 63.43 a 115.1; unpaired t test with Welch's correction, \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ ).



**Figura 12.** Microfotografías del hipocampo que muestran la inmunotinción de NeuN en los animales control (a, c, e, *Sema3e*<sup>+/-</sup>) y mutante (b, d, f, *Sema3e*<sup>0/0</sup>) a diferentes estadios postnatales (P9: a-b; P15: c-d) y en el adulto (e-f). Se observa la presencia de ondas en la capa suprapiramidal, así como un elevado número de células ectópicas invadiendo la capa molecular en ausencia de Sema3E (cabezas de flecha en b, d, f). g Histograma que ilustran el número de células NeuN positivas presentes en la capa molecular interna de la hoja suprapiramidal del DG de los animales *Sema3e*<sup>+/-</sup> y *Sema3e*<sup>0/0</sup>. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticas entre grupos. \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ . ANOVA Bonferroni post hoc test. Abreviaturas: CA, *cornu ammonis*; DG, giro dentado. Barras de escala: a-d= 500 $\mu$ m; e-f, h-i= 500 $\mu$ m.

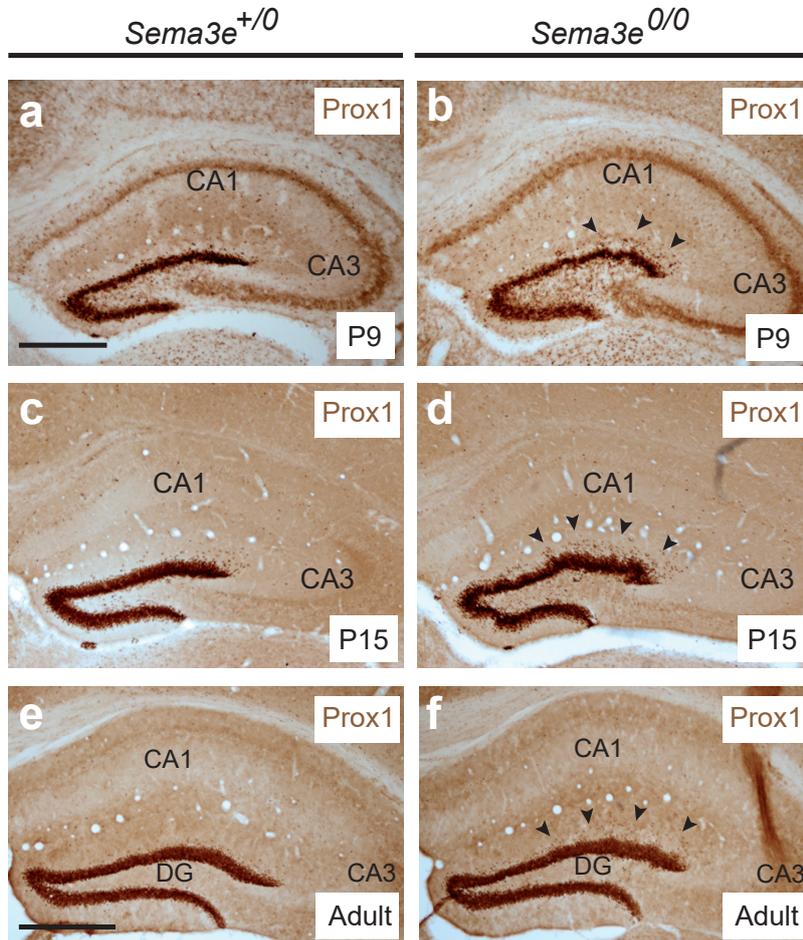
Para determinar si estas alteraciones también están presentes en los animales que carecen de PlexinD1, llevamos a cabo la inmunodetección de NeuN en los animales mutantes *Nestin-cre;Plxnd1<sup>flox/flox</sup>* (Fig. 13). En estos animales también observamos alteraciones en el giro, aunque más sutiles. No observamos alteraciones en la morfología del DG tan marcadas como en los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>*, no obstante sí observamos la presencia de un mayor número de células NeuN+ en la capa molecular del DG (flechas en Fig. 13b) en comparación con los animales control (*Nestin-cre;Plxnd1<sup>flox/+</sup>*; Fig. 13a). Tras realizar la cuantificación de las células NeuN+ presentes en la capa molecular de la hoja suprapiramidal del DG (Fig. 13c), observamos como los animales *Nestin-cre;Plxnd1<sup>flox/flox</sup>* presentan un mayor número de células que los animales control (*Nestin-cre;Plxnd1<sup>flox/flox</sup>*:  $162 \pm 12.42$ ; vs *Nestin-cre;Plxnd1<sup>flox/+</sup>*:  $88.50 \pm 6.293$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.;  $t = 5.28$ ;  $P = 0.0041$ ; intervalo de confianza 99% = 18.84 a 132.2; unpaired t test with Welch's correction, \*\*  $P \leq 0.01$ ).



**Figura 13.** Microfotografías del hipocampo adulto que muestran la inmunotinción de NeuN en los animales control (**a**, *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/+</sup>*) y mutante (**b**, *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/flox</sup>*). Se observa la presencia de células granulares NeuN ectópicas en ausencia de PlexinD1 (cabezas de flecha en **b**). **c** Histograma que ilustran el número de células NeuN positivas presentes en la capa molecular interna de la hoja suprapiramidal del DG de los animales *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/+</sup>* y *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/flox</sup>*. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticas entre grupos. \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ . ANOVA Bonferroni post hoc test. Abreviaturas: CA, *cornu ammonis*; DG, giro dentado. Barras de escala: **a-d**= 500µm; **e-f, h-i**= 500µm.

Puesto que NeuN es un marcador pan-neuronal, decidimos utilizar otros marcadores como Prox1 (Fig. 14), que comienza a expresarse en células granulares inmaduras. El análisis lo llevamos a cabo en los animales mutantes para Sema3E, y los resultados obtenidos fueron parecidos a los observados para el marcador NeuN. No obstante, puesto que Prox1 comienza a expresarse en células granulares inmaduras, ya desde P9 podemos observar un mayor número de células Prox1+ en toda la capa granular del DG (Fig. 14a-b), en comparación con las células NeuN+ (Fig. 12a-b). Observamos como en los animales *Sema3e<sup>+/0</sup>*, el giro se desarrolla adecuadamente (Fig. 14a, c, e), y al igual que ocurre con NeuN, detectamos la presencia de algunas células Prox1+ presentes en la capa molecular del DG, en la zona de la hoja suprapiramidal, desde P9 hasta el adulto. No obstante, en los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* observamos de nuevo la presencia de ondulaciones en la capa granular del DG, sobre todo en la hoja

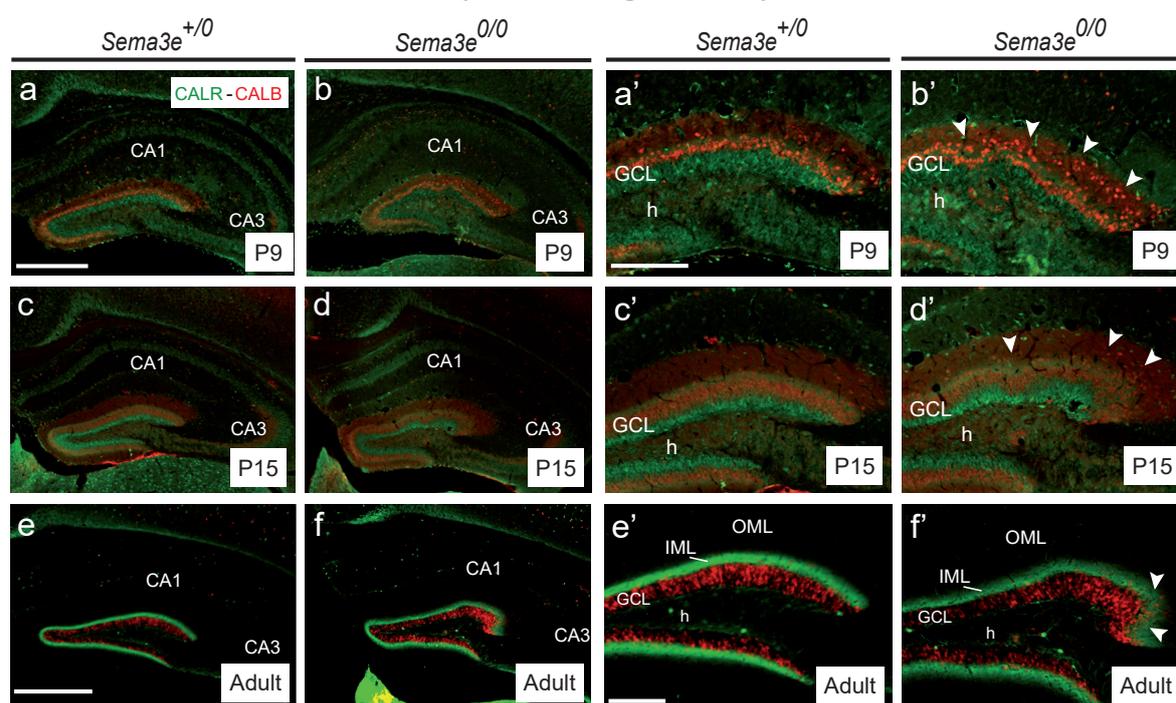
suprapiramidal, en todos los estadios analizados (Fig. 14b, d, f). Asimismo, detectamos la presencia de un mayor número de células Prox1+ ectópicas, invadiendo la capa molecular (flechas en Fig. 14b, c, d) en comparación con los animales *Sema3e<sup>+/-</sup>*.



**Figura 14.** Microfotografías del hipocampo que muestran la inmunotinción de Prox1 en los animales control (**a, c, e, *Sema3e<sup>+/-</sup>***) y mutante (**b, d, f, *Sema3e<sup>0/0</sup>***) a diferentes estadios postnatales (P9:**a-b**; P15: **c-d**) y en el adulto (**e-f**). Se observa la presencia de células granulares ectópicas invadiendo la capa molecular así como irregularidades en la forma de la hoja suprapiramidal en ausencia de Sema3E (cabezas de flecha en **b, d, f**). Abreviaturas: CA, *cornu ammonis*; DG, giro dentado. Barras de escala: **a-d**= 500 $\mu$ m; **e-f**= 500 $\mu$ m.

Otro marcador de células granulares que utilizamos fue Calbindina (CALB), que se expresa en células granulares maduras. La detección de este marcador la llevamos a cabo en conjunto con Calretinina (CALR), que es expresada de forma transitoria por las células granulares, durante su maduración (Fig. 15). Por otro lado, a medida que se avanza en el desarrollo, el marcador CALR termina expresándose en los botones sinápticos de las fibras comisurales-asociacionales, observables en la capa molecular interna (IML) del DG. El análisis lo llevamos a cabo en los animales mutantes para Sema3E, y los resultados obtenidos fueron parecidos a los observados anteriormente. En los animales *Sema3e<sup>+/-</sup>* observamos a P9 como las células CALB+ comienzan a detectarse en la parte más externa de la capa granular del DG, al igual que ocurre con el marcador NeuN. Asimismo, observamos células CALR+ en la parte más interna de la capa granular (Fig. 15a, a'). A medida que se avanza en el desarrollo, aumenta el número de células granulares maduras, es por ello que a P15 observamos un mayor número de células CALB+ y

un menor número de células CALR+ (Fig. 15c, c'). Ya en el adulto, observamos cómo la totalidad de la capa granular presenta células CALB+, mientras que CALR se detecta en los botones sinápticos de las fibras comisurales-asociacionales presentes en la IML del DG (Fig. 15e, e'). Este mismo patrón de desarrollo se observa en los animales *Sema3e*<sup>0/0</sup>, no obstante, al igual que ocurre con el resto de marcadores analizados, detectamos la presencia de ondulaciones en el DG, sobre todo en la hoja suprapiramidal, en todos los estadios analizados (Fig. 15b, b', d, d', f, f'). Asimismo, observamos la presencia de células CALB+ deslocalizadas, invadiendo la capa molecular, desde P9 hasta el adulto (flechas en Fig. 15b', d' f').

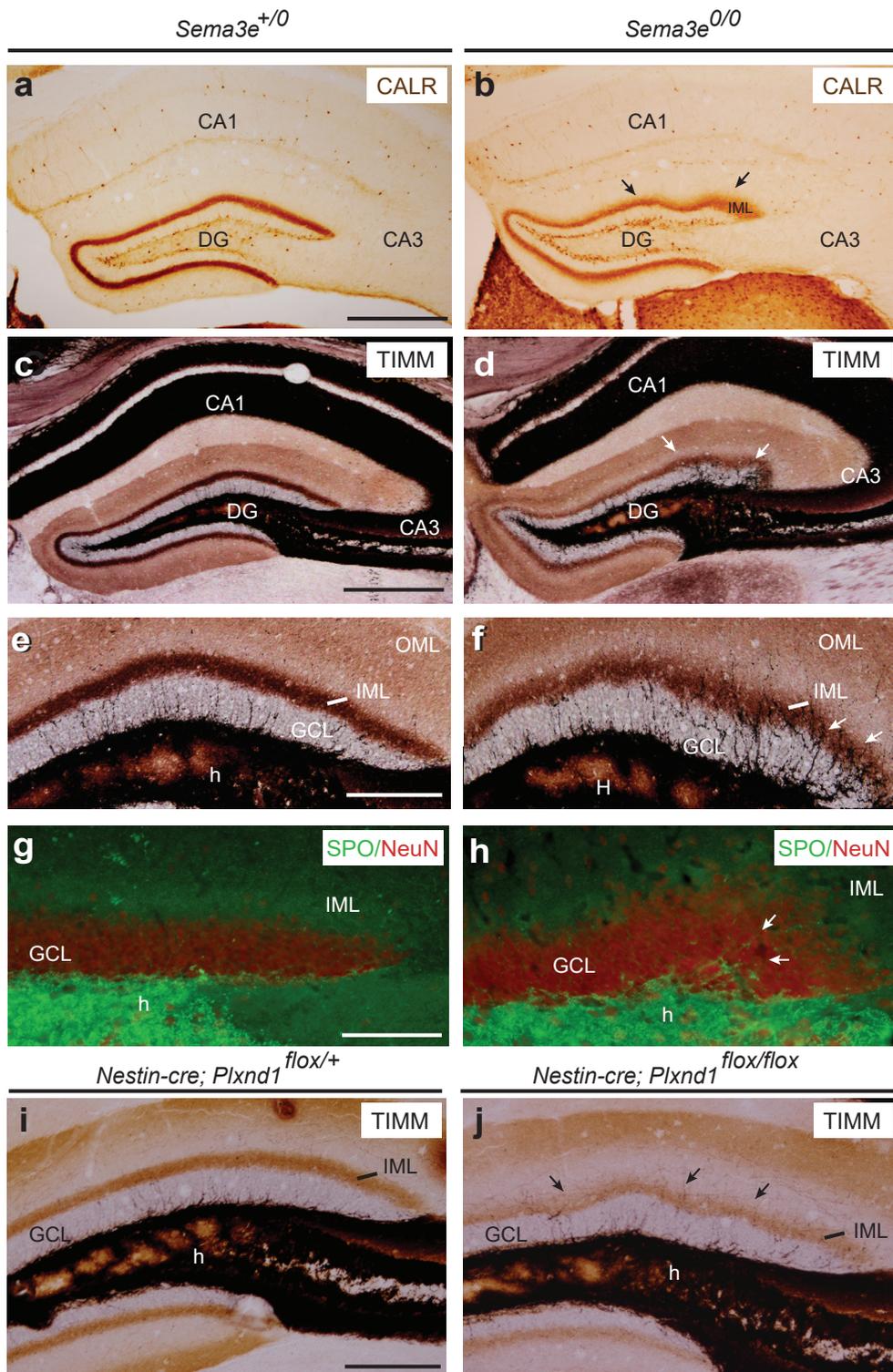


**Figura 15.** Microfotografías del hipocampo a bajo (a-f) y alto (a'-f') aumento de la doble inmunotinción de Calretinina (verde) y Calbindina (rojo) en los animales control (a, a', c, c', e, e', *Sema3e*<sup>+/-0</sup>) y mutante (b, b', d, d', f, f', *Sema3e*<sup>0/0</sup>) a diferentes estadios postnatales (P9:a-b, a'-b'; P15: c-d, c'-d') y en el adulto (e-f, e'-f'). Se observa la presencia de células granulares ectópicas en la capa molecular interna, así como ondas en la hoja suprapiramidal del DG en los mutantes de Sema3E (flechas en b', d', f'), en comparación con sus hermanos control. También se observa a P9, cómo las células granulares se encuentran situadas a distintos niveles en el animal *Sema3e*<sup>0/0</sup> (b') en comparación al animal *Sema3e*<sup>+/-0</sup> (a'). Se observa cómo en el adulto la conexión comisural-asociacional, marcada con Calretinina, se encuentra más difusa en ausencia de Sema3E (marcaje verde en f, f'), que en presencia del ligando (marcaje verde en e, e'). Abreviaturas: CA, *cornu ammonis*; DG, giro dentado. Barras de escala: a-d= 500µm; a'-d'= 200µm; e-f=500µm; e'-f'=150µm.

## 2.2. Análisis de las conexiones principales del hipocampo adulto en ausencia de Sema3E o PlexinD1

Teniendo en cuenta las alteraciones observadas en el DG de los animales *Sema3e*<sup>0/0</sup>, procedimos a analizar el estado de las conexiones principales del hipocampo adulto (Fig. 16). Mediante la inmunodetección de los botones sinápticos de las fibras comisurales-asociacionales con CALR, observamos como en los animales *Sema3e*<sup>+/-0</sup> el marcaje de CALR se encuentra delimitado en la

capa molecular interna del DG, formando una fina capa con los márgenes bien definidos (Fig. 16a). Sin embargo, en los animales *Sema3e*<sup>0/0</sup> detectamos como este marcaje se encuentra más difuso (Fig. 16b), y no tan definido como en los animales *Sema3e*<sup>+/-</sup>. Además, al igual que ocurre con los marcadores utilizados anteriormente, pudimos apreciar cómo la marca de CALR sigue las ondulaciones que presenta la capa granular de la hoja suprapiramidal en los animales *Sema3e*<sup>0/0</sup> (flechas en Fig. 16b), en comparación con los animales control (Fig. 16a).

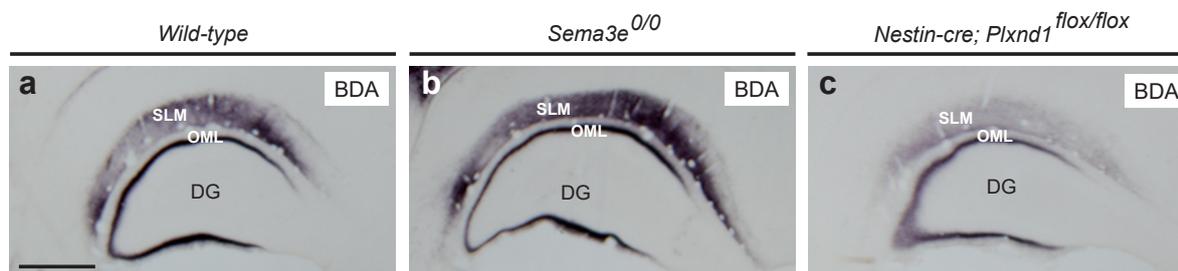


**Figura 16.** Microfotografías del hipocampo de los animales control (**a**, *Sema3e<sup>+/0</sup>*) y mutante (**b**, *Sema3e<sup>0/0</sup>*) adultos inmunoteñidos con Calretinina. Se observa la presencia de ondas en la IML de la hoja suprapiramidal del DG (flechas en **b**), así como en la propia capa granular. **c-f** Microfotografías del hipocampo de los animales control (**c-e**, *Sema3e<sup>+/0</sup>*; **i**, *Nestin-cre; Plxnd1<sup>fllox/+</sup>*) y mutante (**d, f**, *Sema3e<sup>0/0</sup>*; **j**, *Nestin-cre; Plxnd1<sup>fllox/fllox</sup>*) teñidos con la tinción de Timm. Se observan numerosas fibras musgosas ectópicas cruzando la capa granular e invadiendo la capa molecular en ausencia de Sema3E (flechas en **f**), así como la presencia de ondas en la hoja suprapiramidal. Estas alteraciones también están presente en ausencia de PlexinD1, aunque en menor medida (flechas en **j**). **g-h** Microfotografías del giro dentado que muestran la doble inmunotinción de Sinaptoporina (SPO, verde) y NeuN (rojo) en los animales *Sema3e<sup>+/0</sup>* (**g**) y *Sema3e<sup>0/0</sup>* (**h**). Se observa la presencia de fibras musgosas ectópicas en la capa granular en ausencia de Sema3E (flechas en **h**). Abreviaturas: CA, *cornu ammonis*; DG, giro dentado; GCL, capa granular; h, hilus; IML, capa molecular interna; OML, capa molecular externa. Barras de escala: **a-d**= 500µm; **e-f, i-j**=150µm; **g, h**=100µm.

Por otro lado, analizamos el estado de las fibras musgosas mediante una tinción de selenito de plata (Timm) que marca proyecciones ricas en zinc, puesto que los botones de las fibras musgosas son Zinc positivos y glutamatérgicos (Fig. 16c-f). Mediante esta tinción, también se puede observar las diferentes capas que forman la estructura laminada del hipocampo. En los animales *Sema3e<sup>+/0</sup>*, el DG presenta una morfología normal y las diferentes capas que constituyen el hipocampo se encuentran muy bien delimitadas (Fig. 16c, e). Asimismo, observamos la presencia de una capa molecular interna muy marcada y definida. Por otro lado, también pudimos constatar la presencia de algunas fibras musgosas presentes en la capa granular del DG, tal y como se ha descrito previamente (Haug, 1974; Laurberg and Zimmer, 1981; Ribak and Peterson, 1991) (Fig. 16e). Sin embargo, en los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* (Fig.16d, f) observamos la presencia de un mayor número de fibras musgosas invadiendo la capa granular (GCL, del inglés *Granular Cell Layer*), y alcanzando incluso la IML del DG (flechas en Fig. 16f). Además, tal y como observamos en los análisis previos, detectamos la presencia de ondulaciones en la hoja suprapiramidal del DG (flechas en Fig. 16d), así como una IML más difusa, en comparación con los animales *Sema3e<sup>+/0</sup>*. Asimismo, la presencia de estas fibras musgosas ectópicas es más evidente en la hoja suprapiramidal de la capa granular, en la zona de las ondulaciones. Por otro lado, mediante la inmunodetección de sinaptoporina (SPO, del inglés *Synaptoporin*), una proteína de membrana vesicular presente sobre todo en los axones de las fibras musgosas, pudimos corroborar el aumento de la presencia de botones de las fibras musgosas en la capa granular del giro dentado de los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* (flechas en Fig. 16h), en comparación con los animales control. Para conocer si en ausencia del receptor PlexinD1, los animales presentan alteraciones en las fibras musgosas, realizamos la tinción de Timm en los mutantes de *Plxnd1* (Fig. 16i-j). Los resultados obtenidos fueron parecidos a los observados en los animales mutantes de Sema3E, aunque en menor magnitud. Los animales *Nestin-cre;Plxnd1<sup>fllox/+</sup>* *fllox* presentan un mayor número de fibras musgosas invadiendo la GCL y alcanzando incluso la capa molecular del DG (Fig. 16j), en comparación con los animales *Nestin-cre;Plxnd1<sup>fllox/+</sup>* (Fig. 16i). Asimismo, en ausencia de PlexinD1, también observamos la presencia de ondulaciones en

la hoja suprapiramidal del DG (flechas en Fig. 16j) y una IML más difusa.

Por último, puesto que durante el desarrollo observamos la presencia de axones entorrinales ectópicos en los animales mutantes para Sema3E y PlexinD1, decidimos analizar el estado de la vía EH en el hipocampo adulto (Fig. 17). Para ello, llevamos a cabo el marcaje *in vivo* de esta conexión mediante el uso del trazador anterógrado BDA (del inglés *Biotinylated Dextran Amine*) (Fig. 17). No observamos diferencias en cuanto a la distribución de la vía en ausencia de Sema3E (Fig. 17b), ni de PlexinD1 (Fig. 17c), en comparación con los animales control (Fig. 17a). Observamos cómo los axones entorrinales se encuentran, en todos los casos, delimitados y bien definidos en la capa molecular externa (OML) del DG.



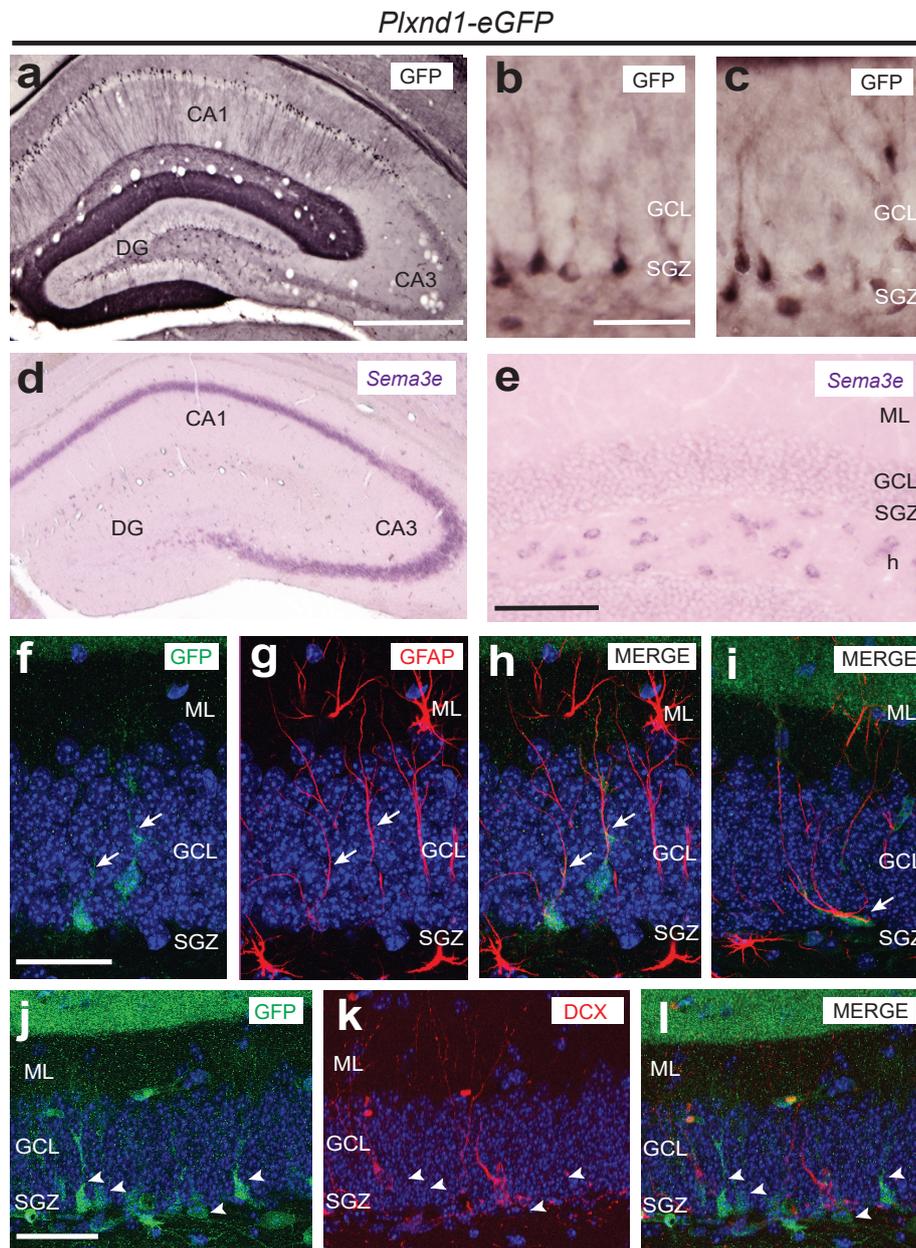
**Figura 17.** Microfotografías que ilustran el trazado de la conexión EH con BDA en los animales adultos control (**a**, *wild-type*) y mutante (**b**, *Sema3e<sup>0/0</sup>* y **c**, *Nestin-cre; Plxnd1<sup>lox/lox</sup>*). No se observan diferencias en cuanto a la distribución de estas fibras. Abreviaturas: DG, giro dentado; OML, capa molecular externa; SLM, *stratum lacunosum moleculare*. Barras de escala: 200µm.

### 2.3. Análisis de la función de Sema3E/PlexinD1 en el proceso de neurogénesis de la zona subgranular del giro dentado

Tanto las irregularidades observadas en el giro dentado, como la presencia de numerosas células granulares ectópicas invadiendo la capa molecular del DG, nos hicieron centrar la atención en el proceso de neurogénesis adulta que ocurre en la SGZ del DG.

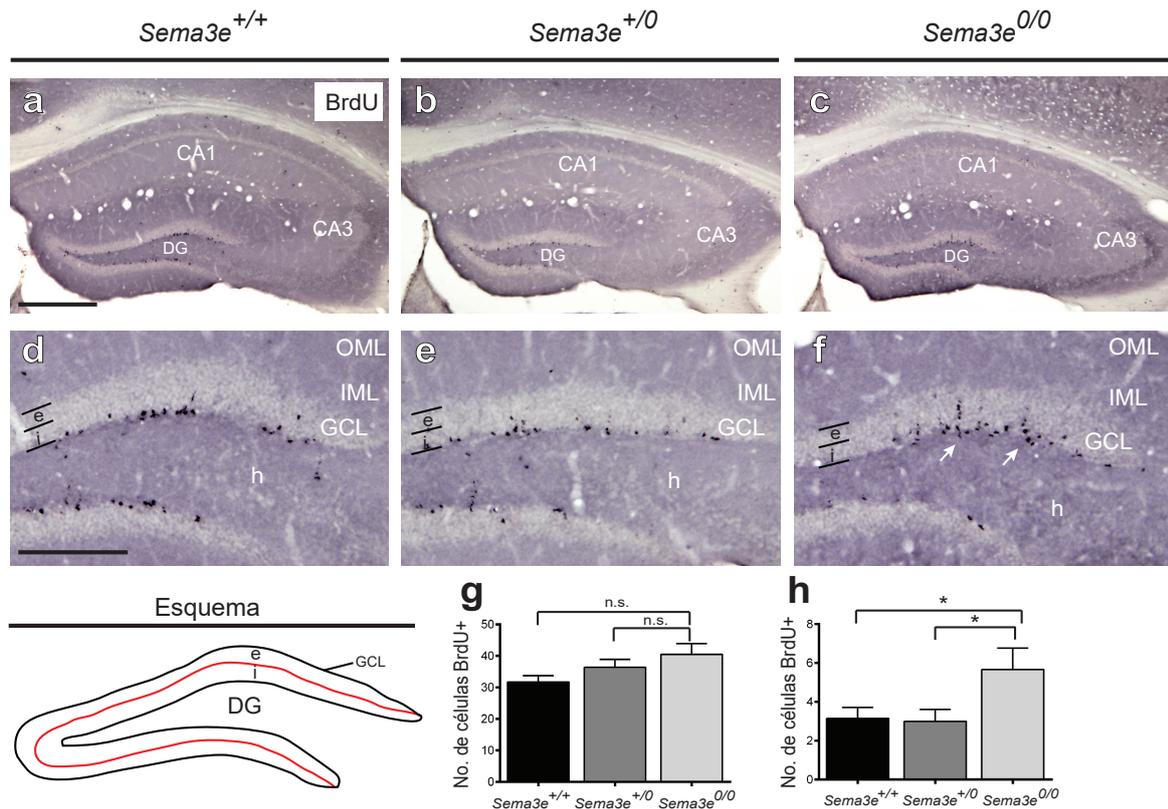
En primer lugar, quisimos conocer dónde se expresan PlexinD1 y Sema3E en el hipocampo adulto. Para ello, analizamos el patrón de expresión de PlexinD1 en el hipocampo adulto, mediante la detección por inmunohistoquímica de GFP (del inglés *Green Fluorescent Protein*) en una cepa de ratón que expresa esta proteína bajo el promotor de PlexinD1 (*Plxnd1-eGFP*) (Fig. 18a-c). Observamos que PlexinD1 se expresa en algunas neuronas piramidales de la CA1, en células del hilus y en la SGZ (Fig.18 a-c). La presencia de PlexinD1 en la SGZ sugirió que ésta podría estar expresándose en células progenitoras, por lo que para identificar de qué células se trataba, llevamos a cabo dobles inmunofluorescencias de GFP con dos marcadores neurogénicos diferentes. Los marcadores neurogénicos analizados fueron GFAP y DCX. Pudimos observar que las células GFP positivas también lo son para GFAP, marcador de las células de tipo 1 o RGLs

presentes en el nicho neurogénico (Fig. 18f-i). Por otro lado, las células GFP positivas no lo son para DCX (Fig. 18j-l), indicando por tanto que PlexinD1 no se expresa en neuronas inmaduras. Por otro lado, también analizamos el patrón de expresión de *Sema3e* mediante hibridación *in situ* (Fig. 18d-e) y pudimos observar que se expresa en la capa piramidal del hipocampo propio, en el *stratum lacunosum moleculare* y en el hilus.



