

RESUMEN
Y
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Expresión de *Zac1* y caracterización de las subpoblaciones celulares *Zac1*-positivas durante el desarrollo neural

1.1. Patrón de expresión de *Zac1*

El análisis del patrón de expresión del gen murino *Zac1* durante el desarrollo del sistema nervioso muestra que su expresión se observa en el prosencéfalo y mesencéfalo en fases muy tempranas del desarrollo neural (E9-E10), siendo particularmente abundante e intensa en áreas neurales donde ocurre alta actividad mitótica (tubo neural y neuroepitelios) (Tabla I, Resultados, Capítulo 1; Tabla I, Resultados, Capítulo 2). Entre los días embrionarios E10 y E12.5, se observa un aumento exponencial de la expresión de *Zac1*, alcanzando valores máximos de expresión entre E14 y E16, los cuáles comienzan a disminuir a partir del día embrionario E18. En adulto, los niveles de expresión de *Zac1* son bajos comparativamente con los del embrión.

Entre E9.5 y E12.5, altos niveles de expresión del gen *Zac1* se detectan a lo largo de todo el tubo neural, en las vesículas telencefálicas, en el primordium de la retina neural y en la hendidura infundibular del tercer ventrículo (irIIIv) (Figura 1, Resultados, Capítulo 1; Figura 1, Resultados, Capítulo 2), destinada a formar la neurohipófisis (glándula pituitaria), donde *Zac1* se encuentra altamente expresado en adulto (Spengler et al, 1997).

Entre E14 y E18, la expresión de *Zac1* continua siendo detectada en muchas áreas neurales con alta actividad proliferativa, tales como la zona ventricular y subventricular de los ventrículos laterales, del tercer y cuarto ventrículo, en los neuroepitelios del acueducto de *Sylvius*, del surco hipotalámico ventral, de la hendidura preóptica y del *infundibulum*, así como en la capa granular externa del cerebelo (EGL). Sin embargo, en estos estadios del desarrollo neural, los procesos de diferenciación celular se incrementan y con ellos se van estableciendo los patrones celulares característicos de cada región cerebral. En este sentido, la expresión de *Zac1* se detecta en distintas poblaciones celulares que se van posicionando en la amígdala, hipotálamo (en los núcleos arcuado, lateral, dorsomedial y ventromedial) y tálamo (en los núcleos ventral y dorsomedial), así como en los plexos coroideos de las regiones ventriculares, los cuáles regulan la estabilidad química del líquido cerebroespinal (Figura 2, Resultados, Capítulo 1; Figura 1, Resultados, Capítulo 2).

Entre P0 y adulto, *Zac1* se expresa intensamente en algunos núcleos talámicos y en muchos núcleos hipotalámicos, así como en los distintos núcleos amigdalinos y en la región CA3 posterior del hipocampo. En el cerebelo, la expresión de *Zac1* es moderada en la EGL y en las células de Purkinje, exceptuando a partir de P9, cuando la expresión de *Zac1* disminuye en la capa EGL mientras que se mantiene en las células de Purkinje. Por tanto, durante el desarrollo postnatal y con

la maduración del cerebro, la expresión de *Zac1* va disminuyendo progresivamente en las zonas con alta actividad mitótica (en las zonas ventricular y subventricular). No obstante, en el ratón adulto persiste una población de células que expresan *Zac1*, localizada en la capa más interna de la zona subventricular y a lo largo de la RMS. Los estudios inmunohistoquímicos con la proteína *Zac1* han revelado que su patrón de expresión durante el desarrollo es idéntico al del gen, tanto temporal como regionalmente.

1.2. Expresión de *Zac1* en las células madre/progenitoras

Durante el desarrollo embrionario, *Zac1* tiene una expresión muy amplia e intensa dentro de las diversas matrices germinativas (zonas de alta actividad mitótica), concretamente a lo largo del tubo neural y en los diversos neuroepitelios cerebrales. Entre E12 y E18, muchas células *Zac1*-positivas, localizadas en la capa celular más interna que rodea el lumen del tubo neural y en las zonas ventricular y subventricular de las vesículas telencefálicas, expresan Nestina (proteína de los filamentos intermedios del tipo VI, que se expresa en las células madre/progenitoras del neuroepitelio más primitivo) y GFAP (proteína de los filamentos intermedios de la clase-III, que se encuentra expresada tanto en la astrogía indiferenciada como en la madura, así como en las células madre/progenitoras neurales; Doetsch y col., 1999; Laywell y col., 2000; Álvarez-Buylla y col., 2001) (Figura 3 y Tabla II, Resultados, Capítulo 2). Además, muchas de las células ventriculares y subventriculares que expresan *Zac1* también expresan PCNA (la cuál se acumula durante la fase G1 del ciclo celular, alcanza su máximo durante la fase S, y baja sus niveles durante la fase G2/M; Kurki, 1988), mientras que algunas células *Zac1*-positivas en la zona ventricular y en el tubo neural expresan FORSE-1 (el cuál marca regionalmente subpoblaciones específicas de células progenitoras del sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario; Allendoerfer y col., 1999). Con el desarrollo del prosencéfalo y mesencéfalo (entre E14 y E16), los niveles de expresión de *Zac1* se incrementan en las zonas de diferenciación celular del futuro sistema límbico (área amigdalina, primordium del bulbo olfativo, hipotálamo y tálamo). Así, las células *Zac1*-positivas que dejan el tercer ventrículo siguen una ruta migratoria hacia la futura zona mamilotalámica y hacia los futuros núcleos hipotalámicos dorsomedial y lateral, donde posiblemente establecen su posición final (Figuras 2 y 3, Resultados, Capítulo 1). Las células que se encuentran en la ruta migratoria co-expresan β -tubulina (la isoforma β -III-tubulina, la cuál tiene afinidad específica para las neuronas inmaduras), calbindina D-28k, parvalbumina y calretinina (proteínas secuestradoras de calcio) y netrina-1 (proteína implicada en los procesos quimiotróficos, cuya actividad promueve la guía axonal y la posición neuronal durante el desarrollo del hipotálamo; Deiner y Sretavan, 1999) (Figura 4 y Tabla II, Resultados, Capítulo 2). Sin embargo, en esta ruta migratoria muy pocas de

estas células *Zac1*-positivas co-localizan con NeuN (marcador nuclear de las neuronas maduras del SNC y del SNP). Por tanto, parece que las células que expresan *Zac1* durante esta ruta migratoria no están completamente diferenciadas, aunque ya expresen marcadores neuronales como la calbindina y calretinina.

Entre E16 y E19, los niveles de expresión de *Zac1* aumentan en las zonas subventriculares, en las rutas migratorias, y en los núcleos amigdalinos e hipotalámicos en formación (Figura 4 y Tabla II, Resultados, Capítulo 2). Consecuentemente, incrementan las subpoblaciones celulares *Zac1*-positivas que expresan marcadores neuronales. Así, en las zonas subventriculares algunas células *Zac1*-positivas expresan PSA-NCAM (molécula que reconoce específicamente la adherencia de células neuronales). No obstante, el número de células que co-expresan *Zac1* y NeuN sigue siendo bajo, y se limita a las áreas amigdalina e hipotalámica. En este sentido, en E16, algunas poblaciones de la amígdala e hipotálamo co-expresan *Zac1* y *GAD65* (enzima responsable por la conversión del glutamato en GABA), así como *Zac1* y *NPY* (marcador de subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas). Además, algunas células del tronco cerebral y de la médula espinal co-expresaron *Zac1* y *GAD65* o *Zac1* y TH (marcador de neuronas catecolinérgicas). En E18, algunas subpoblaciones amigdalinas e hipotalámicas que expresan *Zac1* comienzan a expresar somatostatina (marcador de subpoblaciones de interneuronas). Sin embargo, las subpoblaciones *Zac1*/somatostatina-positivas y *Zac1*/TH-positivas serán más evidentes durante el desarrollo postnatal.

