Universitat de Lleida

# Desarrollo de las neuronas amigdalinas derivadas del hipotálamo: del origen histogenético al fenotipo

Beatriz Castro Robles

http://hdl.handle.net/10803/405475

**ADVERTIMENT**. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING**. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Universitat de Lleida

# TESI DOCTORAL

# Desarrollo de las neuronas amigdalinas derivadas del hipotálamo: del origen histogenético al fenotipo

Beatriz Castro Robles

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida
Programa de Doctorat en Salut

Director/a
Ester Desfilis Barceló
Loreta Mª Medina Hernández

Tutor/a
Loreta Mª Medina Hernández

2017

Universitat de Lleida
Departament de Medicina Experimental

Avda. Alcalde Rovira Roure 80
Edifici Biomedicina II - IRBLleida
E-25198 LLEIDA (Catalunya)
Telf. +34 (9) 73 702961
Fax +34 (9) 73 702426
secretaria@mex.udl.cat
http://web.udl.cat/dept/mex

La Dra. Loreta Mª Medina Hernández, Catedrática contratada (*Serra i Hunter*) del Área de Anatomía y Embriología Humana, y la Dra. Ester Desfilis Barceló, Profesora Agregada (*Serra i Hunter*) del Área de Psicobiología, ambas del Departamento de Medicina Experimental de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida,

HACEN CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral titulada "Desarrollo de las neuronas amigdalinas derivadas del hipotálamo: del origen histogenético al fenotipo" ha sido realizada por Beatriz Castro Robles bajo nuestra inmediata dirección en el Departamento de Medicina Experimental de la Universitat de Lleida, y reúne todos los requisitos de originalidad, calidad científica y legislativos para ser presentada y defendida con el objetivo de optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente escrito.

Lleida, 22 de abril de 2017

Dra. Loreta Mª Medina Hernández  Dra. Ester Desfilis Barceló

# ÍNDICE

**ABREVIATURAS**.....i

**RESUMEN**.....vii

**ABSTRACT**.....ix

**RESUM**.....xi

**1. INTRODUCCIÓN**..... 3

1.1 NEUROPÉPTIDOS VASOPRESINA Y OXITOCINA..... 5

1.1.1 Distribución de vasopresina y oxitocina y de sus receptores en el cerebro de mamíferos..... 6

1.1.2 Función de los sistemas vasopresinérgicos y oxitocinérgicos en el cerebro de mamíferos..... 7

1.1.3 Sistemas VP y OT: dianas en tratamientos de trastornos psiquiátricos y del neurodesarrollo en humanos.....10

1.2 MORFOGÉNESIS DEL TUBO NEURAL.....13

1.2.1 Regionalización dorsoventral y anteroposterior del tubo neural.....15

1.2.2 Principales tipos de migración: radial y tangencial.....17

1.3 MODELOS DE INTERPRETACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN ANATÓMICA DEL PROSENCÉFALO.....20

1.4 ORGANIZACIÓN DEL PROSENCÉFALO Y DOMINIOS HISTOGENÉTICOS.....22

1.4.1 Principales dominios histogenéticos de la placa alar hipotalámica.....25

1.4.2 División del telencéfalo embrionario: palio y subpalio.....27

1.4.2.1 Formación de las divisiones y subdivisiones radiales del telencéfalo..29

1.4.3 Límite telencéfalo-hipotálamo.....30

1.4.4 La amígdala.....31

1.4.4.1 Organización en mosaico de la amígdala.....32

1.4.4.2 La amígdala centromedial extendida.....33

1.4.4.3 Subdivisiones paliales y subpaliales de la amígdala.....35

1.4.4.4 Contribución extratelencefálica a la amígdala.....37

1.5 DIFERENCIACIÓN CELULAR EN EL HIPOTÁLAMO Y EL TELENCÉFALO.....39

1.5.1 Especificación molecular de las poblaciones neuronales productoras de neuropéptidos.....39

1.6 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ..... 41

**2. MATERIALES Y MÉTODOS** ..... 45

2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN ..... 45

2.2 DISECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO ..... 45

2.2.1 Obtención del tejido, fijación y sexado ..... 45

2.2.2 Sección de los cerebros ..... 45

2.2.2.1 Vibratomo ..... 45

2.2.2.2 Criostato ..... 46

2.3 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* ..... 47

2.3.1 Hibridación *in situ* con fosfatasa alcalina (ARN-ARN) ..... 47

2.3.2 Hibridación *in situ* indirecta fluorescente ..... 48

2.3.3 Obtención de ribosondas: técnicas de biología molecular ..... 50

2.3.3.1 Transformación y cultivo de bacterias competentes ..... 50

2.3.3.2 Extracción del plásmido ..... 52

2.3.3.3 Linealización ..... 52

2.3.3.3.1 Enzimas de restricción ..... 52

2.3.3.3.2 PCR ..... 53

2.3.3.4 Síntesis de ribosondas ..... 54

2.4 TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA ..... 56

2.4.1 Inmunohistoquímica simple indirecta con el método ABC ..... 56

2.4.2 Método de recuperación del antígeno (*antigen retrieval*) ..... 58

2.4.3 Simple y doble inmunofluorescencia indirecta ..... 58

2.4.4 Triple inmunohistoquímica: doble inmunofluorescencia indirecta combinada con inmunohistoquímica simple indirecta ..... 60

2.5 ENSAYOS DE MIGRACIÓN ..... 60

2.5.1 Cultivos organotípicos ..... 60

2.5.2 Recuperación de la fluorescencia ..... 61

2.6 ANÁLISIS Y ADQUISICIÓN DE DATOS ..... 62

2.6.1 Microscopía de campo claro ..... 62

2.6.2 Microscopía confocal.....62

2.6.3 Tratamiento de imagen.....62

**3. RESULTADOS**.....65

3.1 EL DOMINIO SPV Y SUS SUBDIVISIONES TERMINAL Y PEDUNCULAR.....65

3.1.1 Extensión radial y límites del dominio SPV en estadios tempranos .....65

3.1.2 Distinción de las divisiones terminal y peduncular del domino SPV en base a la expresión de Rgs4 .....70

3.2 ONTOGENIA DE LAS CÉLULAS VP Y OT EN EL HIPOTÁLAMO Y LA AMÍGDALA MEDIAL EXTENDIDA .....91

3.2.1 Patrón de expresión de VP y OT durante el desarrollo embrionario .....92

3.2.2 Patrón de expresión de VP en etapas postnatales .....96

3.3 ENSAYOS DE MIGRACIÓN.....113

3.3.1 La división terminal del dominio SPV produce células para el área preóptica ventral y la región quiasmática terminal .....113

3.3.2 La división peduncular del dominio SPV produce células para el hipotálamo anterior y lateral, el núcleo supraóptico principal, la amígdala medial extendida y el dominio quiasmático peduncular.....115

3.3.3 El SPV peduncular produce células vasopresinérgicas para el hipotálamo anterior y lateral, el núcleo supraóptico principal y áreas más ventrales del hipotálamo, así como para la EAme .....116

3.3.4 El dominio preóptico produce células para la amígdala medial extendida (incluyendo el BSTM y la amígdala medial) y otras áreas subpaliales del telencéfalo .....118

**4. DISCUSIÓN** .....139

4.1 El dominio supraopto-paraventricular y sus subdivisiones terminal y peduncular 140

4.2 Rutas de migración tangencial desde el SPV terminal y peduncular a otros dominios.....144

4.2.1 Contribución del subdominio SPV terminal al área preóptica ventral, al dominio quiasmático terminal y al hipotálamo tuberal .....146

4.2.2 Contribución del subdominio SPV peduncular al área preóptica comisural, a la amígdala medial extendida, al dominio quiasmático peduncular, a áreas basales del hipotálamo peduncular y al pretálamo.....147

4.3 Fenotipo de las neuronas que migran desde el SPV a la EAme y a otros dominios ..... 149

4.3.1 Distribución de VP y OT en el hipotálamo y en la EAme durante el desarrollo embrionario, y comparación con Otp y con los ensayos de migración celular ..... 149

4.3.2 Dimorfismo sexual de las neuronas VP y OT ..... 151

4.4. Nueva concepción del dominio preóptico y su contribución a la amígdala medial extendida y otras áreas subpaliales ..... 152

**5. CONCLUSIONES** ..... 157

**6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... 163

**ANEXOS** ..... 189

ANEXO I. Reactivos y disoluciones empleadas ..... 191

ANEXO II. Ejemplares utilizados en este estudio ..... 197

Tabla de animales usados para los ensayos de hibridación *in situ* o inmunohistoquímica ..... 197

Tabla de casos seleccionados de los ensayos de migración ..... 199

ANEXO III. Comparación de expresión de VP y OT en machos y hembras ..... 201

# ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| **ac** | Comisura anterior |
| **AH** | Hipotálamo anterior |
| **AP** | Regionalización anteroposterior |
| **Arc** | Núcleo arcuato |
| **ARNm** | ARN mensajero |
| **Bas** | Núcleo basal de Meynert |
| **BST** | Lecho del núcleo de la *stria terminalis* |
| **BSTL** | División lateral del BST |
| **BSTM** | División medial del BST |
| **BSTMh** | División hipotalámica del BSTM |
| **BSTMp** | BSTM posterior |
| **BSTMpl** | BSTM posterolateral |
| **BSTS** | Parte supracapsular del BST |
| **Cb** | Cerebelo |
| **Ce** | Amígdala central |
| **Ch/SPa** | Dominio quiasmático o subparaventricular |
| **Chp/PSPa** | División peduncular del Ch/SPa |
| **Cht/TSPa** | División terminal del Ch/SPa |
| **CMFDA** | Trazador celular fluorescente |
| **CRF** | Hormona liberadora de corticotropina |
| **DV** | Regionalización dorsoventral |
| **EA** | Amígdala extendida |
| **EAme** | Amígdala medial extendida |
| **EG** | Eminencia ganglionar |
| **EMT** | Eminencia pretalámica |
| **GP** | Globo pálido |
| **Hyb** | Hipotálamo basal |
| **ic** | Cápsula interna |
| **IC** | Colículo inferior |
| **LH** | Hipotálamo lateral |
| **M** | Región mamilar |
| **Me** | Amígdala medial |
| **ME** | Eminencia media |
| **MeA** | Amígdala medial anterior |
| **MeP** | Amígdala medial posterior |

| | |
|---|---|
| **NCx** | Neocortex |
| **ob** | Bulbo olfatorio |
| **och** | Quiasma óptico |
| **os** | Tallo óptico |
| **OT** | Oxitocina |
| **ot** | Tracto óptico |
| **Otp** | *Orthopedia homeobox* |
| **OTR** | Receptor de oxitocina |
| **ov** | Vesícula óptica |
| **p3** | Prosómero 3 |
| **Pe** | Núcleo hipotalámico periventricular |
| **Pet** | Parte terminal o rostral del Pe |
| **PHy** | Hipotálamo peduncular |
| **PO** | Dominio preóptico |
| **POC** | Parte comisural del PO |
| **POv** | Parte ventral del PO |
| **PTh** | Pretálamo |
| **PVN** | Núcleo paraventricular hipotalámico |
| **RM** | Área retromamilar |
| **RTu** | Área hipotalámica retrotuberal |
| **SC** | Colículo superior |
| **SCh** | Núcleo supraquiasmático |
| **SEAme** | EAme sublenticular |
| **Shh** | *Sonic Hedgehog* |
| **SNC** | Sistema nervioso central |
| **SO** | Núcleo supraóptico principal |
| **SOt** | Núcleo supraóptico terminal |
| **SOtu** | Núcleo supraóptico tuberal |
| **SPV** | Dominio supraopto-paraventricular hipotalámico |
| **SPVp** | División prosomérica peduncular del SPV |
| **SPVt** | División prosomérica terminal del SPV |
| **St** | Estriado |
| **st** | *Stria terminalis* |
| **SuC** | Núcleo quiasmático superficial |
| **TEA** | Trastorno de espectro autista |
| **Th** | Tálamo |

| | |
|---|---|
| **THy** | Hipotálamo terminal |
| **TRH** | Hormona liberadora de tirotropina |
| **Tu** | Área hipotalámica tuberal |
| **v** | Ventrículo |
| **VM** | Núcleo ventromedial hipotalámico |
| **VOLT** | Órgano vascular de la lámina *terminalis* |
| **VP** | Vasopresina |
| **VPR** | Receptor de vasopresina |

# Resumen / Abstract / Resum

# RESUMEN

Los nonapéptidos vasopresina y oxitocina tienen un papel clave en varios aspectos del comportamiento y la cognición social, como afiliación, formación de vínculos de pareja y reconocimiento materno-filial. En el cerebro, son producidos principalmente por neuronas de los núcleos hipotalámicos paraventricular (PVN) y supraóptico (SO), cuyos axones los liberan como hormonas principalmente en la neurohipófisis. Ambos nonapéptidos son también liberados en el cerebro desde éstas y otras subpoblaciones de neuronas del hipotálamo y la amígdala medial extendida, actuando como neurotransmisores/neuromoduladores. Se ha propuesto que las neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas del PVN y SO se originan en el dominio hipotalámico supraopto-paraventricular (SPV) y que su diferenciación depende del factor de transcripción Otp, pero no se ha demostrado experimentalmente. Además, se desconoce el origen de las poblaciones de neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas localizadas en otras regiones del cerebro. Por otra parte, en las propuestas más recientes del modelo prosomérico, el SPV incluye dos partes que pertenecen a diferentes prosómeros, terminal y peduncular. No se conoce cuál es la contribución de cada subdivisión del SPV a la amígdala extendida ni si las células Otp alcanzan esta región mediante migraciones radiales o tangenciales. El objetivo de este estudio fue investigar estas cuestiones. Para ello, estudiamos el desarrollo de las células que expresan vasopresina (VP) y oxitocina (OT), mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, en embriones y postnatales de ratón. Con el fin de estudiar el origen de las neuronas vasopresinérgicas en el hipotálamo y el telencéfalo, realizamos ensayos de migración celular en secciones del prosencéfalo, utilizando un trazador celular fluorescente, seguidos de inmunofluorescencia. Para comprender mejor la localización de las células VP y OT y las rutas de migración desde el SPV terminal o peduncular, comparamos los resultados con datos de la expresión de Otp, Islet1 y Rgs4, y con la disposición de la glía radial. Mientras la combinación de Otp y Islet1 fue útil para discriminar el SPV de los dominios adyacentes, Rgs4 permitió la distinción de la parte peduncular del SPV. Las rutas de migración difirieron dependiendo de la posición del trazador celular. Desde el SPV terminal, las células migraron dorsalmente al área preóptica ventral y ventralmente a la región quiasmática terminal. Es posible que algunas de estas células migren hasta alcanzar el hipotálamo basal para formar el núcleo SO tuberal. Desde el SPV peduncular, muchas células migran siguiendo la dimensión radial, extendiéndose desde el PVN a través del hipotálamo anterior y lateral, el SO principal y una estrecha franja del BSTM posterior. Además, se observaron células que migran tangencialmente al BSTM lateral y otras partes de la

amígdala medial extendida, y también al hipotálamo ventral. Tras inmunofluorescencia para VP observamos numerosos casos de colocalización entre el trazador celular y el nonapéptido. En conclusión, en este trabajo demostramos que el SPV es la principal fuente de las células Otp y VP del hipotálamo y el telencéfalo, y que únicamente la parte peduncular produce células para la amígdala medial extendida.

# ABSTRACT

The nonapeptides vasopressin and oxytocin play key roles in several aspects of social behavior and cognition, such as affiliation, pair bond formation, and materno-filial recognition. In the brain, they are mainly produced by neurons of the paraventricular (PVN) and supraoptic (SO) hypothalamic nuclei, whose axons release them as hormones mainly in the neurohypophysis. Both nonapeptides are also released in the brain from these neurons and other subpopulations of the hypothalamus and the medial extended amygdala, acting as neurotransmitters/neuromodulators. While vasopressinergic and oxytocinergic neurons of the PVN and SO are supposed to originate in the supraopto-paraventricular hypothalamic domain (SPV) and their differentiation depends on the transcription factor Otp, experimental demonstration is missing. Moreover, the origin of the vasopressinergic and oxytocinergic neurons located outside PVN and SO is unknown. Besides, in recent postulations of the prosomeric model, the SPV includes two parts that belong to different prosomeres, terminal and peduncular. It is unclear what the contribution of each SPV subdivision to the extended amygdala is, and whether Otp cells arrive there by either radial or tangential migration. The aim of this study was to investigate these questions. We studied the development of the cells expressing vasopressin (VP) and oxytocin (OT), using in situ hybridization and immunohistochemistry, in mice at different embryonic and postnatal ages. We also performed migration assays in mouse embryonic forebrain slices, using a fluorescent cell tracker, followed by immunofluorescence in order to study the origin of vasopressin containing neurons of the hypothalamus and telencephalon. To better understand the location of the VP and OT cells and the migration routes from terminal or peduncular SPV, we compared the results to data on expression of Otp, Islet1 and Rgs4, and on radial glial disposition. While the combinatorial expression of Otp and Islet1 was useful to discriminate the SPV from adjacent domains, Rgs4 allowed distinction of the peduncular part of the SPV. The migration routes differed depending on the cell tracker position. From the terminal SPV, cells migrated dorsally to the ventral preoptic area, and ventrally to the terminal chiasmatic region. Perhaps some of the latter cells continue migration to the basal hypothalamus to form the tuberal SO. From the peduncular SPV, many cells migrated following the radial dimension, extending from the PVN through the anterior and lateral hypothalamus, principal SO, and a narrow branch of the posterior BSTM. In addition, tangential migration of cells was observed to the lateral BSTM and other parts of the medial extended amygdala, as well as to the ventral hypothalamus. Following immunofluorescence for vasopressin, we observed numerous cases of colocalization

between the cell tracker and the nonapeptide. In conclusion, we here demonstrate that SPV is the main source of Otp and VP cells of the hypothalamus and telencephalon, and that only its peduncular part produces cells for the medial extended amygdala.

# RESUM

Els nonapèptids vasopressina i oxitocina tenen un paper clau en diversos aspectes del comportament i la cognició social, com la afiliació, la formació de vincles de parella i el reconeixement matern-filial. En el cervell, són produïts principalment per neurones dels nuclis hipotalàmics paraventricular (PVN) i supraòptic (SO), els axons dels quals els alliberen com a hormones principalment en la neurohipòfisis. Tots dos nonapèptids són també alliberats en el cervell des d'aquestes i altres subpoblaciones de neurones de l'hipotàlem i l'amígdala estesa, actuant com neurotransmissors/neuromoduladors. S'ha proposat que les neurones vasopressinèrgiques i oxitocinèrgiques del PVN i SO s'originen en el domini hipotalàmic supraopto-paraventricular (SPV) i que la seva diferenciació depèn del factor de transcripció Otp, però no s'ha demostrat experimentalment. A més, es desconeix l'origen de les poblacions de neurones vasopressinèrgiques i oxitocinèrgiques localitzades en altres regions del cervell. D'altra banda, en les propostes més recents del model prosomeric, el SPV inclou dues parts que pertanyen a diferents prosomers, terminal i peduncular. No es coneix quin és la contribució de cada subdivisió del SPV a l'amígdala estesa ni si les cèl·lules Otp arribin a aquesta regió mitjançant migracions radials o tangencials. L'objectiu d'aquest estudi va ser investigar aquestes qüestions. Amb aquest proposit, estudiarem el desenvolupament de les cèl·lules que expressen vasopressina (VP) i oxitocina (OT), mitjançant hibridació in situ i inmunohistoquímica, en embrions i postnatals de ratolí. Amb la finalitat d'estudiar l'origen de les neurones vasopressinèrgiques en l'hipotàlem i el telencèfal, realitzarem assajos de migració cel·lular en seccions del prosencèfal, utilitzant un traçador cel·lular fluorescent, seguits de immunofluorescència. Per comprendre millor la localització de les cèl·lules VP i OT, i de les rutes de migració des del SPV terminal o peduncular, compararem els resultats amb dades de l'expressió de Otp, Islet1 i Rgs4, i amb la disposició de la glia radial. Mentre la combinació de Otp i Islet1 va ser útil per discriminar el SPV dels dominis adjacents, Rgs4 va permetre la distinció de la part peduncular del SPV. Les rutes de migració van diferir depenent de la posició del traçador cel·lular. Des del SPV terminal, les cèl·lules migraren dorsalment a l'àrea preòptica ventral i ventralment a la regió quiasmàtica terminal. És possible que algunes d'aquestes cèl·lules migren fins a arribar a l'hipotàlem basal per formar el nucli SO tuberal. Des del SPV peduncular, moltes cèl·lules migren seguint la dimensió radial, estenent-se des del PVN a través de l'hipotàlem anterior i lateral, el SO principal i una estreta franja del BSTM posterior. A més, es van observar cèl·lules que migren tangencialment al BSTM lateral i altres parts de l'amígdala medial estesa, i també a l'hipotàlem ventral. Amb inmunofluorescencia per a VP observarem

nombrosos casos de colocalització entre el traçador cel·lular i el nonapèptid. En conclusió, en aquest treball es demostra que el SPV és la principal font de les cèl·lules Otp i VP de l'hipotàlem i el telencèfal, i que únicament la part peduncular produeix cèl·lules per a l'amígdala medial estesa.

# 1. Introducción
## Antecedentes, hipótesis y objetivos

# 1. INTRODUCCIÓN

Una de las grandes preguntas del ser humano y un desafío para la ciencia es entender el funcionamiento del cerebro, y comprender cómo se producen nuestras emociones y pensamientos, y cómo se genera nuestra conducta. Para contestar a esta pregunta es imprescindible estudiar la organización de las redes neuronales del cerebro. Los estudios de neuroimagen están aportando información relevante en este sentido, y han puesto de relieve la existencia de estructuras hiperconectadas, como la amígdala, situada en el centro de redes neuronales implicadas en el procesamiento de las emociones y con distintos aspectos del comportamiento y la cognición social (Pessoa 2008; Medina *et al*. 2017). El creciente interés que suscita esta estructura se debe a que su funcionamiento está alterado en diferentes trastornos neurológicos y psiquiátricos (Heimer 2003; Phelps y LeDoux 2005; Whalen y Phelps 2009). Nuestro grupo de investigación (grupo de *Desarrollo y Evolución del Cerebro* de la Universitat de Lleida) lleva varios años estudiando la amígdala de distintos vertebrados usando una aproximación de la biología evolutiva del desarrollo ("evo-devo"), que está aportando datos muy relevantes para ayudar a comprender los principios de organización funcional de esta estructura (revisiones por Medina *et al*. 2011, 2017). La investigación del grupo ha demostrado que la amígdala está formada por múltiples neuronas con diferente origen embrionario y perfil genético, y ha llevado a sugerir que el origen determina en gran medida la conectividad de las neuronas, de forma que las neuronas de la amígdala con el mismo origen están preferentemente conectadas entre sí, proyectan a las mismas dianas y están implicadas en las mismas redes funcionales (García-López *et al*. 2008; Medina *et al*. 2011, 2017; Bupesh *et al*. 2011a,b; Vicario *et al*. 2014, 2015).

Este trabajo surge como continuación de la investigación del grupo sobre el origen de las neuronas de la amígdala medial extendida (García-López *et al*. 2008; Bupesh *et al*. 2011a; Vicario *et al*. 2017), que está implicada en diferentes aspectos del comportamiento social (Choi *et al*. 2005). Una subpoblación de las neuronas de la amígdala medial extendida se origina en el hipotálamo (García-Moreno *et al*. 2010; Bupesh *et al*.2011a), y nuestro grupo ha sugerido que esas poblaciones neuronales de la amígdala con origen extratelencefálico podrían expresar los neuropéptidos vasopresina (VP) y oxitocina (OT), y podrían estar conectadas con las que permanecen en el hipotálamo (Bupesh *et al*. 2011a; Medina *et al*. 2011, 2017; Vicario *et al*. 2017). Estos neuropéptidos, altamente conservados durante la evolución, están implicados en el control de distintos aspectos del comportamiento social y la cognición social (Young y Wang 2004; Cushing y Kramer 2005) y su neurotransmisión se

encuentra alterada en algunos tipos de autismo y esquizofrenia (Montag *et al*. 2012; Banerjee *et al*. 2014). Por ello, los sistemas de VP y OT se están convirtiendo en dianas de nuevos tratamientos contra alteraciones mentales. Sin embargo, a pesar de su creciente aplicación clínica, falta información sobre las redes funcionales en las que participan estos neuropéptidos. De ahí, la enorme importancia de estudiar el origen de las neuronas que los expresan, dado que los estudios del desarrollo son fundamentales para una mejor comprensión de los principios de organización funcional del cerebro adulto.

El objetivo de este trabajo de tesis ha sido estudiar el desarrollo de las neuronas que expresan estos neuropéptidos en el cerebro de ratón, analizando sus vías de migración desde su origen en el hipotálamo por medio de la expresión de diferentes genes y ensayos de migración celular.

Los apartados que se exponen a continuación pretenden explicar las bases en las que se fundamenta el estudio, comenzando por la relevancia biológica de los nonapéptidos VP y OT, para a continuación revisar los conocimientos actuales sobre el desarrollo embrionario del prosencéfalo desde la formación de los dominios progenitores en los estadios de placa y tubo neural hasta la diferenciación neuronal y su posicionamiento en estadios finales del desarrollo y del adulto.

## 1.1 NEUROPÉPTIDOS VASOPRESINA Y OXITOCINA

De los más de 100 neuropéptidos descritos en el cerebro de mamíferos, la mayoría son sintetizados y liberados por el hipotálamo, en algunos casos con efectos periféricos como hormonas endocrinas. Los neuropéptidos normalmente interaccionan con receptores acoplados a proteínas G, a través de los cuales pueden actuar como neurotransmisores o como neuromoduladores. Los nonapéptidos son una de las familias de neuropéptidos y se caracterizan por estar formados por nueve aminoácidos y producirse a partir de un precursor proteico de mayor tamaño denominado neurofisina (Fig. 1.1).

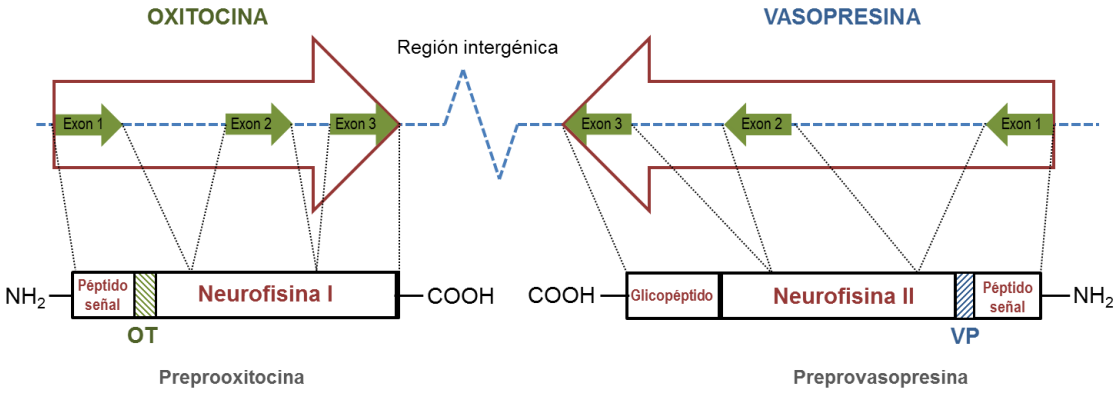



**Figura 1.1.** La vasopresina y la oxitocina cuentan con tres exones y dos intrones. Se encuentran en el mismo cromosoma (cromosoma 2 en ratón y cromosoma 20 en humano), pero orientados en direcciones transcripcionales opuestas, lo que significa que estos genes se duplicaron durante el desarrollo evolutivo. Los dos genes están separados por una región intergénica. La preprohormona consiste en el péptido señal, el nonapéptido (OT o VP), la neurofisina I (en preprooxitocina) y II (en preprovasopresina) y, en el caso de la preprovasopresina, en un glicopéptido en la parte C-terminal (Modificado de Caldwell *et al*., 2008).

Los nonapéptidos son evolutivamente antiguos y están presentes tanto en invertebrados como en vertebrados. La forma ancestral de vertebrados parece ser la arginina vasotocina presente en ciclóstomos y codificada por un único gen, el cual por duplicación dio lugar a las dos formas parálogas que encontramos en el resto de vertebrados: un péptido básico, la arginina vasotocina en no mamíferos y la arginina vasopresina (VP) en la mayoría de mamíferos, y un péptido neutral, isotocina en la mayoría de los peces, mesotocina en peces pulmonados y tetrápodos, y oxitocina (OT) en mamíferos euterios (revisado por Banerjee *et al*. 2017). En las diversas especies aparecen las siguientes características conservadas: 1) Los nonapéptidos se expresan tanto en el cerebro como en las gónadas; 2) la expresión de sus receptores está

afectada por los esteroides gonadales, los cambios estacionales y el sexo; y 3) son importantes en diferentes aspectos del comportamiento social (revisado en Goodson y Bass 2001; Caldwell y Young 2006; Goodson y Thompson 2010; Choleris *et al*. 2013; Banerjee *et al*. 2017).

### 1.1.1 Distribución de vasopresina y oxitocina y de sus receptores en el cerebro de mamíferos

VP y OT son dos neuropéptidos muy relacionados entre ellos que únicamente difieren en dos aminoácidos (Fig. 1.2). Ambos son sintetizados por neuronas de los núcleos supraóptico (SO) y paraventricular (PVN) del hipotálamo. En estos núcleos encontramos dos tipos de neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas: neuronas de gran tamaño denominadas magnocelulares y neuronas pequeñas o parvocelulares. Las neuronas magnocelulares parecen ser las responsables de producir la VP y la OT que se liberan al torrente sanguíneo a través de la glándula pituitaria posterior o neurohipófisis (revisado en Morris 2006). Como hormonas, OT promueve la contracción uterina durante el parto y la secreción de leche en la lactancia, mientras que VP incrementa la presión sanguínea mediante sus efectos antidiuréticos y vasoconstrictores (revisado en Banerjee *et al*. 2017). A nivel del sistema nervioso central estos neuropéptidos actúan como neurotransmisores y neuromoduladores (Stoop 2012). Aunque no pueden cruzar la barrera hematoencefálica, OT y VP son liberados en el propio hipotálamo desde el soma y las dendritas de las células neuroendocrinas (Ludwig 1998; Sabatier *et al*. 2004; Ludwig y Leng 2006; Tobin *et al*. 2012) y también desde sus axones a través de mecanismos sinápticos. Sin embargo, se ha propuesto que la acción de la VP y la OT en el sistema nervioso central (SNC) estaría mediada por las proyecciones de las neuronas parvocelulares situadas en estos mismos núcleos (principalmente en el PVN) y por neuronas VP y OT de otras áreas del SNC. Además de las poblaciones neuroendocrinas, existen neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas en zonas próximas al tercer ventrículo de otras regiones hipotalámicas, como el núcleo supraquiasmático, en el hipotálamo lateral, en el área preóptica y en la amígdala medial extendida (en rata: Buijs *et al*. 1978; DeVries *et al*. 1985; en ratón: Rood y De Vries 2011; Otero-Garcia *et al*. 2014; Otero-García *et al*. 2016). Algunas de estas neuronas coexpresan los dos neuropéptidos (Mezey y Kiss 1991; Otero-García *et al*. 2016).

La acción de VP y de la OT está mediada por sus respectivos receptores. Los tres principales tipos de receptores de la VP (VPR) son: VPR1a, VPR1b y VPR2 (Birnbaumer 2000; Caldwell *et al*. 2008). Para la OT se ha identificado un solo tipo de receptor, el OTR (Gimpl *et al*. 2008). Los más estudiados son OTR y VPR1a por su

abundante expresión en el cerebro (VPR1b también se expresa en el cerebro pero presenta niveles de expresión más bajos). El perfil de expresión de estos receptores es específico del sexo, estando afectado por los esteroides gonadales, y de la especie (Lim y Young 2006; Insel 2010).

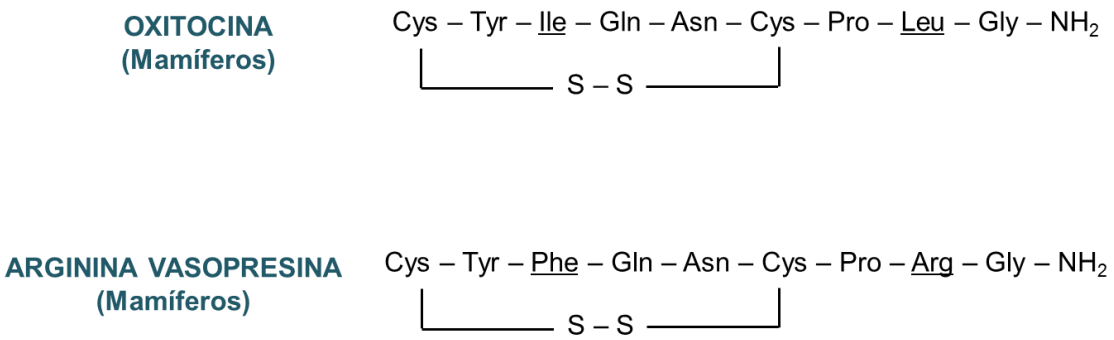



**Figura 1.2.** Estructura aminoacídica de la oxitocina y la vasopresina en mamíferos (difieren únicamente en dos aminoácidos).

### 1.1.2 Función de los sistemas vasopresinérgicos y oxitocinérgicos en el cerebro de mamíferos

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios en distintas especies animales sobre la función de los nonapéptidos en distintos aspectos cognitivos y de comportamiento, por ejemplo, comportamientos sociales (materno-filial y de pareja), el miedo, la ansiedad y el estrés, la olfacción, la homeostasis, y el aprendizaje y la memoria (Carter *et al*. 1995, 1997, 2008; Insel y Young 2001; Carter y Keverne 2002; Donaldson y Young 2008; Meyer-Lindenberg *et al*. 2011; Stoop 2012; Neumann y Landgraf 2012).

La liberación de VP y OT a nivel del sistema nervioso central regula una gran variedad de comportamientos sociales (Figs. 1.3 y 1.4) (Insel *et al*. 1998; Cho *et al*. 1999; Insel y Young 2001; Cushing y Kramer 2005; Goodson y Thompson 2010; Goodson 2013). Así, en distintas especies la OT promueve la interacción social y la aproximación, incluyendo comportamientos materno-filiales (Fig. 1.3) (Burbach *et al*. 2006) y la VP fomenta varios comportamientos sociales típicos de machos, incluyendo el marcado de territorio con señales olorosas, la agresión y el cuidado paternal (Fig.1.4) (Ferris *et al*. 1990; Boyd *et al*. 1992; Wang *et al*. 1994; Goodson y Bass 2001). Ambos neuropéptidos son importantes en la formación de recuerdos sociales imprescindibles para el reconocimiento de los individuos familiares (Bielsky y Young 2004).

**Figura 1.3.** Ciclo de vida simplificado que muestra la participación de la oxitocina tanto en aspectos conductuales como fisiológicos de relevancia biológica (Modificado de Lee *et al*. 2009).

**Figura 1.4.** Algunas de las funciones en el comportamiento social de mamíferos que regula la vasopresina.

Como hormona, la OT tiene funciones importantes en las hembras de mamífero durante el parto y postparto. Diversos estudios han sugerido que su acción a nivel del SNC estaría implicada en la inducción del comportamiento maternal tras el parto (Rosenblatt *et al*. 1988). En el comportamiento maternal postparto, se han implicado varias áreas del cerebro, entre las que se encuentran el área preóptica, el BST y el septum lateral. Los niveles de ARNm de OTR en estas áreas son mayores entorno a la fecha del parto, probablemente debido al alto nivel de estrógeno (Young *et al*. 1997; Leng *et al*. 2008), y se ha observado una correlación positiva con el nivel de comportamiento maternal en ratas (Champagne *et al*. 2001).

Ambos nonapéptidos están implicados en la formación de pareja en los roedores de la especie *Microtus ochrogaster* (Young y Wang 2004). De modo que, en esta especie, la OT y la VP poseen un importante papel en el establecimiento del vínculo de pareja: la aproximación inicial y los comportamientos afiliativos; la identificación de señales sociales necesarias para el reconocimiento social; y finalmente, la formación del vínculo (Young *et al*. 2005; Lim y Young 2006). La inyección en el SNC de OT o VP aumenta la preferencia por la propia pareja respecto a un extraño, mientras que la inyección de antagonistas de OTR o VPR1a la disminuye (Insel *et al*. 1997). Estos efectos parecen ser dependientes del sexo: VP es más efectivo en machos, y OT en hembras. Se han realizado estudios comparando la especie monógama *Microtus ochrogaster* con la especie promiscua *Microtus montanus* y se ha visto que ambas especies muestran un patrón de expresión de OT y VP en el cerebro similar, pero existe una gran diferencia en la distribución de sus receptores, especialmente en estructuras del sistema límbico (Young y Wang 2004; Young *et al*. 2005; Hammock y Young 2006). Estos estudios demuestran que la formación de los vínculos afectivos, regulada por OT y VP, es dependiente de la especie.

Otros estudios en ratas y ratones silvestres implican a ambos neuropéptidos en la regulación de la memoria de reconocimiento social (Ferguson *et al*. 2002; Bielsky y Young 2004; Choleris *et al*. 2009), mientras que los ratones OT-*knockout* y OTR-*knockout* no poseen esta capacidad memorística (Ferguson *et al*. 2000; Takayanagi *et al*. 2005). En el caso de los ratones OT-*knockout*, la inyección de OT en la amígdala medial habilitaba dicha memoria (Ferguson *et al*. 2001). Por tanto, la OT en esta zona parece ser crucial en la memoria de reconocimiento social (Choleris *et al*. 2007). La VP también tiene un importante papel en la memoria social. Un ejemplo claro son las ratas Brattleboro, que carecen de VP por una mutación natural en el gen que la codifica, y muestran graves déficits en su memoria social (Engelmann y Landgraf 1994), con un efecto similar al de los ratones VPR1a-*knockout* (Bielsky *et al*. 2005). En este caso, el área cerebral que parece estar más afectada es el septum lateral, ya que la inyección

de VP en esta área restaura la memoria social de las ratas Brattleboro (Engelmann y Landgraf 1994).

### 1.1.3 Sistemas VP y OT: dianas en tratamientos de trastornos psiquiátricos y del neurodesarrollo en humanos

Debido a sus importantes funciones en comportamiento social, los sistemas de OT y VP se están convirtiendo en dianas de nuevos tratamientos para alteraciones mentales tales como la adicción, la ansiedad, el autismo, la esquizofrenia, la depresión y el estrés postraumático (Carter 2003, 2007; Yamamoto *et al*. 2004; Lim *et al*. 2005; Liu *et al*. 2005; Hammock y Young 2006; Harony y Wagner 2010; Yang *et al*. 2014, 2013; Lukas y Neumann 2013; Montag *et al*. 2013).

Las variaciones en los genes que codifican los receptores de VP y OT se han relacionado con variaciones en el comportamiento social. En humanos, distintos polimorfismos del gen que codifica el receptor de vasopresina VPR1a se han asociado con características de la personalidad, problemas de pareja, tendencia a la infidelidad, aptitudes musicales, trastornos neuropsiquiátricos y con la respuesta al estrés (Geller *et al*. 2005; Walum *et al*. 2008; Ukkola *et al*. 2009; Roper *et al*. 2011; Ebstein *et al*. 2012; McCall y Singer 2012).

Respecto a las respuestas de estrés, la VP parece tener un papel ansiogénico en humanos. Una expresión elevada de VP en el PVN se ha asociado con un incremento en el nivel de ansiedad y excitación (Lee *et al*. 2009). En cambio, la OT causa relajación y descenso de los niveles de ansiedad. Este efecto se debe en parte a la inhibición del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal. Así, la OT endógena liberada por mujeres lactantes está asociada con un descenso en los niveles plasmáticos de ACTH y cortisol, reduciéndose las respuestas de estrés (Chiodera *et al*. 1991; Amico *et al*. 1994; Heinrichs *et al*. 2001). Resultados similares se obtuvieron con mujeres que habían recibido un contacto físico positivo (Turner *et al*. 1999).

Un mecanismo por el que OT puede reducir la ansiedad es mediante la modulación de las respuestas al miedo mediadas por la amígdala a través de los receptores de OTR en la amígdala. Estudios con resonancia magnética nuclear han mostrado que la inyección exógena de OT reduce la activación de la amígdala ante estímulos relacionados con el miedo (Kirsch *et al*. 2005; Meyer-Lindenberg 2008; Petrovic *et al*. 2008; Domes *et al*. 2010).

Estos neuropéptidos también parecen estar implicados en el trastorno de espectro autista (TEA) (Insel *et al*. 1999). Varias indicaciones apuntan en esta dirección. Los ratones OTR-*knockout* muestran aberraciones en el comportamiento social que se asemejan en algunos aspectos al fenotipo autista, como niveles reducidos de

comunicación y problemas en la interacción social materno-filial y con individuos del mismo sexo. Asimismo, los déficits en la capacidad de reconocimiento facial que muestran los individuos con TEA (Caronna *et al*. 2008), podrían relacionarse con los déficits de memoria de reconocimiento social que presentan los ratones OT-*knockout* y OTR-*knockout* (Winslow y Insel 2004; Bielsky y Young 2004). Todo esto ha llevado a proponer a estos *knockout* como modelos de TEA. Además, en humanos existe un riesgo genético para el desarrollo del TEA que implica a polimorfismos en el gen OTR (Wu *et al*. 2005; Ylisaukko-oja *et al*. 2006; Jacob *et al*. 2007; Yrigollen *et al*. 2008; Lerer *et al*. 2008; Wermter *et al*. 2010).

Cabe añadir que existe un marcado dimorfismo sexual en la incidencia del TEA, con una ocurrencia que es de 3-5 veces mayor en hombres. Como hemos visto, en animales las funciones de OT y VP en el comportamiento social son sexualmente dimórficas, con mayor implicación de OT en hembras y de VP en machos (Carter 2007). Además, los sistemas oxitocinérgico y vasopresinérgico en el cerebro de la mayoría de los vertebrados son sexualmente dimórficos (de Vries 2008; Yamasue *et al*. 2009; Kelly y Goodson 2013). Así, la expresión de VP en la amígdala medial y el BST es mucho mayor en machos (De Vries y Panzica 2006). De este modo, las diferencias sexuales en la distribución y conectividad de las neuronas que contienen OT y VP y de sus receptores en el cerebro podrían estar relacionadas con el dimorfismo sexual en la susceptibilidad al TEA en humanos.

Los estudios de neuroimagen revelan un mal funcionamiento de la amígdala en humanos con TEA (Baron-Cohen *et al*. 2000; Schulkin 2007) y esta área muestra una fuerte expresión de receptores de OT y VP (Caldwell *et al*. 2008; Lee *et al*. 2009). Tanto la administración de OT como los polimorfismos en el gen de VPR1a afectan a la respuesta de la amígdala en humanos (Kirsch *et al*. 2005; Domes *et al*. 2007; Meyer-Lindenberg *et al*. 2009).

Todo esto sugiere que el OTR y el VPR1a podrían ser importantes dianas terapéuticas. Dado que únicamente una pequeña fracción de estos neuropéptidos atraviesa la barrera hematoencefálica tras la administración intravenosa (Kang y Park 2000) y, teniendo en cuenta que dicha administración podría tener efectos secundarios en el sistema hormonal, el uso potencial de estos neuropéptidos requiere una vía más directa al cerebro humano a través de la administración intranasal. Los estudios preclínicos en pacientes con diferentes trastornos mentales muestran resultados prometedores para la administración intranasal de OT (Born *et al*. 2002). El tratamiento temprano con OT intranasal puede mejorar la funcionalidad social en individuos jóvenes con TEA (Guastella *et al*. 2010). En personas con TEA, el tratamiento con OT se ha asociado con la reducción de la ansiedad, del comportamiento obsesivo y del

estrés (Carter 2003). Además, la OT intranasal aumenta las interacciones sociales y la confianza (Andari *et al*. 2010), y mejora la capacidad de inferir los estados mentales de otros (Domes *et al*. 2007), capacidad muy afectada en personas con TEA (Caronna *et al*. 2008).

La OT también se ha propuesto como tratamiento para la esquizofrenia tras la demostración en algunos estudios con modelos animales de que el incremento de los niveles endógenos de OT o la administración del neuropéptido parecían tener efectos antipsicóticos, y los niveles inferiores de OT en sangre en personas con esquizofrenia (Feifel y Reza 1999; Feifel 2012; Rich y Caldwell 2015). Sin embargo, los resultados de la administración intranasal de OT a personas con esquizofrenia son contradictorios (De Berardis *et al*. 2013; Lee *et al*. 2013; Davis *et al*. 2013; Guastella *et al*. 2015).

A diferencia de lo que ocurre con la OT, se han realizado muy pocos estudios de administración intranasal de VP en humanos. Estos estudios demuestran un incremento en atención y memoria de expresiones faciales emocionales (Thompson *et al*. 2004, 2006), así como en la activación de áreas cerebrales implicadas en el procesamiento de estímulos emocionales y sociales, teoría de la mente y reconocimiento social (Zink y Meyer-Lindenberg 2012). Desde un punto de vista terapéutico, se han administrado antagonistas para los receptores VPR1a y VPR1b para el tratamiento de la depresión en modelos animales y se ha propuesto que podrían ser útiles en el tratamiento de trastornos relacionados con el estrés y de aquellos caracterizados por violencia interpersonal, como el trastorno de personalidad antisocial (Schüle *et al*. 2009; Stanley y Siever 2010).

## 1.2 MORFOGÉNESIS DEL TUBO NEURAL

La neurulación es un proceso fundamental de la embriogénesis que culmina en la formación de las crestas neurales y del tubo neural tras el plegamiento progresivo de la placa neural temprana (Fig. 1.5) (Sanes *et al*. 2006; Puelles *et al*. 2008). La curvatura de la placa neural implica la formación de regiones bisagra donde la placa se pliega debido a modificaciones en el citoesqueleto de las células, hasta finalmente formar el tubo neural (para una revisión ver Colas y Schoenwolf 2001). El neuroepitelio del tubo neural contiene los progenitores que darán lugar a las células neurales (neuronas y glía) del SNC (Puelles *et al*. 2008).

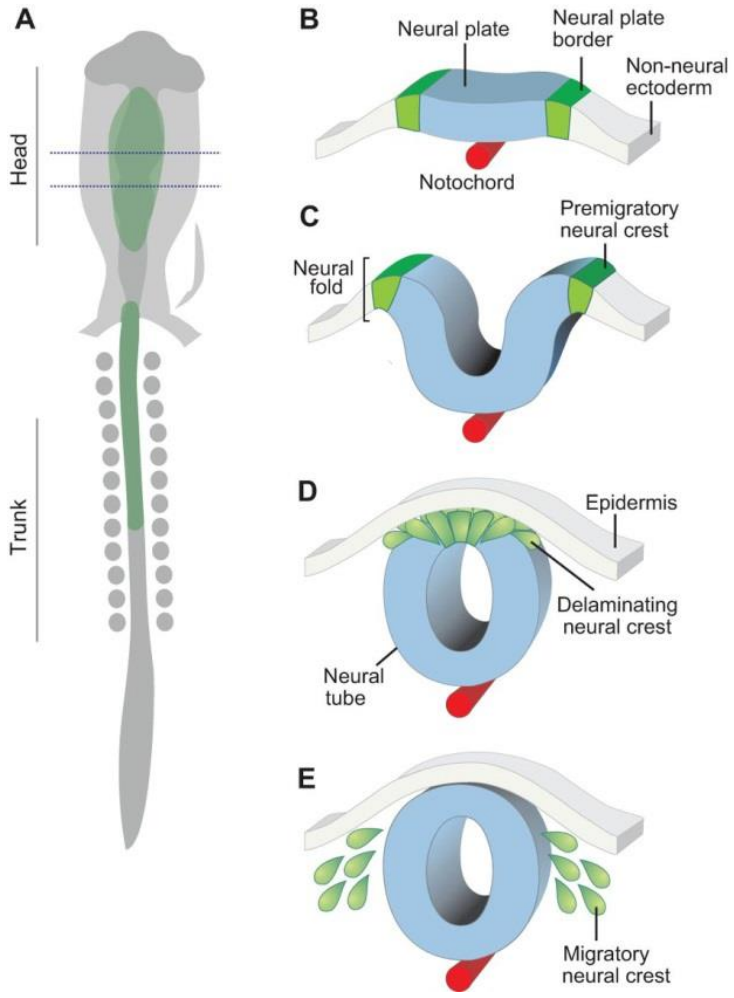



**Figura 1.5.** Esquema del proceso de neurulación desde el estadio de placa neural al plegamiento definitivo del tubo neural y la formación de las crestas neurales. A: Vista dorsal esquemática de un embrión de pollo de 10 somitas, mostrando la cresta neural (verde) próxima a la línea media. Las líneas de puntos delimitan la región embrionaria representada en las secciones transversales en B-E. A medida que avanza el desarrollo del embrión, la placa neural (B) se pliega, hundiéndose progresivamente en el dorso embrionario, originándose el canal neural cuyo cierre formará el tubo neural (C-E). El neuroepitelio del tubo neural contiene las células progenitoras que darán lugar a las neuronas y glía del sistema nervioso central (E)

(Langman y Sadler 2001; Sanes *et al*. 2006; Puelles *et al*. 2008; imagen tomada de Simoes-Costa y Bronner 2015).

El tubo neural comienza a formarse a nivel occipito-cervical, y desde ese nivel avanza rostral- y caudalmente (Langman y Sadler 2001). Antes de que su parte posterior se haya formado, la parte más anterior del tubo experimenta cambios drásticos debido a su proliferación diferencial (Puelles *et al*. 2008). En esta región, que dará lugar al encéfalo, el tubo se engrosa formando tres vesículas primarias, que de rostral a caudal son: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. Al mismo tiempo que la parte final posterior del tubo neural se cierra, unas protuberancias secundarias (las vesículas ópticas) se extienden lateralmente desde cada lado del prosencéfalo en desarrollo (Puelles *et al*. 2004, 2008; Medina 2008a). En este estado temprano del desarrollo (el llamado estado de tres-vesículas), el eje longitudinal del tubo neural se curva considerablemente debido a proliferación y crecimiento diferencial a lo largo del eje dorsoventral, dando lugar al desarrollo de las flexuras cefálica y cervical del tubo neural (cóncavas ventralmente), seguida de la formación de la flexura pontina (cóncava dorsalmente) (Fig. 1.6).

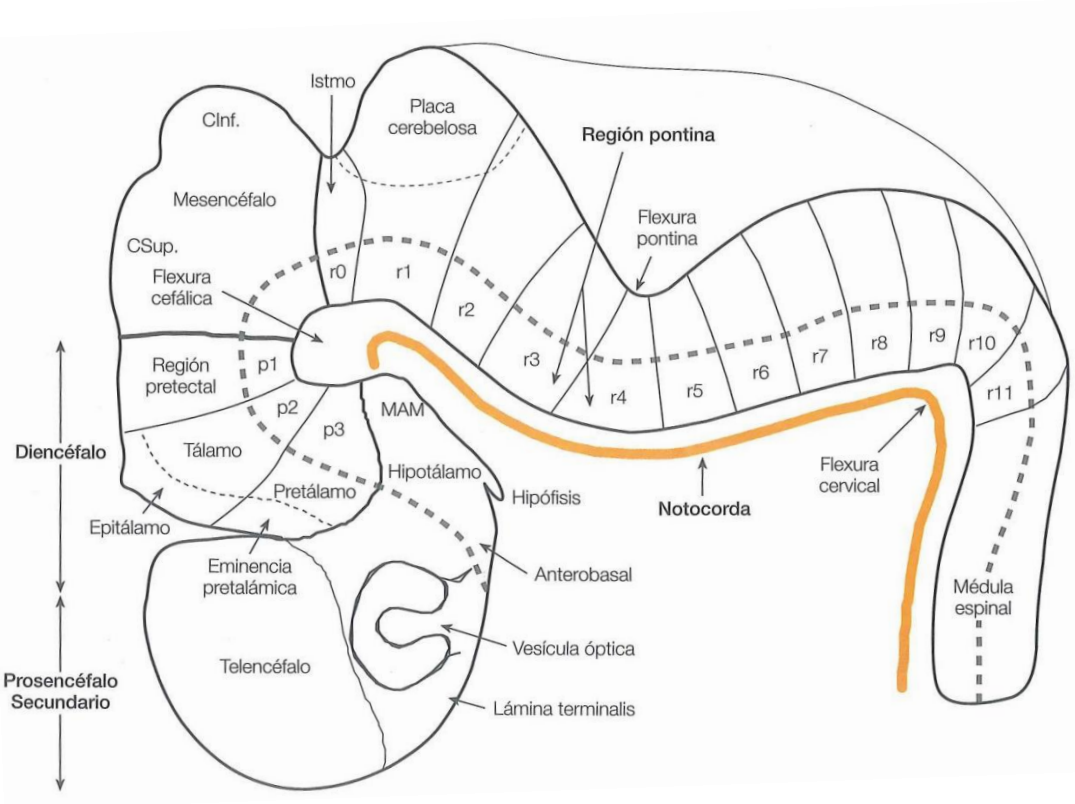



**Figura 1.6.** Esquema de la regionalización anteroposterior y dorsoventral del tubo neural. Se observa el engrosamiento de la parte anterior del tubo neural dando lugar al prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Se distinguen, de izquierda a derecha: el prosencéfalo primario, formado por el diencéfalo (prosómeros p1-p3) y el prosencéfalo secundario (hipotálamo y

telencéfalo); el mesencéfalo; y el rombencéfalo (el istmo o rombómero r0 más los rombómeros r1-r11). La curvatura del eje neural se muestra con la línea discontinua, que representa el límite alar-basal. Las flexuras pontina, cefálica y cervical también aparecen representadas (Puelles *et al*. 2008).

A continuación, el prosencéfalo se subdivide en dos protosegmentos: uno anterior o rostral, el prosencéfalo secundario (que dará lugar al telencéfalo e hipotálamo; esta parte es la que queda conectada a las vesículas ópticas); y otro posterior o caudal, el diencéfalo (que dará lugar al pretálamo, tálamo y región pretectal) (Puelles *et al*. 2004, 2008; Medina 2008a; Ferrán *et al*. 2015). Como se explica en el siguiente apartado, cada una de estas divisiones del tubo va a subdividirse de forma gradual a lo largo de los ejes rostrocaudal (o anteroposterior) y dorsoventral gracias a la acción de diferentes genes reguladores del desarrollo, hasta llegar a la formación de segmentos o compartimentos transversales (como los prosómeros a nivel del prosencéfalo, y los rombómeros a nivel del rombencéfalo), cada uno de los cuales presenta a su vez distintos compartimentos dorsoventrales (como las placas del techo, alar, basal y del suelo, y subdivisiones de éstas) (Puelles *et al*. 2008).