**Figura 18.** Microfotografías a bajo (a) y alto (b-c) aumento que muestran las neuronas GFP-positivas presentes en el hipocampo (a) y giro dentado (b-c) del animal adulto *Plxnd1-eGFP*. Se observa la presencia de células GFP-positivas en la capa piramidal de la CA1, así como en el hilus y en la zona subgranular. Microfotografías a bajo (d) y alto (e) aumento que muestran la distribución del mRNA de *Sema3e* en el hipocampo (d) y giro dentado (d, e) de un animal *wild-type* adulto. f-i Imágenes de microscopía confocal de una doble inmunofluorescencia de GFP (verde) y GFAP (rojo) del giro dentado de un animal *Plxnd1-eGFP* adulto. Se observa que todas las células GFP-positivas también lo son para GFAP (flechas). j-l Imágenes de microscopía confocal de una doble inmunofluorescencia de GFP (verde) y DCX (rojo) del giro dentado de un animal *Plxnd1-eGFP* adulto. Se observa que las células GFP-positivas no lo son para DCX (cabezas de flecha). Abreviaturas: CA: *cornu ammonis*; DG, giro dentado; GCL, capa granular; ML, capa molecular; SGZ, zona subgranular. Barras de escala: a,d=500µm; b,c= 50µm; e=150µm; f-i=50µm; j-l=50µm.

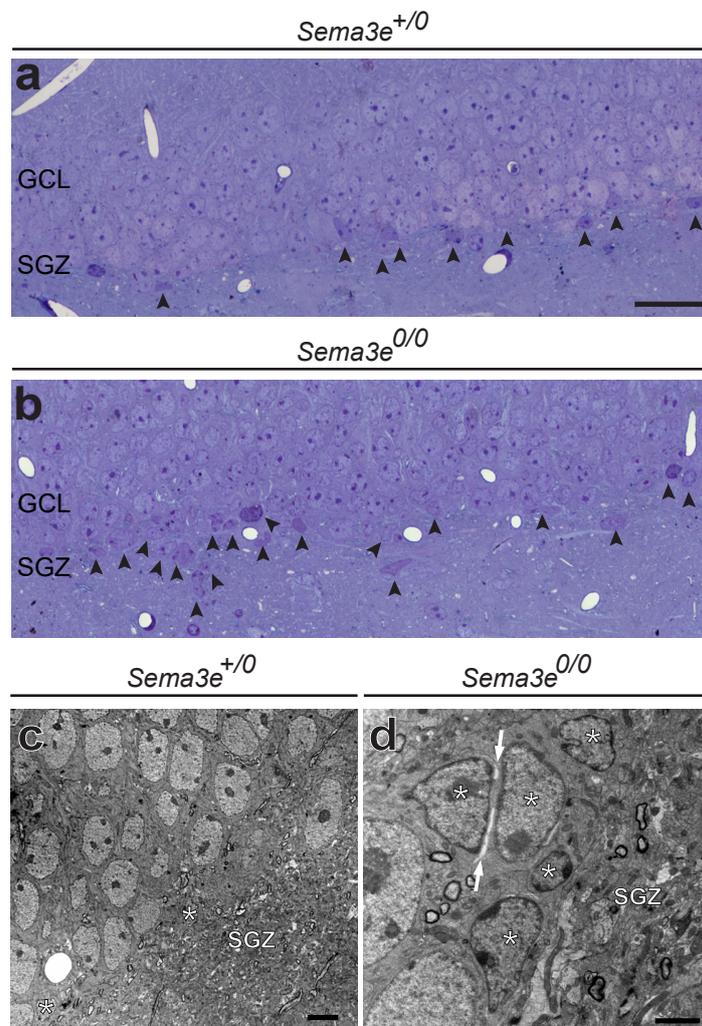
Puesto que PlexinD1 se expresa en las células RGLs, a continuación, nos centramos en determinar si el proceso de neurogénesis se ve alterado en ausencia de la señalización mediada por Sema3E/PlexinD1. Para ello llevamos a cabo un ensayo de BrdU (ver Materiales y Métodos) en el cual inyectamos de forma intraperitoneal el compuesto químico durante cuatro días consecutivos a animales *Sema3e<sup>+/+</sup>*, *Sema3e<sup>+/-</sup>* y *Sema3e<sup>0/0</sup>*. Una semana más tarde, profundimos y procesamos estos animales para la detección inmunohistoquímica de BrdU (Fig. 19a-f).



**Figura 19.** Microfotografías a bajo (**a-c**) y alto (**d-f**) aumento del hipocampo de los animales control (**a-b**, *Sema3e<sup>+/+</sup>*; **d-e**, *Sema3e<sup>+/-</sup>*) y mutante (**c,f**, *Sema3e<sup>0/0</sup>*) pinchados con BrdU. Se observa la presencia de células BrdU positivas formando columnas en la capa granular del DG en ausencia de Sema3E (flechas en **f**). **g-h** Histogramas que muestran la cuantificación de las células BrdU-positivas en toda la capa granular (**g**) y en la porción externa de ésta (nombrada como 'e') (**h**) en los animales *Sema3e<sup>+/+</sup>*, *Sema3e<sup>+/-</sup>* y *Sema3e<sup>0/0</sup>*. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticas entre grupos. \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ . ANOVA Bonferroni post hoc test. Abreviaturas: CA: cornu ammonis; DG, giro dentado; GCL, capa granular; h, hilus; IML, capa molecular interna; OML, capa molecular externa. Barras de escala: **a-c**= 500 $\mu$ m; **d-e**= 200 $\mu$ m.

Observamos cómo los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* (Fig. 19c, f) presentan un mayor número de células BrdU+ en la GCL del DG, en comparación con los animales *Sema3e<sup>+/+</sup>* (Fig. 19a, d) y *Sema3e<sup>+/-</sup>* (Fig. 19b, e). Además, observamos como en el animal *Sema3e<sup>0/0</sup>*, estas células BrdU+ se encuentran a distintos niveles de la GCL, sobretudo de la hoja suprapiramidal, formando columnas (flechas en Fig. 19f). Estas columnas celulares se observan mayoritariamente en la zona donde se suelen apreciar las ondulaciones de la hoja suprapiramidal. Teniendo en cuenta

estas observaciones, decidimos cuantificar las células BrdU+ presentes en toda la GCL del DG de los diferentes genotipos analizados. Los resultados de la cuantificación mostraron un aumento en el número de estas células, aunque no significativo, en los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* (Fig. 19g), en comparación con los animales *Sema3e<sup>+/-</sup>* y *Sema3e<sup>+/+</sup>*. Puesto que los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* presentan células BrdU+ a distintos niveles, decidimos cuantificar las células BrdU+ presentes en la zona más externa de la GCL (marcado como “e” en el esquema de la Fig. 19). Tras la cuantificación observamos que los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* presentan un aumento significativo en el número de estas células en comparación con los animales *Sema3e<sup>+/-</sup>* y *Sema3e<sup>+/+</sup>* (Fig. 19h) (*Sema3e<sup>0/0</sup>*;  $5.67 \pm 1.11$ ; vs *Sema3e<sup>+/-</sup>*;  $3.0 \pm 0.61$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.;  $t = 2.291$ ;  $P = 0.0849$ ; confidence interval 90% = -5.248 to -0.084; *Sema3e<sup>0/0</sup>*;  $5.67 \pm 1.11$ ; vs *Sema3e<sup>+/+</sup>* mice;  $3.14 \pm 0.57$ ;  $t = 2.301$ ;  $P = 0.083$ ; confidence interval 90% = -4.957 to -0.09061; ANOVA, Bonferroni *post hoc* test,  $*P < 0.1$ ).

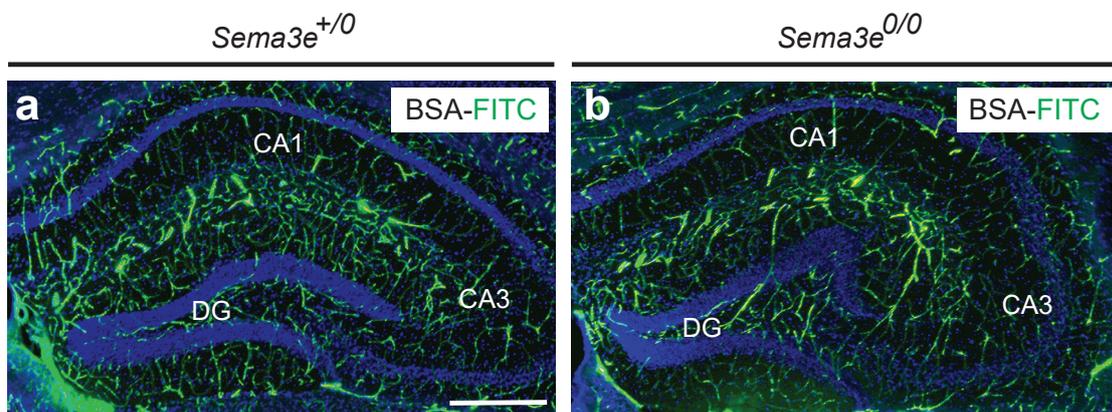


**Figura 20.** Organización de la capa granular y zona subgranular en los animales control (**a**, *Sema3e<sup>+/-</sup>*) y mutante (**b**, *Sema3e<sup>0/0</sup>*). **a-b** Cortes semifinos (1.5 μm) teñidos con azul de toluidina que muestran la presencia de grupos formados por numerosas células inmaduras en la SGZ en ausencia de Sema3E (cabezas de flecha en b). **c-d** Imágenes de microscopía electrónica que muestran la presencia de células inmaduras (asteriscos) en los nichos neurogénicos de la SGZ en ambos genotipos. Se observa la presencia de diferentes niveles de condensación de la cromatina en las células inmaduras, en comparación a las células granulares postmitóticas. También se detecta la presencia de espacios vacíos (flechas en **d**) entre las células inmaduras, típicos de células activas que se encuentran proliferando o migrando. Abreviaturas: GCL, capa granular; SGZ, zona subgranular. Barras de escala: **a-b**=25 μm; **c**=10 μm; **d**=2 μm.

Estas alteraciones se pudieron corroborar con el estudio de microscopía electrónica de la SGZ del DG (Fig. 20) llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. José Manuel García Verdugo,

de la Universidad de Valencia. Mediante la tinción de azul de toluidina en cortes semifinos, observamos la presencia de un mayor número de neuronas inmaduras en la SGZ del DG en los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* (cabezas de flecha en Fig. 20b) en comparación con los animales *Sema3e<sup>+/-</sup>* (cabezas de flecha en Fig. 20a). Estas neuronas inmaduras se encuentran formando nichos celulares en los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>*, donde se agrupan a distintos niveles de la GCL del DG, en comparación con los animales *Sema3e<sup>+/-</sup>* donde la distribución es más lineal y confinada a la SGZ. A nivel ultraestructural, observamos que las neuronas inmaduras presentes en los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* (asteriscos en Fig. 20d) presentan una gran heterogeneidad en cuanto a su morfología nuclear, indicando que estas células se encuentran en diferente grado de diferenciación. Además, en estas células inmaduras destaca la presencia de espacios intercelulares (flechas en Fig. 20d), típico de células en migración.

Por otro lado, debido a la importancia de las funciones llevadas a cabo por el sistema vascular en los nichos neurogénicos presentes en la SGZ del DG, procedimos a analizar la distribución de los vasos sanguíneos presentes en el hipocampo de los animales *Sema3e<sup>+/-</sup>* (Fig. 21a) y *Sema3e<sup>0/0</sup>* (Fig. 21b). Para ello, llevamos a cabo el marcaje de los vasos mediante la inyección intracardíaca de albúmina de suero bovino marcado con isotiocianato de fluoresceína (BSA-FITC). Tras el procesamiento de los cerebros y la observación de la distribución de los vasos, no detectamos alteraciones relevantes entre los animales control y mutante.



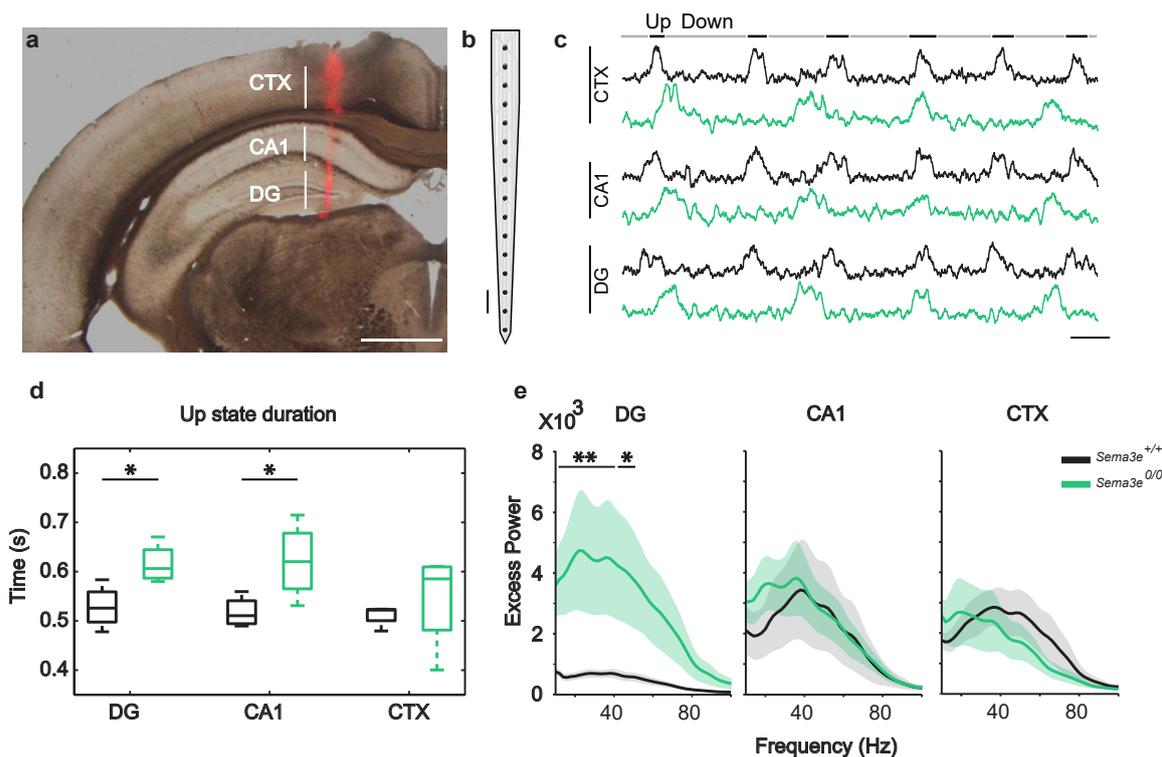
**Figura 21.** Microfotografías que muestran la distribución de los vasos sanguíneos en el hipocampo de los animales control (**a**, *Sema3e<sup>+/-</sup>*) y mutante (**b**, *Sema3e<sup>0/0</sup>*) tras la tinción con BSA-FITC. Abreviaturas: CA: *cornu ammonis*; DG, giro dentado. Barras de escala **a-b**= 250µm.

#### 2.4. Análisis de la actividad eléctrica del hipocampo en ausencia de Sema3E

El aumento en la proliferación de las células granulares en el adulto se ha detectado en diferentes modelos de epilepsia. Estas células granulares que se generan, junto con las ya existentes contribuyen a la reorganización aberrante de los axones del hipocampo. Además, las convulsiones persistentes también interrumpen la migración de las nuevas células que se

generan dando lugar a células ectópicas que invaden el hilus. Estas células ectópicas se integran de forma anormal a la circuitería existente dando lugar a un proceso de hiperexcitabilidad (Hamani et al., 2005; Mitchell et al., 1996; Parent, 2007).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, quisimos analizar la actividad eléctrica del hipocampo de los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* para determinar si presentaban patrones de actividad funcional de tipo epiléptico (Fig. 22). Para ello, en colaboración con el grupo de la Dra. María Victoria Sánchez Vives, de IDIBAPS, analizamos la actividad eléctrica espontánea del hipocampo mediante el potencial de campo local (LFP, del inglés *Local Field Potential*) gracias al uso de un multi-electrodo de 16 canales. El multi-electrodo se situó de forma que estuviese cubriendo las áreas del DG y de la CA1 del hipocampo, y de la corteza cerebral presente encima de estas áreas (Fig. 22a-b), en animales *Sema3e<sup>0/0</sup>*, *Sema3e<sup>+/-</sup>* y *Sema3e<sup>+/+</sup>* anestesiados. Después de cada lectura, se comprobó que el electrodo estuviese cubriendo las áreas mencionadas mediante el uso de DiI e histología.



**Figura 22.** Medida de la actividad oscilatoria en los animales control (*Sema3e<sup>+/+</sup>*) y mutante (*Sema3e<sup>0/0</sup>*). **a** Mitad de una sección coronal que muestra las zonas cubiertas por el multi-electrodo (rojo, DiI) que son la corteza cerebral y el hipocampo. **b** Representación esquemática del multi-electrodo de 16 canales utilizado para medir la actividad neuronal. **c** Ejemplos de la actividad medida en la corteza cerebral e hipocampo de los animales *Sema3e<sup>+/+</sup>* (negro) y *Sema3e<sup>0/0</sup>* (verde) durante la actividad oscilatoria lenta. **d** Histograma de cajas y bigotes que muestra la duración de los *Up states* medidos en el hipocampo y corteza cerebral de los animales *Sema3e<sup>+/+</sup>* (negro, n=4) y *Sema3e<sup>0/0</sup>* (verde, n=4). **e** Potencia media registrada durante los *Up states* en el hipocampo y corteza cerebral de los animales *Sema3e<sup>+/+</sup>* (negro) y *Sema3e<sup>0/0</sup>* (verde). Los datos están representados como la media ± S.E.M (sombra). \* P < 0.1, \*\* P < 0.05, Wilcoxon rank-sum test. Abreviaturas: CA: *cornu ammonis*; CTX, corteza; DG, giro dentado. Barras de escala: **a** = 1mm; **b** = 100µm; **c** = 0.5s.

En condiciones de anestesia profunda, la actividad cerebral está caracterizada por la actividad oscilatoria de onda lenta (<1Hz) que presentan períodos activos o *Up states* (potenciales postsinápticos excitatorios e inhibitorios) y períodos silentes o *Down states* (hiperpolarización y quiescencia) (Ruiz-Mejias et al., 2016; Steriade et al., 1993; Timofeev et al., 1996) (Fig. 22c). Observamos que el perfil del LFP no presentaba evidencias de actividad espontánea tipo epiléptica en ninguno de los genotipos analizados, de forma que procedimos a inducir descargas epilépticas evocadas mediante la inyección de ácido kaínico en los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* y *Sema3e<sup>+/+</sup>*, y tampoco observamos diferencias en la dinámica de los períodos epilépticos entre los dos genotipos. No se detectaron diferencias significativas en la latencia de descarga (*Sema3e<sup>0/0</sup>*:  $2400 \pm 400$ s, *Sema3e<sup>+/+</sup>*:  $1800 \pm 600$ s), ni en la frecuencia de los períodos epilépticos (*Sema3e<sup>0/0</sup>*:  $0.03 \pm 0.02$ Hz, *Sema3e<sup>+/+</sup>*:  $0.02 \pm 0.01$ Hz), o en la duración de éstos (*Sema3e<sup>0/0</sup>*:  $27 \pm 3$ s, *Sema3e<sup>+/+</sup>*:  $31 \pm 11$ s) ( $P > 0.05$ , Wilcoxon rank-sum test para todas las comparaciones). Estos resultados muestran que los animales que carecen de Sema3E no presentan descargas epilépticas espontáneas, ni un aumento en la tendencia a expresarlas.

Posteriormente medimos diferentes parámetros de los *Up* y *Down states* de la actividad oscilatoria lenta y detectamos un aumento en la duración de los *Up states* en la CA1 y DG de los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* (Fig. 22d, verde) respecto al *Sema3e<sup>+/+</sup>* (Fig. 22d, negro) ( $P < 0.1$ , Wilcoxon rank-sum test), pero no a nivel de la corteza cerebral. Los *Up states* se generan a partir de la conectividad de circuitos locales, y su duración está influenciada por un equilibrio entre excitación e inhibición (Compte et al., 2008; Contreras et al., 1996; Sanchez-Vives and McCormick, 2000) por lo que un aumento en la duración de los *Up states* se considera una medida de aumento de excitabilidad (Gibson et al., 2008; Huo et al., 2016). Por otro lado, el equilibrio entre excitación e inhibición también es necesario para la generación de componentes oscilatorios de alta frecuencia tanto en la corteza como en el hipocampo (Compte et al., 2008; Csicsvari et al., 2003). Para saber más sobre la posible desregulación de este equilibrio en los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>*, medimos la potencia de la actividad oscilatoria de altas frecuencias (10-100Hz) y observamos que ésta estaba aumentada alrededor del rango gamma (20-55Hz) en el DG de estos animales (Fig. 22e, verde) ( $P < 0.05$ , Wilcoxon rank-sum test), en comparación con los animales *Sema3e<sup>+/+</sup>* (Fig. 22e, negro).





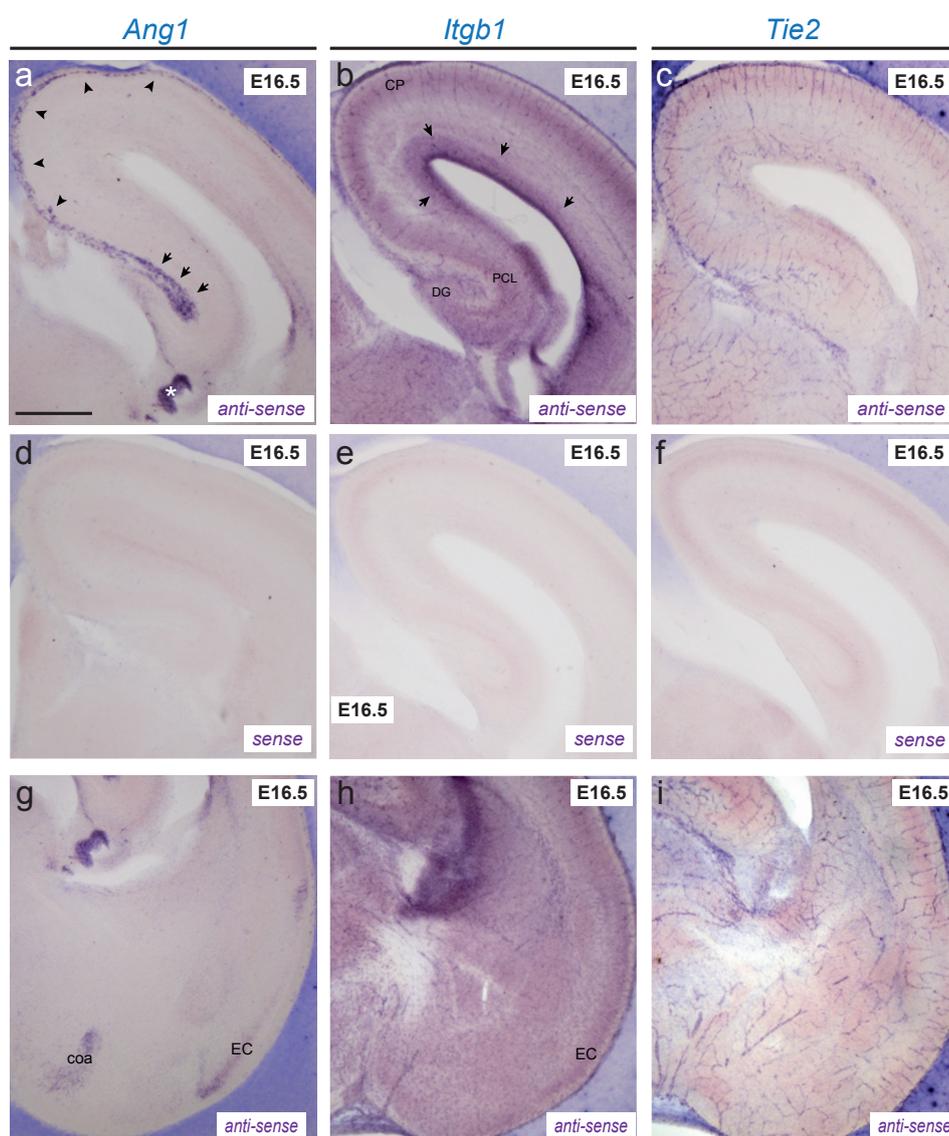
## **Capítulo 3:**

**Estudio del papel de ANG1 y sus receptores  
durante el desarrollo del hipocampo**



### 3.1. Análisis del patrón de expresión de *Ang1* y sus receptores *Tie2* e *Itgb1* en la FH en desarrollo

Para determinar el patrón de expresión de *Ang1* y sus receptores *Tie2* e *Itgb1*, llevamos a cabo la detección de sus RNA mensajeros (mRNAs) mediante hibridación *in situ* en cerebros procesados en secciones histológicas coronales (Fig. 23). Se procesaron animales *wild-type* con el objetivo de determinar la distribución fisiológica de estos mRNAs. Los patrones de expresión fueron analizados durante el estadio embrionario E16.5, momento en el cual ocurre la mayoría de procesos de guía axonal y crecimiento neurítico en el hipocampo.



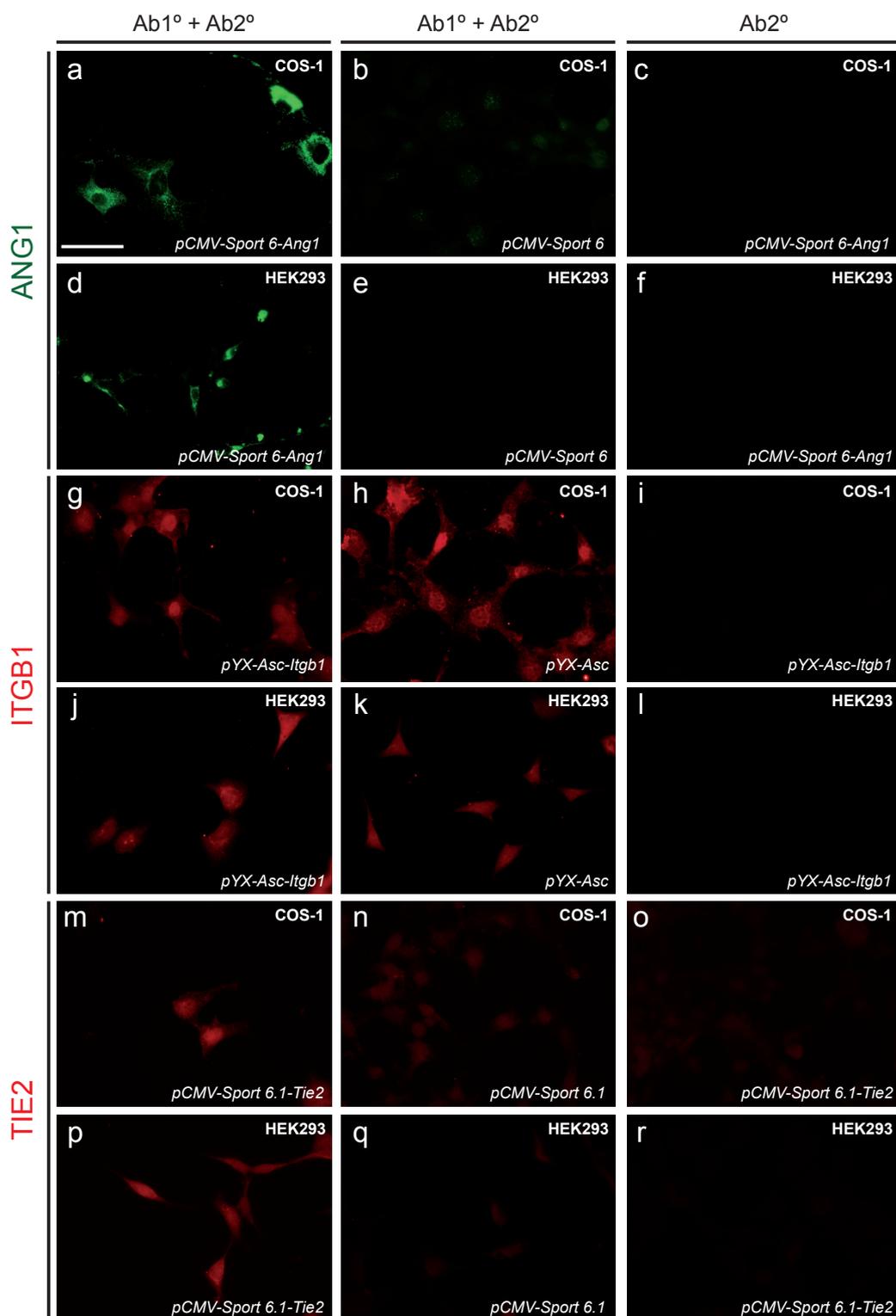
**Figura 23.** Microfotografías que ilustran el patrón de expresión de *Ang1* (a, g), *Itgb1* (b, h) y *Tie2* (c, i) en cortes coronales a E16.5. a, g Se observa expresión de *Ang1* en la zona marginal (flechas en a), en la capa I cortical (cabezas de flecha en a), en la fimbria (asterisco en a), en el núcleo amigdaloido cortical anterior y corteza entorrinal (g). b, h Se detecta marcaje de *Itgb1* en el epitelio endimario del ventrículo lateral (flechas en b), en la placa cortical, en la capa piramidal del hipocampo, en las meninges y los vasos sanguíneos y en la corteza entorrinal. c Respecto a *Tie2* observamos expresión en los vasos sanguíneos. d-f Microfotografías que ilustran la distribución de las sondas sense de *Ang1* (d), *Itgb1* (e) y *Tie2* (f). Abreviaturas: coa, núcleo amigdaloido cortical anterior; EC, corteza entorrinal. Barras de escala: a-i= 250µm.