Estudios recientes han confirmado la existencia de altos índices de apoptosis en los progenitores neurales durante la embriogénesis (D'Sa-Eipper y Roth, 2000; D'Sa-Eipper y col., 2001; Zaidi y col., 2001). En este sentido, *Zac1* es un factor de la transcripción capaz de inducir el paro del ciclo celular en fase G1 y, por una vía independiente, inducir la apoptosis (Spengler y col., 1997). Los resultados de co-localización han permitido demostrar que las células ventriculares *Zac1*-positivas que presentan actividad apoptótica (detectada a través del marcador ssDNA-F7-26-Apostain o de la técnica del Klenow-FragEL-DNA fragmentation), durante la proliferación de los precursores neurales, corresponden a una *pool* de progenitores muy pequeña y que se restringe únicamente a los ventrículos laterales. Por tanto, estos resultados evidencian que durante la embriogénesis *Zac1* puede estar implicada en los mecanismos apoptóticos que ocurren en algunas subpoblaciones restringidas de precursores neurales en los ventrículos laterales. Sin embargo, los altos niveles de *Zac1* en las células ventriculares con alta actividad mitótica (no-apoptóticas) antes de entrar en un proceso de diferenciación celular, en el cuál disminuyen los niveles de *Zac1*, sugiere que *Zac1* estaría más implicada en la regulación del ciclo celular (actividad mitótica) de los

precursores neurales durante la neurogénesis que en la muerte apoptótica de los progenitores neurales.

En resumen, los resultados de la expresión y caracterización celular de *Zac1* durante la embriogénesis del sistema nervioso central sugieren la existencia de distintas subpoblaciones de progenitores neurales que expresan *Zac1* (Fig. 42).

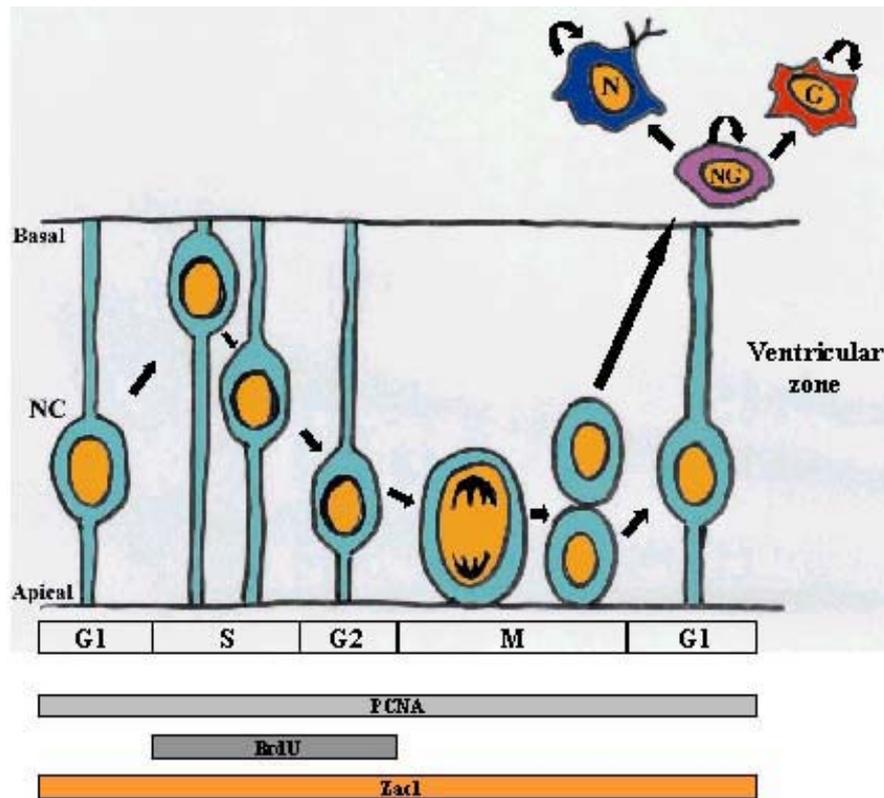


FIGURA 42. Esquema de la división celular asimétrica en la zona ventricular. *Zac1* se expresa en las células neuroepiteliales (NC, células turquesa) de la zona ventricular y su co-localización con BrdU y PCNA sugiere que se expresa en las distintas fases del ciclo celular dentro de la zona ventricular. *Zac1* también se expresa en los progenitores neurales que dejan la zona ventricular (NG, precursores de macroglía y de neuronas) y empiezan un proceso de migración (célula lila), en el cuál aún mantienen su capacidad mitótica. Estos progenitores en migración originan otros progenitores con un mayor grado de diferenciación (G, precursores de macroglía, rojo; N, precursores de neuronas, azul), los cuáles aún expresan *Zac1*.

Así, en los ventrículos laterales, *Zac1* se expresa en las células madre/progenitoras de las zonas ventriculares y subventriculares. Si las nuevas células neurales salen de la zona subventricular y migran hacia las capas corticales, la expresión del gen *Zac1* disminuye notablemente hasta desaparecer, mientras que si las nuevas células neurales siguen la vía RMS la expresión de *Zac1* disminuye moderadamente, aunque persiste a lo largo de todo el sistema olfativo. Además, en el tercer y cuarto ventrículo, la expresión de *Zac1* se mantiene tanto en las rutas migratorias hacia el

hipotálamo y el tronco cerebral, como en las neuronas diferenciadas, o en diferenciación, de estas áreas. Se ha demostrado que *Zac1* regula la expresión del gen PACAP-R1 (Hoffmann y col., 1998) a través de su ligando PACAP, el cuál está implicado en la regulación de los precursores neurales, tanto gliales como neuronales, durante el desarrollo. PACAP coordina la transición de la proliferación celular hacia la salida del ciclo celular (para la revisión, véase Waschek, 2002). En este sentido, la expresión de *Zac1* en los neuroepitelios ventriculares sugiere una posible coordinación de *Zac1*/PACAP en la proliferación y diferenciación celular de los progenitores neurales.

1.3. Expresión de *Zac1* en las interneuronas GABAérgicas

Durante el desarrollo postnatal, se observa una clara disminución en el número de células progenitoras y, consecuentemente, en la expresión de *Zac1*. Sin embargo, permanece una población bien definida en las zonas subventriculares (actividad mitótica) y en la RMS durante el desarrollo postnatal y en el adulto. Con la diferenciación celular, muchas células *Zac1*-positivas en la vía RMS expresan PSA-NCAM o β -tubulina. Al llegar al bulbo olfativo, las poblaciones celulares que expresan *Zac1* se distribuyen en las distintas capas olfativas, especialmente en la capa mitral y granular, co-expresando NeuN, calbindina o calretinina. Al mismo tiempo, las células *Zac1*-positivas que han dejado la zona subventricular del tercer y cuarto ventrículo van adquiriendo un carácter de diferenciación durante su ruta migratoria, expresando primero β -tubulina, calbindina o calretinina, y luego NeuN, parvalbumina, GAD65, NPY, somatostatina o TH, de acuerdo con la región cerebral donde se posicionan.

En las etapas postnatales subsecuentes y hacia la edad adulta, aumentan las subpoblaciones *Zac1*/calbindina-positivas, *Zac1*/*GAD65*-positivas y *Zac1*/*NPY*-positivas, mientras disminuyen las subpoblaciones *Zac1*/calretinina-positivas y *Zac1*/TH-positivas. Las neuronas catecolinérgicas (TH-positivas) son probablemente neuronas dopaminérgicas, ya que la expresión de *Zac1* está diferencialmente regulada en ratones tratados con agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos del tipo D1 y de D2 (resultados preliminares). Por otra parte, las neuronas catecolinérgicas están implicadas en la regulación hormonal del eje hipotálamo-glándula pituitaria (Gonzalez et al., 1989; Dorton, 2000). En este sentido, *Zac1* se expresa abundantemente en el núcleo hipotalámico arcuado (Figura 3, Resultados, Capítulo 1), el cuál produce muchos de los factores de liberación hormonal que actúan en la glándula pituitaria (Szentagothai, 1969). Además, las células que expresan ZAC en la glándula pituitaria co-expresan con los distintos factores hormonales (Pagotto y col., 1999; 2000). Igualmente, las células que expresan *Zac1* en el núcleo arcuado, así como en sus proyecciones a través de la eminencia media, también expresan algunos

factores de liberación hormonal producidos en el hipotálamo, tales como LHRH y CFR (Figura 4 y Tabla II, Resultados, Capítulo 2).