### 1.2.1 Regionalización dorsoventral y anteroposterior del tubo neural

La regionalización comienza desde el estadio de placa neural, antes de que el tubo neural se cierre por completo, gracias a la acción diferencial de distintas proteínas morfogenéticas y factores de transcripción, que provocan la división gradual en diferentes dominios anteroposteriores y dorsoventrales (Briscoe *et al*. 2000; Wilson y Rubenstein 2000; Briscoe y Ericson 2001; Wilson y Houart 2004; Lupo *et al*. 2006) (Fig. 1.6). Las células neuroepiteliales iniciales del tubo neural reciben múltiples señales posicionales morfogenéticas, codificadas por una distribución gradual de moléculas de señalización (producidas en sitios restringidos dentro o fuera del campo en desarrollo). Estas señales actúan sobre receptores específicos de las células neuroepiteliales, y regulan la expresión de un conjunto concreto de factores de transcripción que controlan la proliferación, la neurogénesis y la diferenciación celular para dar lugar finalmente a la aparición de las conexiones y propiedades funcionales. Estos códigos moleculares progresan desde estados iniciales dinámicos a estados más estables o definitivos, caracterizando la identidad molecular de las poblaciones celulares, y la formación de compartimentos (Briscoe *et al*. 2000; Wilson y Rubenstein 2000; Briscoe y Ericson 2001; Wilson y Houart 2004; Lupo *et al*. 2006; Puelles *et al*. 2008).

Por tanto, la regionalización depende de una compleja red genética diferencial que promueve una identidad genética característica de los progenitores en cada dominio

progenitor, la cual influye en todos los aspectos de la histogénesis (propiedades proliferativas, diferenciación celular de neuronas y glía, adhesividad celular y composición de la matriz extracelular), con consecuencias en la migración celular, la navegación axonal y el establecimiento de conexiones, así como en la sinaptogénesis (Briscoe y Ericson 2001; Puelles *et al*. 2008). Varios genes que codifican para factores de transcripción y morfógenos se expresan de forma homogénea o en gradiente dentro de las diferentes regiones rostrocaudales y dorsoventrales del neuroectodermo, generalmente de forma simétrica respecto a la línea media. El estado de especificación molecular en cada estadio del desarrollo depende de los genes que están activos en ese momento en cada región.

Se han descrito dos tipos de regionalización, mediados por los mecanismos de especificación molecular mencionados anteriormente, que actúan en paralelo (Puelles *et al*. 2004, 2008) (Fig. 1.7):

- La regionalización anteroposterior (AP) o segmentación (formación de compartimentos transversales), mediante la cual el tubo se subdivide transversalmente hasta llegar al nivel de segmentos o neurómeros. La porción rostral del tubo neural (que dará lugar al encéfalo) se subdivide inicialmente en tres vesículas rostrocaudales: el prosencéfalo primario, el mesencéfalo y el rombencéfalo. Posteriormente, bajo el control de genes de segmentación e interacciones morfogenéticas, las vesículas primarias se subdividen en segmentos transversales o neurómeros, llamados prosómeros, mesómeros o rombómeros en función de su localización (Puelles *et al*. 2008). En tiempos recientes, el trabajo de Luis Puelles y sus colaboradores ha sido decisivo para reformular la segmentación del prosencéfalo con la ayuda de los múltiples patrones de expresión de genes reguladores del desarrollo, interpretados bajo el prisma del marco topológico del tubo neural (modelo prosomérico, Puelles y Rubenstein 1993, 2003, 2015). De acuerdo con el modelo prosomérico (véase apartado 1.3), el prosencéfalo primario sufre fenómenos de crecimiento localizado por los que se segmenta en dos vesículas secundarias o protosegmentos, el prosencéfalo secundario y el diencéfalo (Puelles y Rubenstein 2015). Estos protosegmentos se dividen después en segmentos o prosómeros, de forma que el diencéfalo producirá los prosómeros (p) 1 al 3 (a nivel alar dan lugar al pretecho [p1], el epitálamo/tálamo [p2] y la eminencia pretalámica/pretálamo [p3]; Puelles *et al*. 1987, 2004, 2008; Fig. 1.6), mientras que el prosencéfalo secundario se dividirá en dos segmentos: el peduncular y el terminal (Puelles y Rubenstein 2015).

- La regionalización dorsoventral (DV) o zonación longitudinal, mediante la cual el tubo neural se subdivide en cuatro columnas celulares longitudinales, cada una con propiedades intrínsecas similares, y que de ventral a dorsal son: la placa del suelo, la

placa basal, la placa alar y la placa del techo. Las placas del suelo y del techo presentan proliferación mínima, mientras que las placas alar y basal tienen una gran proliferación y son las que principalmente contribuyen al engrosamiento de la pared del tubo (Puelles *et al*. 2008). Las placas longitudinales alar y basal se distinguen inicialmente entre sí por una neurogénesis precoz de la segunda respecto a la primera, que lleva a una curvatura del tubo en el eje longitudinal (His, 1904; Puelles *et al*. 1987, 2008). La competición entre proteínas morfogenéticas ventralizantes, como *Sonic Hedgehog* (Shh), y dorsalizantes, como las *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs), produce esta regionalización dorsoventral (mediolateral en la placa neural) (Briscoe y Ericson 2001). A éstas hay que añadir las señales laterales de ácido retinoico procedentes de los somitos, que tienen una influencia directa sobre la zona intermedia del tubo y contribuyen a la zonación DV (Lupo *et al*. 2006; Medina 2008a).

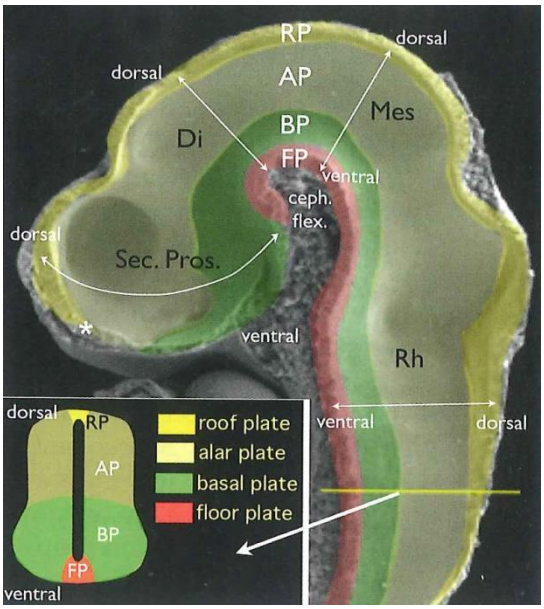



**Figura 1.7.** Representación de las columnas longitudinales DV a lo largo de la parte rostral del tubo neural en un embrión de ratón E9.5, cortado sagitalmente. Las deformaciones topográficas del eje longitudinal (debidas a la flexura cefálica) provocan cambios en la orientación de la dimensión ventrodorsal a lo largo del mismo (flechas blancas de doble cabeza). Es decir, el plano transversal verdadero varía en función de la curvatura del eje longitudinal. En un corte transversal al rombencéfalo, se muestran las principales subdivisiones longitudinales de la pared neural: placas del techo (amarillo), alar (gris), basal (verde) y del suelo (rosa) (Martínez *et al*. 2012).

### 1.2.2 Principales tipos de migración: radial y tangencial

Tras la neurulación, se instaura una fase inicial de proliferación exponencial intensa del neuroepitelio (Fig. 1.8), a diferentes ritmos en cada una de las zonas del tubo

neural (heterocronía), generándose el aumento de superficie característico de los procesos de formación de vesículas y segmentación vistos anteriormente (Puelles *et al*. 2008). Tras esta proliferación neuroepitelial inicial de divisiones simétricas (que producen un aumento de progenitores), comienza una segunda fase con divisiones asimétricas, en la que algunas células hijas generadas abandonan el ciclo proliferativo, y adquieren un destino neuronal o glial. Estas células postmitóticas (neuroblastos o glioblastos) abandonan la capa ventricular y comienzan a migrar y diferenciarse. Tras la migración, las células comienzan a acumularse en la pared del tubo (que es, por tanto, cada vez más gruesa) para generar paulatinamente la capa del manto, en donde tendrá lugar la fase final de su diferenciación (maduración del árbol dendrítico y adquisición de otros aspectos del fenotipo). La magnitud y la dirección del desplazamiento migratorio del soma neuronal hasta llegar a su destino final puede variar según el tipo neuronal y el área cerebral donde se haya generado (Puelles *et al*. 2008).

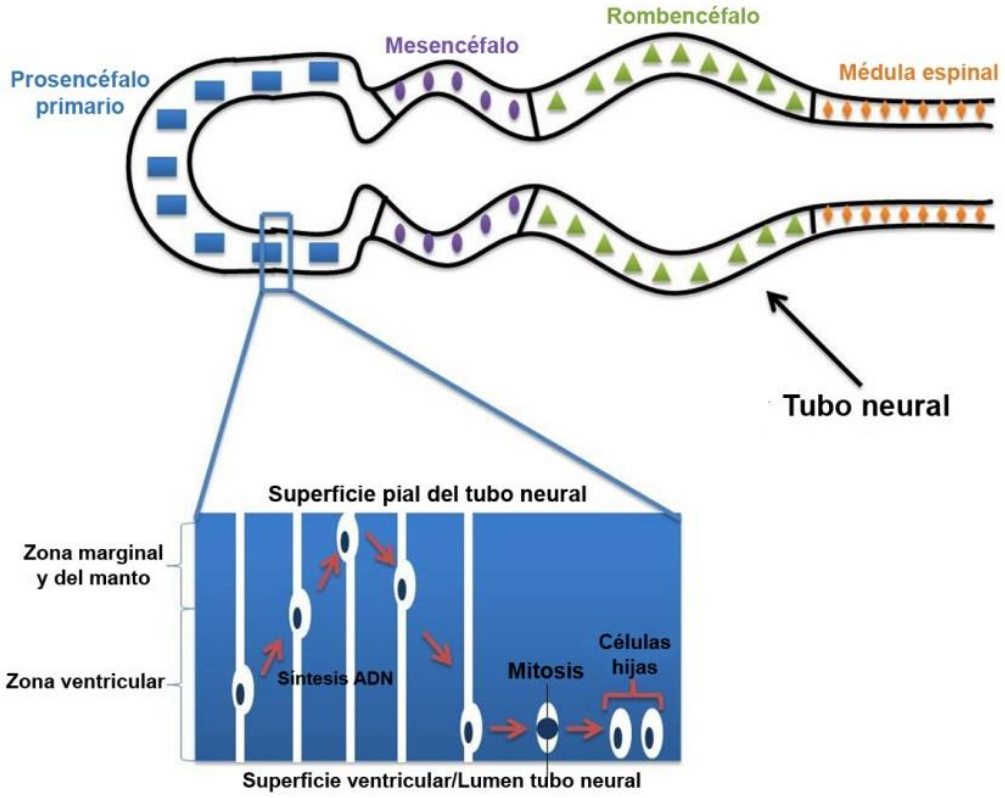



**Figura 1.8.** Esquema de la proliferación neuroepitelial en el prosencéfalo. Las nuevas células se generan en la zona ventricular (Sitio web *Neurogenesis NEUR 401 Advanced Neuroscience*).

Hay dos tipos básicos de migración neuronal: radial y tangencial. Su clasificación se hace acorde a la orientación y la dirección relativa del movimiento celular respecto

a la superficie del cerebro y a la zona ventricular (Marín *et al*. 2001; Puelles *et al*. 2008). En la migración radial (Fig. 1.9), las neuronas se mueven en la dirección radial del neuroepitelio, siguiendo o no una larga prolongación de glía radial para llegar a su lugar de destino, mientras que en la migración tangencial se desplazan siguiendo una dirección ortogonal a la radial, es decir, de forma paralela a la superficie del tubo neural y siempre fuera de la zona ventricular (Puelles *et al*. 2008). La migración radial es la principal responsable del aumento de complejidad debido al engrosamiento de la pared neural por acumulación de células en la zona del manto, que se agregan formando distintos núcleos y/o estructuras laminares siguiendo un "código molecular adhesivo" (mediado por la expresión de distintas combinaciones de moléculas de adhesión celular como las cadherinas; Redies y Puelles 2001). Gracias a la migración radial, la codificación molecular del neuroepitelio a lo largo de los ejes rostrocaudal y dorsoventral se transfiere a una tercera dimensión espacial, la mediolateral (de ventrículo a superficie) (Puelles y Medina 2002; Medina 2007). Por ello, cada compartimento del neuroepitelio identificado molecularmente produce una división histogenética radial, formada principalmente por neuronas originadas en dicho compartimento. La migración tangencial contribuye a un aumento de la complejidad cerebral al incrementar la diversidad de subtipos neuronales que se encuentran en cada división histogenética.

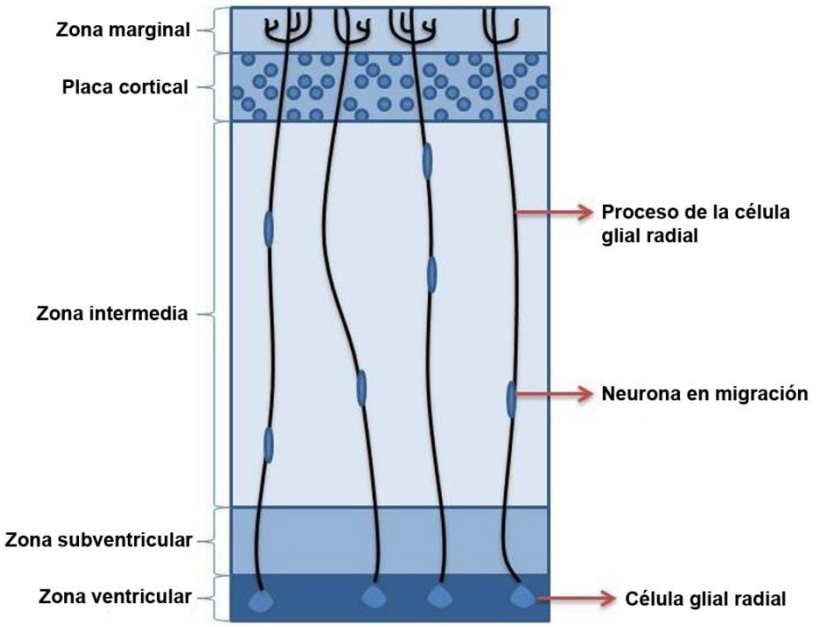



**Figura 1.9.** Esquema representativo de la migración radial. Las células hijas migran desde la zona ventricular hacia la pia deslizándose a lo largo de fibras muy finas (tallos radiales de células gliales) que comunican ambas zonas (Sitio web *Neurogenesis NEUR 401 Advanced Neuroscience*).

La consideración de las divisiones histogenéticas radiales del cerebro tiene implicaciones importantes para comprender el concepto de homología de campo (Puelles y Medina 2002; Medina 2007). Este concepto postula que, durante el desarrollo embrionario, se generan divisiones cerebrales (que son las divisiones histogenéticas radiales) que pueden considerarse homólogas o equivalentes, "como campos", entre las distintas especies, aunque sus derivados específicos (capas, núcleos, subnúcleos, etc) en el embrión tardío o cerebro adulto (particularmente en áreas con gran grosor de la pared neural como el telencéfalo) no sean homologables uno a uno. Otro concepto básico que resulta esencial para la comparación de divisiones del cerebro, no solo entre distintas especies sino en la misma especie a lo largo del desarrollo, es el de la topología, que considera que la posición relativa de cada división dentro del plan general del tubo neural es invariable; es decir, cada división histogenética del tubo tiene las mismas relaciones que tuvo en origen con divisiones vecinas, y éstas son invariables independientemente de las deformaciones que hayan ocurrido durante el desarrollo o a la largo de la evolución (Puelles y Medina 2002; Medina 2007; Nieuwenhuys y Puelles 2016). El concepto de topología, por tanto, resultará esencial para la interpretación de los resultados de esta tesis.

## 1.3 MODELOS DE INTERPRETACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN ANATÓMICA DEL PROSENCÉFALO

La correcta interpretación y la comprensión de los procesos que tienen lugar en el SNC y de cómo interactúan los distintos centros entre sí, tanto durante su formación como cuando se ha establecido el patrón definitivo, requieren de un modelo de interpretación de la estructura cerebral que se ajuste lo más posible al patrón cerebral real. Dos tendencias contrapuestas, surgidas durante el siglo XIX, han intentado explicar la organización cerebral. Por un lado, el modelo columnar, resultante del análisis de los componentes funcionales de los nervios craneales y espinales, ampliamente aceptado por la comunidad científica y docente, y por otro, el modelo neuromérico o segmentario, que ha resurgido durante las últimas dos décadas, siendo cada vez más aceptado por los neurocientíficos, al verse respaldado por numerosos datos sobre expresión y función de genes, así como datos experimentales (Puelles *et al*. 1987, 2004, 2007; Puelles y Rubenstein 1993, 2003, 2015; Puelles 2001, 2009; revisado por Alonso 2007).

El modelo neuromérico o segmentario surge de los estudios de desarrollo del encéfalo, en paralelo a un modelo segmentario del cuerpo y la cabeza de los vertebrados. A finales del siglo XIX, el embriólogo americano H.W. Orr (1887) realizó un estudio en embriones de lagarto en el que caracterizó histológicamente las

subdivisiones neuroméricas del rombencéfalo, mesencéfalo y prosencéfalo, estableciendo una subdivisión longitudinal y reconociendo la curvatura del eje longitudinal, elementos básicos del módelo neuromérico actual. Este modelo fue utilizado principalmente entre los años 20-50 del s. XX (Palmgren 1921; Rendahl 1924; Bergquist y Kallen 1953; Vaage 1969; Keyser 1972), hasta que el interés por las columnas funcionales (promovido por Herrick ,1910, y continuado por sus seguidores), llevó a su progresivo desuso al considerar que los abultamientos segmentarios observados durante el desarrollo temprano eran elementos transitorios, sin ningún poder explicativo sobre la organización funcional del cerebro maduro (revisado por Puelles 2009). Así, este modelo fue abandonado durante más de tres décadas, hasta que lo retomaron Puelles y colaboradores a finales de la década de los ochenta (Puelles *et al*. 1987) en base a la observación de un patrón segmentario en la neurogénesis del prosencéfalo y mesencéfalo, que venían a confirmar algunos de los estudios clásicos. Más tarde, con la incorporación de datos sobre expresión de genes reguladores del desarrollo, se comprobó el gran poder explicativo del modelo para entender tanto los patrones de expresión, como los efectos de mutaciones en esos genes, lo que llevó a proponer el modelo prosomérico (centrado en la organización segmentaria del prosencéfalo; Figs. 1.6 y 1.7), desarrollado en varios artículos científicos y revisiones por Puelles, Rubenstein y colaboradores (Puelles y Rubenstein 2003, 2015; Puelles *et al*. 2012). El modelo prosomérico postula tres elementos estructurales conservados: 1) el eje longitudinal curvo, 2) la subdivisión metamérica a lo largo del eje AP en compartimentos a modo de anillos concéntricos perpendiculares a dicho eje, los denominados neurómeros transversales; y 3) las subdivisiones longitudinales (placas del suelo, basal, alar y techo) que comparten los neurómeros, consecuencia de un patrón común de zonación DV. Estas columnas longitudinales son diferentes de las columnas postuladas por Herrick y sus seguidores, y cada una tiene propiedades moleculares similares en cada neurómero. Estas unidades de desarrollo DV y AP son comunes al cerebro de todos los vertebrados constituyendo un patrón morfogenético o *Bauplan* (término alemán que significa plan de construcción) común.

El modelo columnar propone una organización básica del sistema nervioso central en columnas funcionales dorsoventrales. Al analizar los componentes funcionales en los nervios craneales y espinales se observa que cada componente del nervio (fibras sensitivas o motoras) se origina en una columna celular sensitiva o motora, tanto en la médula espinal como en el rombencéfalo; cada columna sensitiva y motora se subdivide a su vez en somática y visceral. En un intento de extender dichas columnas funcionales hacia el prosencéfalo, Herrick (1948) introduce la concepción columnar en el diencéfalo de anfibios subdividiéndolo en cuatro columnas; pronto se reconoció que

dicha continuidad no existe (revisado por Puelles 2009; Puelles *et al*. 2013). Sus ideas, generalizadas por Kuhlenbeck (1927, 1973) a todos los vertebrados, originaron el dogma sobre la subdivisión del diencéfalo en epitálamo, tálamo dorsal, tálamo ventral e hipotálamo separados por tres surcos “longitudinales” ventriculares. Para que estas cuatro columnas fueran longitudinales como las del tronco del encéfalo, Herrick (1948) obvió el eje longitudinal curvo, observable en cerebros embrionarios y en secciones mediales sagitales de cerebros adultos, sustituyéndolo arbitrariamente por un eje recto que atraviesa el telencéfalo acabando rostralmente en el bulbo olfativo, sin tener en cuenta la naturaleza par de los hemisferios telencefálicos y de los bulbos olfativos.

El modelo columnar presenta serias deficiencias (Puelles 2009; Puelles *et al*. 2013). El error fundamental es la definición de un eje longitudinal recto, que no tiene en cuenta la torsión o curvatura del cerebro a nivel principalmente de la flexura cefálica, sino que cruza la región pontina hacia el hipotálamo, atravesándolo “longitudinalmente” para entrar en el telencéfalo y finalizar en el bulbo olfativo. Además, a nivel prosencefálico, en este modelo se identifican a los surcos diencefálicos (*sulci*) como límites entre los cuatro compartimentos dorsoventrales diencefálicos de Herrick (transversales según el modelo prosomérico). Se ha comprobado que estos surcos son simples invaginaciones de la pared ventricular formados como consecuencia del crecimiento diferencial de los distintos centros cerebrales, con una localización variable durante el desarrollo y entre diferentes especies de vertebrados. Por el contrario, el actual modelo prosomérico (Fig. 1.10) está respaldado por numerosos datos experimentales obtenidos en los campos de la embriología (trasplantes, mapas de destino, etc.), la anatomía comparada, la expresión y función génica (histogenética) y la topología del trayecto de los tractos axonales, integrando toda la información aportada por los mismos de una forma coherente (Puelles *et al*. 1987, 2004, 2007, 2013; Puelles y Rubenstein 1993, 2003; Puelles 2001, 2009; revisado por Alonso 2007). Los estudios sobre los dominios de expresión de genes del desarrollo, muchos de ellos determinantes causales del patrón estructural e histogenético de la pared del tubo neural, han revelado patrones de expresión longitudinales y transversales en consonancia con las propuestas del modelo prosomérico. Por tanto, éste es el modelo seguido para interpretar los resultados de esta tesis, centrada en el desarrollo de una región del prosencéfalo.

## 1.4 ORGANIZACIÓN DEL PROSENCÉFALO Y DOMINIOS HISTOGENÉTICOS

El prosencéfalo es la porción más anterior del SNC y da lugar al territorio más complejo del cerebro (Puelles *et al*. 2008, 2013). Está formado por el diencéfalo (incluyendo el tálamo), el hipotálamo, el telencéfalo y las vesículas ópticas (Puelles *et*

*al*. 2004; Medina 2008a). El modelo prosomérico (Puelles y Rubenstein 1993) ha permitido una mejor comprensión del desarrollo y organización del prosencéfalo (Puelles y Rubenstein 1993, 2003, 2015) y su evolución. Conceptualmente, según este modelo, el prosencéfalo en los diferentes vertebrados está subdividido en divisiones longitudinales y transversales, similares al resto del tubo neural, pero con la consideración de que el eje longitudinal se curva en los niveles rostrales.

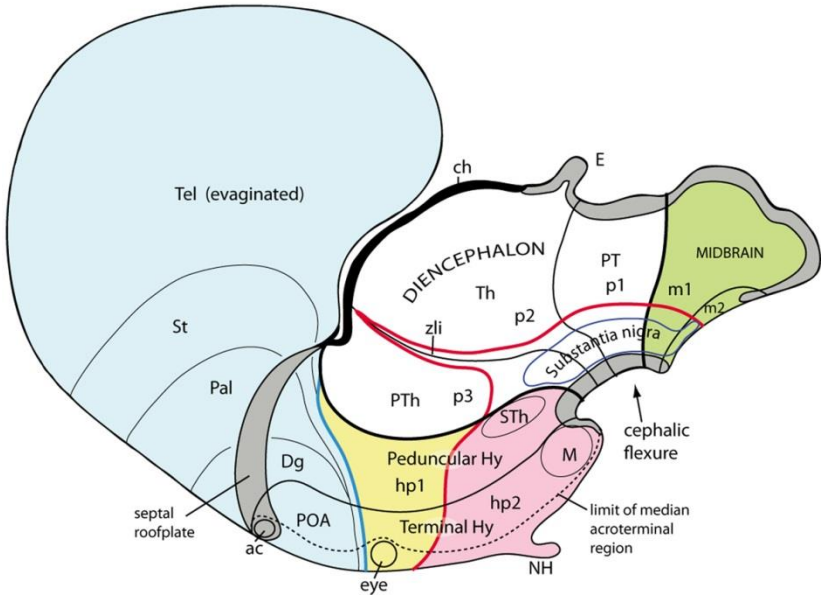



**Figura 1.10.** Actual modelo prosomérico representando el prosencéfalo secundario (hipotálamo y telencéfalo) y el diencéfalo. El límite alar-basal se visualiza con la línea roja. La zona limitans intratalámica (zli), entre p2 y p3, aparece representada como un "pico" y se aproxima a la placa del techo perperdicularmente al límite alar-basal. La división intrahipotalámica divide al hipotálamo en el prosómero peduncular (hp1) y el terminal (hp2) (Puelles *et al*. 2012).

Mediante el análisis del mapa de destino y expresión de genes implicados en especificación en diferentes vertebrados, se ha comprobado que el prosencéfalo y sus principales divisiones se especifican en el estadio de placa neural, antes incluso de que sean morfológicamente visibles (Wilson y Rubenstein 2000; Puelles *et al*. 2004). Durante el desarrollo, el prosencéfalo se divide transversalmente en la vesícula diencefálica, caudalmente, y en el prosencéfalo secundario, rostralmente. Al igual que pasa con otras partes del tubo neural, el prosencéfalo se divide longitudinalmente, desde dorsal a ventral, en placa del techo, alar, basal y del suelo (Puelles y Rubenstein 1993, 2003, 2015; Puelles 2001; Puelles *et al*. 2004, 2007). Después, el diencéfalo es adicionalmente subdividido en tres prosómeros, llamados p1, p2 y p3 de caudal a rostral (Puelles y Rubenstein 1993, 2003; Puelles *et al*. 2007; Ferrán *et al*. 2007, 2009).

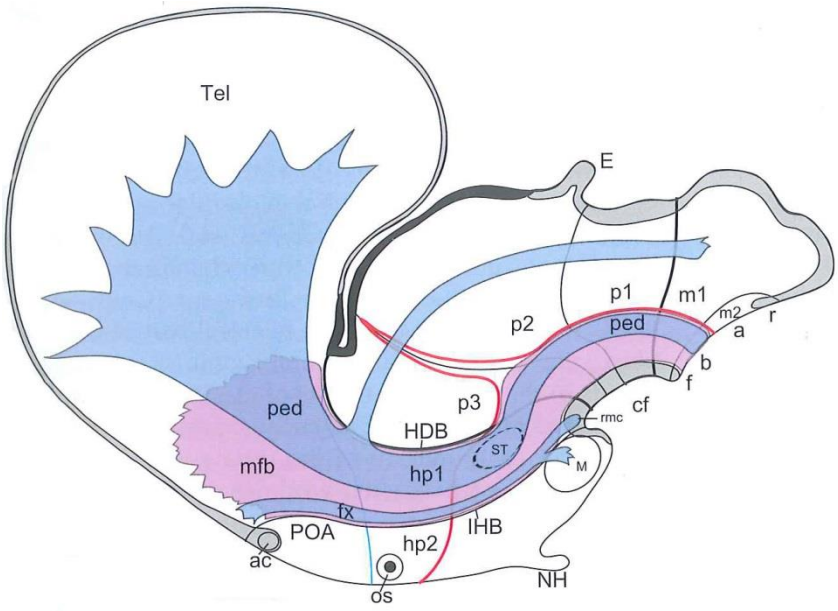



**Figura 1.11.** Tractos transversales pedunculares. El pedúnculo (ped) atraviesa el neurómero hipotalámico hp1 transversalmente y limita con el límite hipotálamo-diencéfalo (HDB). A nivel del núcleo subtalámico, el ped cambia de transversal a longitudinal (Puelles *et al*. 2012).

Según el modelo prosomérico actual (Puelles *et al*. 2012, 2014; Morales-Delgado *et al*. 2014; Puelles y Rubenstein 2015), el prosencéfalo secundario contiene dos unidades segmentarias denominadas prosómeros hipotalámicos (hp) (Fig. 1.10). El prosómero hipotalámico hp1, localizado caudalmente, es el neurómero de mayor tamaño de todo el cerebro y se encuentra asociado al pedúnculo cerebral (Fig. 1.11), por lo que también se le denomina prosómero peduncular (Puelles *et al*. 2012). Su porción basal está ocupada exclusivamente por hipotálamo peduncular. En su placa alar se encuentra la porción alar del hipotálamo peduncular, tres de los cuatro dominios subpaliales (área diagonal, pálido y estriado) y los cuatro dominios paliales (medial, lateral, ventral y dorsal). Su placa del techo es la tela coroidea de los ventrículos laterales y justo donde se ancla constituye la fimbria (Bardet 2007; Puelles *et al*. 2007; Pombal *et al*. 2009; Bardet *et al*. 2010; *Allen Developing Mouse Brain Atlas*). El prosómero hipotalámico hp2 es el más rostral y se le denomina por tanto prosómero terminal. Su placa basal contiene el hipotálamo basal terminal, mientras que su placa alar contiene la porción alar del hipotálamo terminal, las vesículas ópticas y el área subpalial preóptica. En su techo encontramos la comisura anterior.

### 1.4.1 Principales dominios histogenéticos de la placa alar hipotalámica

La placa alar hipotalámica queda definida en estadios muy tempranos por la expresión del gen Pax6 (Shimamura y Rubenstein 1997; Bardet *et al*. 2008; Puelles *et al*. 2012; *Allen Developing Mouse Brain Atlas*) y se corresponde con la región supraóptica/anterior clásica. En el modelo prosomérico, la placa alar hipotalámica se extiende dorsalmente hasta las deformaciones subpaliales del telencéfalo, y comprende dos dominios histogenéticos, uno dorsal y otro ventral, que se extienden longitudinalmente a lo largo de sus porciones peduncular y terminal: el dominio paraventricular (Pa; dorsal; también denominado supraopto-paraventricular, SPV, porque produce los núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico) y el subparaventricular hipotalámico (SPa; ventral; inicialmente denominado dominio o banda quiasmática debido a que produce el núcleo supraquiasmático, con relación aparente con el quiasma, como se observa en la Fig. 1.12). La figura 1.12 muestra las cuatro subáreas dorsoventrales progenitoras principales (las partes peduncular [P] y terminal [T] de Pa y SPa: PPa, TPa, PSPa y TSPa) más las correspondientes áreas acroterminales (en el borde rostral del tubo) en que queda dividido el hipotálamo alar (Puelles *et al*. 2012; Morales-Delgado *et al*. 2014).

El SPV, que contiene el tallo óptico, de donde se originan el receso óptico y el quiasma óptico, y los núcleos supraóptico (SO) y paraventricular (PVN), se caracteriza por la expresión selectiva y temprana de varios marcadores moleculares como son Otp/Sim1/Brn2/Ngn2, y en estadios tardíos también por la presencia de Tbr1 y neuronas glutamatérgicas (Simeone *et al*. 1994; Bulfone *et al*. 1995; Fan *et al*. 1996; Puelles y Rubenstein 2003; Puelles *et al*. 2004, 2012; Shimogori *et al*. 2010; Morales-Delgado *et al*. 2011; *Allen Developing Mouse Brain Atlas*). Algunos patrones histogenéticos diferenciales sugieren una subdivisión del SPV peduncular (SPVp o PPa) en al menos tres partes dorsoventrales: dorsal (PPaD), central (PPaC) y ventral (PPaV) (Fig. 1.12; Puelles y Rubenstein 2003; Morales-Delgado *et al*. 2011). A pesar de que estas subáreas no son tan evidentes en la estrecha región terminal del SPV (SPVt o TPa), algunas observaciones genoarquitectónicas e inmunocitoquímicas apuntan en esa dirección y sugieren el tripartito correspondiente en TPaD, TPaC y TPaV (Fig. 1.12; Puelles y Rubenstein 2003; Bardet 2007; Puelles *et al*. 2012).

El dominio Ch/SPa, que contiene importantes derivados clásicos como son los núcleos supraquiasmático (SCh) e hipotalámico anterior (AH), se caracteriza por la expresión diferencial de varios genes de la familia Dlx (Dlx1/2/5/6), los cuales solapan con dominios de expresión de Arx, Islet1 y Vax1, entre otros (Ericson *et al*. 1995; Miura *et al*. 1997; Hallonet *et al*. 1998; Puelles y Rubenstein 2003; Puelles *et al*. 2004, 2012;

Shimogori *et al*. 2010; Morales-Delgado *et al*. 2011). Mientras que muchos marcadores del Ch/SPa (ej., Dlx y Arx) también se expresan en el pretálamo diencefálico y en el subpalio, la expresión de Vax1 queda restringida al área preóptica y al Ch/SPa hipotalámico, sin "cruzar" el límite hipotálamo-diencefálico (Hallonet *et al*. 1998).

La mayoría de las neuronas derivadas del SPV son glutamatérgicas (VGLUT2 positivas), mientras que la mayor parte de las neuronas subparaventriculares son gabaérgicas (Gad67 positivas, como ocurre con el resto de neuronas que expresan Dlx del prosencéfalo; Stühmer *et al*. 2002).

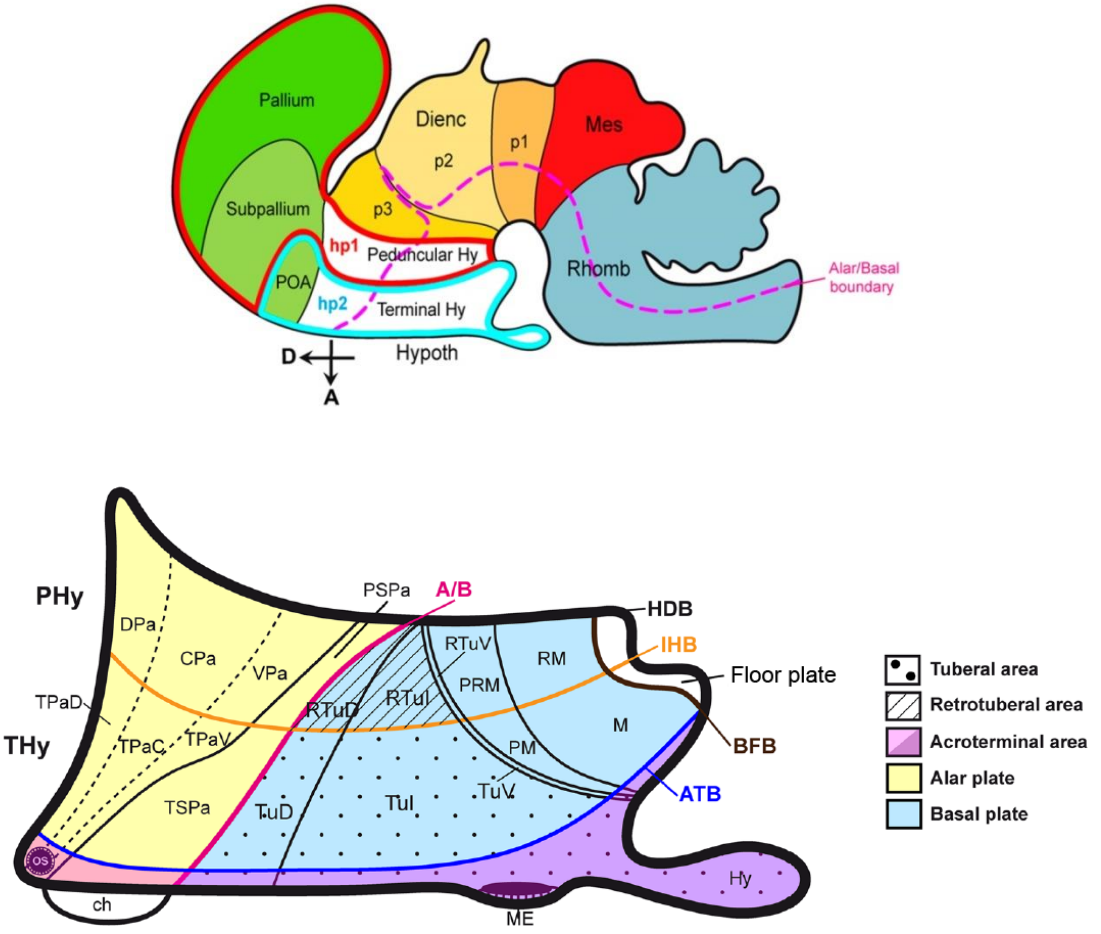



**Figura 1.12.** Representaciones esquemáticas del hipotálamo según el modelo prosomérico. El límite alar-basal (A/B) aparece como una línea rosa y el límite intrahipotalámico (IHB) con una línea amarilla. Se muestran en distintos colores las placas alar, basal y del suelo del hipotálamo así como los neurómeros transversales (perpendiculares a las placas), peduncular (PHy) y terminal (THy), además de la división transversal acroterminal (junto al borde rostral, en malva). El dominio SPV o Pa se muestra con sus divisiones dorsal, central y ventral (DPa, CPa, VPa), separadas por líneas discontinuas (Morales-Delgado *et al*. 2014).

### 1.4.2 División del telencéfalo embrionario: palio y subpalio.

El telencéfalo embrionario inicialmente se divide en dos grandes regiones, el palio y el subpalio (Fig. 1.13). El análisis de los datos proporcionados por los estudios de mapa de destino y la expresión de genes revelan estas dos grandes divisiones del telencéfalo y, algunas de sus subdivisiones aparecen durante la embriogénesis y están presentes en todos los vertebrados (Puelles *et al*. 2000, 2004; Wilson y Rubenstein 2000; Wullimann y Mueller 2004; Mueller y Wullimann 2009; Moreno *et al*. 2009; Abellán y Medina 2009). El palio da lugar a las regiones corticales, el claustro, la amígdala palial, y el bulbo olfatorio en mamíferos, y el bulbo olfatorio y las regiones cortico-paliales en los no mamíferos, como la placa cortical y la cresta ventricular dorsal (DVR) de reptiles y aves (Striedter 1997; Puelles *et al*. 2000; Medina y Reiner 2000; Puelles 2001; Medina *et al*. 2004; Abellán y Medina 2009). En los diferentes vertebrados, el subpalio va a producir los ganglios basales, la amígdala centromedial extendida, la región peduncular, la mayor parte del septum y la región preóptica (Medina y Reiner 1995; Striedter 1997; Marín *et al*. 1998; Puelles *et al*. 2000; Brox *et al*. 2003; Moreno *et al*. 2004, 2009, 2010; Moreno y González 2006; Medina 2008b; García-López *et al*. 2008; Abellán y Medina 2009).

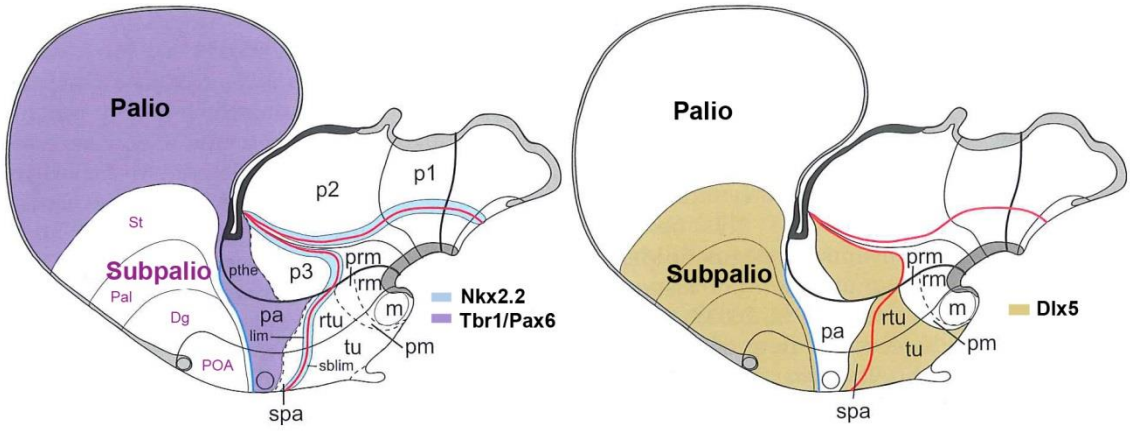



**Figura 1.13.** Representación esquemática del palio y del subpalio, así como otras divisiones prosencefálicas. En estadios tempranos, en el palio las células progenitoras expresan el factor de transcripción Pax6 (también: Emx1/2, Lhx2/9, Lef1 y Dbx1), y cuando llegan al manto y empiezan a diferenciarse expresan Tbr1 (Medina y Abellán, 2009). Las células progenitoras del subpalio expresan Gsh1/2 y Dlx2 (además, dependiendo del subdominio expresan Pax6, Nkx2.1 y/o Shh, entre otros). Cuando abandonan la zona proliferativa (vz/svz) empiezan a migrar y diferenciarse, expresando Dlx5 (también, dependiendo del subdominio subpalial: Pax6, Islet1, Mash1, Lhx6, Lhx7/8) (Medina y Abellán, 2012) (Modificado de Puelles *et al*. 2012).

Los datos obtenidos de los patrones de expresión de una gran combinatoria de genes reguladores del desarrollo muestran que en el telencéfalo de ratón y pollo el subpalio incluye al menos tres subdivisiones radiales principales, mientras que el palio incluye al menos cuatro (Puelles *et al*. 2000; Medina *et al*. 2004; Flames *et al*. 2007; García-López *et al*. 2008; Abellán y Medina 2009).

Clásicamente, el palio estaba subdividido en tres divisiones principales denominadas palio medial, dorsal y lateral (revisado por Striedter, 1997), pero Puelles y colaboradores propusieron la existencia de cuatro subdivisiones radiales en el palio basadas en la combinación de patrones de expresión de genes que codifican para los factores de transcripción Pax6, Tbr1 y Emx1 (Puelles *et al*. 2000). En concreto propusieron la división del palio lateral clásico en dos dominios radiales: el palio lateral redefinido y un nuevo palio ventral (adyacente al límite palio-subpalio, Puelles *et al*. 2000). Todas las subdivisiones paliales expresaban Pax6 en la zona ventricular y Tbr1 en el manto (Bulfone *et al*. 1995, 1999; Puelles *et al*. 2000). En cambio, Emx1 se expresaba tanto en la zona ventricular (vz) como en el manto del palio medial, dorsal y lateral, pero estaba ausente en la zona ventricular y la mayor parte de manto del palio ventral (Puelles *et al*. 2000; Bishop *et al*. 2000, 2003), considerándose pues una nueva subdivisión palial. Más tarde, se comprobó que el palio ventral está caracterizado por genes específicos como el factor de transcripción Dbx1, que se expresa en la vz del palio ventral, pero no en los palios lateral y dorsal, y tampoco en la división subpalial adjacente (Yun *et al*. 2001; Medina *et al*. 2004). Otro factor de transcripción que se expresa de forma diferencial en el palio ventral de distintos vertebrados es Lhx9 (García-López *et al*. 2008; Abellán *et al*. 2009, 2014). Inicialmente se pensó que tanto el palio ventral como el lateral producían distintas partes de la amígdala palial (Puelles 2001; Medina *et al*. 2004). Los derivados de los palios lateral y ventral han sido recientemente redefinidos en base a nuevos datos de genoarquitectura y de mapeo genético de los derivados de Dbx1 (Puelles *et al*. 2016a; b). De acuerdo a esta nueva definición, solamente el palio ventral produce neuronas para la amígdala, pero no el palio lateral. Además, se ha propuesto la existencia de al menos otra división palial caudal, que no expresa Dbx1, que contribuye a la formación de la parte caudal de la amígdala (Medina *et al*. 2017; discutido también en Abellán *et al*. 2014; Puelles *et al*. 2016b).

En relación al subpalio, las tres subdivisiones principales se denominan la subdivisión estriatal (eminencia ganglionar lateral en ratón), la subdivisión palidal (eminencia ganglionar medial y el área peduncular o diagonal en ratón) y la subdivisión preóptica (Puelles *et al*. 2000, 2004; Flames *et al*. 2007; García-López *et al*. 2008; Abellán y Medina 2009; Abellán *et al*. 2009; Medina y Abellán 2012). La subdivisión

estriatal se caracteriza por la expresión de Gsh2, Mash1, Dlx1/2 y Dlx5; la palidal también expresa genes de la familia de Dlx y Mash y, además, Nkx2.1, Lhx6 y Lhx7/8; y la subdivisión preóptica expresa Dlx, Nkx2.1, Lhx6, Lhx7/8 y, en la zona ventricular, expresa el gen que codifica para la proteína Shh (Puelles *et al*. 2000, 2004; Medina *et al*. 2004; Flames *et al*. 2007; García-López *et al*. 2008; Abellán y Medina 2009; Medina y Abellán 2012). Puesto que algunos de estos genes reguladores del desarrollo también están expresados en el manto (por ejemplo, Dlx5, Nkx2.1, Lhx6 y Shh), la combinación de sus patrones de expresión resulta muy útil para analizar los derivados de cada división (Puelles *et al*. 2000; García-López *et al*. 2008; Medina y Abellán 2012; Medina *et al*. 2017). Este tipo de análisis sugiere que diferentes divisiones del subpalio dan lugar a diferentes partes de la amígdala centromedial extendida (incluyendo la amígdala centromedial y el núcleo del lecho de la *stria terminalis* o BST) (véanse siguientes apartados) (García-López *et al*. 2008; Bupesh *et al*. 2011b; a; Medina *et al*. 2017).

#### *1.4.2.1 Formación de las divisiones y subdivisiones radiales del telencéfalo*

En el telencéfalo embrionario temprano, la confluencia de varias señales induce a la expresión de varios factores de transcripción y otras proteínas reguladoras en patrones diferentes, dando lugar a una parcelación gradual del neuroepitelio en compartimentos progenitores distintos (Marín y Rubenstein 2002; Medina 2008a). Estos progenitores se encuentran inicialmente a nivel de la zona ventricular. A medida que el desarrollo avanza, se forma una segunda capa germinativa llamada zona subventricular, que es particularmente prominente a nivel de las eminencias ganglionares del subpalio. Cada compartimento progenitor ocupa un lugar específico a lo largo de los ejes rostrocaudal y dorsoventral del tubo neural (es decir, una posición topológica determinada dentro del *Bauplan* del tubo neural), y expresa una combinación diferente de factores de transcripción y otras proteínas reguladoras del desarrollo, dando lugar a un grupo concreto de neuronas y células gliales (Puelles *et al*. 2004; Medina 2008a; Medina y Abellán 2009, 2012). Además, cada compartimento progenitor muestra restricción clonal, por lo que las células proliferativas permanecen segregadas a nivel de la zona ventricular (Puelles *et al*. 2004). La mayoría de las nuevas neuronas en cada compartimento progenitor migran radialmente para ocupar diferentes posiciones superficiales a la zona ventricular, aunque debido al crecimiento y morfogénesis diferencial de distintos sectores, la dimensión radial del telencéfalo pronto se empieza a deformar.

Tras la división inicial, el palio y el subpalio experimentan una morfogénesis distinta (Puelles *et al*. 2008). La proliferación y diferenciación celular en el subpalio ocurre en

estadios tempranos del desarrollo, y las células tienden a acumularse en posiciones profundas, formando las eminencias gangliónicas lateralmente y el septum medialmente. En mamíferos, las eminencias ganglionares (EG) se denominan EG lateral y EG medial, que formarán las estructuras nucleares estriatales y palidales, respectivamente (Puelles *et al*. 2008; Medina y Abellán 2012).

En cambio, en las sudivisiones medial y dorsal del palio, que dan lugar a la formación hipocampal y el neocortex, respectivamente, las células tienden a agregarse cerca de la superficie formando una capa fina que ocupa una gran extensión superficial. Además, el enorme crecimiento del palio dorsal en mamíferos, va a tener como consecuencia la deformación de la glía radial en los extremos del palio (y como consecuencia, la glía radial del subpalio). En el palio ventrolateral, en particular en el palio ventral, la glía radial queda inclinada hacia abajo, guiando a las estructuras derivadas de este palio hacia posiciones ventrales (Medina y Abellán 2009; Medina *et al*. 2017). En este palio, las células no permanecen cerca del ventrículo, sino que migran largas distancias siguiendo la dimensión radial a lo largo de la corriente migratoria ventral (Medina *et al*. 2004; Puelles *et al*. 2016b).

Por tanto, esta diferencia de crecimiento y morfogénesis entre el palio y el subpalio, junto con el gran crecimiento del palio dorsal, están probablemente detrás de la gran deformación de la dimensión radial en los límites del palio. Ésto también obliga a las unidades radiales de parte del subpalio a adoptar una posición oblicua. Es importante tener ésto en consideración para entender las divisiones radiales tanto de los extremos del palio, como del subpalio en el adulto.

### 1.4.3 Límite telencéfalo-hipotálamo

El límite telencéfalo-hipotalámico queda acotado por el borde ventral de la expresión de la familia de genes Dlx (Dlx1/2/5/6) y los genes Arx y Mash1 (también conocido como Ascl1), que se expresan selectivamente en el subpalio adyacente al dominio hipotalámico alar Pa o SPV; este último está caracterizado por ser fuertemente Otp/Sim1 positivo e inmunorreactivo para la calbindina, y por carecer de señal Dlx/Arx (Puelles y Rubenstein 2003; Puelles *et al*. 2004; Shimogori *et al*. 2010; Morales-Delgado *et al*. 2011). Este límite molecular, además, coincide con el plano que separa el complejo de la *stria terminalis* telencefálica del núcleo supraóptico y el núcleo de la *stria medullaris*, ambos en territorio hipotalámico o diencefálico (Puelles *et al*. 2012).

El hipotálamo alar contacta también directamente con el palio telencefálico, penetrando en él a través del suelo del foramen interventricular (rostral a la eminencia pretalámica). Este “pasillo” hipotálamo-palial está extremadamente deformado y

discurre a lo largo del *sulcus terminalis*, cerca del curso de las fibras de la *stria terminalis* (Fan *et al*. 1996; Puelles *et al*. 2000; Puelles 2011). Hay varios patrones de expresión génica que son continuos a un lado y otro de esta frontera como, por ejemplo, los de Tbr1, Pax6 y Ngn2 (Puelles *et al*. 2012; *Allen Developing Mouse Brain Atlas*). Por tanto, el curso de dos tractos nos delimitan al hipotálamo del telencéfalo: la *stria medullaris* que cursa a nivel del extremo dorsal del hipotálamo alar (luego continuando por la eminencia pretalámica), mientras que la *stria terminalis* (Fig. 1.14) sigue un trayecto paralelo al límite en el lado telencefálico (Puelles *et al*. 2012).

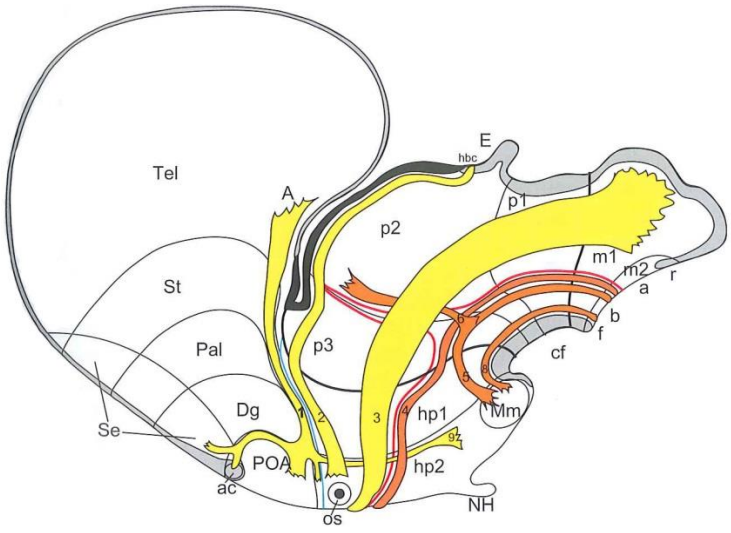



**Figura 1.14.** Tres de los principales tractos longitudinales alares se muestran en amarillo y se corresponden con la *stria terminalis* (1), la *stria medullaris* (2) y el tracto óptico (3) (Puelles *et al*. 2012).

### 1.4.4 La amígdala

La amígdala fue descrita por primera vez por Burdach a principios del s. XIX como una estructura en forma de almendra localizada en el lóbulo temporal del cerebro humano. Sin embargo, lo que Burdach describió fue únicamente una parte de la amígdala, la llamada amígdala basolateral (revisado por McDonald 2003; Whalen y Phelps 2009; Medina *et al*. 2017). Johnston (1923) fue el primero en describir las subdivisiones de la amígdala que hoy en día están más aceptadas, separándolas en dos grupos principales en función de su aparente origen embrionario: los núcleos central y medial, derivados de la eminencias gangliónicas; y los núcleos cortical y basolateral, producidos por plegamiento y proliferación del lóbulo piriforme (revisado por McDonald 2003; Medina *et al*. 2017).

Mediante estudios de lesión, Weiskrantz (1956) fue el primero en identificar la amígdala como el área del lóbulo temporal asociada al procesamiento de la emoción, incluyendo la reacción al miedo y el comportamiento sexual (revisado por LeDoux y Schiller 2009; Medina *et al*. 2017). Numerosos estudios en diferentes animales reafirman el papel de la amígdala en funciones relevantes para la supervivencia y la eficacia biológica de los individuos, tales como el control del sistema neuroendocrino y la homeostasis, la reproducción, la sociabilidad y la respuesta de miedo, así como en funciones cognitivas como la atención y el aprendizaje emocional (Young *et al*. 1998; Davis 1998; Aggleton 2000; Swanson 2000; Phelps 2004; Phelps y LeDoux 2005). Si a eso se le suma que las alteraciones en la amígdala dan lugar a importantes disfunciones y enfermedades neuropsiquiátricas como ansiedad/estrés, epilepsia, autismo y esquizofrenia (Kitamura *et al*. 2002; Kato y Dobyns 2005; Amaral *et al*. 2008; Fazzari *et al*. 2010), dicha estructura se convierte en un objeto de estudio clave para la comprensión de las bases neurales de las emociones, el comportamiento social y la cognición.

#### *1.4.4.1 Organización en mosaico de la amígdala*

En mamíferos, la amígdala es muy compleja debido a sus múltiples subdivisiones, subtipos neuronales y conexiones, constituyendo un mosaico de distintos tipos neuronales con origen embrionario diferente (Medina *et al*. 2011, 2017; Abellán *et al*. 2013). Los datos sugieren que las neuronas con un mismo origen embrionario expresan los mismos factores de transcripción durante el desarrollo y contienen los mismos neurotransmisores y neuropéptidos, y que dichas neuronas podrían estar interconectadas, proyectar a las mismas dianas y estar implicadas en las mismas funciones (Medina *et al*. 2011, 2017; Bupesh *et al*. 2011a, b; Abellán *et al*. 2013).

En la mayoría de los mamíferos, las subdivisiones básicas de la amígdala y de su parte extendida son las siguientes (Medina *et al*. 2017): (1) Una amígdala basolateral o complejo nuclear basolateral; (2) varias áreas amigdalinas corticales olfato-receptoras; (3) una amígdala medial; (4) una amígdala central; (5) las células amigdalinas intercaladas; (6) la amígdala anterior; y (7) el núcleo del lecho de la *stria terminalis* (BST) con sus subdivisiones lateral y medial. Además, en todos los mamíferos estudiados hay áreas de transición entre la amígdala y las áreas adyacentes: el estriado, la corteza piriforme, la corteza entorrinal y la formación hipocampal.