Respecto al ligando *Ang1*, observamos expresión de su mRNA en la zona marginal del hipocampo (flechas en Fig. 23a), en la capa I cortical (cabezas de flecha en Fig. 23a), en la fimbria (asterisco en Fig. 23a), en el núcleo amigdaloides cortical anterior y en la EC (Fig. 23g). Respecto al receptor *Itgb1* (Fig. 23b), detectamos expresión en los vasos sanguíneos, en la placa cortical (CP), en la capa piramidal del hipocampo (PCL), en el epitelio endodivario del ventrículo lateral (flechas en Fig. 23b) y en las meninges. Asimismo, también detectamos una ligera marca en la EC (Fig. 23h). Por último, respecto al receptor *Tie2*, solo observamos expresión en los vasos sanguíneos (Fig. 23c, i). Los controles negativos de la hibridación, llevados a cabo mediante la incubación con la sonda *sense*, no mostraron señales específicas (Figs. 23d-f). Los resultados obtenidos muestran que *Ang1* e *Itgb1* se expresan en el parénquima neural de la FH en desarrollo, y *Tie2* en los vasos sanguíneos presentes en todo el parénquima.

### 3.2. Análisis de la expresión de ANG1 y sus receptores en cultivos neuronales

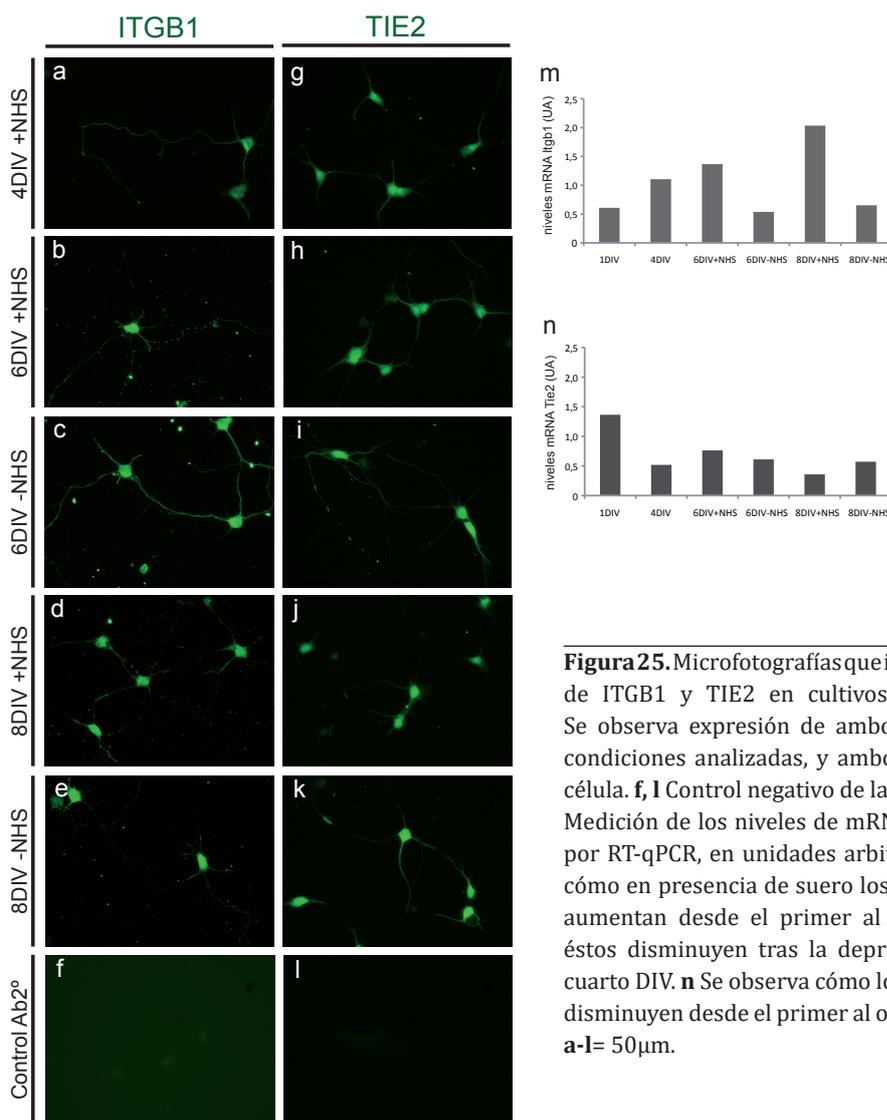
Puesto que *Ang1* y sus receptores se expresan en la FH en desarrollo, y teniendo en cuenta las funciones que ANG1 lleva a cabo sobre diferentes modelos neuronales *in vitro*, quisimos analizar sus funciones en cultivos primarios hipocámpicos de embriones a E16.5. En primer lugar, quisimos conocer si los receptores TIE2 e ITGB1 están presentes en este tipo de cultivos, mediante inmunocitoquímica. No obstante, antes de este paso, llevamos a cabo la caracterización de diferentes anticuerpos primarios con el objetivo de seleccionar el más óptimo para la inmunodetección de estas proteínas. Para esta caracterización utilizamos las líneas celulares COS-1 y HEK293 transfectadas con los plásmidos que codifican para ANG1, TIE2 o ITGB1, por separado. Tras probar diferentes anticuerpos para cada proteína, seleccionamos aquellos que mejor funcionaron, que se muestran en la Tabla 2 de *Materiales y Métodos*, y cuyos resultados se observan en la Figura 24. La primera columna de la Figura 24 muestra el resultado obtenido tras la inmunodetección de las diferentes proteínas con su anticuerpo primario óptimo (Fig. 24a, d, g, j, m, p). La segunda y tercera columna muestran los resultados de los controles negativos utilizados, que fueron el control negativo de la transfección (Fig. 24b, e, h, k, n, q), y el control negativo de la inmunofluorescencia (Fig. 24c, f, i, l, o, r), respectivamente. En ambas líneas celulares transfectadas con el vector que codifica para ANG1, observamos cómo la señal de esta proteína se presenta en forma punteada por todo el citoplasma de la célula (Fig. 24a, d). En el caso de ITGB1 y TIE2, observamos cómo la señal de ambas proteínas se encuentra también en forma punteada, aunque por toda la célula (ITGB1: Fig. 24g, j; TIE2: Fig. 24m, p). Los controles negativos no mostraron señal, a excepción del control negativo de la transfección de *Itgb1*, en la cual sí observamos señal (Fig. 24h, k), aunque esta situación se repitió para todos

los anticuerpos de ITGB1 analizados.



**Figura 24.** Caracterización de los anticuerpos primarios contra ANG1 (**a-f**), ITGB1 (**g-l**) y TIE2 (**m-r**). Microfotografías que muestran el resultado obtenido tras la inmunofluorescencia realizada sobre células COS-1 y HEK293 transfectadas con vectores que codifican para *Ang1* (**a, d**), *Itgb1* (**g, j**) y *Tie2* (**m, p**). Se observa cómo ANG1 se expresa de forma punteada en el citoplasma de ambas líneas celulares (**a, d**), mientras que ITGB1 y TIE2 también se expresan de forma punteada aunque por toda la célula (**g, j, m, p**). También se ilustran el control negativo de la transfección para ANG1 (**b, e**), ITGB1 (**h, k**), y TIE2 (**n, q**); y el control negativo de la inmunofluorescencia (**c, f, i, l, o, r**). Barras de escala: **a-r**= 50µm.

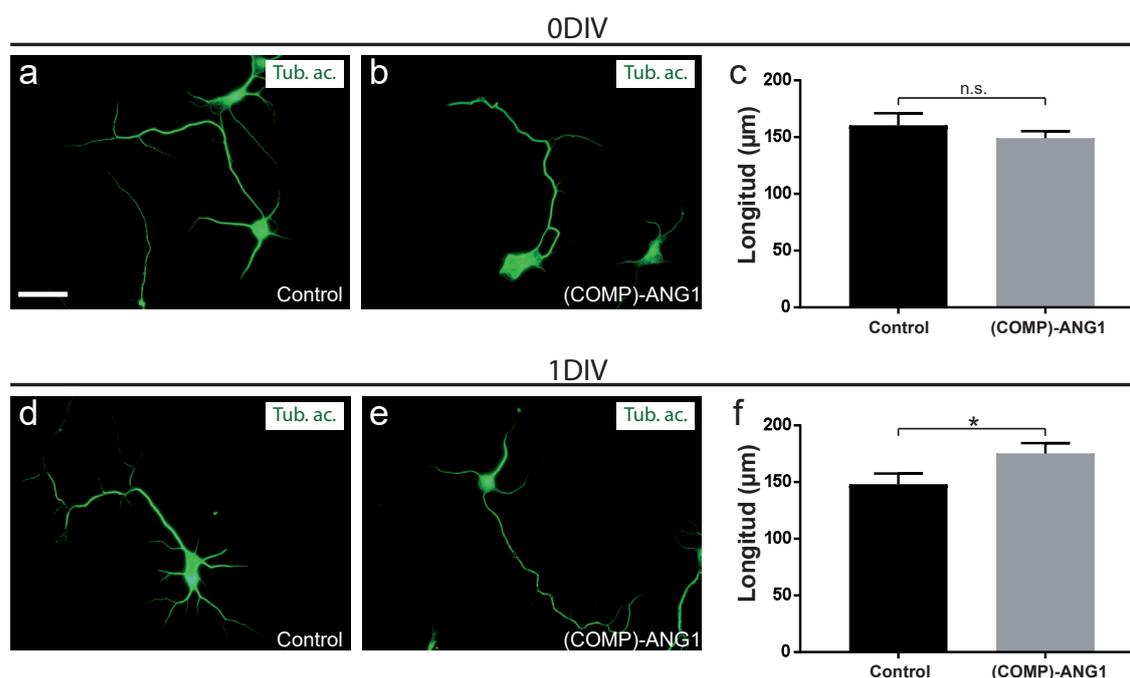
Habiendo seleccionado los anticuerpos primarios más óptimos para la inmunodetección de TIE2 e ITGB1, decidimos analizar su expresión en los cultivos primarios hipocámpicos (Fig. 25). La detección se realizó a diferentes días *in vitro*, tanto en presencia como en ausencia de suero (NHS, del inglés *Normal Horse Serum*). Observamos que en todas las condiciones analizadas, ambos receptores se expresan por toda la célula (Fig. 25a-e, g-k). También llevamos a cabo el control negativo de la inmunofluorescencia, en el cual no observamos ninguna señal (Fig. 25f, l). Por lo tanto, ambos receptores se expresan en los cultivos primarios hipocámpicos, desde el cuarto al octavo DIV, y tanto en presencia como en ausencia de suero. Por otro lado, también analizamos por RT-qPCR los niveles de mRNA de *Itgb1* (Fig. 25m) y *Tie2* (Fig. 25n). Observamos que, en presencia de suero, los niveles de mRNA de *Itgb1* aumentan desde el primer al octavo DIV, no obstante, cuando se depriva de suero a las células, a partir del cuarto DIV, estos niveles disminuyen. Al contrario de lo que ocurre con *Itgb1*, los de *Tie2* van disminuyendo desde el primer al octavo día *in vitro*, tanto en presencia como en ausencia de suero.



**Figura 25.** Microfotografías que ilustran la inmunodetección de ITGB1 y TIE2 en cultivos primarios hipocámpicos. Se observa expresión de ambos receptores en todas las condiciones analizadas, y ambos se expresan por toda la célula. **f, l** Control negativo de la inmunofluorescencia. **m-n** Medición de los niveles de mRNA de *Itgb1* (**m**) y *Tie2* (**n**) por RT-qPCR, en unidades arbitrarias (UA). **m** Se observa cómo en presencia de suero los niveles de mRNA de *Itgb1* aumentan desde el primer al octavo DIV, mientras que éstos disminuyen tras la deprivación de suero desde el cuarto DIV. **n** Se observa cómo los niveles de mRNA de *Tie2* disminuyen desde el primer al octavo DIV. Barras de escala: **a-l**= 50µm.

### 3.3. Estudio del papel de ANG1 sobre la longitud neurítica y el crecimiento axónico en cultivos neuronales

Trabajos previos han demostrado que ANG1 puede promover el crecimiento neurítico en células del ganglio de la raíz dorsal (Kosacka et al., 2005; Kosacka et al., 2006; Ward and Lamanna, 2004), en cultivos primarios corticales (Cui et al., 2013) y en células PC12 (Chen et al., 2009). No obstante, existe cierta controversia en cuanto a los receptores a través de los cuales lleva a cabo esta función, puesto que se ha observado que para algunos casos actúa a través de TIE2 (Cui et al., 2013; Kosacka et al., 2005; Kosacka et al., 2006), y en otros a través de ITGB1 (Chen et al., 2009; Ward and Lamanna, 2004). Se ha observado incluso, de forma independiente, que para un mismo tipo celular, ANG1 puede actuar a través de ambos receptores, como es el caso de las células del ganglio de la raíz dorsal (Kosacka et al., 2005; Kosacka et al., 2006; Ward and Lamanna, 2004). Teniendo en cuenta estos trabajos, y que los cultivos primarios hipocámpicos tienen ambos receptores, decidimos analizar el efecto de ANG1 sobre el crecimiento neurítico de estas células (Fig. 26), en concreto en el crecimiento de la neurita más larga, que sería el equivalente al axón *in vivo*.



**Figura 26.** Cuantificación de la longitud de la neurita más larga tras el tratamiento de los cultivos primarios hipocámpicos con (COMP)-ANG1. **a-b, d-e** Microfotografías que muestran la inmunodetección de tubulina acetilada en los cultivos primarios hipocámpicos tratados a 0DIV (**a-b**) y a 1DIV (**d-e**) con PBS+0.02%CHAPS como situación control (**a, d**) y (COMP)-ANG1 (**b, e**). **c, f** Histogramas que representan los resultados obtenidos tras la cuantificación de la longitud de la neurita más larga. A 0DIV (**c**) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el tratado y el no tratado. A 1DIV (**f**), las células tratadas con (COMP)-ANG1 presentan mayor longitud de la neurita más larga que las células de la situación control, y la diferencia es estadísticamente significativa. \*P < 0.05. Barras de escala: **a-b, d-e**= 50µm.

Para ello, tratamos los cultivos con una proteína comercial, (COMP)-ANG1, tanto a 0DIV (Fig. 26a-c), es decir, en el momento en el que se plantan las células, como a 1DIV (Fig. 26d-f). Como tratamiento control utilizamos CHAPS al 0.01% en PBS 0.1M que es la solución en la que viene disuelta la proteína recombinante. Tras la inmunodetección de tubulina acetilada (Fig. 26a-b, d-e), y la medición de la longitud de la neurita más larga, observamos que a 0DIV no existen diferencias significativas en ambas condiciones analizadas (Fig. 26c: Control:  $160.4 \pm 10.65$ ; vs (COMP)-ANG1:  $149.0 \pm 6.234$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.;  $t = 0.92$ ;  $P = 0.3608$ ; confidence interval 95% = -35.96 to 13.26; Unpaired t test with Welch's correction). No obstante, a 1DIV observamos que las células tratadas con (COMP)-ANG1 presentan mayor longitud neurítica respecto al control (Fig. 26f: Control:  $148.1 \pm 9.558$ ; vs (COMP)-ANG1:  $175.2 \pm 9.261$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.;  $t = 2.038$ ;  $P = 0.0449$ ; confidence interval 95% = 0.6291 to 53.62; Unpaired t test with Welch's correction,  $*P < 0.05$ ). Por tanto, ANG1 es capaz de incrementar la longitud de la neurita más larga de los cultivos primarios hipocámpicos tras el tratamiento a 1DIV.

Otra aproximación que llevamos a cabo fue determinar la función de ANG1 sobre el crecimiento axónico, mediante explantes de CA de embriones a E16.5 (Fig. 27). Al igual que con los cultivos primarios, realizamos el tratamiento con (COMP)-ANG1 a 0DIV (Fig. 27b) y 1DIV (Fig. 27c). Los experimentos se pararon a 4DIV y tras la inmunodetección de TUJ-1, cuantificamos la distancia máxima alcanzada por los axones mediante el uso del plug-in *NeuriteJ* del programa *ImageJ*. Tras la medición (Fig. 27d), observamos que los explantes tratados a 0DIV alcanzan mayor distancia que la situación control, aunque la diferencia observada no es estadísticamente significativa. Para los explantes tratados a 1DIV, no observamos diferencias en la distancia máxima alcanzada de los axones respecto a la situación control. No obstante, sí observamos diferencias significativas entre la distancia máxima que alcanzan los axones de los explantes tratados a 0DIV respecto a los tratados a 1DIV, presentando los primeros, valores de mayor magnitud (Control:  $771.4 \pm 33.82$ ; vs (COMP)-ANG1 0DIV:  $977.5 \pm 86.32$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.;  $t = 2.128$ ;  $P = 0.1315$ ; confidence interval 95% = -455.3 to 43.2; Control:  $771.4 \pm 33.82$ ; vs (COMP)-ANG1 1DIV:  $730 \pm 48.13$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.;  $t = 0.4277$ ;  $P > 0.9999$ ; confidence interval 95% = -207.8 to 290.7; (COMP)-ANG1 0DIV:  $977.5 \pm 86.32$ ; vs (COMP)-ANG1 1DIV:  $730 \pm 48.13$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.;  $t = 2.816$ ;  $P = 0.0287$ ; confidence interval 95% = 21.29 to 473.7; ANOVA, Bonferroni *post hoc* test,  $*P < 0.05$ ). En conclusión, los resultados obtenidos muestran que ANG1 es capaz de incrementar la distancia máxima que alcanzan los axones hipocámpicos al ser tratados a 0DIV pero no a 1DIV.

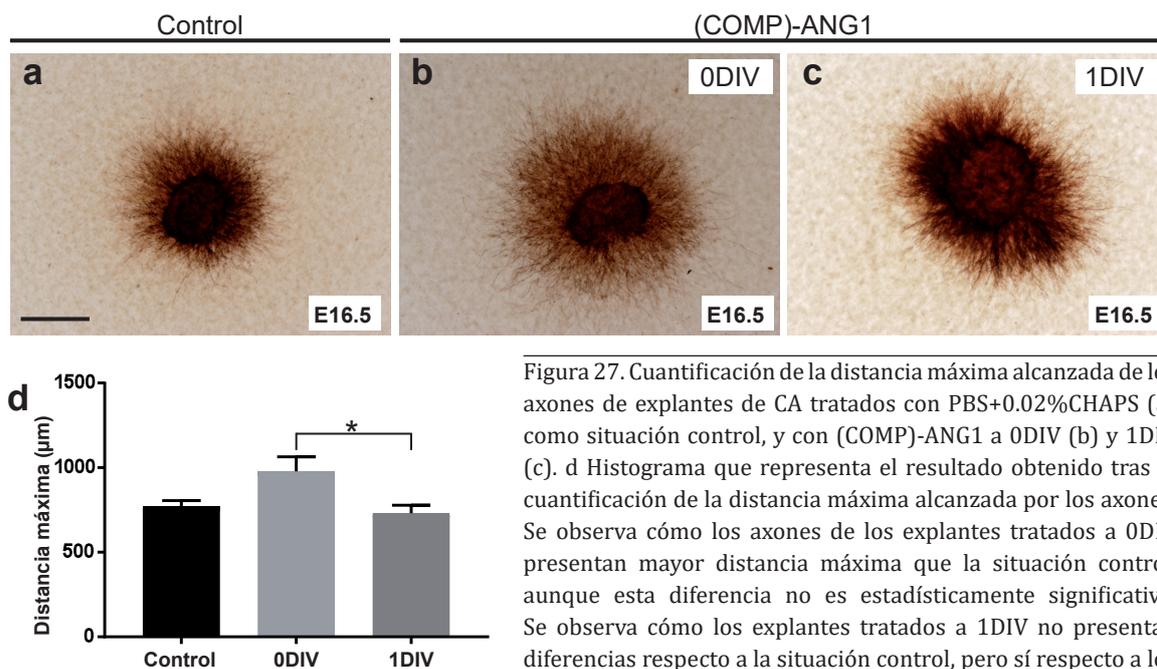


Figura 27. Cuantificación de la distancia máxima alcanzada de los axones de explantes de CA tratados con PBS+0.02%CHAPS (a) como situación control, y con (COMP)-ANG1 a 0DIV (b) y 1DIV (c). d Histograma que representa el resultado obtenido tras la cuantificación de la distancia máxima alcanzada por los axones. Se observa cómo los axones de los explantes tratados a 0DIV presentan mayor distancia máxima que la situación control, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Se observa cómo los explantes tratados a 1DIV no presentan diferencias respecto a la situación control, pero sí respecto a los tratados a 0DIV, los cuales presentan mayor distancia máxima. \* $P < 0.05$ . Barras de escala: a-c= 150µm.



# Discusión



# **Capítulo 1:**

**Papel de Sema3E/PlexinD1 en el desarrollo de las conexiones del hipocampo y en la FH postnatal y adulta**



Las semaforinas son moléculas inicialmente conocidas como moléculas de guía axonal que juegan un papel fundamental en el establecimiento de las conexiones durante el desarrollo. En esta etapa intervienen en el crecimiento de los procesos neuríticos, en la guía axonal, en la innervación de la diana y en la migración neuronal. Llevando a cabo estas funciones promueven la formación de un andamio inicial de conectividad neuronal. No obstante, las funciones de las semaforinas no están delimitadas exclusivamente al desarrollo, puesto que también intervienen en la etapa adulta llevando a cabo funciones que darán lugar al refinamiento de este andamio inicial. Estas funciones en el adulto están enfocadas a esculpir y transformar la red neuronal inmadura en la red neuronal compleja y funcional que observamos en el adulto. Entre estas funciones se encuentran la elaboración dendrítica, la sinaptogénesis, la eliminación de conexiones aberrantes, la remodelación de la conectividad sináptica dependiente de la experiencia, y la muerte celular ((Mann et al., 2007; Pasterkamp and Giger, 2009) para revisión). Por lo tanto, el funcionamiento adecuado del sistema nervioso maduro depende del correcto establecimiento de los circuitos neuronales durante el desarrollo y de la constante remodelación de estos circuitos en el adulto. Es por ello que alteraciones en la expresión o función de las semaforinas dan lugar a perturbaciones en la conectividad neuronal o función sináptica relacionadas con determinados trastornos del desarrollo, psiquiátricos y neurodegenerativos. Asimismo, hay estudios que relacionan estas alteraciones en la expresión o función de las semaforinas con trastornos como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), epilepsia, enfermedad de Alzheimer y problemas en la regeneración del SNC ((Mann et al., 2007; Pasterkamp and Giger, 2009) para revisión).

En algunos de estos trastornos mencionados como son la enfermedad de Alzheimer y la epilepsia, se ve afectada la formación hipocámpica. También puede verse alterada en otros trastornos como son el estrés crónico, la depresión y la esquizofrenia ((Mann et al., 2007; Pasterkamp and Giger, 2009) para revisión). La FH es una estructura que presenta funciones fisiológicas muy importantes. Interviene en diferentes procesos cognitivos como son la memoria declarativa y espacial, el aprendizaje, la inhibición del comportamiento, el comportamiento emocional, la ansiedad y el estrés. Además, es una estructura que presenta un elevado grado de organización, y donde el desarrollo de las conexiones ocurre de forma muy estereotipada. Se conoce muy bien la trayectoria y las regiones dianas de las diferentes vías, así como los tiempos en los que comienzan a establecerse (Super and Soriano, 1994). Es por ello que la FH es una región que ha sido utilizada como modelo de estudio fundamental en Neurociencias, pero sobre todo en la especificación axonal. Durante este proceso de especificación axonal y “wiring” que ocurre en el hipocampo en desarrollo y adulto, es relevante la función que desempeñan las semaforinas

de la clase III y sus receptores. Es por ello que en muchos trastornos en los que se ve alterada la FH, también se observa alteración en la expresión o función de estas semaforinas. Para conocer qué ocurre en una situación patológica en la cual están implicadas alteraciones en la expresión y función de estas semaforinas, es importante conocer en primer lugar cuáles son sus funciones fisiológicas. De esta manera, se podría llegar a identificar posibles dianas terapéuticas para enfermedades que son cada vez más incidentes.

Una de las semaforinas de la clase III que no ha sido del todo explorada en este aspecto, es Sema3E. Este ligando, junto con su receptor PlexinD1, se conoce que intervienen en el desarrollo de otras conexiones cerebrales (Bellon et al., 2010; Chauvet et al., 2007). Además, su expresión y función se ha visto alterada en diversas patologías como en la regeneración axonal tras lesión del SNC ((Mann et al., 2007; Pasterkamp and Verhaagen, 2006) para revisión) y la epilepsia (Yutsudo et al., 2013). Es por ello que la presente tesis se centra en conocer las funciones del binomio Sema3E/PlexinD1 en el desarrollo y la etapa adulta de la FH.

### **1.1. Papel de Sema3E/PlexinD1 en el desarrollo de las conexiones del hipocampo**

La vía perforante o conexión EH conecta la neocorteza con la FH, y constituye la principal vía de entrada de información neocortical al hipocampo (Amaral and Witter, 1989; Burwell et al., 1995; Isaacson and Pribram, 1975; Witter et al., 1989). De forma que el correcto desarrollo de la vía es fundamental para el desempeño adecuado de sus funciones. Respecto a las semaforinas de la clase III, se conoce bastante bien el papel que desempeñan Sema3A y Sema3F, y sus receptores, durante el desarrollo de la conexión EH (Chedotal et al., 1998; Pozas et al., 2001). Estudios previos muestran cómo estas dos semaforinas llevan a cabo la repulsión de los axones hipocámpicos y entorrinales *in vitro* (Chedotal et al., 1998; Pozas et al., 2001; Steup et al., 1999). La repulsión de los axones hipocámpicos por estas semaforinas ocurre desde E14, cuando comienzan a desarrollarse, y desaparece completamente en los estadios postnatales tempranos, cuando alcanzan sus dianas. Por otro lado, Sema3A lleva a cabo la repulsión de los axones entorrinales en los estadios embrionarios (Chedotal et al., 1998; Pozas et al., 2001; Steup et al., 1999), cuando comienza a desarrollarse la conexión EH. En los estadios postnatales, cuando los axones entorrinales ya han alcanzado su diana, Sema3A y Sema3F también llevan a cabo la repulsión de estos axones, pudiendo estar involucradas en los procesos de terminación de la conexión y sinaptogénesis (Pozas et al., 2001). De esta forma, se ha observado que, a nivel postnatal, los animales deficientes de Sema3A presentan alteraciones en la terminación de los axones entorrinales, que inervan de forma anómala el *stratum radiatum* y el hilus (Pozas et al., 2001). Se define que un patrón de expresión decreciente de ambas semaforinas desde la corteza

entorrinal hacia el hipocampo impiden que los axones hipocámpicos crezcan hacia la EC, y los empuje hacia la fimbria, donde la expresión de señales quimioattractivas favorecerían este proceso (Chedotal et al., 1998; Pozas et al., 2001). Por otro lado, señales repulsivas presentes en la neocorteza adyacente a la EC impiden que los axones entorrinales entren en la neocorteza y se dirijan hacia el hipocampo para formar la vía perforante (Chedotal et al., 1998).

Aunque la función de Sema3E haya sido estudiada en este contexto, tal y como se ha comentado previamente, los resultados obtenidos hasta el momento resultan ser algo contradictorios. Se había demostrado que Sema3E solo era capaz de llevar a cabo la repulsión de los axones hipocámpicos a E14.5, sin presentar más efectos en estadios posteriores (Pozas et al., 2001), no obstante, desde el descubrimiento de PlexinD1 como receptor directo de Sema3E (Gu et al., 2005) se han ido descubriendo nuevas funciones del ligando en el desarrollo del telencéfalo. Asimismo, se ha visto que el binomio Sema3E/PlexinD1 lleva a cabo el colapso de los axones corticales a E17.5 (Chauvet et al., 2007), interviene en la migración de las células de CR durante el desarrollo cortical (Bribian et al., 2014) y en el desarrollo de las conexiones subiculares (Bellon et al., 2010; Chauvet et al., 2007) y estriatales (Ding et al., 2012). No obstante, la función del binomio Sema3E/PlexinD1 durante el desarrollo de la conexión EH no ha sido explorada. Para ello, en primer lugar, llevamos a cabo el análisis del patrón de expresión del ligando y su receptor durante el desarrollo de la FH. En segundo lugar, decidimos estudiar las funciones que Sema3E ejerce, *in vitro*, sobre los axones de las diferentes regiones que componen la FH.

#### **1.1.1. Sema3e y Plixnd1 se expresan en la FH en desarrollo**

El patrón de expresión de Sema3E y PlexinD1 ha sido analizado en estudios previos. Brevemente, se conoce que PlexinD1 se expresa en el ratón, en la preplaca y subplaca, en los estadios tempranos de la corticogénesis (a E12.5), así como en las células de CR del hipocampo. Posteriormente, se expresa en la placa cortical presentando un gradiente de expresión lateral-medial (E14.5-E16.5), estando presente sobretodo en las regiones ventrolaterales de la corteza. También se ha detectado que se expresa en el estriado (desde E14.5) y en la capa piramidal del subiculum (a E17.5). Desde E18.5 hasta la etapa adulta se expresa en las capas II/III y Va de la neocorteza (Bribian et al., 2014; Chauvet et al., 2007; Deck et al., 2013; Molyneaux et al., 2009; Watakabe et al., 2006). Además, se ha observado que Sema3E y PlexinD1 presentan un patrón de expresión complementario, puesto que Sema3E se expresa desde muy temprano (E12.5) en la zona ventricular/subventricular de la neocorteza, así como en el hipocampo (Bribian et al., 2014), y en las capas corticales más profundas en el adulto (Watakabe et al., 2006).

No obstante, decidimos analizar el patrón de expresión de ambas proteínas a distintos estadios embrionarios claves en el desarrollo de las conexiones del hipocampo. Tras llevar a cabo este análisis observamos que ambas proteínas se expresan en todos los estadios analizados, y cómo el patrón de expresión concuerda con lo descrito previamente (Bribian et al., 2014; Chauvet et al., 2007; Deck et al., 2013). Además, analizamos el patrón de expresión de las semaforinas Sema3A y Sema3F y de sus receptores Np1 y Np2 cuyas funciones en el desarrollo de las conexiones del hipocampo son más conocidas, y con el objetivo de integrar la información que obtuviésemos en la ya existente. También observamos que éstas se expresan en la FH en todos los estadios analizados, tal y como se había descrito previamente (Chedotal et al., 1998). Detectamos cómo el patrón de expresión que presentan las proteínas analizadas, a lo largo del desarrollo, es muy dinámico y variable, ya que se expresan y dejan de expresar a medida que se van desarrollando y estableciendo las diferentes conexiones. Por otra parte, se conoce que el binomio Sema3E/PlexinD1 también es capaz de actuar a través de Np1-VEGFR2 para dar lugar a procesos de quimioatracción en los axones subículo-mamilares (Bellon et al., 2010). Es por ello que también analizamos el patrón de expresión de VEGFR2, mediante hibridación *in situ*, respecto al cual solo observamos expresión en los vasos sanguíneos (Fig. 28d).

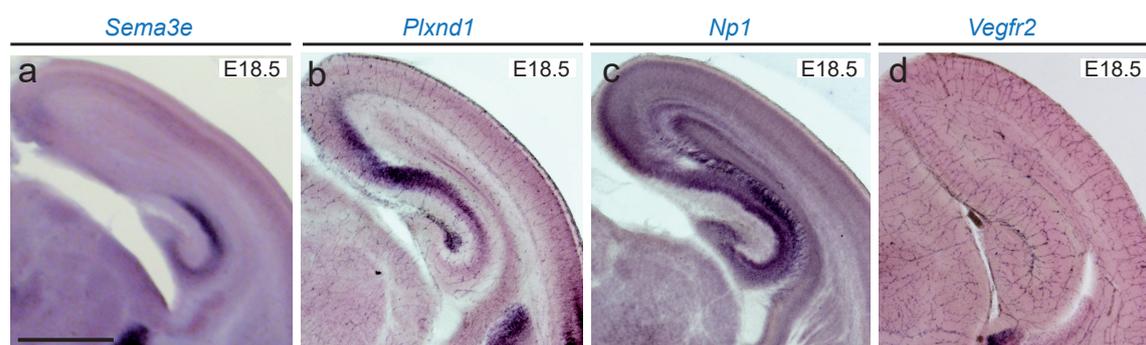
Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos analizar si Sema3E presenta algún efecto sobre los axones de aquellas regiones donde se expresa PlexinD1. Para ello llevamos a cabo los experimentos de co-cultivos.