Los altos niveles celulares de GAD y de GABA durante embriogénesis temprana, antes de la diferenciación celular, sugieren un papel en las vías de señalización durante el desarrollo (Katarova y col., 2000), mientras que en los circuitos neuronales maduros tienen un papel predominante en la inhibición neuronal. Las proteínas secuestradoras de calcio, así como la somatostatina, GAD65 y NPY, son marcadores de distintas subpoblaciones inhibitorias, GABAérgicas (Yan y col., 1995; Soghomonian y Martin, 1998). En este sentido, durante el desarrollo *Zac1* se expresa en los progenitores neurales y en las células que se diferencian esencialmente en neuronas GABAérgicas, sugiriendo que *Zac1* puede estar implicado en los procesos diferenciación de las neuronas GABAérgicas del sistema límbico.

CAPÍTULO 2

Expresión de *Zac1* durante la formación y el desarrollo del esqueleto y del músculo esquelético. Caracterización de las células *Zac1*-positivas durante la embriogénesis.

2.1. Expresión de *Zac1* durante la condrogénesis

El patrón que define las extremidades de los organismos vertebrados resulta de las interacciones celulares entre el ectodermo que rodea la región apical de las extremidades y las células mesenquimales que se forman en el núcleo de la región apical (Christ y Brand-Saberi, 2002). Entre E10 y E12, *Zac1* (gen y proteína) se expresa en la región dorsal del tubo neural (células de la cresta neural), en el notocordio, en los somitas y en la región ectodermal apical de las extremidades (Figura 1 y Tabla I, Resultados, Capítulo 2). En E12.5, los altos niveles de expresión de *Zac1* se observan en los cartílagos primordiales del esqueleto craneofacial (cartílago de Meckel, primordium del diente, cartílago nasal y hueso maxilar), del esqueleto de las extremidades (radio, húmero, falangio y metacarpo) y del esqueleto axial (costillas y vértebras), así como en muchas células vasculares que rodean los sitios de osificación de las extremidades. En E14.5, la expresión del gen *Zac1* es intensa en los cartílagos primordiales y moderada en los sitios de osificación, mientras que la expresión de la proteína solamente se detecta en los condrocitos (cartílago), en las células del *pericondrium* y en las células vasculares que rodean los huesos en formación de las extremidades. En E16, la expresión del gen *Zac1* disminuye notablemente en los sitios de osificación, no siendo detectada en E18, mientras que su expresión se mantiene en los condrocitos durante todo el desarrollo y persiste en la edad adulta. Así, la expresión de *Zac1* es transitoria durante las fase iniciales de osificación, mientras que su expresión es permanente en los cartílagos. Tres linajes celulares son los responsables de la formación y el desarrollo embrionario del esqueleto vertebrado: (a) las células de la cresta neural dan lugar al esqueleto craneofacial; (b) las células paraxiales del mesodermo (somitas) forman el esqueleto axial (costillas y vértebras), la dermis y el músculo esquelético del cuerpo y de las extremidades; y (c) las células laterales del mesodermo forman el esqueleto de las extremidades (Erlebacher y col., 1995; Olsen y col., 2000). Los condrocitos provienen de estos tres linajes celulares (Shum y Nuckolls, 2002). Estas células progenitoras migran hacia posiciones embrionarias específicas, donde originaran núcleos de condensación celular, que luego se diferenciaran en condrocitos o osteoblastos (Hall y Miyake, 2000; DeLise y col., 2000). En este sentido, en los huesos faciales y de la clavícula, las condensaciones mesenquimales se diferencian directamente en osteoblastos, **desarrollo membranoso del hueso**, mientras que en el resto de los huesos (esqueleto de las extremidades, costillas, vértebras, etc.), las condensaciones mesenquimales se diferencian en condrocitos,

desarrollo esquelético endocondral, para crear un soporte cartilaginoso del futuro hueso (para la revisión véase Horton, 2003, y Shum y Nuckolls, 2002). De acuerdo con los presentes resultados, *Zac1* se expresa esencialmente en el desarrollo esquelético endocondral, ya que se localiza en el primordium de los sitios cartilagosos entre los días embrionarios E12 y E14 (Fig. 43).

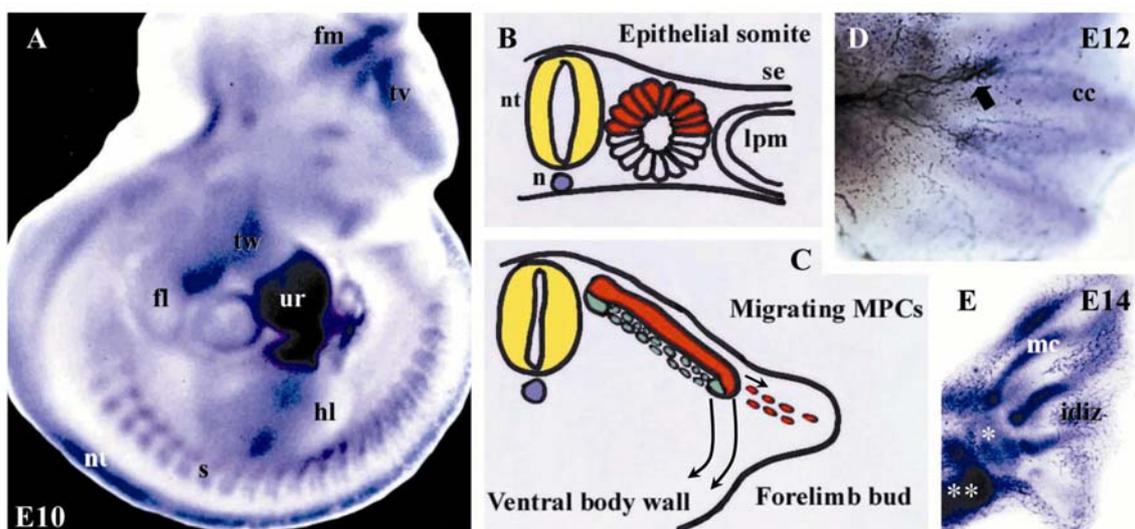


FIGURA 43. Expresión de *Zac1* en el mesodermo y desarrollo de las extremidades. *Zac1* se expresa intensamente en los somitas (s en A), los cuáles reciben señales provenientes del notocordio (n) y del tubo neural (nt), iniciando un proceso de desepiteliación (B y C) que conduce a la formación y desarrollo de las extremidades. *Zac1* se expresa intensamente en el primordium del cartilago de los sitios de osificación (D y E). nt, tubo neural; ur, región umbilical; fl, extremidades anteriores; fm, cerebro medio; hl, extremidades posteriores; tw, pared torácica; s, somitas; tv, versículas telencefálicas; n, notocordio; cc, células del cartilago; lpm, placa mesodérmica lateral; se, superficie del ectodermo; mc, cartilago del metacarpo; idiz, zona interdigital; flecha, células vasculares; asterisco, cartilago carpal; doble asterisco, cartilago radial.