Considerando el neurotransmisor que contienen sus principales neuronas (GABA *vs* glutamato) y sus conexiones y funciones primarias, la amígdala se ha dividido en dos grandes grupos:

1. Una amígdala palial tipo cortical, que incluye el complejo nuclear basolateral y las áreas amigdalinas corticales (Swanson y Petrovich 1998; Swanson 2000; McDonald 2003). Sus principales neuronas son tipo piramidal, expresan el neurotransmisor excitatorio glutamato y se encuentran conectadas con otras áreas corticales (Swanson y Petrovich 1998; McDonald 2003; Freese y Amaral 2009). Debido a sus conexiones con la corteza, el complejo basolateral es importante para la contextualización de la información sensorial recibida de las áreas olfatorias, del tálamo y del bulbo raquídeo (Freese y Amaral 2009) y es esencial para el aprendizaje asociativo (Cardinal *et al*. 2002). A continuación, el complejo basolateral pasa esa información contextualizada a la amígdala centromedial extendida donde se producen las repuestas emocionales y sociales (Freese y Amaral 2009; Pare y Duvarci 2012).

2. Una amígdala subpalial tipo ganglios basales, que incluye la amígdala central y medial, las células amigdalinas intercaladas, la amígdala anterior y el BST (Alheid *et al*. 1995; Swanson y Petrovich 1998; Swanson 2000; McDonald 2003). Todas estas divisiones juntas forman la amígdala centromedial extendida (véase siguiente apartado). Al igual que en los ganglios basales, las principales neuronas de la amígdala centromedial extendida son gabaérgicas, coexpresan diferentes neuropéptidos y dan lugar a proyecciones descendentes a centros efectores del hipotálamo y del tronco encefálico (revisado por Swanson 2000; Medina *et al*. 2017).

#### *1.4.4.2 La amígdala centromedial extendida*

El concepto de amígdala extendida (EA) fue propuesto por primera vez por Johnston (1923) quien sugirió la existencia de un corredor celular continuo en el telencéfalo basal embrionario de diferentes mamíferos, estableciendo una relación entre el BST y el núcleo amigdalino centromedial. Casi 50 años después, de Olmos proporcionó evidencia de la existencia de una continuidad entre el BST y la amígdala centromedial incluso en mamíferos adultos (de Olmos 1969, 1972). Las neuronas a lo largo de este corredor celular muestran características neuroquímicas y conexiones similares (Alheid y Heimer 1988; Alheid *et al*. 1995; de Olmos *et al*. 2004). Basándose en estas similitudes, de Olmos junto con Alheid y Heimer redefinieron el corredor (de Olmos *et al*. 1985, 2004; Alheid y Heimer 1988; Alheid *et al*. 1995; de Olmos y Heimer 1999; Heimer 2003; Walker y Davis 2008). Mostraron que el núcleo central y medial de la amígdala y el BST estaban conectados por columnas de células localizadas a través del curso de la *stria terminalis* (tracto de fibras que conecta estos núcleos amigdalinos con el BST) y a través de la parte sublenticular del telencéfalo basal (de Olmos *et al*. 1985; Alheid y Heimer 1988; Alheid *et al*. 1995; Heimer 2003; Walker y Davis 2008). Así, según esta propuesta, la EA está formada por dos corredores celulares paralelos

llamados amígdala central extendida (EAce, dorsalmente, incluyendo el núcleo amigdalino central y la parte lateral del BST) y la amígdala medial extendida (EAme, ventralmente, incluyendo el núcleo amigdalino medial y la parte medial del BST).

Amígdala central extendida (EAce)

Actualmente se considera que la EAce incluye la amígdala central, las células amigdalinas intercaladas, una parte dorsal del EA sublenticular y la parte lateral del BST (BSTL) (de Olmos *et al*. 2004).

Las principales contribuciones sensoriales que recibe la EAce son: olfatoria, de las áreas y núcleos amigdalinos olfato-receptores (Swanson y Petrovich 1998; Freese y Amaral 2009); visual, auditiva y somestésica, de diferentes núcleos del complejo intralaminar del tálamo (Yasui *et al*. 1991; Linke *et al*. 2000; D'Hanis *et al*. 2007); y gustativa e información visceral, del tálamo posterior, núcleo parabraquial y el núcleo del tracto solitario (Ricardo y Koh 1978; Ter Horst *et al*. 1989; D'Hanis *et al*. 2007; Tokita *et al*. 2009). Además, la EAce recibe información de regiones corticales/paliales y puede producir y modular los comportamientos relacionados con miedo/ansiedad e ingesta (LeDoux *et al*. 1990; Davis 1992; Swanson 2000; Cardinal *et al*. 2002; Phelps y LeDoux 2005; Walker y Davis 2008).

Las proyecciones descendentes del núcleo central y del BSTL al hipotálamo y al bulbo raquídeo llegan a centros efectores implicados en la regulación de respuestas emocionales tanto fisiológicas como conductuales (Phelps y LeDoux 2005). El BSTL también proyecta al área tegmental ventral (VTA), modulando el sistema mesolímbico dopaminérgico que está implicado en motivación (Cardinal *et al*. 2002; Kudo *et al*. 2012, 2014; Jennings *et al*. 2013).

Amígdala medial extendida (EAme)

La EAme está formada por la amígdala medial, una parte ventral de la EA sublenticular y la parte medial del BST (BSTM) (de Olmos *et al*. 2004). Esta parte de la amígdala tiene un papel importante en varios aspectos del comportamiento social (Alheid y Heimer 1988; Alheid *et al*. 1995; Swanson 2000; Heimer 2003; de Olmos *et al*. 2004), y de la cognición social (De Vries y Miller 1998; Coolen y Wood 1998; Newman 1999; Bickart *et al*. 2014).

La EAme es muy importante en la integración de las señales olfativas (fundamentales para el comportamiento y reconocimiento social) con el sistema neuroendocrino. En concreto, el núcleo amigdalino medial y el BSTM reciben un importante aporte directo de los bulbos olfatorios principal y accesorio (Martínez-Marcos y Halpern 1999; Shipley *et al*. 2004; Mohedano-Moriano *et al*. 2007). Además,

la EAme está recíprocamente conectada con el complejo hipocampal y la corteza prefrontal (Canteras *et al*. 1995; Freese y Amaral 2009), de ahí su papel en cognición social.

La amígdala medial integra la información que le llega y proyecta al área preóptica medial y a los centros efectores en el hipotálamo medial que regulan los sistemas neuroendocrino y autónomo, implicándose en comportamiento sexual y agonista (Swanson y Petrovich 1998; Swanson 2000; Choi *et al*. 2005). También proyecta al septum lateral (relacionado con comportamiento social), al núcleo accubens, al pálido ventral y al VTA (relacionado con motivación). La amígdala medial también proyecta a la EAce y al núcleo talámico paraventricular sensible al estrés (Canteras y Goto 1999), influyendo en comportamientos relacionados con el estrés en contexto social.

La EAme es sexualmente dimórfica en el cerebro adulto de distintos vertebrados, incluyendo mamíferos, en relación al volumen nuclear, número de neuronas, la organización sináptica y la expresión de neurotransmisores y receptores (Newman 1999; Morris *et al*. 2008). Todas las subdivisiones de la EAme y, en especial aquellas implicadas en comportamiento sexual, son ricas en receptores de esteroides (Shughrue *et al*. 1997; Newman 1999).

#### *1.4.4.3 Subdivisiones paliales y subpaliales de la amígdala.*

Basándose en criterios morfológicos, los pioneros de la neuroembriología comparada Holmgren (1925) y Källén (1951) propusieron la existencia de partes paliales y subpaliales en la amígdala de diferentes vertebrados, lo cual se ha corroborado en las últimas décadas gracias a los datos de expresión de genes regulatorios del desarrollo y a los análisis de mapa de destino (Puelles *et al*. 2000; Gorski *et al*. 2002; Medina *et al*. 2004, 2011; Moreno y González 2006; García-López *et al*. 2008; Xu *et al*. 2008; Hirata *et al*. 2009; Medina y Abellán 2009; Moreno *et al*. 2009; Waclaw *et al*. 2010). Las características neuroquímicas y la conectividad de las diferentes partes de la amígdala se pueden entender mejor cuando se analizan considerando los datos del desarrollo. Estas características están basadas en la expresión diferencial en el palio y subpalio de genes reguladores del desarrollo. En el telencéfalo en desarrollo, los genes implicados en neurogénesis (Neurogeninas 1 y 2), en migración (NeuroD) o diferenciación (Tbr1) de las néuronas glutamatérgicas se encuentran exclusivamente en el palio (Fode *et al*. 2000; Yun *et al*. 2001; Hevner *et al*. 2001; Stenman *et al*. 2003; Osório *et al*. 2010). En el caso de la neuronas gabaérgicas, los genes implicados en esos mismos procesos (Mash1 y Dlx1/2/5/6) están exclusivamente en el subpalio, con la excepción de las poblaciones celulares que migran tangencialmente desde el subpalio al palio (Fode *et al*. 2000; Yun *et al*. 2001;

Anderson *et al*. 2001; Marín y Rubenstein 2001, 2002; Stenman *et al*. 2003; Osório *et al*. 2010). La expresión de Tbr1 en el complejo basolateral y las áreas corticales amigdalinas (Puelles *et al*. 2000; Medina *et al*. 2004), además de mostrar su origen palial, ayuda a comprender por qué las principales neuronas de estas estructuras son glutamatérgicas. Lo mismo sucede con la expresión de Dlx2/Dlx5 en la amígdala centromedial y el BST (Puelles *et al*. 2000; Medina *et al*. 2004), que explica su origen subpalial y el fenotipo gabaérgico de la mayoría de sus neuronas.

En base a la expresión de genes reguladores del desarrollo, trazado de linajes celulares y ensayos de migración, la amígdala palial deriva de las partes ventral y caudal del palio, mientras que la amígdala subpalial deriva de las partes caudales de las tres principales subdivisiones del subpalio: el estriado, el pálido y el preóptico (Medina *et al*. 2004; García-López *et al*. 2008; Hirata *et al*. 2009; Waclaw *et al*. 2010; Bupesh *et al*. 2011a; b).

En los estudios iniciales, basados en la expresión de Tbr1 y otros factores de transcripción a lo largo del desarrollo (como Dbx1), se propuso que el complejo basolateral y las áreas amigdalinas corticales derivan de dos divisiones del palio, el lateral y el ventral (Medina *et al*. 2004); más tarde, Lhx9 surgió como un buen marcador de la parte palial ventral de la amígdala (Tole *et al*. 2005; García-López *et al*. 2008). Más recientemente se ha perfilado mejor el origen concreto de la amígdala palial en base a mapa de destino genético de células derivadas de progenitores Dbx1 (específico del palio ventral), en comparación con otros genes expresados en el palio. En base a estos nuevos datos, actualmente se considera que la mayor parte de la amígdala palial se origina en el palio ventral, excepto su polo posterior (incluyendo la parte posterior del complejo basal y de las áreas corticales amigdalinas) (Hirata *et al*. 2009; Waclaw *et al*. 2010; Puelles *et al*. 2016b). Por el contrario, el palio lateral - definido ahora en base a Nr4a2/Nurr1 - no produce ninguna parte de la amígdala (Puelles *et al*. 2016a). En relación a la parte posterior de la amígdala palial, se ha propuesto que podría originarse en un nuevo dominio ventrocaudal del palio, que expresa Emx1 y Zic2, pero no Dbx1 (Medina *et al*. 2017). Este dominio podría ser el origen de las neuronas de la amígdala palial con Emx1 (Medina *et al*. 2017) que se distribuyen por toda la amígdala palial (Gorski *et al*. 2002). También podría ser el verdadero origen de las neuronas del LOT2 (Medina *et al*. 2017), que se había propuesto que migraban tangencialmente desde el palio dorsal (Remedios *et al*. 2007). Estos dos dominios paliales, con expresión de Lhx9 (palio ventral) o bien la combinación de Emx1/Lhx9 (palio ventrocaudal), también parecen estar presentes en el telencéfalo de sauropsidos (aves y reptiles), y producen distintas partes de la amígdala palial en estos animales (Abellán *et al*. 2014; Medina *et al*. 2017). El palio

ventral expresa Lhx9 y produce una parte palial de la amígdala también en anfibios (Moreno y González 2006).

Por otro lado, la expresión combinatoria de Pax6, Dlx5, Islet1, Nkx2.1, Lhx6 y Shh ha mostrado la contribución estriatal, palidal y preóptica a los núcleos amigdalinos medial y central y/o al BST en ratón (Puelles *et al*. 2000; Medina *et al*. 2004; García-López *et al*. 2008) y otros vertebrados, incluyendo pollo (Abellán y Medina 2009; Vicario *et al*. 2014, 2015, 2017), tortuga (Moreno *et al*. 2010), y rana (González *et al*. 2002; Moreno *et al*. 2004, 2008a; b, 2009, 2012; Moreno y González 2006; Domínguez *et al*. 2010) (revisado por Medina *et al*. 2017). Los ensayos de migración han sido muy útiles a la hora de elucidar estas propuestas sobre el origen estriatal, pallidal o preóptico de distintas subpoblaciones neuronales de la amígdala y el BST (Bupesh *et al*. 2011a; b; Vicario *et al*. 2015). La mayor parte de la amígdala central extendida se origina en dos subdivisiones estriatales, dorsal (células con Pax6) y ventral (células con Islet1), excepto una subpoblación de neuronas que tienen Nkx2.1 y somatostatina, que proceden de un subdominio palidal caudoventral (Waclaw *et al*. 2010; Bupesh *et al*. 2011a; Vicario *et al*. 2014, 2015). Por su parte, las neuronas de la amígdala medial extendida proceden en su mayor parte de las divisiones palidal (subdominio palidal caudoventral; células con Lhx6) y preóptica (comisural; células con Shh), aunque también contiene subpoblaciones con origen en el palio ventral (con Lhx9) y con origen extratelencefálico (García-López *et al*. 2008; Hirata *et al*. 2009; Carney *et al*. 2010; Bupesh *et al*. 2011b).

#### *1.4.4.4 Contribución extratelencefálica a la amígdala.*

Basado en la expresión de los factores de transcripción Otp y Lhx5, se propuso que la amígdala medial del ratón incluiría una importante subpoblación neuronal derivada del dominio SPV (Fig. 1.15) (Puelles y Rubenstein 2003; García-López *et al*. 2008; Bardet *et al*. 2008; Abellán *et al*. 2010).

Como ya se mencionó, este dominio produce el PVN y el SO, que son los principales núcleos hipotalámicos del eje hipotálamo-hipofisario, siendo Otp y Sim1 esenciales en el desarrollo de estos centros (Michaud *et al*. 1998; Wang y Lufkin 2000). Basado en el análisis de las células que expresan Otp y Lhx5 durante el desarrollo, algunas células producidas en el SPV parecían extenderse tangencialmente hacia el telencéfalo para invadir la amígdala medial y otras partes de la amígdala medial extendida (Bardet *et al*. 2008; Abellán *et al*. 2010). Ésto ha sido confirmado experimentalmente gracias a los mapas de destino (García-Moreno *et al*. 2010; Bupesh *et al*. 2011a) y al análisis de los ratones Otp-*knockout* donde el número

de células derivadas del SPV que llegan a la amígdala medial y al BST disminuye (Wang y Lufkin 2000; García-Moreno *et al*. 2010).

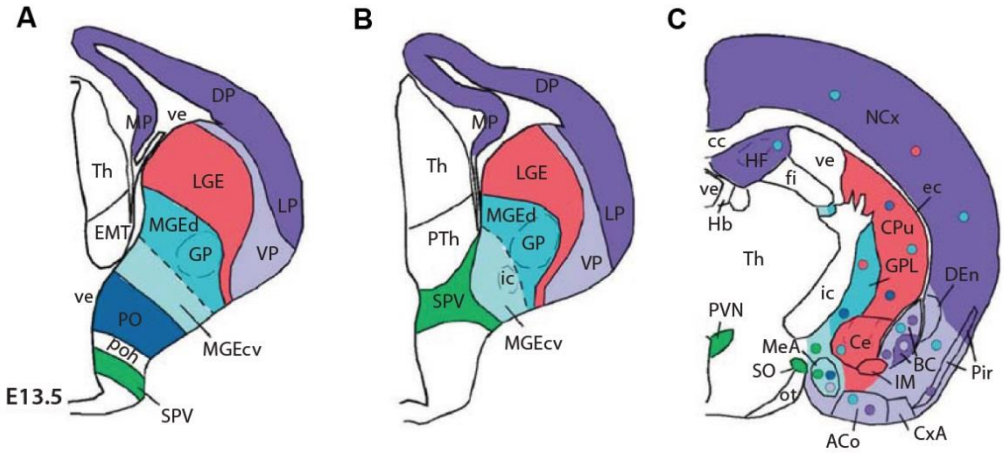



**Figura 1.15.** A y B. Dibujos esquemáticos de secciones frontales del prosencéfalo embrionario de ratón de estadios E13.5 mostrando las principales divisiones y subdivisiones en distintos colores. C. El dibujo se corresponde con el de una sección del prosencéfalo en ratón adulto al nivel de la amígdala anterior donde se muestran los derivados de cada dominio embrionario en los mismos colores usados en A y B (Medina *et al*. 2011).

En base a la expresión del transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2, marcador de células glutamatérgicas), parece probable que las células derivadas de SPV de la amígdala medial sean glutamatérgicas y que sus proyecciones sean excitatorias (García-Moreno *et al*. 2010; Abellán *et al*. 2010). Sin embargo, el fenotipo, las conexiones y la función de este grupo de neuronas de la amígdala medial son desconocidas. Nuestro grupo ha propuesto que las células Lhx5/Otp de la amígdala medial y del BST (derivadas de SPV) podrían estar interconectadas y proyectar a dianas hipotalámicas similares implicadas en defensa/agresión y/o en otros aspectos del comportamiento social (Choi *et al*. 2005; Abellán *et al*. 2013; Bupesh *et al*. 2014; Medina *et al*. 2017).

Puesto que el SPV produce las neuronas que contienen VP y OT del PVN (Michaud *et al*. 1998; Wang y Lufkin 2000), es posible que las células de la amígdala medial extendida (incluyendo el BSTM y la amígdala medial) que expresan VP y/o OT también deriven del SPV (Medina *et al*. 2017).

Algo muy relevante en relación con el dominio SPV es que su tamaño aumenta por la reducción o falta de función del factor de transcripción Nkx2.1 en el hipotálamo (Marín *et al*. 2002). Parece que la expresión de Nkx2.1 ha estado regulada a la baja en el hipotálamo alar durante la evolución de los mamíferos, lo que ha podido producir un

agrandamiento del SPV y la subpoblación amigdalina derivada de él (revisado en Medina *et al*. 2011).

## 1.5 DIFERENCIACIÓN CELULAR EN EL HIPOTÁLAMO Y EL TELENCÉFALO

### 1.5.1 Especificación molecular de las poblaciones neuronales productoras de neuropéptidos.

El hipotálamo y la hipófisis o glándula pituitaria constituyen el principal eje del sistema neuroendocrino que controla la síntesis y secreción de hormonas necesarias para el crecimiento, el comportamiento, la reproducción y el metabolismo (Simmons *et al*. 1990; Wilson y Foster 1992; Treier y Rosenfeld 1996). El hipotálamo neuroendocrino está formado por dos poblaciones neuronales: las neuronas magnocelulares, agrupadas en los núcleos PVN y SO que proyectan sus axones a la neurohipófisis o pituitaria posterior y liberan OT y VP; y las parvocelulares que proyectan a la eminencia media donde liberan hormonas hipofisiotrópicas que regulan la secreción hormonal de la adenohipófisis o pituitaria anterior (Swanson 1987; Sharp y Morgan 1996). Las neuronas parvocelulares del PVN liberan la hormona liberadora de corticotropina (CRF) y la hormona liberadora de tirotropina (TRH).

En embriones de ratón, las neuronas parvocelulares y magnocelulares de los núcleos PVN y SO se originan entre el día 10 y el 12 post-coito (p.c.) en el dominio SPV (Karim y Sloper 1980). Una fracción de esas neuronas permanece en una posición medial dando lugar al PVN mientras que la porción restante migra lateralmente llegando a su destino final entre los días 13.5 y 14.5 p.c. formando el SO (Karim y Sloper 1980).

Han sido muchos los estudios sobre los factores de transcripción de la familia POU como Pit1 y Brn2, implicados en el desarrollo del eje hipotálamo-hipofisario (Ingraham *et al*. 1988; Simmons *et al*. 1990; Li *et al*. 1990; Nakai *et al*. 1995; Schonemann *et al*. 1995). Además de éstos, el factor de transcripción Sim1 desempeña un papel crucial en el desarrollo de las neuronas parvocelulares y magnocelulares de los núcleos PVN, SO y aPV (núcleo periventricular anterior) así como en el mantenimiento de la expresión de Brn2 (Michaud *et al*. 1998). Por consiguiente, las disfunciones neuroendocrinas detectadas en ratones mutantes Brn2 -/- (Nakai *et al*. 1995; Schonemann *et al*. 1995) están presentes también en ratones carentes de Sim1 (Michaud *et al*. 1998).

Otro factor de transcripción muy importante es Otp, un factor con homeodominio muy conservado, que se expresa durante el desarrollo embrionario en el AH (hipotálamo anterior), el PVN, el SO y el núcleo arcuato (Arc) (Puelles y Rubenstein

1993; Rubenstein *et al*. 1994; Alvarez-Bolado *et al*. 1995). Como ya hemos comentado, algunas células Otp también están presentes en la amígdala medial extendida, incluyendo el BSTM, el BST intra-amigdalino y el núcleo medial (Bardet *et al*. 2008; García-Moreno *et al*. 2010; Abellán *et al*. 2010). El análisis anatomo-histológico de los cerebros de ratones neonatos Otp-*knockout* (Otp -/-) muestra evidentes anormalidades en el hipotálamo (Acampora *et al*. 1999; Wang y Lufkin 2000). Los núcleos PVN y SO contienen un número de células menor y éstas no poseen sus características morfológicas típicas. TRH y CRF no se expresan en el PVN, y VP y OT son inexistentes en el PVN y el SO (Acampora *et al*. 1999; Wang y Lufkin 2000). Además, las células VP también desaparecen de la amígdala medial extendida (Wang y Lufkin 2000; García-Moreno *et al*. 2010). Por otra parte, la ausencia de Lhx5 (marcador de varias estructuras amigdalinas) en los ratones Otp -/- sugiere que Otp podría estar regulando directa o indirectamente la expresión de Lhx5. Estos estudios demuestran que Otp está implicado en el correcto desarrollo de los núcleos PVN y SO (Acampora *et al*. 1999; Wang y Lufkin 2000) y de la amígdala medial extendida (García-Moreno *et al*. 2010). En conclusión, Otp juega un papel en la proliferación y/o la supervivencia de los neuroblastos así como en procesos de migración y diferenciación (Wang y Lufkin 2000; Acampora *et al*. 2000; García-Moreno *et al*. 2010).

Otp y Sim1 comparten una distribución similar en el telencéfalo. Los estudios hasta ahora proponían que ambos factores de transcripción podrían expresarse independientemente uno del otro y que en ratones donde faltaba uno, continuaba la expresión del otro (Wang y Lufkin 2000; Caqueret *et al*. 2006). De hecho, la expresión telencefálica de Sim1 parecía inalterada en ausencia de Otp (Wang y Lufkin 2000). Sin embargo, aunque es cierto que existe una población que expresa Sim1 que no está afectada por la ausencia de Otp, hay otras poblaciones que expresan Sim1 en la amígdala que se encuentran alteradas cuando Otp está ausente (García-Moreno *et al*. 2010).

En la red de regulación génica, Otp se encuentra antes (o "aguas arriba") de Brn2 y parece actuar en paralelo con Sim1 (Acampora *et al*. 2000; García-Moreno *et al*. 2010). El análisis de ratones mutantes para Brn2 revela que Brn2 actúa relativamente tarde en el desarrollo neuroendocrino, siendo necesario en etapas finales de la diferenciación de los linajes celulares de CRF, VP y OT (Schonemann *et al*. 1995; Sharp y Morgan 1996; Treier y Rosenfeld 1996). Por tanto, Otp y Sim1 son necesarios para la expresión adecuada de Brn2 en el SPV y en sus derivados hipotalámicos, el PVN y SO (Fig. 1.16).

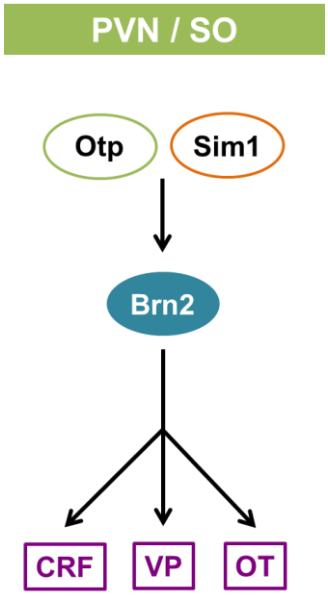



**Figura 1.16.** Cascada de señalización para la diferenciación de tres subtipos neuronales productores de hormonas (CRF, VP y OT) en el hipotálamo alar (Modificado de Caqueret *et al*. 2005).

## 1.6 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos de nuestro laboratorio y otros grupos han demostrado mediante ensayos de migración que una subpoblación de neuronas de la amígdala medial extendida (EAme) se origina en el dominio hipotalámico supraopto-paraventricular (SPV) (García-Moreno *et al*. 2010; Bupesh *et al*. 2011a), que es el mismo que origina las neuronas con VP, OT, corticotropina, y otros neurotransmisores / neuropéptidos de los núcleos supraóptico (SO) y paraventricular (PVN) hipotalámicos (Wang y Lufkin 2000). Sin embargo, estos estudios no han podido demostrar el fenotipo de las células migradas a la amígdala. Además, el SPV tiene dos divisiones que pertenecen a los prosómeros terminal y peduncular (Puelles *et al*. 2014), pero los estudios previos no han considerado la existencia de estas divisiones. Teniendo ésto en consideración, nuestra hipótesis de trabajo es que: (1) Las neuronas de la EAme con dichos fenotipos se originan en el mismo dominio embrionario que produce las del PVN y el SO, es decir el SPV hipotalámico. (2) Las divisiones terminal y peduncular del SPV tienen contribuciones diferentes a la EAme, lo que podría repercutir sobre su participación en distintas redes funcionales y su implicación en distintos trastornos psiquiátricos.

El principal objetivo es estudiar el desarrollo de las neuronas de la EAme con origen hipotalámico y conocer su fenotipo usando como modelo el ratón. Para lograr ésto, los objetivos específicos son los siguientes:

**Objetivo 1:** Estudio de las rutas de migración y contribución diferencial de las partes terminal y peduncular del dominio embrionario SPV a la EAme mediante:

- 1a) Análisis espacio-temporal de la distribución de las células que expresan el factor de transcripción Otp, derivadas del SPV, en relación con la glía radial y con Islet1, un factor de transcripción que se expresa en dominios adyacentes.
- 1b) Análisis de la contribución diferencial de las divisiones terminal y peduncular del SPV, en base a la comparación de Otp con la expresión de un marcador parcial de la región peduncular, Rgs4.
- 1c) Ensayos de migración en cultivos organotípicos, usando un trazador celular fluorescente (CMFDA), y comparación de los resultados con la expresión de Otp, Islet1, Rsg4 y glía radial.

**Objetivo 2:** Estudio del fenotipo de las neuronas que migran desde SPV terminal y peduncular a la EAme, con énfasis en la expresión de VP y OT, mediante:

- 2a) Análisis de la distribución de las neuronas con VP y OT a lo largo del desarrollo, y su comparación con Otp y otros resultados previos.
- 2b) Ensayos de migración en cultivos organotípicos, usando un trazador celular fluorescente (CMFDA), combinados con inmunofluorescencia (IF) y/o hibridación *in situ* fluorescente (HISF) para detectar el ARNm de VP, OT y otros neuropéptidos.

# 2. Materiales y métodos

# 2. MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para el presente estudio se usaron embriones de ratón (*Mus musculus; Swiss;* CD-1), de diferentes estadios embrionarios (desde E9.5 a E18.5), así como neonatos (P0, P3 y P7). Todos los animales se trataron de acuerdo con la normativa vigente para el cuidado y manipulación de animales de experimentación de la Unión Europea (Directiva 2010/63/EU) y del Gobierno de España (Real Decreto 1021/2005 y 53/2013). Los protocolos que se usaron fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universitat de Lleida.

## 2.2 DISECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

### 2.2.1 Obtención del tejido, fijación y sexado

Los embriones se extrajeron mediante cesárea de ratonas gestantes tras sacrificarlas por dislocación cervical. En el caso de los estadios más tempranos (E9.5 y E10.5), se disecaron las cabezas completas mientras que desde E12.5 a E15.5, se disecaron los cerebros y, tanto cabezas como cerebros, se fijaron por inmersión en paraformaldehido al 4% (PFA) en tampón fosfato salino 0.1 M (PBS). Los cerebros de estadios a partir del día 16.5 de gestación y neonatos, se fijaron mediante perfusión transcardiaca y postfijación por inmersión. Para dicha perfusión, los animales fueron aletargados con hielo (embriones) o anestesiados (fetos a partir de E16.5 y postnatales) con pentobarbital sódico (*Dolethal*).

Antes de proceder a la fijación, se tomó una muestra de tejido, en concreto, un pedazo de cola. El sexado fue realizado por el servicio de genómica y proteómica de la Universitat de Lleida. Se utilizó un método de sexado basado en PCR (McClive y Sinclair 2001).

### 2.2.2 Sección de los cerebros

#### *2.2.2.1 Vibratomo*

Los cerebros fijados que se cortaron usando un vibratomo (Leica VT 1000S) previamente se embebieron en un bloque de agarosa (LOW EEO, Conda) al 4% en tampón fosfato. Tras probar con varios planos de corte, se optó por un plano oblicuo paralelo al corredor celular amigdalo-hipotalámico (a partir de ahora, se le llamará a este plano de corte “oblicuo”; Fig. 2.1). De esta forma, se realizaron cortes flotantes seriados de 80 µm, recogiéndolos en PBS frío y se obtuvieron varias series que se

procesaron con alguna de las técnicas histológicas que se describen en los siguientes apartados.

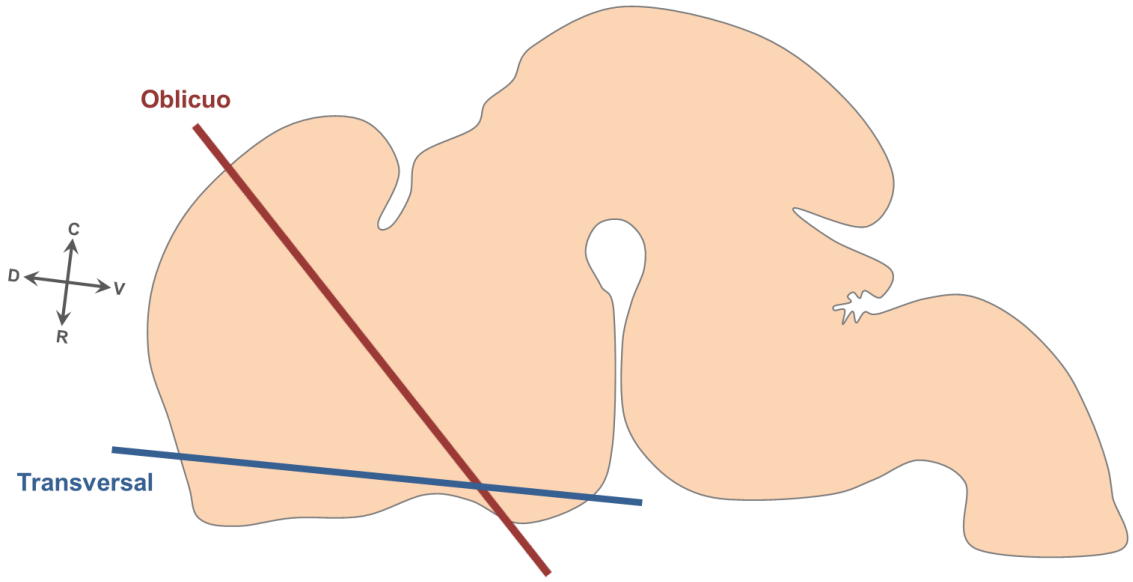



**Figura 2.1.** Dibujo representativo de un cerebro de embrión de ratón E14.5 y dos planos de corte utilizados en este trabajo: el plano oblicuo, paralelo al corredor amígdalo-hipotalámico, y el plano transversal al hipotálamo. Los ejes muestran las posiciones dorsal (D), ventral (V), rostral (R) y caudal (C), en relación al prosencéfalo secundario según el modelo prosomérico.

#### *2.2.2.2 Criostato*

En el caso del criostato, los cerebros se cortaron congelados. Para ello, fue muy importante realizar una crioprotección del tejido tras la fijación. Se usó sacarosa al 30% en PBS y se mantuvo en dicha disolución una noche, hasta que el cerebro se embebió bien (dejó de flotar y bajó al fondo del tubo). A continuación, se colocó en un molde que contenía medio de congelación (Tissue Freezing Medium, Electron Mircroscopy Sciences, EMS) y se congeló por inmersión de los bloques en isopentano (2-metilbutano, Sigma, Cat. No. 59070) durante 1 minuto, a una temperatura que se mantuvo entre los -55 y -60°C mediante la adición de hielo seco. Los bloques se conservaron a -80°C hasta su procesado. Se usó un criostato Leica CM 3000.

En este caso la secciones que se obtuvieron fueron de 20 µm sobre un portaobjetos, que se mantuvo a -20ºC hasta la aplicación de alguna de las técnicas histológicas.

## 2.3 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

La hibridación *in situ* es una técnica que se usa para la detección de ácidos nucleicos en células, tejidos e incluso en órganos y/o animales enteros. El método se basa en la unión complementaria de una sonda de nucleótidos a una secuencia específica de ADN o ARN. Las secuencias de interés son identificadas gracias a la propiedad que poseen los ácidos nucleicos de formar híbridos entre ellos. Estos híbridos pueden ser dos hebras complementarias de ADN (ADN-ADN), una de ARN con una de ADN (ARN-ADN) o dos hebras de ARN (ARN-ARN). Además, son posibles los híbridos entre ácidos nucleicos naturales y artificiales.

Las sondas pueden estar marcadas en alguna de las bases nitrogenadas con radioisótopos, moléculas fluorescentes o antígenos y, dependiendo del marcaje, la visualización de los híbridos se realiza por autorradiografía, microscopía fluorescente o inmunohistoquímica, respectivamente.

### 2.3.1 Hibridación *in situ* con fosfatasa alcalina (ARN-ARN)

La técnica permite la detección de ARN mensajero (ARNm) de tejido fijado utilizando ribosondas *antisense* de ARN marcadas con digoxigenina en los uracilos. El procedimiento implica una primera etapa de hibridación de la ribosonda con los ARNm del tejido, formándose dobles híbridos ARN-ARN. A continuación, se usa un anticuerpo anti-digoxigenina que está conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. Finalmente, se añaden los sustratos de la fosfatasa alcalina dando lugar a una reacción cromógena en el citoplasma de las células que contienen el ARNm hibridado con la ribosonda (Fig. 2.2).

Antes de la pre-hibridación, las secciones flotantes del tejido se permeabilizan con PBST (PBS-Tween 20 al 0.1%) durante 30 minutos. Para pre-hibridar se utilizó únicamente el tampón de hibridación del 1$^{er}$ día (BH 1$^{er}$ día, Anexo I) a 58 ºC durante 2-4 horas. La hibridación se realizó con ribosondas marcadas con digoxigenina. La concentración que se usó fue 1:900 (1µl de sonda por ml de BH 1$^{er}$ día). Esta disolución se desnaturalizó a 80 ºC durante 5 minutos (para eliminar los bucles que pueda tener la hebra de ARN) y luego se enfrió en hielo durante otros 5 minutos. El tejido se incubó con esta disolución de la sonda durante toda la noche a 58 ºC en un baño húmedo.

A día siguiente, se retiró la sonda y se hicieron, en primer lugar, dos lavados de 30 minutos con BH 2º día (Anexo I) a 58 ºC y, a continuación, otro con una mezcla 1:1 de MABT1x (Anexo I) y BH 2º día a 58ºC durante 20 minutos. Se finalizó con una serie de lavados con MABT1x durante 2 horas. Antes de incubar con el anticuerpo anti-

digoxigenina, se añadió un reactivo bloqueante (BBR, Anexo I), mezclado con MABT1x y suero ovino (disolución bloqueante, Anexo I), durante cuatro horas a temperatura ambiente y movimiento. La incubación del anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP Fab. Fragments, Roche, Cat. No. 11093274910) a una concentración 1:3500 en la misma disolución bloqueante se dejó media hora a temperatura ambiente y, luego, a 4 ºC durante toda la noche.

El tercer día, tras desechar el anticuerpo, se lavó con MABT1x durante dos horas y media. El revelado se realizó con BM Purple (Roche, Cat. No. 11442074001) cuya base molecular es cloruro de nitroblue tetrazolium / 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP). Éstos sirven de sustrato a la fosfatasa alcalina, produciendo una reacción cromógena y dando un precipitado de color azul oscuro en el citoplasma de las células a las que se ha unido la ribosonda. Cuando el revelado finalizó, se lavó con MABT 1x y la reacción se paró con PFA.

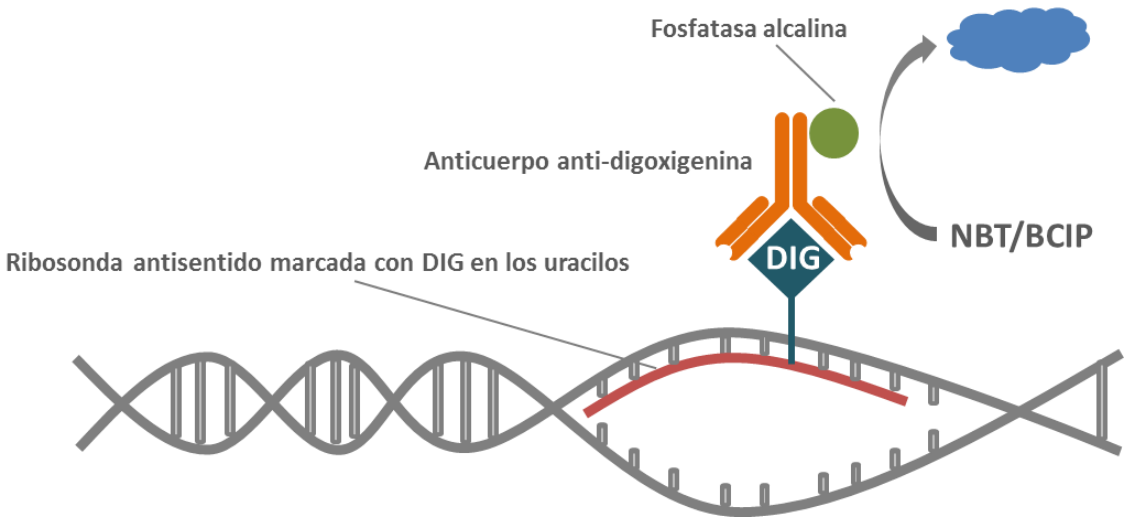



**Figura 2.2.** Representación esquemática de la unión de la ribosonda marcada con digoxigenina en los uracilos a la secuencia de ARNm que se quiere detectar. La digoxigenina es reconocida por el anticuerpo anti-DIG que está conjugado a la fosfatasa alcalina. Al añadir los sustratos NBT/BCIP en condiciones de pH básico, se forma un precipitado azul.

### 2.3.2 Hibridación *in situ* indirecta fluorescente

La necesidad de poseer un método apropiado para detectar la expresión de los neuropéptidos de interés tras los ensayos de migración (veáse cultivos organotípicos, apartado 2.5.1) propició la puesta a punto de esta técnica. Las sondas utilizadas son las mismas que en la hibridación *in situ* con fosfatasa alcalina, pero se utiliza un anticuerpo anti-digoxigenina que lleva conjugada la enzima peroxidasa (POD) en vez de fosfatasa alcalina (Anti-DIG-POD, fab fragments, Roche, Cat. No. 11207733910).

Esta técnica se basa en obtener una señal fluorescente mediante un sistema de complejos de tiramida conjugados a un fluoróforo (TSA Plus Cyanine 3 System, PerkinElmer, Cat. No. NEL744001KT). La tiramida-fluoróforo se oxida por la acción de la peroxidasa en presencia de $H_2O_2$. Los radicales libres de tiramida se unen covalentemente a los residuos de tirosina próximos a POD, dando una señal muy amplificada (Fig. 2.3).

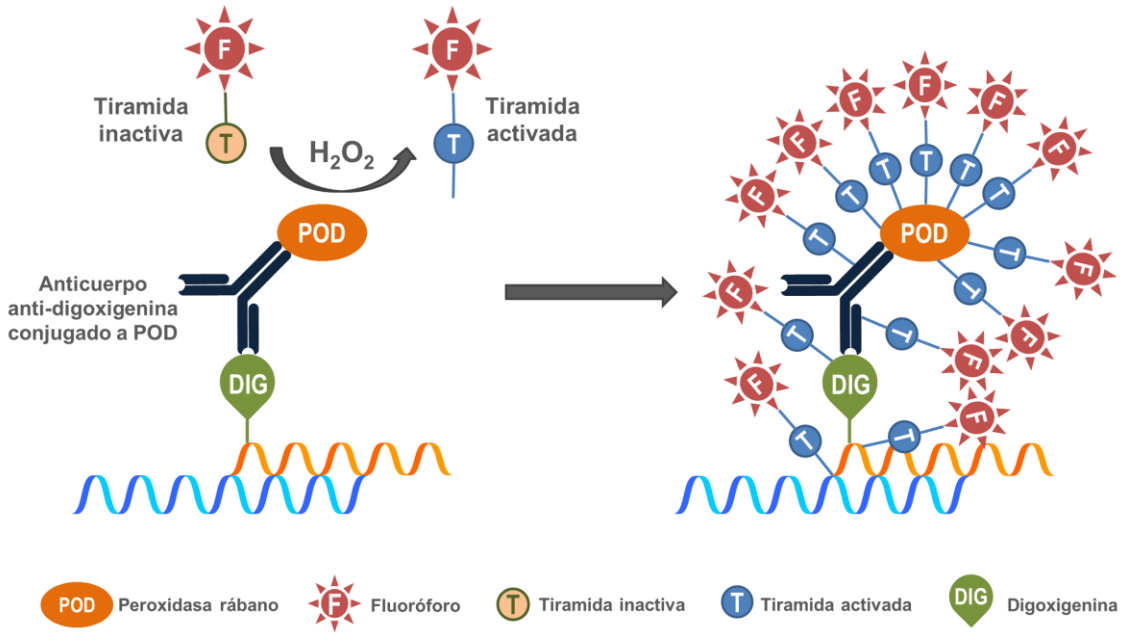



**Figura 2.3.** Representación esquemática de la obtención de señal fluorescente usando complejos de tiramida.

Puesto que el protocolo implica un anticuerpo unido a peroxidasa, hay que desactivar las peroxidasas endógenas como se hace en el protocolo de la inmunohistoquímica indirecta (veáse apartado 2.4.1). Para ello, se hace un lavado con peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) al 1% en PBS durante 10 minutos. Los restos de $H_2O_2$ se eliminan con PBS y se permeabiliza el tejido con PBST. En los casos en los que las secciones de tejido sean muy gruesas, conviene hacer una permeabilización adicional con proteinasa K (10 µg/ml). A continuación, se hace la pre-hibridación con el BH 1$^{er}$ día sin sonda a 58 ºC durante 2-4 horas. La hibridación emplea las mismas concentraciones y ribosondas conjugadas a digoxigenina que se describieron en el apartado anterior y se realiza a 58 ºC durante una noche.

Al día siguiente, se retira la sonda y se hacen lavados con SSC 0.2x pH 7.5 (Anexo I) a 58 ºC durante una hora. Para atemperar el tejido, se añade otro lavado de SSC 0.2x pH 7.5 a temperatura ambiente durante un par de minutos. A continuación se hacen lavados con una disolución TNT (Tris-HCl 0.1M, NaCl 0.15M, Tween-20 al 0.05%, Anexo I) durante 15 minutos. Para bloquear las uniones inespecíficas del

anticuerpo, se incuba con una disolución bloqueante (TNB, Anexo I) durante 3-4 horas. La incubación con el anti-DIG-POD a una concentración de 1:200 en TNB se realiza durante una noche a 4 ºC y agitación moderada.

El tercer día, se quita el anticuerpo y se lava con la disolución TNT durante media hora. Entonces, se incuba con el sistema de amplificación TSA *Plus working solution* (Anexo I) durante 10 minutos. Los restos de esta disolución se lavan con TNT y las secciones se montan con un medio de montaje hidrofílico y *antifade* (que no interfiere en la fluorescencia y evita su pérdida) (Fluoromount-G, SouthernBiotech, Cat. No. 0100-01), para su posterior análisis mediante microscopía de fluorescencia o confocal.

### 2.3.3 Obtención de ribosondas: técnicas de biología molecular

Las ribosondas monocatenarias de ARN utilizadas en las técnicas de hibridación *in situ* se sintetizaron en el laboratorio. Para ello, se partió de fragmentos de la secuencia de ADN correspondiente al gen de interés que estaban insertos en vectores plasmídicos. Estos vectores fueron clonados previamente en un huésped bacteriano competente con el fin de extraer un gran número de copias del ADN plasmídico (ADNp). Tras la linealización del inserto, se procedió a una reacción de transcripción *in vitro* para la obtención de las ribosondas propiamente dichas. A continuación se detalla cada etapa hasta la síntesis final de la ribosonda.

#### *2.3.3.1 Transformación y cultivo de bacterias competentes*

Se usaron las bacterias competentes *E. Coli* de la cepa *DH5α* (Invitrogen). Los plásmidos que se utilizaron eran comerciales y contenían en su secuencia una resistencia a antibióticos (Fig. 2.4).

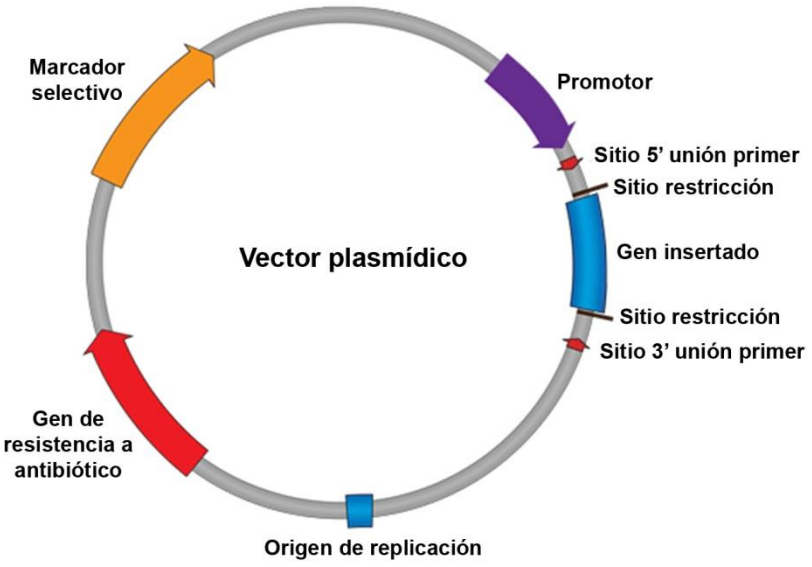



**Figura 2.4.** Esquema de un vector plasmídico.

Al mezclar las bacterias competentes con el plásmido, éstas incorporan el ADNp y en la fase de la replicación bacteriana, el ADNp se replica también, dando lugar a un gran número de copias.

Estas bacterias se encuentran a -80 ºC y se descongelan en hielo lentamente junto con el plásmido. A 20 µl de bacterias se le añade 1 µl de plásmido y se incuba durante 10 minutos en hielo. A continuación, se le da un choque térmico de 42 ºC en un *termoblock* durante un minuto. El choque térmico permeabiliza la membrana plasmática de la bacteria incorporando el plásmido en su interior. Transcurrido el minuto, se deja 2 minutos en hielo, se le añaden 300 µl de medio LB líquido enriquecido (SOC Medium, Invitrogen) y se incuban durante una hora a 37 ºC y agitación. Este volumen se vierte y se extiende con un asa de siembra en una placa de LB-Agar que contiene el antibiótico al que es resistente el plásmido. Así, únicamente crecerán en la placa de cultivo las bacterias que hayan incorporado el plásmido resistente al antibiótico. La placa se deja toda la noche a 37 ºC. Al día siguiente, las bacterias han crecido como colonias independientes en la placa. En la Tabla 2.1 se muestran los genes de interés, que se encontraban clonados en vectores plasmídicos comerciales.

| **Gen** | **Vector clonación** | **Tamaño inserto** | **Tamaño vector** | **Enzima restricción (digestión *antisense)*** | **ARN polimerasa (síntesis *antisense)*** | **Nº acceso *Genbank*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Otp*** | Pyx-Asc ($Amp^R$) | 688 pb | 1691 pb | EcoRI | T3 | NM_011021.3 |
| ***VP*** | pDNR-LIB ($Cam^R$) | 633 pb | 4160 pb | Linealizado por PCR | T3 | NM_009732.1 |
| ***OT*** | pT7T3D-PacI ($Amp^R$) | 466 pb | 2897 pb | EcoRI | T3 | NM_011025.3 |
| ***Rgs4*** | pBluescript-LION ($Amp^R$) | 474 pb | 2943 pb | Linealizado por PCR | T3 | NM_009062.3 |
| ***CRF*** | Laboratorio de Alon Chen (Weizmann Institute of Science) | | | Hind III | SP6 | NM_205769.1 |

**Tabla 2.1.** Los vectores plasmídicos con el inserto del gen de interés eran comerciales. Se muestra tanto la forma de linealización (enzimas de restricción o PCR) como la polimerasa usada para sintetizar la ribosonda *antisense*. $Amp^R$: resistente a ampicilina; $Cam^R$: resistente a cloranfenicol.

### *2.3.3.2 Extracción del plásmido*

De la placa de cultivo se selecciona una colonia de bacterias y, con una punta estéril y bajo llama, se obtiene una de ellas y se introduce en un matraz que contiene LB líquido junto con el antibiótico correspondiente. Se incuba a 37 ºC y agitación durante una noche para que crezcan las bacterias. A la mañana siguiente, se añade el volumen del matraz en tubos apropiados y se centrifugan a 6000 g y 4 ºC durante 15 minutos, quedando las bacterias como un pellet en el fondo de los tubos. Ese pellet contiene las bacterias que han incorporado el ADNp.

Para la extracción del ADNp, el pellet se trató según el protocolo de extracción de ADNp del kit comercial *QIAGEN Plasmid Midi Kit (25)*. Este kit se basa en el método de lisis alcalina de las bacterias y en la purificación del ADNp al pasar el lisado por columnas cromatográficas de intercambio iónico, cuya matriz se encuentra cargada positivamente. De esta manera, el ADN (que posee carga negativa) se queda retenido en la columna. Tras eluir el ADN mediante un tampón de elución, se añade isopropanol y se centrifuga a 15000 g y 4 ºC durante 30 minutos con el fin de precipitar el ADN. Se desecha el sobrenadante, y al pellet (que contiene el ADNp) se añaden 50 µl de agua pura (Sigma).

### *2.3.3.3 Linealización*

Para la síntesis de la sonda de ARN a partir de la secuencia de ADN complementario en el plásmido o transcripción *in vitro*, éste debe estar en forma lineal. Se usaron dos mecanismos para linealizar el plásmido: mediante enzimas (endonucleasas) de restricción y por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### *2.3.3.3.1 Enzimas de restricción*

A ambos lados del inserto del fragmento de ADN con la secuencia de interés quedan varios lugares de reconocimiento de distintas enzimas de restricción. Como sitio de corte se eligió el flanco que permitía sintetizar una sonda antisentido (opuesto al sitio de unión de la polimerasa de síntesis antisentido) y se seleccionó una enzima que no cortase dentro del inserto. Para el proceso de linealización se usó la mezcla de reacción de la tabla 2.2.

La reacción de linealización se dejó incubando a 37 ºC (ésta es la temperatura más habitual pero puede variar dependiendo de las especificaciones de la enzima de restricción) durante 2-3 horas. Para asegurarnos que se había linealizado, se corrieron electroforéticamente 1 µl del producto de reacción (lineal) y 1 µl de ADN circular (control) en un gel de agararosa al 1.2 % (MS-8; Pronadisa, Cat. No. 8065) con 15 µl

de SYBR *safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Cat. No. 10328162) en tampón TAE 1X (Anexo I) a un voltaje constante de 90 V durante 15 minutos. El plásmido circular corre mucho más que el lineal debido a su enrollamiento, por lo que la banda del lineal debe estar más atrasada que la del circular.

| Producto / Reactivo | Volumen | |
|---|---|---|
| Enzima restricción | 1.5 µl | |
| Tampón de la enzima 10X | 10 µl | |
| DNAp (circular, Midiprep) | Variable (~ 1 µg) | |
| BSA | 2 µl | **Para algunas enzimas** |
| Triton X-100 | 2 µl | |
| Agua pura (Sigma) | Variable (hasta completar 20 µl) | |
| **Volumen final** | **20 µl** | |

**Tabla 2.2.** Mezcla de reacción para linealizar el ADN plasmídico mediante enzimas de restricción.

*2.3.3.3.2 PCR*

Los vectores que contienen la secuencia de interés para obtener la ribosonda suelen tener a ambos lados del inserto la región de reconocimiento para las polimerasas T7, SP6 o T3. A la hora de amplificar el inserto por PCR, se usaron cebadores (secuencias sintéticas cortas de oligonucléotidos tipo ARN) que reconocen los sitios de unión a polimerasas y amplifican las secuencias objetivo a las que son complementarias. En este caso, se usaron cebadores diseñados para reconocer directamente las secuencias T7 y T3 y un par de nucleótidos extra que garantizan que las polimerasas puedan unirse a ese sitio tras la amplificación. Las secuencias de los cebadores (primers) para T7 y T3 son las siguientes:

Primer T7 5'-CGTAATACGACTCACTATAGGGCGA-3'
Primer T3 5'-GCAATTAACCCTCACTAAAGGGAAC-3'

Tanto la mezcla de reacción usada como el programa del termociclador se detallan en las tablas 2.3 y 2.4, respectivamente. El resultado final fue tanto la linealización del ADNp como la amplificación del mismo. La reacción de PCR consiste en: un paso inicial de desnaturalización para deshacer posibles estructuras cuaternarias; varias etapas sucesivas de desnaturalización del ADN molde, unión de los cebadores al ADN

y síntesis de la hebra complementaria por la ADN polimerasa que se repiten de 30-40 ciclos; una polimerización final en la que se añaden adeninas a los extremos de las copias generadas; y un paso de conservación en el que las muestras se mantienen a 4ºC hasta su análisis. En este caso también se corre un gel de electroforesis.

| Producto / Reactivo | Volumen |
|---|---|
| Polimerasa (FastStart PCR Master) | 12.5 µl |
| Primer 1 (10 pmol/l) | 2.5 µl |
| Primer 2 (10 pmol/l) | 2.5 µl |
| ADNp (Midiprep) | 2.5 µl |
| Agua (Sigma) | 5 µl |
| **Volumen final** | **25 µl** |

**Tabla 2.3.** Mezcla de reacción de la PCR.

| Programa termociclador | | |
|---|---|---|
| **Ciclos** | **Temperatura** | **Tiempo** |
| 1 x | 94 ºC | 5 minutos |
| 38 x | 94 ºC<br>60 ºC<br>72 ºC | 30 segundos<br>30 segundos<br>X minutos* |
| 1 x | 72 ºC | 20 minutos |
| 1 x | 4 ºC | ∞ |

* 1 minuto por cada 1000 pb

**Tabla 2.4.** Programa termociclador para la PCR.

Tras linealizar el ADNp se procedió a su purificación usando el protocolo del kit comercial QIAquick PCR Purification kit (50) (QIAGEN). La base del kit para la purificación del ADN es un sistema de columnas cromatográficas donde queda anclado el ADN. De esta forma, con un procedimiento rápido y sencillo de lavado y elución, se obtiene el producto purificado (ADN lineal purificado).