### **1.1.2. Sema3E presenta actividad quimiorrepulsiva *in vitro***

Llevando a cabo los experimentos de co-cultivos observamos cómo Sema3E lleva a cabo la quimiorrepulsión de los axones hipocámpicos, subiculares, y de las cortezas entorrinal y ventrolateral a E14.5 y E16.5. Si analizamos el patrón de expresión de *Plxd1*, podemos observar cómo ésta se expresa en las áreas mencionadas en ambos estadios, a excepción del hipocampo a E14.5. Como se ha comentado previamente (apartado *Semaforinas* de la introducción), se ha descrito que la unión de Sema3E a PlexinD1 da lugar a una respuesta de quimiorrepulsión en los axones estriatonigrales y corticofugales (Chauvet et al., 2007), mientras que la unión de Sema3E al complejo receptor formado por PlexinD1, Np1 y VEGFR2 da lugar a una respuesta de quimioatracción en los axones subículo-mamilares (Bellon et al., 2010). Puesto que en los presentes resultados hemos observado que Sema3E da lugar a respuestas de quimiorrepulsión y no de quimioatracción, parece ser que el ligando esté actuando a través de PlexinD1 únicamente. Además, esta quimiorrepulsión disminuye a E14.5 (del 93.75% al 54.5%) en los axones entorrinales procedentes del mutante que carece de PlexinD1, corroborando que

Sema3E posiblemente esté actuando directamente sobre dicho receptor.

Como se ha comentado previamente, a E14.5 vemos quimiorrepulsión de los axones hipocámpicos, donde no se expresa *Plxnd1*. Esta respuesta puede deberse a que los experimentos de co-cultivos permanecen *in vitro* durante varios días, momento en el cual ya se detecta expresión de *Plxnd1* en el hipocampo. No obstante, Sema3E también podría estar actuando a través de otro receptor cuya interacción se desconozca hasta el momento. Asimismo, se ha determinado que Sema3E en altas concentraciones también puede unirse a Np1 y Np2 *in vitro* (Watakabe et al., 2006). Para conocer si Sema3E está actuando a través de Np1 o Np2 en este contexto, se podrían realizar experimentos de co-cultivos donde se bloquee la función de Np1 y Np2 mediante el uso de anticuerpos, como se ha realizado en otros trabajos (Chedotal et al., 1998; Giger et al., 1998; He and Tessier-Lavigne, 1997; Pozas et al., 2001). También se podrían realizar experimentos de co-cultivos utilizando explantes procedentes de animales que carecen de Np1 o Np2. Por otro lado, al contrario de lo que ocurre en Bellon et al., 2010, donde observan una acción quimioattractiva de Sema3E sobre los axones subiculares a E17.5, en el presente estudio hemos observado una acción quimiorrepulsiva, no obstante, esta acción quimiorrepulsiva disminuye desde E14.5 a E16.5 del 75% al 60%, y no ha sido analizada a E17.5, momento en el cual se ha descrito esa quimioatracción. Sin embargo, esa quimioatracción mediada por Sema3E es dependiente de VEGFR2, y en el presente trabajo solo hemos observado expresión de VEGFR2 en los vasos sanguíneos y no en el parénquima neural (Fig. 28d).



**Figura 28.** Microfotografías que ilustran el patrón de expresión de *Sema3e* (a), *Plxnd1* (b), *Np1*(c) y *Vegfr2* (d). Se observa expresión de *Vegfr2* exclusivamente en los vasos sanguíneos. Barras de escala: a-d= 1mm.

Por otro lado, puesto que Sema4A es capaz de llevar a cabo un proceso de quimiorrepulsión en neuronas hipocámpicas y corticales *in vitro* (Ishii et al., 2010; Yukawa et al., 2005), y que además es capaz de unirse a PlexinD1 en el sistema vascular (Gay et al., 2011), no se descarta que también pueda estar actuando durante el desarrollo de las conexiones de la FH. Un estudio detallado sobre el patrón de expresión de dicha proteína así como de sus posibles funciones sobre las diferentes regiones de la FH, *in vitro*, ayudarían a clarificar este hecho.

En cuanto a Sema3A, observamos que ésta presenta cambios en su capacidad quimiorrepulsiva desde E14.5 a E16.5. Asimismo, observamos que a E14.5 lleva a cabo la quimiorrepulsión de los axones hipocámpicos, tal y como se había descrito previamente (Pozas et al., 2001), y cómo esta quimiorrepulsión disminuye a E16.5. Si observamos el patrón de expresión de Np1, vemos que ésta se expresa en el hipocampo tanto a E14.5 como a E16.5, por lo que, en cierta medida, Sema3A podría estar actuando a través de dicho receptor. Por otro lado, en el caso de los explantes de *subiculum* y corteza entorrinal, observamos como Sema3A pasa de no ejercer ninguna función a E14.5, a presentar un aumento en la capacidad quimiorrepulsiva sobre los axones de estas regiones. Observando de nuevo el patrón de expresión de Np1, podemos ver como ésta se expresa en *subiculum* y corteza entorrinal en ambos estadios. No obstante, estos cambios observados en la capacidad quimiorrepulsiva de Sema3A a lo largo del desarrollo, también podrían deberse a cambios en la combinación de Np1 con diferentes Plexinas (Rohm et al., 2000; Takahashi et al., 1999; Tamagnone et al., 1999).

Respecto a Sema3F, también observamos que ésta presenta cambios en su capacidad quimiorrepulsiva desde E14.5 a E16.5. Asimismo, observamos como a E14.5 lleva a cabo la quimiorrepulsión de los axones hipocámpicos y de la corteza ventrolateral, y cómo esta quimiorrepulsión aumenta a E16.5. Por otro lado, observamos como a E14.5, Sema3F no ejerce ningún efecto sobre los axones subiculares y entorrinales, y como a E16.5 ésta ejerce un proceso de quimiorrepulsión sobre estos axones. Estos efectos correlacionan con el patrón de expresión de Np2, cuyos niveles de expresión se ven incrementados desde E14.5 a E16.5 en las regiones mencionadas (hipocampo, corteza ventrolateral, *subiculum* y corteza entorrinal). No obstante, al igual que ocurre con Sema3A, los cambios observados en la capacidad repulsiva de Sema3F, a lo largo del desarrollo, podrían deberse a cambios en la combinación de Np2 con diferentes Plexinas.

Cabe destacar la ausencia de expresión de las tres semaforinas analizadas en la región subicular. Puesto que la conexión EH atraviesa dicha región a medida que transcurre hacia el hipocampo, es considerable pensar que estos bajos niveles de expresión en las semaforinas 3A, 3F y 3E, constituyen un pasillo axonal que ayuda al correcto establecimiento de la vía, tal y como ocurre en otras conexiones como la talamocortical (Lopez-Bendito et al., 2006). En la conexión talamocortical, la migración tangencial temprana de neuronas GABAérgicas desde la eminencia ganglionar lateral hasta la medial, es esencial para la formación de un pasillo permisivo por el cual los axones talamocorticales pueden extenderse por el tálamo. Durante este proceso, las células que forman este pasillo, también denominadas *corridor cells*, secretan Neuroregulina-1, que actúa guiando a los axones talamocorticales hacia el tálamo (Lopez-

Bendito et al., 2006).

### **1.1.3. El binomio Sema3E/PlexinD1 participa en la distribución final de los axones de la vía EH**

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que Sema3E es capaz de actuar sobre los axones entorrinales *in vitro*, en los estadios en los que se desarrolla la vía EH. Además, parece ser que ejerce su función a través de PlexinD1. Es por ello por lo que decidimos analizar el desarrollo de la vía EH en ausencia tanto del ligando como del receptor.

Tras realizar los experimentos de trazado de la conexión EH observamos como el binomio Sema3E/PlexinD1 no es imprescindible para el establecimiento de la vía, no obstante, en ausencia tanto del ligando como del receptor, ocurren alteraciones en la distribución final de los axones, tal y como se ha descrito que ocurre en el animal *Sema3a<sup>0/0</sup>* (Pozas et al., 2001). Sin embargo, mediante el trazado con BDA, estos defectos no se observan en el hipocampo adulto, por lo que probablemente se resuelven durante la etapa de refinamiento de sinapsis que ocurre a nivel postnatal, tal y como se piensa que ocurre para las fibras corticofugales y estriatonigrales en el animal *Sema3e<sup>0/0</sup>* (Bellon et al., 2010; Chauvet et al., 2007). En el caso de estas fibras, en el animal *Sema3e<sup>0/0</sup>* adulto no se observan las alteraciones detectadas durante el desarrollo, donde los axones invaden regiones que normalmente no invaden, como son el núcleo reticular talámico y el cerebro medio dorsal. Una razón por la cual los axones entorrinales ectópicos no se observen en el adulto, podría ser porque durante el desarrollo de la conexión EH, los axones entorrinales establecen contactos sinápticos transitorios con las células de CR (Ceranik et al., 2000; Super et al., 1998; Super and Soriano, 1994), hasta que las dendritas de las células granulares hayan madurado. De forma que los axones ectópicos que observamos en ausencia de Sema3E, durante el desarrollo de la vía, puede que no lleguen a establecer estos contactos transitorios y que por tanto terminen sufriendo un proceso de retracción o reorganización.

### **1.2 Papel de Sema3E/PlexinD1 en el hipocampo postnatal y adulto**

Puesto que el desarrollo de la FH continúa durante las etapas postnatales, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, decidimos analizar las posibles funciones del binomio Sema3E/PlexinD1 en el hipocampo postnatal y adulto. En primer lugar, llevamos a cabo el estudio citoarquitectónico del hipocampo, y observamos grandes alteraciones a nivel del giro dentado, diana de los axones entorrinales. Tras analizar la citoarquitectura del hipocampo mediante diversos marcadores neuronales, pudimos observar que en ausencia de Sema3E, o de PlexinD1, los animales presentan alteraciones a nivel del giro dentado desde la

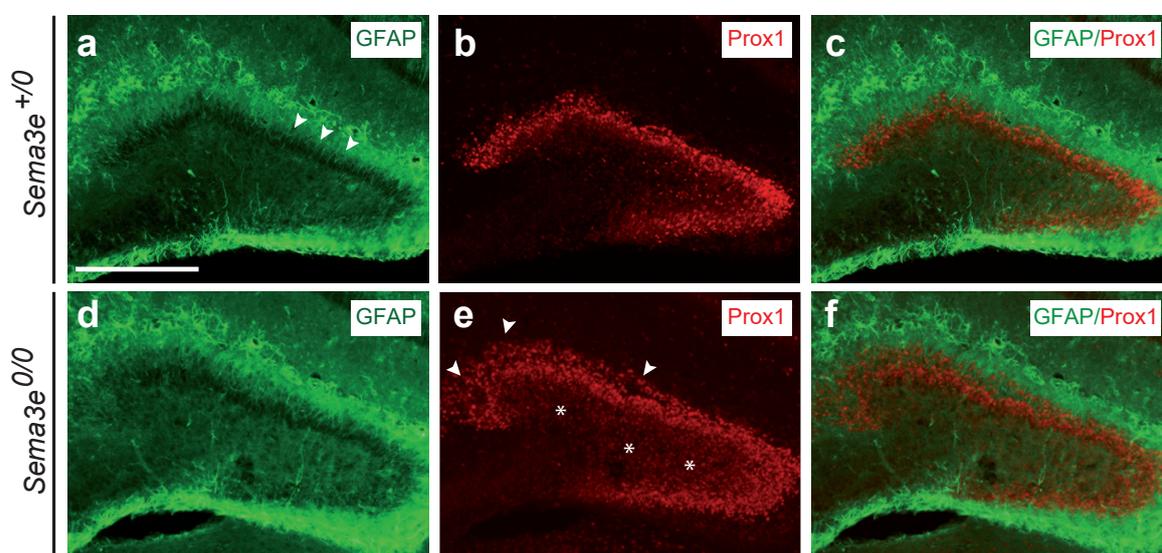
etapa postnatal hasta la adulta, siendo estas alteraciones más evidentes en ausencia del ligando que del receptor. Detectamos la presencia de ondulaciones en la hoja suprapiramidal del DG y células granulares ectópicas invadiendo la capa molecular. Asimismo, también observamos alteraciones en la distribución de algunas de las conexiones, como las fibras musgosas, las cuales se encuentran ectópicas, invadiendo la capa granular y molecular interna del DG; y las fibras comisurales, que se presentan difusas en la capa molecular interna.

### **1.2.1 Posible función del binomio Sema3E/PlexinD1 en el proceso de migración de las células granulares**

Las alteraciones observadas en el DG podrían deberse a un problema en la migración de las células granulares. Durante el desarrollo del DG se conoce que las meninges y las células de CR secretan CXCL12 que atrae a las células granulares que se encuentran migrando hacia el incipiente DG (Bagri and Tessier-Lavigne, 2002). Puesto que el binomio Sema3E/PlexinD1 lleva a cabo la disminución de la motilidad y velocidad de la migración de las células de CR durante la corticogénesis, modulando diferentes aspectos de la señalización mediada por CXCL12/CXCR4 (Bribian et al., 2014), es posible que también pudiera estar ejerciendo una función parecida en las células granulares. De forma que en ausencia de Sema3E, se podría dar lugar a un aumento en la capacidad migratoria de estas células y que por tanto acaben situándose de forma errónea.

Por otra parte, las células de CR que se encuentran en la zona marginal (lo que será el *stratum lacunosum moleculare*) y la capa molecular externa del giro dentado, y la proteína que secretan, Reelina, son imprescindibles para el correcto desarrollo del giro. La Reelina es necesaria para el desarrollo de las células de glía radial postnatal, las cuales son los andamios celulares que permiten la migración de las células granulares. En ausencia de dicha proteína, de sus receptores ApoER2 y VLDLR, o de componentes de su señalización intracelular, como la proteína adaptadora Dab, estos andamios no se forman adecuadamente, lo que da lugar a una desorganización de la capa granular (Brunner et al., 2013; Forster et al., 2002; Gebhardt et al., 2002). De forma que, como se ha comentado anteriormente, el binomio Sema3E/PlexinD1 podría estar regulando la migración de las células de CR también en el hipocampo, y una alteración en la migración de estas células podría dar lugar a un desarrollo anormal de las células de glía radial que conduciría a alteraciones en el posicionamiento de las células granulares. Para profundizar en este aspecto, analizamos la distribución de la glía radial en el estadio postnatal temprano, cuando se está formando el DG. Para ello, llevamos a cabo la inmunodetección de GFAP, marcador de glía radial, junto con Prox1, marcador de neurona granular (Fig. 29). Observamos que en el animal *Sema3e<sup>0/0</sup>*, a P5, las células de glía radial se

establecen de forma irregular (Fig. 29d) en comparación con sus hermanos control, en los cuales éstas células presentan sus procesos orientados de forma radial y dispuestos de forma alineada y ordenada en la capa granular en formación (cabezas de flecha en Fig. 29a). Además, al igual que habíamos observado previamente con otros marcadores, observamos cómo la capa granular se forma de manera irregular en ausencia de Sema3E (cabezas de flecha en Fig. 29e). También observamos un mayor número de células Prox1+ fuera de la capa granular, en lo que será el hilus, en el animal *Sema3e<sup>0/0</sup>* (asteriscos en Fig. 29e) en comparación con sus hermanos control (Fig. 29b). No obstante, un estudio más detallado de la situación de la glía radial y de su disposición tridimensional en el hipocampo del animal *Sema3e<sup>0/0</sup>* ayudaría a esclarecer estas observaciones.



**Figura 29.** Microfotografías que ilustran el marcaje de GFAP (verde) y Prox1 (rojo) en los animales *Sema3e<sup>+/0</sup>* (a-c) y *Sema3e<sup>0/0</sup>* (d-f). Se observa cómo en ausencia de Sema3E, las células de glía radial se establecen de forma irregular, (d) y la presencia de células células granulares ectópicas (flechas y asteriscos en e). Barras de escala: a-f= 500μm.

Por otro lado, la glía radial expresa receptores de integrina de la clase  $\beta 1$ , a los cuales puede unirse Reelina. Estos receptores, al igual que la Reelina, regulan el desarrollo de las células de glía radial, y ambas proteínas se encargan de regular el anclaje del proceso basal de estas células a la membrana basal. Es por ello que los animales que carecen de estas integrinas también presentan alteraciones en la formación de los andamios celulares de glía radial tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo. En este último, la ausencia de estos receptores da lugar al mal posicionamiento de las células granulares, presentando defectos parecidos a los detectados en ausencia de Reelina, aunque en menor medida (Forster et al., 2002). Asimismo, los animales que carecen de estas integrinas, así como de los componentes intracelulares presentes en la vía de señalización de estos receptores como son el FAK o el ILK, presentan una desorganización de la zona marginal que conduce a la fusión de los hemisferios corticales,

a alteraciones en la laminación cortical y a alteraciones en la morfología del DG parecidos al obtenido en los resultados de la presente tesis (Beggs et al., 2003; Forster et al., 2002; Graus-Porta et al., 2001; Niewmierzycka et al., 2005). En efecto, se ha descrito que, en otros tipos celulares, la vía de señalización mediada por Sema3E/PlexinD1 es capaz de modular la adhesión de las células a la matriz extracelular a través de integrinas. De forma que cuando PlexinD1 se encuentra inactiva, ésta permite la activación de las integrinas  $\beta 1$  que implica la adhesión a la matriz extracelular, así como la activación de cascadas de señalización que conducen a la organización del citoesqueleto y a otros eventos como la supervivencia, la proliferación y la migración celular. Cuando Sema3E se une a PlexinD1, ocurre la inactivación de las integrinas  $\beta 1$ , lo que conduce a la pérdida de la adhesión celular y a la desorganización del citoesqueleto dando lugar a los procesos de retracción típicos de la quimiorrepulsión (Choi et al., 2014; Gay et al., 2011). De forma que no podemos obviar que una interacción de este tipo pueda estar implicada en las alteraciones observadas en el DG en ausencia de Sema3E.

Cabe destacar que los animales adultos que carecen de Reelina, así como de sus receptores ApoER2 y VLDLR también presentan alteraciones en la distribución laminar de los axones comisurales/asociacionales. Se piensa que estas alteraciones se deben a la distribución anormal de las células granulares, puesto que la alteración en la distribución de la conexión es más evidente en los animales carentes de Reelina, que a su vez son los que mayor desorganización presentan respecto a las células granulares. La distribución de las células granulares determinarían, por tanto, la distribución laminar de la conexión. No obstante, estos animales no presentan alteraciones en la conexión EH, puesto que el correcto desarrollo de dicha conexión depende de las células de CR presentes de forma transitoria en la capa molecular externa (Del Rio et al., 1997; Gebhardt et al., 2002). Estos datos podrían explicar por qué vemos resultados parecidos respecto a las conexiones comisural/asociacional y EH, en ausencia sobre todo de Sema3E y también de PlexinD1.

### **1.2.2. Implicación del binomio Sema3E/PlexinD1 en la regulación de la neurogénesis adulta**

Por otro lado, puesto que las alteraciones observadas en la citoarquitectura del DG se mantienen en el adulto, nos hicieron pensar que, en ausencia de la señalización mediada por Sema3E/PlexinD1 también podría haber alteraciones a nivel de la neurogénesis adulta, así que decidimos realizar un ensayo de BrdU para ver si estaba alterada. Tras llevar a cabo el análisis del proceso de neurogénesis en el animal adulto *Sema3e<sup>0/0</sup>*, observamos un aumento en la proliferación de las células granulares del DG. Observamos como estas células proliferan formando columnas sobre todo en las zonas de la hoja suprapiramidal donde ésta se ve más afectada. Además, en

estos animales detectamos, mediante microscopía electrónica, un mayor número de nichos con células inmaduras, que se presentan alejadas de la zona subgranular, embebidas en la capa granular.

Mediante la inmunotinción de PlexinD1 observamos que ésta se expresa por las células GFAP+, que son las células de tipo1. Además, observamos que las células granulares inmaduras, que son DCX+ no expresan PlexinD1. Por lo que *Sema3E* podría estar regulando el estado de quiescencia de las células de tipo1, actuando a través de PlexinD1. Puesto que se conoce que altos niveles de la señalización mediada por *Sema3E*/PlexinD1 da lugar a una disminución en la proliferación de las células malignas (Casazza et al., 2012; Chen et al., 2015; Sabag et al., 2012) y no malignas (Movassagh et al., 2014), la ausencia de *Sema3E* podría dar lugar a un descontrol en la proliferación a nivel de la SGZ. No obstante, los resultados obtenidos por microscopía electrónica sugerían que los animales *Sema3e<sup>0/0</sup>* presentan un menor número de interneuronas GABAérgicas en la SGZ. El neurotransmisor GABA es uno de los factores que se conoce que intervienen en el mantenimiento de la quiescencia de las células de tipo 1, al igual que otros factores, como las vías de señalización de BMP y Notch (ver apartado 3.5.1 de Introducción). Puesto que son las interneuronas de Parvalbúmina (PV) las que, mediante la liberación de GABA, regulan el estado de quiescencia de las células de tipo1 (Song et al., 2012), decidimos cuantificar las células PV+ (Fig. 30a) presentes en la capa granular suprapiramidal del DG de estos animales, donde las alteraciones son más evidentes (zona roja del esquema en Fig. 30). No obstante, no observamos diferencias en el número de células PV+, entre los genotipos analizados (*Sema3e<sup>+/-</sup>* y *Sema3e<sup>0/0</sup>*) (Fig. 30a: *Sema3e<sup>+/-</sup>*:  $7.882 \pm 0.68$ ; vs *Sema3e<sup>0/0</sup>*:  $9.132 \pm 0.4637$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.;  $t = 1.518$ ;  $P = 0.1391$ ; confidence interval 95% = -0.4285 to 2.927; Unpaired t-test), por lo no podemos relacionar las anomalías observadas en el proceso de neurogénesis en el animal adulto *Sema3e<sup>0/0</sup>* con una deficiencia en interneuronas PV+.

Aunque los resultados obtenidos tras la cuantificación de las células PV+ no indicaron alteraciones en la tasa de diferenciación de los progenitores neurales, decidimos analizarlo. Para ello, llevamos a cabo la inmunodetección de DCX en los animales que habían sido tratados con BrdU, y tras la cuantificación de las células BrdU+DCX+ presentes en la capa granular suprapiramidal del DG, no observamos diferencias entre los diferentes genotipos analizados (Fig.30b) (*Sema3e<sup>+/+</sup>*:  $85.19 \pm 3.507$ ; vs *Sema3e<sup>+/-</sup>*:  $81.93 \pm 2.217$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.;  $t = 0.9253$ ;  $P > 0.9999$ ; confidence interval 95% = -5.263 to 11.78; *Sema3e<sup>+/+</sup>*:  $85.19 \pm 3.507$ ; vs *Sema3e<sup>0/0</sup>*:  $84.87 \pm 1.49$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.;  $t = 0.09256$ ;  $P > 0.9999$ ; confidence interval 95% = -7.974 to 8.608; *Sema3e<sup>+/-</sup>*:  $81.93 \pm 2.217$ ; Mean  $\pm$  S.E.M.; vs *Sema3e<sup>0/0</sup>*:  $84.87 \pm 1.49$ ;  $t = 1.066$ ;  $P = 0.8639$ ; confidence interval 95% = -9.614 to 3.734; ANOVA, Bonferroni *post hoc* test). Estos resultados

podrían indicar que el binomio *Sema3E*/*PlexinD1* podría estar implicado en la regulación de la proliferación de las células de tipo 1, pero no en la tasa de diferenciación a células de tipo 2b, cuando comienza a expresarse *DCX*.

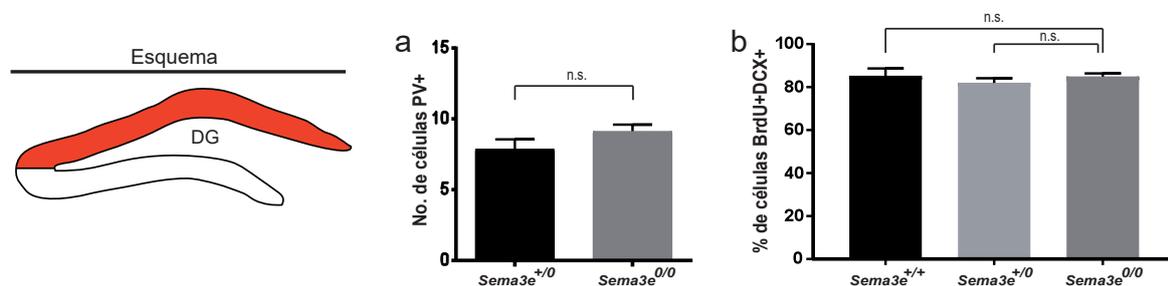


Figura 30. Histogramas que respresentan la cuantificación de las células PV+ (a) y BrdU+DCX+ (b) en los animales *Sema3e*<sup>+/+</sup> y *Sema3e*<sup>+/-</sup> y *Sema3e*<sup>0/0</sup>. Esquema de la región cuantificada (rojo) de la capa granular del DG. No se muestran diferencias significativas entre los genotipos analizados. Abreviaturas: DG, giro dentado.

### 1.2.3. Alteración de la excitabilidad del hipocampo en ausencia de *Sema3E*

El aumento en la proliferación de las células granulares en el adulto, así como la distribución ectópica de estas, y la presencia de fibras musgosas aberrantes invadiendo las capas granular y molecular del DG se ha descrito en diferentes modelos de epilepsia (Hamani et al., 2005; Mitchell et al., 1996; Parent, 2007). Es por ello que decidimos llevar a cabo el análisis de la actividad eléctrica espontánea de los animales *Sema3e*<sup>0/0</sup>.

Tras las convulsiones epilépticas se observan reorganizaciones sinápticas, y para ello se lleva a cabo una modulación en los niveles de expresión de las moléculas de guía axonal como son las semaforinas de la clase III (Barnes et al., 2003; Sahay et al., 2005; Yang et al., 2005) y algunos de sus receptores como las neuropilinas (De Winter et al., 2002; Gant et al., 2009; Shimakawa et al., 2002). En efecto, en un modelo de epilepsia, se ha observado una correlación entre la aparición de fibras musgosas aberrantes en el DG con una disminución en la expresión de *Sema3F* (Cai et al., 2016). Además, se ha descrito que el animal *Sema3f*<sup>0/0</sup> presenta mayor susceptibilidad a padecer convulsiones (Sahay et al., 2005). Por otro lado, en el animal *fosb*<sup>0/0</sup>, que presenta alteraciones en la neurogénesis hipocámpica adulta y epilepsia espontánea con comportamiento depresivo, se ha observado una disminución en la expresión de *Sema3E* en el hipocampo tras el tratamiento con ácido kaínico (Yutsudo et al., 2013). Teniendo en cuenta estos datos, junto con las alteraciones citoarquitectónicas que presenta, el animal *Sema3E*<sup>0/0</sup> podría presentar características epileptogénicas.

No obstante, tras llevar a cabo el análisis de la actividad eléctrica espontánea de los animales *Sema3e*<sup>0/0</sup>, no observamos actividad epiléptica en comparación con sus hermanos control. No

obstante, sí detectamos un aumento en la excitabilidad en el DG y CA1, y en algunos componentes de las altas frecuencias, alrededor del rango gamma (20-55Hz) en el DG. Un aumento en la excitabilidad del DG también se ha observado en ratas, tras la inducción del *status epilepticus*. Curiosamente, este modelo presenta la aparición de giros en el DG tras la lesión, y las nuevas neuronas granulares que se van generando, se van acumulando en la base de esos giros. Se deduce que esa acumulación de neuronas son las responsables del aumento de excitabilidad (Magagna-Poveda et al., 2017). En el animal *Sema3e<sup>0/0</sup>* observamos la aparición de columnas de células BrdU+ en la zona de la hoja suprapiramidal donde las ondulaciones de ésta son más evidentes, por lo que podría ser que el aumento de excitabilidad en este animal también se debiera a esa acumulación de neuronas.

La actividad epiléptica aguda o crónica da lugar a un aumento en la proliferación de las células granulares en el adulto. Puesto que el animal *Sema3e<sup>0/0</sup>* no presenta actividad epiléptica espontánea, el aumento en la proliferación de las células granulares podría deberse a una modulación directa de Sema3E sobre las células de tipo 1 que expresan PlexinD1, tal y como se ha comentado previamente. En ausencia de Sema3E, tiene lugar una proliferación aberrante que genera neuronas granulares que podrían contribuir al crecimiento anormal de las fibras musgosas, tal y como ocurre en el modelo de ratón de *estatus* epiléptico inducido por pilocarpina (Parent et al., 1997). Este crecimiento anómalo de las fibras musgosas, junto con la acumulación de las neuronas granulares formando columnas podrían ser las responsables de la hiperexcitabilidad del DG. No obstante, no se descarta una modulación directa del binomio Sema3E/PlexinD1 sobre el desarrollo de las fibras musgosas puesto que se conoce que otras semaforinas de la clase III están implicadas en este proceso (Chen et al., 2000; Cheng et al., 2001; Sahay et al., 2003). Además, Sema3E y PlexinD1 podrían estar modulando la formación de sinapsis en el hipocampo, puesto que se conoce que bajos niveles de PlexinD1 disminuye la densidad sináptica en neuronas neocorticales (Wang et al., 2015a), pero aumenta el número de sinapsis de la vía talamoestriatal en el estriado (Ding et al., 2012). Esta posible función podría explicar por qué vemos un aumento de las fibras zinc-positivas y de botones presinápticos sinaptoporina-positivos en la capa granular del DG en ausencia de Sema3E.

Por otro lado, las diferencias en las fibras musgosas que existe entre diferentes cepas de ratones están relacionadas con la obtención de distintos resultados en las tareas de memoria espacial y no espacial (Crusio et al., 1993; Schwegler et al., 1990). El animal *Sema3e<sup>0/0</sup>* presenta niveles bajos de ansiedad y alteraciones moderadas en la memoria de trabajo espacial (Chauvet et al., 2007). Por lo que estas alteraciones de memoria podrían deberse a la distribución aberrante de las fibras musgosas.

Cabe destacar que todas las alteraciones observadas, tanto en el desarrollo como a nivel postnatal y adulto, son más evidentes en ausencia de Sema3E que de PlexinD1, por lo que, como se ha comentado previamente, no se descarta que Sema3E pueda estar actuando a través de otro receptor.