Además, los condrocitos poseen un ciclo vital que incluye la proliferación, la diferenciación, la maduración y la apoptosis. En este sentido, los resultados presentados muestran que la expresión de *Zac1* es diferencial de acuerdo con la fase del ciclo vital en que se encuentran los condrocitos (Figura 5 y Tabla II, Resultados, Capítulo 2). Así, *Zac1* se expresa en al menos 4 subpoblaciones distintas de condrocitos: (a) los condrocitos quiescentes, los cuáles se localizan en la región más alejada de la zona de osificación, co-expresando altos niveles de *Zac1* y bajos niveles de PCNA y BrdU; (b) los condrocitos mitóticamente activos, los cuáles se sitúan en la parte media de la zona condrogénica, co-expresando altos niveles de *Zac1*, PCNA y BrdU; (c) los condrocitos diferenciados (condrocitos pre-hipertróficos), los cuáles están localizados en la zona condrogénica más interna, expresando niveles bajos de *Zac1*; y (d) los condrocitos hipertróficos apoptóticos, los cuales se encuentran en la región más cercana a la zona de osificación, expresando niveles bajos de *Zac1* y altos niveles de *Apostain*. Los condrocitos hipertróficos inducen la angiogénesis alrededor del *pericondrium* (Gerber y col., 1999). La angiogénesis suministra los progenitores de los

osteoblastos a los sitios de osificación (Yang y Karsenty, 2002). Con la formación de los centros primarios de osificación, se degrada la matriz del cartílago y los condrocitos hipertróficos son eliminados por apoptosis. En este sentido, *Zac1* se expresa en las células del *pericondrium* y en las células vasculares que lo rodean co-expresando PCNA, mientras que su expresión en la zona vascular interdigital y en los condrocitos hipertróficos se solapa con la expresión de *Apostain*. Por tanto, *Zac1*, al igual que el colágeno tipo II, se expresa en todas las fases de la condrogénesis, sugiriendo que *Zac1* pueda tener un papel regulador en el desarrollo del esqueleto, tanto en el desarrollo de los cartílagos (proliferación de los condrocitos) como en el desarrollo de los sitios de osificación, a través de la degradación y el reemplazo del cartílago en hueso por apoptosis (Shum y Nuckolls, 2002).

2.2. Expresión de *Zac1* durante la miogénesis

Todas las células musculares se desarrollan a partir de los somitas, donde las células dermomiótomas localizadas en la parte dorsal, reciben señales del notocordio y de la base del tubo neural, dando inicio a un proceso de desepitelización. Las células mesenquimales desepitelizadas migran individualmente, mientras proliferan, y se diferencian posteriormente originando tejidos musculares específicos (Christ y Ordahl, 1995; Schmidt y col., 1998; Borycki y Emerson, 2000).

Entre E9 y E10, *Zac1* se expresa intensamente en los somitas (Figura 1, Resultados, Capítulo 1) y en las células mesenquimales en migración y en proliferación del músculo (Figura 6 y Tabla II, Resultados, Capítulo 2), así como en varias fibras musculares (miofibras) durante el desarrollo.

Entre E12 y E15, en las extremidades muchas células mesenquimales en migración expresan el gen *Zac1*, así como las células diferenciadas del músculo que rodea el cartílago primordial del esqueleto axial (costillas y vértebras) y las células de los músculos faciales y del músculo esquelético de la lengua. En estos estadios del desarrollo, el ectodermo superficial origina la epidermis, el pelo, las uñas, el epitelio de la cavidad bucal, la lengua, y distintas glándulas endocrinas (Jonker y col., 2004). En este sentido, en E15 la expresión de *Zac1* se observa en el primordium de las uñas, en el primordium del folículo de las vibras y en las células musculares que lo rodean. Estudios inmunohistoquímicos han permitido determinar que la mayoría de estas células musculares que expresan *Zac1* presentan carácter mitótico (Figura 6 y Tabla II, Valente y col., 2005).

En las etapas postnatales, y con el proceso de diferenciación de las células musculares, la expresión de *Zac1* disminuye, siendo baja en los músculos de las extremidades y de la cola, así como en los craneofaciales.

Durante la embriogénesis, la parte ventral de los somitas (esclerotomo) da lugar al cartílago y al hueso de la columna vertebral y de las costillas, mientras que la parte dorsal de los somitas (dermomiótomo) produce la dermis y el músculo esquelético del cuerpo y de las extremidades, así como el tejido conjuntivo muscular, excepto los músculos principales, los cuáles proceden de mesodermo precordial y paraxial (Buckingham y col., 2003). Al mismo tiempo, el gen *Zac1* se expresa ampliamente en estas áreas embrionarias, concretamente en las células progenitoras del esqueleto y del músculo esquelético, así como en todas las fases del ciclo de vida de los condrocitos y del desarrollo de las fibras musculares. Por tanto, estos resultados sugieren que *Zac1*, al igual que otros factores de transcripción (tales como Pax, bHLH y Sox), podría ser un factor de regulación de la condrogénesis y de la miogénesis (Moran y col., 2002; Yang y Karsenty, 2002; Stockdale y col., 2000; Olsen y col., 2000).

El patrón de expresión de *Zac1* durante el desarrollo, **Capítulos 1 y 2**, es similar al descrito para *ZAC*, su homólogo humano, en tejidos adultos y fetales (Varrault y col., 1998). Sin embargo, en el cerebro adulto del ratón la expresión de *Zac1* es mucho más intensa que la de *ZAC*. El gen *Zac1* muestra un patrón de expresión más restringido que el gen *ZAC*, el cuál está más ampliamente distribuido en los distintos tejidos periféricos. Además, la expresión de *Zac1* es mucho más intensa durante el desarrollo embrionario que en el adulto, contrariamente a lo que se ha descrito para *ZAC* (Varrault y col., 1998). Ambas proteínas, *Zac1* y *ZAC*, son nucleares y presentan actividad anti-proliferativa (Varrault y col., 1998). Sin embargo, las discrepancias entre los patrones de expresión de *Zac1* y *ZAC* podrían ser debidas a que la secuencia proteica murina difiere de la humana. En este sentido, la proteína *Zac1* posee una región rica en prolina (PLE, PMQ y PML), la cuál es importante en las interacciones proteína-proteína (Williamson, 1994), que no se encuentran en la proteína *ZAC*.

Por tanto, *Zac1* se expresa intensamente en las células madre/progenitoras de distintos linajes celulares durante el ciclo proliferativo, y su expresión disminuye o desaparece justo antes de la diferenciación celular, reforzando su papel en el control de la proliferación (Spengler y col., 1997) a través de la regulación del ciclo celular y de la apoptosis y, además, todos los datos obtenidos durante el desarrollo sugieren que la proteína *Zac1* podría estar implicada, posiblemente a través de interacciones que otras proteínas, en las vías de señalización molecular que determinan el tipo celular durante la embriogénesis.

CAPÍTULO 3

Regulación de la expresión de *Zac1* en modelos convulsivos

El análisis detallado de las respuestas genómicas puede proporcionar los datos necesarios para determinar los acontecimientos moleculares que conducen a la plasticidad neuronal y a la neurodegeneración (Zagulska-Szymczak y col., 2001). Las dosis sistémicas de AK conducen a la despolarización neuronal, la cuál se manifiesta en un comportamiento complejo de insultos convulsivos en el sistema límbico (Lothman y col., 1981). Estos insultos convulsivos pueden asociarse a la muerte celular, tanto por apoptosis como por necrosis (Filipkowski et al., 1994; Pollard y col., 1999a, b), y, consecuentemente, con las múltiples respuestas genómicas cerebrales (Kaminska y col., 1997; Goodenough y col., 1997; Djebaïli y col., 2001). Muchos de los genes implicados en las respuestas neurodegenerativas son genes que se encuentran altamente expresados durante el desarrollo. Por tanto, los modelos neurodegenerativos son herramientas útiles para el estudio de la expresión génica de los genes implicados en el desarrollo del SNC.

3.1. Inducción de *Zac1* en el sistema límbico

La expresión de *Zac1* es inducida moderadamente en las células granulares del giro dentado y débilmente en las células piramidales de la corteza entorhinal y piriforme, y en las neuronas de la amígdala y del bulbo olfativo, 3 horas después de la administración de AK (Tabla I, Resultados, Capítulo 3). Seis horas después del tratamiento con AK, la inducción de *Zac1* se extiende a las neuronas piramidales del hipocampo (CA1-CA3) y de las cortezas cingular, entorhinal, parietal, somatosensorial y piriforme, así como a las neuronas de los núcleos hipotalámicos arcuado, lateral y dorsomedial. La inducción de *Zac1* alcanza un máximo entre las 6 y 8h tras el tratamiento con AK, decreciendo gradualmente hacia las 18h, donde los niveles de expresión de *Zac1* son similares al de los animales control, aunque todavía encontramos algunas células inducidas en el hipocampo.