#### *2.3.3.4 Síntesis de ribosondas*

La síntesis de la sonda es una reacción de transcripción *in vitro*, donde la hebra monocatenaria de ARN es sintetizada por una ARN polimerasa a partir de una secuencia de ADN molde (ADNp linealizado purificado) y en presencia de

desoxinucleótidos marcados (dNTPs). El transcrito antisentido o *antisense* de ARN obtenido hibridará con el ARNm del tejido que queremos estudiar debido a que posee una secuencia complementaria a éste. La visualización de la reacción de hibridación *in situ* se producirá gracias a que el desoxinucleótido uracilo (UTP) de la ribosonda está marcado con digoxigenina (proteína de origen vegetal). Por el contrario, la secuencia de la sonda *sense* es idéntica al ARNm que estamos buscando y, por tanto, no hibridará con él y se usará como control negativo.

Una vez seleccionada la polimerasa para sintetizar la hebra *antisense*, se hizo la mezcla de reacción (Tabla 2.5) según el protocolo de síntesis de la casa comercial Roche. Dicha mezcla se incubó durante 2 horas (para T3 y T7) a 37 ºC en un *termoblock*.

| Producto / Reactivo | Volumen |
|---|---|
| ADNp lineal purificado | Variable (1 µg) |
| dNTPs 10X | 2 µl (Roche, DIG RNA labeling mix) |
| Tampón transcripción 10X | 2 µl (Roche, específico de cada polimerasa) |
| ARN Polimerasa | 2 µl (Roche, T3 y T7) |
| Inhibidor de ARNasa | 0.5 µl (Roche) |
| Agua (Sigma) | Variable (hasta completar 20 µl) |
| **Volumen final** | **20 µl** |

**Tabla 2.5.** Mezcla para la reacción de síntesis de la ribosonda.

Tras comprobar con un gel de agarosa al 1.2% que la síntesis había tenido lugar, se añadieron 100 µl de TE (Tris 10 mM + EDTA 1mM), 5 µl de LiCl 8M (Sigma, Cat. No. L7026) y 300 µl de etanol absoluto a 4 ºC (Serva, Cat. No. 11093). La mezcla se dejó a -20 ºC durante 30 minutos como mínimo. A continuación, se procedió a su purificación. Se centrifugó a 14000 g y 4 ºC durante 30 minutos. El pellet se lavó con 200 µl de etanol al 70% a 4 ºC. Se centrifugó a 14000 g y 4 ºC durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet, que es donde se encuentra la sonda purificada. Finalmente, se resuspendió con 20 µl de agua (Sigma, Cat. No. W4502), y se le añadieron 20 µl de formamida molecular (Sigma, Cat. No. F9037) para una mejor conservación a -20 ºC.

## 2.4 TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Estás técnicas permiten detectar y localizar proteínas en tejidos y células mediante un anticuerpo diseñado contra algún epítopo de la proteína de interés. Así se determina dónde y cuándo se expresa el gen a estudiar. Debido a los distintos niveles de regulación desde el ARNm a la proteína, la presencia del ARNm no significa que esté siendo traducido a proteína. El tiempo de fijación del tejido para la inmunohistoquímica fue inferior que el usado para la técnica de hibridación *in situ*, debido a que la fijación enmascara los epítopos (véase método de recuperación del antígeno, apartado 2.4.2).

### 2.4.1 Inmunohistoquímica simple indirecta con el método ABC

El método avidina-biotina-peroxidasa (ABC) es una técnica indirecta que amplifica la señal del anticuerpo secundario ya que la avidina tiene cuatro sitios de unión a la biotina, creándose grandes complejos que contienen múltiples moléculas de biotina conjugada a peroxidasa. Tras el reconocimiento del antígeno por un anticuerpo primario, se expone el tejido a un anticuerpo segundario hecho contra la especie del primario y conjugado a la biotina. De este modo, la biotina puede ser detectada a través del complejo preformado ABC. La peroxidasa, en presencia de $H_2O_2$ (sustrato) y de la diaminobencidina (DAB), oxida a ésta última formándose un precipitado insoluble de color marrón que se puede observar a simple vista (Fig. 2.5).

Las secciones de tejido fijado recogidas en PBS se sometieron previamente a la desactivación de la peroxidasa endógena mediante un lavado con $H_2O_2$ al 1% en PBS 0.1M (PBS) durante 10 minutos. A continuación, tras desechar los restos de $H_2O_2$ con lavados en PBS, se permeabilizó el tejido con PBS-Tritón X-100 (PBS-Tx; Triton X-100, Sigma, Cat. No. T8787) al 0.2% y se incubó con una disolución del anticuerpo primario a la concentración correspondiente (tabla 2.6) en PBS-Tx 0.2% y NGS (*normal goat serum*, Vector, Cat. No. S-1000) al 10 % durante tres días a 4 ºC y agitación. Una vez incubado el anticuerpo primario, se retiró y se lavó el tejido con PBS-Tx 0.2% para eliminar restos del anticuerpo y proceder, seguidamente, a la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado a una concentración de 1:200 en PBS-Tx 0.2% (tabla 2.6) durante una hora y media a temperatura ambiente y agitación moderada. Después de lavar las secciones, se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC elite, Vector, Cat. No. PK-6100) al 0.003% durante una hora a temperatura ambiente y agitación suave.

Tras una serie de lavados con PBS-Tx 0.2% y tampón Tris 0.05M, se realizó el revelado con DAB y $H_2O_2$. En algunos casos el revelado se llevó a cabo mediante la

técnica con DAB intensificada con níquel, con la cual se añade sulfato amónico de niquel al 4% a la disolución de DAB produciéndose un precipitado negro-azulado.

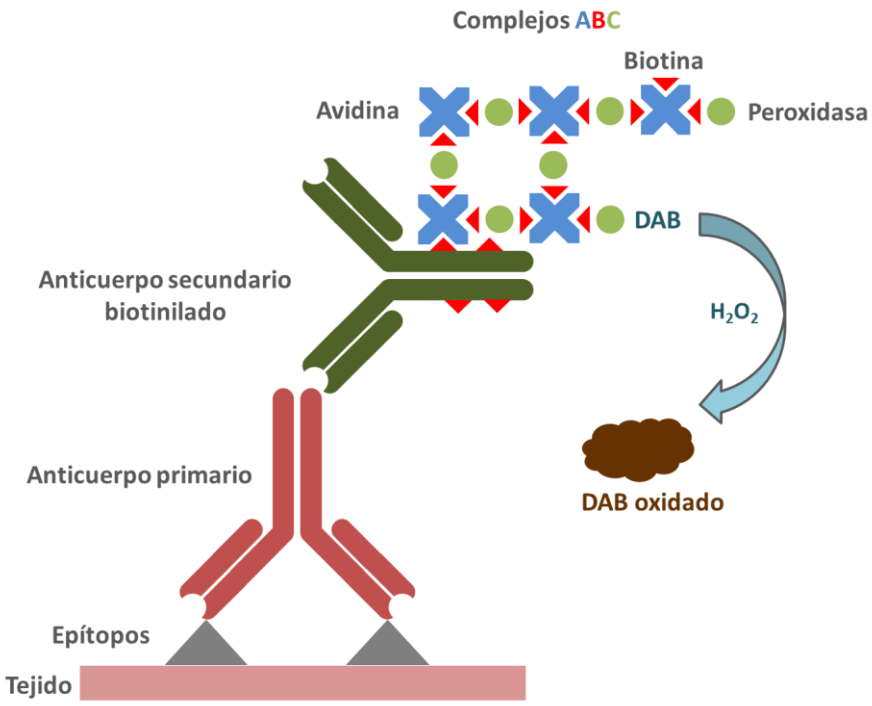



**Figura 2.5**. Representación del método ABC en una inmunohistoquímica indirecta.

| Anticuerpo primario | Especie huesped | Mono- o policlonal | Dilución | Anticuerpo secundario |
|---|---|---|---|---|
| Anti-VP (Millipore, Cat. No. AB1565) | Conejo | Policlonal | 1:5000 | Anti-conejo (Biotinylated goat anti-rabbit IgG, Vector, BA-1000) |
| Anti-OTP (Antibodies-online, Cat. No. ABIN183823) | Conejo | Policlonal | 1:1000 | Anti-conejo (Biotinylated goat anti-rabbit IgG, Vector, BA-1000) |
| Anti-Marcador glía radial / Nestina (Developmental Hybridoma bank, Cat. No. RC2) | Ratón | Monoclonal | 1:100 | Anti-ratón (Biotinylated goat anti-mouse IgM, Vector, BA-2020) |
| Anti-ISLET 1/2 (Developmental Hybridoma bank, Cat. No. 39.4D5) | Ratón | Monoclonal | 1:200 | Anti-ratón (Biotinylated goat anti-mouse IgG, Vector, BA-9200) |

**Tabla 2.6.** Anticuerpos primarios y secundarios usados en la inmunohistoquímica indirecta.

### 2.4.2 Método de recuperación del antígeno (*antigen retrieval*)

Esta técnica se utilizó en los casos en los que los epítopos que reconoce el anticuerpo estaban muy enmascarados debido al proceso de fijación. Para ello, se utilizó una disolución AR (Anexo I) basada en tampón citrato y con un pH ligeramente ácido (Fig. 2.6). Dicha disolución se calentó a 80 ºC. A continuación, se añadió al tejido y se incubó con ella durante 20 minutos a 80 ºC. Los cortes se lavaron con PBS a temperatura ambiente para quitar los restos de la disolución AR. A partir de aquí, se continuó con el protocolo de inmunohistoquímica habitual. Este método se utilizó para el anticuerpo Islet 1/2, obteniéndose un marcaje más definido.

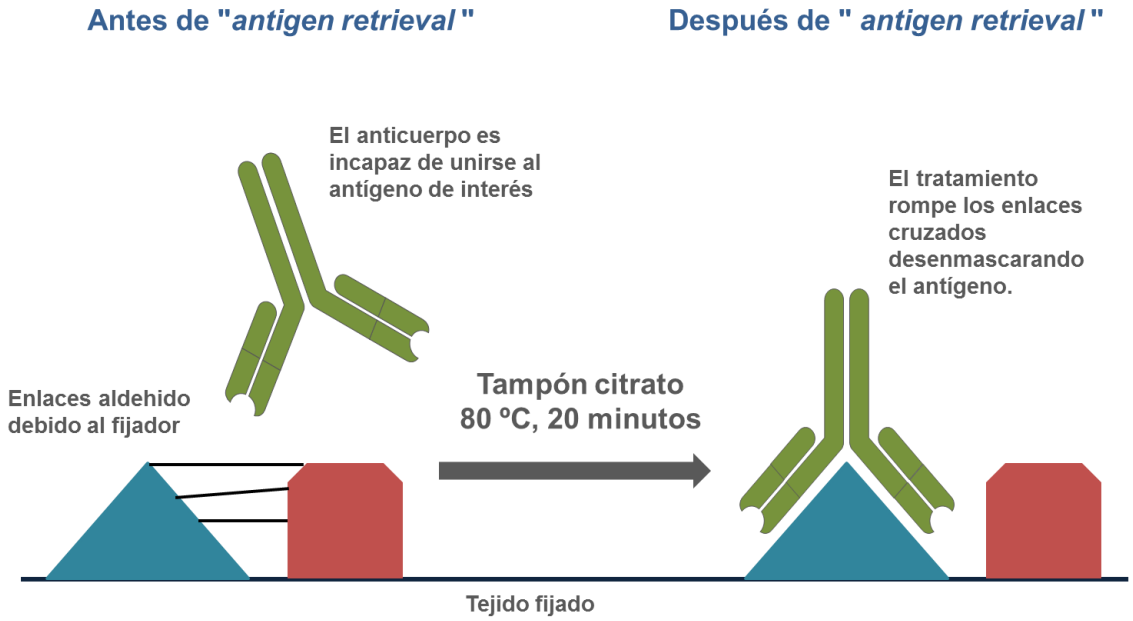



**Figura 2.6.** Visualización simplificada del método *antigen retrieval*.

### 2.4.3 Simple y doble inmunofluorescencia indirecta

Esta técnica se realizó para secciones flotantes de vibratomo y en secciones de criostato en portaobjetos. La técnica utiliza los mismos anticuerpos primarios que para la inmunohistoquímica indirecta de la peroxidasa pero el secundario es fluorescente. En este caso la detección de la proteína se realiza mediante excitación del fluoróforo del anticuerpo secundario utilizando un microscopio confocal.

Para la inmunofluorescencia simple, las secciones de tejido se lavaron con PBS-Tx 0.3% y se incubó el anticuerpo primario diluido en este mismo tampón (concentración en tabla 2.6) a 4 ºC durante tres días consecutivos y agitación moderada.

Una vez incubado, se retiró el anticuerpo primario lavando con PBS-Tx 0.3% durante una hora y media. Después, se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 2.7) durante dos horas a temperatura ambiente, agitación moderada y oscuridad.

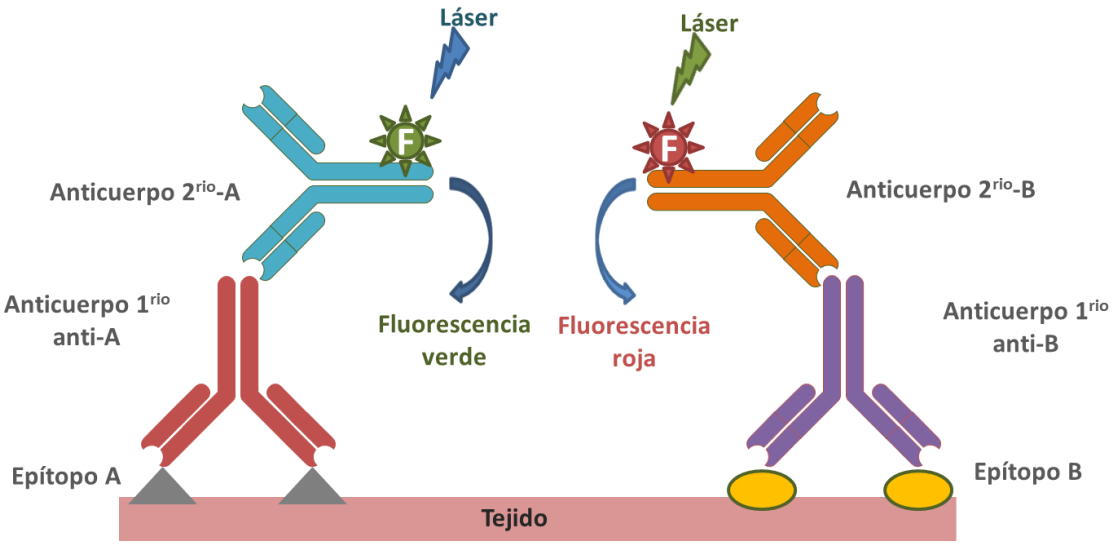



**Figura 2.7.** Representación de una doble inmunofluorescencia indirecta. El láser azul se utiliza para la excitación del fluoróforo que dará lugar a la fluorescencia verde, mientras que con el láser verde se obtendrá la fluorescencia roja.

En el caso de la doble inmunofluorescencia (Fig. 2.7), el procedimiento fue idéntico, incubando los dos anticuerpos primarios a la vez, y los dos secundarios también. Esta técnica se puede realizar siempre y cuando la especie de la que se obtienen los anticuerpos primarios sea diferente.

Finalmente, se lavó con PBS-Tx 0.3% y las secciones se montaron utilizando un medio de montaje *antifade*.

| ANTICUERPOS SECUNDARIOS FLUORESCENTES | | | |
|---|---|---|---|
| **ANTICUERPO** | **ESPECIE HUÉSPED** | **DILUCIÓN** | **REFERENCIA** |
| Anti-conejo IgG conjugado a Alexa fluor 488 | Cabra | 1:500 | Molecular probes, Cat. No. A-11034 |
| Anti-ratón IgG conjugado a Cy3 | Burro | 1:1000 | Jackson Immnunoresearch, Cat. No. 715165151 |

**Tabla 2.7**. Anticuerpos secundarios usados en la inmunofluorescencia indirecta.

### 2.4.4 Triple inmunohistoquímica: doble inmunofluorescencia indirecta combinada con inmunohistoquímica simple indirecta

La técnica se utilizó para la detección fluorescente de Otp y Islet1 junto con el marcador de glía radial revelado con DAB-niquel. El fundamento de la doble inmunofluorescencia y de la inmunohistoquímica simple indirecta es el mismo que el explicado en los apartados anteriores. Para llevar a cabo esta triple inmunohistoquímica se añadieron los tres anticuerpos primarios al mismo tiempo. Tras quitar los restos de los anticuerpos primarios, se incubaron los tres anticuerpos secundarios a la vez. Se continuó con el protocolo de inmunohistoquímica indirecta hasta que se reveló la glía radial. El revelado de los anticuerpos secundarios fluorescentes se realizó por excitación con los láseres correspondientes.

## 2.5 ENSAYOS DE MIGRACIÓN

Durante el desarrollo del sistema nervioso se produce un hecho inherente a la naturaleza neural: la migración. Las neuronas migran largas distancias desde sus lugares de origen hasta que se asientan en sus posiciones finales y establecen conexiones con otras células.

Los ensayos de migración surgen como herramienta para visualizar dichas migraciones, mediante aproximaciones anatómicas y moleculares. Permiten estudiar el movimiento neuronal y su localización usando un trazador celular fluorescente. Posteriormente, se estudia el fenotipo de las neuronas migradas con técnicas de inmunofluorescencia o hibridación *in situ* fluorescente.

### 2.5.1 Cultivos organotípicos

Estos cultivos se realizaron en cerebros embrionarios y se utilizaron partículas de tungsteno impregnadas con un trazador celular fluorescente (CellTracker™ Green CMFDA Dye, Molecular probes, Cat. No. C2925) que inicialmente es permeable a la membrana celular pero una vez en el interior se vuelve impermeable, permitiendo visualizar la migración neuronal (Fig. 2.8).

En este caso, los cerebros se procesaron frescos sin fijar y se incluyeron en agarosa (LOW EEO, Conda) al 4% en una disolución de glucosa y sales (suero glucosado, Anexo I) que mantuvo el tejido vivo. Se cortó en secciones de 300 µm con un vibratomo, se recogieron en una placa de seis pocillos que contenía suero glucosado frío y se incubaron en medio DMEM enriquecido (Anexo I) durante una hora en una cámara de $CO_2$ (5% de $CO_2$ y a 37 ºC). A continuación, se pinchó en el domino SPV el trazador celular CMFDA con un capilar y se cambió el medio DMEM por NEUROBASAL enriquecido (Anexo I), manteniendo la placa en la cámara de $CO_2$ a

37 ºC durante 48 horas. El medio NEUROBASAL se cambió por medio nuevo a las 24 horas. Transcurrido este tiempo, el cultivo se paró vertiendo sobre el tejido PFA al 4% tamponado y las secciones se dejaron en PBS-azida 01% para evitar su contaminación a la espera de su análisis con microscopía confocal.

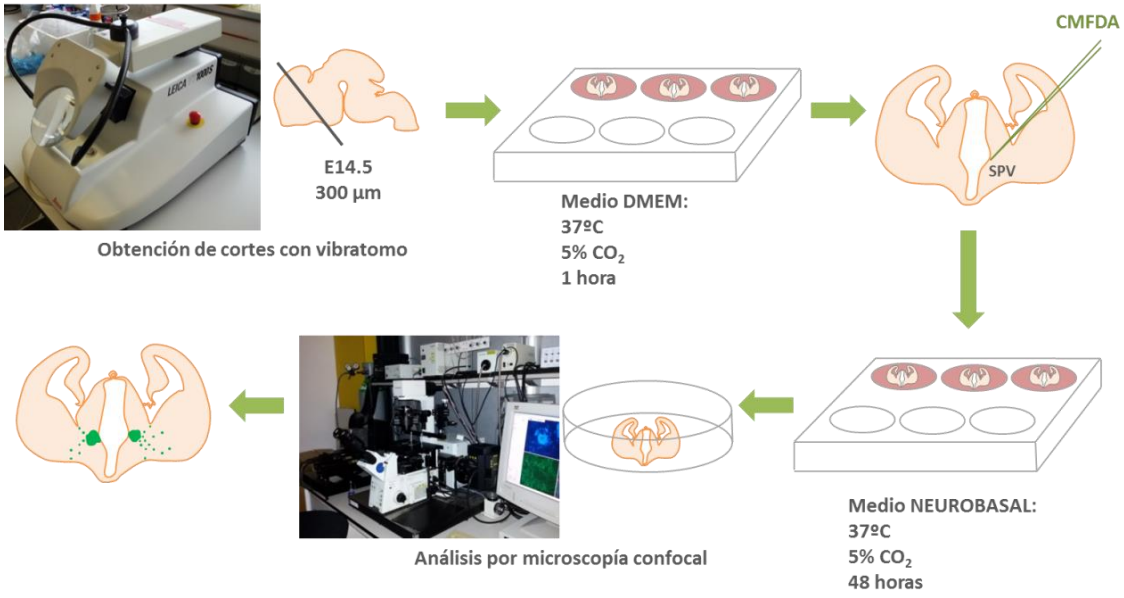



**Figura 2.8.** Representación esquemática del proceso de los cultivos organotípicos.

Tras el análisis, se seleccionaron aquellos donde fuera evidente la migración para estudiar el fenotipo de las neuronas migradas sometiéndolos a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos contra los neuropéptidos de interés o bien a hibridación *in situ* fluorescente usando ribosondas que reconocen el ARNm de los neuropéptidos.

Los medios usado en estos ensayos, DMEM y NEUROBASAL, se enriquecieron con glutamina, una mezcla de antibióticos (penicilina / estreptomicina) y suero bovino fetal inactivado térmicamente (56 ºC durante 30 minutos). Al NEUROBASAL, además, se le añadió un suplemento B-27 (Gibco) que respalda la viabilidad de las neuronas del sistema nervioso central. La sustitución del medio DMEM por NEUROBASAL se debe a que este último permite el mantenimiento de las células neuronales embrionarias tanto a corto como a largo plazo.

### 2.5.2 Recuperación de la fluorescencia

La pérdida de la fluorescencia del trazador celular tras realizar la hibridación *in situ* sobre los cortes de cultivos organotípicos hizo necesaria la puesta a punto de esta técnica.

Puesto que el trazador celular CMFDA es un derivado de la fluoresceína, se usó un anticuerpo contra fluoresceína con el fin de reconocer el CMFDA, aportándole de nuevo fluorescencia. Se realizó una inmunfluorescencia indirecta tras realizar la hibridación *in situ* usando el anticuerpo RB-antifluoresceína-alexa 488 (Molecular probes, Cat. No. A11090) a una concentración 1:500. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo-Alexa 488 (tabla 2.7). El resultado fue la recuperación de una parte de la fluorescencia perdida.

## 2.6 ANÁLISIS Y ADQUISICIÓN DE DATOS

### 2.6.1 Microscopía de campo claro

Este tipo de microscopía se ha utilizado en los casos de hibridación *in situ* que usa la fosfatasa alcalina y el sistema NBT/BCIP para el revelado y en la inmunohistoquímica con DAB. En estos casos, las secciones se montaron en portas y se cubrieron con cubreobjetos usando un medio de montaje hidrofílico (Glycerol gelatin, Sigma, Cat. No. GG1) para su posterior fotografiado con un microscopio de campo claro (Leica [DMR HC] equipado con una cámara digital *Zeiss Axiovision* y el programa de captura de imágenes ZEN de Zeiss).

### 2.6.2 Microscopía confocal

Las imágenes del material fluorescente se tomaron con un microscopio confocal (Olympus FV500). En el caso de las secciones sometidas a inmunofluorescencia e hibridación *in situ* fluorescente, se montaron en un portaobjetos usando un medio de montaje hidrofílico y *antifade*. Las secciones de tejido sometidas a cultivos organotípicos se colocaron sin montar en una pequeña placa con base de vidrio con unas gotas de PBS.

Este tipo de microscopía permite un barrido muy amplio en el eje Z, lo cual nos resulta muy útil debido al grosor de nuestros cortes.

### 2.6.3 Tratamiento de imagen

Tras la obtención de las imágenes, éstas se modificaron ligeramente para incrementar el foco, el brillo y el contraste el programa informático *Adobe PhotoShop CS6*.

El montaje de las figuras con las imágenes de interés y su etiquetado se realizó con *Adobe Illustrator CS6*.

# 3. Resultados

# 3. RESULTADOS

A continuación se exponen los principales resultados de este trabajo de investigación organizados en tres apartados o secciones. En la primera sección se caracteriza el dominio supraopto-paraventricular (SPV) en etapas tempranas del desarrollo embrionario y se estudian los posibles derivados de sus subdivisiones terminal y peduncular. En la segunda sección se detalla la ontogenia de las células VP y OT desde estadios embrionarios a etapas postnatales tempranas, con especial referencia a su posición en relación a los prosómeros terminal y peduncular. El tercer y último apartado muestra las rutas de migración desde el SPVt y SPVp, resultado de los ensayos de migración y el fenotipo vasopresinérgico de algunas de las células migradas.

Dado que en ratones adultos varios núcleos hipotalámicos, preópticos y amigdalinos son sexualmente dimórficos, se sexaron los ejemplares y se analizaron los resultados considerando el sexo como variable. En las edades estudiadas no observamos diferencias sexuales ni en la distribución de la expresión de los genes estudiados, ni en el momento en que comienzan a expresarse. Por ello, todos los resultados se refieren a los dos sexos sin hacer distinción.

En los anexos se detallan los datos de los ejemplares utilizados en este trabajo (Anexo II) y se incluyen también algunas figuras complementarias comparando la expresión de VP y OT (mediante hibridación *in situ*) en machos y hembras en estadios embrionarios E16.5 y E18.5 (Anexo III).

## 3.1 EL DOMINIO SPV Y SUS SUBDIVISIONES TERMINAL Y PEDUNCULAR

### 3.1.1 Extensión radial y límites del dominio SPV en estadios tempranos

El dominio SPV es una división del hipotálamo alar que, según el modelo prosomérico actualizado (Morales-Delgado *et al*. 2014; Puelles y Rubenstein 2015), se subdivide en una parte rostral, denominada dominio paraventricular terminal (TPa o SPVt) y una parte caudal, el dominio paraventricular peduncular (PPa o SPVp). El modelo postula que cada una daría origen a poblaciones celulares diferentes. El dominio entero está caracterizado por la expresión del factor de transcripción Otp, implicado en proliferación y diferenciación celular (Acampora *et al*. 2000), incluyendo la de las neuronas con VP y OT de los núcleos PVN y SO del hipotálamo (Wang y Lufkin 2000; Acampora *et al*. 2000). Sin embargo, se han descrito células con Otp y neuronas con VP y OT fuera del dominio, y no queda claro si éstas se originan dentro o fuera del SPV.

Con el fin de definir mejor los límites del dominio SPV e intentar discriminar entre la posible dispersión de las células con Otp desde el SPV y/o un origen múltiple en distintos dominios, se realizó un análisis espacio-temporal de la expresión de los factores de transcripción Otp y Islet1 en comparación con un marcador de glía radial (RC2). Islet1 se expresa en los dominios adyacentes al SPV (dorsal, ventral y caudalmente), utilizándose en este estudio como delimitador del dominio SPV. Así, se analizó el patrón de expresión de estos marcadores desde el estadio E9.5 al E14.5.

En E9.5 no se detecta expresión de Otp. En este estadio, Islet1 aparece muy restringido en el manto del dominio quiasmático o subparaventricular (Ch/SPa) y el preóptico (PO). En esta edad y más tarde, el SPV aparece como un dominio negativo para Islet1, intercalado entre los dominios Ch/SPa y PO (Fig. 3.1A).

En E10.5, aparecen las primeras células Otp en el manto del dominio SPV (Fig. 3.1B,C) y en el tallo óptico (Fig. 3.1D). Este dominio queda delimitado por Islet1, que se expresa en los dominios PO (dorsalmente), Ch/SPa (ventralmente), y pretalámico (en el prosómero 3 o p3, caudalmente) (Fig. 3.1A-C). Caudalmente, una parte dorsal del SPV se relaciona además con la eminencia pretalámica (también en el p3), que no expresa Islet1 y está situada dorsalmente al pretálamo (Fig. 3.1B). A esta edad, las células Otp no se encuentran totalmente restringidas a su dominio radial. Así, el principal grupo de células Otp se encuentra restringido al SPV (Fig. 3.1B,C) y a su extensión en el tallo óptico (Fig. 3.1D), pero en los cortes más caudoventrales - cuando se pasa directamente del pretálamo (en p3) al Ch/SPa - se observan algunas células con Otp que se entremezclan con las células Islet1 (Fig. 3.1D). En base a su proximidad a p3 (en el límite caudal), parece que la mayor parte de las células Otp se encuentran en la subdivisión peduncular del SPV, mientras que las que se entremezclan con Islet1 estarían en el dominio quiasmático peduncular (Chp/PSPa). Además, contrariamente a la suposición de que el pedículo óptico se extiende desde la subdivisión terminal, nuestros datos sugieren que podría tener una parte terminal y otra peduncular (esta última con muchas más células Otp) (ver los insertos de la Fig. 3.1).

A partir de E11.5 se observan muchas más células con Otp, tanto en la parte peduncular como en la terminal, aunque el límite entre ambas partes es incierto y no se puede definir sólo con Otp (Fig. 3.2A-C). El SPVt aparece en cortes más rostrodorsales, en continuidad con PO (Fig. 3.2A), mientras que el SPVp aparece en cortes más caudoventrales en continuidad con la parte evaginada y caudal del telencéfalo donde se encuentra el primordio de la amígdala (Fig. 3.2C) y, más caudoventralmente, está en relación con p3 (ver también la comparación entre Otp y Islet1 en cortes adyacentes en E12.5 en la figura 3.3). En E11.5 y E12.5, la mayor

parte de las células con Otp se encuentran segregadas de Islet1 en SPVt y SPVp. Sin embargo, se observa una importante mezcla de ambos tipos celulares en el dominio PO (Fig. 3.2A,B). El análisis de doble marcaje usando inmunofluorescencia indica que Otp y Islet1 no colocalizan y se encuentran totalmente segregados en células distintas, aunque entremezcladas en PO (Fig. 3.2A,B).

Para poder comprender mejor la dimensión radial del SPV y la posición de las células Otp con respecto a dicha dimensión, se comparó la expresión de Otp con la glía radial en E12.5, tanto en cortes adyacentes (Figs. 3.4; 3.5) como en secciones con triple marcaje de Otp, Islet1 y RC2 (un marcador de glía radial) (Fig. 3.6). Este tipo de análisis sugiere que los grupos más compactos de células Otp se encuentran en el manto de los dominios radiales del SPVt y el SPVp (ocupando una extensión radial más amplia, desde posiciones periventriculares hasta la superficie, en SPVp), desde los cuales podría haber una dispersión tangencial de células Otp. Por un lado, esta supuesta dispersión tangencial de células Otp es evidente en los cortes más rostrodorsales, extendiéndose desde SPVt a PO (Fig. 3.4A,B). Durante el desarrollo, esta aparente dispersión de células Otp desde el SPVt al PO va en aumento, entremezclándose en PO con células Islet1 sin llegar a colocalizar (Figs. 3.3A; 3.4A; 3.7A-D).

Por otro lado, en cortes más caudoventrales se observa una aparente dispersión de células Otp desde el dominio SPVp que alcanzan el territorio prospectivo de la amígdala extendida (Figs. 3.3C,E; 3.4C,E; 3.5A). Una parte importante de estas células se sitúan en el BSTM, concretamente en una subdivisión situada alrededor de la comunicación interventricular de Monro (Figs. 3.3C; 3.4C; E3.7). Esta subdivisión del BSTM podría localizarse en el aspecto más dorsal del SPVp (por ello lo hemos llamado BSTM hipotalámico o BSTMh), una subdivisión que se deforma dorsalmente formando una espiga que toca el telencéfalo según el modelo prosomérico (Puelles y Rubenstein 2003, 2015; Morales-Delgado *et al*. 2014; Ferrán *et al*. 2015). No obstante, debido a la deformación, la organización de las células y la disposición de la glía radial en esta zona son poco claras y difíciles de interpretar (Figs. 3.4C-E; 3.5A,B). Otro grupo de células Otp en continuidad con las del SPVp se extienden en el telencéfalo, incluyendo otras partes palido-preópticas del BSTM (Fig. 3.6A',A'') y la amígdala medial; en esta últimas las células Otp quedan segregadas de un grupo de células con Islet1 relacionado con la amígdala central (Figs. 3.3G,H; 3.4E; 3.6B,B',B''), que proceden del dominio estriatal ventral (Bupesh *et al*. 2011b).

Además de la aparente dispersión de células dorsalmente hacia el telencéfalo, parece existir una dispersión ventral de células Otp. Entre éstas, existe un grupo particularmente importante de células que parecen ocupar el dominio Ch/SPa (flechas

en Figs. 3.3C,E; 3.4C). Este dominio tiene una gran cantidad de células Islet1, pero éstas ocupan una posición medial con respecto a las células Otp (Fig. 3.3D,H). Por ello, a este grupo de células Otp situadas en la parte superficial del dominio Ch/SPa le hemos llamado núcleo quiasmático superficial (SuC), y estaría situado en la parte terminal del dominio (Figs. 3.3E; 3.4C). En niveles pedunculares del dominio, también se observan células Otp (Figs. 3.3G; 3.4E), que podrían resultar de una dispersión desde el SPV peduncular.

En E13.5 el patrón de expresión de Otp es bastante similar al de E12.5, aunque parece aumentar la densidad de las células Otp tanto en los dominios radiales SPVt y SPVp, como en las que se entremezclan con Islet1 en el PO (Fig. 3.7C,D). Algunas células Otp también parecen alcanzar el PO comisural (POC), que tiene menos células con Islet1 con respecto al PO ventral (POv) (Fig. 3.7C,D y datos obtenidos de dobles marcajes Otp-Islet no mostrados). La comparación con la glía radial apoya la supuesta dispersión tangencial de las células Otp que pueblan tanto el POv como el POC (Fig. 3.8A-D).

En E13.5, también se encuentran muchas células con Otp en el BSTMh (en la parte dorsal del SPVp), pero además se observan subpoblaciones de células que alcanzan partes más laterales de la amígdala medial extendida, incluyendo partes laterales del BSTM y la amígdala medial (Figs. 3.7E,G; 3.8E,G; 3.9). Como en edades anteriores, mientras las células Otp y Islet1 se entremezclan en PO (pero sin llegar a colocalizar), ambos tipos celulares permanecen principalmente segregados a nivel del BSTM y la amígdala medial (Fig. 3.9).

Además, en E13.5 existe un contingente importante de células Otp que parecen dispersarse ventralmente hacia el Ch/SPa (Figs. 3.7E,G; 3.8E,G); como anteriormente, en el Ch/SPa las células con Otp aparecen más próximas a la superficie y segregadas de las células Islet1 de dicho dominio (Figs. 3.7F; 3.9B), constituyendo el núcleo SuC (Fig. 3.7E). Algunas de estas células Otp parecen contribuir al SO tuberal, situado más ventralmente aún, ya en la placa basal (Fig. 3.7G; véase sección 3.2). Otras células Otp parecen estar situadas en el dominio Ch/SPa a nivel peduncular (Fig. 3.7G).

En E14.5, se puede apreciar mejor la localización precisa de las células Otp al estar más desarrollado el manto y distinguirse diferentes estratos, desde zonas próximas al ventrículo hasta la superficie. A nivel terminal, un aspecto novedoso es que por primera vez Otp se extiende desde la zona periventricular a la superficie radial del SPVt (Fig. 3.10A). En el PO, sigue existiendo mucha mezcla de células con Otp o con Islet1 (particularmente, en la parte ventral del PO, adyacente al SPVt), pero ahora se aprecian varios estratos intercalándose unos donde predominan más las células Otp (por ejemplo a nivel periventricular) con otros donde predominan las células Islet1

(Figs. 3.10A; 3.11A,A',C'). A nivel peduncular, se hace más evidente el BSTMh dentro del dominio radial del SPVp, mostrándose como un corredor rico en células Otp muy empaquetadas (Fig. 3.10C,D). Aparentemente, este BSTMh apenas tiene células Islet1 (Fig. 3.11B'), marcador expresado en los dominios adyacentes al SPV. Una subdivisión del BSTMh se convierte en el BST supracapsular (BSTS; Fig. 3.10E).

Además, al hacer la comparación con la glía radial a esta edad, algunas células Otp parecen dispersarse tangencialmente, llegando a otras divisiones más laterales del BSTM y otras partes de la amígdala medial extendida (Figs. 3.10A,C; 3.11A'), incluyendo la amígdala medial o Me (Fig. 3.10E). En cortes más caudoventrales, se aprecia el SPVp en su extensión radial (Fig. 3.10E,F), con la mayor parte de las células en el área periventricular y muchas alcanzando la superficie. Algunas de las que llegan a la superficie parecen formar parte del primordio del SO principal.

Por otro lado, en esta edad se continua observando una aparente dispersión ventral de un grupo denso de células Otp hacia el Ch/SPa (el SuC), que parecen ser continuas con otras más ventralmente, en el SO tuberal (Fig. 3.10E; véase sección 3.2). Además de éstas, se observan también unas pocas células Otp en posición periventricular, que podrían alcanzar esta posición mediante migración tangencial. Además, otro grupo reducido de células Otp parecen dispersarse periventricularmente hacia territorio pretalámico (Fig.3.10E).

Estos resultados sugieren que el dominio radial del SPV peduncular incluye en su superficie el núcleo principal del SO. Además, incluye una parte posterior del BSTM, el BSTMh. Nuestros resultados indican que desde estadios muy tempranos las células Otp no están totalmente restringidas a su dominio radial y, sobre todo a partir de E12.5, se observan numerosas células Otp en dominios dorsales y ventrales al SPV, tanto a nivel terminal como peduncular, posiblemente como consecuencia de migraciones tangenciales. Dorsalmente, se localizan células Otp dentro del dominio PO (aparentemente a nivel terminal), y dentro de la EAme, incluyendo partes del BSTM (posiblemente a nivel peduncular). Ventralmente, hay células Otp que parecen dispersarse dentro del dominio Ch/SPa, e incluso alcanzan el SO tuberal (en la parte basal del prosómero terminal).

### 3.1.2 Distinción de las divisiones terminal y peduncular del domino SPV en base a la expresión de Rgs4

Como se ha mencionado en apartados anteriores, el dominio SPV se subdivide en SPVt y SPVp pero la distinción entre estas dos partes no es clara si solo nos guiamos por la expresión de Otp. Ésto dificulta el análisis de los derivados de cada subdivisión, y la comprensión de la contribución diferencial de ambas subdivisiones a la formación del prosencéfalo. Por ello, se realizó un primer intento de distinguir entre ambas subdivisiones del SPV usando para ello un marcador de la parte peduncular del SPV, denominado Rgs4 (Ferrán *et al*. 2015). Rgs4 codifica para una familia de genes que regula la señalización de proteínas G activando la GTPasa. En estadios tempranos, dentro del hipotálamo alar Rgs4 aparece restringido al componente peduncular del dominio SPV, marcando la extensión dorsoventral completa del dominio en E13.5, aunque a partir de E15.5 su expresión parece restringirse al componente ventral del SPVp (Ferrán *et al*. 2015). La expresión de Rgs4 también se localiza en el hipotálamo basal (Ferrán *et al*. 2015).

Por ello, para llevar a cabo este objetivo, se comparó la expresión de Rgs4 con la de Otp y con la de los neuropéptidos VP y OT, expresados en los núcleos hipotalámicos PVN y SO. El análisis se realizó en los estadios E12.5 y E14.5.

En E12.5, Rgs4 aparece en el dominio SPVp y al comparar con Otp en cortes adyacentes permite distinguir este dominio del SPVt (Fig. 3.12). Además de su presencia en el manto del SPVp, se observa un pequeño parche de expresión de Rgs4 en la superficie de la región PO, en una zona libre de expresión de Otp (Fig. 3.12A,B). Teniendo en cuenta la dirección de la glía radial en la zona preóptica (Fig. 3.4B), parece que el parche de Rgs4 se localiza en particular en la superficie de la parte comisural del PO (POC), y no en el PO ventral (POv). En base a ésto y otras observaciones, es posible que estas dos partes preópticas pertenezcan a dos prosómeros distintos, siendo el POC parte del peduncular (donde se encuentra la expresión de Rgs4) y el PO ventral parte del terminal.

En el SPVp, la expresión de Rgs4 no cubre toda la pared, siendo más restringida radialmente que la de Otp (comparar Fig. 3.12C y E con D y F). A este nivel, Otp se expresa desde la zona periventricular a la superficie. Por el contrario, en el SPVt (que carece de Rgs4), las células con Otp se concentran en la superficie, dejando libre la zona periventricular (Fig. 3.12C-F). En base a esta distinción, es posible que la marca de Otp que se observa ventralmente aparentemente invadiendo el dominio Ch/SPa (como se explicó en el apartado anterior) (Figs. 3.3G; 3.4E; 3.12E), derive en particular del SPVt, aunque en todo caso ésto hay que confirmarlo usando una aproximación

experimental. Por otro lado, la comparación entre Rgs4 y Otp permite confirmar la continuidad entre el SPVp con el grupo de células Otp que se extiende dorsalmente hacia la amígdala extendida, incluyendo el BSTMh (Fig. 3.12C,E).

En 14.5 ya se observa expresión de los neuropéptidos VP y OT, localizada en los núcleos hipotalámicos PVN y SO principal así como en partes de la EAme (Figs. 3.13 y 3.14). Además, estos neuropéptidos muestran expresión en el SO tuberal (Figs. 3.13G; 3.14G). Rgs4 mantiene la expresión en el territorio peduncular, aunque ahora es más extensa y compleja. La comparación de VP y OT con Rgs4 y Otp apoya el origen de los núcleos PVN y el SO principal en el SPVp (Figs. 3.13D-F; 3.14D-F). Dorsalmente, la expresión de Rsg4 se extiende por la parte peduncular del telencéfalo, donde se encuentra la amígdala extendida (Figs. 3.13B; 3.14B). En esta zona también se observan algunas células con VP (Fig. 3.13A), pero no hay células con OT a esta edad (Fig. 3.14A).

Por otro lado, con VP y con OT se observa una discontinuidad entre el SO principal y el SO tuberal (Figs. 3.13G y 3.14G). Mientras la parte principal del SO expresa Rgs4, la parte tuberal no (Figs. 3.13E,H; 3.14E,H). Ésto podría indicar un origen distinto de ambas partes: mientras la parte principal se origina en SPVp, el SO tuberal podría derivar del SPVt.

Estos resultados sugieren que ya en E12.5 se pueden distinguir los dos subdominios del SPV, el SPVp y el SPVt. Además, el SPVp parece contribuir al PVN y al SO principal, ambos incluidos dentro de su dominio radial. Sin embargo, el SO tuberal no parece tener origen peduncular. Por otro lado, se confirma la relación del SPVt con la parte ventral de la zona preóptica sin Rgs4, mientras que el SPVp guarda relación dorsalmente con el POC y la zona peduncular telencefálica donde se sitúa la amígdala extendida, todas ellas con expresión de Rgs4.

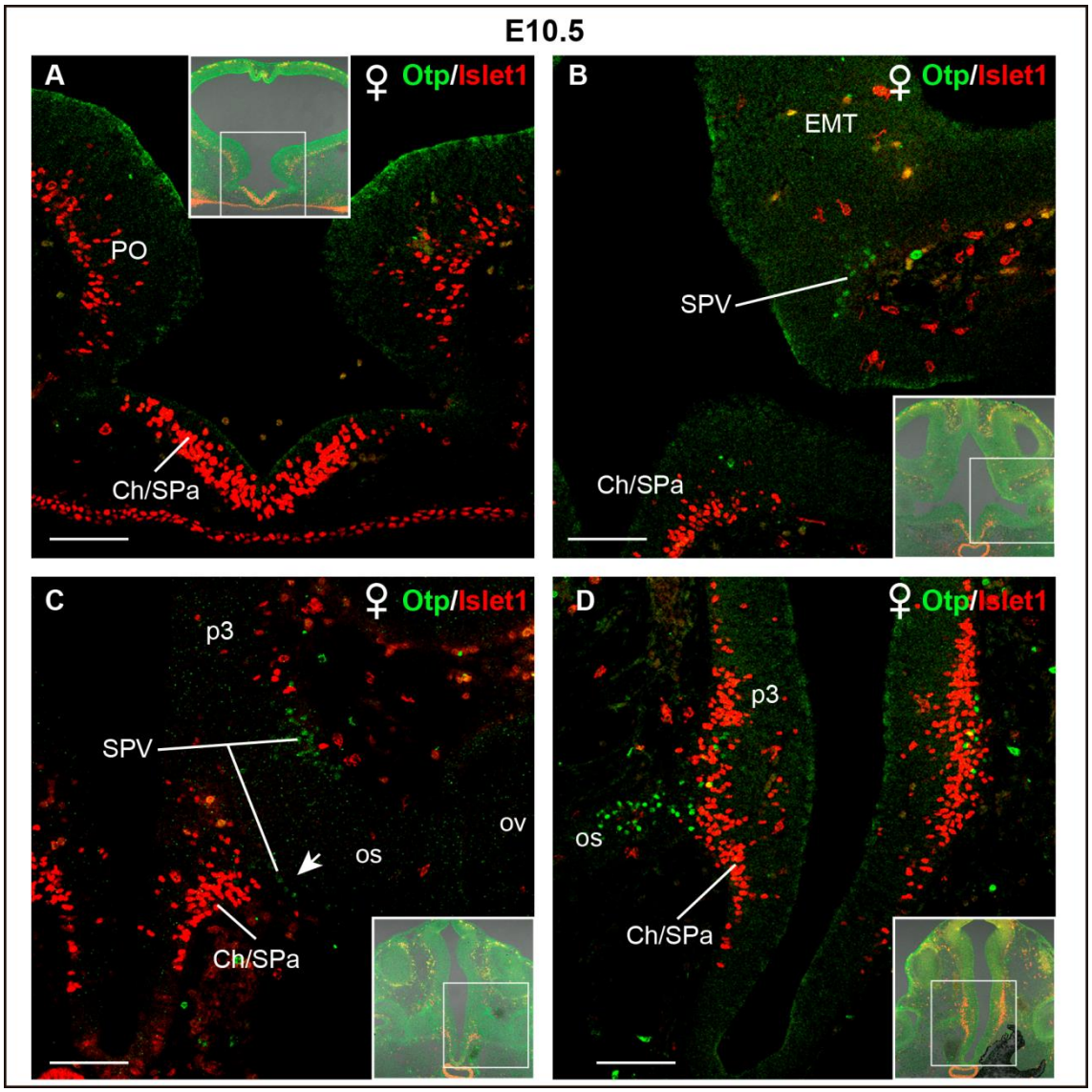



**Figura 3.1. Expresión de Otp en el SPV y en el tallo óptico en E10.5.** Inmunofluorescencia doble para Otp (verde) y Islet1 (rojo) en secciones oblicuas de 20 µm de cerebro de embrión de ratón de 10.5 días, de rostrodorsal (A) a caudoventral (D). Los insertos en cada panel muestran una imagen panorámica de la sección, con un recuadro de la zona detallada a mayor aumento. El SPV aparece entre dos dominios ricos en células con Islet1, la zona preóptica (PO) y el dominio quiasmático o subparaventricular (Ch/SPa). Se observan también algunas células mesenquimáticas con Islet1, principalmente fuera del tubo neural. En E10.5 se identifican las primeras células Otp en el SPV y en el tallo óptico. La flecha en C indica unas pocas células Otp situadas en el SPV, probablemente en su parte terminal. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

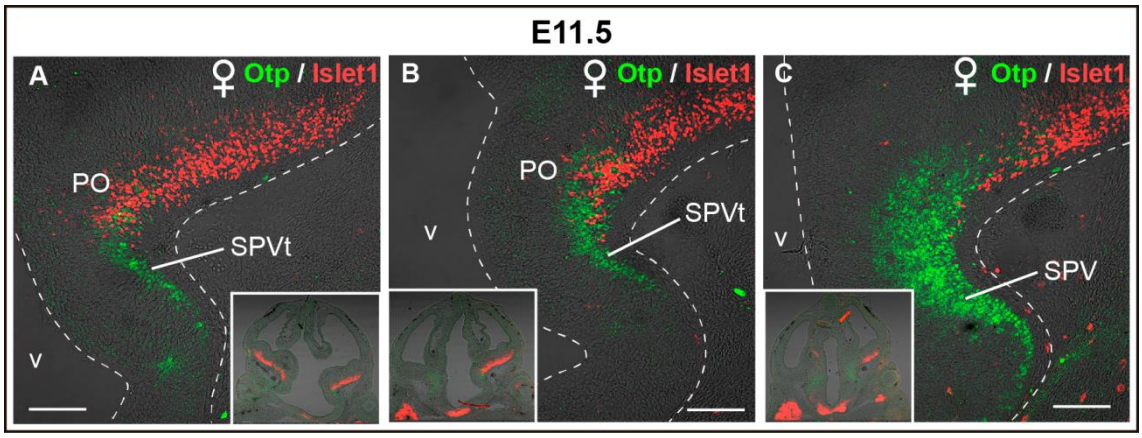



**Figura 3.2. Aparente dispersión de células Otp desde el SPV al dominio preóptico en E11.5.** Inmunofluorescencia doble para Otp (verde) y Islet1 (rojo) en secciones oblicuas de 20 µm de cerebro de embrión de ratón de 11.5 días, de rostrodorsal (A) a caudoventral (C). Los insertos muestran una imagen panorámica de la sección. En esta edad, ambas divisiones del SPV contienen abundantes células con Otp. La mayoría de las células Otp se encuentran segregadas de las Islet1. Sin embargo, algunas células se adentran en el PO entremezclándose con células Islet1. No se observa coexpresión de Otp y Islet1. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

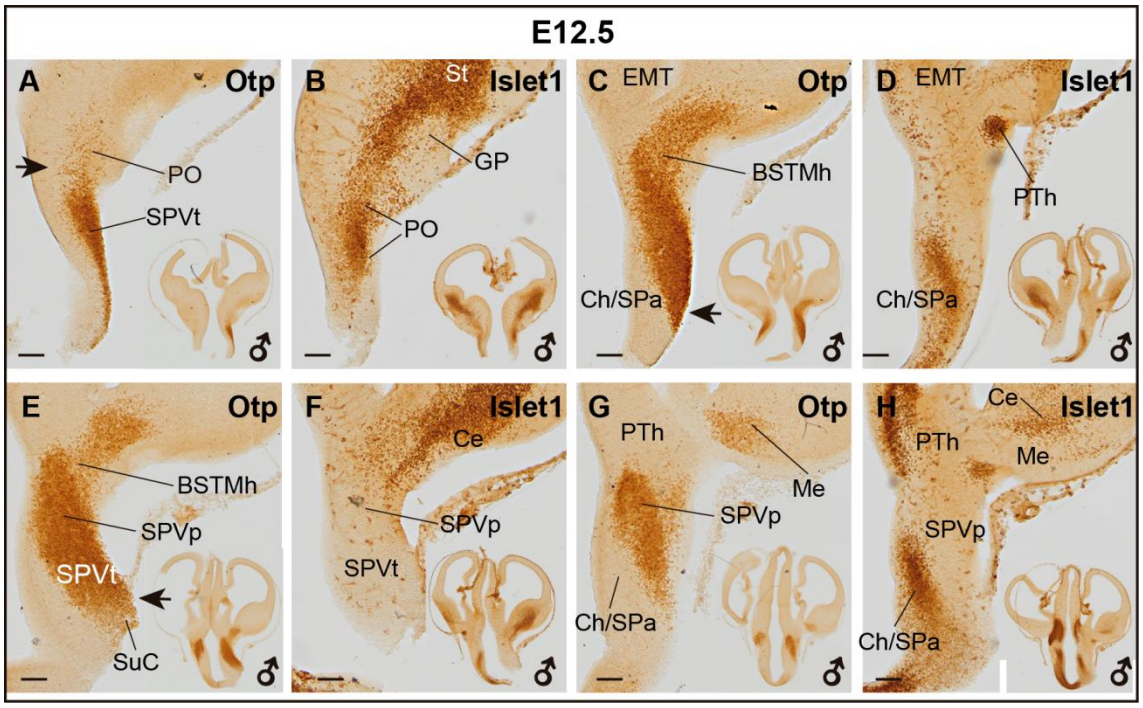



**Figura 3.3. Aparente dispersión de células Otp desde el SPV hacia el dominio preóptico (PO), la amígdala medial extendida (EAme) y el dominio quiasmático o subparaventricular (Ch/SPa) en E12.5.** Detalles de una inmunohistoquímica para Otp y Islet1 en secciones alternas y seriadas de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E12.5 (macho), cortadas siguiendo un plano oblicuo paralelo al corredor celular amigdalo-hipotalámico, desde niveles rostrodorsales (A,B) a caudoventrales (G,H). Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. Las flechas en C y G indican la aparente dispersión ventral de células Otp hacia el dominio Ch/SPa (rico en células con Islet1, como se observa en las secciones alternas). En A también se observa una aparente dispersión de células Otp desde el SPV terminal al dominio PO (con abundantes células Islet1, especialmente en su zona ventral; flecha azul). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