## **Capítulo 2:**

**Papel de ANG1 y sus receptores durante el desarrollo del hipocampo**



Las funciones que ANG1 desempeña durante la angiogénesis han sido ampliamente descritas. En este aspecto, ANG1 es responsable de la maduración, estabilización y quiescencia de los vasos sanguíneos (Yuan et al., 2009). Estas funciones las lleva a cabo, mayoritariamente, a través de los receptores Tie. No obstante, se conoce que ANG1 también es capaz de unirse y señalar a través de receptores de integrinas. Actualmente existen, cada vez más, evidencias sobre las funciones que ANG1 desempeña en el sistema nervioso. De esta forma, se conoce que presenta un efecto neuroprotector, y que promueve el crecimiento de neuritas, la proliferación y la diferenciación neuronal (Bai et al., 2009; Cui et al., 2013; Kosacka et al., 2005; Rosa et al., 2010; Valable et al., 2003). Estas funciones se ha visto que las lleva a cabo a través del receptor TIE2, o de receptores de integrinas  $\beta$ 1. No obstante, estos resultados se han obtenido a partir de trabajos realizados *in vitro*, y existe cierta controversia en cuanto a los receptores, puesto que la detección de TIE2 en el parénquima neural *in vivo* ha resultado difícil. Por otro lado, estos resultados se han obtenido a partir de diferentes modelos celulares, como son cultivos primarios corticales, cultivos primarios de ganglios de la raíz dorsal e incluso líneas celulares como PC12. Sin embargo, la función de ANG1 en el hipocampo no ha sido analizada. Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de *Ang1* en el cerebro adulto da lugar a alteraciones en la distribución del árbol dendrítico de las neuronas granulares del DG, y de las células piramidales de la CA1 (Ward et al., 2005), consideramos interesante analizar sus posibles funciones en el hipocampo. Puesto que los procesos angiogénicos son imprescindibles para el desarrollo del sistema vascular, y puesto que existe cierta sinergia entre el desarrollo del sistema vascular y nervioso, nos hemos querido centrar en las posibles funciones que ANG1 pueda desempeñar durante el desarrollo del hipocampo. Para ello, en primer lugar, llevamos a cabo el análisis del patrón de expresión tanto de *Ang1*, como de *Tie2* e *Itgb1*, en el hipocampo en desarrollo. En segundo lugar, hemos querido analizar las posibles funciones de ANG1 sobre el crecimiento neurítico de neuronas hipocámpicas.

### **2.1. *Ang1* y sus receptores se expresan en el hipocampo en desarrollo**

La expresión de *Ang1* y sus receptores, *Tie2* e *Itgb1*, ha sido analizada en el cerebro adulto de ratón (Ward et al., 2005). En el caso de ANG1 se ha observado que se expresa en células gliales, entre las cuales se distinguen las que rodean a las neuronas hipocámpicas, las que están presentes en la sustancia blanca, y las que se asocian a los vasos sanguíneos. Por otro lado, también se ha detectado la presencia del mRNA de *Ang1* en neuronas (Audero et al., 2001; Stratmann et al., 1998), células gliales y de Purkinje (Acker et al., 2001; Beck et al., 2000; Hashimoto et al., 2001), y células endoteliales presentes en el cerebro (Audero et al., 2001;

Nourhaghi et al., 2003; Stratmann et al., 1998). Aunque *in vitro* sí se ha detectado expresión de *Tie2* en neuronas (Valable et al., 2003), *in vivo*, se ha observado que solo se expresa en las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales (Ward et al., 2005). Al contrario de lo que ocurre con *Tie2*, se ha observado expresión de *Itgb1* en neuronas de la corteza motora y del hipocampo, y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos presentes en el cerebro (Ward et al., 2005). No obstante, el análisis del patrón de expresión de estas proteínas no ha sido analizada, *in vivo*, durante el desarrollo del cerebro. Es por ello que, en primer lugar, llevamos a cabo el análisis del patrón de expresión de *Ang1* y sus receptores *Tie2* e *Itgb1*, mediante hibridación *in situ*. El análisis lo llevamos a cabo en cerebros de animales *wild-type* a 16.5, momento en el cual ocurre la mayoría de procesos de guía axonal y crecimiento neurítico en el hipocampo.

Respecto a *Ang1*, observamos que ésta se expresa en la zona marginal del hipocampo, en la capa I cortical y en la fimbria. La expresión de *Ang1* presente en la zona marginal del hipocampo y en la capa I cortical parece proceder de las células de CR, no obstante, cabría llevar a cabo un estudio más detallado para verificar esta identidad. También detectamos expresión de *Ang1* en el núcleo amigdaloides cortical anterior y en la corteza entorrinal. Como se ha comentado previamente, durante el desarrollo de la vía EH, los axones entorrinales establecen contactos sinápticos transitorios con las células de CR, antes de alcanzar sus dianas (Ceranik et al., 2000; Super et al., 1998; Super and Soriano, 1994). De forma que la presencia de expresión de *Ang1* en las células de CR y en la corteza entorrinal indican que dicha proteína podría estar involucrada en el proceso de desarrollo de la vía EH. Asimismo, la presencia de *Ang1* en la fimbria también indica que dicha proteína podría estar involucrada en el desarrollo de las conexiones hipocamposeptales, septohipocámpicas o comisurales.

Respecto a *Itgb1*, observamos que se expresa en diferentes zonas del parénquima neural, como en la placa cortical, en la capa piramidal del hipocampo y en la corteza entorrinal. Por otro lado, observamos que se expresa en los vasos sanguíneos, en el epitelio endotelial del ventrículo lateral y en las meninges. Al igual que ocurre con *Ang1*, la presencia de expresión de *Itgb1* en el hipocampo y en la corteza entorrinal indica que ésta podría estar involucrada en el desarrollo de la vía EH. Por último, respecto a *Tie2*, solo observamos expresión en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, y no detectamos expresión en el parénquima neural, al igual que se había observado en los animales adultos (Ward et al., 2005). Sería interesante conocer si ANG1, presenta alguna función en el establecimiento de la vía EH. Puesto que ANG1 es una molécula que se secreta al medio extracelular, se podrían hacer ensayos de co-cultivos de explantes de EC enfrentados a una fuente de ANG1. También se podrían tratar cultivos primarios entorrinales

con ANG1 y ver qué efecto tiene a nivel de colapso de axones. Por otro lado, para determinar a través de qué receptores actúa, se podrían realizar los mismos experimentos, pero inhibiendo los receptores por separado a través del uso de anticuerpos bloqueantes o drogas.

## 2.2. ANG1 promueve el crecimiento neurítico

Teniendo en cuenta los estudios que indican que ANG1 promueve el crecimiento neurítico *in vitro*, a través de TIE2 (Bai et al., 2009; Cui et al., 2013; Kosacka et al., 2005; Kosacka et al., 2006) o ITGB1 (Chen et al., 2009; Ward and Lamanna, 2004), y teniendo en cuenta que estas proteínas se expresan en el hipocampo, en un momento clave en el desarrollo de las conexiones, decidimos analizar si ANG1 promueve el crecimiento neurítico a nivel del hipocampo. Para ello utilizamos cultivos primarios hipocámpicos y explantes de CA.

En primer lugar, decidimos analizar la expresión de TIE2 e ITGB1 en los cultivos primarios hipocámpicos mediante inmunocitofluorescencia. Analizamos la expresión a distintos tiempos de cultivo, y tanto en presencia como ausencia de suero (NHS), con el objetivo de determinar las condiciones más óptimas para la realización de futuros experimentos. Observamos que tanto TIE2 como ITGB1 se expresan en los cultivos primarios hipocámpicos en todas las condiciones analizadas. Además, mediante RT-qPCR pudimos observar cómo el nivel de expresión de *Tie2* e *Itgb1* cambia a lo largo de los días que el cultivo permanece *in vitro*, y según si están en presencia o ausencia de suero. Asimismo, los niveles de *Itgb1* parecen aumentar a lo largo de los días y en presencia de suero. No obstante, en cuanto se priva de suero, el nivel de expresión de *Itgb1* disminuye. Este hecho podría deberse a que la privación de suero impide el crecimiento de algunos tipos celulares no neuronales que podrían estar expresando *Itgb1*. Por otro lado, los niveles de *Tie2* van disminuyendo a lo largo de los días, tanto en presencia como en ausencia de suero.

Teniendo en cuenta que los receptores se expresan en los cultivos primarios hipocámpicos, decidimos tratarlos con ANG1 ((COMP)-ANG1) y analizar el efecto de esta proteína en el crecimiento neurítico. El tratamiento se llevó a cabo a dos días distintos, por un lado, tratamos las células al momento de plantarlas (0DIV), y por otro, un día después de plantarlas (1DIV). En ambos casos, los experimentos se pararon a los 4DIV. El tratamiento se llevó a cabo en presencia de suero puesto que los primeros días del cultivo son críticos, y la privación de suero induce, en muchos casos, muerte celular. Tras la cuantificación de la longitud de la neurita más larga observamos cómo ANG1, a 0DIV, no presenta ningún efecto; no obstante, a 1DIV observamos cómo esta proteína es capaz de promover el crecimiento de la neurita más

larga. A 0DIV, los cultivos se encuentran en las fases 0-1 (0-6h) de la neuritogénesis, donde las células presentan una morfología esférica, aunque comienzan a extender protrusiones de lamelipodios y filopodios. A 1DIV los cultivos se encuentran en la fase 3 de la neuritogénesis (24-72h en cultivo) (da Silva and Dotti, 2002; Flynn, 2013), momento en el cual, una de las neuritas comienza a alargarse a un ritmo más rápido que el resto para terminar formando el axón. Los resultados obtenidos indican que ANG1 no ejerce ningún efecto sobre las células en fases 0-1, pero sí es capaz de promover el crecimiento de la neurita más larga en el momento en el que ésta comienza a desarrollarse (fase 3), lo que sugiere que ANG1 puede tener un papel en el desarrollo y especificación axonal tal y como se había visto que ocurre tras el tratamiento con ANG1 de neuroesferas de la zona subventricular (Rosa et al., 2010). También existe otra molécula con función angiogénica capaz de promover el crecimiento neurítico, es el caso de VEGF (Jin et al., 2006; Sondell et al., 1999; Sondell et al., 2000).

También analizamos la función de ANG1 sobre el crecimiento axonal en explantes de CA. Al igual que con los cultivos primarios hipocámpicos, llevamos a cabo el tratamiento de los explantes con (COMP)-ANG1 a 0DIV y 1DIV, y paramos los experimentos a 4DIV. Al contrario de lo que observamos en los cultivos primarios hipocámpicos, los axones de los explantes tratados a 0DIV alcanzaron mayor distancia que los tratados a 1DIV y que los explantes control. Los tratados a 1DIV presentaron valores de longitud similares a los explantes control. Aunque, tras la cuantificación, se observó una diferencia significativa entre los tratados a 0DIV y los tratados a 1DIV, no se observó diferencias significativas entre los explantes control y los tratados a 0DIV. Estos resultados pueden deberse a la necesidad de realizar más experimentos para aumentar el tamaño poblacional. ANG1 parece promover el crecimiento de los axones de los explantes de CA a 0DIV, antes de que éstos comiencen a crecer *in vitro*. El hecho de que ANG1 tenga efecto en los cultivos primarios hipocámpicos a 1DIV, y en los explantes de CA a 0DIV, podría deberse a que los cultivos primarios necesitan adherirse y adaptarse al medio para poder responder al factor, mientras que los explantes no, por lo que, en este último caso, ANG1 podría estar actuando desde el momento de exposición a la proteína. Por último, para conocer a través de qué receptor está actuando ANG1, se podrían realizar los mismos experimentos bloqueando la función de TIE2 e ITGB1 mediante el uso de anticuerpos bloqueantes o drogas.

Los resultados obtenidos indican que *Ang1* se expresa en el hipocampo en un momento crítico en el desarrollo de las conexiones. Así mismo, hemos podido observar que ANG1 promueve el crecimiento de la neurita más larga en los cultivos primarios hipocámpicos, así como el crecimiento axonal en los explantes de CA. Experimentos futuros se centrarán en conocer a través de qué receptor está actuando en este contexto. Por otro lado, también se centrarán en

determinar sus funciones durante el desarrollo de las diferentes conexiones de la FH.



# Conclusiones



1. Sema3E y PlexinD1 se expresan en la FH en desarrollo y presentan un patrón de expresión dinámico.
2. El binomio Sema3E/PlexinD1 interviene en el desarrollo de la conexión EH, al inhibir los axones entorrinales.
3. La ausencia de Sema3E/PlexinD1 provoca alteraciones en el “targeting” final de los axones entorrinales.
4. La ausencia de Sema3E/PlexinD1 da lugar a la aparición de células granulares ectópicas, y a la presencia de ondulaciones en la hoja suprapiramidal del DG postnatal y adulto.
5. La ausencia Sema3E/PlexinD1 promueve la proliferación de los progenitores neurales presentes en la SGZ del DG adulto.
6. La ausencia de Sema3E/PlexinD1 causa alteraciones en la distribución de las fibras musgosas, y provoca un aumento de la excitabilidad a nivel del DG.
7. *Ang1* y sus receptores, *Tie2* e *Itgb1*, se expresan durante el desarrollo del hipocampo. *Ang1* e *Itgb1* se expresan en el parénquima neural, mientras que *Tie2* se expresa en los vasos sanguíneos presentes en el parénquima.
8. ANG1 promueve el crecimiento de la neurita más larga de los cultivos primarios hipocámpicos, tratados a 1DIV.
9. ANG1 promueve el incremento de la distancia máxima alcanzada por los axones de los explantes de CA, tratados a 0DIV.



# **Materiales y Métodos**



## Animales

Se utilizaron para el conjunto de experimentos diferentes cepas de ratones. Los animales *Plxnd1<sup>flox/flox</sup>* (Zhang et al., 2009) fueron cedidos por la Dra. Fanny Mann y se mantuvieron en homocigosis. La descendencia fue genotipada siguiendo las indicaciones descritas en (Zhang et al., 2009). Los ratones *Nestin-cre* fueron comprados a *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA) y se mantuvieron en hemicigosis, la descendencia fue genotipada siguiendo las indicaciones de *The Jackson Laboratory*. Para la obtención de los animales *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/+</sup>*, se realizó un primer cruce de una hembra *Plxnd1<sup>flox/flox</sup>* con un macho *Nestin-cre*. La descendencia procedente de este primer cruce podía presentar los siguientes genotipos: 50% *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/+</sup>* y 50% *Nestin-wt; Plxnd1<sup>flox/+</sup>*. Los machos *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/+</sup>* fueron seleccionados para aparearlos con hembras *Plxnd1<sup>flox/flox</sup>*. De este segundo cruce se obtienen animales con los siguientes genotipos de interés y que fueron utilizados en los diferentes experimentos: 25% *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/flox</sup>*, 25% *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/+</sup>*, 25% *Nestin-wt; Plxnd1<sup>flox/flox</sup>*, 25% *Nestin-wt; Plxnd1<sup>flox/+</sup>*. Los ratones mutantes carentes de *Plxnd1* son los que presentan el genotipo *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/flox</sup>*, mientras que sus hermanos de camada *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/+</sup>* fueron utilizados como controles. Los ratones *Sema3e<sup>0/0</sup>* (Gu et al., 2005) se mantuvieron en heterocigosis (*Sema3e<sup>+/0</sup>*) y la descendencia fue genotipada por PCR tal y como se describe en (Gu et al., 2005). Los ratones *Plxnd1-eGFP* fueron adquiridos en Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC, University of California, CA, USA) y se mantuvieron en homocigosis. Los ratones CD1 fueron adquiridos de *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA). En la **Tabla 1** se muestran los cebadores que se utilizaron para el genotipado de los animales.

El acoplamiento de los animales se realizó durante una noche (12pm a 8 am). La mañana del acoplamiento se consideró como día embrionario 0.5 (E0.5), y el día de nacimiento de los animales como día post-natal 0 (P0). Los animales se mantuvieron en estabularios de la Universidad de Barcelona, bajo condiciones libres de patógenos. Todos los experimentos se realizaron bajo las directrices y protocolos del Comité de Ética para la Experimentación Animal (CEEAA) de la Universidad de Barcelona. Los protocolos aprobados por la CEEAA son los siguientes: 276/16 y 141/15.

## Histología

**Procesamiento del tejido para inmunohistoquímica:** Los animales fueron perfundidos con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M (PFA 4% en PB 0.1M, pH= 7,3- 7,4). Sus cerebros fueron extraídos y se dejaron durante una noche en post-fijación en PFA 4% a 4°C.

Posteriormente se crioprotegieron en sacarosa al 30% en tampón fosfato salino 0.1M (PBS 0.1M) y congelados en hielo seco. Se cortaron en un micrótopo de congelación siguiendo una orientación coronal, a 40µm de grosor, y los cortes se mantuvieron en solución crioprotectora (30% glicerol, 30% etilenglicol, 40% PBS 0.1M) a -20° hasta su uso.

**Procesamiento del tejido para hibridación *in situ*:** Los animales fueron procesados como se describe en el apartado anterior, pero las soluciones de perfusión y de crioprotección estaban tratadas con dietilpírocarbonato (DEPC, Sigma). En el caso de los estadios embrionarios, tras la post-fijación los cerebros fueron incluidos en agarosa al 4% en PBS 0.1M y cortados en el vibratomo a 80µm de grosor en orientación horizontal o coronal. En el caso de los adultos, los cerebros fueron procesados tras la post-fijación tal y como se describe en el apartado anterior.

**Procesamiento del tejido para microscopía electrónica:** El tejido fue procesado tal y como se describe en (Doetsch et al., 1997). Brevemente, los animales *Sema3e<sup>+/-0</sup>* (n=4) y *Sema3e<sup>0/0</sup>* (n=4) fueron perfundidos con glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 2% en PB 0.1M. Los cerebros se extrajeron y se post-fijaron en la misma solución durante una noche a 4°C y posteriormente se lavaron durante 2 horas en PB 0.1M. Se cortaron secciones coronales de cerebro a 100µm de grosor con un vibratomo y se post-fijaron en osmio al 2% durante 2 horas. Posteriormente se lavaron, deshidrataron e incluyeron en Araldite (Durcupan, Fluka BioChemika, Ronkonkoma, NY). Para estudiar la organización general de la SGZ, se cortaron secciones semifinas de 1.5µm de grosor con una cuchilla de vidrio, y se tiñieron con azul de toluidina al 1%. Para la identificación de células individuales, se cortaron secciones ultrafinas (0.05µm) con una cuchilla de diamante, y se tiñeron con citrato de plomo. Las muestras se examinaron bajo un microscopio electrónico Jeol 100CX.

### Inmunohistoquímica

Las secciones de cerebro adulto fueron procesadas en flotación y se les realizaron 5 pasos de incubación diferentes. En primer lugar, se procedió a inactivar la peroxidasa endógena incubando el tejido en una solución de agua oxigenada al 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y metanol al 10% en PBS 0.1M durante 20 minutos a temperatura ambiente. En segundo lugar, se procedió a realizar el bloqueo del tejido, para ello se incubó en solución de bloqueo, constituida por gelatina al 0.2%, suero fetal bovino (FBS) al 10%, glicina 0.2M y Tritón X-100 al 0.5% en PBS 0.1M, durante 2 horas a temperatura ambiente. En tercer lugar, el tejido se incubó con el anticuerpo primario durante 24 horas a 4°C en agitación. En la **Tabla 2** se muestran los diferentes anticuerpos primarios utilizados. El anticuerpo primario se preparó en una solución de 0.2% gelatina, 5%

FBS y 0.2% tritonX 100 en PBS 0.1M. En cuarto lugar, el tejido fue incubado con el anticuerpo secundario biotinilado (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) a una concentración de 1:200 durante 2 horas a temperatura ambiente en la misma solución que el anticuerpo primario. En quinto lugar, se procedió a incubar el tejido con el complejo Avidina-Biotina peroxidasa (ABC) (1:100) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) en la misma solución que los anticuerpos primario y secundario, a una concentración de 1:100, durante 2 horas a temperatura ambiente. Entre los diferentes pasos de incubación, el tejido fue lavado con Tritón X-100 al 0.5% en PBS 0.1M, excepto en los pasos previos al revelado, que fue lavado con Tris-HCl 0.1M pH7.6. Posteriormente, las secciones de tejido fueron reveladas con diaminobenzidina (DAB) al 0.03% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.02% en Tris-HCl 0.1M. Finalmente, las secciones fueron extendidas sobre portaobjetos gelatinizados, deshidratadas en una batería de etanoles y xilol (70% EtOH, 90% EtOH, 100% EtOH, Xilol) y cubiertas con un cubreobjetos usando como medio de montaje Eukitt™ (Merck, Darmstadt, Germany).

El procedimiento seguido en tejido embrionario y postnatal fue el mismo que el descrito para adultos, pero las soluciones que contenían Tritón X-100 presentaban un 0.03% del detergente para el tejido embrionario, y un 0.1% para el tejido postnatal P0 a P5.

Para las inmunofluorescencias, no se realizó la primera incubación de eliminación de la actividad peroxidasa endógena, y se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos (Alexa fluor 488 o 568, Life technologies) y DAPI como marcador específico de núcleos (Sigma). Además, el tejido no fue deshidratado y se montó directamente en un medio de montaje acuoso denominado Mowiol™. Todas las muestras fueron fotodocumentadas en un microscopio Olympus BX61 o en un microscopio confocal Leica SP5.

### **Hibridación *in situ***

Para la hibridación *in situ* se utilizaron diferentes sondas que fueron generadas a partir de diferentes fragmentos de cDNA. Cada fragmento de cDNA codificaba para un gen de interés. Durante la retrotranscripción *in vitro* de estos cDNA se utilizaron oligonucleótidos marcados con digoxigenina (Roche). Se sintetizaron tanto la sonda sense como la anti-sense para los diferentes genes. La síntesis de las diferentes sondas se muestra en la **Tabla 3**. Las secciones de cerebro procesadas de unas 40um de grosor (adultos y postnatales), u 80um de grosor (embrionarios) fueron procesadas en flotación y se les realizaron 4 pasos de incubación diferentes. En primer lugar, tras permeabilizar el tejido con Tween al 0.1% en PBS 0.1M, se procedió a prehibridar el tejido en solución de hibridación durante 3 horas a 65°. La solución

de hibridación estaba constituida por formamida desionizada al 50%, dextrán sulfato sódico al 10%, solución Denhardt al 2%, cloruro de sodio (NaCl) 0.62M, tetraacetato de etileno diamino (EDTA) 10mM, ácido piperacín-1,4-bis(2-etanosulfónico) (PIPES) 20mM, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.2%, 250ug/ml de DNA de esperma de salmón (ssDNA) y 250ug/ml de tRNA de levadura (ytRNA) en H<sub>2</sub>O. En segundo lugar, se procedió a incubar el tejido con la sonda en la misma solución de hibridación durante una noche a 65°C. Al día siguiente se procedió a lavar el tejido con dos soluciones diferentes, haciendo 3 lavados de 30 minutos a 62°C con cada solución. La primera solución estaba formada por formamida al 50%, citrato de sodio salino (SSC) al 25% y SDS al 5% en H<sub>2</sub>O, mientras que la segunda solución estaba formada por formamida al 50%, SSC al 10% y SDS al 5% en H<sub>2</sub>O. Tras estos lavados, se lavó el tejido con Tween al 0.1% en tampón Tris (TBST) a temperatura ambiente para proceder a la tercera incubación en solución de bloqueo (suero de cabra (NGS) al 10% en TBST) durante 2 horas a temperatura ambiente. En cuarto lugar, se incubó el tejido con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina a 1:1500 en una solución NGS al 1% en TBST durante la noche a 4°C. Por último, se procedió a revelar el tejido con *nitroblue tetrazolium* y 5-bromo-4-cloro-3-indólfosfato (NBT/BCIP, Roche). Todas las soluciones utilizadas en la hibridación *in situ* estaban tratadas con DEPC. Las muestras fueron fotodocumentadas en un microscopio Olympus BX61.

### **Marcaje 5'-Bromo-2-deoxiuridina (BrdU)**

El marcaje con BrdU se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Fontana et al., 2006). Se procedió a inyectar de forma intraperitoneal BrdU (50mg/kg) en ratones adultos (2-3 meses de edad, n=4 *Sema3e<sup>0/0</sup>*, n=4 *Sema3e<sup>+/-</sup>*, n=4 *Sema3e<sup>0/0</sup>*) durante cuatro días. Una semana después de la última inyección los animales se procesaron histológicamente para inmunohistoquímica como se ha descrito previamente. Para la detección de BrdU, el tejido se procesó como se describe en trabajos previos (del Rio and Soriano, 1989; Fontana et al., 2006). Para ello, se realizan varios pasos adicionales de desnaturalización y neutralización entre la inhibición de la actividad peroxidasa endógena y el bloqueo. Estos pasos consistieron en un primer tratamiento con ácido clorhídrico 0.1N (HCl 0.1N) en hielo durante 10 minutos, un segundo tratamiento con HCl 2N en PBS 0.05M a 37°C durante 25 minutos, y un último paso de neutralización con tampón borato 0.1M pH= 8.5. El suero utilizado durante este proceso fue NHS. Se llevó a cabo el conteo de las células BrdU positivas presentes en la capa granular del DG en un microscopio Olympus BX61.

### Tinción de selenito de plata

La tinción de selenito de plata para la detección de proyecciones ricas en zinc se realizó como está descrito en (Danscher, 1982). El selenito de plata ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 20mg/kg) se inyectó de forma intraperitoneal en ratones adultos (2-3 meses de edad, *Sema3e<sup>+/-</sup>* (n=2), *Sema3e<sup>0/0</sup>* (n=2), *Nestin-cre; Plxnd1<sup>fllox/+</sup>* (n=2), *Nestin-cre; Plxnd1<sup>fllox/fllox</sup>* (n=2)). 1 hora después se anestesiaron y sus cerebros fueron extraídos y congelados en hielo seco. Los cerebros se cortaron a 30µm de grosor en un criostato y los cortes montados en portaobjetos se mantuvieron a -20° hasta su uso. Las secciones se revelaron en oscuridad durante 60-80 minutos en una solución amplificadora de plata: goma arábica al 50%, tampón citrato de sodio 2M, hidroquinona al 8.5% y lactato de plata al 1.2% en  $\text{H}_2\text{O}$  a 26°C. Tras lavar el tejido en  $\text{H}_2\text{O}$ , se trató con tiosulfato de sodio al 5% durante 12 minutos. Posteriormente se deshidrató en una batería de alcoholes y se cubrió con un cubreobjetos y medio de montaje Eukitt™. Las muestras fueron fotodocumentadas en un microscopio Olympus Bx61.

### FITC-albúmina

Para la determinación de la distribución de los vasos sanguíneos en el hipocampo, ratones adultos (2-3 meses de edad, *Sema3e<sup>+/-</sup>* (n=2), *Sema3e<sup>0/0</sup>* (n=2)) anestesiados recibieron una inyección de 300µl de albúmina de suero bovino marcado con isotiocianato de fluoresceína (BSA-FITC; Sigma, Cat#A9771, 25mg/ml en 0.1M PBS) (Giannoni et al., 2016) en el ventrículo derecho. Pasados dos minutos, los animales se sacrificaron y sus cerebros se extrajeron y fijaron por inmersión en PFA al 4% durante 72 horas. Posteriormente los cerebros se incluyeron en agarosa al 4% en PBS 0.1M y se cortaron en el vibratomo a 60µm en orientación coronal. Los núcleos se marcaron con DAPI y las secciones se montaron con Mowiol™. Las muestras se fotodocumentaron en un microscopio Olympus BX61.

### Trazado axonal

**En cultivos organotípicos mediante biocitina:** Los cultivos organotípicos de la FH se obtuvieron a partir del cerebro de animales a P0, tal y como se describe en (del Rio and Soriano, 2010). Los genotipos analizados fueron *Sema3e<sup>+/-</sup>*, *Sema3e<sup>0/0</sup>*, *Nestin-cre; Plxnd1<sup>fllox/+</sup>* y *Nestin-cre; Plxnd1<sup>fllox/fllox</sup>*. Brevemente, tras anestesiarse a los animales por hipotermia, sus cerebros fueron extraídos y diseccionados de forma que la FH estuviese intacta. Mediante el uso de un *chopper* McIlwain, los trozos de tejido fueron cortados (300-400 µm de grosor) de forma que tanto el hipocampo como la corteza entorrinal estuviesen presentes en la misma rebanada. La disección se llevó a cabo en medio de disección (MEM suplementado con glutamina (2 mM)). Posteriormente,

las secciones seleccionadas fueron cultivadas utilizando el sistema de membranas de interfase (Stoppini et al., 1991). Las secciones se colocaron en membranas estériles de 30 mm ø (Millicel-CM, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) y se cultivaron en medio de cultivo (50% MEM, 25% NHS, 25% HBSS) suplementado con 2 mM de glutamina y 0.044% de bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) ajustado todo a un pH 7.3. Los cultivos se mantuvieron en el incubador a 37° con un 5% CO<sub>2</sub>. Tras 7 DIV, se procedió a colocar cristales de biocitina (Sigma, Poole, Dorset, UK) en la corteza entorrinal para trazar la conexión EH y un día más tarde se procedió a la fijación de los cultivos con PFA al 4% durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se procedió a incluirlos en una pasta constituida por albúmina de huevo de pollo al 30% y gelatina al 0.6% en PB 0.1M para poder cortarlos al vibratomo a 40µm de grosor para su posterior procesamiento inmunohistológico. El proceso inmunohistológico consistió en revelar la biocitina, para ello se llevaron a cabo 3 pasos de incubación del tejido. En primer lugar, el tejido fue incubado en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en PB 0.1M durante 10 minutos, en DMSO al 20% en PB 0.1M durante 20 minutos, y en DMSO al 40% en PB 0.1M durante 40 minutos. En segundo lugar, se procedió a incubar el tejido en solución de bloqueo (gelatina al 0.2%, suero de cabra (NGS) al 10%, glicina 0.2M y Tritón X-100 al 0.5% en PBS 0.1M) durante 2 horas a temperatura ambiente. En tercer lugar, se incubó el tejido con el complejo Avidina-Biotina peroxidasa (ABC-elite™) (1:100) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) en solución de bloqueo, aunque con un 5% de NGS, durante una noche a 4°C. Al día siguiente la actividad peroxidasa se visualizó utilizando la reacción de diaminobenzidina (DAB)-níquel (Del Rio et al., 1997). Finalmente, las secciones fueron extendidas sobre portaobjetos gelatinizados, deshidratadas en una batería de etanoles y xilol (70% EtOH, 90% EtOH, 100% EtOH, Xilol) y cubiertas con un cubreobjetos con medio de montaje Eukitt™. Las muestras se fotodocumentaron en un microscopio Olympus Bx61.

**En rodajas de cerebro fijado mediante DiI:** El cerebro fijado de los animales *Sema3e<sup>+/-0</sup>* y *Sema3e<sup>0/0</sup>* a P0 se cortó al vibratomo en orientación horizontal a 300µm de grosor. En las secciones que presentaban la formación hipocámpica se procedió a pinchar un cristal del colorante lipofílico DiI (1,1',dioctadecil-3,3,3'3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato) en la corteza entorrinal, con una aguja de metal gracias al uso de una lupa. Las secciones se conservaron en solución fijadora (PFA al 4%) durante aproximadamente 1 mes. Posteriormente las secciones se montaron con Mowiol™ y fueron fotodocumentadas en un microscopio Olympus Bx61.

**In vivo mediante BDA:** Animales adultos de aproximadamente 3 meses de edad (*Sema3e<sup>+/-0</sup>* (n=2), *Sema3e<sup>0/0</sup>* (n=2), *Nestin-cre; Plxnd1<sup>flox/flox</sup>* (n=2)) fueron anestesiados con una dosis intraperitoneal de una mezcla de ketamina (113mg/kg) y xilacina (4.5mg/kg). Posteriormente se situaron en un estereotáxico y se procedió a la operación quirúrgica que consistió en inyectar

una solución de BDA al 10% en PBS 0.01M en la corteza entorrinal. La inyección se llevó a cabo mediante el uso de una micropipeta de cristal rellena con la solución de trazado, y mediante la aplicación de corriente de pulsos positivos (7s ON-7s OFF, 7.5 uA durante 20 min). Las coordenadas que se siguieron se obtuvieron del *A stereotaxic atlas of the albino mouse forebrain* de Slotnick and Leonard y fueron las siguientes: Bregma F-3.0; Lateral 4.5; Profundidad 4.0. Tras 11 días de supervivencia, los animales fueron procesados histológicamente como se describe en el apartado *procesamiento del tejido para inmunohistoquímica*. La detección del BDA en el tejido se llevó a cabo igual que para la biocitina en los cultivos organotípicos, a excepción de los tratamientos con DMSO.