En los animales tratados previamente con MK-801 y luego con AK, la respuesta del gen *Zac1* es temporalmente más lenta y en menor grado de inducción. Así, se observa una ligera inducción de *Zac1* entre las 6 y 8 horas después del tratamiento MK-801/AK, concretamente en las células granulares del bulbo olfativo y del giro dentado, así como en las neuronas piramidales de la CA1 y CA3, de las cortezas entorhinal, parietal, piriforme y somatosensorial (Figuras 2 y 3, Resultados Capítulo 3).

Los animales tratados con PTZ presentan un patrón de inducción de *Zac1* similar al observado con MK-801/AK entre las 6 y 8 horas seguidas al tratamiento. Sin embargo, en los modelos convulsivos con PTZ, las neuronas de la amígdala, del hipotálamo y del tálamo también

presentan inducción de la expresión de *Zac1* (Figuras 2 y 3, Resultados, Capítulo 3). No se observa inducción de la expresión del gen *Zac1* en los distintos tratamientos control, siendo su patrón de expresión idéntico al observado en los animales adultos no tratados (descrito en el Capítulo 1 de los Resultados).

En los distintos tratamiento, la inmunodetección de la proteína *Zac1* se observa en las mismas áreas del sistema límbico donde se induce la expresión del gen *Zac1*, tanto regional como temporalmente (Figuras 5 y 6, Resultados, Capítulo 3). Además, únicamente en los ratones tratados con AK (a las 8 horas tras el tratamiento), la proteína *Zac1* se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma y en las proyecciones de algunas neuronas hipotalámicas, así como en las células gliales de la capa subgranular del giro dentado y de la zona subventricular (Fig. 44), donde se hallan los precursores neurales del cerebro maduro (para revisión véase Doetsch, 2003; Storch y Schwarz, 2002; Gage, 2000).

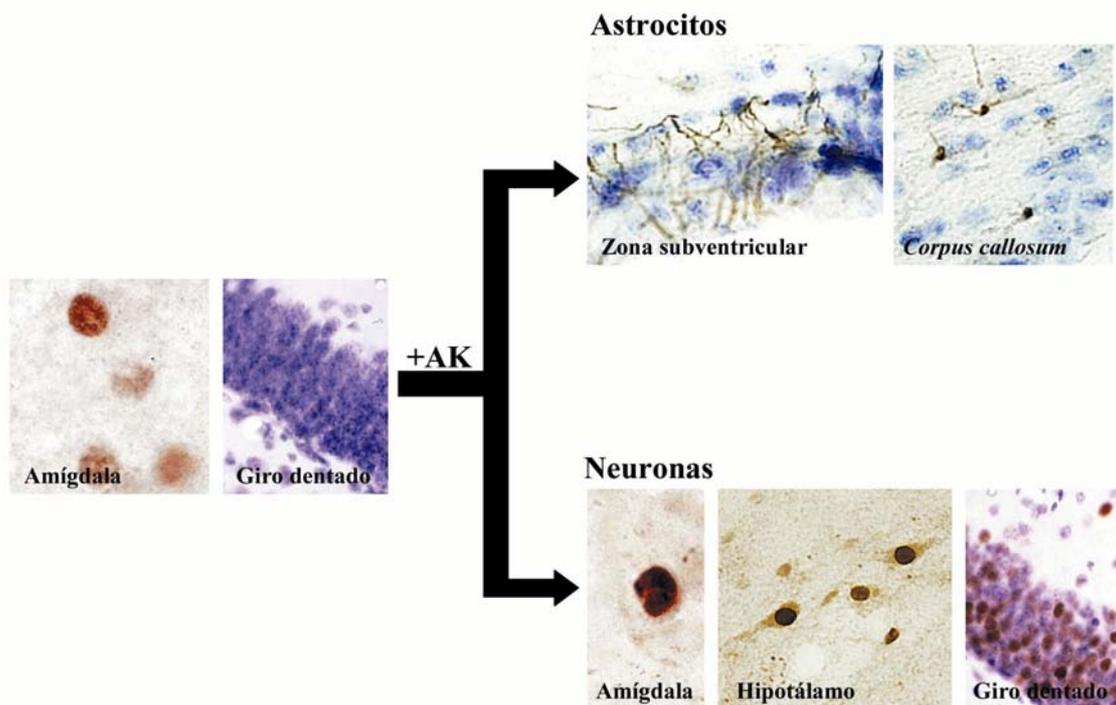


FIGURA 44. Inducción de la expresión de *Zac1* tras el tratamiento con AK. En los ratones no tratados, la proteína *Zac1* es nuclear y se expresa en distintas poblaciones neuronales de la amígdala, hipotálamo y de la región CA3 del hipocampo. En los ratones tratados con AK, la expresión de *Zac1* es inducida en todo el hipocampo, especialmente en las células granulares del giro dentado. Además, después del tratamiento con AK la inmunodetección de la proteína *Zac1* se halla tanto en el núcleo como en el citoplasma de algunas neuronas hipotalámicas, así como en algunos astrocitos de la zona subventricular y del cuerpo caloso.

El AK es un análogo del glutamato, el mayor neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso, y como tal actúa provocando una intensa activación de las neuronas excitatorias del sistema límbico, las cuales son muy vulnerables al daño neuronal (Lothman et al., 1981; Filipkowski y col., 1994; Pollard y col., 1994a, b; Goodenough y col., 1997; Djebaïli y col., 2001). Además, las células inducidas que expresan *Zac1* en los modelos convulsivos de AK co-expresan c-fos, la cual es inducida como consecuencia de una entrada masiva de Ca²⁺ en las células vulnerables (Morgan y Curran, 1986; 1989; Greenberg y col., 1992). En los modelos convulsivos con PTZ, el cual es un agente convulsivo que no provoca muerte neuronal (Klioueva et al., 2001; da Silva y col., 1998; Planas y col., 1994), y en los modelos convulsivos con MK-801/AK, no ocurre una fuerte activación celular, ya que la inmunoreactividad para la proteína c-fos es muy baja. Por tanto, estos datos muestran que la expresión de *Zac1* (gen y proteína) es muy sensible en los modelos convulsivos que ocasionan mayor activación celular y, consecuente, mayor muerte neuronal. Por otra parte, en los animales tratados previamente con MK-801, el cual actúa como bloqueador de los receptores de NMDA (Lee y col., 2002; Planas y col., 1995; Clifford et al., 1990), hay una atenuación del efecto provocado por el AK en la expresión de *Zac1*. Este resultado sugiere que la inducción de *Zac1* por AK requiere la activación de los receptores de NMDA.

3.2. Inducción de *Zac1* en células gliales

La proteína *Zac1* está inducida en las células gliales de las zonas ventricular y subventricular de los ventrículos laterales y de la zona subgranular del giro dentado, tras 8 horas de la administración del AK. Los resultados de co-localización entre *Zac1* y GFAP confirman este dato (Figura 6, Resultados, Capítulo 3; Fig. 44). Las zonas ventricular y subventricular están extensamente implicadas en la proliferación y diferenciación celular, tanto en desarrollo como en adulto (Frederiksen y McKay, 1988; Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Cremisi y col., 2003), y en las cuales *Zac1*, la nueva proteína anti-proliferativa (Spengler y col., 1997), se expresa intensamente durante el desarrollo (Resultados, Capítulo 1 y 2). En este sentido, distintos estudios han descrito extensos procesos de proliferación glial en el hipocampo y en la zona subventricular, como respuesta al daño neural inducido por el AK (Altar y Baudry, 1990; Niquet y col., 1994a,b). Todo ello apunta a que *Zac1* podría estar implicada en la regulación de los procesos de plasticidad glial que se desarrollan después de una lesión cerebral.