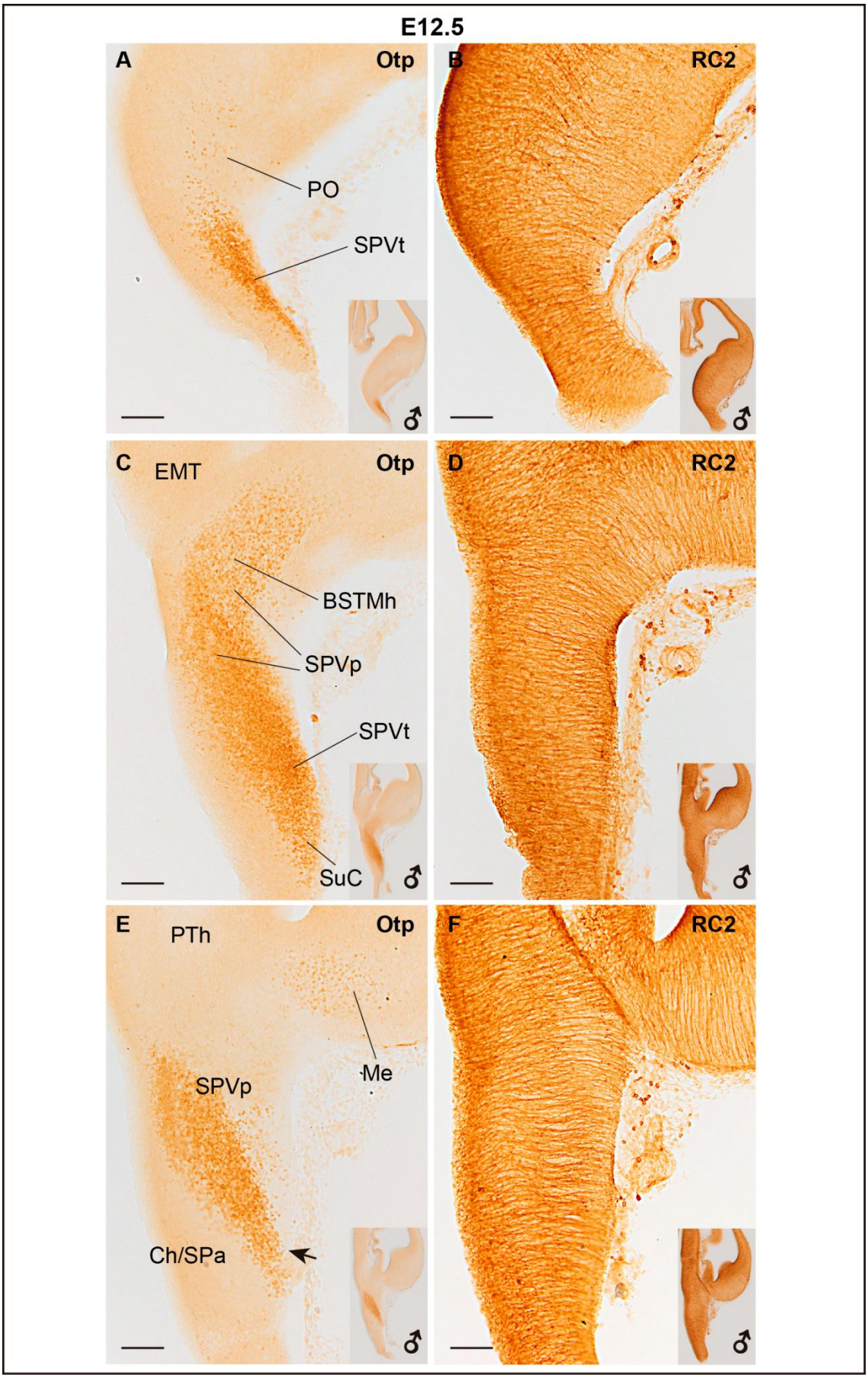

E12.5
A
Otp
PO
SPVt
B
RC2
C
EMT
Otp
BSTMh
SPVp
SPVt
SuC
D
RC2
E
PTh
Otp
Me
SPVp
Ch/SPa
F
RC2

**Figura 3.4. Comparación de la expresión de Otp en el SPV con la glía radial en E12.5.** Inmunohistoquímica para Otp y un marcador de glía radial (RC2) en secciones alternas y seriadas de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E12.5 (macho), cortadas con un plano oblicuo, desde niveles rostrodorsales (A,B) a caudoventrales (E,F). Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. La mayoría de las células Otp se encuentran en la dimensión radial del SPV, ocupando desde posiciones periventriculares a la superficie. Un grupo abundante de células Otp se dispersa hacia territorios amigdalinos ocupando una subdivisión del BSTM, que se ha llamado el BSTMh (C). Comparando con la glía radial, parece que algunas células Otp se dispersan tangencialmente desde la extensión radial del SPV, alcanzando el dominio PO, la EAme y el Ch/SPa. Dentro de la EAme, algunas células Otp llegan a la Me (E). El SuC es un conjunto de células Otp que aparecen situadas en el Ch/SPa terminal (C), mientras que la flecha en E apunta a otro conjunto de células que parecen ocupar la parte peduncular del Ch/SPa. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

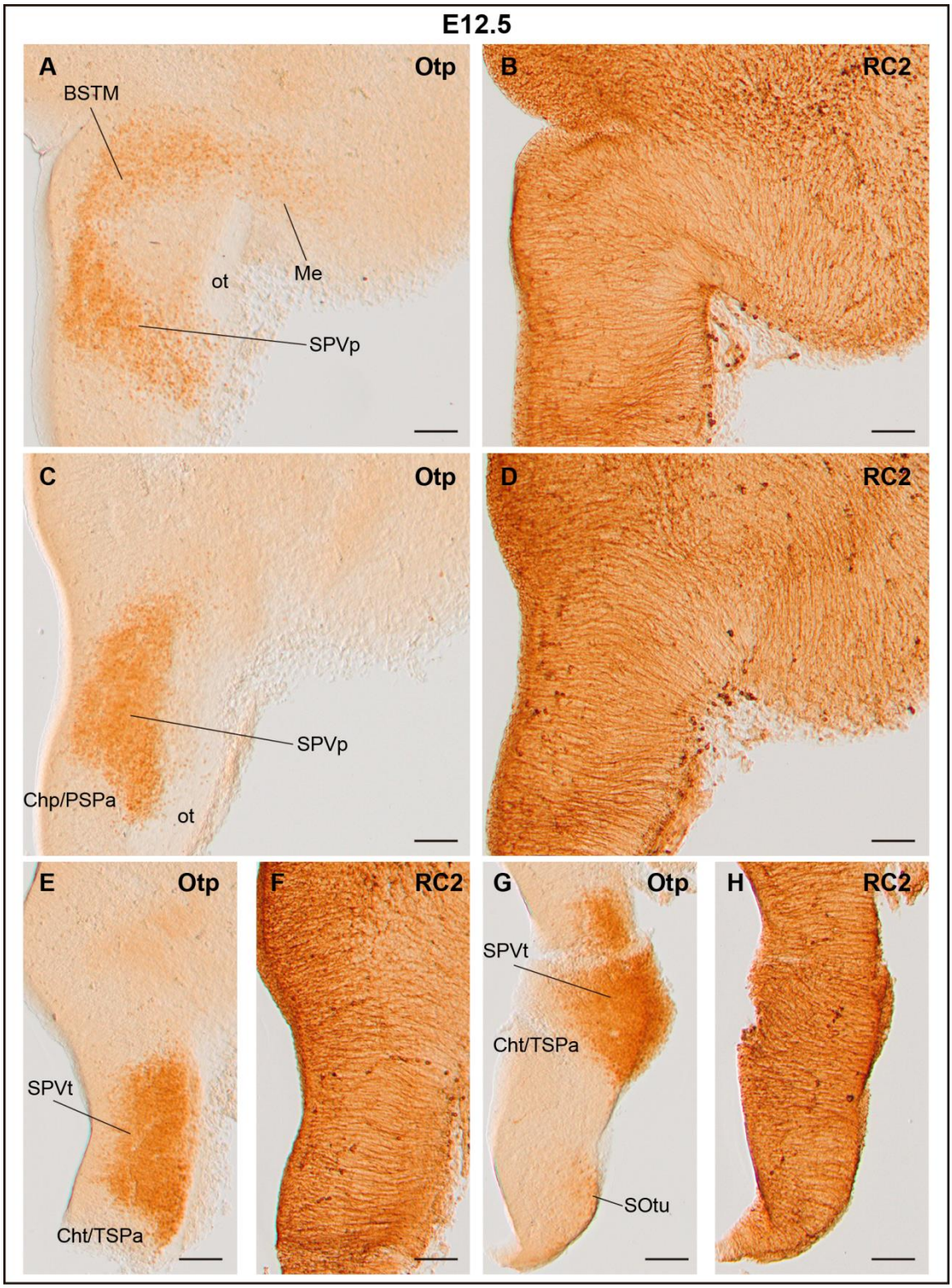



**Figura 3.5. Aparente dispersión ventral desde el SPVp y el SPVt al dominio Ch/SPa.** Inmunohistoquímica para Otp y un marcador de glía radial (RC2) en secciones alternas y seriadas de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E12.5 (macho), cortadas con un plano transversal al hipotálamo, desde niveles caudales (A,B) a ventrales (G,H). Se observa la dimensión radial de los subdominio SPVp (A-D) y SPVt (E-H). Un grupo abundante de células Otp se dispersa hacia territorios amigdalinos ocupando la parte telencefálica del BSTM y la Me (A). Algunas células Otp del SPVp se dispersan tangencialmente alcanzando la parte

peduncular del Ch/SPa (C). Desde el SPVt, las células Otp se adentran en la parte terminal del Ch/SPa (E,G), y algunas alcanzan territorios hipotalámicos más ventrales y ocupan el SOtu (G). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

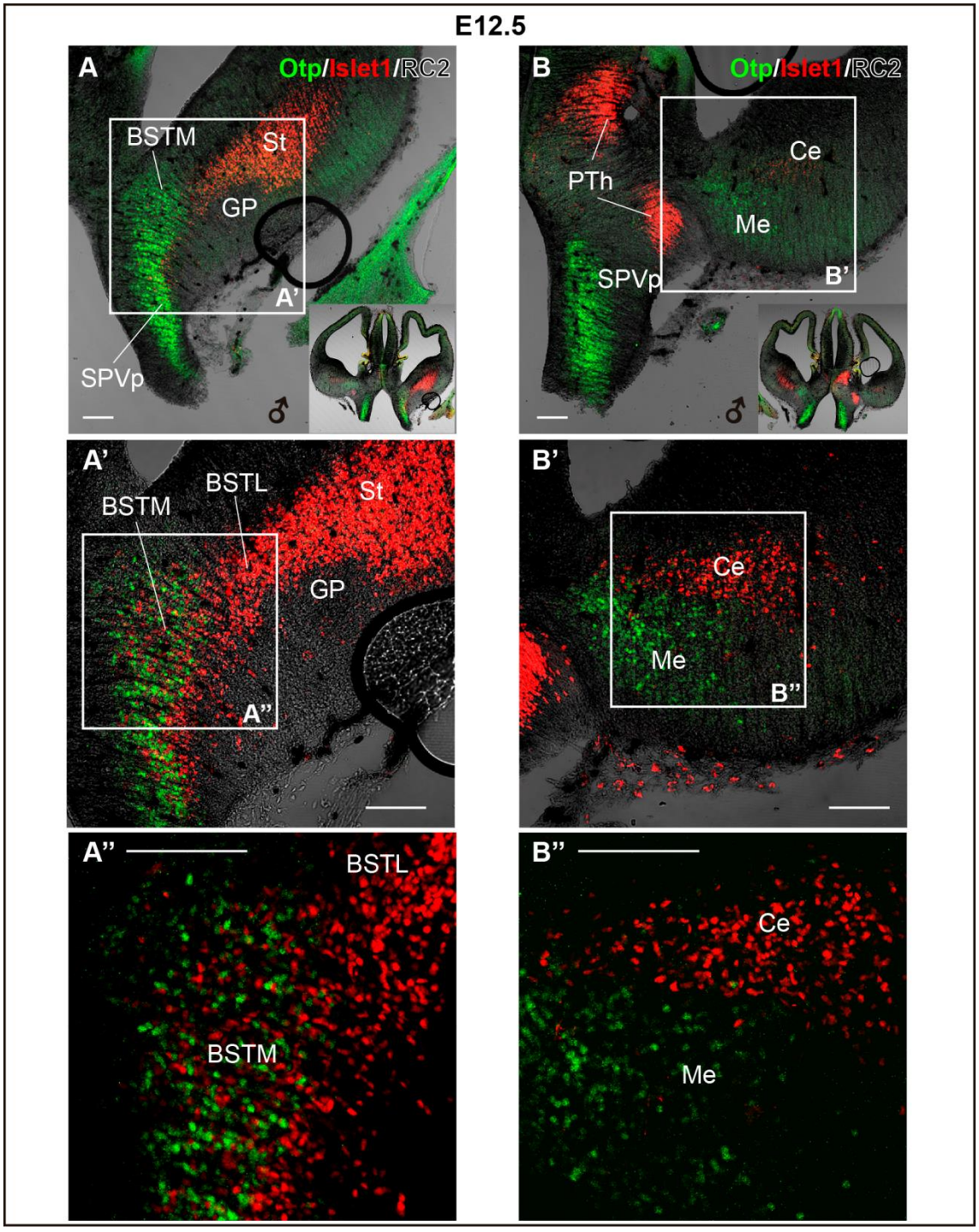



**Figura 3.6. Expresión de Otp y Islet1 en comparación con la glía radial en E12.5.** Triple inmunohistoquímica combinando una doble inmunofluorescencia para Otp (verde) y Islet1 (rojo) con una inmunohistoquímica para un marcador de glía radial (RC2; negro) en secciones de 80

µm de cerebro de embrión de ratón E12.5 (macho), cortadas con un plano oblicuo, en un nivel rostrodorsal (A) y otro caudoventral (B). Comparando con la glía radial, se aprecia una aparente dispersión tangencial de las células Otp desde el SPV a la parte palido-preóptica del BSTM (A',A''). Aquí, las células Otp y Islet1 se entremezclan sin llegar a colocalizar. En cambio, en la Me hay células Otp totalmente segregadas de las células Islet1 en la Ce (B''). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

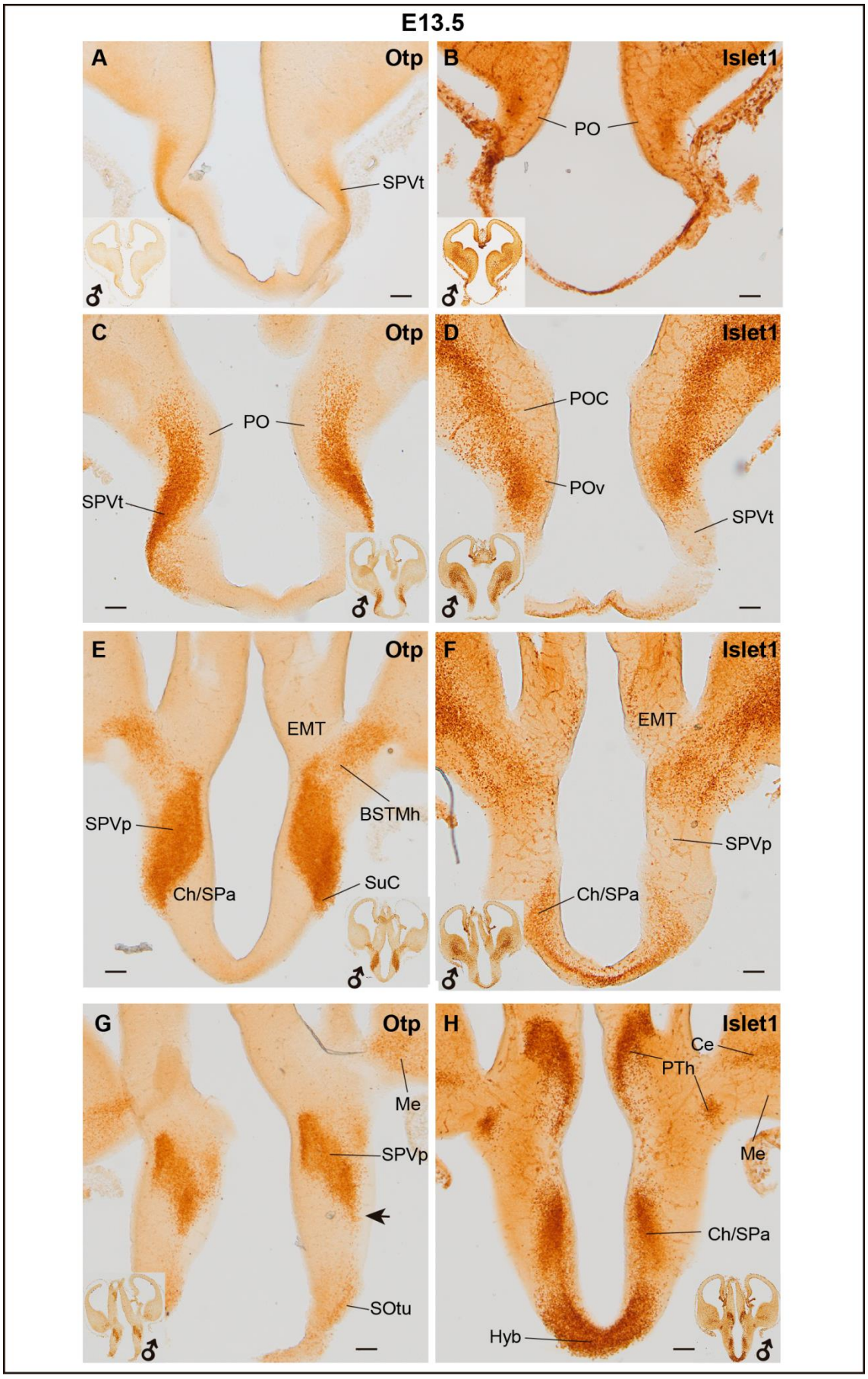

E13.5
A
Otp
SPVt
B
Islet1
PO
C
Otp
PO
SPVt
D
Islet1
POC
POv
SPVt
E
Otp
EMT
BSTMh
SPVp
Ch/SPa
SuC
F
Islet1
EMT
SPVp
Ch/SPa
G
Otp
Me
SPVp
SOtu
H
Islet1
Ce
PTh
Me
Ch/SPa
Hyb

**Figura 3.7. Numerosas células Otp parecen dispersarse desde el SPV a dominios dorsales y ventrales al mismo en E13.5.** Inmunohistoquímica para Otp y Islet1 en secciones de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E13.5 (macho), cortadas con un plano oblicuo, desde niveles rostrodorsales (A,B) a caudoventrales (G,H). Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. A esta edad, el patrón de expresión de Otp es similar al observado en E12.5, aunque son mayores la densidad celular en el SPV y el número de células que se mezclan con células Islet1. Aumenta también la dispersión de células Otp hacia dominios dorsales y ventrales al SPV, localizándose numerosas células en el PO, la Me, el BSTM (incluida la subdivisión hipotalámica, BSTMh) y en el Ch/SPa, todos ellos territorios Islet1 positivos. En las células Otp observadas en el dominio Ch/SPa, algunas parecen estar localizadas a nivel del prosómero terminal (en el núcleo SuC; E), y otras en el peduncular (flecha en G). Además, aparecen unas pocas células en el primordio del SOtu, a nivel basal (G). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

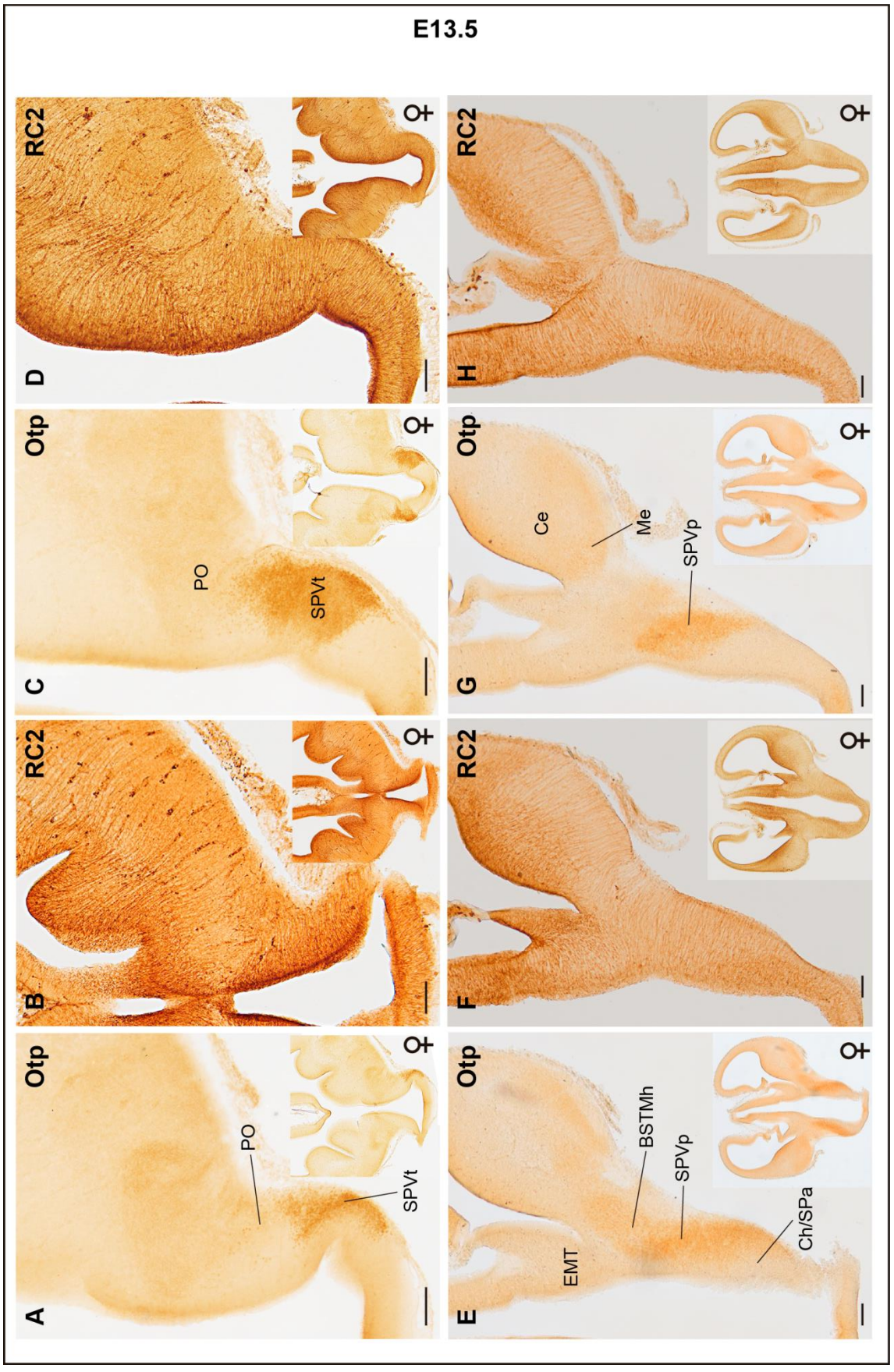

E13.5
A
Otp
PO
SPVt
♀
B
RC2
♀
C
Otp
PO
SPVt
♀
D
RC2
♀
E
Otp
EMT
BSTMh
SPVp
Ch/SPa
♀
F
RC2
♀
G
Otp
Ce
Me
SPVp
♀
H
RC2
♀

**Figura 3.8. Comparación de la expresión de Otp en el SPV con la glía radial en E13.5.** Imágenes de dos casos de inmunohistoquímica para Otp y un marcador de glía radial (RC2) en secciones de 80 µm de dos cerebros de embrión de ratón E13.5 (hembras), cortadas con un plano oblicuo, en niveles rostrodorsales (A-D) y caudoventrales (G,H). Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. La disposición de la glía radial en el SPV muestra cómo algunas de las células Otp siguen una trayectoria tangencial. Éstas parecen dispersarse dorsalmente dentro del dominio PO y la EAme, invadiendo algunas células la Me (G). Ventralmente, las células Otp se adentran en el dominio Ch/SPa (E-H). La división hipotalámica del BSTM (BSTMh) se encuentra dentro de la dimensión radial del SPV (E,F). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

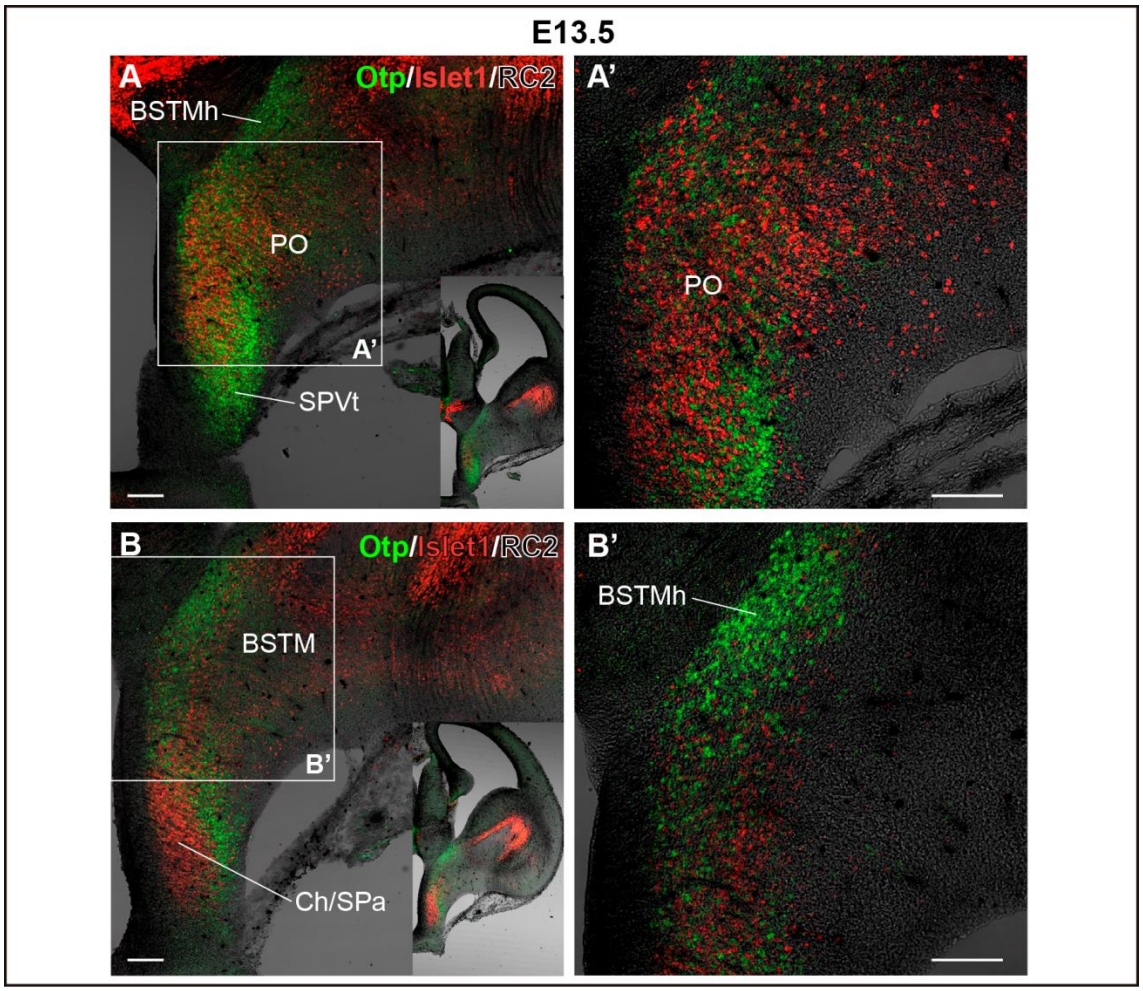



**Figura 3.9. Expresión de Otp y Islet1 en comparación con la glía radial en E13.5.**Triple inmunohistoquímica combinando una doble inmunofluorescencia para Otp (verde) y Islet1 (rojo) con una inmunohistoquímica para un marcador de glía radial (RC2; negro) en secciones de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E13.5, cortadas con un plano oblicuo, en un nivel rostrodorsal (A) a caudoventral (B). Las células Otp que parecen dispersarse dorsalmente hacia el PO se encuentran entremezcladas con células Islet1, pero sin llegar a colocalizar (A,A'). Por otro lado, un grupo de células Otp parece dispersarse ventralmente hacia el Ch/SPa, donde se observa segregación con las células Islet1 (B). Además, abundantes células Otp se localizan en el BSTMh en la dimensión radial del SPVp, donde también permanecen segregadas de las células Islet1 (B,B'). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

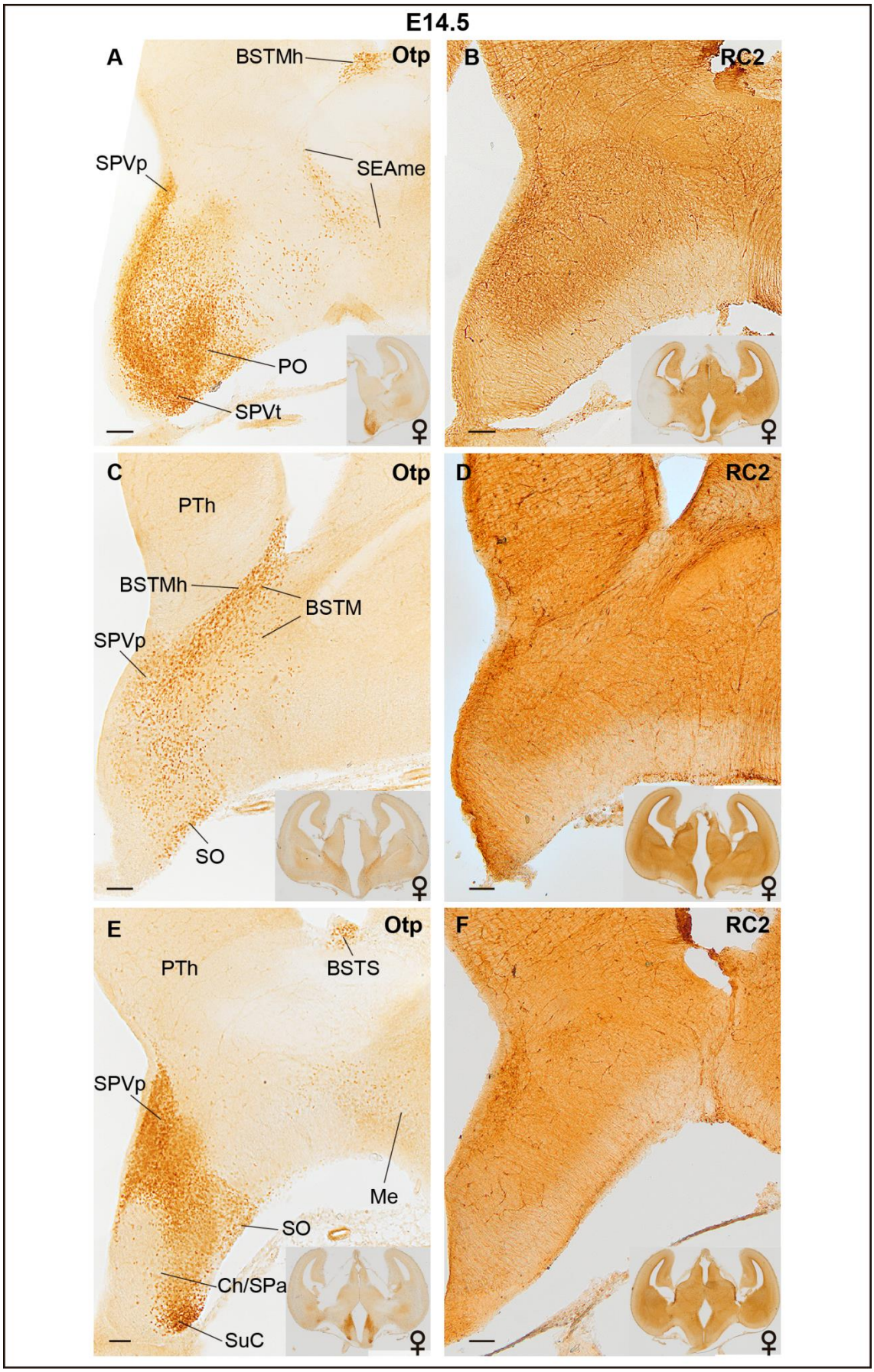

E14.5
A
Otp
BSTMh
SPVp
SEAme
PO
SPVt
B
RC2
C
Otp
PTh
BSTMh
BSTM
SPVp
SO
D
RC2
E
Otp
PTh
BSTS
SPVp
Me
SO
Ch/SPa
SuC
F
RC2

**Figura 3.10. En 14.5 se continúa observando la aparente dispersión desde el SPV a dominios dorsales y ventrales adyacentes.** Inmunohistoquímica para Otp y un marcador de glía radial (RC2) en secciones de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E14.5 (hembra), cortado con un plano oblicuo, desde niveles rostrodorsales (A,B) a caudoventrales (E,F). Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. En cortes más ventrales, se aprecia la extensión radial del SPV, identificándose células Otp en el área periventricular y muchas alcanzando su superficie (C,E). A esta edad, el BSTMh, corredor rico en células Otp, se hace más evidente dentro de la dimensión radial del SPV (C). Comparando con la glía radial, parece que algunas células Otp se dispersan tangencialmente hacia partes telencefálicas del BSTM y otras partes de la EAme (C-F). Algunas llegan a la amígdala medial (E). Se sigue observando la dispersión ventral al Ch/SPa de un grupo compacto de células Otp, que hemos llamado núcleo quiasmático superficial o SuC (E). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

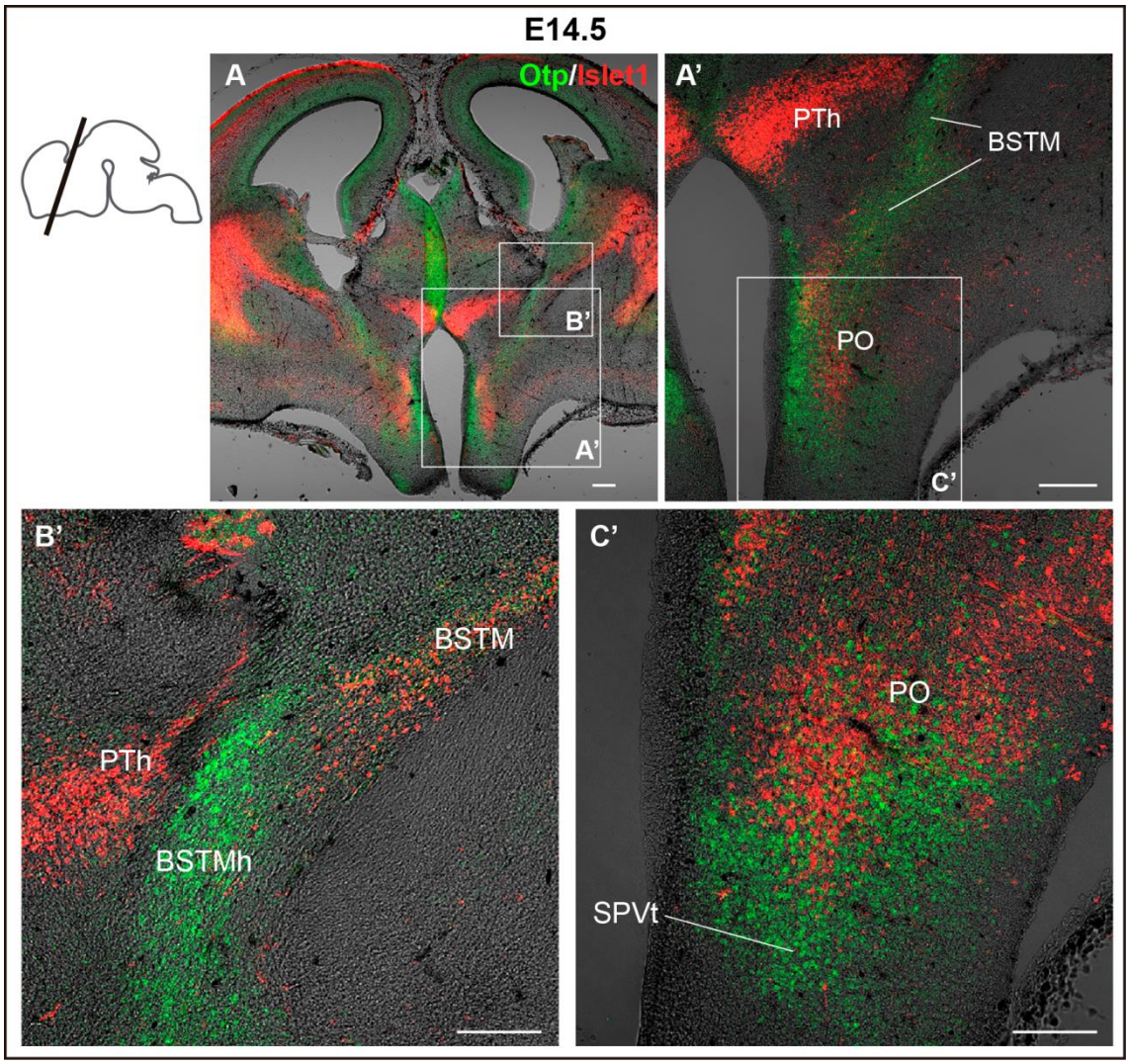



**Figura 3.11. Expresión de Otp y Islet1 en E14.5.** Doble inmunofluorescencia para Otp (verde) y Islet1 (rojo) en secciones de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E14.5, con un plano de corte como se indica en el dibujo. A esta edad se aprecian varios estratos en el PO, con unos donde predominan las células Otp intercalándose con otros ricos en células Islet1 (A',C'). La división BSTMh, rica en células Otp, parece estar segregada de las células Islet1. Además, algunas células Otp alcanzan otras divisiones telencefálicas del BSTM y otras partes de la EAme. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

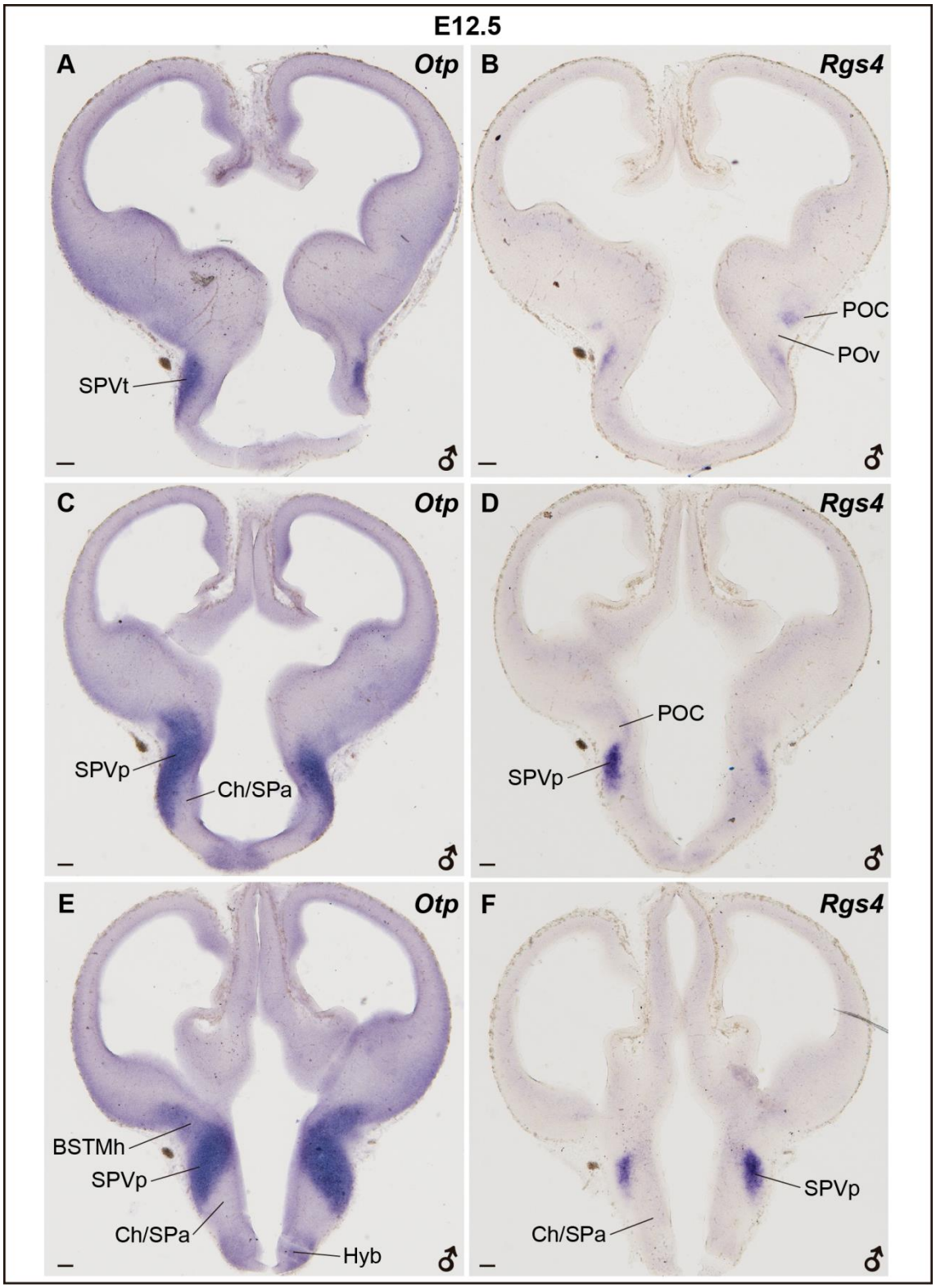



**Figura 3.12. Comparación de la expresión de Otp con un marcador de la división peduncular del SPV (Rgs4) en E12.5.** Hibridación *in situ* para los genes de Otp y Rgs4 en secciones alternas y seriadas de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E12.5 (macho), cortadas con un plano oblicuo. La expresión de Rgs4 en el SPVp se encuentra más restringida radialmente que la de Otp, que se extiende desde la zona periventricular a la superficie. En cambio, en el SPVt no se expresa Rgs4 y las células Otp se concentran en la superficie,

dejando libre la zona periventricular. Según este marcador, es el SPVp el que se continúa con las células que se dispersan dorsalmente hacia la EAme y el BSTMh. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

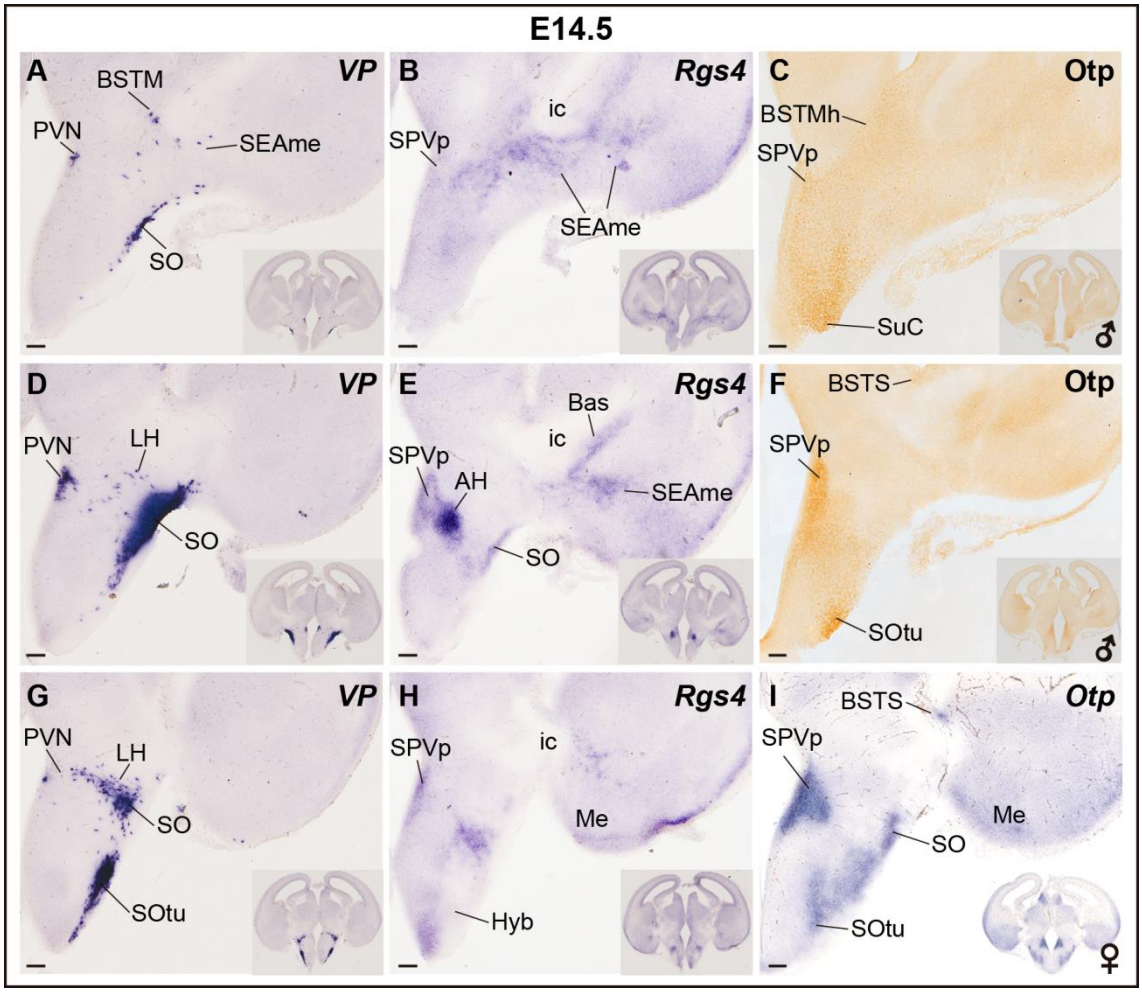



**Figura 3.13. Comparación de la expresión del marcador del SPV peduncular (Rgs4) con la de vasopresina y Otp en E14.5.** Hibridación *in situ* para los genes de Rgs4, Otp y VP (A,B,D,E,G-I) e inmunohistoquímica para Otp (C,F) en secciones de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E14.5, cortadas con un plano oblicuo. La expresión de VP se localiza en los núcleos PVN y SO, en la EAme y en el SO tuberal. A esta edad, la expresión de Rgs4 se mantiene en territorio peduncular. La comparación de la expresión de Rgs4 con la de VP y Otp sugiere el origen peduncular de los núcleos PVN y SO. Además, hay células Rgs4 dispersas dorsalmente en la EAme (parte peduncular telencefálica), donde se identifican algunas células VP (A,B). Por otra parte, Rgs4 se expresa en el SO pero no lo hace el SO tuberal (E,H). Esa discontinuidad entre el SO y el SOtu se observa también en la expresión de VP (G). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

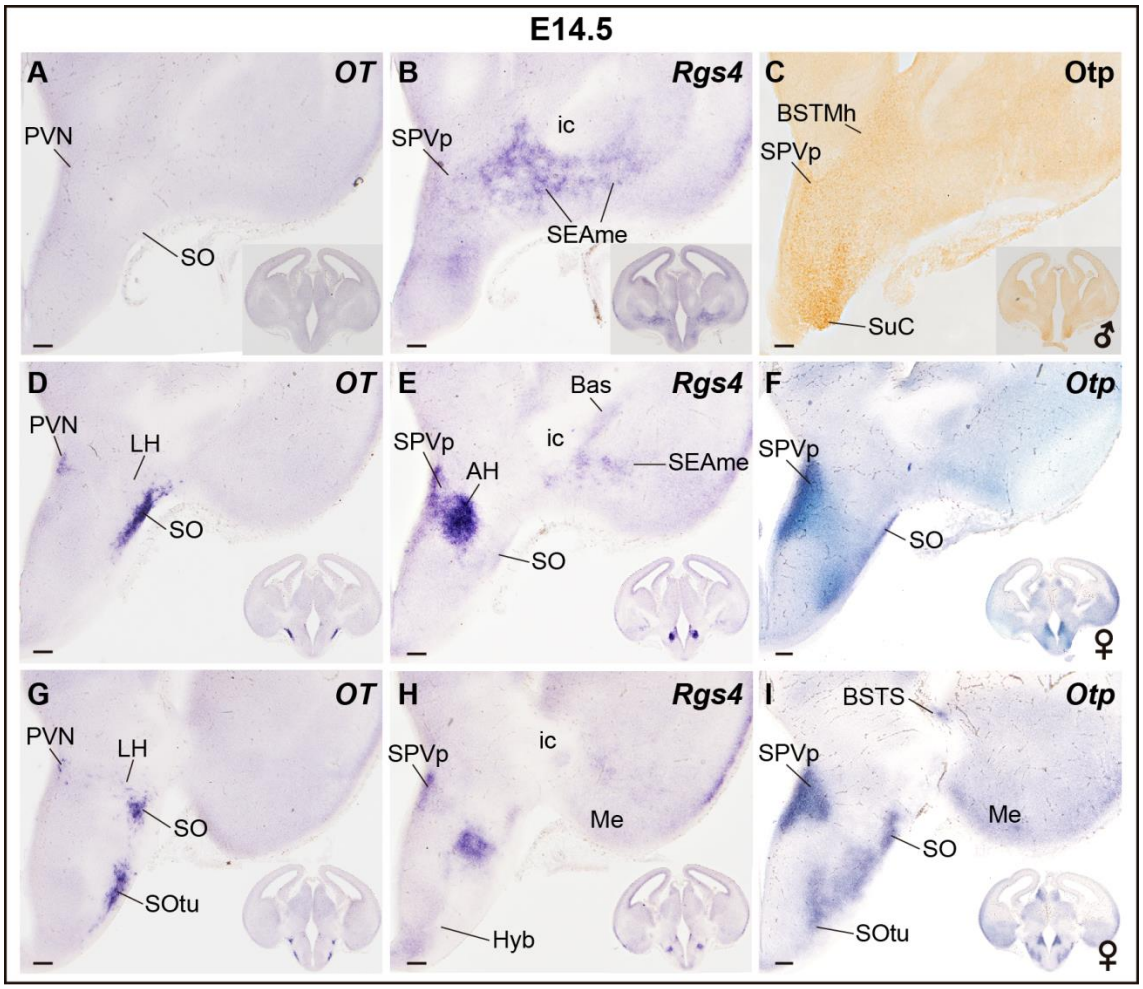



**Figura 3.14. Comparación de la expresión del marcador del SPV peduncular (Rgs4) con la de oxitocina y Otp en E14.5.** Hibridación *in situ* para los genes de Rgs4, Otp y OT (A,B,D-I) e inmunohistoquímica para Otp (C) en secciones de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E14.5, cortadas con un plano oblicuo. La expresión de OT se localiza en los núcleos PVN y SO y en el SO tuberal. A esta edad, la expresión de Rgs4 se mantiene en territorio peduncular. Al igual que sucede con VP, la comparación de la expresión de Rgs4 con la de OT y Otp sugiere el origen peduncular de los núcleos PVN y SO. En 14.5, OT no se expresa en la EAme, territorio Rgs4 positivo (A,B). Además, se observa una discontinuidad entre el SO y el SO tuberal con la expresión de OT (G). Mientras que el SO contiene células Rgs4, el SO tuberal no (E,H). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

## 3.2 ONTOGENIA DE LAS CÉLULAS VP Y OT EN EL HIPOTÁLAMO Y LA AMÍGDALA MEDIAL EXTENDIDA

Como ya hemos explicado anteriormente, los neuropéptidos VP y OT se producen en neuronas de los núcleos hipotalámicos PVN y SO, los cuales necesitan del factor de transcripción Otp para su desarrollo (Acampora *et al*. 1999; Wang y Lufkin 2000). Sin embargo, estos neuropéptidos no sólo se expresan en neuronas del hipotálamo, sino que también se expresan en una pequeña subpoblación de neuronas de la amígdala medial extendida (EAme) (Wang y Lufkin 2000; García-Moreno *et al*. 2010), y se ha sugerido que quizás provengan del dominio hipotalámico SPV (Bupesh *et al*. 2011a; Abellán *et al*. 2013; Medina *et al*. 2017). Esta propuesta se basa en la demostración de migraciones tangenciales de células desde el SPV hipotalámico a la EAme, incluyendo el BSTM y la amígdala medial (Me) (Soma *et al*. 2009; García-Moreno *et al*. 2010; Bupesh *et al*. 2011a), y a que dichas células migradas expresan Otp (García-Moreno *et al*. 2010). De hecho, en los apartados anteriores de resultados vimos las aparentes rutas de la dispersión de células con Otp desde el SPV, distinguiendo entre el SPVp y el SPVt, algo que no se había considerado anteriormente.

En esta parte del trabajo se muestran los resultados del análisis espacio-temporal de la expresión de estos neuropéptidos en comparación con Otp, haciendo especial hincapié en distinguir las poblaciones que se originan en el SPVt y/o el SPVp, y en analizar su posible dispersión hacia otras regiones del prosencéfalo, incluyendo la amígdala extendida. Para ello, se usaron ratones desde estadios tempranos del desarrollo embrionario a edades postnatales, en concreto, desde E12.5 a P7. Para los estudios de desarrollo se realizaron hibridaciones *in situ* para los genes de VP y OT y se compararon con Otp en secciones adyacentes, así como con el material de Otp, Islet1, Rgs4 y glía radial presentado en los apartados anteriores. El uso de hibridación *in situ* para detectar VP y OT permite detectar la presencia de neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas desde etapas muy tempranas del desarrollo, antes de que se acumule suficiente cantidad de péptido para detectarse mediante inmunohistoquímica. En el caso de los individuos postnatales, se estudió únicamente la expresión de VP mediante técnicas inmunohistoquímicas, utilizando tres edades postnatales: P0, correspondiente con el día de nacimiento; P3, a los tres días de nacer; y P7, siete días después del nacimiento.

### 3.2.1 Patrón de expresión de VP y OT durante el desarrollo embrionario

En E12.5 no se observa expresión de VP y OT. A partir de E13, se identifican las primeras células VP y OT en el dominio radial del SPVp (Fig. 3.15), que es Otp y Rgs4 positivo, tanto a nivel superficial como periventricularmente (Figs. 3.4; 3.12). Las células con VP se localizan periventricularmente en el núcleo PVN, mientras que las superficiales se sitúan en el SO (Fig. 3.15A). En E13, estas últimas son más abundantes y tienen expresión más fuerte de VP que las observadas en el PVN. En este estadio, la expresión de OT es más débil que la de VP, observándose algunas células con poca expresión en el SO pero no en el PVN (Fig. 3.15B).

En E13.5, la situación es similar a la observada en E13 (Fig. 3.16). VP se expresa en el PVN y en el SO a nivel peduncular (Fig. 3.16C) mientras que las células con OT únicamente se localizan en el SO en el mismo prosómero (Fig. 3.16D). A esta edad, VP y OT se encuentran en el dominio radial de SPVp, que es Otp positivo. Sin embargo, la zona superficial del SPVp con mayor concentración de células con VP y OT (donde se encuentra el SO principal) presenta expresión más débil de Otp (Fig. 3.16A,B; ver también Figs. 3.7E y 3.10E), lo cual podría ser debido a que este factor de transcripción se apaga en las células una vez se han diferenciado. Por el contrario, no se observan células con VP y OT en territorios dorsales y ventrales al SPV con expresión de Otp, como el BSTM, la Me y el dominio Ch/SPa (Fig. 3.16A,B). Tampoco se observan células con VP y OT en el SPVt.

En E14.5, la expresión de estos neuropéptidos es muy abundante a lo largo del dominio radial del SPVp (Otp positivo), tanto a nivel periventricular como superficial (Fig. 3.17A,B,D,E). A nivel periventricular, se identifican numerosas células VP y algunas OT en el PVN. Se observa además un reguero de células con VP que se extiende radialmente desde el PVN a la superficie radial del SPVp (Fig. 3.17D), donde existe una población muy numerosa de células con VP y OT en el SO principal (Fig. 3.17A,B,D,E). Las células VP y OT del SO principal, que están dentro del dominio radial del SPVp, coinciden con la expresión moderada o débil de Rgs4 y Otp (Figs. 3.13D,E; 3.14D,E,F; 3.17A-F).