### Cultivos de explantes

**Co-cultivos de explantes enfrentados a agregados de células COS-1 previamente transfectadas:** Se obtuvieron explantes de diferentes zonas de la FH (CA, subiculum y cortezas entorrinal, dorsal y ventrolateral) a partir de los cerebros de los embriones tipo silvestre CD1 y mutantes de *Plxnd1* a E14.5 y E16.5. Los cerebros fueron incluidos en agarosa al 4% en medio L-15 de Leibovitz (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) y cortados al vibratomo a 300µm de grosor en orientación horizontal. Se diseccionaron las zonas mencionadas y se cultivaron de uno en uno en un hidrogel de colágeno de rata (Gil and del Rio, 2012) enfrentados a un agregado de células COS1 previamente transfectadas con los vectores que codifican para Sema3E-AP, Sema3F-AP, Sema3A-AP o SEAP (vectores cedidos por F. Mann). Los cultivos se mantuvieron aproximadamente durante 4DIV en el incubador a 37° con un 5% CO<sub>2</sub> en medio Neurobasal™ suplementado con glutamina al 1%, penicilina-estreptomina al 1%, bicarbonato sódico al 0.044%, 6.5 mg/ml de glucosa (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA), B27 al 2% (GIBCO Life Technologies) y NHS al 1%. La transfección de las células COS-1 se llevó a cabo con Lipofectamina Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) 48 horas antes de la disección del tejido. El tiempo de transfección fue de 4 horas. El mismo día de la disección se prepararon los agregados de células transfectadas con colágeno de rata, y una vez solidificado se cortaron en 2 direcciones perpendiculares a 500 µm. Tras aproximadamente 4 DIV, los cultivos fueron fijados en PFA al 4% durante 1 hora a 4°C y procesados inmunohistológicamente para la detección de tubulina (**Tabla 2**). El proceso inmunohistológico seguido fue igual que el descrito en el apartado de *Inmunohistoquímica* pero aumentando los tiempos de incubación, y utilizando el complejo estreptavidina-peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech) en vez del complejo Avidina-Biotina peroxidasa (ABC).

**Explantes de EC para el ensayo de colapso axonal:** Para la obtención de los explantes de EC

se siguió el mismo procedimiento que el descrito en el apartado anterior, pero solo se utilizaron embriones de tipo silvestre CD1 a E16.5. Los explantes se situaron sobre cubreobjetos previamente tratados con Poli-L-Ornitina (0.01%, 1h a 37<sup>o</sup>) y laminina (2µg/ml, durante toda la noche a 37<sup>o</sup>). Se incubaron en medio Neurobasal<sup>TM</sup> suplementado con glutamina al 1%, penicilina-estreptomicina al 1%, bicarbonato sódico al 0.044%, 6.5 mg/ml de glucosa, B27 al 2% y NHS al 1%. A los 3DIV, cuando se observó la presencia de los conos de crecimiento, se trataron los cultivos con un 15% de medio condicionado que contenía Sema3E, Sema3A o Sema3F o medio control, durante 1h. Tras el tratamiento, los cultivos se fijaron en PFA al 4% durante 1h y se tiñeron con Faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para la obtención del medio condicionado, se transfectaron células COS-1 con vectores de expresión que codifican para Sema3E, Sema3A, Sema3F (vectores adquiridos en OriGene, Rockville, MD) o SEAP. El medio de estas células se recogió a las 48h post-transfección, y se concentró diez veces en unas columnas (Ultracel-30 membrane, Millipore). La cuantificación de los conos de crecimiento colapsados se llevó a cabo en un microscopio Olympus Bx61.

**Explantes de CA tratados con (COMP)-Ang1:** Para la obtención de los explantes de CA se siguió el mismo procedimiento que el descrito en el apartado anterior, pero solo se utilizaron embriones de tipo silvestre CD1 a E16.5. Los explantes de CA se cultivaron de uno en uno en un hidrogel de colágeno de rata y se trataron con (COMP)-Ang1 (Enzo Life Sciences;(Cho et al., 2004a; Cho et al., 2004b)) el mismo día del cultivo (0DIV) o a 1DIV. Como control de (COMP)-Ang1 se utilizó CHAPS al 0.01% en PBS 0.1M. Aproximadamente a los 4DIV los cultivos se fijaron en PFA al 4% durante 1 hora a 4<sup>o</sup>C y se procesaron inmunohistológicamente como se ha descrito en el apartado anterior.

### **Cultivos primarios hipocámpicos**

Para los cultivos primarios hipocámpicos se extrajo el cerebro de embriones de los animales CD1 a E16.5, y se llevó a cabo la disección para la obtención del hipocampo en glucosa al 0.6% en PBS 0.1M. Bajo lupa y con bisturí se eliminó el cerebelo y se cortó el cerebro por la fisura inter-hemisférica (línea media). Posteriormente se eliminaron las meninges con pinzas y se separaron el tálamo y la porción rostral del estriado de la corteza con una espátula, siguiendo como referencia anatómica el espacio que queda entre la corteza y el tálamo. Tras eliminar el tálamo y el estriado, se puede observar el hipocampo. Llegados a este punto se procedió a extraer el hipocampo con la ayuda de un bisturí. Los hipocampos se recogieron en glucosa al 0.6% en PBS 0.1M y posteriormente se digirieron en tripsina (Roche) a 37<sup>o</sup>C durante 15 minutos, seguido de un tratamiento con DNasaI (Roche) también a 37<sup>o</sup>C durante 10 minutos.

Para inactivar la DNasal se añadió un cuarto del volumen de NHS. Las células se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en 1ml de medio Neurobasal™ suplementado con glutamina al 1%, penicilina-estreptomicina al 1%, bicarbonato sódico al 0.044%, 6.5 mg/ml de glucosa, B27 al 2% y NHS al 1%. Se realizó el conteo de las células con una cámara Neubauer y se plaquearon diferentes densidades: 28000 células/cm<sup>2</sup> para la inmunodetección de los receptores Itgb1 y Tie2; 17000 células/cm<sup>2</sup> para los experimentos de longitud neurítica; y 104000 células/cm<sup>2</sup> para la cuantificación de mRNA por RT-qPCR. Para los experimentos de longitud neurítica se trataron las células con (COMP)-Ang1 a 0DIV y 1DIV. Como control, las células se trataron con CHAPS al 0.01% en PBS 0.1M. A los 4DIV, los cultivos se fijaron en PFA al 4% durante 1 hora a 4°C y se procesaron para inmunocitoquímica.

### **Transfección de líneas celulares**

Se plaquearon células COS-1 y HEK293 en una densidad de 22000 células/cm<sup>2</sup> en cubreobjetos de 12mm de diámetro, previamente tratados con poli-D-lisina (0.5mg/ml, 1h, 37°C). Se transfectaron las células con los vectores comerciales que codifican para Ang1, Itgb1 y Tie2 (Source BioScience, Nottingham, UK) con Lipofectamina Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dos días después de la transfección, las células se fijaron en PFA al 4% durante 1 hora a 4°C y se procesaron para inmunocitoquímica.

### **Inmunocitoquímica**

Las células fijadas se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS 0.1M y se bloquearon con tampón de bloqueo (gelatina al 0.2%, suero fetal bovino (FBS) al 10%, glicina 0.2M y Tritón X-100 al 0.1% en PBS 0.1M) durante 2 horas a temperatura ambiente. Para marcar las células se utilizaron diferentes anticuerpos primarios (**Tabla 2**), en tampón de incubación (gelatina 0.2%, FBS 5% y Tritón X-100 al 0.1% en PBS 0.1M) durante toda la noche y los correspondientes anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos (AlexaFluor 488, 546 ó 568, Life Technologies). Los núcleos fueron marcados con el marcador DAPI y las muestras se montaron en medio de montaje Mowiol™. Las muestras se fotodocumentaron con un microscopio Olympus BX61.

### **RT-qPCR**

La RT-qPCR se realizó sobre el RNA total extraído de las diferentes muestras con el kit de extracción mirVana (Ambion, Austin, TX). Las muestras procesadas fueron cultivos primarios hipocámpicos recogidos a distintos días y bajo diferentes condiciones de suero (1DIV +NHS;

4DIV +NHS; 6DIV +NHS; 6DIV -NHS; 8 DIV +NHS; 8DIV -NHS). El RNA purificado de las muestras analizadas se utilizó para generar sus correspondientes cDNAs que posteriormente se utilizaron para la cuantificación de mRNA por PCR. Los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 1**. La amplificación por PCR y la detección se realizaron con el detector Roche LightCycler 480, gracias al uso del reactivo SYBR Green Master Mix (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. El perfil de la reacción fue el siguiente: desnaturalización- ciclo de activación (95°C durante 10 minutos) seguido por 40 ciclos de desnaturalización-anillamiento-extensión (95°C, 10 minutos; 72°C, 1 minutos; 98°C, continuo). Los datos se analizaron utilizando el método  $\Delta\Delta C_t$ , y todas las muestras se normalizaron respecto a la expresión del gen de referencia Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

### **Análisis estadístico**

Los datos se muestran como *Mean ± S.E.M.* (Media ± error estándar de la media) y se analizaron con el programa GraphPad Prism 6. Los tests estadísticos que se siguieron (a excepción de los estudios electrofisiológicos) fueron: *unpaired t-test con corrección de Welch* para la comparación entre dos grupos; y *ANOVA Bonferroni post-hoc test* para la comparación entre más de tres grupos. Las diferencias con un *p valor* por debajo de 0.05 ( $P < 0.05$ ) se consideraron estadísticamente significativas (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

### **Medición de la actividad eléctrica extracelular *in vivo***

Los animales (*Sema3e<sup>0/0</sup>* (n=4) y *Sema3e<sup>+0</sup>* (n=4)) se anestesiaron con una dosis intraperitoneal de una mezcla de ketamina (50mg/kg) y medetomidina (1.3mg/kg), y se mantuvieron anestesiados, tras la traqueotomía, por una administración constante de isoflurano (1%) en oxígeno (100%). Se administró atropina (0.3mg/kg) y metilprednisolona (30mg/kg) de forma subcutánea, para evitar secreciones respiratorias y prevenir la formación de edemas. Para el estudio de las descargas epilépticas evocadas, se administró ácido kaínico (10mg/kg) de forma intraperitoneal. La temperatura corporal estuvo monitorizada de forma constante, y mantenida a 37°C gracias al uso de una manta eléctrica. Una vez estabilizados, los animales se situaron en un estereotáxico, y se realizó una craneotomía sobre el área diana (2.0mm posterior al bregma, 1.0mm lateral desde la línea media; (Paxinos and Franklin, 2004). Para las grabaciones extracelulares, se utilizó un multielectrodo de 16 canales (100µm de espaciado entre electrodos, E16-100-S1-L6, Atlas Neuroengineering, Leuven, Belgium), previamente marcado con DiI para la posterior reconstrucción anatómica. El electrodo se situó de forma que las áreas DG y CA del hipocampo, y la corteza cerebral superpuesta quedasen cubiertas.

La señal se amplificó (Multichannel systems, Germany), digitalizó a 20kHz y se mandó a un ordenador a través de una interfaz de digitalización (CED 1401 interface and Spike2 software; Cambridge Electronic Design). La detección de los *Up* y *Down states* y de la actividad epiléptica se llevó a cabo como está descrito en (Castano-Prat et al., 2017; Colic et al., 2013). Los datos se analizaron utilizando el test estadístico no paramétrico de Wilcoxon (Graphpad Prism 6 (Mac Osx, Graphpad)).

Gen	Forward	Reverse	Metodología
<i>PlxnD1<sup>lox</sup></i>	GGCTGCATTATCCTGCATATC	CAGCCCTATAGTTCTCCACCAAAGA	Genotipado
<i>Nestin-cre</i>	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT	Genotipado
<i>Sema3E</i>	GACAGAAAGGCTTAGCGGATC	GGTTCGCCGAGTGACCTG CTTGCTACCATGGTGCCTG	Genotipado
<i>Itgb1</i>	TCGATCCTGTGACCCATTGC	ATGTCGGGACCAGTAGGACA	RT-qPCR
<i>Tie2</i>	CAGCTCTGAGCCTTACTTTGGG	CTCTTGAGGAGGGAGTCCG	RT-qPCR

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para el genotipado de las diferentes colonias de ratones, y para los experimentos de RT-qPCR.

Anticuerpo primario	Concentración de uso	Método experimental	Referencia	Casa comercial
βIII-tubulina (clone TUJ-1)	1:4000	IHQ en explantes	MMS-435P	Covance
NeuN	1:1000 1:500	IHQ IHF	MAB377	Millipore
Prox1	1:2000	IHQ IHF	AB5475	Millipore
Calbindina (CALB)	1:2500	IHF	300	Swant
Calretinina (CALR)	1:500	IHQ IHF	7697	Swant
Sinaptoporina (SPO)	1:200	IHF	102002	Synaptic Systems
GFP	1:500	IHQ	A11122	Invitrogen
GFAP	1:1500 1:800	IHF IHF	Z0334 MAB360	Dako Millipore
Doblecortina (DCX)	1:500	IHF	SC-8066	Sta. Cruz
BrdU	1:100	IHQ IHF	SM1667	Acris Antibodies
Parvalbúmina (PV)	1:2000	IHQ	PV23	Swant
Angiopoyetina1 (Ang1)	1:100	ICF	ABC728	Millipore
Integrina β1 (Itgb1)	1:100	ICF	AB1952	Millipore
Tie2	1:100	ICF	ab135671	Abcam
Tubulina acetilada (Tub. Ac.)	1:3000	ICF	T6793	Sigma

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios utilizados para el conjunto de experimentos. IHQ: Inmunohistoquímica; IHF: Inmunohistofluorescencia; ICF: Inmunocitofluorescencia.

<b>Gen</b>	<b>Vector</b>	<b>Sense (Enz./Pol.)</b>	<b>Antisense (Enz./Pol.)</b>	<b>Procedencia</b>
<i>Sema3E</i>	pCMV-Sport6	XhoI/Sp6	Sall/T7	Cedido por el laboratorio de A.L. Kolodkin
<i>Sema3A</i>	pBluescript II KS	EcoRI/T3	NotI/T3	Cedido por el laboratorio de A. Chèdotal
<i>Sema3F</i>	pBluescript II KS	Sall/T7	EcoRI/T3	
<i>PlexinD1</i>	pCMV-Sport6	NotI/Sp6	Sall/T7	Cedido por el laboratorio de A.L. Kolodkin
<i>Ang1</i>	pCMV-Sport6	NotI/Sp6	Sall/T7	Adquirido en Source Bioscience (IRAVp968F03140D)
<i>Itgb1</i>	pYX-Asc	NotI/T7	EcoRI/T3	Adquirido en Source Bioscience (IRAVp968C10126D)
<i>Tie2</i>	pCMV-Sport6.1	NotI/Sp6	EcoRI/T7	Adquirido en Source Bioscience: (IRAVp968E01103D)

**Tabla 3.** Sondas utilizadas para los experimentos de hibridación in situ. (Enz./Pol.): Enzima de restricción y polimerasa utilizadas para la síntesis de las sondas sense y antisense a partir del plásmido.



# Bibliografía



- Abe, P., Mueller, W., Schutz, D., MacKay, F., Thelen, M., Zhang, P., and Stumm, R. (2014). CXCR7 prevents excessive CXCL12-mediated downregulation of CXCR4 in migrating cortical interneurons. *Development* 141, 1857-1863.
- Acker, T., Beck, H., and Plate, K.H. (2001). Cell type specific expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 and -2 suggests an important role of astrocytes in cerebellar vascularization. *Mech Dev* 108, 45-57.
- Aguilo, A., Schwartz, T.H., Kumar, V.S., Peterlin, Z.A., Tsiola, A., Soriano, E., and Yuste, R. (1999). Involvement of cajal-retzius neurons in spontaneous correlated activity of embryonic and postnatal layer 1 from wild-type and reeler mice. *J Neurosci* 19, 10856-10868.
- Ahn, S., and Joyner, A.L. (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437, 894-897.
- Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., and Gage, F.H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev* 94, 991-1026.
- Aimone, J.B., Wiles, J., and Gage, F.H. (2009). Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron* 61, 187-202.
- Alcantara, S., Pozas, E., Ibanez, C.F., and Soriano, E. (2006). BDNF-modulated spatial organization of Cajal-Retzius and GABAergic neurons in the marginal zone plays a role in the development of cortical organization. *Cereb Cortex* 16, 487-499.
- Altman, J., and Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335.
- Altmann, C.R., and Brivanlou, A.H. (2001). Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int Rev Cytol* 203, 447-482.
- Amador-Arjona, A., Elliott, J., Miller, A., Ginbey, A., Pazour, G.J., Enikolopov, G., Roberts, A.J., and Terskikh, A.V. (2011). Primary cilia regulate proliferation of amplifying progenitors in adult hippocampus: implications for learning and memory. *J Neurosci* 31, 9933-9944.
- Amaral, D., and Lavenex, P. (2007). *Hippocampal Neuroanatomy. The Hippocampus Book Oxford University Press.*
- Amaral, D.G., and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591.
- Amaral, D.G., and Witter, M.P. (1995). Hippocampal formation. In: *The rat nervous system.* Paxinos, G, ed, Academic Press New York.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., and Rubenstein, J.L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278, 474-476.
- Anderson, S.A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J.L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128, 353-363.
- Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R., and Yamada, Y. (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* 23, 354-358.

Arimura, N., and Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 194-205.

Aroca, P., Lorente-Canovas, B., Mateos, F.R., and Puellas, L. (2006). Locus coeruleus neurons originate in alar rhombomere 1 and migrate into the basal plate: Studies in chick and mouse embryos. *J Comp Neurol* 496, 802-818.

Aruga, J., Tohmonda, T., Homma, S., and Mikoshiba, K. (2002). Zic1 promotes the expansion of dorsal neural progenitors in spinal cord by inhibiting neuronal differentiation. *Dev Biol* 244, 329-341.

Audero, E., Cascone, I., Zanon, I., Previtali, S.C., Piva, R., Schiffer, D., and Bussolino, F. (2001). Expression of angiopoietin-1 in human glioblastomas regulates tumor-induced angiogenesis: in vivo and in vitro studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 536-541.

Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 165-177.

Bagri, A., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Neuropilins as Semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance. *Adv Exp Med Biol* 515, 13-31.

Bai, Y., Cui, M., Meng, Z., Shen, L., He, Q., Zhang, X., Chen, F., and Xiao, J. (2009). Ectopic expression of angiopoietin-1 promotes neuronal differentiation in neural progenitor cells through the Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* Jan 9;378(2):296-301.

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

Barallobre, M.J., Pascual, M., Del Rio, J.A., and Soriano, E. (2005). The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Res Brain Res Rev* 49, 22-47.

Barber, M., Arai, Y., Morishita, Y., Vigier, L., Causeret, F., Borello, U., Ledonne, F., Coppola, E., Contremoulins, V., Pfrieger, F.W., *et al.* (2015). Migration Speed of Cajal-Retzius Cells Modulated by Vesicular Trafficking Controls the Size of Higher-Order Cortical Areas. *Curr Biol* 25, 2466-2478.

Barber, M., and Pierani, A. (2015). Tangential migration of glutamatergic neurons and cortical patterning during development: Lessons from Cajal-Retzius cells. *Dev Neurobiol* 76, 847-881.

Barnes, G., Puranam, R.S., Luo, Y., and McNamara, J.O. (2003). Temporal specific patterns of semaphorin gene expression in rat brain after kainic acid-induced status epilepticus. *Hippocampus* 13, 1-20.

Barton, W.A., Tzvetkova-Robev, D., Miranda, E.P., Kolev, M.V., Rajashankar, K.R., Himanen, J.P., and Nikolov, D.B. (2006). Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiopoietin-2-Tie2 complex. *Nat Struct Mol Biol* 13, 524-532.

Battista, D., Ferrari, C.C., Gage, F.H., and Pitossi, F.J. (2006). Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult

dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 23, 83-93.

Bayer, S.A., and Altmann, J. (1991). *Neocortical Development*. Raven Press, New York.

Beck, H., Acker, T., Wiessner, C., Allegrini, P.R., and Plate, K.H. (2000). Expression of angiotensin-1, angiotensin-2, and tie receptors after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 157, 1473-1483.

Beddington, R.S. (1994). Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* 120, 613-620.

Beggs, H.E., Schahin-Reed, D., Zang, K., Goebbels, S., Nave, K.A., Gorski, J., Jones, K.R., Sretavan, D., and Reichardt, L.F. (2003). FAK deficiency in cells contributing to the basal lamina results in cortical abnormalities resembling congenital muscular dystrophies. *Neuron* 40, 501-514.

Bellefroid, E.J., Kobbe, A., Gruss, P., Pieler, T., Gurdon, J.B., and Papalopulu, N. (1998). Xiro3 encodes a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois genes and functions in neural specification. *EMBO J* 17, 191-203.

Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, G., Haigh, J., Chauvet, S., and Mann, F. (2010). VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron* 66, 205-219.

Benes, F.M., Kwok, E.W., Vincent, S.L., and Todtenkopf, M.S. (1998). A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. *Biol Psychiatry* 44, 88-97.

Berger, O., Li, G., Han, S.M., Paredes, M., and Pleasure, S.J. (2007). Expression of SDF-1 and CXCR4 during reorganization of the postnatal dentate gyrus. *Dev Neurosci* 29, 48-58.

Berger, T.W. (1984). Long-term potentiation of hippocampal synaptic transmission affects rate of behavioral learning. *Science* 224, 627-630.

Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M.S., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Landen, M., Druid, H., *et al.* (2012). The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74, 634-639.

Bergsland, M., Werme, M., Malewicz, M., Perlmann, T., and Muhr, J. (2006). The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes Dev* 20, 3475-3486.

Bielle, F., Griveau, A., Narboux-Neme, N., Vigneau, S., Sigrist, M., Arber, S., Wassef, M., and Pierani, A. (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8, 1002-1012.

Blackstad, T.W. (1956). Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol* 105, 417-537.

Blumberg, B., Bolado, J., Jr., Moreno, T.A., Kintner, C., Evans, R.M., and Papalopulu, N. (1997). An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development* 124, 373-379.

Boldajipour, B., Mahabaleswar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008). Control of chemokine-guided cell migration by ligand

sequestration. *Cell* 132, 463-473.

Bonaguidi, M.A., Peng, C.Y., McGuire, T., Falciglia, G., Gobeske, K.T., Czeisler, C., and Kessler, J.A. (2008). Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* 28, 9194-9204.

Bond, A.M., Peng, C.Y., Meyers, E.A., McGuire, T., Ewaleifoh, O., and Kessler, J.A. (2014). BMP signaling regulates the tempo of adult hippocampal progenitor maturation at multiple stages of the lineage. *Stem Cells* 32, 2201-2214.

Borrell, V., and Marin, O. (2006). Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat Neurosci* 9, 1284-1293.

Borrell, V., Ruiz, M., Del Rio, J.A., and Soriano, E. (1999). Development of commissural connections in the hippocampus of reeler mice: evidence of an inhibitory influence of Cajal-Retzius cells. *Exp Neurol* 156, 268-282.

Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E.M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382, 595-601.

Breunig, J.J., Sarkisian, M.R., Arellano, J.I., Morozov, Y.M., Ayoub, A.E., Sojitra, S., Wang, B., Flavell, R.A., Rakic, P., and Town, T. (2008). Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13127-13132.

Breunig, J.J., Silbereis, J., Vaccarino, F.M., Sestan, N., and Rakic, P. (2007). Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20558-20563.

Brewster, R., Lee, J., and Ruiz i Altaba, A. (1998). Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature* 393, 579-583.

Bribian, A., Nocentini, S., Llorens, F., Gil, V., Mire, E., Reginensi, D., Yoshida, Y., Mann, F., and del Rio, J.A. (2014). Sema3E/PlexinD1 regulates the migration of hem-derived Cajal-Retzius cells in developing cerebral cortex. *Nat Commun* 5, 4265.

Brunne, B., Franco, S., Bouche, E., Herz, J., Howell, B.W., Pahle, J., Muller, U., May, P., Frotscher, M., and Bock, H.H. (2013). Role of the postnatal radial glial scaffold for the development of the dentate gyrus as revealed by Reelin signaling mutant mice. *Glia* 61, 1347-1363.

Brunstrom, J.E., Gray-Swain, M.R., Osborne, P.A., and Pearlman, A.L. (1997). Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4. *Neuron* 18, 505-517.

Burwell, R.D., Witter, M.P., and Amaral, D.G. (1995). Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 5, 390-408.

Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B.G., and Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* 6, 1162-1168.

Cai, X., Long, L., Yang, L., Chen, Z., Ni, G., Qin, J., Zhou, J., and Zhou, L. (2016). Association between mossy fiber sprouting and expression of semaphorin-3f protein in dentate gyrus of

hippocampus in lithium-pilocarpine-induced status epilepticus mouse model. *Neurol Res*, 1-6.

Cameron, H.A., and Dayer, A.G. (2008). New interneurons in the adult neocortex: small, sparse, but significant? *Biol Psychiatry* 63, 650-655.

Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., and Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337-344.

Carlson, T.R., Feng, Y., Maisonpierre, P.C., Mrksich, M., and Morla, A.O. (2001). Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J Biol Chem* 276, 26516-26525.

Carmeliet, P., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436, 193-200.

Caronia-Brown, G., and Grove, E.A. (2011). Timing of cortical interneuron migration is influenced by the cortical hem. *Cereb Cortex* 21, 748-755.

Casazza, A., Kigel, B., Maione, F., Capparuccia, L., Kessler, O., Giraud, E., Mazzone, M., Neufeld, G., and Tamagnone, L. (2012). Tumour growth inhibition and anti-metastatic activity of a mutated furin-resistant Semaphorin 3E isoform. *EMBO Mol Med* 4, 234-250.

Cascone, I., Napione, L., Maniero, F., Serini, G., and Bussolino, F. (2005). Stable interaction between alpha5beta1 integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1. *J Cell Biol Sep 12;170(6):993-1004*.

Castano-Prat, P., Perez-Zabalza, M., Perez-Mendez, L., Escorihuela, R.M., and Sanchez-Vives, M.V. (2017). Slow and Fast Neocortical Oscillations in the Senescence-Accelerated Mouse Model SAMP8. *Front Aging Neurosci* 9, 141.

Ceranik, K., Zhao, S., and Frotscher, M. (2000). Development of the entorhino-hippocampal projection: guidance by Cajal-Retzius cell axons. *Ann N Y Acad Sci* 911, 43-54.

Charron, F., and Tessier-Lavigne, M. (2007). The Hedgehog, TGF-beta/BMP and Wnt families of morphogens in axon guidance. *Adv Exp Med Biol* 621, 116-133.

Chauvet, S., Burk, K., and Mann, F. (2013). Navigation rules for vessels and neurons: cooperative signaling between VEGF and neural guidance cues. *Cell Mol Life Sci* 70, 1685-1703.

Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Fekrane, L., Livet, J., Gayet, O., Segu, L., Buhot, M.C., Jessell, T.M., Henderson, C.E., *et al.* (2007). Gating of Sema3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron* 56, 807-822.

Chedotal, A., Del Rio, J.A., Ruiz, M., He, Z., Borrell, V., de Castro, F., Ezan, F., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., *et al.* (1998). Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* 125, 4313-4323.

Chen, H., Bagri, A., Zupicich, J.A., Zou, Y., Stoeckli, E., Pleasure, S.J., Lowenstein, D.H., Skarnes, W.C., Chedotal, A., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25, 43-56.

Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin-2, a

novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19, 547-559.

Chen, H., Xie, G.H., Wang, W.W., Yuan, X.L., Xing, W.M., Liu, H.J., Chen, J., Dou, M., and Shen, L.S. (2015). Epigenetically downregulated Semaphorin 3E contributes to gastric cancer. *Oncotarget* 6, 20449-20465.

Chen, X., Fu, W., Tung, C.E., and Ward, N.L. (2009). Angiopoietin-1 induces neurite outgrowth of PC12 cells in a Tie2-independent, beta1-integrin-dependent manner. *Neurosci Res* 64, 348-354.

Cheng, H.J., Bagri, A., Yaron, A., Stein, E., Pleasure, S.J., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* 32, 249-263.

Chevaleyre, V., and Siegelbaum, S.A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron* 66, 560-572.

Cho, C.H., Kammerer, R.A., Lee, H.J., Steinmetz, M.O., Ryu, Y.S., Lee, S.H., Yasunaga, K., Kim, K.T., Kim, I., Choi, H.H., *et al.* (2004a). COMP-Ang1: a designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5547-5552.

Cho, C.H., Kammerer, R.A., Lee, H.J., Yasunaga, K., Kim, K.T., Choi, H.H., Kim, W., Kim, S.H., Park, S.K., Lee, G.M., *et al.* (2004b). Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5553-5558.

Choe, Y., Huynh, T., and Pleasure, S.J. (2014). Migration of oligodendrocyte progenitor cells is controlled by transforming growth factor beta family proteins during corticogenesis. *J Neurosci* 34, 14973-14983.

Choi, Y.I., Duke-Cohan, J.S., Ahmed, W.B., Handley, M.A., Mann, F., Epstein, J.A., Clayton, L.K., and Reinherz, E.L. (2008). PlexinD1 glycoprotein controls migration of positively selected thymocytes into the medulla. *Immunity* 29, 888-898.

Choi, Y.I., Duke-Cohan, J.S., Chen, W., Liu, B., Rossy, J., Tabarin, T., Ju, L., Gui, J., Gaus, K., Zhu, C., *et al.* (2014). Dynamic control of beta1 integrin adhesion by the plexinD1-sema3E axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 379-384.

Chun, J.J., Nakamura, M.J., and Shatz, C.J. (1987). Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptide-immunoreactive neurons. *Nature* 325, 617-620.

Colic, S., Lang, M., Wither, R.G., Eubanks, J.H., Liang, Z., and Bardakjian, B.L. (2013). Low frequency-modulated high frequency oscillations in seizure-like events recorded from in-vivo MeCP2-deficient mice. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2013, 985-988.

Compte, A., Reig, R., Descalzo, V.F., Harvey, M.A., Puccini, G.D., and Sanchez-Vives, M.V. (2008). Spontaneous high-frequency (10-80 Hz) oscillations during up states in the cerebral cortex in vitro. *J Neurosci* 28, 13828-13844.

Conlon, R.A. (1995). Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends Genet* 11, 314-319.

- Contreras, D., Timofeev, I., and Steriade, M. (1996). Mechanisms of long-lasting hyperpolarizations underlying slow sleep oscillations in cat corticothalamic networks. *J Physiol* 494 ( Pt 1), 251-264.
- Copp, A.J., Greene, N.D., and Murdoch, J.N. (2003). The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet* 4, 784-793.
- Corbin, J.G., Nery, S., and Fishell, G. (2001). Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nat Neurosci* 4 Suppl, 1177-1182.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszodi, A., Morgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R., and Fassler, R. (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* 147, 1109-1122.
- Cox, W.G., and Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development* 121, 4349-4358.
- Crusio, W.E., Schwegler, H., and Brust, I. (1993). Covariations between hippocampal mossy fibres and working and reference memory in spatial and non-spatial radial maze tasks in mice. *Eur J Neurosci* 5, 1413-1420.
- Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K.D., and Buzsaki, G. (2003). Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron* 37, 311-322.
- Cui, X., Chopp, M., Zacharek, A., Cui, Y., Roberts, C., and Chen, J. (2013). The neurorestorative benefit of GW3965 treatment of stroke in mice. *Stroke* 44, 153-161.
- Curtis, M.A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M.F., Axell, M.Z., Wikkelso, C., Holtas, S., van Roon-Mom, W.M., Bjork-Eriksson, T., Nordborg, C., *et al.* (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315, 1243-1249.
- D'Arcangelo, G. (2006). Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders. *Epilepsy Behav* 8, 81-90.
- da Silva, J.S., and Dotti, C.G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neurogenesis. *Nat Rev Neurosci* 3, 694-704.
- Danscher, G. (1982). Exogenous selenium in the brain. A histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds. *Histochemistry* 76, 281-293.
- de Carlos, J.A., Lopez-Mascaraque, L., and Valverde, F. (1996). Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16, 6146-6156.
- De Juan Romero, C., and Borrell, V. (2015). Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia* 63, 1303-1319.
- De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P.J., and Carmeliet, P. (2009). Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 639-649.
- De Winter, F., Holtmaat, A.J., and Verhaagen, J. (2002). Neuropilin and class 3 semaphorins in nervous system regeneration. *Adv Exp Med Biol* 515, 115-139.

de Wit, J., and Verhaagen, J. (2003). Role of semaphorins in the adult nervous system. *Prog Neurobiol* 71, 249-267.