3.3. *Zac1* en el daño neuronal

Se ha observado que la apoptosis, así como la necrosis, contribuyen a la degeneración después de la generación de insultos convulsivos en ratas y ratones (Pollard et al., 1994a,b; Weiss y col., 1996; Portera-Coilliau y col., 1997; Strain y Tasker, 1991; Dominguez y col., 2003).

Los resultados muestran que el patrón de lesión observado es similar al descrito previamente en otros estudios con ratón y con rata (Dominguez y col., 2003; Strain y Tasker, 1991; Ben-Ari, 1985). Así, entre las 6 y 8 horas después del tratamiento, en el hipocampo (hilus y región CA3) se observan muchas células dañadas, con núcleo picnótico y retracción citoplasmática, justamente en las áreas hipocampales donde la expresión de *Zac1* está menos, o incluso no está, inducida (Figura 7 y Tabla 2, Resultados, Capítulo 3). Hacia las 18 horas tras el tratamiento con AK, incrementa el número de células dañadas en el hipocampo (CA1, CA3 y hilus), al mismo tiempo que desaparece la expresión de *Zac1* en esta región, exceptuando en algunas células de la CA3. Cuantitativamente, el porcentaje de células dañadas que expresan *Zac1* es de 11% a las 6h y de 5% a las 18 horas, demostrando que el número de células dañadas que expresan *Zac1* disminuye a tiempos más largos.

Los resultados obtenidos en la detección del DNA fragmentado (núcleos apoptóticos) refuerzan los estudios histológicos (Figura 7, Resultados, Capítulo 3). Así, a las 6 horas que siguen al tratamiento con AK, pocas células apoptóticas se encuentran en el hilus (en el cuál *Zac1* no está inducida) y en la región CA3 (en la cuál *Zac1* está inducida en pocas células). A las 18 horas, se observan muchas células apoptóticas en la región CA3, en la cuál la inducción de *Zac1* ha disminuido. Por tanto, el mayor número de células apoptóticas se observa exactamente cuando la inducción de la expresión de *Zac1* ha desaparecido. Sin embargo, los procesos celulares que conducen a la apoptosis son muy lentos (Mikati et al., 2003; Araki y col., 2002; Tooyama y col., 2002; Djebaïli et al., 2001) y, es posible que algunas células que expresan *Zac1* a tiempos tempranos puedan morir en las horas y días subsecuentes por apoptosis, aunque no coincidan temporalmente con la expresión de *Zac1*. Esta hipótesis se confirmará en el capítulo siguiente.

Los resultados obtenidos en los distintos modelos convulsivos muestran que la inducción de la expresión de *Zac1* es intensa en el modelo que ocasiona extensa activación celular, y consecuentemente, mayor muerte neuronal: el modelo con AK. Sin embargo, muy pocas células dañadas o apoptóticas expresan *Zac1*, mientras que su expresión es alta en las neuronas granulares del giro dentado, las cuáles presentan resistencia al daño neuronal (Bugra et al., 1994; Zagulska-Szymczak y col., 2001). Además, *Zac1* está inducida en las células gliales de las zonas proliferativas del giro dentado y de los ventrículos laterales (Frederiksen y McKay, 1988; Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Cremisi y col., 2003). En este sentido, el gen *Zac1* induce y regula la

expresión del gen de *PACAP-R1* (Spengler y col., 1997; Rodriguez-Henche et al, 2002), el cuál esta implicado en los procesos neurotróficos durante el desarrollo normal del cerebro. Los resultados aquí presentados muestran muchas analogías con la expresión del gen de *PACAP-R1* en los modelos convulsivos con AK (Boschert y col., 1997). Además, ambos genes muestran inducción después de una lesión isquémica (Gillardon y col., 1998). Todo ello sugiere que *Zac1* y *PACAP-R1* actúan coordinadamente en las diversas respuestas biológicas que ocurren tras una fuerte activación neuronal.

CAPÍTULO 4

La proteína anti-proliferativa Zac1 está implicada en la determinación neural y en la resistencia al daño neuronal.

4.1. Fenotipo del cerebro adulto del ratón mutante para Zac1

Los ratones mutantes para Zac1 han sido obtenidos en la cepa C57BL/6 mediante la supresión del gen Zac1. El ratón heterocigoto +/- presenta el mismo fenotipo que el ratón homocigoto -/-. Por tanto, el gen Zac1 es dominante. El fenotipo de los ratones mutantes (+/- y -/-) adultos es aparentemente normal. Sin embargo, su tamaño es relativamente menor y presentan una alta incidencia de quistes y, en algunos casos, de nódulos tumorales, especialmente asociados con el aparato reproductor. Además, aunque su actividad reproductora inicial es normal, se quedan infértiles al cabo de un par de meses después de su maduración sexual (concretamente a los 6 meses). La actividad sexual y reproductora está íntimamente asociada con el hipotálamo, donde Zac1 se expresa intensamente en su formación y desarrollo (Resultados, Capítulo 1). La proteína Zac1 posee homología con los miembros de la familia PLAG, especialmente con el candidato a supresor tumoral PLAGL1 (Kas y col., 1997; Voz y col., 1998; Hensen y col., 2002). Sin embargo, el fenotipo observado en el ratón mutante para Zac1 (retraso en el crecimiento y alteraciones en la fertilidad) es similar al descrito por Hensen y colaboradores (2004) en el estudio del mutante para el proto-oncogene PLAG1. Estos datos juntamente con los obtenidos en el Capítulo 1 de Resultados, refuerzan la hipótesis de que Zac1 sea un cuarto miembro de la familia PLAG (Hensen y col., 2002).

Para la obtención de una colonia permanente de ratones mutantes para Zac1 se cruzaron machos -/- y hembras +/+ de aproximadamente 4 meses de edad. Los ratones mutantes recién nacidos, presentan una tasa de supervivencia del 50% en el día del nacimiento, y se incrementa al 80% en los días siguientes. Los neonatos mueren por carencia nutricional, ya que aparentemente carecen del instinto de mamar. Posiblemente poseen algún fallo en el sistema límbico, en concreto: (a) en el bulbo olfativo, imposibilitando el reconocimiento de las señales odoríficas de la madre asociadas con el acto de mamar; o (b) en el hipotálamo, el cuál produce factores hormonales asociados al hambre y a la sed. Dado que Zac1 se expresa intensamente en el bulbo olfativo y en el hipotálamo durante el desarrollo embrionario (Resultados, Capítulo 1), posiblemente, su ausencia provoca alteraciones que estarían implicadas con el complejo acto neonatal de mamar.

El análisis de los cerebros de los ratones mutantes ha permitido constatar la existencia de una alta incidencia de hidrocefalia (1 en cada 3 ratones). Durante el desarrollo y en adulto, Zac1 se expresa abundantemente en los plexos coroideos (Tabla I, Resultados, Capítulo 1), implicados en la

regulación del líquido cerebroespinal, sugiriendo que la ausencia de *Zac1* provoca alteraciones en los procesos homeostáticos que conducen al desarrollo de la hidrocefalia.

4.2. *Zac1* regula la proliferación en los nichos germinativos del cerebro adulto

Los resultados histoquímicos (Nissl y verde de metilo-pironina) en los ratones mutantes evidencian un incremento en el número de células proliferativas de la capa subgranular del giro dentado y de la zona subventricular, así como en la RMS. Estos resultados son reforzados mediante técnicas inmunohistoquímicas, ya que también revelan un sustancial aumento en las poblaciones celulares PCNA-positivas y BrdU-positivas del giro dentado, de los ventrículos laterales y de la RMS. Sin embargo, en estas áreas proliferativas no se detectan cambios en las poblaciones celulares que expresan nestina. Por tanto, los resultados obtenidos refuerzan el carácter anti-proliferativo de la proteína *Zac1* (Spengler et al., 1997; Varrault y col., 1998), ya que en los ratones mutantes hay un notable incremento en la tasa proliferativa de las zonas germinativas del cerebro del adulto (Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Doestch, 2003; Kintner, 2002). Además, los resultados muestran que la expresión de *Zac1* es importante en la proliferación de los progenitores neurales mientras que es prescindible en la proliferación de las células madre del cerebro adulto.