A partir de esta edad, la expresión de VP y OT no se restringe al dominio radial del SPVp, identificándose las primeras células dorsalmente en la EAme (Fig. 3.17A,B,D,E). Así, en el BSTM se encuentran algunas células con VP y OT (Fig. 3.17A,B) que parecen provenir de una dispersión dorsal desde el SPVp, al igual que sucede con las células Otp en esta zona que se han descrito en la sección 3.1 (Figs. 3.10C; 3.17C). Algunas de estas células se encuentran a nivel del BSTM y en la zona sublenticular de la EAme (SEAme). Además, algunas células VP y OT parecen

alcanzar la amígdala medial posterior (MeP) (Fig. 3.17D,E). Al igual que con Otp, dentro del prosómero peduncular podría existir alguna dispersión ventral de células con VP y/u OT (Fig. 3.17D-F), que habría que confirmar con ensayos de migración.

Ventralmente al SPVt, se observa un grupo numeroso de células VP y OT en la superficie del prosómero terminal. La posición de estas células coincide con la de las células Otp que parecían dispersarse desde el SPVt hacia el Ch/SPa (caracterizado por expresión de Islet1 en las figuras del apartado 3.1) y más ventralmente, hacia el territorio basal (Fig. 3.17D-I). Estas últimas aparentemente darán lugar al SO tuberal (SOtu). Se observa generalmente una separación (un "gap" o área libre de células) entre las células con VP y/u OT observadas a nivel terminal ventral y las observadas a nivel peduncular (por ejemplo, Fig. 3.17D,H).

En E15.5, la expresión de VP y OT fue similar a la de E14.5, observándose un marcaje más intenso en los núcleos PVN y SO. En esta edad, se comparó la expresión de VP y OT con la de otro neuropéptido que se localiza en el PVN, el CRF. Mientras que los tres se detectan en el PVN (Fig. 3.18), el CRF no se expresa en el SO principal ni en partes intermedias del dominio radial SPVp (Fig. 3.18C,F), donde sí existen numerosas neuronas con VP y/u OT (Fig. 3.18A,B,D,E). A esta edad, tampoco se observan células con CRF en la EAme, ni en el SOtu o en otras partes del prosómero terminal que sí expresan VP y/u OT (Fig. 3.18C,F).

En E16.5, va aumentando el número de células que expresan VP y OT en distintas zonas de expresión de Otp, incluyendo distintos núcleos del SPVp, así como distintas subdivisiones de la EAme (Figs. 3.19 y 3.20).

En la dimensión radial del SPVp, se observan células VP y OT en el PVN, el hipotálamo anterior (AH) y lateral (LH) y el SO (Figs. 3.19; 3.20). En el PVN y el SO la expresión de VP y OT es muy intensa, coincidiendo con grupos de células Otp (Figs. 3.19D-L; 3.20G-O). Como se explicó en apartados anteriores, el SPVp dorsal se extiende hacia el telencéfalo para formar una parte espigada del BSTM, rica en células Otp, que hemos llamado BSTMh, y tiene una continuación en el llamado BST supracapsular (BSTS) (Fig. 3.19B,E,H,K). En el BSTMh, se observan algunas células VP coincidiendo con la zona de expresión de Otp (Figs. 3.19D,G; 3.20K), mientras que OT no se aprecia en dicha división del BSTM (Figs. 3.19F; 3.20L). También se observa alguna célula suelta que expresa VP en el BSTS (Fig. 3.19G), pero a esta edad no se observa expresión de OT en esta subdivisión (Figs. 3.19I,L; 3.20I,L).

Desde la parte dorsal del SPVp, se observan algunas células con Otp que invaden (quizás por dispersión tangencial) otras partes telencefálicas del BSTM. Algunas de éstas alcanzan niveles del BSTM alrededor de la comisura anterior (Fig. 3.19B), donde a esta edad también se observan algunas células con VP y OT (Figs. 3.19A,C; 3.20C).

Es decir, estas células alcanzan probablemente esta posición debido a una dispersión dorsal desde el SPVp, que se adentra en el dominio del POC, relacionado con la comisura anterior (sección 3.1).

La parte intermedia del SPVp también parece producir células con Otp que se dispersan dorsalmente e invaden partes más laterales de la EAme, incluyendo la parte posterolateral del BSTM, la SEAme y la Me (Fig. 3.19E,H). En estas zonas se localizan algunas células con el neuropéptido VP, pero casi no se observan células con OT en la EAme a esta edad (Figs. 3.19D-L; 3.20G-O). En la Me, que contiene un grupo de células Otp (Figs. 3.19H-K; 3.20J,M), también tiene algunas células VP y OT en su parte posterior (MeP; Fig. 3.20M-O).

Por otro lado, el SPVt que es rico en células Otp desde etapas tempranas y también a esta edad (Fig. 3.19B), casi no contiene células con VP ni con OT (Fig. 3.19A,C). Tampoco se observan células con VP u OT en el área PO ventral, donde hay células Otp (Fig. 3.19A-C), excepto por unas pocas localizadas en una parte terminal del SO (Fig. 3.20B,C). Sin embargo, sí se observan células con VP en el núcleo supraquiasmático (SCh), localizado en el dominio Ch/SPa terminal (Figs. 3.19D,G; 3.20H,K). Aparentemente, estas células VP podrían originarse de una dispersión ventral desde la parte periventricular del SPVt, al igual que las células Otp que se observan periventricularmente en el dominio Ch/SPa (Figs. 3.19D,E,G,H; 3.20G,H,J,K). Por el contrario, no se observan células con OT en el núcleo SCh a esta edad (Figs. 3.19F,I; 3.20I,L). También se observan algunas células en la superficie del Ch/SPa que tienen VP (Fig. 3.19G) pero no OT (Fig. 3.19I), que coinciden con un grupo de células Otp en la misma zona (Fig. 3.19E).

Además, en la parte terminal del hipotálamo basal hay células VP y OT cerca de la superficie, localizadas en el SOtu, coincidentes con células Otp, que parecen ser una continuación de las observadas a nivel alar en la misma zona (en la superficie de Ch/SPa) y podrían dispersarse ventralmente por la superficie desde el SPVt (Figs. 3.19J-L; 3.20M-O). Así, en el SOtu se observa un grupo celular muy compacto que contiene VP y OT y que expresa Otp (Figs. 3.19J-L; 3.20M-O). En el núcleo arcuato (Arc), que es Otp positivo (Fig. 3.20M), no se observan células VP ni OT (Fig. 3.20M-O). En esta edad, tampoco la eminencia media (ME) contiene células con los neuropéptidos VP y OT.

En E18.5, etapa final del desarrollo prenatal del ratón, se observa un gran número de células diferenciadas que expresan VP y OT en el hipotálamo alar y basal y en la EAme (Fig.3.21). En este estadio, la expresión de ambos neuropéptidos es muy intensa. La distribución es generalmente similar a la descrita en E16.5, aunque ahora hay más células con OT, coincidiendo en gran medida con la localización de las

células VP, con algunas excepciones como en el núcleo SCh. En líneas generales, tenemos dos grandes grupos de células con VP y con OT, uno en el prosómero peduncular y otro en el prosómero terminal. El grupo peduncular se localiza principalmente en el hipotálamo a nivel del SPVp, con numerosas células en PVN, AH, LH y SO principal, además de algunas células en el BSTMh y BSTS. También se observan células con VP y con OT más dispersas en varias partes de la EAme telencefálica, incluyendo el BSTM a nivel comisural, en el BSTM posterolateral, en la SEAme y, menos frecuentemente, en la Me. También parecen existir algunas células con VP y/u OT ventrales al SPVp. Por su parte, el grupo terminal incluye una subpoblación de células con VP y/u OT en el SO terminal, en la superficie del SPVt. Ventralmente, incluye otra subpoblación celular periventricular con VP pero no OT localizada en el SCh. Además, incluye poblaciones superficiales de células con VP y con OT, localizadas a nivel alar en la superficie del Ch/SPa y, a nivel basal en el SOtu. Este último grupo es muy abundante. A continuación, se dan algunos datos sobre estos diversos grupos, junto con la referencia de la figura en la que aparecen.

En la dimensión radial del SPVp, muchas células que expresan VP y OT se encuentran formando grupos compactos en el PVN y en el SO, y en el LH se observan células más dispersas (Fig. 3.21). Además, algunas células VP y OT parecen localizarse en el BSTMh (Fig. 3.21C-F). También, se observan numerosas células VP y OT en otras zonas más dorsales en la EAme, como en el BSTM alrededor de la comisura anterior (Fig. 3.21A,B), en el BSTM posterolateral y zona sublenticular (Fig. 3.21C-F), y además hay algunas células en la Me (Fig. 3.21E-H). Ventralmente, unas pocas células parecen despegarse del SO principal y podrían estar invadiendo el Ch/SPa peduncular (Fig. 3.21E,F) o incluso la región del hipotálamo peduncular basal (Fig. 3.21H).

En el SPVt, se observan algunas células con VP y/u OT en el SOt (Fig. 3.21A,B). El dominio Ch/SPa terminal, en concreto el núcleo SCh, contiene células con el ARNm de VP, pero no con OT (Fig. 3.21C-F). Lateralmente al SCh, también se observan algunas células con VP, y células con OT (Fig. 3.11E,F). Por su posición, parte de estas células podrían estar en lo que queda del SuC (en el Ch/SPa terminal).

En el hipotálamo basal terminal, al igual que en E16.5, se observa un grupo muy denso de células VP y OT en el SOtu (Fig. 3.21G,H). Sin embargo, el núcleo Arc y la ME carecen de estos neuropéptidos a esta edad.

Por tanto, estos resultados muestran que se produce un aumento progresivo de la expresión de VP y OT a lo largo del desarrollo embrionario. A pesar de que las células con estos neuropéptidos parecen producirse en el dominio hipotalámico alar SPV (aunque ésto requiere demostración experimental, que es el objetivo del último

apartado de los resultados), desde estadios embrionarios se observan células con expresión de estos neuropéptidos en territorios hipotalámicos fuera del SPV, como el dominio Ch/SPa (a nivel alar) y el hipotálamo tuberal (a nivel basal), y extrahipotalámicos, como la EAme.

### 3.2.2 Patrón de expresión de VP en etapas postnatales

En los estadios postnatales, los elevados niveles de expresión de VP permiten una buena detección inmunohistoquímica. La VP se acumula en el soma y las dendritas, además de en los axones y terminales, por lo que mediante inmunocitoquímica se puede observar la morfología de las neuronas y de sus prolongaciones axonales.

El número de neuronas que expresan VP y la intensidad de la expresión en animales de ambos sexos no se estabilizan sino que continúan aumentando postnatalmente, por lo menos hasta siete días después del nacimiento (último estadio estudiado). En las tres edades analizadas, P0, P3 y P7, el patrón de expresión de VP es parecido con pequeñas salvedades. A nivel hipotalámico, se observan neuronas que, como ocurría en los estadios prenatales, se localizan tanto a lo largo de la dimensión radial del SPV, como en otros territorios quiasmáticos, hipotalámicos basales y amigdalinos. Además, se puede apreciar el complejo sistema de fibras inmunorreactivas de VP que se distribuye dentro de la dimensión radial del SPV y en dominios dorsales y ventrales al mismo (Figs. 3.22; 3.23; 3.24; 3.25).

La mayoría de las neuronas inmunorreactivas para VP se localizan en los núcleos PVN, el SO principal y en áreas del hipotálamo situadas entre ambos núcleos (Figs. 3.22; 3.23; 3.24C-F). En el PVN hay expresión de VP en diferentes subdivisiones, observándose tanto neuronas magnocelulares como parvocelulares desde P0 (Figs. 3.22D-I; 3.23). Mezcladas con estas neuronas, se identifican numerosas fibras (Fig. 3.22G-I). Algunas de estas fibras alcanzan el núcleo hipotalámico periventricular (Pe), un núcleo alargado situado paralelo al tercer ventrículo, que también contiene algunas neuronas parvocelulares a nivel del SPVt y Ch/SPa (Fig. 3.22F,I; 3.24B). Desde P3, se observan procesos VP inmunorreactivos que contactan con el epitelio ependimario y que se originan tanto en neuronas del PVN, como del Pe (Fig. 3.24B,F).

En las áreas hipotalámicas anterior y central (AHA y AHC) y el área lateral hipotalámica (LH) a nivel del SPVp se observa una mezcla de neuronas de diferentes tamaños con claro predominio de neuronas magnocelulares, las cuales parecen incrementar en número con la edad (Figs. 3.22D-I; 3.23; 3.24C,D). Muchas de las neuronas del LH se orientan paralelas a la dimensión radial del dominio SPVp, entre las fibras vasopresinérgicas que se extienden desde el PVN al SO.

Las neuronas con niveles más altos de expresión de VP se encuentran en el núcleo SO principal, que contiene principalmente neuronas magnocelulares formando un núcleo compacto (Figs. 3.22D-I; 3.24E; 3.25D). Sin embargo, el núcleo SO presenta una subdivisión rostral, que correspondería con la superficie del SPVt, que contiene neuronas dispersas, más pequeñas y que empiezan a expresar VP más tarde (Figs. 3.22A-C,F; 3.24A). En el SO la densidad de fibras se intensifica en P3 y P7 (Fig. 3.22D-I). Algunas de estas fibras discurren paralelas al tracto óptico situándose en la superficie del dominio Ch/SPa, donde también se observan algunas neuronas (Figs. 3.22D-I; 3.24E). En posición medial, en este dominio se localiza el núcleo SCh, que posee un grupo compacto de neuronas parvocelulares que a estas edades expresan niveles bajos de VP (Fig. 3.22D-F).

Los axones que expresan VP de las neuronas del PVN, el SO, el AH y el LH cursan ventralmente hacia territorios basales hipotalámicos y cursan hacia la neurohipófisis a través de la eminencia media (ME) (Figs. 3.23; 3.24G,H). La ME está en el hipotálamo basal terminal, lo que significa que los axones procedentes del SPVp han de cruzar el límite interprosomérico y, posiblemente lo hacen a nivel basal (Fig. 3.24G,H). La ME muestra una inervación compacta con gran cantidad de terminales axónicos y fibras de paso (Figs. 3.23B,C,E,F; 3.24G,H). En estos niveles caudoventrales, ya en el hipotálamo basal se identifica un grupo compacto con una mezcla de neuronas magnocelulares y parvocelulares embebidas entre numerosas fibras vasopresinérgicas que forma el núcleo supraóptico tuberal (SOtu) (Figs. 3.23; 3.24E,G). Este núcleo parece recibir algunos axones del tracto vasopresinérgico que se extiende del SPVp a la ME. Además, los axones de las neuronas VP del SOtu parecen unirse al tracto descendente que alcanza la ME (Figs. 3.23E,F; 3.24G).

En el área preóptica (PO) se detectan fibras VP positivas ya desde P0 que se hacen más evidentes en P3 y P7. Además, a nivel comisural, también se observan algunas neuronas inmunoreactivas (Fig. 3.22A-F).

En la amígdala medial extendida (EAme) se observan células que expresan VP en el BSTMh (Figs. 3.22G-I), que como hemos visto constituye la parte más dorsal del dominio SPV, pero también en partes telencefálicas del BSTM (Figs. 3.22G-I; 3.23A-C; 3.25B,C) y en la Me, tanto en su parte anterior (MeA; Fig. 3.25D) como en su parte posterior (MeP; Figs. 3.22G-I; 3.23A,B; 3.25E,F). Además, se observan numerosas fibras con varicosidades que discurren desde el PVN y el SO a la EAme (Figs. 3.22G-I; 3.23A-C). La mayoría de estas fibras terminan en el BSTM (Fig. 3.22G-I), pero también alcanzan la Me tanto su parte anterior (Figs. 3.22D-F; 3.25D) como la posterior (Figs.3.22G-I; 3.23A,B; 3.25E,F). Algunas de estas fibras son muy gruesas y parecen ser parte de las dendritas de las neuronas magnocelulares del SO (Fig. 3.25D).

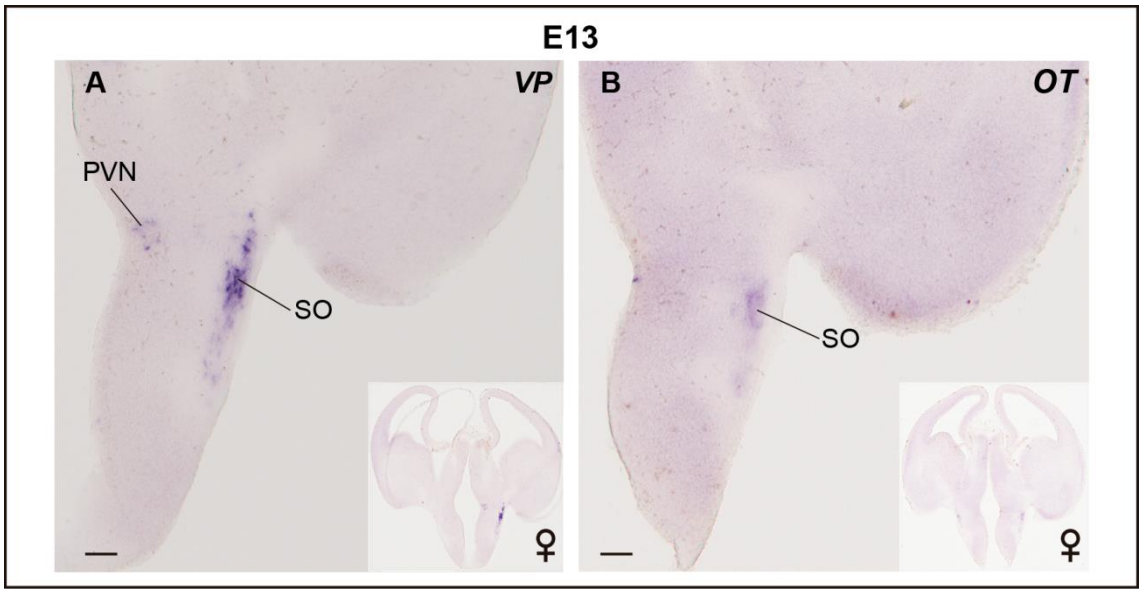



**Figura 3.15. Expresión de vasopresina y oxitocina en el SPV en E13.** Hibridación *in situ* para los genes de VP (A) y OT (B) en secciones adyacentes de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E13, cortadas con un plano oblicuo. En E13 se identifican las primeras células que contienen el ARNm de VP en los núcleos hipotalámicos paraventricular (PVN) y supraóptico principal (SO). A esta edad, OT se expresa únicamente en el SO. Además, VP se expresa más intensamente que OT. Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

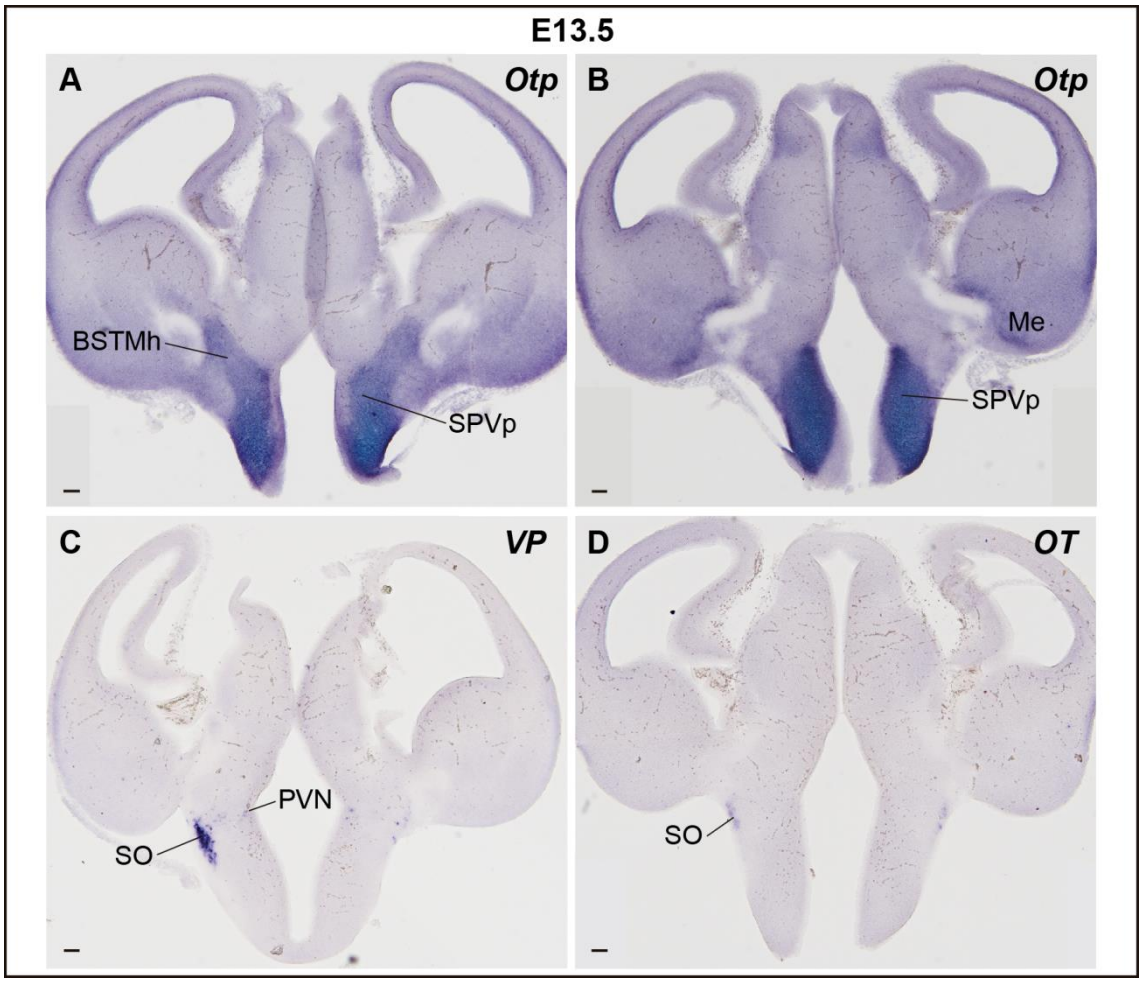



**Figura 3.16. Expresión de VP y OT en relación con el marcador de referencia Otp en E13.5.** Hibridación *in situ* para los genes de Otp (A,B), VP (C) y OT (D) en secciones oblicuas de 80 µm de dos cerebros de embrión de ratón E13.5 (cerebro 1: A,B; cerebro 2: C,D). A,B: En E13.5 Otp se expresa abundantemente en el dominio SPV, que incluye los núcleos PVN y SO dentro de su dimensión radial. Además, las células Otp parecen dispersarse dorsalmente hacia la EAme y ventralmente hacia el dominio Ch/SPa. C: Las células VP están localizadas dentro del dominio radial SPV, poblando densamente el SO. D: La expresión de OT en esta edad es menor que la de VP. Se identifican células OT en el SO, dentro del dominio radial del SPV que es Otp positivo. A-D: Fotomontajes. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

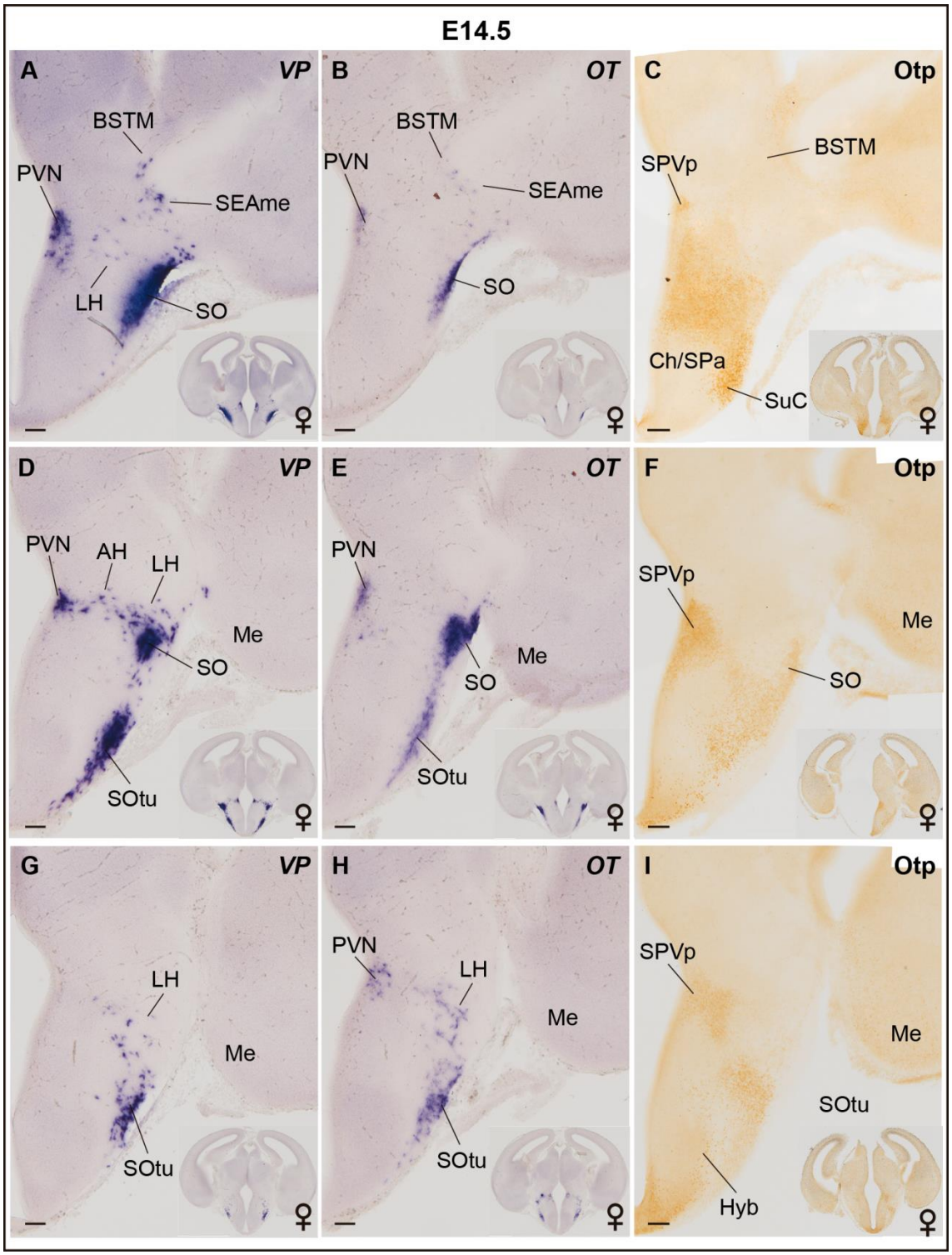



**Figura 3.17. Expresión de vasopresina y oxitocina en el SPV, en la amígdala medial extendida y en el dominio quiasmático en relación con la expresión de Otp en E14.5.** Hibridación *in situ* para los genes de VP y OT (A,B,D,E,G,H) e inmunohistoquímica para Otp (C,F,I) en secciones oblicuas de 80 µm de dos cerebros de embrión de ratón E14.5 [cerebro1: A,B,D,E,G,H; cerebro 2: C,F,I], desde niveles rostrodorsales (A-C) a caudoventrales (G-I). Hay una gran cantidad de células VP y OT en los núcleos PVN y SO, así como células dispersas en la EAme, en el dominio Ch/SPa y en partes más ventrales del hipotálamo, todas ellas conteniendo células Otp. En esta edad, en la amígdala medial (Me) no se observan células VP

ni OT pero sí hay expresión de Otp (F,I). Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. C,F,I: Fotomontajes. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

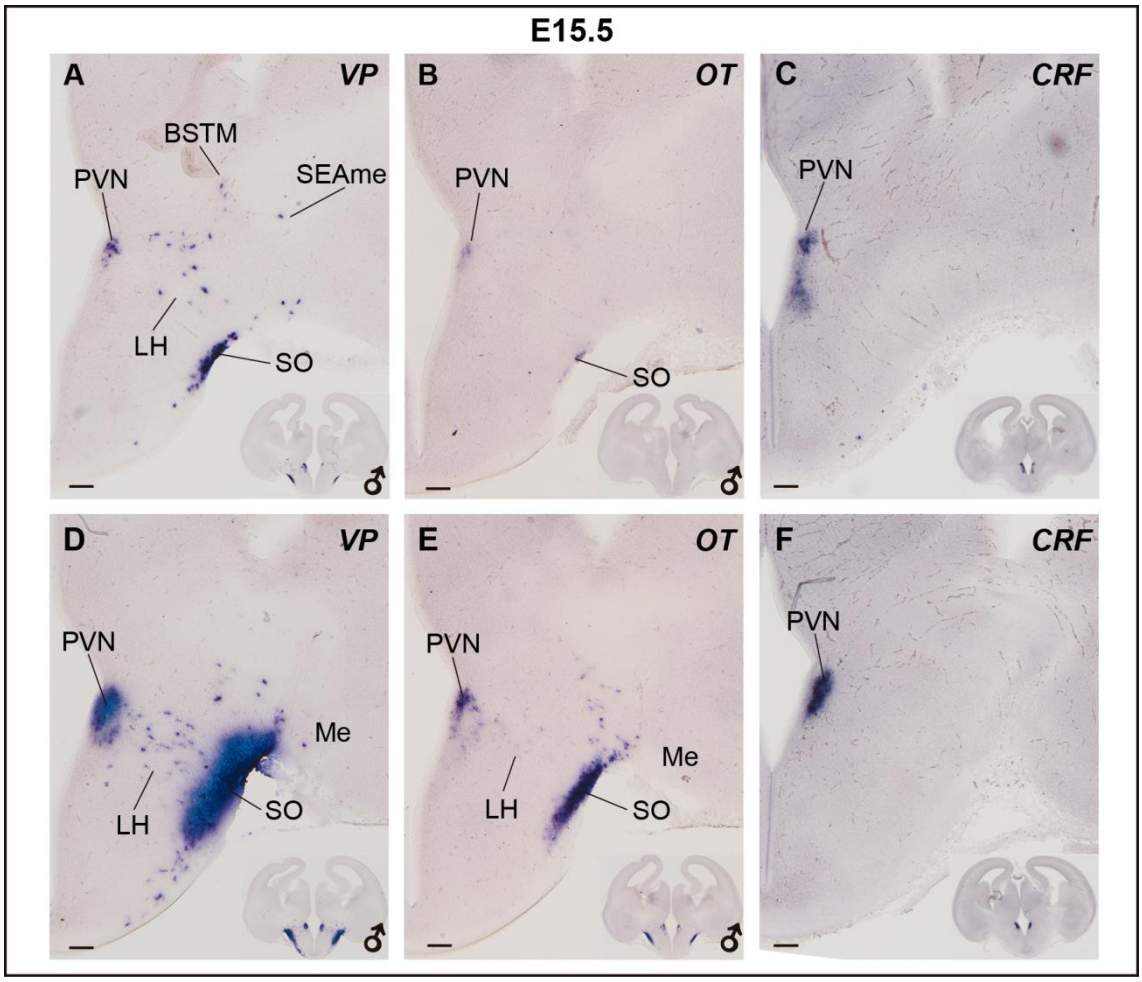



**Figura 3.18. La hormona liberadora de corticotropina se expresa en el SPV pero no lo hace en la amígdala medial extendida.** Hibridación *in situ* para los genes de VP, OT y CRF en secciones oblicuas de 80 µm de dos cerebros de embrión de ratón E15.5 (cerebro 1: A,B,D,E; cerebro 2: C,F), en un nivel rostrodorsal (A-C) y otro caudoventral (D-F). VP y OT se expresan abundantemente en los núcleos PVN y SO y en la amígdala medial extendida (EAme) mientras que CRF se concentra únicamente en el PVN, no apreciándose ninguna célula en la EAme. Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

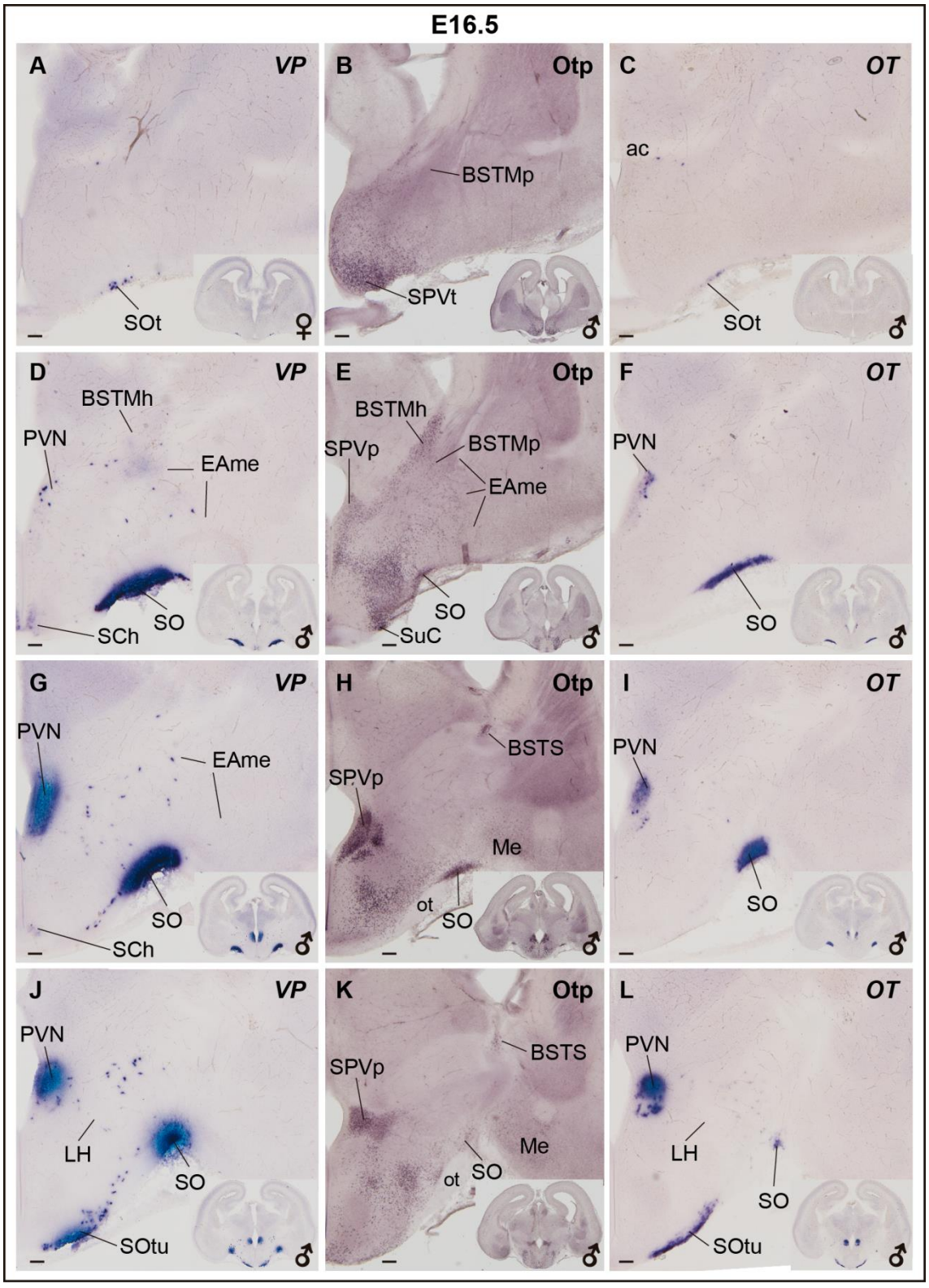



**Figura 3.19. Vasopresina y oxitocina se expresan abundantemente en el SPV y algunas células alcanzan la amígdala medial extendida y otras áreas.** Detalles de varias hibridaciones *in situ* para los genes VP y OT y de una inmunohistoquímica para Otp revelada con DAB-Ni en secciones oblicuas de 80 µm de cerebros de embrión de ratón E16.5, desde niveles rostrodorsales (A-C) a caudoventrales (J-L). Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. VP y OT se expresan intensamente en los núcleos PVN, SO,

SOtu y en la EAme, todos ellos conteniendo células Otp. Las poblaciones de VP, OT y Otp en los núcleos PVN y SO principal se encuentran en el dominio radial del SPV. En cambio, las células VP y OT en la EAme parecen provenir mayormente de una dispersión dorsal desde el dominio SPV peduncular (exceptuando las del BSTMh) tanto a nivel peduncular como terminal. Hay alguna célula VP y OT en la amígdala medial posterior (MeP). Además, ventralmente al SPV, hay algunas células con VP y/u OT en el dominio Ch/SPa, tanto a nivel terminal como peduncular, solapándose con células con Otp. A nivel del Ch/SPa terminal, hay células con VP en el núcleo supraquiasmático. A nivel terminal basal, también hay células con VP y/u OT en el SOtu (J,L). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

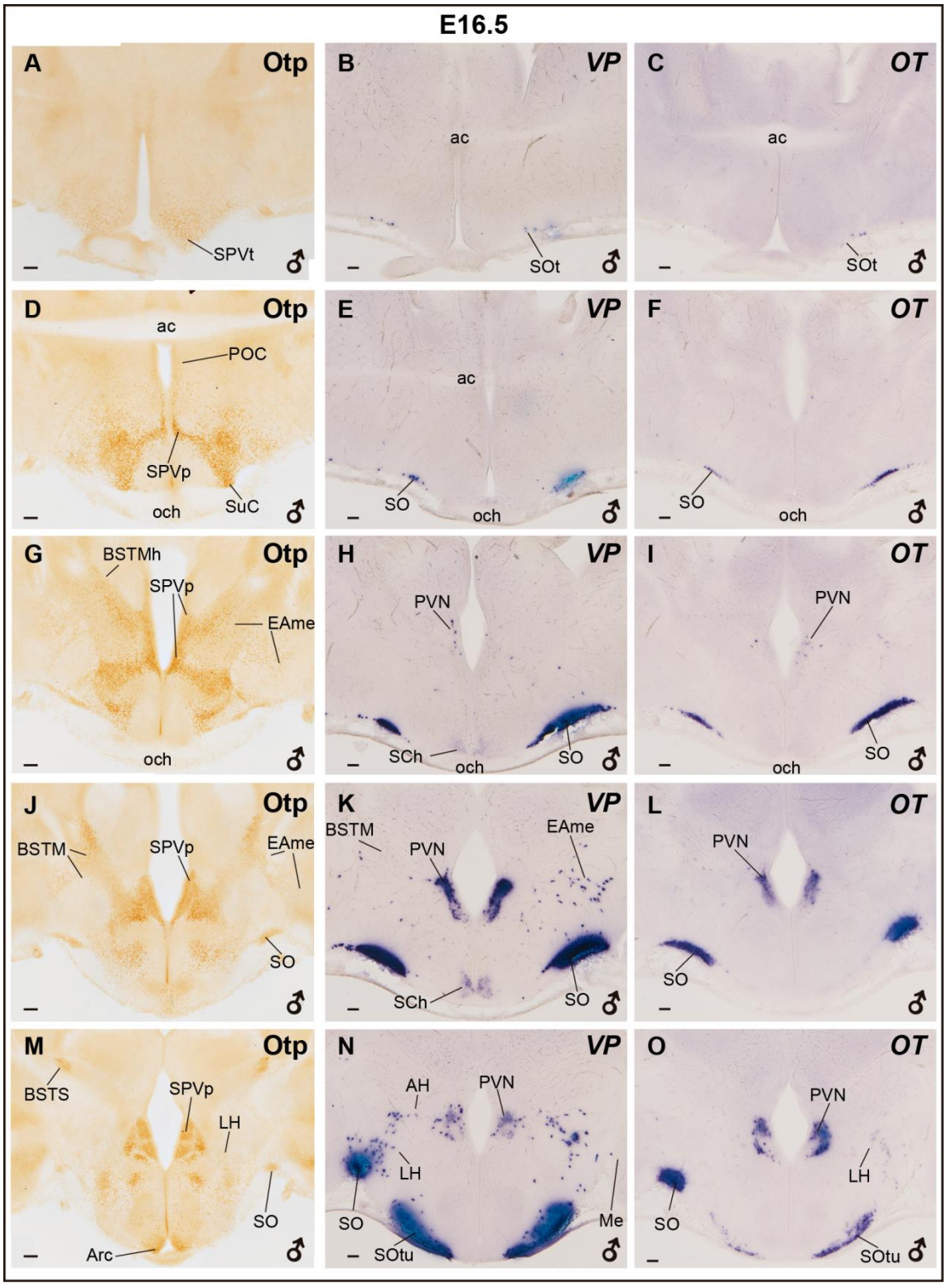



**Figura 3.20. Aparente dispersión de células vasopresinérgicas y oxitocinérgicas desde el dominio SPV hacia la amígdala medial extendida y otras áreas.** Detalles de hibridación *in situ* para los genes VP y OT y de una inmunohistoquímica para Otp en secciones oblicuas de 80 µm de cerebros de embrión de ratón E16.5, desde niveles rostrodorsales (A-C) a caudoventrales (M-O). Las imágenes de Otp se muestran como referencia para localizar el dominio SPV y tanto las poblaciones que se encuentran dentro de su dominio radial (PVN, SO, hipotálamo anterior y lateral) como las que aparentemente se dispersan dorsalmente hacia el

PO (A,D) y la EAme (G,J,M) y, ventralmente, hacia el dominio Ch/SPa y el hipotálamo basal (G,J,M). La expresión de VP en la EAme es mayor que la de OT (H,I,K,L). Alguna célula VP y OT se localiza en la amígdala medial posterior (MeP; N,O). A nivel del Ch/SPa terminal, el núcleo supraquiasmático contiene células VP y Otp mientras que carece de OT (G-L). A nivel basal terminal, el SO tuberal contiene un gran número de células VP y OT, así como Otp (M-O). Mientras el SO principal (localizado en la superficie del SPVp) contiene numerosas células con VP y/u OT (E,F,H,I,K,L,N,O), a esta edad se distinguen también algunas células con el ARNm de estos péptidos en una subdivisión terminal del SO (SOt; B,C). A,D,G,J,M: Fotomontajes. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

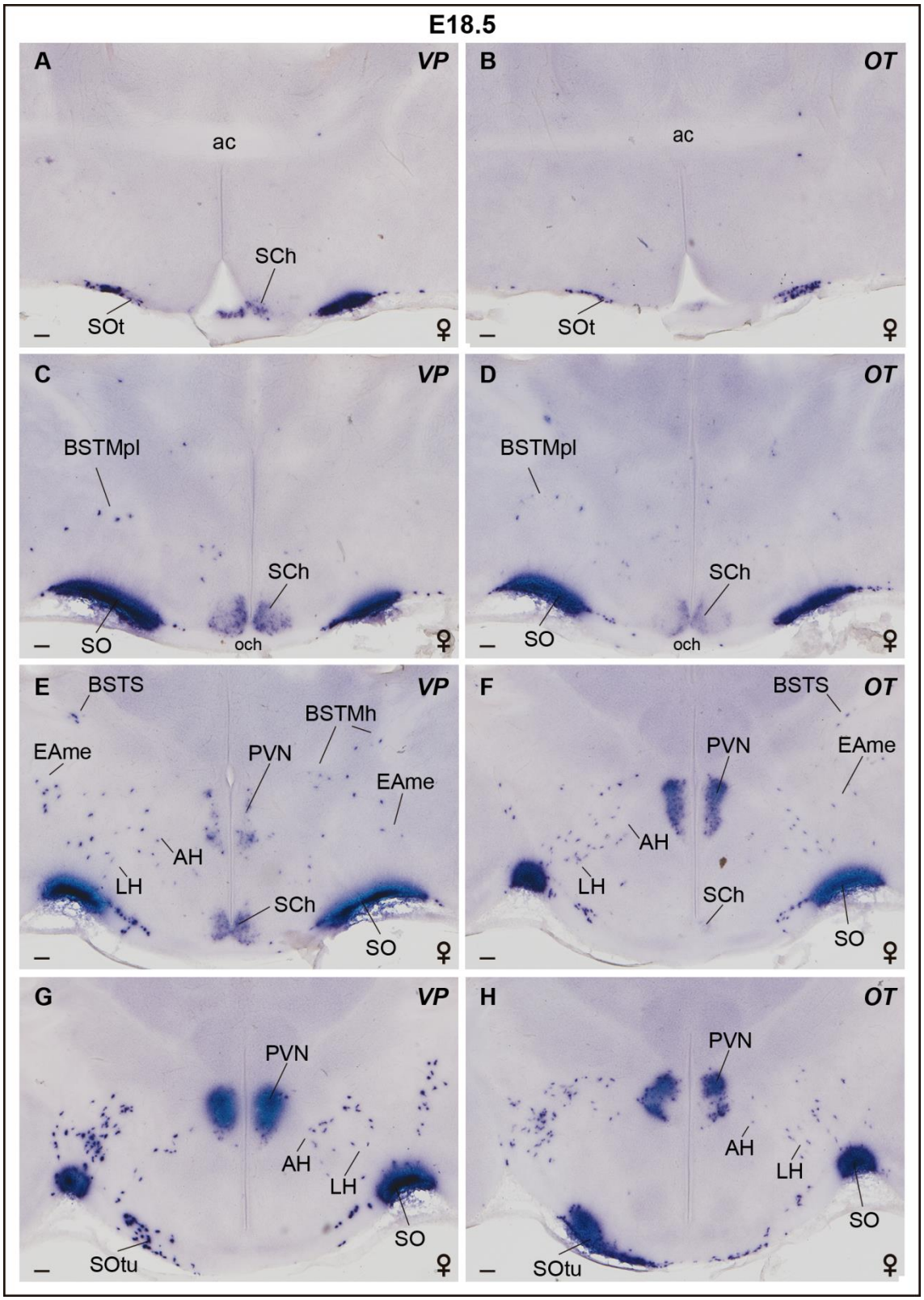



**Figura 3.21. En E18.5, etapa final del desarrollo prenatal, se localiza un gran número de células que expresan vasopresina y oxitocina en el SPV, en otras partes del hipotálamo y en la amígdala medial extendida.** Hibridación *in situ* para los genes de VP y OT en secciones oblicuas de 80 µm de cerebros de embrión de ratón E18.5, desde niveles rostrodorsales (A,B) a caudoventrales (G,H). Los núcleos hipotalámicos PVN y SO (en el SPVp) muestran una

expresión muy intensa de ambos neuropéptidos. Además, un conjunto celular muy abundante con ambos neuropéptidos se localiza en el hipotálamo anterior (AH) y lateral (LH), dentro del dominio radial del SPVp (E-H). Otras células se observan dorsalmente poblando territorios de la EAme (C-F). Alguna célula VP y OT se localiza en la amígdala medial tanto a nivel anterior como posterior (MeP; G,H). En el SPVt, hay algunas células con VP y/u OT en el SO terminal (A,B). Ventralmente al SPVt, también hay células con VP y/u OT en el núcleo supraquiasmático (SCh; C-E), en lo que queda del SuC (a nivel superficial del dominio SCh/SPa; E,F), así como en el SOtu (a nivel basal; G,H). A-H: Fotomontajes. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

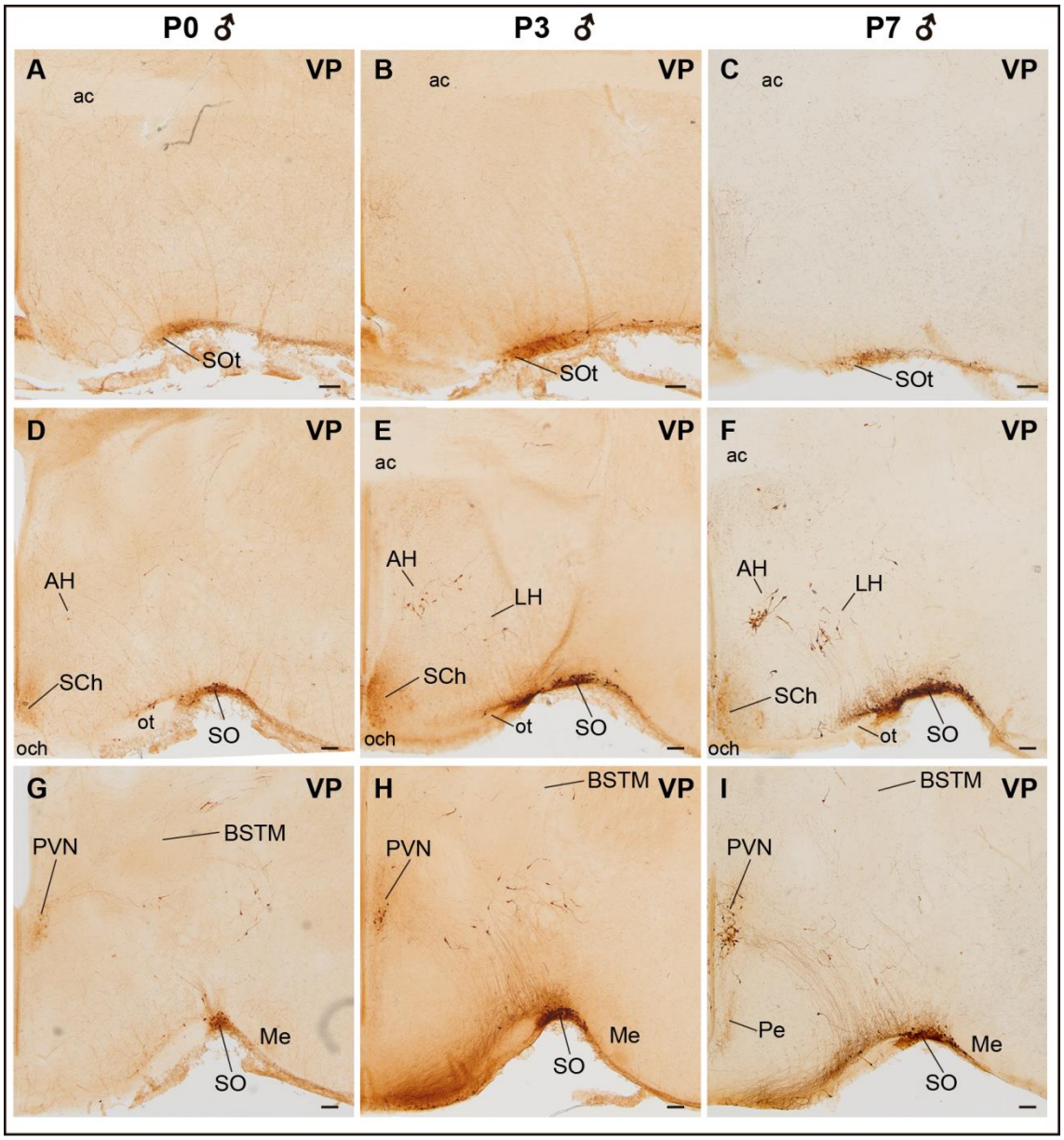



**Figura 3.22. Distribución de vasopresina en el dominio SPV y en la amígdala medial extendida en etapas postnatales.** Inmunoshistoquímica para VP en secciones oblicuas de 80 µm de cerebros de ratones postnatales (machos), desde niveles rostrodorsales (A-C) a caudoventrales (G-I). Se muestran tres estadios diferentes: P0, el día del nacimiento, y P3 y P7, tres y siete días después, respectivamente. Se observa una gran expresión de VP en estadios postnatales, intensificándose con la edad. Hay un gran número de células en los núcleos PVN, SO, AH, LH y algunas alcanzan la EAme, incluyendo la amígdala medial. Los axones de las neuronas del PVN proyectan hacia el SO, dentro del dominio radial del SPV y, además, lo hacen tangencialmente hacia niveles ventrales del hipotálamo (G-I). Además se observan algunas células en el SO terminal (SOt), así como en el núcleo SCh. A-I: Fotomontajes. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

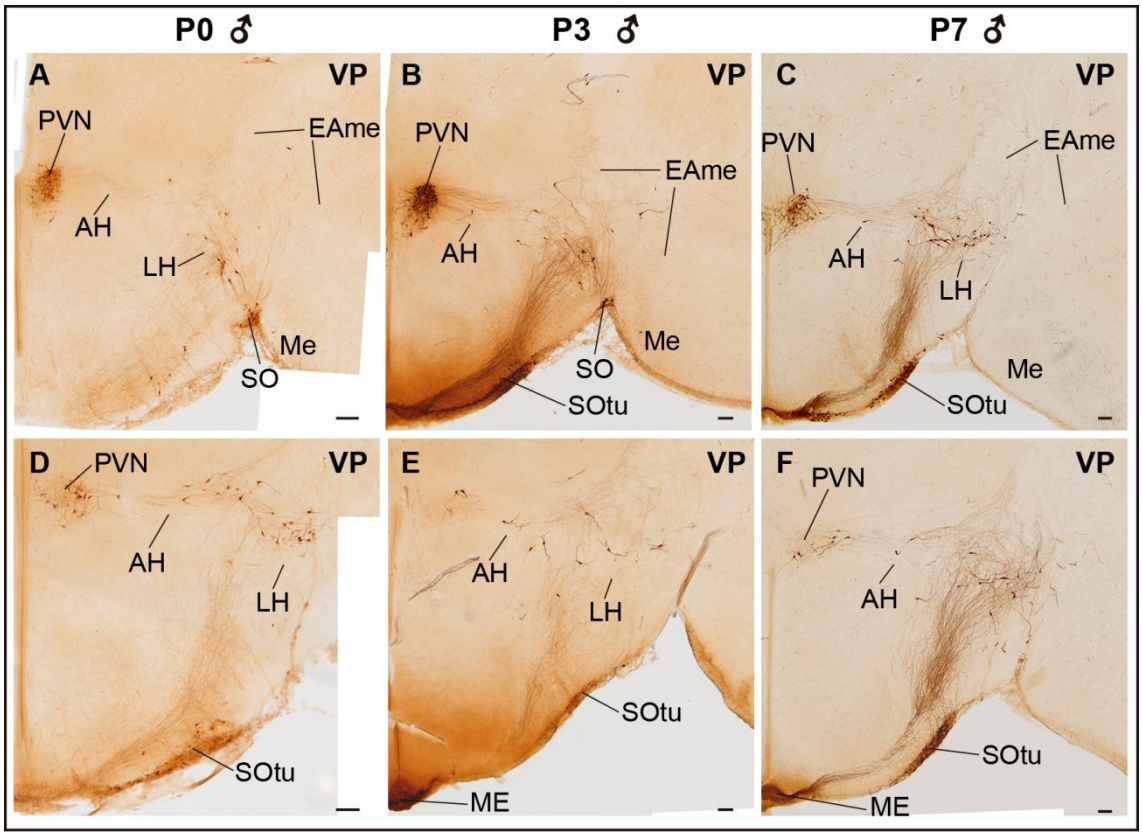



**Figura 3.23. Proyecciones axonales de neuronas vasopresinérgicas hacia territorios basales hipotalámicos.** Inmunoshistoquímica para VP en secciones oblicuas de 80 µm de cerebros de ratones postnatales, a niveles caudoventrales. Las neuronas que expresan VP en los núcleos PVN y SO y el hipotálamo anterior (AH) y lateral (LH) proyectan sus axones ventralmente hacia el hipotálamo basal, alcanzando la eminencia media (ME). Ésto implica que para alcanzar la ME los axones han de cruzar el límite interprosomérico, para pasar del prosómero peduncular al terminal, y es posible que este cruce se produzca a nivel basal. La ME presenta una gran cantidad de terminales axónicos marcados con VP y fibras de paso. Además, un grupo de cuerpos celulares con VP se sitúan en el núcleo supraóptico tuberal (en la superficie del hipotálamo basal terminal). A-F: Fotomontajes. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