Deck, M., Lokmane, L., Chauvet, S., Mailhes, C., Keita, M., Niquille, M., Yoshida, M., Yoshida, Y., Lebrand, C., Mann, F., *et al.* (2013). Pathfinding of corticothalamic axons relies on a rendezvous with thalamic projections. *Neuron*.

DeDiego, I., Smith-Fernandez, A., and Fairen, A. (1994). Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats. *Eur J Neurosci* 6, 983-997.

Del Rio, J.A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., *et al.* (1997). A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385, 70-74.

Del Rio, J.A., Heimrich, B., Super, H., Borrell, V., Frotscher, M., and Soriano, E. (1996). Differential survival of Cajal-Retzius cells in organotypic cultures of hippocampus and neocortex. *J Neurosci* 16, 6896-6907.

del Río, J.A., Martínez, A., Fonseca, M., Auladell, C., and Soriano, E. (1995). Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb Cortex Jan-Feb;5(1):13-21*.

del Rio, J.A., and Soriano, E. (1989). Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 49, 311-317.

del Rio, J.A., and Soriano, E. (2010). Regenerating cortical connections in a dish: the entorhino-hippocampal organotypic slice co-culture as tool for pharmacological screening of molecules promoting axon regeneration. *Nat Protoc* 5, 217-226.

Del Rio, J.A., Soriano, E., and Ferrer, I. (1992). Development of GABA-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *J Comp Neurol* 326, 501-526.

del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J.S., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., Fukamizu, A., *et al.* (2010). Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* 116, 4025-4033.

Deller, T., Haas, C.A., and Frotscher, M. (2001). Sprouting in the hippocampus after entorhinal cortex lesion is layer- specific but not translaminal: which molecules may be involved? *Restor Neurol Neurosci* 19, 159-167.

Demarque, M., Represa, A., Becq, H., Khalilov, I., Ben-Ari, Y., and Aniksztejn, L. (2002). Paracrine intercellular communication by a Ca<sup>2+</sup>- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron* 36, 1051-1061.

Deng, W., Aimone, J.B., and Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11, 339-350.

Dent, E.W., Gupton, S.L., and Gertler, F.B. (2011). The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

Derer, P., and Nakanishi, S. (1983). Extracellular matrix distribution during neocortical wall

- ontogenesis in “normal” and “Reeler” mice. *J Hirnforsch* 24, 209-224.
- Dickson, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959-1964.
- Ding, J.B., Oh, W.J., Sabatini, B.L., and Gu, C. (2012). Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling controls pathway-specific synapse formation in the striatum. *Nat Neurosci* 15, 215-223.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.
- Donà, E., Barry, J.D., Valentin, G., Quirin, C., Khmelinskii, A., Kunze, A., Durdu, S., Newton, L.R., Fernandez-Minan, A., Huber, W., *et al.* (2013). Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. *Neuron* Nov 14;503(7475):285-9.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8, 1454-1468.
- Duveau, V., Laustela, S., Barth, L., Gianolini, F., Vogt, K.E., Keist, R., Chandra, D., Homanics, G.E., Rudolph, U., and Fritschy, J.M. (2011). Spatiotemporal specificity of GABAA receptor-mediated regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 34, 362-373.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.
- Ehm, O., Goritz, C., Covic, M., Schaffner, I., Schwarz, T.J., Karaca, E., Kempkes, B., Kremmer, E., Pfrieger, F.W., Espinosa, L., *et al.* (2010). RBPJkappa-dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* 30, 13794-13807.
- Ekdahl, C.T., Claasen, J.H., Bonde, S., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13632-13637.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.
- Esposito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., and Schinder, A.F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25, 10074-10086.
- Faulkner, R.L., Jang, M.H., Liu, X.B., Duan, X., Sailor, K.A., Kim, J.Y., Ge, S., Jones, E.G., Ming, G.L., Song, H., *et al.* (2008). Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14157-14162.
- Favaro, R., Valotta, M., Ferri, A.L., Latorre, E., Mariani, J., Giachino, C., Lancini, C., Tosetti, V., Ottolenghi, S., Taylor, V., *et al.* (2009). Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci* 12, 1248-1256.
- Felcht, M., Luck, R., Schering, A., Seidel, P., Srivastava, K., Hu, J., Bartol, A., Kienast, Y., Vettel, C., Loos, E.K., *et al.* (2012). Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J Clin Invest* 122, 1991-2005.

Fiedler, U., Scharpfenecker, M., Koidl, S., Hegen, A., Grunow, V., Schmidt, J.M., Kriz, W., Thurston, G., and Augustin, H.G. (2004). The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* 103, 4150-4156.

Flames, N., Pla, R., Gelman, D.M., Rubenstein, J.L., Puellas, L., and Marin, O. (2007). Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* 27, 9682-9695.

Flynn, K.C. (2013). The cytoskeleton and neurite initiation. *Bioarchitecture* 3, 86-109.

Fontana, X., Nacher, J., Soriano, E., and del Rio, J.A. (2006). Cell proliferation in the adult hippocampal formation of rodents and its modulation by entorhinal and fimbria-fornix afferents. *Cereb Cortex* 16, 301-312.

Forster, E., Tielsch, A., Saum, B., Weiss, K.H., Johanssen, C., Graus-Porta, D., Muller, U., and Frotscher, M. (2002). Reelin, Disabled 1, and beta 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13178-13183.

Fortress, A.M., Schram, S.L., Tuscher, J.J., and Frick, K.M. (2013). Canonical Wnt signaling is necessary for object recognition memory consolidation. *J Neurosci* 33, 12619-12626.

Freund, T.F., and Buzsaki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347-470.

Frotscher, M., Seress, L., Abraham, H., and Heimrich, B. (2001). Early generated Cajal-Retzius cells have different functions in cortical development. *Symp Soc Exp Biol*, 43-49.

Fukuhara, S., Sako, K., Minami, T., Noda, K., Kim, H.Z., Kodama, T., Shibuya, M., Takakura, N., Koh, G.Y., and Mochizuki, N. (2008). Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* 10, 513-526.

Fukumitsu, H., Furukawa, Y., Tsusaka, M., Kinukawa, H., Nitta, A., Nomoto, H., Mima, T., and Furukawa, S. (1998). Simultaneous expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in Cajal-Retzius, subplate and ventricular progenitor cells during early development stages of the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 84, 115-127.

Gant, J.C., Thibault, O., Blalock, E.M., Yang, J., Bachstetter, A., Kotick, J., Schauwecker, P.E., Hauser, K.F., Smith, G.M., Mervis, R., *et al.* (2009). Decreased number of interneurons and increased seizures in neuropilin 2 deficient mice: implications for autism and epilepsy. *Epilepsia* 50, 629-645.

Gao, Z., Ure, K., Ables, J.L., Lagace, D.C., Nave, K.A., Goebbels, S., Eisch, A.J., and Hsieh, J. (2009). Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci* 12, 1090-1092.

Gao, Z., Ure, K., Ding, P., Nashaat, M., Yuan, L., Ma, J., Hammer, R.E., and Hsieh, J. (2011). The master negative regulator REST/NRSF controls adult neurogenesis by restraining the neurogenic program in quiescent stem cells. *J Neurosci* 31, 9772-9786.

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

- Gay, C.M., Zygmunt, T., and Torres-Vazquez, J. (2011). Diverse functions for the semaphorin receptor PlexinD1 in development and disease. *Dev Biol* 349, 1-19.
- Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., and Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589-593.
- Ge, S., Yang, C.H., Hsu, K.S., Ming, G.L., and Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54, 559-566.
- Gebhardt, C., Del Turco, D., Drakew, A., Tielsch, A., Herz, J., Frotscher, M., and Deller, T. (2002). Abnormal positioning of granule cells alters afferent fiber distribution in the mouse fascia dentata: morphologic evidence from reeler, apolipoprotein E receptor 2-, and very low density lipoprotein receptor knockout mice. *J Comp Neurol* 445, 278-292.
- Gelman, D.M., and Marin, O. (2010). Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 31, 2136-2141.
- Gelman, D.M., Martini, F.J., Nobrega-Pereira, S., Pierani, A., Kessaris, N., and Marin, O. (2009). The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci* 29, 9380-9389.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., *et al.* (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161, 1163-1177.
- Giachino, C., Barz, M., Tchorz, J.S., Tome, M., Gassmann, M., Bischofberger, J., Bettler, B., and Taylor, V. (2014). GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABAB receptors. *Development* 141, 83-90.
- Giannoni, P., Arango-Lievano, M., Neves, I.D., Rousset, M.C., Baranger, K., Rivera, S., Jeanneteau, F., Claeysen, S., and Marchi, N. (2016). Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 88, 107-117.
- Gibson, J.R., Bartley, A.F., Hays, S.A., and Huber, K.M. (2008). Imbalance of neocortical excitation and inhibition and altered UP states reflect network hyperexcitability in the mouse model of fragile X syndrome. *J Neurophysiol* 100, 2615-2626.
- Giger, R.J., Urquhart, E.R., Gillespie, S.K., Levenson, D.V., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (1998). Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 21, 1079-1092.
- Gil, V., and del Rio, J.A. (2012). Analysis of axonal growth and cell migration in 3D hydrogel cultures of embryonic mouse CNS tissue. *Nat Protoc* 7, 268-280.
- Gilbert, S.F. (2000). *Developmental biology*.
- Gilthorpe, J.D., Papantoniou, E.K., Chedotal, A., Lumsden, A., and Wingate, R.J. (2002). The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. *Development* 129, 4719-4728.
- Glykys, J., and Mody, I. (2006). Hippocampal network hyperactivity after selective reduction of tonic inhibition in GABA A receptor alpha5 subunit-deficient mice. *J Neurophysiol* 95, 2796-2807.

- Godin, J.D., and Nguyen, L. (2014). Novel functions of core cell cycle regulators in neuronal migration. *Adv Exp Med Biol* 800, 59-74.
- Goncalves, J.T., Schafer, S.T., and Gage, F.H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167, 897-914.
- Gotz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777-788.
- Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8: 481-488.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C., and Muller, U. (2001). Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* 31, 367-379.
- Griveau, A., Borello, U., Causeret, F., Tissir, F., Boggetto, N., Karaz, S., and Pierani, A. (2010). A novel role for Dbx1-derived Cajal-Retzius cells in early regionalization of the cerebral cortical neuroepithelium. *PLoS Biol* 8, e1000440.
- Gu, C., Yoshida, Y., Livet, J., Reimert, D.V., Mann, F., Merte, J., Henderson, C.E., Jessell, T.M., Kolodkin, A.L., and Ginty, D.D. (2005). Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science* 307, 265-268.
- Gu, X., Liu, B., Wu, X., Yan, Y., Zhang, Y., Wei, Y., Pleasure, S.J., and Zhao, C. (2011). Inducible genetic lineage tracing of cortical hem derived Cajal-Retzius cells reveals novel properties. *PLoS One* 6, e28653.
- Gupta, A., Tsai, L., and Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3(5):342-355.
- Hamani, C., Paulo, I., and Mello, L.E. (2005). Neo-Timm staining in the thalamus of chronically epileptic rats. *Braz J Med Biol Res* 38, 1677-1682.
- Hashimoto, T., Lam, T., Boudreau, N.J., Bollen, A.W., Lawton, M.T., and Young, W.L. (2001). Abnormal balance in the angiotensin-ii system in human brain arteriovenous malformations. *Circ Res* 89, 111-113.
- Hatten, M.E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22, 511-539.
- Hatten, M.E. (2002). New directions in neuronal migration. *Science* 297, 1660-1663.
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W.B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3196-3201.
- Haug, F.M. (1974). Light microscopical mapping of the hippocampal region, the pyriform cortex and the corticomedial amygdaloid nuclei of the rat with Timm's sulphide silver method. I. Area dentata, hippocampus and subiculum. *Z Anat Entwicklungsgesch* 145, 1-27.
- He, Z., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent

Semaphorin III. *Cell* 90, 739-751.

Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O.G., and Melton, D.A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77, 283-295.

Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D. (1997). Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise. *Cell* 88, 13-17.

Hernandez-Miranda, L.R., Parnavelas, J.G., and Chiara, F. (2010). Molecules and mechanisms involved in the generation and migration of cortical interneurons. *ASN Neuro* 2, e00031.

Hevner, R.F., Daza, R.A., Englund, C., Kohtz, J., and Fink, A. (2004). Postnatal shifts of interneuron position in the neocortex of normal and reeler mice: evidence for inward radial migration. *Neuroscience* 124, 605-618.

Hevner, R.F., Daza, R.A., Rubenstein, J.L., Stunnenberg, H., Olavarria, J.F., and Englund, C. (2003). Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons. *Dev Neurosci* 25, 139-151.

Hitti, F.L., and Siegelbaum, S.A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature* 508, 88-92.

Hodge, R.D., Kowalczyk, T.D., Wolf, S.A., Encinas, J.M., Rippey, C., Enikolopov, G., Kempermann, G., and Hevner, R.F. (2008). Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *J Neurosci* 28, 3707-3717.

Hodge, R.D., Nelson, B.R., Kahoud, R.J., Yang, R., Mussar, K.E., Reiner, S.L., and Hevner, R.F. (2012). Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *J Neurosci* 32, 6275-6287.

Holl, E.K., O'Connor, B.P., Holl, T.M., Roney, K.E., Zimmermann, A.G., Jha, S., Kelsoe, G., and Ting, J.P. (2011). Plexin-D1 is a novel regulator of germinal centers and humoral immune responses. *J Immunol* 186, 5603-5611.

Honma, Y., Araki, T., Gianino, S., Bruce, A., Heuckeroth, R., Johnson, E., and Milbrandt, J. (2002). Artemin is a vascular-derived neurotropic factor for developing sympathetic neurons. *Neuron* 35, 267-282.

Hsieh, J., Aimone, J.B., Kaspar, B.K., Kuwabara, T., Nakashima, K., and Gage, F.H. (2004). IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol* 164, 111-122.

Huber, A.B., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., and Cloutier, J.F. (2003). Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci* 26, 509-563.

Huo, Q., Chen, M., He, Q., Zhang, J., Li, B., Jin, K., Chen, X., Long, C., and Yang, L. (2016). Prefrontal Cortical GABAergic Dysfunction Contributes to Aberrant UP-State Duration in APP Knockout Mice. *Cereb Cortex*.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.

Imayoshi, I., Isomura, A., Harima, Y., Kawaguchi, K., Kori, H., Miyachi, H., Fujiwara, T., Ishidate, F., and Kageyama, R. (2013). Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science* *342*, 1203-1208.

Imayoshi, I., and Kageyama, R. (2014). bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells. *Neuron* *82*, 9-23.

Imayoshi, I., Shimogori, T., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008). Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. *Development* *135*, 2531-2541.

Isaacson, R.L., and Pribram, K.H. (1975). *The Hippocampus* (New York: Plenum Press).

Ishii, H., Kubo, T., Kumanogoh, A., and Yamashita, T. (2010). Th1 cells promote neurite outgrowth from cortical neurons via a mechanism dependent on semaphorins. *Biochem Biophys Res Commun* *402*, 168-172.

Itou, Y., Nochi, R., Kuribayashi, H., Saito, Y., and Hisatsune, T. (2011). Cholinergic activation of hippocampal neural stem cells in aged dentate gyrus. *Hippocampus* *21*, 446-459.

Iwano, T., Masuda, A., Kiyonari, H., Enomoto, H., and Matsuzaki, F. (2012). Prox1 postmitotically defines dentate gyrus cells by specifying granule cell identity over CA3 pyramidal cell fate in the hippocampus. *Development* *139*, 3051-3062.

Javaherian, A., and Kriegstein, A. (2009). A stem cell niche for intermediate progenitor cells of the embryonic cortex. *Cereb Cortex* *19 Suppl 1*, i70-77.

Jeltsch, M., Leppanen, V.M., Saharinen, P., and Alitalo, K. (2013). Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *5*.

Jin, K., Mao, X.O., and Greenberg, D.A. (2006). Vascular endothelial growth factor stimulates neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling. *J Neurobiol* *66*, 236-242.

Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 11946-11950.

Jongbloets, B.C., and Pasterkamp, R.J. (2014). Semaphorin signalling during development. *Development* *141*, 3292-3297.

Kalil, K., and Dent, E.W. (2005). Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Curr Opin Neurobiol* *15*, 521-526.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessel, T.M. (2000). *Principles of neural science*.

Kang, W., and Hebert, J.M. (2015). FGF Signaling Is Necessary for Neurogenesis in Young Mice and Sufficient to Reverse Its Decline in Old Mice. *J Neurosci* *35*, 10217-10223.

Kater, S.B., and Rehder, V. (1995). The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr Opin Neurobiol* *5*, 68-74.

Kempermann, G., Song, H., and Gage, F.H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a018812.

Kerr, K.M., Agster, K.L., Furtak, S.C., and Burwell, R.D. (2007). Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* 17, 697-708.

Khalaf-Nazzal, R., and Francis, F. (2013). Hippocampal development - old and new findings. *Neuroscience* 248, 225-242.

Kim, H.J., Denli, A.M., Wright, R., Baul, T.D., Clemenson, G.D., Morcos, A.S., Zhao, C., Schafer, S.T., Gage, F.H., and Kagalwala, M.N. (2015). REST Regulates Non-Cell-Autonomous Neuronal Differentiation and Maturation of Neural Progenitor Cells via Secretogranin II. *J Neurosci* 35, 14872-14884.

Kim, M., Allen, B., Korhonen, E.A., Nitschke, M., Yang, H.W., Baluk, P., Saharinen, P., Alitalo, K., Daly, C., Thurston, G., *et al.* (2016). Opposing actions of angiopoietin-2 on Tie2 signaling and FOXO1 activation. *J Clin Invest* 126, 3511-3525.

Kishi, M., Mizuseki, K., Sasai, N., Yamazaki, H., Shiota, K., Nakanishi, S., and Sasai, Y. (2000). Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* 127, 791-800.

Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A.J., Jung, H.Y., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., *et al.* (2014). Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat Neurosci* 17, 269-279.

Kokoeva, M.V., Yin, H., and Flier, J.S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310, 679-683.

Kolm, P.J., Apekin, V., and Sive, H. (1997). *Xenopus* hindbrain patterning requires retinoid signaling. *Dev Biol* 192, 1-16.

Kolodkin, A.L., Levengood, D.V., Rowe, E.G., Tai, Y.T., Giger, R.J., and Ginty, D.D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753-762.

Kolodkin, A.L., and Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

Komuro, H., Yacubova, E., Yacubova, E., and Rakic, P. (2001). Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci* 21, 527-540.

Kosacka, J., Figiel, M., Engele, J., Hilbig, H., Majewski, M., and Spanel-Borowski, K. (2005). Angiopoietin-1 promotes neurite outgrowth from dorsal root ganglion cells positive for Tie-2 receptor. *Cell Tissue Res* 320, 11-19.

Kosacka, J., Nowicki, M., Kacza, J., Borlak, J., Engele, J., and Spanel-Borowski, K. (2006). Adipocyte-derived angiopoietin-1 supports neurite outgrowth and synaptogenesis of sensory neurons. *J Neurosci Res* 83, 1160-1169.

Kostovic, I., and Rakic, P. (1980). Cytology and time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon. *J Neurocytol* 9, 219-242.

- Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R.A., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W.B., and Hevner, R.F. (2009). Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb Cortex* *19*, 2439-2450.
- Krauss, S., Concordet, J.P., and Ingham, P.W. (1993). A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*.
- Kroll, K.L., Salic, A.N., Evans, L.M., and Kirschner, M.W. (1998). Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development* *125*, 3247-3258.
- Kruger, R.P., Aurandt, J., and Guan, K.L. (2005). Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 789-800.
- Kupferman, J.V., Basu, J., Russo, M.J., Guevarra, J., Cheung, S.K., and Siegelbaum, S.A. (2014). Reelin signaling specifies the molecular identity of the pyramidal neuron distal dendritic compartment. *Cell* *158*, 1335-1347.
- Kusakawa, Y., Mikawa, S., and Sato, K. (2015). BMP5 expression in the adult rat brain. *Neuroscience* *284*, 972-987.
- Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D.C., Moore, L., Nakashima, K., Asashima, M., and Gage, F.H. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci* *12*, 1097-1105.
- Kwon, H.J., Ma, S., and Huang, Z. (2011). Radial glia regulate Cajal-Retzius cell positioning in the early embryonic cerebral cortex. *Dev Biol* *351*, 25-34.
- Lai, K., Kaspar, B.K., Gage, F.H., and Schaffer, D.V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* *6*, 21-27.
- Lamb, T.M., Knecht, A.K., Smith, W.C., Stachel, S.E., Economides, A.N., Stahl, N., Yancopoulos, G.D., and Harland, R.M. (1993). Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* *262*, 713-718.
- Laurberg, S., and Zimmer, J. (1981). Lesion-induced sprouting of hippocampal mossy fiber collaterals to the fascia dentata in developing and adult rats. *J Comp Neurol* *200*, 433-459.
- Lavado, A., Lagutin, O.V., Chow, L.M., Baker, S.J., and Oliver, G. (2010). Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. *PLoS Biol* *8*.
- Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V., and Parnavelas, J.G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* *19*, 7881-7888.
- Lehtinen, M.K., and Walsh, C.A. (2011). Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu Rev Cell Dev Biol* *27*, 653-679.
- Lehtinen, M.K., Zappaterra, M.W., Chen, X., Yang, Y.J., Hill, A.D., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez,

- D., Kim, S., Ye, P., *et al.* (2011). The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron* 69, 893-905.
- Li, G., Fang, L., Fernandez, G., and Pleasure, S.J. (2013). The ventral hippocampus is the embryonic origin for adult neural stem cells in the dentate gyrus. *Neuron* 78, 658-672.
- Li, Y., Aimone, J.B., Xu, X., Callaway, E.M., and Gage, F.H. (2012a). Development of GABAergic inputs controls the contribution of maturing neurons to the adult hippocampal network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 4290-4295.
- Li, Y., Luikart, B.W., Birnbaum, S., Chen, J., Kwon, C.H., Kernie, S.G., Bassel-Duby, R., and Parada, L.F. (2008). TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* 59, 399-412.
- Li, Y.N., Radner, S., French, M.M., Pinzon-Duarte, G., Daly, G.H., Burgeson, R.E., Koch, M., and Brunken, W.J. (2012b). The gamma3 chain of laminin is widely but differentially expressed in murine basement membranes: expression and functional studies. *Matrix Biol* 31, 120-134.
- Libby, R.T., Champlaud, M.F., Claudepierre, T., Xu, Y., Gibbons, E.P., Koch, M., Burgeson, R.E., Hunter, D.D., and Brunken, W.J. (2000). Laminin expression in adult and developing retinae: evidence of two novel CNS laminins. *J Neurosci* 20, 6517-6528.
- Lie, D.C., Colamarino, S.A., Song, H.J., Desire, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E.S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A.R., *et al.* (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437, 1370-1375.
- Liem, K.F., Jr., Tremml, G., and Jessell, T.M. (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91, 127-138.
- Liem, K.F., Jr., Tremml, G., Roelink, H., and Jessell, T.M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969-979.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978-981.
- Lopez-Bendito, G., Cautinat, A., Sanchez, J.A., Bielle, F., Flames, N., Garratt, A.N., Talmage, D.A., Role, L.W., Charnay, P., Marin, O., *et al.* (2006). Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* 125, 127-142.
- Lorente de Nó, R. (1933). Studies on the structure of the cerebral cortex. *J Psychol Neurol* 45, 381-438.
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 46, 113-177.
- Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 1, 173-180.
- Luo, R., Jeong, S.J., Jin, Z., Strokes, N., Li, S., and Piao, X. (2011). G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination. *Proc*

Natl Acad Sci U S A *108*, 12925-12930.

Luskin, M.B., and Shatz, C.J. (1985). Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones. *J Neurosci* *5*, 1062-1075.

Lynch, G., Muller, D., Seubert, P., and Larson, J. (1988). Long-term potentiation: persisting problems and recent results. *Brain Res Bull* *21*, 363-372.

Magagna-Poveda, A., Moretto, J.N., and Scharfman, H.E. (2017). Increased gyrification and aberrant adult neurogenesis of the dentate gyrus in adult rats. *Brain Struct Funct*.

Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R.F., Wiegand, S.J., Furth, M.E., Lindsay, R.M., and Yancopoulos, G.D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* *5*, 501-509.

Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., *et al.* (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* *277*, 55-60.

Malatesta, P., Hack, M.A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., and Gotz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* *37*, 751-764.

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

Mancuso, M.R., Kuhnert, F., and Kuo, C.J. (2008). Developmental angiogenesis of the central nervous system. *Lymphat Res Biol* *6*, 173-180.

Mann, F., Chauvet, S., and Rougon, G. (2007). Semaphorins in development and adult brain: Implication for neurological diseases. *Prog Neurobiol* *82*, 57-79.

Marin-Padilla, M. (1985). Early vascularization of the embryonic cerebral cortex: Golgi and electron microscopic studies. *J Comp Neurol* *241*, 237-249.

Marin-Padilla, M. (1998). Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* *21*, 64-71.

Marin, O. (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur J Neurosci* *38*, 2019-2029.

Marin, O., and Rubenstein, J.L. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* *26*, 441-483.

Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* *293*, 872-875.

Marshall, H., Nonchev, S., Sham, M.H., Muchamore, I., Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1992). Retinoic acid alters hindbrain Hox code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. *Nature* *360*, 737-741.

Martinez, A., and Soriano, E. (2005). Functions of ephrin/Eph interactions in the development

of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Brain Res Rev* 49, 211-226.

Martínez, S., Puelles, E., Puelles, L., and Echevarria, E. (2012). Molecular regionalization of the developing neural tube. *The mouse nervous system*.

Martini, F.J., Valiente, M., Lopez Bendito, G., Szabo, G., Moya, F., Valdeolillos, M., and Marin, O. (2009). Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* 136, 41-50.

Masiulis, I., Yun, S., and Eisch, A.J. (2011). The interesting interplay between interneurons and adult hippocampal neurogenesis. *Mol Neurobiol* 44, 287-302.

Mathews, E.A., Morgenstern, N.A., Piatti, V.C., Zhao, C., Jessberger, S., Schinder, A.F., and Gage, F.H. (2010). A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 518, 4479-4490.

Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 446-454.

McGrew, L.L., Hoppler, S., and Moon, R.T. (1997). Wnt and FGF pathways cooperatively pattern anteroposterior neural ectoderm in *Xenopus*. *Mech Dev* 69, 105-114.

Memi, F., Abe, P., Cariboni, A., MacKay, F., Parnavelas, J.G., and Stumm, R. (2013). CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) affects the migration of GnRH neurons by regulating CXCL12 availability. *J Neurosci* 33, 17527-17537.

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

Mira, H., Andreu, Z., Suh, H., Lie, D.C., Jessberger, S., Consiglio, A., San Emeterio, J., Hortiguera, R., Marques-Torrejon, M.A., Nakashima, K., *et al.* (2010). Signaling through BMPRII regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7, 78-89.

Mitchell, J., Gatherer, M., and Sundstrom, L.E. (1996). Aberrant Timm-stained fibres in the dentate gyrus following tetanus toxin-induced seizures in the rat. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22, 129-135.

Mitsushima, D., Takase, K., Funabashi, T., and Kimura, F. (2009). Gonadal steroids maintain 24 h acetylcholine release in the hippocampus: organizational and activational effects in behaving rats. *J Neurosci* 29, 3808-3815.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31, 727-741.

Mizuseki, K., Kishi, M., Matsui, M., Nakanishi, S., and Sasai, Y. (1998a). *Xenopus* Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development* 125, 579-587.

Mizuseki, K., Kishi, M., Shiota, K., Nakanishi, S., and Sasai, Y. (1998b). SoxD: an essential mediator of induction of anterior neural tissues in *Xenopus* embryos. *Neuron* 21, 77-85.

- Moffat, J.J., Ka, M., Jung, E.M., and Kim, W.Y. (2015). Genes and brain malformations associated with abnormal neuron positioning. *Mol Brain* 8, 72.
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Fame, R.M., MacDonald, J.L., MacQuarrie, K.L., and Macklis, J.D. (2009). Novel subtype-specific genes identify distinct subpopulations of callosal projection neurons. *J Neurosci* 29, 12343-12354.
- Moody, S.A., Klein, S.L., Karpinski, B.A., Maynard, T.M., and Lamantia, A.S. (2013). On becoming neural: what the embryo can tell us about differentiating neural stem cells. *Am J Stem Cells* 2, 74-94.
- Moore, J.O., Lemmon, M.A., and Ferguson, K.M. (2017). Dimerization of Tie2 mediated by its membrane-proximal FNIII domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 4382-4387.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.
- Movassagh, H., Shan, L., Halayko, A.J., Roth, M., Tamm, M., Chakir, J., and Gounni, A.S. (2014). Neuronal chemorepellent Semaphorin 3E inhibits human airway smooth muscle cell proliferation and migration. *J Allergy Clin Immunol* 133, 560-567.
- Mueller, B.K. (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* 22, 351-388.
- Nadarajah, B., and Parnavelas, J.G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3, 423-432.
- Nakahira, E., and Yuasa, S. (2005). Neuronal generation, migration, and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. *J Comp Neurol* 483, 329-340.
- Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J., and Mikoshiba, K. (1997). *Xenopus* Zic3, a primary regulator both in neural and neural crest development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11980-11985.
- Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J., and Mikoshiba, K. (1998). *Xenopus* Zic family and its role in neural and neural crest development. *Mech Dev* 75, 43-51.
- Niclou, S.P., Franssen, E.H., Ehlert, E.M., Taniguchi, M., and Verhaagen, J. (2003). Meningeal cell-derived semaphorin 3A inhibits neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 24, 902-912.
- Niewmierzycka, A., Mills, J., St-Arnaud, R., Dedhar, S., and Reichardt, L.F. (2005). Integrin-linked kinase deletion from mouse cortex results in cortical lamination defects resembling cobblestone lissencephaly. *J Neurosci* 25, 7022-7031.
- Nikolopoulou, E., Galea, G.L., Rolo, A., Greene, N.D., and Copp, A.J. (2017). Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development* 144, 552-566.
- Niu, W., Zou, Y., Shen, C., and Zhang, C.L. (2011). Activation of postnatal neural stem cells requires nuclear receptor TLX. *J Neurosci* 31, 13816-13828.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., and Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714-720.

- Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7, 136-144.
- Nottebohm, F., Stokes, T.M., and Leonard, C.M. (1976). Central control of song in the canary, *Serinus canarius*. *J Comp Neurol* 165, 457-486.
- Nourhaghighi, N., Teichert-Kuliszewska, K., Davis, J., Stewart, D.J., and Nag, S. (2003). Altered expression of angiopoietins during blood-brain barrier breakdown and angiogenesis. *Lab Invest* 83, 1211-1222.
- O'Keefe, J., and Conway, D.H. (1978). Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res* 31, 573-90.
- O'Keefe, J., and Speakman, A. (1987). Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Exp Brain Res* 68, 1-27.
- Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., and 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.
- Oh, W.J., and Gu, C. (2013). The role and mechanism-of-action of Sema3E and Plexin-D1 in vascular and neural development. *Semin Cell Dev Biol* 24, 156-162.
- Okamoto, M., Inoue, K., Iwamura, H., Terashima, K., Soya, H., Asashima, M., and Kuwabara, T. (2011). Reduction in paracrine Wnt3 factors during aging causes impaired adult neurogenesis. *FASEB J* 25, 3570-3582.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R., and Gage, F.H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425, 479-494.
- Panchision, D.M., and McKay, R.D. (2002). The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 12, 478-487.
- Paredes, M.F., Li, G., Berger, O., Baraban, S.C., and Pleasure, S.J. (2006). Stromal-derived factor-1 (CXCL12) regulates laminar position of Cajal-Retzius cells in normal and dysplastic brains. *J Neurosci* 26, 9404-9412.
- Parent, J.M. (2007). Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163, 529-540.
- Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H., Sloviter, R.S., and Lowenstein, D.H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17, 3727-3738.
- Paridaen, J.T., and Huttner, W.B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep* 15, 351-364.
- Paridaen, J.T., Wilsch-Brauninger, M., and Huttner, W.B. (2013). Asymmetric inheritance of centrosome-associated primary cilium membrane directs ciliogenesis after cell division. *Cell* 155, 333-344.

Parnavelas, J.G., and Edmunds, S.M. (1983). Further evidence that Retzius-Cajal cells transform to nonpyramidal neurons in the developing rat visual cortex. *J Neurocytol* *12*, 863-871.

Pascual, M., Pozas, E., Barallobre, M.J., Tessier-Lavigne, M., and Soriano, E. (2004). Coordinated functions of Netrin-1 and Class 3 secreted Semaphorins in the guidance of reciprocal septohippocampal connections. *Mol Cell Neurosci* *26*, 24-33.

Pasterkamp, R.J., and Giger, R.J. (2009). Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr Opin Neurobiol* *19*, 263-274.

Pasterkamp, R.J., and Verhaagen, J. (2006). Semaphorins in axon regeneration: developmental guidance molecules gone wrong? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *361*, 1499-1511.

Paxinos, G., and Franklin, K. (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* Academic Press.

Penzel, R., Oschwald, R., Chen, Y., Tacke, L., and Grunz, H. (1997). Characterization and early embryonic expression of a neural specific transcription factor xSOX3 in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* *41*, 667-677.

Pettit, D.L., and Augustine, G.J. (2000). Distribution of functional glutamate and GABA receptors on hippocampal pyramidal cells and interneurons. *J Neurophysiol* *84*, 28-38.

Peyre, E., Silva, C.G., and Nguyen, L. (2015). Crosstalk between intracellular and extracellular signals regulating interneuron production, migration and integration into the cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., and De Robertis, E.M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* *397*, 707-710.

Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., and Jessell, T.M. (1999). A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* *97*, 903-915.

Pietila, R., Natynki, M., Tammela, T., Kangas, J., Pulkki, K.H., Limaye, N., Vikkula, M., Koh, G.Y., Saharinen, P., Alitalo, K., *et al.* (2012). Ligand oligomerization state controls Tie2 receptor trafficking and angiopoietin-2-specific responses. *J Cell Sci* *125*, 2212-2223.

Pleasure, S.J., Anderson, S., Hevner, R., Bagri, A., Marin, O., Lowenstein, D.H., and Rubenstein, J.L. (2000). Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* *28*, 727-740.

Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* *146*, 873-887.

Pownall, M.E., Tucker, A.S., Slack, J.M., and Isaacs, H.V. (1996). eFGF, Xcad3 and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. *Development* *122*, 3881-3892.

Pozas, E., Pascual, M., Nguyen Ba-Charvet, K.T., Guijarro, P., Sotelo, C., Chedotal, A., Del Rio, J.A., and Soriano, E. (2001). Age-dependent effects of secreted Semaphorins 3A, 3F, and 3E on

developing hippocampal axons: in vitro effects and phenotype of Semaphorin 3A (-/-) mice. *Mol Cell Neurosci* 18, 26-43.

Puelles, L., and Rubenstein, J.L. (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16, 472-479.

Purves, D., Augustine, G.A., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., and Williams, S.M. (2001). *Neuroscience*. Sinauer Associates, Inc Sunderland Massachusetts.

Qu, Q., Sun, G., Li, W., Yang, S., Ye, P., Zhao, C., Yu, R.T., Gage, F.H., Evans, R.M., and Shi, Y. (2010). Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat Cell Biol* 12, 31-40; sup pp 31-39.

Quaegebeur, A., Lange, C., and Carmeliet, P. (2011). The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 71, 406-424.

Radley, J.J., and Jacobs, B.L. (2002). 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res* 955, 264-267.

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145, 61-83.

Ramón y Cajal, S. (1911). *Histologie du système nerveus de l'homme et des vestrebes*. ParisMaloine.

Ramón y Cajal, S. (1981). Sur la structure de l'écorce cérébrale de quelques mammiferes. *La Cellule* 7:125-78.

Raper, J.A., Bastiani, M.J., and Goodman, C.S. (1983). Guidance of neuronal growth cones: selective fasciculation in the grasshopper embryo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 2, 587-598.

Reiss, Y. (2010). Angiopoietins. *Recent Results Cancer Res* 180, 3-13.

Ribak, C.E., and Peterson, G.M. (1991). Intragranular mossy fibers in rats and gerbils form synapses with the somata and proximal dendrites of basket cells in the dentate gyrus. *Hippocampus* 1, 355-364.

Ribak, C.E., Vaughn, J.E., and Saito, K. (1978). Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res* 140, 315-332.

Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* 16, 522-529.

Ringstedt, T., Linnarsson, S., Wagner, J., Lendahl, U., Kokaia, Z., Arenas, E., Ernfors, P., and Ibanez, C.F. (1998). BDNF regulates reelin expression and Cajal-Retzius cell development in the cerebral cortex. *Neuron* 21, 305-315.

Robichaux, M.A., and Cowan, C.W. (2013). Signaling mechanisms of axon guidance and early synaptogenesis. *Curr Top Behav Neurosci* 16, 19-48.

Rogers, C., Moody, S., and Casey, E. (2009). Neural induction and factors that stabilize a neural fate. *Birth Defects Res C Embryo Today*.

Rohm, B., Ottemeyer, A., Lohrum, M., and Puschel, A.W. (2000). Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech Dev* 93, 95-104.

Rosa, A.I., Goncalves, J., Cortes, L., Bernardino, L., Malva, J.O., and Agasse, F. (2010). The angiogenic factor angiopoietin-1 is a proneurogenic peptide on subventricular zone stem/progenitor cells. *J Neurosci* 30, 4573-4584.

Rubin, A.N., Alfonsi, F., Humphreys, M.P., Choi, C.K., Rocha, S.F., and Kessar, N. (2010). The germinal zones of the basal ganglia but not the septum generate GABAergic interneurons for the cortex. *J Neurosci* 30, 12050-12062.

Rubio, S.E., Martinez, A., Chauvet, S., Mann, F., Soriano, E., and Pascual, M. (2011). Semaphorin 3C is not required for the establishment and target specificity of the GABAergic septohippocampal pathway in vitro. *Eur J Neurosci* 34, 1923-1933.

Ruhrberg, C., and Bautsch, V.L. (2013). Neurovascular development and links to disease. *Cell Mol Life Sci* 70, 1675-1684.

Ruiz-Mejias, M., Martinez de Lagran, M., Mattia, M., Castano-Prat, P., Perez-Mendez, L., Ciria-Suarez, L., Gener, T., Sancristobal, B., Garcia-Ojalvo, J., Gruart, A., *et al.* (2016). Overexpression of Dyrk1A, a Down Syndrome Candidate, Decreases Excitability and Impairs Gamma Oscillations in the Prefrontal Cortex. *J Neurosci* 36, 3648-3659.

Ruiz i Altaba, A., Placzek, M., Baldassare, M., Dodd, J., and Jessel, T.M. (1995). Early stages of notochord and floor plate development in the chick embryo defined by normal and induced expression of HNF-3 beta. *Dev Biol* 170, 299-313.

Ryder, E.F., and Cepko, C.L. (1994). Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* 12, 1011-1028.

Rymar, V.V., and Sadikot, A.F. (2007). Laminar fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype. *J Comp Neurol* 501, 369-380.

Sabag, A.D., Bode, J., Fink, D., Kigel, B., Kugler, W., and Neufeld, G. (2012). Semaphorin-3D and semaphorin-3E inhibit the development of tumors from glioblastoma cells implanted in the cortex of the brain. *PLoS One* 7, e42912.

Saharinen, P., Eklund, L., Miettinen, J., Wirkkala, R., Anisimov, A., Winderlich, M., Nottebaum, A., Vestweber, D., Deutsch, U., Koh, G.Y., *et al.* (2008). Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol* 10, 527-537.

Sahay, A., Kim, C.H., Sepkuty, J.P., Cho, E., Huganir, R.L., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (2005). Secreted semaphorins modulate synaptic transmission in the adult hippocampus. *J Neurosci* 25, 3613-3620.

Sahay, A., Molliver, M.E., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (2003). Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J Neurosci* 23, 6671-6680.

- Sainath, R., and Gallo, G. (2015). Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. *Cell Tissue Res* 359, 267-278.
- Salajegheh, A. (2016). Angiopoietins. *Angiogenesis in Health, Disease and Malignancy Springer International Publishing Switzerland*.
- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-Garcia Verdugo, J., *et al.* (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740-744.
- Sanchez-Alcaniz, J.A., Haege, S., Mueller, W., Pla, R., Mackay, F., Schulz, S., Lopez-Bendito, G., Stumm, R., and Marin, O. (2011). Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron* 69, 77-90.
- Sanchez-Vives, M.V., and McCormick, D.A. (2000). Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3, 1027-1034.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., and De Robertis, E.M. (1995). Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 376, 333-336.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K., and De Robertis, E.M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79, 779-790.
- Savaskan, N.E., and Nitsch, R. (2001). Molecules involved in reactive sprouting in the hippocampus. *Rev Neurosci* 12, 195-215.
- Schanzer, A., Wachs, F.P., Wilhelm, D., Acker, T., Cooper-Kuhn, C., Beck, H., Winkler, J., Aigner, L., Plate, K.H., and Kuhn, H.G. (2004). Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 14, 237-248.
- Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C., and Croll, S. (2005). Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol* 192, 348-356.
- Schwegler, H., Crusio, W.E., and Brust, I. (1990). Hippocampal mossy fibers and radial-maze learning in the mouse: a correlation with spatial working memory but not with non-spatial reference memory. *Neuroscience* 34, 293-298.
- Seegar, T.C., Eller, B., Tzvetkova-Robev, D., Kolev, M.V., Henderson, S.C., Nikolov, D.B., and Barton, W.A. (2010). Tie1-Tie2 interactions mediate functional differences between angiopoietin ligands. *Mol Cell* 37, 643-655.
- Segal, M., and Olds, J. (1972). Behavior of units in hippocampal circuit of the rat during learning. *J Neurophysiol* 35, 680-690.
- Segklia, A., Seuntjens, E., Elkouris, M., Tsalavos, S., Stappers, E., Mitsiadis, T.A., Huylebroeck, D., Remboutsika, E., and Graf, D. (2012). Bmp7 regulates the survival, proliferation, and neurogenic properties of neural progenitor cells during corticogenesis in the mouse. *PLoS One* 7, e34088.
- Segura, I., De Smet, F., Hohensinner, P.J., Ruiz de Almodovar, C., and Carmeliet, P. (2009). The

neurovascular link in health and disease: an update. *Trends Mol Med* 15, 439-451.

Seib, D.R., Corsini, N.S., Ellwanger, K., Plaas, C., Mateos, A., Pitzer, C., Niehrs, C., Celikel, T., and Martin-Villalba, A. (2013). Loss of Dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline. *Cell Stem Cell* 12, 204-214.

Seo, S., Herr, A., Lim, J.W., Richardson, G.A., Richardson, H., and Kroll, K.L. (2005). Geminin regulates neuronal differentiation by antagonizing Brg1 activity. *Genes Dev* 19, 1723-1734.

Seo, S., and Kroll, K.L. (2006). Geminin's double life: chromatin connections that regulate transcription at the transition from proliferation to differentiation. *Cell Cycle* 5, 374-379.

Seress, L., and Ribak, C.E. (1984). Direct commissural connections to the basket cells of the hippocampal dentate gyrus: anatomical evidence for feed-forward inhibition. *J Neurocytol* 13, 215-225.

Shattil, S.J., Kim, C., and Ginsberg, M.H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 288-300.

Shearer, M.C., Niclou, S.P., Brown, D., Asher, R.A., Holtmaat, A.J., Levine, J.M., Verhaagen, J., and Fawcett, J.W. (2003). The astrocyte/meningeal cell interface is a barrier to neurite outgrowth which can be overcome by manipulation of inhibitory molecules or axonal signalling pathways. *Mol Cell Neurosci* 24, 913-925.

Sheng, G., dos Reis, M., and Stern, C.D. (2003). Churchill, a zinc finger transcriptional activator, regulates the transition between gastrulation and neurulation. *Cell* 115, 603-613.

Shimakawa, S., Suzuki, S., Miyamoto, R., Takitani, K., Tanaka, K., Tanabe, T., Wakamiya, E., Nakamura, F., Kuno, M., Matsuura, S., *et al.* (2002). Neuropilin-2 is overexpressed in the rat brain after limbic seizures. *Brain Res* 956, 67-73.

Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008). Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* 58, 52-64.

Shimozaki, K., Zhang, C.L., Suh, H., Denli, A.M., Evans, R.M., and Gage, F.H. (2012). SRY-box-containing gene 2 regulation of nuclear receptor tailless (Tlx) transcription in adult neural stem cells. *J Biol Chem* 287, 5969-5978.

Sidman, R.L., and Rakic, P. (1973). Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 62, 1-35.

Siegenthaler, J.A., Ashique, A.M., Zarbalis, K., Patterson, K.P., Hecht, J.H., Kane, M.A., Folias, A.E., Choe, Y., May, S.R., Kume, T., *et al.* (2009). Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell* 139, 597-609.

Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7, 483-495.

Sievers, J., Pehlemann, F.W., Gude, S., and Berry, M. (1994). Meningeal cells organize the superficial glia limitans of the cerebellum and produce components of both the interstitial matrix and the basement membrane. *J Neurocytol* 23, 135-149.

- Simeone, A., Avantaggiato, V., Moroni, M.C., Mavilio, F., Arra, C., Cotelli, F., Nigro, V., and Acampora, D. (1995). Retinoic acid induces stage-specific antero-posterior transformation of rostral central nervous system. *Mech Dev* 51, 83-98.
- Simoës-Costa, M., and Bronner, M.E. (2015). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development* 142, 242-257.
- Singh, H., Tahir, T.A., Alawo, D.O., Issa, E., and Brindle, N.P. (2011). Molecular control of angiopoietin signalling. *Biochem Soc Trans* 39, 1592-1596.
- Skutella, T., and Nitsch, R. (2001). New molecules for hippocampal development. *Trends Neurosci* 24, 107-113.
- Smith, A.S., Williams Avram, S.K., Cymerblit-Sabba, A., Song, J., and Young, W.S. (2016). Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Mol Psychiatry* 21, 1137-1144.
- Smith, D., Wagner, E., Koul, O., McCaffery, P., and Drager, U.C. (2001). Retinoic acid synthesis for the developing telencephalon. *Cereb Cortex* 11, 894-905.
- Smith, J.L., and Schoenwolf, G.C. (1998). Getting organized: new insights into the organizer of higher vertebrates. *Curr Top Dev Biol* 40, 79-110.
- Smith, W.C., and Harland, R.M. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70, 829-840.
- Smith, W.C., Knecht, A.K., Wu, M., and Harland, R.M. (1993). Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing *Xenopus* mesoderm. *Nature* 361, 547-549.
- Sobue, K. (1993). Actin-based cytoskeleton in growth cone activity. *Neurosci Res* 18, 91-102.
- Sondell, M., Lundborg, G., and Kanje, M. (1999). Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 19, 5731-5740.
- Sondell, M., Sundler, F., and Kanje, M. (2000). Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci* 12, 4243-4254.
- Song, H.J., and Poo, M.M. (1999). Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr Opin Neurobiol* 9, 355-363.
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M.A., Sun, G.J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z.J., Ge, S., Enikolopov, G., *et al.* (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489, 150-154.
- Soriano, E., Alvarado-Mallart, R.M., Dumesnil, N., Del Rio, J.A., and 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.
- Soriano, E., Cobas, A., and Fairen, A. (1986). Asynchronism in the neurogenesis of GABAergic and non-GABAergic neurons in the mouse hippocampus. *Brain Res* 395, 88-92.

Soriano, E., Cobas, A., and Fairen, A. (1989a). Neurogenesis of glutamic acid decarboxylase immunoreactive cells in the hippocampus of the mouse. I: Regio superior and regio inferior. *J Comp Neurol* 281, 586-602.

Soriano, E., Cobas, A., and Fairen, A. (1989b). Neurogenesis of glutamic acid decarboxylase immunoreactive cells in the hippocampus of the mouse. II: Area dentata. *J Comp Neurol* 281, 603-611.

Soriano, E., Del Rio, J.A., Martinez, A., and Super, 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., and Frotscher, M. (1989). A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res* 503, 170-174.

Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Bostrom, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., *et al.* (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219-1227.

Squire, L.R. (1987). The organization and neural substrates of human memory. *Int J Neurol* 21-22, 218-222.

Stanfield, B.B., and Cowan, W.M. (1979). The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol* 185, 423-459.

Stein, E., Savaskan, N.E., Ninnemann, O., Nitsch, R., Zhou, R., and Skutella, T. (1999). A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting. *J Neurosci* 19, 8885-8893.

Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H., and Kempermann, G. (2006). Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 54, 805-814.

Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M.D., Reuter, K., and Kempermann, G. (2004). Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46, 41-52.

Steriade, M., Nunez, A., and Amzica, F. (1993). A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *J Neurosci* 13, 3252-3265.

Steup, A., Ninnemann, O., Savaskan, N.E., Nitsch, R., Puschel, A.W., and Skutella, T. (1999). Semaphorin D acts as a repulsive factor for entorhinal and hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 11, 729-734.

Stevenson, E.L., and Caldwell, H.K. (2014). Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. *Eur J Neurosci* 40, 3294-3301.

Stoppini, L., Buchs, P.A., and Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37, 173-182.

Stratmann, A., Risau, W., and Plate, K.H. (1998). Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* 153, 1459-1466.

- Streit, A., Berliner, A.J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., and Stern, C.D. (2000). Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* 406, 74-78.
- Streit, A., Lee, K.J., Woo, I., Roberts, C., Jessell, T.M., and Stern, C.D. (1998). Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo. *Development* 125, 507-519.
- Stumm, R.K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., Nagasawa, T., Holtt, V., and Schulz, S. (2003). CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci* 23, 5123-5130.
- Suh, S.H., Paik, I.Y., and Jacobs, K. (2007). Regulation of blood glucose homeostasis during prolonged exercise. *Mol Cells* 23, 272-279.
- Sullivan, S.A., Akers, L., and Moody, S.A. (2001). *foxD5a*, a *Xenopus* winged helix gene, maintains an immature neural ectoderm via transcriptional repression that is dependent on the C-terminal domain. *Dev Biol* 232, 439-457.
- Super, H., Del Rio, J.A., Martinez, A., Perez-Sust, P., and 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.
- Super, H., Martinez, A., Del Rio, J.A., and Soriano, E. (1998). Involvement of distinct pioneer neurons in the formation of layer-specific connections in the hippocampus. *J Neurosci* 18, 4616-4626.
- Super, H., and Soriano, E. (1994). The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer DiI. *J Comp Neurol* 344, 101-120.
- Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L.H., Murakami, Y., Kalb, R.G., Fujisawa, H., and Strittmatter, S.M. (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99, 59-69.
- Takahashi, T., Misson, J.P., and Caviness, V.S., Jr. (1990). Glial process elongation and branching in the developing murine neocortex: a qualitative and quantitative immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol* 302, 15-28.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness, V.S., Jr. (1993). Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J Neurosci* 13, 820-833.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness, V.S., Jr. (1994). Mode of cell proliferation in the developing mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 375-379.
- Takiguchi-Hayashi, K., Sekiguchi, M., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Hasegawa, H., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Nakanishi, S., and Tanabe, Y. (2004). Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J Neurosci* 24, 2286-2295.
- Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G.I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M.L.,

Goodman, C.S., Poo, M., *et al.* (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99, 71-80.

Tamamaki, N., Fujimori, K., Nojyo, Y., Kaneko, T., and Takauji, R. (2003). Evidence that *Sema3A* and *Sema3F* regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex. *J Comp Neurol* 455, 238-248.

Thomas, M., Felcht, M., Kruse, K., Kretschmer, S., Deppermann, C., Biesdorf, A., Rohr, K., Benest, A.V., Fiedler, U., and Augustin, H.G. (2010). Angiopoietin-2 stimulation of endothelial cells induces  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin internalization and degradation. *J Biol Chem* 285, 23842-23849.

Thomas, P., and Beddington, R. (1996). Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr Biol* 6, 1487-1496.

Timofeev, I., Contreras, D., and Steriade, M. (1996). Synaptic responsiveness of cortical and thalamic neurones during various phases of slow sleep oscillation in cat. *J Physiol* 494 ( Pt 1), 265-278.

Tissir, F., Ravni, A., Achouri, Y., Riethmacher, D., Meyer, G., and Goffinet, A.M. (2009). *DeltaNp73* regulates neuronal survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16871-16876.

Tiveron, M.C., Boutin, C., Daou, P., Moepps, B., and Cremer, H. (2010). Expression and function of *CXCR7* in the mouse forebrain. *J Neuroimmunol*.

Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11, 901-907.

Toni, N., and Sultan, S. (2011). Synapse formation on adult-born hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 33, 1062-1068.

Toni, N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H., and Gage, F.H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10, 727-734.

Trousse, F., Poluch, S., Pierani, A., Dutriaux, A., Bock, H.H., Nagasawa, T., Verdier, J.M., and Rossel, M. (2015). *CXCR7* Receptor Controls the Maintenance of Subpial Positioning of Cajal-Retzius Cells. *Cereb Cortex* 25, 3446-3457.

Uda, M., Ishido, M., and Kami, K. (2007). Features and a possible role of Mash1-immunoreactive cells in the dentate gyrus of the hippocampus in the adult rat. *Brain Res* 1171, 9-17.

Urban, N., and Guillemot, F. (2014). Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci* 8, 396.

Uwanogho, D., Rex, M., Cartwright, E.J., Pearl, G., Healy, C., Scotting, P.J., and Sharpe, P.T. (1995). Embryonic expression of the chicken *Sox2*, *Sox3* and *Sox11* genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech Dev* 49, 23-36.

Valable, S., Bellail, A., Lesne, S., Liot, G., Mackenzie, E.T., Vivien, D., Bernaudin, M., and Petit, E. (2003). Angiopoietin-1-induced PI3-kinase activation prevents neuronal apoptosis. *FASEB J* 17, 443-445.

- van der Zwaag, B., Hellemons, A.J., Leenders, W.P., Burbach, J.P., Brunner, H.G., Padberg, G.W., and Van Bokhoven, H. (2002). PLEXIN-D1, a novel plexin family member, is expressed in vascular endothelium and the central nervous system during mouse embryogenesis. *Dev Dyn* 225, 336-343.
- van Groen, T., Miettinen, P., and Kadish, I. (2003). The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus* 13, 133-149.
- Venkiteswaran, G., Lewellis, S.W., Wang, J., Reynolds, E., Nicholson, C., and Knaut, H. (2013). Generation and dynamics of an endogenous, self-generated signaling gradient across a migrating tissue. *Cell* 155, 674-687.
- Villar-Cervino, V., Molano-Mazon, M., Catchpole, T., Valdeolmillos, M., Henkemeyer, M., Martinez, L.M., Borrell, V., and Marin, O. (2013). Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron* 77, 457-471.
- Wacker, A., and Gerhardt, H. (2011). Endothelial development taking shape. *Curr Opin Cell Biol* 23, 676-685.
- Waddington, C.H. (1933). Induction of primitive streak and its derivatives in the chick. *J Exp Biol* 10, 38-48.
- Waddington, C.H. (1936). Organizers in Mammalian Development. *Nature* 138.
- Walchli, T., Mateos, J.M., Weinman, O., Babic, D., Regli, L., Hoerstrup, S.P., Gerhardt, H., Schwab, M.E., and Vogel, J. (2015a). Quantitative assessment of angiogenesis, perfused blood vessels and endothelial tip cells in the postnatal mouse brain. *Nat Protoc* 10, 53-74.
- Walchli, T., Wacker, A., Frei, K., Regli, L., Schwab, M.E., Hoerstrup, S.P., Gerhardt, H., and Engelhardt, B. (2015b). Wiring the Vascular Network with Neural Cues: A CNS Perspective. *Neuron* 87, 271-296.
- Walker, M.C., and Semyanov, A. (2008). Regulation of excitability by extrasynaptic GABA(A) receptors. *Results Probl Cell Differ* 44, 29-48.
- Wang, F., Eagleson, K.L., and Levitt, P. (2015a). Positive regulation of neocortical synapse formation by the Plexin-D1 receptor. *Brain Res* 1616, 157-165.
- Wang, L., Chang, X., She, L., Xu, D., Huang, W., and Poo, M.M. (2015b). Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. *J Neurosci* 35, 8384-8393.
- Ward, N.L., and Lamanna, J.C. (2004). The neurovascular unit and its growth factors: coordinated response in the vascular and nervous systems. *Neurol Res* 26, 870-883.
- Ward, N.L., Putoczki, T., Mearow, K., Ivanco, T.L., and Dumont, D.J. (2005). Vascular-specific growth factor angiopoietin 1 is involved in the organization of neuronal processes. *J Comp Neurol* 482, 244-256.
- Watakabe, A., Ohsawa, S., Hashikawa, T., and Yamamori, T. (2006). Binding and complementary expression patterns of semaphorin 3E and plexin D1 in the mature neocortices of mice and monkeys. *J Comp Neurol* 499, 258-273.

Watanabe, T., and Niki, H. (1985). Hippocampal unit activity and delayed response in the monkey. *Brain Res* 325, 241-254.

Wegner, M., and Stolt, C.C. (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci* 28, 583-588.

Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., Herrera, D.G., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci* 2, 461-466.

Wichterle, H., Turnbull, D.H., Nery, S., Fishell, G., and Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128, 3759-3771.

Williamson, A., and Spencer, D.D. (1994). Electrophysiological characterization of CA2 pyramidal cells from epileptic humans. *Hippocampus* 4, 226-237.

Wilson, P.A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* 376, 331-333.

Wilson, S.I., Graziano, E., Harland, R., Jessell, T.M., and Edlund, T. (2000). An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol* 10, 421-429.

Wilson, S.W., and Rubenstein, J.L. (2000). Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* 28, 641-651.

Witter, M.P., and Amaral, D.G. (2004). Hippocampal formation. In: *The rat nervous system* (Third Edition). Paxinos, G, ed Academic Press San Diego pp: 635-704.

Witter, M.P., Van Hoesen, G.W., and Amaral, D.G. (1989). Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci* 9, 216-228.

Won, C., Lin, Z., Kumar, T.P., Li, S., Ding, L., Elkhali, A., Szabo, G., and Vasudevan, A. (2013). Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat Commun* 4, 2149.

Wray, S., Key, S., Qualls, R., and Fueshko, S.M. (1994). A subset of peripherin positive olfactory axons delineates the luteinizing hormone releasing hormone neuronal migratory pathway in developing mouse. *Dev Biol* 166, 349-354.

Xu, R.H., Kim, J., Taira, M., Sredni, D., and Kung, H. (1997). Studies on the role of fibroblast growth factor signaling in neurogenesis using conjugated/aged animal caps and dorsal ectoderm-grafted embryos. *J Neurosci* 17, 6892-6898.

Xu, R.H., Kim, J., Taira, M., Zhan, S., Sredni, D., and Kung, H.F. (1995). A dominant negative bone morphogenetic protein 4 receptor causes neuralization in *Xenopus* ectoderm. *Biochem Biophys Res Commun* 212, 212-219.

Yabut, O., Renfro, A., Niu, S., Swann, J.W., Marin, O., and D'Arcangelo, G. (2007). Abnormal laminar position and dendrite development of interneurons in the reeler forebrain. *Brain Res* 1140, 75-83.

- Yang, J., Houk, B., Shah, J., Hauser, K.F., Luo, Y., Smith, G., Schauwecker, E., and Barnes, G.N. (2005). Genetic background regulates semaphorin gene expression and epileptogenesis in mouse brain after kainic acid status epilepticus. *Neuroscience* 131, 853-869.
- Yazdani, U., and Terman, J.R. (2006). The semaphorins. *Genome Biol* 7, 211.
- Yokota, Y., Gashghaei, H.T., Han, C., Watson, H., Campbell, K.J., and Anton, E.S. (2007). Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex. *PLoS One* 2, e794.
- Yoshida, K., and Gage, F.H. (1991). Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain Res* 538, 118-126.
- Yoshida, K., Tobet, S.A., Crandall, J.E., Jimenez, T.P., and Schwarting, G.A. (1995). The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve. *J Neurosci* 15, 7769-7777.
- Yoshida, M., Assimacopoulos, S., Jones, K.R., and Grove, E.A. (2006). Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development* *Feb*;133(3):537-45.
- Yousef, H., Morgenthaler, A., Schlesinger, C., Bugaj, L., Conboy, I.M., and Schaffer, D.V. (2015). Age-Associated Increase in BMP Signaling Inhibits Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells* 33, 1577-1588.
- Yu, H.H., and Kolodkin, A.L. (1999). Semaphorin signaling: a little less per-plexin. *Neuron* 22, 11-14.
- Yuan, H.T., Khankin, E.V., Karumanchi, S.A., and Parikh, S.M. (2009). Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol* 29, 2011-2022.
- Yukawa, K., Tanaka, T., Bai, T., Ueyama, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Maeda, M., Suzuki, K., Kikutani, H., and Kumanogoh, A. (2005). Semaphorin 4A induces growth cone collapse of hippocampal neurons in a Rho/Rho-kinase-dependent manner. *Int J Mol Med* 16, 115-118.
- Yutsudo, N., Kamada, T., Kajitani, K., Nomaru, H., Katogi, A., Ohnishi, Y.H., Ohnishi, Y.N., Takase, K., Sakumi, K., Shigeto, H., *et al.* (2013). *fosB*-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior. *Neuropsychopharmacology* 38, 895-906.
- Zacchigna, S., Lambrechts, D., and Carmeliet, P. (2008). Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9, 169-181.
- Zhang, Y., Singh, M.K., Degenhardt, K.R., Lu, M.M., Bennett, J., Yoshida, Y., and Epstein, J.A. (2009). Tie2Cre-mediated inactivation of plexinD1 results in congenital heart, vascular and skeletal defects. *Dev Biol* 325, 82-93.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Jr, Ming, G.L., and Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26, 3-11.
- Zhou, Y., Gunput, R.A., and Pasterkamp, R.J. (2008). Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* 33, 161-170.

Zimmer, C., Lee, J., Griveau, A., Arber, S., Pierani, A., Garel, S., and Guillemot, F. (2010). Role of Fgf8 signalling in the specification of rostral Cajal-Retzius cells. *Development* 137, 293-302.

Zimmer, J. (1971). Ipsilateral afferents to the commissural zone of the fascia dentata, demonstrated in decommissurated rats by silver impregnation. *J Comp Neurol* 142, 393-416.

Zupanc, G.K. (2001). A comparative approach towards the understanding of adult neurogenesis. *Brain Behav Evol* 58, 246-249.