4.3. *Zac1* en la diferenciación de los progenitores neurales

En los ratones mutantes, los resultados inmunohistoquímicos (Figuras 1-5 y Tabla I, Resultados, Capítulo 4) revelan la existencia de alteraciones en distintas subpoblaciones neuronales (GABAérgicas y colinérgicas) y gliales (oligodendrocitos, astrocitos, y microglía) en regiones cerebrales muy concretas del sistema límbico.

Zac1 en la RMS

Los ratones mutantes muestran una reducción del número de neuronas indiferenciadas (células PSA-NCAM-positivas) que llegan al bulbo olfativo y la ausencia de neuronas calretinina-positivas en la capa glomerular del bulbo olfativo. Además, estos ratones presentan una reducción en las poblaciones neuronales que expresan *GAD65* en las capas granular y glomerular, así como una reducción en las neuronas y en las proyecciones dentríticas (neuronas MAP2a&b-positivas) entre ambas capas del bulbo olfativo. Inversamente, en estos ratones mutantes hay un sustancial aumento de las poblaciones de astrocitos (células GFAP-positivas) en el bulbo olfativo. Por tanto, en los ratones mutantes los progenitores adoptan un carácter glial lo que conduce a una sobreproducción de astrocitos y, simultáneamente, una bajada en las poblaciones de neuronas GABAérgicas que expresan calretinina. En el desarrollo, *Zac1* se expresa intensamente en las

células neuroepiteliales, las cuáles, en los mamíferos, generan todas las neuronas y células macrogliales del sistema nervioso central (Resultados, Capítulos 1 y 2). En adulto, la expresión de *Zac1* persiste en las células germinativas de la SVZ, las cuáles migran hacia el bulbo olfativo a través de la RMS, donde se diferencian esencialmente en interneuronas GABAérgicas (Menezes y col., 2002). Todo ello, sugiere que la expresión de *Zac1* es determinante en la diferenciación de los progenitores neurales que originarán las neuronas GABAérgicas calretinina-positivas (Fig. 45 vía (1)), mientras que su ausencia favorece conduce a la diferenciación de los progenitores neurales hacia astrocitos (Fig. 45 vía (2)), en el bulbo olfativo.

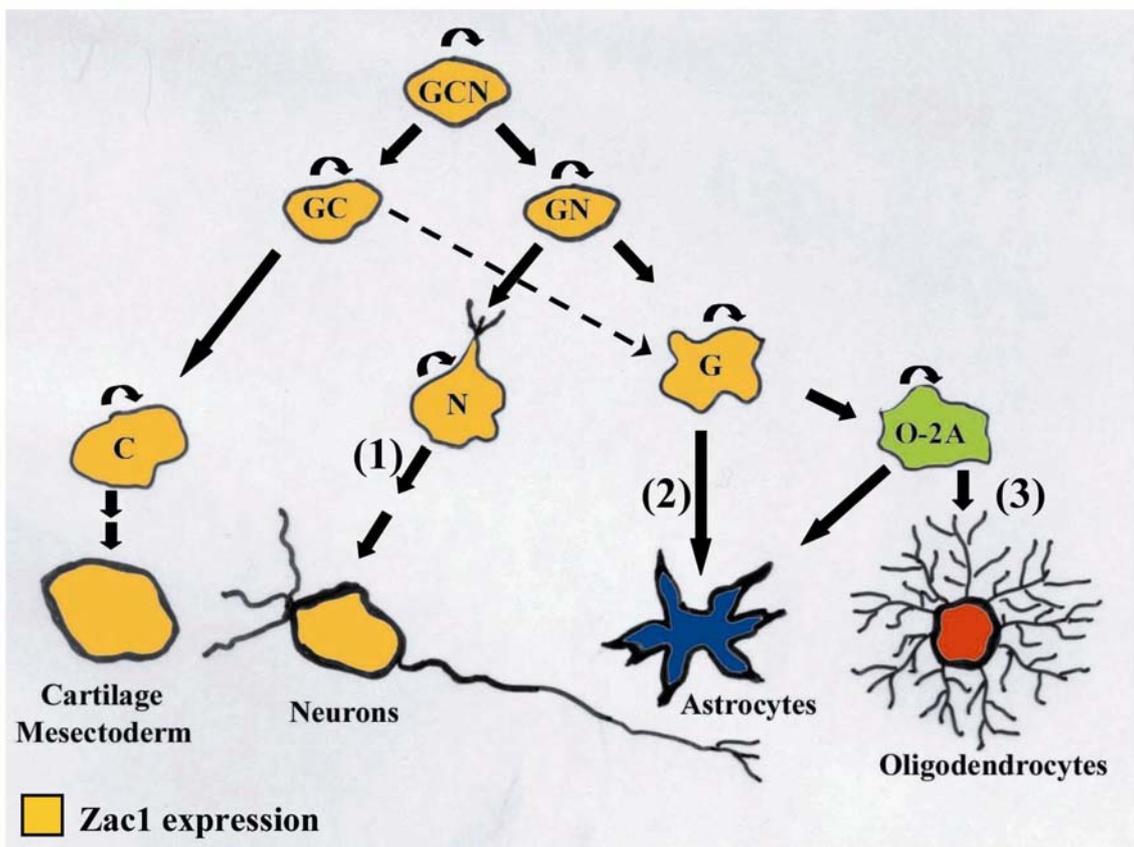


FIGURA 45. Esquema representativo de la expresión de *Zac1* durante la división celular de los progenitores neurales. *Zac1* se expresa en los progenitores neurales (GCN) que originarán al menos 3 líneas celulares distintas: neuronas (N), macroglía (G) y cartilago (C). En adulto, la expresión de *Zac1* persiste en las neuronas y en las células del cartilago diferenciadas. En los ratones mutantes para *Zac1*, la vía (1) está selectivamente inducida (aumento de las neuronas que expresan NPY, calbindina y parvalbúmina) mientras que la vía (3) está parcialmente reprimida, exceptuando en la RMS, donde la vía (1) está selectivamente bloqueada (no hay células calretinina-positivas) mientras que la vía (2) está inducida (astrocitos).

Zac1 en el prosencéfalo y diencefalo

En los ratones mutantes hay un notable incremento en algunas subpoblaciones neuronales (neuronas calbindina-positivas, neuronas parvalbumina-positivas y neuronas NPY-positivas) en distintas áreas cerebrales, mientras que hay una reducción en las subpoblaciones de oligodendrocitos inmaduros y maduros en la materia blanca. Además, hay una disminución generalizada de los axones mielinizados (axones MBP-positivos). Los oligodendrocitos juegan un papel fundamental en los procesos de mielinización axonal (para revisión véase Buttery y ffrench-Constant, 2001), y, en este sentido una disminución en la población de oligodendrocitos maduros provoca alteraciones en la mielinización axonal de los ratones mutantes para Zac1. Además, los resultados en desarrollo, muestran que Zac1 se expresa en las células progenitoras de la eminencia gangliónica lateral y medial (Resultados, Capítulos 1 y 2). Esta área cerebral está implicada en la generación de interneuronas GABAérgicas y oligodendrocitos (Olsson y col., 1998; Wilson y Rubenstein, 2000; Rakic y Zecevic, 2003). Así, la inactivación del gen Zac1 impide la diferenciación de los progenitores neurales hacia oligodendrocitos (Fig. 45 vía (3)), mientras que favorece la producción de subpoblaciones neuronales GABAérgicas (Fig. 45 vía (1)). Por tanto, Zac1 desempeña un papel importante en el control de la especificación neural hacia interneuronas o hacia oligodendrocitos.