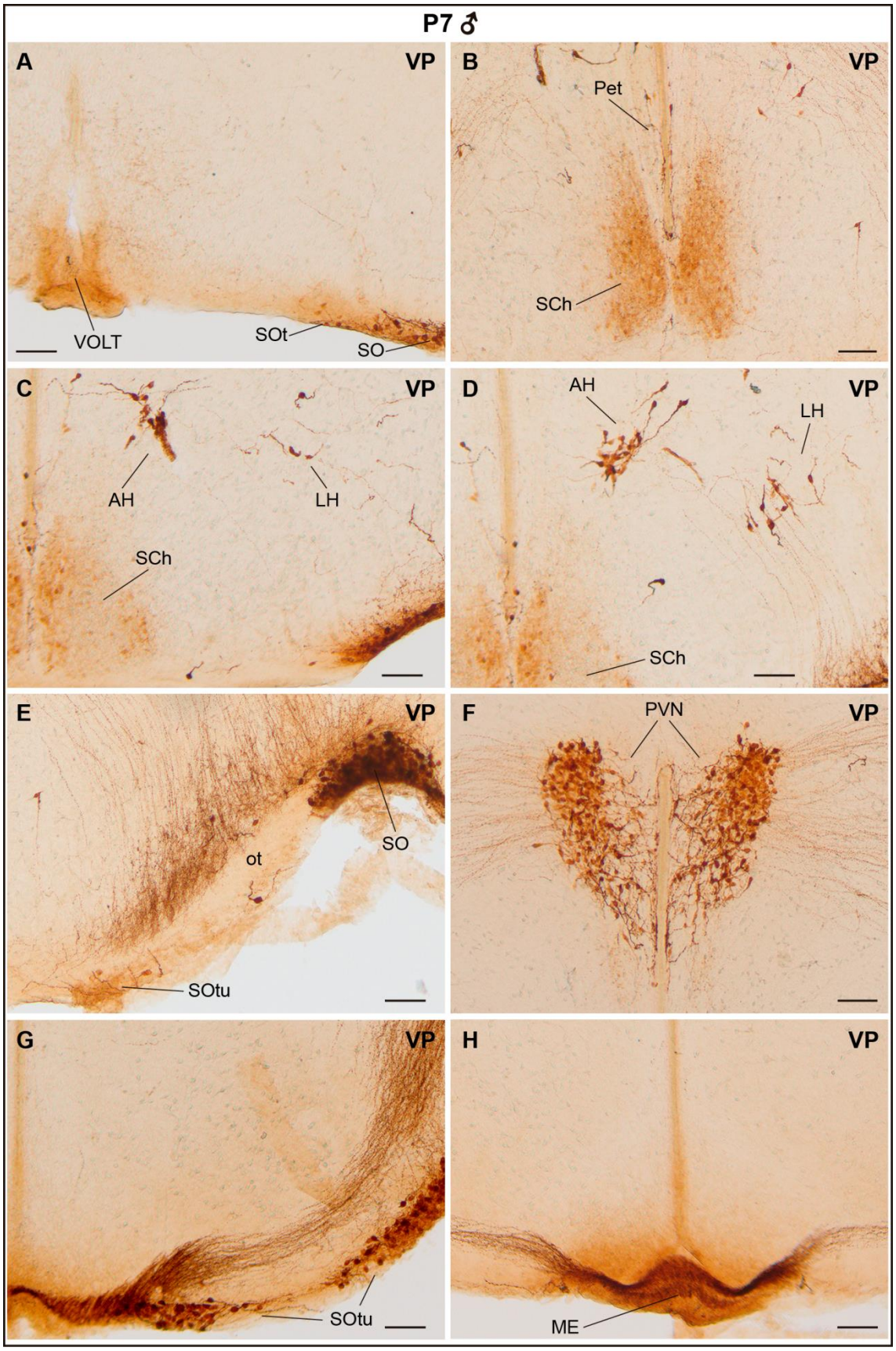



**Figura 3.24.** Detalles de una inmunoshistoquímica para VP en secciones oblicuas de 80 µm de un cerebro de ratón P7, desde niveles rostrodorsales (A) a caudoventrales (H). A: Terminales

axónicos en el órgano vascular de la lámina terminalis. Tanto el SOt como el SO contienen células con VP. Mientras las del SOt son parvocelulares, las del SO son mayoritariamente magnocelulares. B: El SCh contiene células parvocelulares VP. Se observan células a nivel ventricular del núcleo periventricular terminal (Pet). C: Relación de las neuronas magnocelulares VP con vasos. D: Dos grupos diferentes de neuronas VP en el AH y en el LH (a nivel del SPVp). A nivel ventricular se observan algunas células. F: Las neuronas magnocelulares del PVN tienen procesos en relación con el epitelio ependimario. G: Algunos axones VP del tracto que se dirige a la ME parecen dar colaterales para el SOtu, y además, los axones de las células VP del SOtu parecen unirse al tracto. H: La ME presenta una gran cantidad de terminales axónicos marcados con VP. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

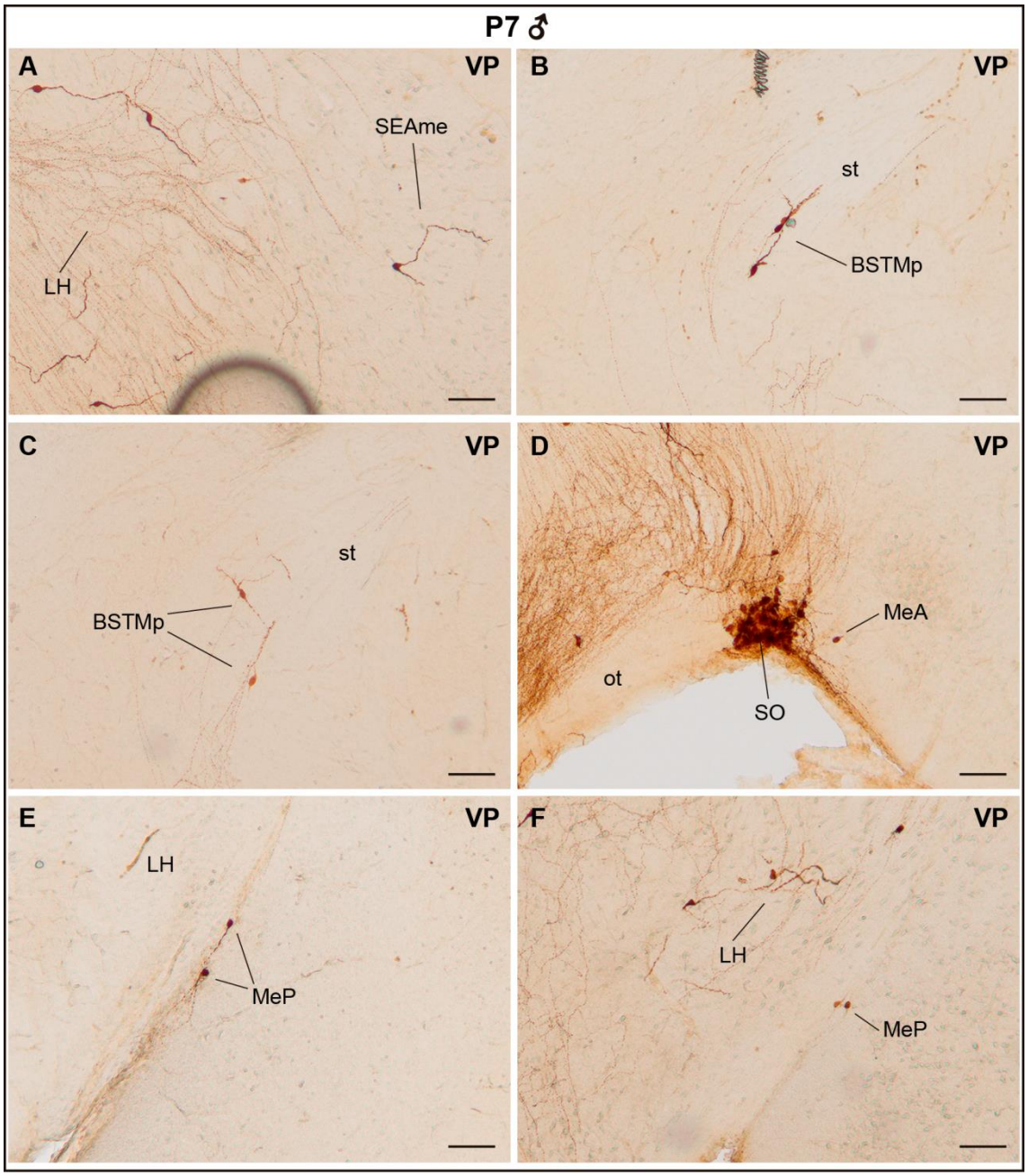



**Figura 3.25. Expresión de VP en la EAme.** Detalles de una inmunoshistoquímica para VP en secciones oblicuas de 80 µm de un cerebro de ratón P7. Se observan neuronas VP en la parte sublenticular de la EAme (A), en la parte posterior del BSTM telencefálico (B,C) y en la Me, tanto en su parte anterior (D) como posterior (F). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

## 3.3 ENSAYOS DE MIGRACIÓN

Los estudios previos del grupo confirman que algunas neuronas de la EAme se originan en el dominio hipotalámico SPV, y se sugirió que algunas de estas neuronas expresan vasopresina (Bupesh *et al*. 2011a). Sin embargo, no está claro qué divisiones prosoméricas del SPV y en qué medida contribuyen a la formación de la EAme, ni tampoco el fenotipo de las neuronas que migran a la EAme (más allá de que tienen Otp). En los apartados anteriores de esta tesis, se ha intentado discriminar entre ambas divisiones del SPV, y se han realizado algunas sugerencias sobre los derivados y posibles rutas de migración desde cada una. Esta sección aporta evidencia experimental sobre la contribución diferencial de las divisiones terminal y peduncular del SPV, el SPVt y el SPVp, respectivamente.

Los ensayos de migración realizados en esta parte del trabajo permitieron determinar dicha aportación. Para ello, se combinaron cultivos organotípicos (usando marcaje fluorescente de clones celulares en preparados *ex-vivo* de rodajas de prosencéfalo embrionario) con técnicas de inmunofluorescencia o de hibridación *in situ* fluorescente, centrándonos principalmente en el marcaje de vasopresina. Como la vasopresina no se empieza a detectar con anticuerpos en células del hipotálamo hasta E14.5, se usó esta edad embrionaria para realizar los cultivos. De esta forma, se observaron migraciones radiales en el dominio radial SPV y tangenciales hacia dominios adyacentes al SPV, en concreto, hacia el dominio PO, el Ch/SPa y EAme.

Los apartados siguientes detallan los resultados de dichos ensayos de migración, analizando de manera independiente la aportación de las partes terminal y peduncular del dominio SPV a otras zonas. Además, como punto de comparación, se ha añadido un último apartado donde se muestran los resultados de ensayos de migración desde el PO a otras áreas.

### 3.3.1 La división terminal del dominio SPV produce células para el área preóptica ventral y la región quiasmática terminal

Para estudiar la contribución del SPVt, se realizaron cultivos organotípicos en secciones de cerebro de embrión de ratón E14.5 cortadas con un plano oblicuo que, como ya se ha comentado, es paralelo al corredor celular amígdalo-hipotalámico. El trazador celular fluorescente (CMFDA) se colocó en el SPVt. Esta división, la más rostral del SPV, se visualiza en niveles de corte rostrodorsales y en E14.5 se caracteriza por la expresión de un grupo compacto de células Otp que se extiende desde la zona periventricular a la superficie. Por ello, se comparó con Otp en

secciones similares para asegurar la ubicación del trazador celular en el SPVt (Fig. 3.26A-C).

Los resultados se muestran en cuatro casos seleccionados donde el trazador celular CMFDA se colocó en el SPVt (Fig. 3.26D-F). En tres de los casos, el trazador se sitúa en el SPVt, incluyendo la zona ventricular o periventricular (hemisferio izquierdo de caso mBe046-3-2; caso mBe071-2-3, y caso mBe064-1-4; en Fig. 3.26D-F); en el cuarto caso (hemisferio derecho de mBe046-3-2), el trazador celular CMFDA se sitúa en la parte más dorsal del SPVt y más ventral del área preóptica, implicando a ambos dominios. A estos niveles no se visualiza el SPVp, asegurando que en ninguno de los cuatro casos se colocara el trazador en la división peduncular del SPV. Para comprobar la ubicación del trazador, compárese con las imágenes de Otp en la figura 3.26A-C.

Tras dos días de cultivo, se observaron células marcadas con el trazador fluorescente (verdes) migradas desde el sitio de aplicación del trazador, es decir, el SPVt. El patrón de migración observado en los tres casos puros de inyección en SPVt fue muy similar entre ellos, y parcialmente diferente al observado cuando el trazador también implicó la zona preóptica.

Comparando con la disposición de la glía radial que se ha estudiado en la sección 3.1, se observaron migraciones radiales y tangenciales desde el SPVt (Fig. 3.26D-F). En todos los casos, las células migradas ocuparon posiciones donde también existen células con Otp.

Por un lado, algunas células se desplazaron lateralmente desde la periferia del ventrículo llegando a partes laterales del manto (Fig. 3.26E) y a la superficie del dominio radial del SPVt (Fig. 3.26D-F).

Por otro lado, otras células se desplazaron tangencialmente, tanto dorsalmente como ventralmente. Dorsalmente al SPVt, se observaron células migradas a la parte ventral del dominio PO (Fig. 3.26D-F), y ventralmente al SPVt, se observaron células que alcanzaron el dominio Ch/SPa terminal (Fig. 3.26D,F). La migración al Ch/SPa se observó mejor en el caso mBe064-1-4 (Fig. 3.26F), al presentar un plano de corte más inclinado. En este caso, se observaron dos rutas de migración al Ch/SPa, una periventricular y otra siguiendo la superficie subpial (Fig. 3.26F).

Por otro lado, en el caso con el trazador en SPVt y PO ventral (Fig. 3.26D, hemisferio derecho), aparte de las migraciones señaladas antes, se observó una corriente de células migradas que llegaron a la comisura anterior, extendiéndose en relación a ella en el dominio del POC; algunas atravesaron la línea media hacia el otro hemisferio.

Estos resultados apoyan las migraciones de las células Otp sugeridas en la sección 3.1, demostrando que el SPVt produce células que migran tangencialmente, dentro del prosómero terminal, al dominio PO ventral y a la región terminal del Ch/SPa.

### 3.3.2 La división peduncular del dominio SPV produce células para el hipotálamo anterior y lateral, el núcleo supraóptico principal, la amígdala medial extendida y el dominio quiasmático peduncular

Para el estudio de la contribución de la división peduncular del SPV se procedió de manera similar a la descrita en el apartado anterior. Se realizaron cultivos organotípicos de secciones de cerebro de embrión de ratón E14.5 con un plano de corte oblicuo. Se escogieron secciones a niveles más ventrocaudales que las usadas en el estudio del SPVt. El trazador CMFDA se colocó en las zonas ventricular y periventricular del SPVp. La división peduncular del SPV se caracteriza por la expresión de Otp. Por ello, se usó Otp como marcador de referencia a la hora de colocar el trazador celular en el SPVp (Figs. 3.27A,D,G,J; 3.28C). También se comparó con VP que se expresa en los núcleos hipotalámicos PVN y SO, así como en el AH, en el LH y en la EAme (Fig. 3.28A). Los resultados se muestran en los seis casos seleccionados de las figuras 3.27 y 3.28. En todos ellos, el trazador se colocó en el SPVp, aunque a diferentes niveles de corte, incluyendo sus subdivisiones dorsal, central y ventral.

Tras dos días de cultivo, se observó migración celular desde el SPVp. Se observaron numerosas células marcadas con el trazador migradas hacia la superficie del dominio SPVp y hacia la EAme y el dominio Ch/SPa, con diferencias en función del lugar de aplicación del trazador dentro del SPVp. En todos los casos, las células migradas ocuparon posiciones donde también existen células con Otp.

Cuando el trazador afectó a la zona central/ventral del SPVp, se observó una gran cantidad de células migradas lateralmente en el hipotálamo anterior (AH) y lateral (LH), y algunas alcanzaron la superficie (Fig. 3.27B,C). La comparación con la glía radial indicó que las células que se desplazaron lateralmente hacia la superficie del SPVp siguen una migración radial (Figs. 3.27C; 3.28B,D). Muchas de estas células que alcanzaron la superficie se establecieron en el núcleo principal SO (Figs. 3.27C; 3.28B,D). Ésto demuestra que el SO principal se encuentra en la dimensión radial del SPVp. Además, se observaron numerosos procesos celulares marcados que parecían axones siguiendo la dimensión radial, desde el punto de ubicación del trazador al SO (Fig. 3.27C). En estos casos, también se observaron células marcadas desplazadas tangencialmente tanto dorsalmente, como ventralmente (Fig. 3.27C). Las células desplazadas ventralmente invadieron posiblemente el domino Ch/SPa a nivel

peduncular. Algunas de estas células migraron periventricularmente, mientras otras lo hicieron por zonas más laterales del manto.

Cuando el trazador se aplicó afectando a la parte más dorsal del SPVp, se observó un grupo compacto de células en el BSTM, representando la parte hipotalámica de este núcleo (BSTMh; Figs. 3.27F,I,L; 3.28D), solapada con un contingente similar en forma de espiga de células con Otp (Figs. 3.27D,G,J; 3.28C). En algunos casos, los procesos de estas células también se marcaron, estando alineados siguiendo la hilera de células a lo largo del BSTMh (por ejemplo, Fig. 3.27I). Según se explicó en la sección 3.1, esta parte del BSTM se encuentra dentro del dominio radial del SPV, y adquiere esta forma espigada debido a la deformación del tejido alrededor de la comunicación interventricular de Monro (que comunica el ventrículo telencefálico con el hipotalámico).

Además, tanto en los casos de aplicación del trazador restringido al SPVp dorsal (Fig. 3.27F,I), como en los casos en los que estaba implicada además la parte central del SPVp (Fig. 3.27F,L, 3.28B,D), se observaron células que invadieron mediante migración tangencial partes más laterales de la EAme (Fig. 3.27F,L; 3.28B,D).

Estos resultados, junto con los obtenidos en las secciones 3.1 y 3.2, sugieren que el SO y el BSTMh se encuentran en la dimensión radial del SPVp, y que algunas de las migraciones tangenciales desde el SPV a la EAme y el Ch/SPa tienen origen peduncular.

### 3.3.3 El SPV peduncular produce células vasopresinérgicas para el hipotálamo anterior y lateral, el núcleo supraóptico principal y áreas más ventrales del hipotálamo, así como para la EAme

Para determinar si las neuronas vasopresinérgicas del hipotálamo y la EAme se originan en la división peduncular del SPV, se combinaron los cultivos organotípicos con técnicas de inmunofluorescencia o de hibridación *in situ* fluorescente para VP. Aquí también se utilizaron cultivos de secciones de cerebro de embrión de ratón E14.5 con un plano de corte oblicuo (Figs. 3.29; 3.30; 3.31).

En los tres casos seleccionados (mBe064-1-1a, mBe064-1-1b, mBe078-3-2) se colocó el trazador fluorescente CMFDA en el SPVp (Figs. 3.29 a 3.31), usando Otp como marcador de referencia para situar el trazador (para localizar los núcleos PVN y SO se muestra una hibridación *in situ* para VP en secciones similares; Figs. 3.29A y 3.30A). Tras dos días de cultivo, se observó migración celular radial desde la zona ventricular/periventricular del SPVp al AH, LH y al SO principal, así como migración tangencial de células a la EAme y partes más ventrales del hipotálamo (Figs. 3.29; 3.30; 3.31). También se detectaron numerosos procesos axonales marcados, muchos

de ellos siguiendo la dimensión radial desde la zona profunda (donde se sitúa el PVN) a la superficial del SPVp (donde se sitúa el SO principal), y otros orientados tangencialmente, ortogonalmente a los anteriores (Figs. 3.29; 3.30).

A continuación, dos de los casos (mBe064-1-1a, mBe064-1-1b), se procesaron para inmunofluorescencia para la detección de VP en rojo (Figs. 3.29; 3.30).

El resultado muestra un intenso marcaje de VP en numerosas células del SO principal, así como células dispersas en el AH y LH del dominio radial del SPVp (Figs. 3.29C-E,H; 3.30D). También se observaron células con VP dorsalmente al SPVp, dentro de la EAme (Fig. 3.30D,E-E''), así como en partes más ventrales del hipotálamo (Figs. 3.29D,H-J''; 3.30D). Asimismo, se observaron algunos procesos celulares con VP, algunos de los cuales parecían axones que seguían un curso radial en SPVp, o tangencial, de forma similar a los procesos marcados con el trazador celular (Figs. 3.29D,E; 3.30D).

Al analizar el doble marcaje por microscopía confocal, se observaron algunas células migradas radialmente en SPVp (marcadas con el trazador celular, en verde) que presentaban colocalización con el neuropéptido VP (rojo), situadas en el hipotálamo anterior y lateral (AH, LH, Fig. 3.29E,F-G'', flechas blancas) y el SO principal (Fig. 3.29E). Además, en áreas más ventrales hipotalámicas, se observaron células migradas desde el SPVp que presentaron colocalización con VP (Figs. 3.29H-J'', flechas blancas). Finalmente, dorsalmente al SO principal y al dominio radial del SPVp, algunas células migradas tangencialmente a la EAme también mostraron colocalización del trazador celular con VP (flechas blancas en fig. 3.30E-E'').

Los resultados del tercer caso seleccionado (mBe078-3-2) con el trazador en SPVp son similares a los dos anteriores, observando migraciones celulares radiales desde la zona periventricular del SPVp al AH, LH y SO principal, así como migraciones celulares tangenciales a la EAme (Fig. 3.31A,A'). Tras el cultivo, se le realizó una hibridación *in situ* fluorescente para detectar VP en rojo (Fig. 3.31B).

Como se comentó en el apartado de materiales y métodos, al realizar la hibridación *in situ* sobre secciones de cultivo, la mayoría de la fluorescencia del trazador se pierde. Para solventar este problema, tras la hibridación *in situ* se hizo una inmunofluorescencia contra fluoresceína, compuesto principal del trazador CMFDA. Se logró recuperar parte de la fluorescencia de los ensayos de migración, pero no toda (comparar el marcaje del trazador celular antes y después de la hibridación, en la Fig. 3.31A y B, respectivamente), y la recuperación fue insuficiente para lograr ver coexpresión (Fig. 3.31B,B'). No obstante, el caso muestra que la técnica de hibridación *in situ* fluorescente funciona después del cultivo organotípico.

En su conjunto, los resultados presentados en este apartado demuestran que las células vasopresinérgicas que se observan en el hipotálamo (incluyendo el AH, LH y el SO principal), así como en la EAme se originan en el SPV peduncular.

### 3.3.4 El dominio preóptico produce células para la amígdala medial extendida (incluyendo el BSTM y la amígdala medial) y otras áreas subpaliales del telencéfalo

Teniendo en cuenta que el SPVt es muy estrecho y difícil de marcar sin afectar la zona preóptica adyacente, se realizaron cultivos organotípicos en los que se aplicó el trazador celular CMFDA en esta última zona, que sirvieron como punto de comparación con los cultivos en los que el trazador se aplicó exclusivamente en SPVt (presentados en el apartado 3.4.1). Al igual que en casos anteriores, los cultivos se realizaron con las secciones de cerebro de embrión de ratón E14.5, y en este caso el trazador CMFDA se colocó en una de las dos divisiones del PO (comisural o ventral).

Los resultados se muestran en los siete casos seleccionados en las Figuras 3.32 y 3.33. En cuatro de los casos el trazador se colocó en el POC [mBe034-4-2a (hemisferio derecho), mBe034-4-2b (hemisferio izquierdo), mBe064-4-3a y mBe064-4-3b]. En el resto, el CMFDA se colocó en el PO ventral (mBe021-2-3, mBe067-4-3, y mBe020-3-1). En el caso mBe020-3-1, el plano de corte que se obtuvo fue asimétrico, visualizándose el dominio PO y la EAme en la misma sección. Tras dos días de cultivo, se observaron migraciones celulares desde ambas divisiones del PO (PO ventral y POC), con diferencias en los patrones observados tras el marcaje en POC, versus los patrones que se obtuvieron tras el marcaje en PO ventral.

En los casos donde el CMFDA se colocó en el PO ventral, se observó un migración abundante de células hacia la superficie del dominio radial (Fig. 3.32B,C). Además, se observaron migraciones tangenciales desde esta división ventral del PO hacia la parte comisural del PO (POC), formando una corriente muy compacta y definida de células migradas, algunas de las cuales podrían alcanzar el BSTM (Fig. 3.32C). Además, el caso mBe020-3-1 en una sección asimétrica permitió observar de forma clara una migración de algunas células desde el PO ventral a la amígdala medial (Fig. 3.32D,E). Esta migración no había sido descrita previamente (Bupesh *et al*., 2011b) y posiblemente se ha podido observar en este caso gracias a la asimetría del corte.

En los casos donde el trazador celular se colocó en el POC, se observó migración radial dentro del dominio (Fig. 3.32A), incluyendo parte preópticas del BSTM (Fig. 3.33C,F), y además se observaron migraciones tangenciales de células hacia el PO ventral, el BSTL, el estriado y otras áreas ventrales subpaliales (Figs. 3.32A; 3.33C-F).

En dos de los casos del trazador en POC se realizó una inmunofluorescencia tras el cultivo para analizar la expresión de Islet1 (Fig. 3.33). El factor de transcripción Islet1 se visualizó en rojo y está presente en muchas células del PO ventral, y algunas del POC. Además, Islet1 está presente en células del estriado y el BSTL (Fig. 3.33A-D,F) que se originan en el dominio embrionario estriatal ventral (Bupesh *et al*., 2011a). El análisis del doble marcaje con el microscopio confocal mostró que las células originadas en el POC en E14.5 no expresan Islet1, aunque se solapen parcialmente en su distribución con células Islet1. En el BSTL, las células con origen en POC (verdes) tienden a distribuirse alrededor de las que tienen Islet1 (Fig. 3.33C,F).

En su conjunto, estos resultados muestran que ambas divisiones preópticas, POC y PO ventral, producen células para la EAme. El POC, además produce células para el BSTL y el estriado, aunque ninguna de éstas tiene Islet1.

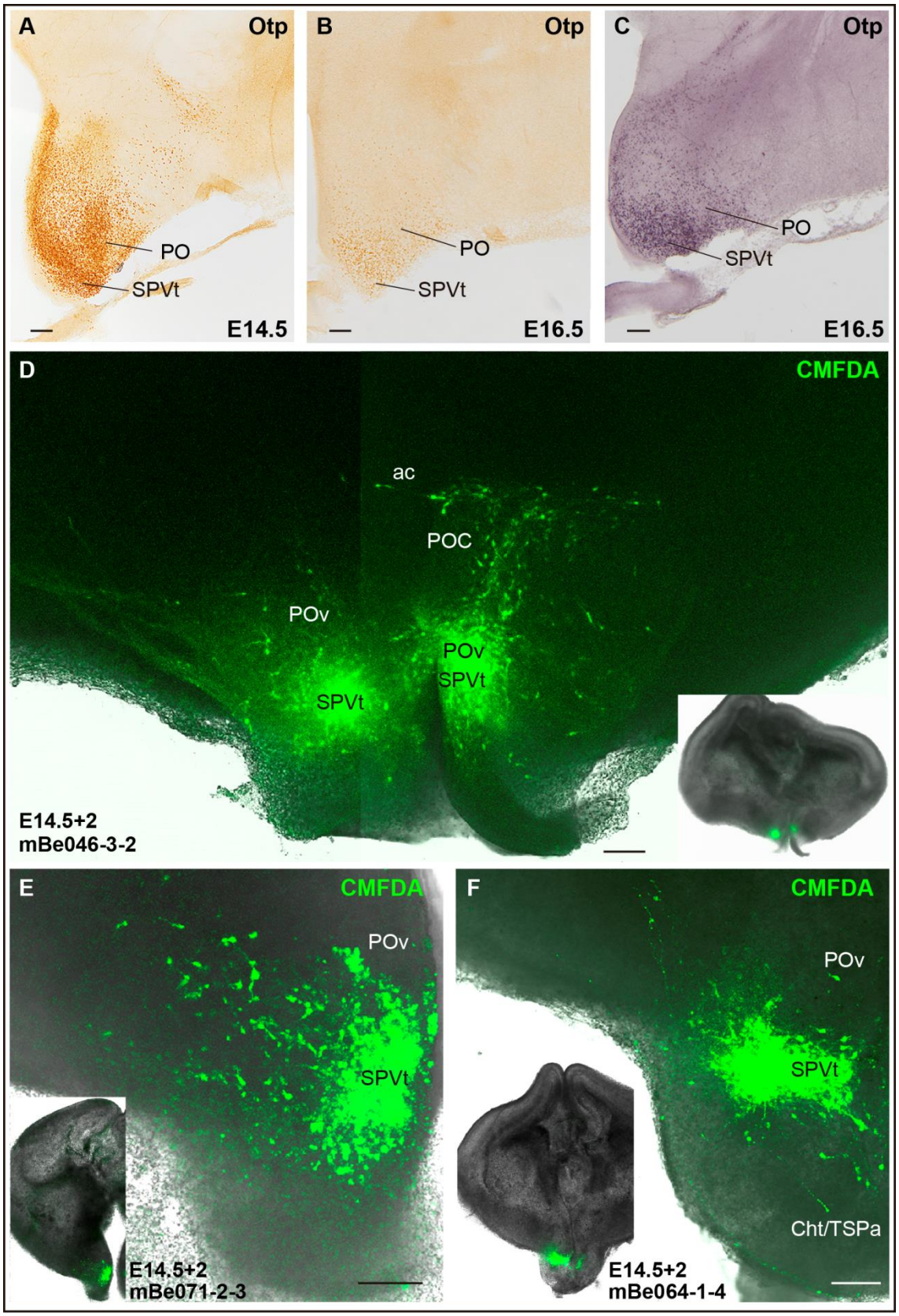



**Figura 3.26. Migración neuronal desde el dominio SPV terminal (SPVt).** A-C: Imágenes de referencia para localizar el SPVt, donde se muestran tres casos de inmunohistoquímica para Otp en secciones oblicuas de 80 µm de un cerebro de embrión de ratón E14.5 (A) y dos de E16.5 (B,C), a nivel rostrodorsal. El revelado de A y B se realizó con DAB, y el de C con DAB-

Ni. Se observa un grupo rostral de células Otp que se concentra compactamente desde la zona periventricular a la superficie, ocupando el dominio radial del SPVt. D-F: Imágenes de tres cultivos organotípicos (mBe046-3-2, mBe071-2-3, mBe064-1-4) de secciones oblicuas de 300 µm de cerebros de embriones de ratón E14.5, similares a las mostradas en A, B y C, donde el trazador celular fluorescente CMFDA (verde) se colocó en el SPVt (D,E,F). En el hemisferio derecho de D, el trazador implicó también al dominio PO. Tras dos días de cultivo, se observaron células migradas hacia el dominio PO y hacia la superficie del dominio radial de SPVt (D,E,F). Además, se observan células migradas tangencialmente al PO ventral (D-izquierdo,E,F) y al dominio quiasmático terminal (D,F). Las células que migran hacia el Ch/SPa terminal desde el SPVt lo hacen siguiendo tanto rutas periventriculares como subpiales (F). En D (hemisferio derecho) el trazador también implicó al POv, y en este caso se observa una corriente de células migradas que llegan a la comisura anterior e incluso la atraviesan para alcanzar el otro hemisferio. A,B,D: Fotomontajes. D-F: Resultado de la suma de varias imágenes en planos de diferente profundidad (en z) tomadas con el microscopio confocal. Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

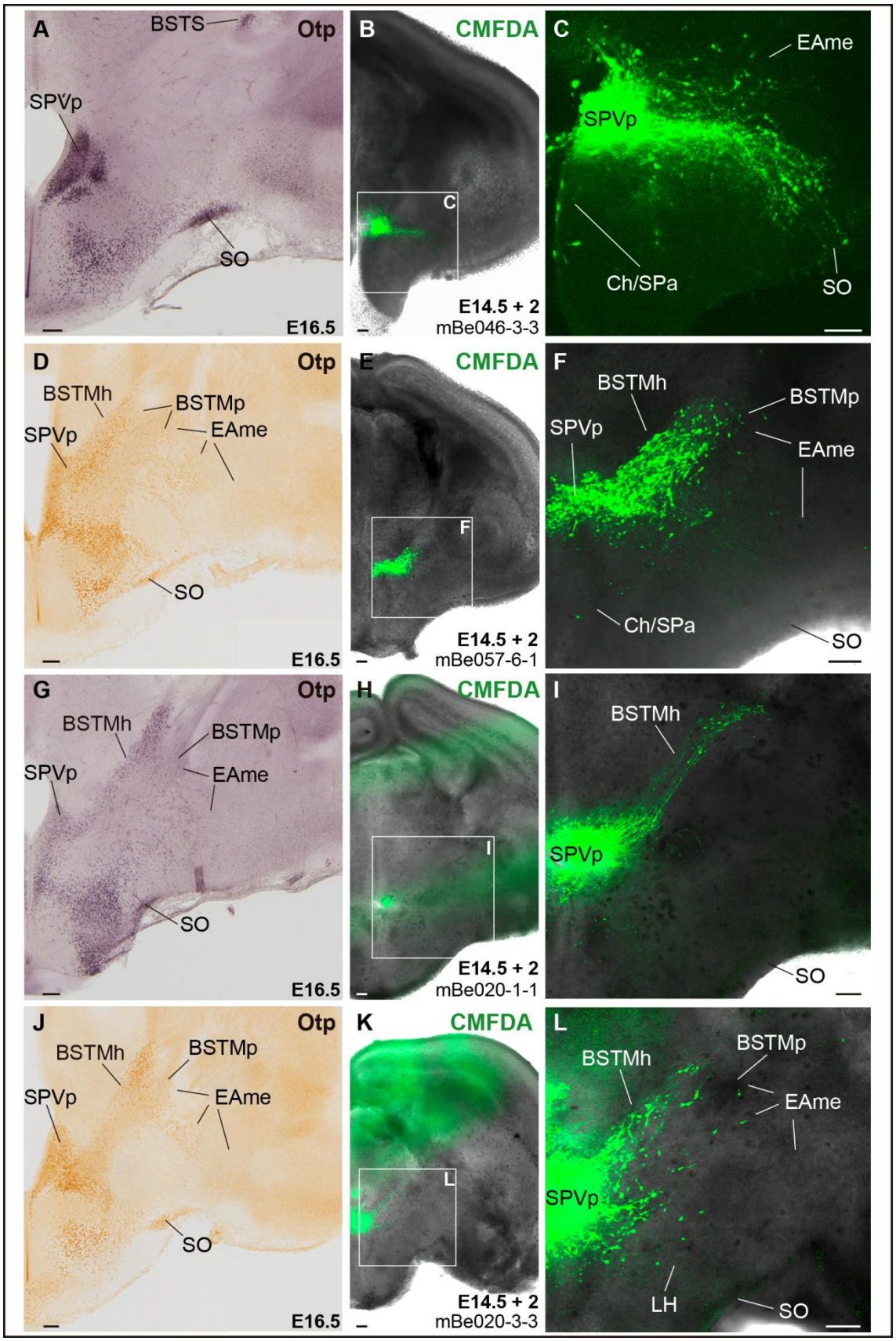

A
Otp
BSTS
SPVp
SO
E16.5
B
CMFDA
C
E14.5 + 2
mBe046-3-3
C
EAme
SPVp
Ch/SPa
SO
D
Otp
BSTMh
BSTMp
SPVp
EAme
SO
E16.5
E
CMFDA
F
E14.5 + 2
mBe057-6-1
F
BSTMh
BSTMp
SPVp
EAme
Ch/SPa
SO
G
Otp
BSTMh
BSTMp
SPVp
EAme
SO
E16.5
H
CMFDA
I
E14.5 + 2
mBe020-1-1
I
BSTMh
SPVp
SO
J
Otp
BSTMh
BSTMp
SPVp
EAme
SO
E16.5
K
CMFDA
L
E14.5 + 2
mBe020-3-3
L
BSTMh
BSTMp
EAme
SPVp
LH
SO

**Figura 3.27. Migración neuronal desde el dominio SPV peduncular (SPVp) hacia el núcleo supraóptico (SO), la amígdala medial extendida (EAme) y el dominio quiasmático.** A,D,G,J: Imágenes de referencia para localizar el SPVp, mostrando varios casos de inmunohistoquímica para Otp en secciones oblicuas de 80 µm de cerebros de embrión de ratón E16.5, reveladas con DAB (D,J) y DAB-Ni (A,G). Los núcleos PVN y SO y el BSTM hipotalámico (BSTMh) muestran una gran cantidad de células Otp. También se observan células dispersas con Otp en la EAme, incluyendo otras partes del BSTM, y en el dominio quiasmático. B,E,H,K: Imágenes de cuatro cultivos organotípicos (mBe046-3-3, mBe057-6-1, mBe020-1-1, mBe020-3-3) de secciones oblicuas de 300 µm de cerebros de embriones de ratón E14.5, similares a las mostradas en las inmunohistoquímicas, donde el trazador celular fluorescente CMFDA (verde) se colocó en el SPVp. Tras dos días de cultivo, se observaron células migradas hacia el hipotálamo lateral (LH), el núcleo supraóptico principal (SO) (C), y el BSTMh, solapándose con la distribución de células Otp (F,I,L). Además, se observaron células desplazadas tangencialmente a partes telencefálicas del BSTM (F,L), y al dominio quiasmático (C). D,J: Fotomontajes. C,F,I: Resultado de la suma de varias imágenes en planos de diferente profundidad (en z) tomadas con el microscopio confocal. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

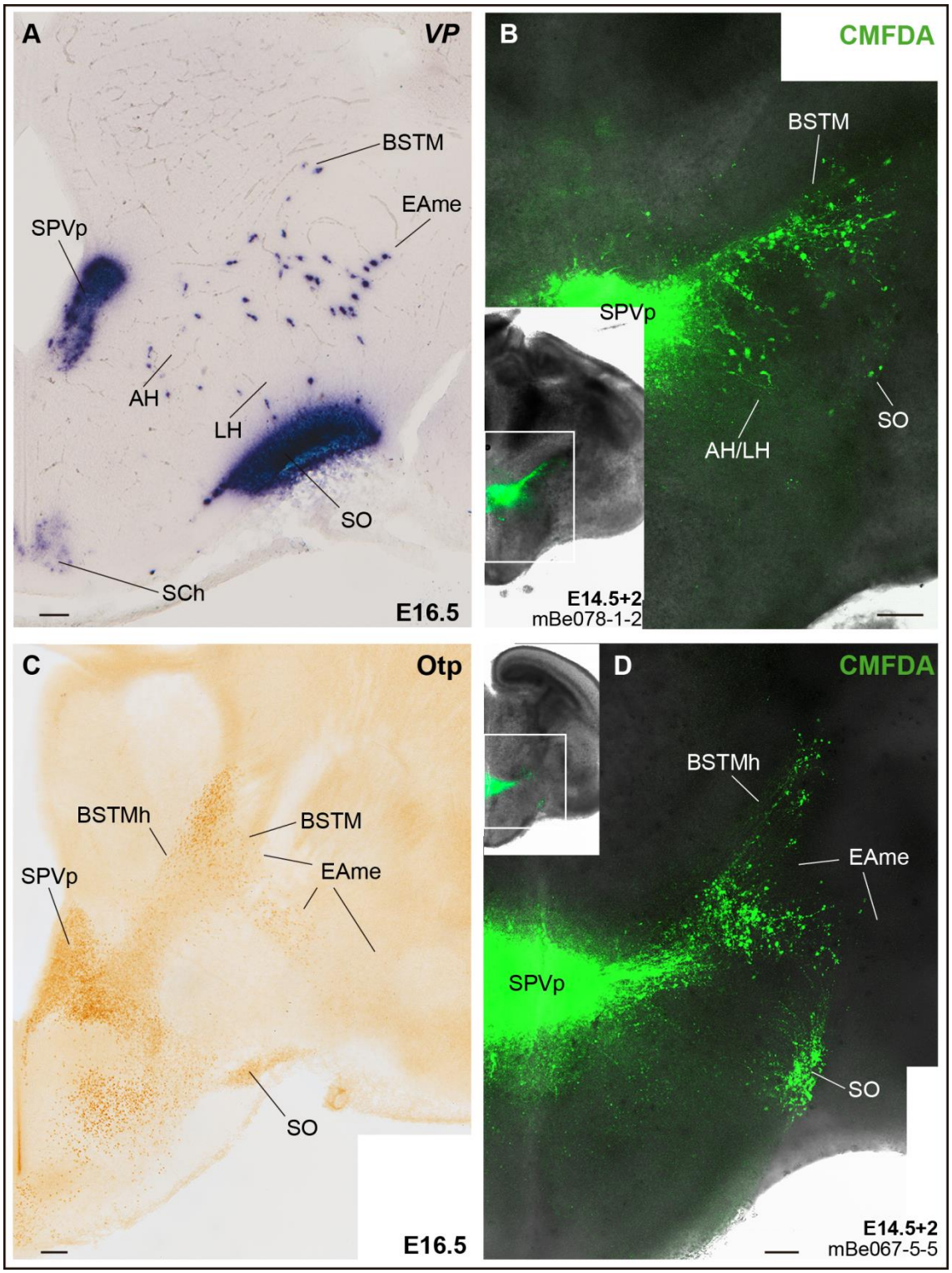



**Figura 3.28. Migración neuronal desde el dominio SPV peduncular (SPVp) hacia el hipotálamo anterior (AH) y lateral (LH), el núcleo supraóptico principal (SO) y la amígdala medial extendida (EAme).** A,C: Imágenes de referencia para localizar el dominio SPV, mostrando una hibridación *in situ* para el gen de VP (A) y una inmunohistoquímica para Otp en secciones oblicuas de 80 µm de cerebros de embrión de ratón E16.5. Hay una gran cantidad de células VP en los núcleos PVN y SO, así como en AH y LH, y también células dispersas en la EAme (A), todos ellos conteniendo células Otp (C). B,D: Cultivos organotípicos (mBe078-1-2,

mBe067-5-5) de secciones oblicuas de 300 µm de cerebros de embriones de ratón E14.5, similares a las mostradas en A y C, donde el trazador celular fluorescente CMFDA (verde) se colocó en el SPVp. Tras dos días de cultivo, se observaron células migradas hacia el BSTM y otras zonas de la EAme (B,D), y hacia el AH, LH y el SO (B,D). B-D: Fotomontajes. B,D: Resultado de la suma de varias imágenes en planos de diferente profundidad (en z) tomadas con el microscopio confocal. Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

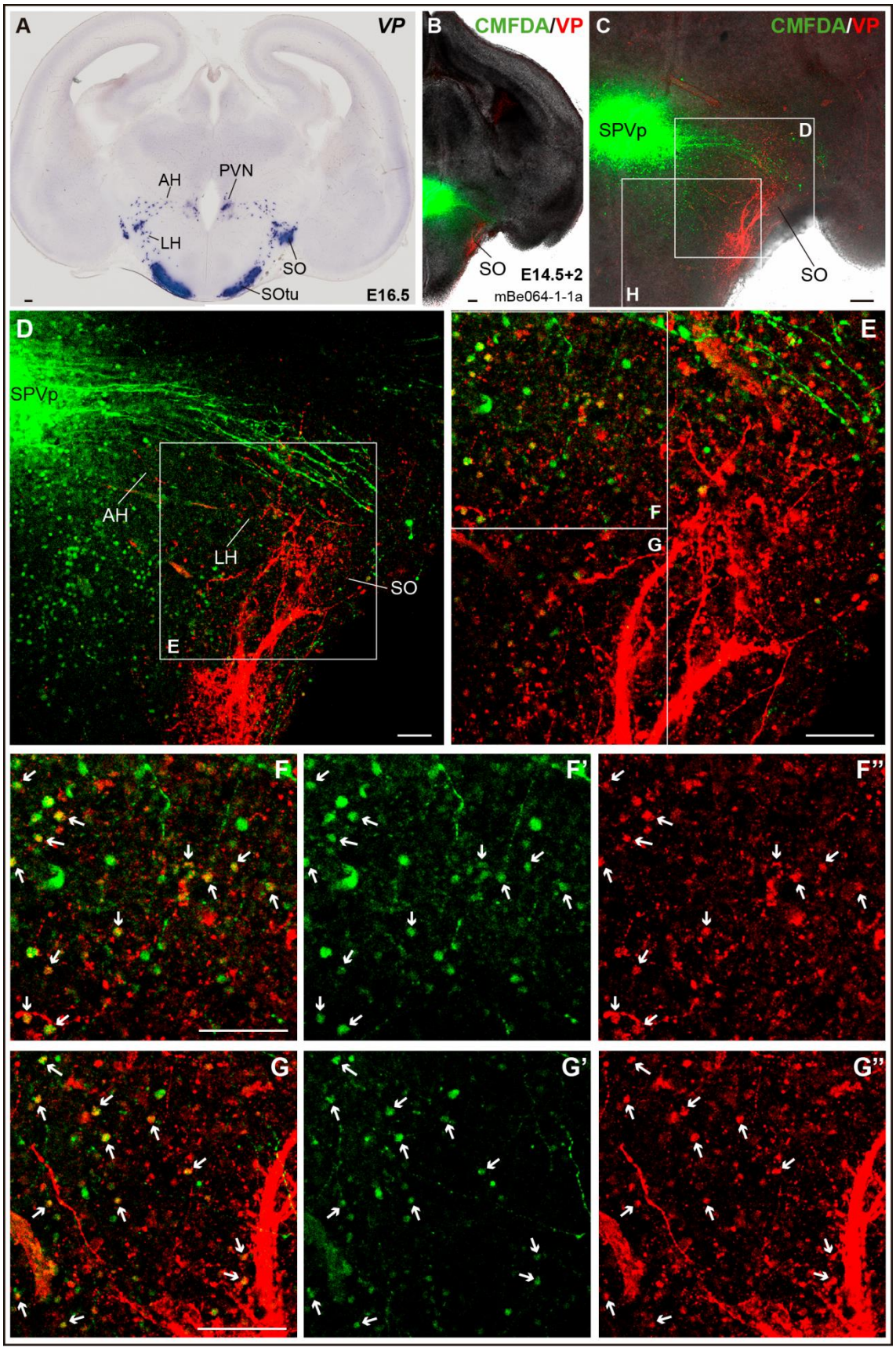

A
VP
AH
PVN
LH
SO
SOtu
E16.5
B
CMFDA/VP
SO
E14.5+2
mBe064-1-1a
C
CMFDA/VP
SPVp
D
SO
H
D
SPVp
AH
LH
SO
E
F
G
E
F
F'
F''
G
G'
G''

**Figura 3.29.**

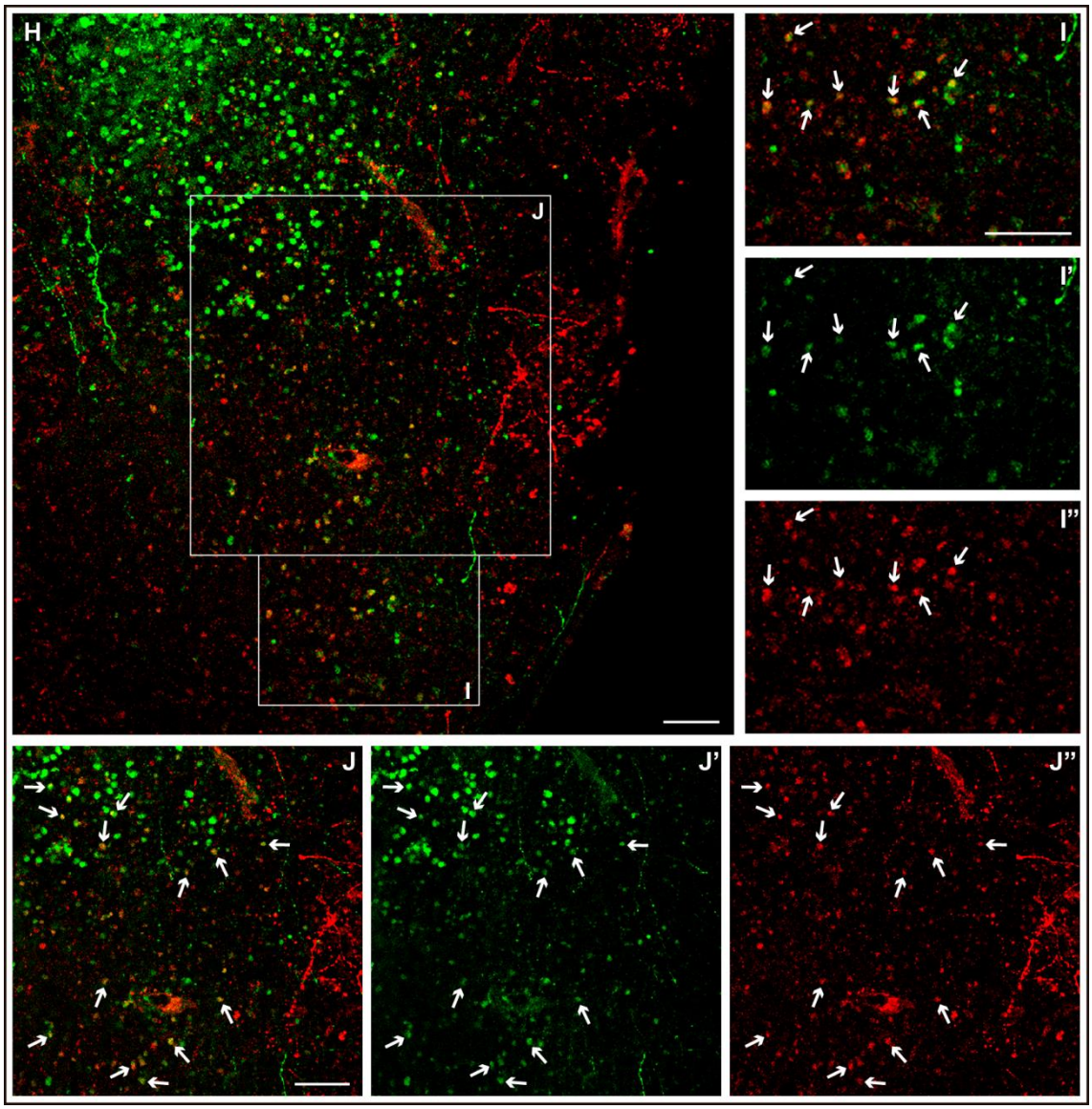



**Figura 3.29 continuación. Migración neuronal desde el dominio SPV peduncular al hipotálamo anterior y lateral, al núcleo supraóptico principal y a áreas más ventrales del hipotálamo.** A: Como referencia para localizar los núcleos principales del SPVp, se muestra una hibridación *in situ* para el gen de VP en una sección oblicua de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E16.5. Hay una gran cantidad de células con VP en los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico principal (SO) y tuberal (SOtu), pero además se observan células dispersas en el hipotálamo anterior, lateral y la amígdala medial extendida (EAme). B-J'': Cultivo organotípico de una sección oblicua de 300 µm de cerebro de embrión de ratón E14.5, similar a la mostrada en A, donde el trazador celular fluorescente CMFDA (verde) se colocó en el SPVp. Tras 2 días en cultivo, se observaron células migradas al hipotálamo anterior y lateral, el SO, la EAme y además a partes más ventrales del hipotálamo. A continuación, se le realizó una inmunofluorescencia para la detección de VP (rojo). A: Fotomontaje. C,H: Resultado de la suma de varias imágenes en planos de diferente profundidad (en z) tomadas con el microscopio confocal, en la que se aprecian las distintas células migradas (verde) en relación a la inmunofluorescencia (rojo). F,G,I,J: Detalles de la células doblemente marcadas con CMFDA (verde) y VP (rojo) en el núcleo SO y el hipotálamo

anterior y lateral del mismo dominio radial del SPV (F) y además en zonas hipotalámicas más ventrales (G-J). Las flechas blancas indican las células donde hay coexpresión. Para abreviaturas ver lista. Barras de escala: A-C: 100 µm; D-J'': 50 µm.

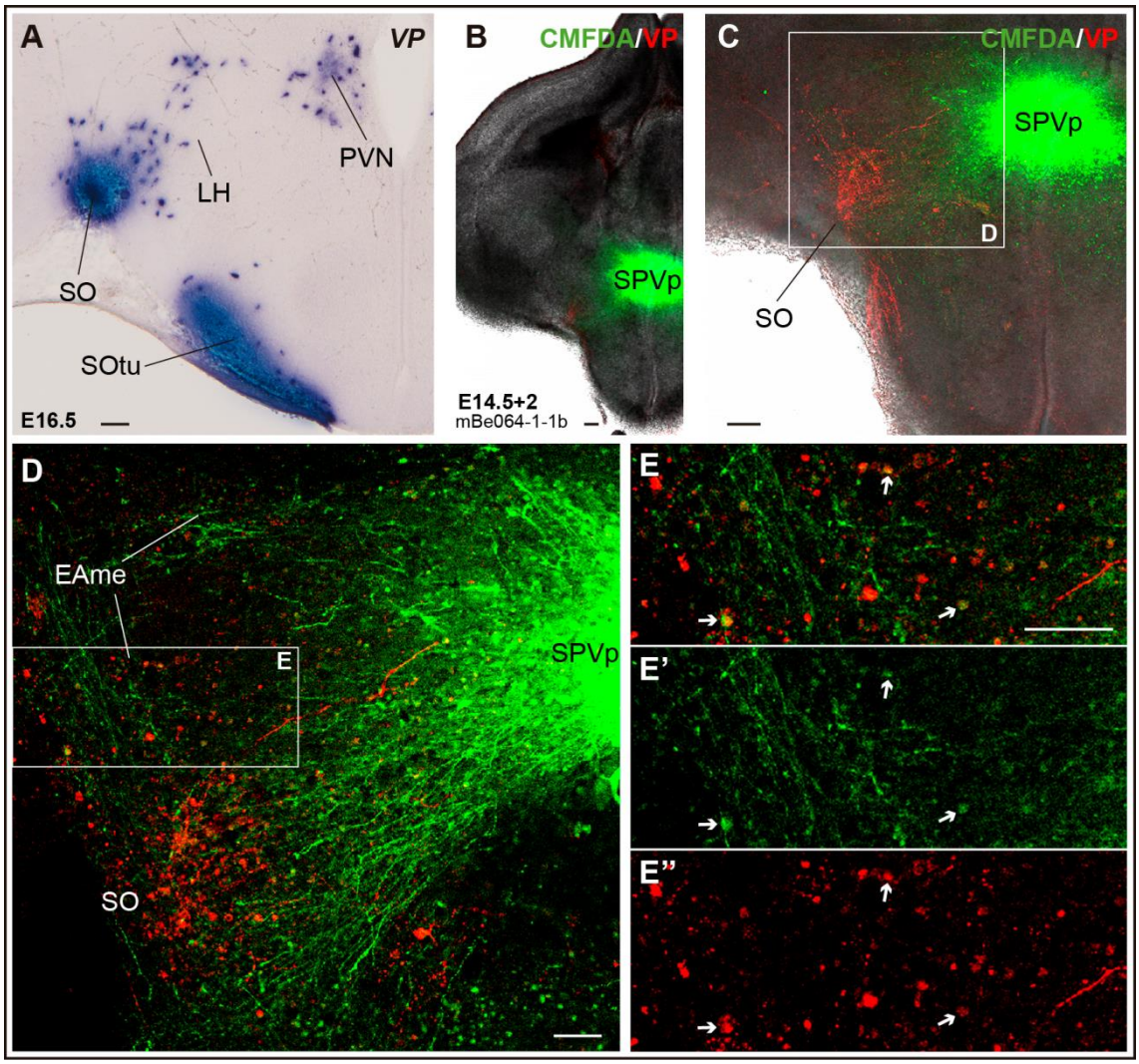



**Figura 3.30. Migración neuronal desde el dominio SPV peduncular al núcleo supraóptico principal y a la EAme.** A: Imagen de referencia para localizar los núcleos PVN y SO de una hibridación *in situ* para el gen de VP en una sección oblicua de 80 µm de cerebro de embrión de ratón E16.5. Hay una gran cantidad de células VP en el PVN y en el SO y el SO tuberal, así como células dispersas localizadas a medio caminio entre el PVN y el SO. B-E: Cultivo organotípico de una sección oblicua de 300 µm de cerebro de embrión de ratón E14.5, similar a la mostrada en A, donde el trazador celular fluorescente CMFDA (verde) se colocó en el SPVp. Tras 2 días en cultivo, se observaron células migradas hacia el AH/LH y el SO (D,E). También se observaron células marcadas con el trazador dorsalmente al dominio radial del SPVp, localizadas en partes de la amígdala medial extendida (EAme, D,E). A continuación, se le realizó una inmunofluorescencia para la detección de VP (rojo). C: Resultado de la suma de varias imágenes en planos de diferente profundidad (en z) tomadas con el microscopio confocal, donde el trazador se muestra en verde y la inmunofluorescencia para VP en rojo. E: Detalles de la células doblemente marcadas con CMFDA (verde) y VP (rojo) en la EAme. Las flechas blancas indican las células donde hay coexpresión. Para abreviaturas ver lista. Barras de escala: A-C: 100 µm; D,E: 50 µm.