Zac1 en las neuronas de catecolinérgicas

Los ratones mutantes muestran una importante reducción en las subpoblaciones neuronales catecolinérgicas (células TH-positivas), así como en sus proyecciones axonales. Durante el desarrollo, Zac1 se expresa en las células catecolinérgicas (Resultados, Capítulo 2), las cuáles regulan los factores hormonales producidos en el hipotálamo (Gonzalez et al., 1989; Dorton, 2000). Por tanto, la expresión de Zac1 es importante para la diferenciación de los progenitores neuronales (Fig. 45 vía (1)) que determinan las subpoblaciones catecolinérgicas del hipotálamo y del tronco cerebral.

Todos estos resultados juntos, apuntan a que la proteína anti-proliferativa Zac1 juega un papel importante en la diferenciación de distintas subpoblaciones de progenitores neurales, en determinadas regiones cerebrales.

Zac1 en las células microgliales

Los ratones mutantes presentan una disminución en las poblaciones microgliales. Estas células se consideran la única población celular de origen mesodermal del cerebro, ya que provienen de un linaje hematopoyético (Ling y Wong, 1993; Corti et al., 2002). Las células

microgliales se activan en respuesta al daño celular y están involucradas en procesos autoinmunes del sistema nervioso central (van Rossum y Hanisch, 2004). Recientemente, se ha descrito que las células microgliales expresan marcadores característicos de los progenitores de los oligodendrocitos, y, además, los estudios *in vitro* muestran que las células de la microglía tiene carácter multipotente, ya que pueden originar neuronas, astrocitos, o oligodendrocitos (Yokoyama et al., 2004). Todo ello sugiere que *Zac1* puede tener un papel importante en los procesos de microgliogénesis.

4.4. Papel de la *Zac1* en el daño neuronal

Los ratones mutantes y salvajes tratados intraperitonealmente con el AK desarrollan convulsiones de intensidad y frecuencia comparables. Además, el patrón de lesión obtenido en los ratones salvajes es idéntico al obtenido previamente en otra cepa de ratón usando el mismo modelo (Resultados, Capítulo 3; Dominguez y col., 2003), así como en otros modelos de rata y ratón (Strain y Tasker, 1991; Ben-Ari, 1985). Sin embargo, el análisis del patrón de lesión celular en los ratones mutantes tratados con AK es distinto respecto al obtenido en los ratones salvajes. Así, los ratones mutantes presentan un menor daño neuronal a corto plazo (en las primeras 12 horas), periodo en el que el daño necrótico es predominante, y ningún signo de daño neuronal a partir de las 24 horas después del tratamiento con AK, justamente cuando se visualizan las células apoptóticas en el hipocampo de los ratones salvajes. Estos resultados muestran que en los animales mutantes no se activan las cascadas intracelulares que conducen a la muerte celular por apoptosis, reforzando el papel de *Zac1* en la inducción de la apoptosis (Spengler y col., 1997) y la hipótesis sugerida en el capítulo 3 de la discusión. Además, los resultados obtenidos sugieren que la inducción temprana de *Zac1*, en los modelos convulsivos con AK, es imprescindible para la activación de las vías apoptóticas que se visualizarán en los días siguientes, y, además, sugieren que *Zac1* está implicada en los primeros pasos de las vías apoptóticas.

Sin embargo, la tasa de mortalidad en los ratones mutantes tratados con AK es visiblemente mayor que la tasa obtenida en los ratones salvajes tratados con AK. Ben-Ari (1985) determinó que la concentración de AK que llega al cerebro varía entre 2 al 4 % de la dosis administrada intraperitonealmente, y por tanto la mayor parte del AK seguirá las rutas metabólicas. Durante el desarrollo y en adulto, *Zac1* se expresa en diversos tejidos periféricos, tales como el estómago, el páncreas y el hígado, sugiriendo que la alta mortalidad de los ratones mutantes tratados con AK se deba a un fallo en las vías metabólicas.

Los estudios inmunohistoquímicos en los ratones mutantes y salvajes tratados con AK, evidencian algunos cambios en las poblaciones neuronales y gliales hacia las 48 horas después del tratamiento con AK. Así, en los animales mutantes (a) hay una notable reducción del número de células proliferativas en la capa subgranular del giro; (b) aparecen algunas células proliferativas en el septum, las cuáles son esencialmente oligodendrocitos inmaduros y células microgliales activadas; (c) hay una reducción notable del número de neuronas diferenciadas en el septum. Además, el grado de proliferación observado en el septum de los ratones mutantes es mucho menor que el observado en los animales salvajes. En las áreas donde hay pérdida neuronal, tras el tratamiento con AK, hay profundos cambios en las poblaciones gliales, así como en las interacciones entre la glía y los axones (Marty y col., 1991). A tiempos cortos, la microglía y la oligodendroglía residentes son activados. En las horas y días posteriores hay un aumento progresivo en el número de células gliales mitóticamente activas, tales como astrocitos, células microgliales y precursores de oligodendrocitos (Marty y col., 1991; Niquet y col., 1994a,b); Murabe y col., 1982). El periodo en que hay una intensa proliferación glial corresponde al periodo en que ocurre la fragmentación del DNA (apoptosis), sugiriendo que ambos procesos están estrechamente relacionados (Tooyama y col., 2002). Sin embargo, los resultados en los animales mutantes muestran que hay una respuesta glial mismo que no haya inducción de la apoptosis, aunque esta respuesta glial sea en mucho menor grado. Posiblemente, esta baja respuesta glial corresponde a la pérdida neuronal (necrótica) que se observa a tiempos cortos, tanto en los ratones mutantes como en los salvajes.

Por tanto, en los ratones mutantes tratados con AK se reduce la proliferación celular a la vez que se bloquea la apoptosis, lo cuál sugiere que la expresión de *Zac1*, por un lado, es determinante para inducir la apoptosis neuronal en los modelos neurodegenerativos con AK, y por otra parte, es importante para inducir la proliferación de los progenitores neurales del giro dentado y la diferenciación de los progenitores neuronales de la zona subventricular tras insultos convulsivos.

CONCLUSIONES

1. Los niveles de expresión del gen murino, *Zac1*, alcanzan un máximo durante el desarrollo embrionario, contrariamente a lo que sucede con el gen humano, *ZAC*.
2. Durante el desarrollo, el gen anti-proliferativo *Zac1* se expresa intensamente en las células madre/progenitoras de los neuroepitelios ventriculares.
3. Durante la embriogénesis, *Zac1* se expresa intensamente en las células progenitoras mitóticamente activas mientras que su expresión en las células progenitoras apoptóticas es mínima.
4. Durante el desarrollo, *Zac1* se expresa en los progenitores neuronales que se diferencian esencialmente en interneuronas GABAérgicas, y su expresión se mantiene en el adulto.
5. *Zac1*, al igual que el colágeno del tipo II, se expresa en todas las fases del ciclo de vida de los condrocitos (condrogénesis), sugiriendo que *Zac1* pueda tener un papel regulador en el desarrollo del esqueleto.
6. *Zac1* se expresa en la células precursoras del tejido muscular durante la proliferación, migración y diferenciación, sugiriendo que *Zac1* podría ser un factor de regulación en la miogénesis.
7. *Zac1* es inducido tempranamente en las células neurales (glía y neuronas) del sistema límbico en modelos convulsivos con AK que conducen a una fuerte activación/muerte celular, y esta inducción es dependiente de la activación de los receptores NMDA.
8. *Zac1* regula la proliferación de los progenitores neurales pero no la de las células madre.
9. En la rostral migratory stream, la expresión de *Zac1* determina la diferenciación de los progenitores neurales que originarán las neuronas GABAérgicas que expresan calretinina, y su ausencia favorece la diferenciación de los progenitores neurales en astrocitos.
10. La ausencia de *Zac1* impide la diferenciación de los progenitores neurales hacia oligodendrocitos, desviando la diferenciación hacia distintas subpoblaciones de neuronas GABAérgicas (que expresan calbindina, parvalbúmina o NPY) y catecolinérgicas (que expresan TH).
11. La expresión de *Zac1* en los modelos neurodegenerativos con AK es determinante para inducir la apoptosis neuronal, y para inducir la proliferación de los progenitores neurales del giro dentado y de la zona subventricular.