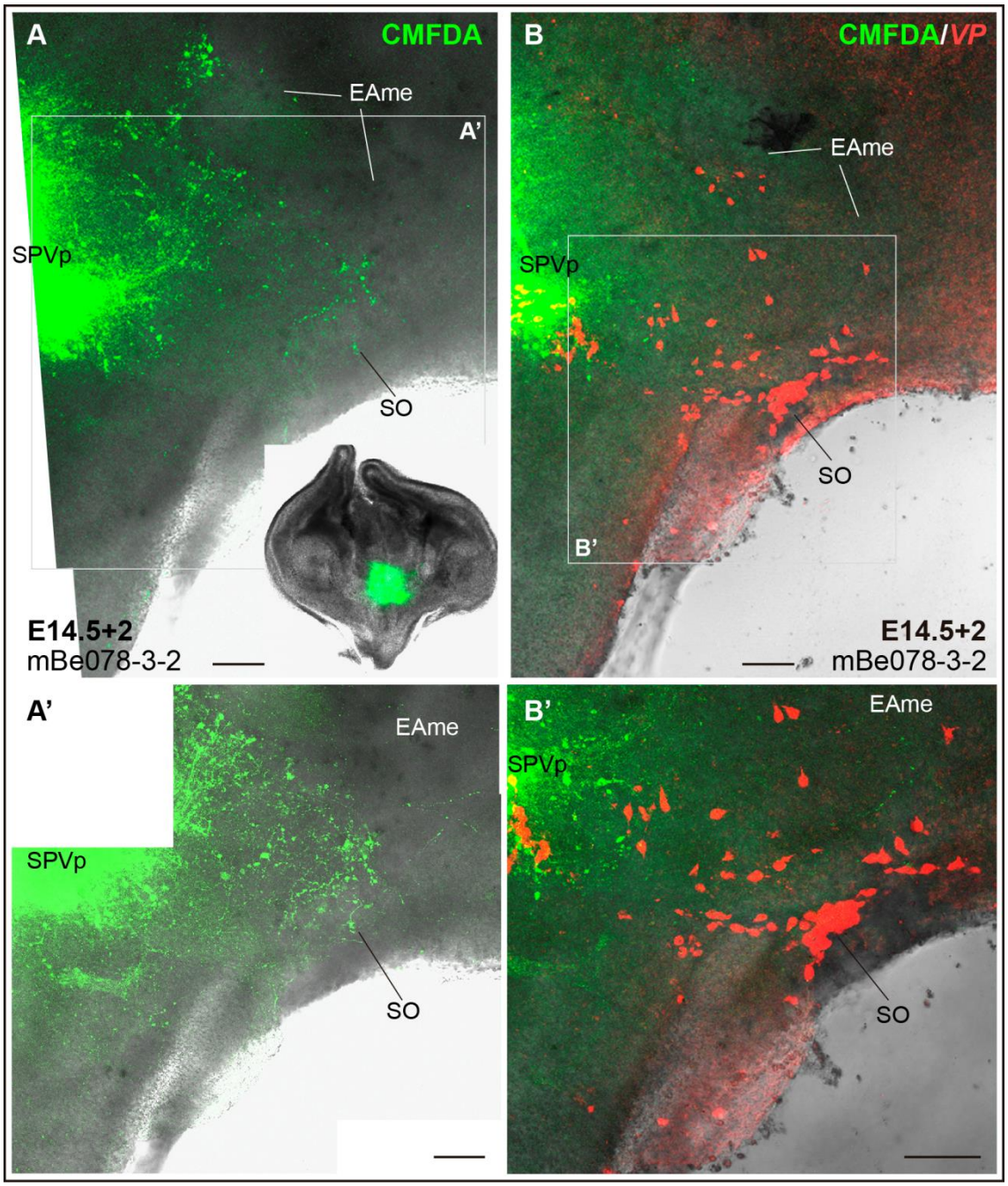



**Figura 3.31. Migración neuronal desde el dominio SPV peduncular al núcleo supraóptico y la amígdala medial extendida.** A: Cultivo organotípico de una sección oblicua de 300 µm de cerebro de embrión de ratón E14.5, donde el trazador celular fluorescente CMFDA (verde) se colocó en el SPVp. Tras 2 días en cultivo, se observaron células migradas hacia el hipotálamo anterior, lateral, en el SO y además en la EAme. B: Hibridación *in situ* fluorescente para el gen de VP (rojo) realizada sobre la sección A tras el cultivo. Las células VP se localizan en el AH/LH, el SO y en zonas de la EAme. A causa de la hibridación *in situ*, se perdió la mayoría del marcaje fluorescente del trazador CMFDA (verde), por lo que se realizó una inmunofluorescencia para la detección de fluoresceína. El resultado fue la recuperación parcial de la fluorescencia del trazador, aunque insuficiente para localizar coexpresión. A,A': Fotomontajes. A,A',B,B': Resultado de la suma de varias imágenes en planos de diferente

profundidad (en z) tomadas con el microscopio confocal. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

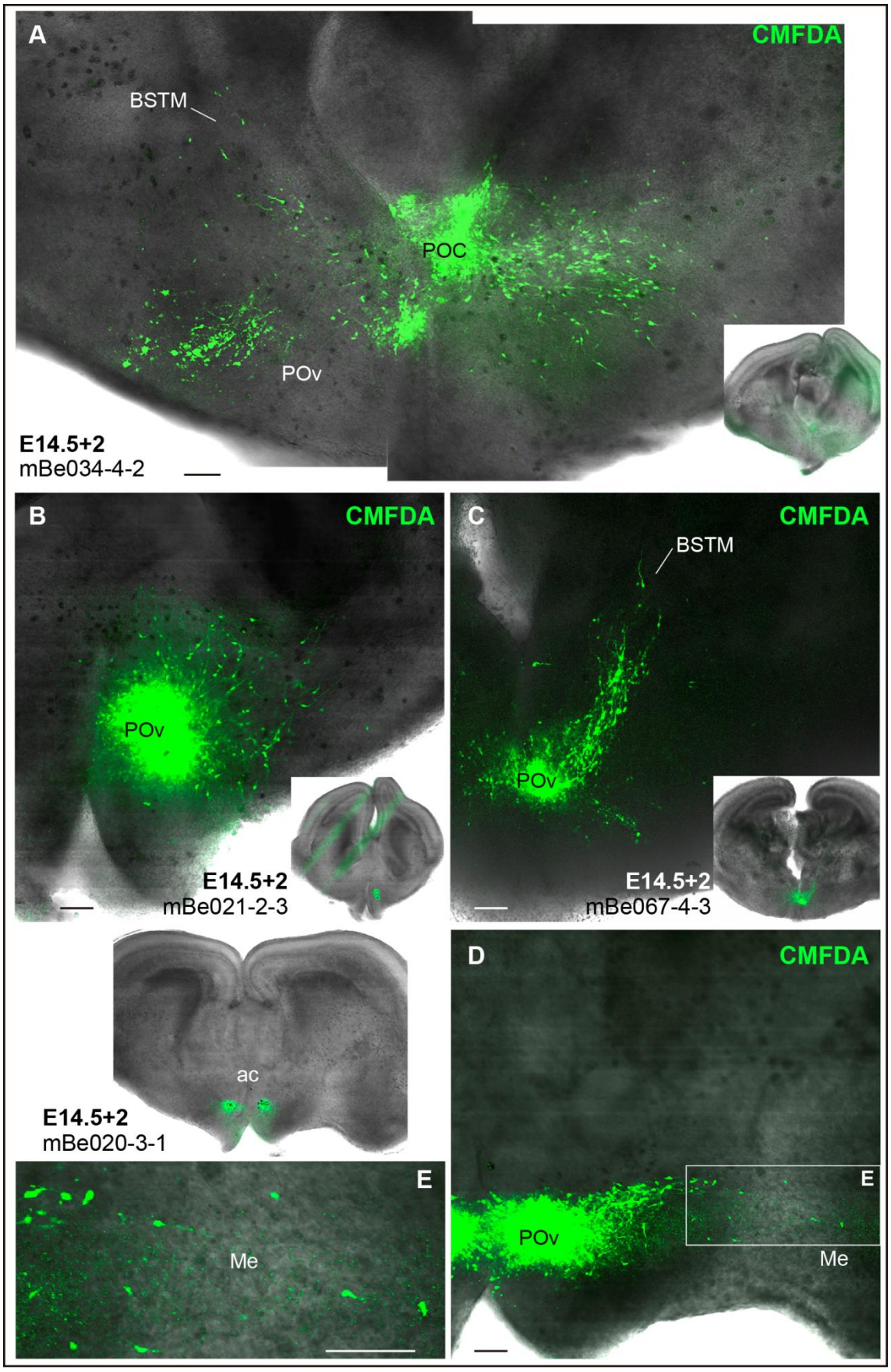

A
CMFDA
BSTM
POC
POv
E14.5+2
mBe034-4-2
B
CMFDA
POv
E14.5+2
mBe021-2-3
C
CMFDA
BSTM
POv
E14.5+2
mBe067-4-3
ac
E14.5+2
mBe020-3-1
D
CMFDA
E
POv
Me
E
Me

**Figura 3.32. Migración neuronal desde el dominio preóptico hacia la superficie radial del mismo y hacia el BSTM y la amígdala medial extendida.** A-E: Cultivos organotípicos (mBe034-4-2, mBe021-2-3, mBe067-4-3, mBe020-3-1) de secciones oblicuas de 300 µm de cerebros de embriones de ratón E14.5, donde el trazador celular fluorescente CMFDA (verde) se colocó en la división ventral del dominio preóptico (B-E) y en la comisural (POC; A). Tras 2 días de cultivo, se observaron células migradas desde PO ventral y POC: radialmente, hacia la superficie del PO (A-C) y, tangencialmente, hacia otros dominios más dorsales subpaliales (A), hacia el BSTM (C) y hacia la EAme (D, plano de corte oblicuo e inclinado). En contra de lo que se había dicho previamente, no sólo el POC sino que también el POv producen células para la EAme, incluyendo BSTM y Me (D,E). B,C: Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. A: Fotomontaje. C: Resultado de la suma de varias imágenes en planos de diferente profundidad (en z) tomadas con el microscopio confocal. E: Detalle de la células migradas desde el PO a la Me. Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

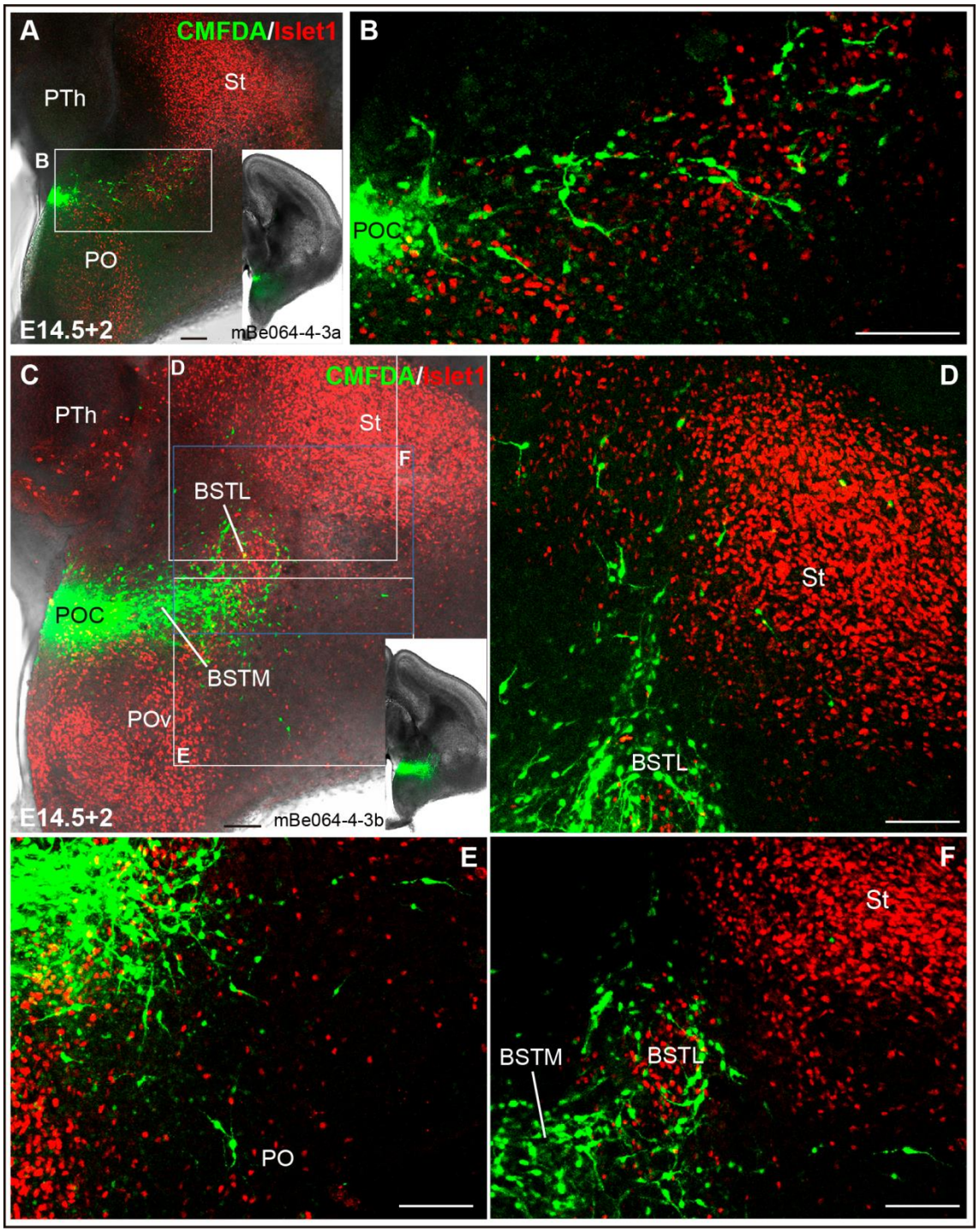



**Figura 3.33. Migración neuronal desde el dominio preóptico hacia zonas estriatales y el BST.** A,C: Cultivo organotípico de una sección oblicua de 300 µm de cerebro de embrión de ratón E14.5, donde el trazador celular fluorescente CMFDA (verde) se colocó en la división comisural del dominio preóptico (POC; A,C). Tras 2 de días de cultivo, se observaron células migradas hacia el BST (D,F), el estriado (B) y otras zonas dorsales subpaliales (B,D,F). Además, algunas células se adentran en el PO ventral desde el POC (E). A continuación, se le realizó una inmunofluorescencia para Islet1 (rojo). Hay células migradas en territorios Islet1 (B,D,E,F), aunque no se aprecian células con coexpresión del trazador verde y de Islet1 (rojo). A,C: Los insertos muestran una imagen panorámica de cada sección. A-F: Resultado de la suma de varias imágenes en planos de diferente profundidad (en z) tomadas con el

microscopio confocal, en la que se aprecian las distintas células migradas (verde) en relación a la inmunofluorescencia (rojo). Para abreviaturas ver lista. Barra de escala: 100 µm.

# 4. Discusión

# 4. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis indican que el dominio supraopto-paraventricular (SPV) se distingue en el hipotálamo alar de ratón en base a la expresión de Otp y ausencia de Islet1 desde etapas muy tempranas del desarrollo. Gracias a la expresión de Rgs4, hemos podido distinguir dos subdominios en el SPV, uno rostral relacionado con el prosómero terminal (SPVt) y otro caudal relacionado con el prosómero peduncular (SPVp). El seguimiento de las células con expresión de Otp durante el desarrollo, en comparación con Islet1, Rgs4 y la glía radial, así como con resultados de ensayos de migración celular ha permitido analizar los derivados de cada subdominio, tanto a nivel radial como a nivel tangencial. Este análisis combinado aporta información novedosa sobre el origen en distintos prosómeros de núcleos relevantes del hipotálamo como el supraóptico, así como de las células de la amígdala medial extendida (EAme) con origen hipotalámico. Además, nuestros resultados demuestran que algunas de las células derivadas del SPV que migran tanto al hipotálamo como a la EAme son vasopresinérgicas, y sugieren que algunas podrían ser oxitocinérgicas

Un resultado adicional de esta tesis es que los distintos subdominios del SPV se relacionan principalmente con partes distintas de la región preóptica, de forma que cada subdominio del SPV produce células que migran tangencialmente a una subdivisión preóptica posiblemente situada en el mismo prosómero: así, el SPVt produce células mayormente para la división preóptica ventral (posiblemente situada dentro del mismo prosómero terminal), mientras que el SPVp produce principalmente células para el área preóptica comisural (probablemente situada en el prosómero peduncular). Este hecho podría tener implicaciones a la hora de entender la conectividad y funcionalidad de estas distintas subdivisiones preópticas, y contradicen la última versión del modelo prosomérico, según la cual toda la región preóptica está situada en el prosómero peduncular (Puelles y Rubenstein 2015).

Aunque los resultados de esta tesis proporcionan datos novedosos, también plantean numerosas preguntas sobre el origen y función de las neuronas de la EAme y de otros dominios. Estas cuestiones se discuten en los siguientes apartados en base a los resultados obtenidos en este trabajo.

## 4.1 El dominio supraopto-paraventricular y sus subdivisiones terminal y peduncular

El dominio supraopto-paraventricular (SPV) es la división más dorsal del hipotálamo alar que produce los núcleos hipotalámicos paraventricular (PVN) y supraóptico (SO) (revisado en Puelles *et al*. 2012). Durante el desarrollo, el SPV se distingue por la expresión diferencial de distintos factores de transcripción. Es un dominio Otp/Sim1 positivo y Dlx/Arx/Islet1 negativo, donde la mayoría de las neuronas son glutamatérgicas (Puelles y Rubenstein 2003; Puelles *et al*. 2004, 2012; Shimogori *et al*. 2010; Morales-Delgado *et al*. 2011). Además, los marcadores moleculares Otp y Sim1 son factores de transcripción clave para la proliferación y diferenciación de los precursores de las células con distintos neuropéptidos que se encuentran en el área periventricular anterior, el PVN y el SO, como las células con somatostatina (SST), hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona liberadora de corticotropina (CRF), arginina vasopresina (VP) y oxitocina (OT) (Acampora *et al*. 1999, 2000; Wang y Lufkin 2000; Goshu *et al*. 2004; Morales-Delgado *et al*. 2011). Algunos de los estudios previos también han puesto de manifiesto la importancia del factor de transcripción Otp en la migración y diferenciación de distintas poblaciones de neuronas peptidérgicas situadas no sólo en el hipotálamo sino también en la EAme (Acampora *et al*. 1999, 2000; Wang y Lufkin 2000; García-Moreno *et al*. 2010). Ventral al SPV se encuentra el dominio quiasmático o subparaventricular (Ch/SPa), un dominio alar que expresa Dlx, Arx, Islet1, Vax1 y Gad67, donde las neuronas son principalmente gabaérgicas (Stühmer *et al*. 2002).

En base a estas características, identificamos el SPV del ratón desde estadios embrionarios tempranos (E9.5) usando para ello los patrones de expresión de los factores de transcripción Otp y Islet1. Como hemos mencionado, Otp se expresa en todo el dominio SPV, y Islet1 (junto con Dlx2) lo hace en dominios adyacentes, como el dominio Ch/SPa (ventralmente), el dominio preóptico (dorsalmente) y el pretálamo (caudalmente). Esta combinación de genes es la que delimita este dominio también en otros vertebrados, incluyendo aves, reptiles y anfibios (Bardet *et al*. 2008; Abellán y Medina 2009; Medina *et al*. 2011; Moreno *et al*. 2012; Vicario *et al*. 2014, 2015, 2017; Domínguez *et al*. 2015; revisado en Medina *et al*. 2017).

Además, el modelo prosomérico actual propone la división del hipotálamo en dos partes que de rostral a caudal se denominan hipotálamo terminal (THy) y peduncular (PHy) (Puelles *et al*. 2012, 2014; Morales-Delgado *et al*. 2014; Puelles y Rubenstein 2015; Ferrán *et al*. 2015). De esta manera, el dominio SPV también queda dividido en dos subdominios, uno rostral o terminal (SPVt) y otro caudal o peduncular (SPVp). El

modelo postula que cada división prosomérica da origen a poblaciones celulares diferentes (Morales-Delgado *et al*. 2011, 2014), aunque hasta la fecha no existían datos experimentales sobre los derivados de cada subdivisión del SPV. Uno de los objetivos de esta Tesis ha sido estudiar ésto usando marcadores moleculares, junto con el análisis de la glía radial y los ensayos de migración celular.

La primera expresión de Otp en el SPV la encontramos en E10.5, y la mayoría de las células que expresan Otp se encuentran en las proximidades del tallo óptico, en una localización que probablemente se corresponda con la división peduncular del SPV, ya que esa expresión de Otp se encuentra flanqueada por el prosómero 3 (p3) y el dominio Ch/SPa (quizás el Ch/SPa peduncular), territorios Islet1 positivos. Sin embargo, también se observa expresión temprana - aunque más débil - de Otp en algunas células localizadas en el lado opuesto del tallo óptico, que posiblemente pertenezca al SPV terminal, lo que sugiere que quizás ambos subdominios del SPV se relacionan con el pedículo óptico, y no solamente el terminal, como se ha asumido hasta ahora (Puelles *et al*. 2012). Es decir, el pedículo podría tener una parte terminal y otra peduncular. En base a la posición relativa de dichas partes, así como a datos sobre la expresión diferencial de factores de transcripción como Six3 o Rax (en E11.5 relegado a la parte terminal; Ferrán *et al*. 2015), es posible que la parte del SPV terminal se relacione en particular con la parte neural de la vesícula óptica que origina la retina (que también expresa Six3 y Rax de forma específica, una vez regionalizada la vesícula) y con el verdadero tallo óptico (por donde pasarán los axones que proceden de la retina neural y viajan al cerebro), mientras que la parte peduncular del SPV posiblemente se relacione con el epitelio pigmentario de la retina (caracterizado por la expresión del factor de transcripción Mitf y Otx2, pero no Six3 ni Rax tras la regionalización de la vesícula) (para la expresión y función de distintos genes en el desarrollo de la vesícula óptica, ver revisiones por Martínez-Morales *et al*. 2004; Fuhrmann 2010).

Para distinguir mejor las divisiones terminal y peduncular del SPV se utilizó Rgs4, una proteína reguladora de GTPasa (Grillet *et al*. 2003, 2005), que fue recientemente propuesta como marcador molecular para ayudar a delimitar la parte peduncular del SPV (Ferrán *et al*. 2015). En estadios tempranos, este marcador se expresa en toda la extensión dorsoventral del SPVp pero a partir de E15.5 se restringe a la parte ventral del SPVp (Ferrán *et al*. 2015). La comparación de Rgs4 con Otp y los neuropéptidos VP y OT, que se expresan en los núcleos PVN y SO hipotalámicos, nos permitió distinguir con más seguridad estos subdominios terminal y peduncular desde E12.5 y parecen producir distintos grupos de células para el hipotálamo y el telencéfalo. No obstante, los ensayos de migración fueron la prueba experimental fundamental de esta

contribución diferencial de las divisiones del SPV. Es importante aclarar que en este trabajo no contamos con un marcador que nos permitiese distinguir el borde rostral acroterminal propuesto por el modelo prosomérico (Puelles *et al*. 2012; Puelles y Rubenstein 2015; Ferrán *et al*. 2015) y por ello lo hemos incluido dentro del prosómero terminal.

Además, usamos un marcador de glía radial (RC2) para identificar qué células se encontraban dentro de la dimensión radial del SPV y cuáles parecían dispersarse tangencialmente adentrándose en otros dominios.

En base al análisis de la expresión de Otp a lo largo del desarrollo, en comparación con Islet1, Rgs4, RC2, VP, OT y a los resultados de los ensayos de migración, pudimos distinguir los derivados de cada subdominio del SPV, tanto en la dimensión radial como en la tangencial. El SPVt produce una parte del hipotálamo alar rostral mal definida hasta ahora, que en parte ha sido considerada como preóptica por diversos autores, incluyendo el atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos y Franklin 2001, 2008). Si extrapolamos nuestros datos al cerebro adulto, el SPVt parece incluir medialmente una parte del área preóptica medial o MPA (a nivel de Bregma -0,34 mm de Paxinos y Franklin 2008), mientras que lateralmente incluye el núcleo lateral anterior del hipotálamo (LA). La inclusión del LA como parte del SPVt coincide con la interpretación de Puelles *et al*. (2012) y de Morales-Delgado *et al*. (2014). Nuestros datos de Otp comparados con VP y OT también sugieren que hay una división rostral del núcleo supraóptico situada en la superficie del SPVt, con células VP y OT parvocelulares a partir de E16.5. Puelles *et al*. (2012) también propusieron la existencia de una subdivisión del núcleo supraóptico (SO) situada en el SPVt. Sin embargo, según nuestros datos, el territorio radial del SPVt es menos extenso (es decir, es más estrecho) de lo que consideran Puelles y col. (2012), y ésto también afecta a la subdivisión terminal del SO (SOt). En contra de la descripción de Puelles *et al*. (2012), las células de esta subdivisión terminal del supraóptico parecen parvocelulares, y no magnocelulares, quedando éstas últimas relegadas a la división principal del SO, que tiene origen en el SPV peduncular. Según nuestros datos, el SOt muestra células con VP y OT mucho más tarde que la división principal del supraóptico.

Por su parte, la división peduncular del SPV es más ancha que la terminal y, cuando se ve en cortes sagitales, muestra una forma de trapecio más ancho caudal que rostralmente, donde confluyen sus tres subdivisiones: dorsal, central y ventral (Morales-Delgado *et al*. 2011, 2014; Puelles y Rubenstein 2015). El SPVp da lugar al PVN periventricularmente y al SO principal en la superficie (con neuronas VP y OT magnocelulares), así como otros grupos de neuronas localizados en parte del área

hipotalámica anterior y central (AHA y AHC, medialmente) y el área lateral hipotalámica (LH, lateralmente) que pertenecen al SPVp. Además, en la dimensión radial del SPVp también encontramos una subdivisión del BSTM (BSTM hipotalámico, BSTMh). Dicha subdivisión (el BSTMh) fue identificada en base a calbindina por Bupesh *et al*. (2011a) y parece encontrarse en el aspecto más dorsal del SPVp, que está deformado formando una espiga que toca el telencéfalo (como propusieron Puelles y Rubenstein 2003, 2015; Morales-Delgado *et al*. 2011, 2014; Ferrán *et al*. 2015); esta subdivisión expresa Otp pero no Islet1. Además, el BSTMh tiene una fuerte expresión de VGLUT2 (*Allen Developing Mouse Brain Atlas*), por lo que parece probable que sus neuronas sean glutamatérgicas. El BSTMh está situado junto a la comunicación del tercer ventrículo con los ventrículos laterales, en una zona extremadamente deformada que discurre a lo largo del *sulcus terminalis*, cerca del curso de las fibras de la *stria terminalis*, que discurre más lateralmente (Fan *et al*. 1996; Puelles *et al*. 2000; Puelles 2001; revisado en Puelles *et al*. 2012). Hay varios patrones de expresión génica que son continuos a lo largo de este pasillo que se extiende desde el hipotálamo al telencéfalo como, por ejemplo, los de Tbr1, Pax6 y Ngn2 (revisado en Puelles *et al*. 2012; *Allen Developing Mouse Brain Atlas*), además de Lhx5 y VGLUT2 (Abellán *et al*. 2010). Actualmente habría que distinguir en dicho corredor una parte periventricular que incluye al BSTMh y quizás la parte medial de la eminencia pretalámica, y una parte más lateral relacionada con otras poblaciones de distintos orígenes (Abellán y Medina 2008, 2009; Abellán *et al*. 2009, 2010).

Teniendo en consideración la dimensión radial del SPVt y del SPVp y sus migraciones tangenciales hacia otros dominios (tratadas en la siguiente sección), consideramos acertada la terminología SPV para denominar al dominio, pues éste da lugar a los núcleos PVN y SO hipotalámicos. Este término se había desechado y sustituido por el de dominio paraventricular debido a que se propuso que el núcleo SO sólo aparecía dentro del THy (Puelles y Rubenstein 2015). Sin embargo, nuestros resultados muestran que el SO principal deriva de la parte peduncular del SPV y está localizado en la superficie radial de dicho dominio, aunque tiene una pequeña parte en la superficie del SPVt y que posiblemente deriva de dicha subdivisión.

Otro aspecto a considerar es el desarrollo diferencial del SPVt y del SPVp. Nuestros datos sobre Otp y sobre VP/OT sugieren que el SPVp empieza a madurar antes que el SPVt. Ésto se basa en tres observaciones: en primer lugar, cuando se observa la primera expresión de Otp (en E10.5), ésta es más abundante en el SPVp que en el SPVt (como se mencionó antes). En segundo lugar, en E11.5, la expresión de Otp cubre ya gran parte del manto del SPVp, pero ésto no ocurrirá en el SPVt hasta E14.5. En tercer lugar, la primera expresión de VP y OT se observa en el SPVp.

## 4.2 Rutas de migración tangencial desde el SPV terminal y peduncular a otros dominios

Las migraciones tangenciales son aquellas que siguen una trayectoria ortogonal a la glía radial, es decir, de forma paralela a la superficie del tubo neural y fuera de la zona ventricular (Puelles *et al*. 2008).

Nuestros resultados de expresión (mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ*) y de los ensayos de migración, comparados con la glía radial, muestran que el dominio SPV produce células para otros dominios dorsales y ventrales al mismo. Estas migraciones tangenciales se observan desde ambas divisiones del SPV, el SPVt y el SPVp. Desde muy temprano en el desarrollo embrionario, observamos cómo las células Otp no se encuentran restringidas totalmente a la dimensión radial del SPV, aunque el grado de dispersión tangencial va en aumento a medida que progresa el desarrollo. Algunas células Otp se dispersan dorsalmente, hacia el dominio PO y la EAme, mientras otras se dispersan ventralmente hacia el dominio Ch/SPa, alcanzando algunas incluso el hipotálamo basal (Fig. 4.1).

Esta dispersión de células Otp concuerda con nuestros resultados de los ensayos de migración, y con estudios experimentales previos mostrando una migración de células desde el hipotálamo (Soma *et al*. 2009) o, más particularmente, desde SPV hipotalámico (Bupesh *et al*. 2011a) a la amígdala medial extendida (EAme).

Además, estos resultados concuerdan con la demostración experimental de la migración de células Otp desde el hipotalámo a la EAme (García-Moreno *et al*. 2010), y con el análisis de ratones Otp-*knockout*, en los que el número de células derivadas del SPV que llegan a la EAme disminuye (Wang y Lufkin 2000; García-Moreno *et al*. 2010).

El SPV también parece producir células para la EAme en otros vertebrados, incluyendo aves (Bardet *et al*. 2008; Abellán *et al*. 2010; Vicario *et al*. 2014), reptiles (Moreno *et al*. 2012; Abellán *et al*. 2013) y anfibios (Bardet *et al*. 2008). Sin embargo, habría que distinguir entre la participación, dentro de la parte dorsal del mismo dominio radial, del SPVp en el BSTMh de la contribución a través de migraciones tangenciales. Por ejemplo, es posible que la extensión del SPVp a la EAme mostrada en cortes sagitales del cerebro de rana por Bardet *et al*. (2008) se refiera en particular al BSTMh, y se incluye como una extensión dorsal (hacia el telencéfalo), en forma de espiga, del SPV que expresa Otp de forma abundante (Domínguez *et al*. 2013). Además de esta subdivisión del BSTM, que forma parte del dominio radial del SPV, al igual que en ratón, en aves y reptiles, existen migraciones tangenciales de células con Otp desde el SPV a la EAme (incluyendo partes laterales del BSTM posterior y la amígdala medial),

pero estas células están más dispersas y cursan más lateralmente hacia el telencéfalo (Moreno *et al*. 2012; Abellán *et al*. 2013). No está claro si estas migraciones tangenciales también existen en anfibios. En base a la expresión de VGLUT2 (marcador de células glutamatérgicas) en el SPV de distintos vertebrados, es muy probable que las células de la EAme derivadas del SVP sean glutamatérgicas y por lo tanto, que sus proyecciones sean excitadoras (García-Moreno *et al*. 2010; Abellán *et al*. 2010; Medina *et al*. 2017).

Un aspecto novedoso del presente estudio es que ha permitido distinguir las distintas rutas de migración dorsal y ventral desde las dos subdivisiones del SPV, el SPVt y el SPVp. En la Figura 4.1 se presenta un resumen de dichas rutas migratorias. A continuación, en apartados distintos se discute la contribución diferencial del SPVt y del SPVp a otras partes del hipotálamo y al telencéfalo.

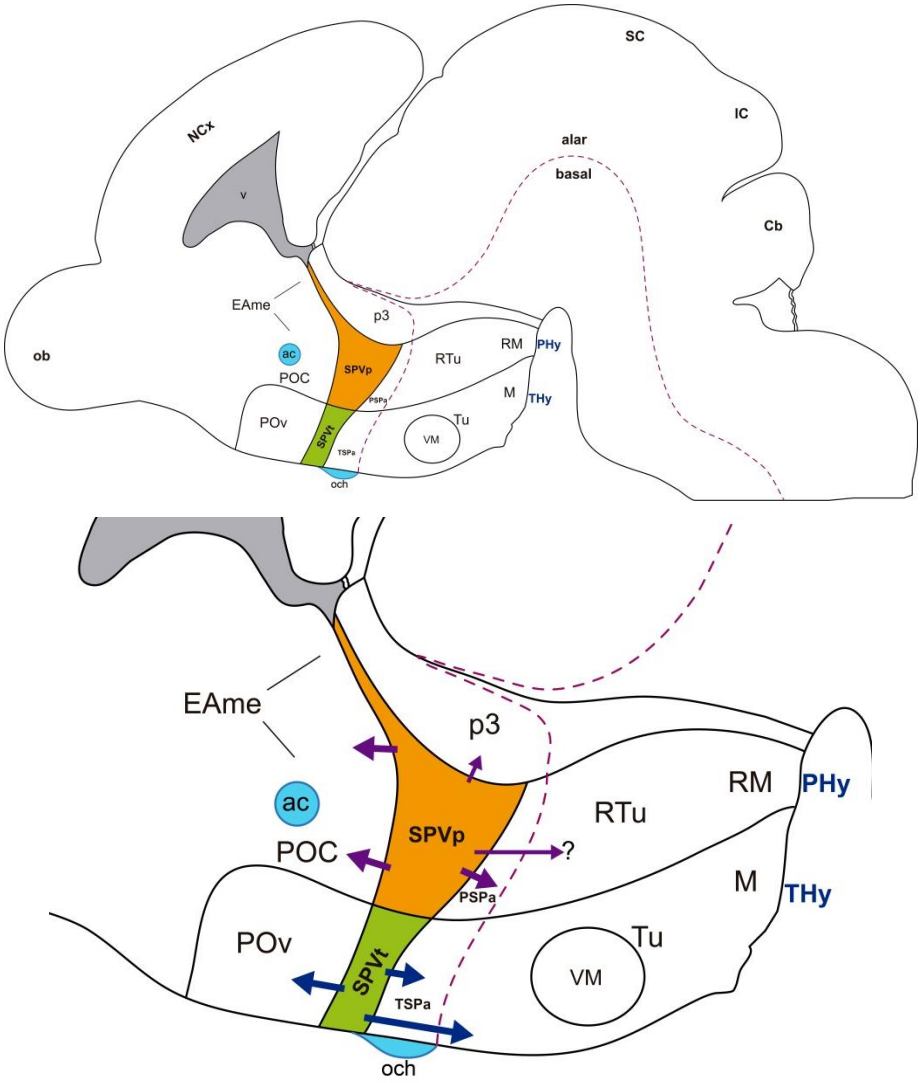



**Figura 4.1.** Representación esquemática de las distintas migraciones tangenciales desde el SPVt (en verde) y el SPVp (en naranja).

### 4.2.1 Contribución del subdominio SPV terminal al área preóptica ventral, al dominio quiasmático terminal y al hipotálamo tuberal

La división terminal del SPV no está bien definida y se ha confundido en parte con áreas preópticas o se ha incluido en áreas hipotalámicas más amplias que ahora sabemos que se expanden a través de varias divisiones histogenéticas. Sin embargo, nuestro estudio ha ayudado a delimitar qué áreas y núcleos derivan radialmente de esta división y se ha visto que es incluso más estrecha de lo que se había supuesto (Puelles *et al*. 2012).

Los ensayos de migración demuestran que desde el SPVt se producen migraciones tangenciales hacia dominios dorsales y ventrales, y la distribución de estas células migradas se correlaciona con la expresión de Otp en esos dominios.

Dorsalmente, el SPVt produce células para el dominio PO, en concreto, para el área ventral del PO (POv), que es Islet1 positivo. Desde estadios embrionarios tempranos (E11.5), es decir, poco después de que comience la expresión de Otp en el SPVt, se observa en el POv una mezcla de células Otp con otras que tienen Islet1, sin llegar a colocalizar. Ésto muestra la enorme diversidad celular que se observa en cada dominio, incluso en el desarrollo embrionario temprano. Quizás ésta es una de las razones por las que el área preóptica contiene no solamente neuronas GABAérgicas (lo habitual en el subpalio telencefálico), sino además subpoblaciones de neuronas glutamatérgicas (Medina y Abellán 2012). Nuestros ensayos de migración indican que las células derivadas del SPVt no alcanzan el área preóptica comisural y no parecen contribuir células a la amígdala extendida.

Por otro lado, las células que migran ventralmente desde el SPVt alcanzan el Ch/SPa terminal (Cht/TSPa), territorio rico en células con Islet1. En el Cht/TSPa, las células Otp y Islet1 se mantienen segregadas, ocupando las células Islet1 una posición medial con respecto a las células Otp, que se encuentran a nivel superficial. Las células Otp invaden la superficie del Cht/TSPa muy masivamente durante los estadios E12.5 y E13.5, pero esa población se va debilitando a medida que avanza el desarrollo (en E14.5, E16.5). Es probable que algunas de estas células Otp que migran ventralmente hacia el Cht/TSPa continúen migrando hacia territorios hipotalámicos más ventrales, alcanzando algunas de ellas el núcleo supraóptico tuberal (SOtu; denominado retroquiasmático, clásicamente, o núcleo subóptico tuberal [TuSbO], según el modelo prosomérico actualizado; Puelles *et al*. 2012; Puelles y Rubenstein 2015). Esta migración ventral desde el SPV al SOtu se ha sugerido en otros estudios en base al patrón de expresión de varios neuropéptidos y marcadores moleculares (Morales-Delgado *et al*. 2011; Díaz *et al*. 2015). Nuestros datos obtenidos

de ensayos de migración y de la expresión de Otp, Rgs4, VP y OT sugieren que el SPVt contribuye a este núcleo. Además, el marcador peduncular Rgs4 no se expresa en el SOtu. Este núcleo tiene una gran cantidad de células con Otp, que están en continuidad con otras en la misma posición superficial a nivel alar (formando un núcleo o masa en parte transitoria que hemos llamado núcleo quiasmático superficial o SuC). La cantidad de células con Otp a nivel tuberal aumenta de forma gradual a medida que disminuye a nivel alar, y en la misma posición se empiezan a observar muchas células con VP y con OT (a partir de E14.5). Sin embargo, debido al plano de corte (optimizado para analizar las migraciones a la amígdala), nuestros ensayos de migración no nos permitieron observar células migradas desde el SPVt a la zona tuberal, sino sólo a la zona quiasmática terminal. Por ello, para saber si el SPVt verdaderamente da lugar a las células del SOtu sería necesario llevar a cabo otras aproximaciones experimentales utilizando un plano de corte transversal al hipotálamo (según el modelo prosomérico) y colocando el trazador celular en el SPVt.

Además de la migración masiva superficial, a partir de E14.5 se observan células que migran ventralmente desde el SPVt hacia el Cht/TSPa, siguiendo una ruta periventricular. Quizás, estas células sean el origen de las células con Otp y, más tarde, con VP del núcleo supraquiasmático (SCh).

### 4.2.2 Contribución del subdominio SPV peduncular al área preóptica comisural, a la amígdala medial extendida, al dominio quiasmático peduncular, a áreas basales del hipotálamo peduncular y al pretálamo

Nuestros ensayos de migración, comparados con la distribución de células con Otp, VP y OT a lo largo del desarrollo, así como con la expresión del marcador peduncular Rgs4, muestran numerosas migraciones tangenciales que se producen desde este subdominio del SPV. Parece que este subdominio es la única parte del hipotálamo que produce células para la amígdala medial extendida.

Desde el SPVp las células migran dorsalmente adentrándose tangencialmente en el área preóptica comisural (POC) y la zona diagonal (del MGEcv o antiguo AEP), donde alcanzan distintas partes de la EAme, incluyendo parte de la amígdala medial (Me), de la región sublenticular de la EAme y del BSTM posterolateral. Como se ha comentado, en estudios previos se ha demostrado la contribución del SPV a la EAme (García-Moreno *et al*. 2010; Bupesh *et al*. 2011a). Sin embargo, hasta ahora no se había especificado qué división del SPV era la implicada en esa contribución. Nuestros datos muestran que es el SPVp el que produce células para la EAme. Además, parece que al menos dos subdivisiones del SPVp, la dorsal (BSTMh) y la central, podrían producir células para la EAme. En la Me las células Otp se encuentran totalmente

segregadas de las células Islet1, pero en el BSTM posterolateral y a nivel comisural algunas células Otp se entremezclan con las Islet1 sin llegar a colocalizar. Una vez más se muestra la enorme complejidad celular que posee cada dominio, tal y como se ha sugerido por nuestro grupo en base a datos en distintos vertebrados (García-López *et al*. 2008; Bupesh *et al*. 2011a; Abellán *et al*. 2013; Medina *et al*. 2017; Vicario *et al*. 2017). Además de las células con origen hipotalámico, el EAme contiene células con origen palidal (en el MGEcv o dominio diagonal), en el área preóptica (tanto POC como POv, como se comenta en los resultados y en el último apartado de la discusión), y en la eminencia pretalámica (Medina *et al*. 2017). La amígdala medial también incluye una subpoblación minoritaria de neuronas con origen en el palio ventral (con Lhx9; García-López *et al*. 2008; Abellán *et al*. 2009; Bupesh *et al*. 2011b; Medina *et al*. 2017). Además, en base a mapas del linaje celular con *Foxb1*, parece que el pretálamo también produce una subpoblación de células para la EAme (Zhao *et al*. 2008), por lo que podría ser responsable de algunas de las células Islet1 (no todas, pues algunas podrían ser preópticas) que se entremezclan con las de Otp en la parte posterolateral del BSTM. Mientras las células del EAme con origen hipotalámico (con Otp) y con origen en la eminencia pretalámica (con Pax6 y/o Lhx5) son glutamatérgicas (Abellán *et al*. 2013; Medina *et al*. 2017), las de origen pretalámico con linaje Foxb1 son GABAérgicas (Zhao *et al*., 2008), al igual que las de origen subpalial (Abellán *et al*. 2013; Medina *et al*. 2017).

Ventralmente, se observan células que migran desde el SPVp al Ch/SPa peduncular (Chp/PSPa) y a otras áreas hipotalámicas más ventrales. Ésto concuerda con los estudios previos de nuestro laboratorio que demostraban una migración ventral desde el SPV al Ch/SPa (Bupesh *et al*. 2011a). Otros trabajos basados en el estudio de la distribución de células con marcadores moleculares a lo largo del desarrollo habían propuesto que una población de neuronas GHRH producidas en la división ventral del SPV podría estar migrando hacia el Chp/PSPa (Morales-Delgado *et al*. 2014). Además, nuestros datos sugieren una pequeña migración desde el SPVp al pretálamo. El fenotipo de las células migradas será discutido en el siguiente apartado.

## 4.3 Fenotipo de las neuronas que migran desde el SPV a la EAme y a otros dominios

### 4.3.1 Distribución de VP y OT en el hipotálamo y en la EAme durante el desarrollo embrionario, y comparación con Otp y con los ensayos de migración celular

Los núcleos PVN y SO contienen las neuronas productoras de los neuropéptidos VP y OT, y se ha demostrado que el factor de transcripción Otp desempeña un papel fundamental en su diferenciación, en base a que dichas neuronas no se forman en ratones Otp-*knockout* (Acampora *et al*. 1999, 2000; Wang y Lufkin 2000). Sin embargo, no existía demostración experimental directa del origen embrionario concreto de dichas células, pues hay células con Otp en varios dominios hipotalámicos (Morales-Delgado *et al*. 2011, 2014). Nuestro estudio ha mostrado que el SPV parece ser el origen de las células del PVN y SO (y otras áreas del dominio radial del SPV), y que desde este dominio algunas células migran tangencialmente para alcanzar otras zonas. Los resultados de nuestros ensayos de migración muestran la existencia de tales migraciones celulares del SPV a otras partes del hipotálamo, así como al telencéfalo. Además la combinación de los ensayos de migración con marcaje inmunofluorescente para VP ha demostrado que verdaderamente el SPV produce neuronas con VP para el AH, el LH, el SO y otras partes más ventrales del hipotálamo.

Como se ha explicado, el SPV también produce células para la EAme y otros dominios adyacentes (presentes resultados; García-Moreno *et al*. 2010; Bupesh *et al*. 2011a). Nuestro grupo propuso que algunas de esas células podrían ser VP u OT, pero el fenotipo de estas células no se había podido demostrar hasta ahora.

Las células que llegan a la EAme suscitan un interés especial ya que esta estructura es un centro telencefálico clave para el control del comportamiento y la cognición social (Alheid y Heimer 1988; Alheid *et al*. 1995; De Vries y Miller 1998; Coolen y Wood 1998; Newman 1999; Swanson 2000; Heimer 2003; de Olmos *et al*. 2004; Bickart *et al*. 2014). Además, los sistemas con VP y OT han sido precisamente muy estudiados por su implicación en comportamiento y cognición social (Young y Wang 2004; Cushing y Kramer 2005) y su relación con diversos trastornos psiquiátricos, como el autismo y la esquizofrenia (Insel *et al*. 1999; Bielsky y Young 2004; Montag *et al*. 2012; Banerjee *et al*. 2014). Por ello, el estudio del origen embrionario de las neuronas VP y OT de la EAme podría ayudar a entender las redes funcionales en las que están implicadas (Medina *et al*. 2017), lo cual puede ayudar a comprender los efectos de la disfunción de dichas redes.

Con el fin de estudiar en detalle la distribución de células con expresión de VP y OT, usamos la técnica de hibridación *in situ*, lo que nos permitió la localización del ARNm de estos neuropéptidos desde estadios más tempranos, ya que la proteína se expresa más tarde. Esta expresión la comparamos con Otp y con Rgs4 (marcador peduncular). Los estudios realizados hasta ahora mostraban que el ARNm de OT se detecta en el cerebro embrionario de ratón a partir de E15.5 y el de VP a partir de E16 (revisado en Ugrumov 2002; Grinevich *et al*. 2015). En cambio, nuestros resultados muestran la primera expresión de ARNm de ambos neuropéptidos en E13 en la dimensión radial del dominio SPV, lo cual casi coincide con la expresión de VP encontrada en el *Allen Developing Mouse Brain Atlas* (en E13.5). Nuestros datos indican que la expresión es más intensa para VP que para OT. Esta diferencia con los estudios previos podría deberse a una mayor sensibilidad del protocolo de hibridación *in situ* que hemos utilizado, ya que los datos publicados se basaban en técnicas autorradiográficas. En E13 y en E13.5, mientras el ARNm de VP se expresa en los núcleos PVN y SO, el de OT lo hace únicamente en el SO. Ésto sugiere que las neuronas oxitocinérgicas empiezan a diferenciarse más tardíamente que las vasopresinérgicas. A partir de E14.5, la expresión de VP y OT se extiende a otras zonas hipotalámicas y extrahipotalámicas. A nivel hipotalámico, el mensajero de VP y OT se expresa en células de otros dominios hipotalámicos ventrales, como el Ch/SPa y el hipotálamo basal, coincidiendo con las células Otp que se observan en estas zonas. Nuestros ensayos de migración combinados con inmunofluorescencia para VP demuestran que algunas de las células del SPV que llegan a zonas más ventrales hipotalámicas son vasopresinérgicas.

A partir de E16.5, en el Ch/SPa la VP se expresa en el núcleo supraquiasmático (SCh). Este núcleo también contiene células Otp dispersas, que podrían ser el origen de las células VP que se diferencian en este núcleo. Sin embargo, resulta curioso encontrar expresión de VP en el SCh de ratones Otp-*knockout* (Acampora *et al* 1999). Puede ser que en este núcleo la expresión de VP esté bajo el control de otros factores de transcripción (como Sim1) y, por tanto, esta población sea diferente de la observada en el PVN y el SO.

En el hipotálamo basal, la expresión de VP y OT es muy intensa en el SOtu. Esta expresión está relacionada con la dispersión ventral que siguen algunas células Otp desde el SPV al Ch/SPa y a territorios hipotalámicos más ventrales. Los resultados de hibridación *in situ* y los ensayos de migración sugieren que las células VP y OT del SOtu provienen de una dispersión ventral del SPVt. Estos datos coinciden con lo que se ha sugerido en otros estudios (Díaz *et al*. 2015).

Fuera del hipotálamo, VP y OT se expresan en células de la EAme. La primera expresión de VP y OT en la EAme la encontramos en E14.5, lo que coincide con los resultados publicados en rata (Al-Shamma y De Vries 1996). VP y OT se expresan en el BSTM, la Me y la región sublenticular de la EAme, y en todas estas regiones hay células Otp migradas desde el SPV. Estos resultados se corroboran con los estudios con ratones Otp-*knockout* donde la expresión de VP y OT desaparece en todas estas áreas de la EAme (Acampora *et al*. 1999; Wang y Lufkin 2000). Nuestros resultados de ensayos de migración combinados con inmunofluorescencia para VP demuestran que algunas de las células de la EAme que se producen en el SPV son vasopresinérgicas, siendo ésta la primera demostración experimental. Por otro lado, en el BSTMh se observan algunas células aisladas de VP pero no de OT. Ésto sugiere que las células con expresión de VP y OT se concentran en las partes central y ventral del SPV, y no en la dorsal, que es donde se localiza el BSTMh.

Además, nuestros datos ponen de manifiesto que el SPVt y el SPVp producen células VP y OT de manera diferencial. El SPVp daría lugar a las neuronas VP y OT del PVN, el SO principal y el AH/LH y también es el origen de las células VP y OT que migran tangencialmente hacia áreas ventrales hipotalámicas y la EAme, lo cual se ha demostrado experimentalmente para las células con VP. Por otro lado, el SPVt sería el origen de las neuronas con VP y/u OT encontradas en el SO terminal, y quizás también las del SCh y el SOtu.

### 4.3.2 Dimorfismo sexual de las neuronas VP y OT

Muchos son los estudios que demuestran el dimorfismo sexual en las respuestas en las que están implicados los neuropéptidos VP y OT, teniendo un papel importante en la expresión de los comportamientos característicos de machos y de hembras (Young 1999; Insel y Young 2000; Goodson y Bass 2000; Ferguson *et al*. 2002; Kelly y Goodson 2013; Paul *et al*. 2014). De esta forma, la VP regula principalmente el comportamiento de machos mientras que la OT tiene mayor relevancia en el de hembras (Young 1999; Insel y Young 2000; Goodson y Bass 2000; Ferguson *et al*. 2002; Kelly y Goodson 2013; Paul *et al*. 2014). Esta diferencia sexual es variable dependiendo de la especie (Goodson 2013; revisado en Albers 2015). Además, la mayoría de los efectos de la VP y la OT, especialmente los relacionados con comportamiento, son dependientes de esteroides (Wang *et al*. 1994; Caldwell *et al*. 2003; Cushing y Kramer 2005). Diversos estudios han mostrado la existencia de dimorfismo sexual en el BSTM y, en particular, de las neuronas que expresan VP y OT en distintas especies de vertebrados (revisado en Grossmann *et al*. 2002; De Vries y

Panzica 2006; datos en rata: Al-Shamma y De Vries 1996; Dumais *et al*. 2016; datos en ratón: Otero-García *et al*. 2014, 2016).

Aunque el estudio del origen de este dimorfismo sexual no era uno de los objetivos de la tesis, sexamos los animales utilizados en nuestro estudio y consideramos la posible influencia del sexo en la distribución de los neuropéptidos VP y OT durante el desarrollo embrionario. En las edades estudiadas no observamos diferencias sexuales ni en la distribución de VP y OT, ni en el momento en que comienzan a expresarse. Sin embargo, sería necesario un estudio más completo, con mayor tamaño muestral, y en el que se tengan en consideración los niveles de hormonas gonadales de cada individuo ya que la expresión de estos nonapéptidos es muy sensible a las variaciones en los niveles de estas hormonas (rata: DeVries *et al*. 1985; Han y De Vries 2003; ratón: Rood *et al*. 2013).

### 4.4. Nueva concepción del dominio preóptico y su contribución a la amígdala medial extendida y otras áreas subpaliales

Nuestros datos de Otp y los ensayos de migración muestran que cada una de las divisiones prosoméricas del SPV guarda relación con una parte distinta del área preóptica: el SPVt produce células que migran tangencialmente a la subdivisión preóptica ventral (POv), mientras que el SPVp produce células que migran tangencialmente a la subdivisión preóptica comisural (POC). Estos datos, junto con la expresión del marcador peduncular Rgs4 en POC pero no POv sugieren que el POv pertenece al prosómero terminal, mientras que POC pertenece al peduncular. Ésto contradice la propuesta más reciente del modelo prosomérico, que sugiere que toda la región preóptica es terminal (Puelles *et al*. 2012; Puelles y Rubenstein 2015). Sin embargo, nuestra propuesta concuerda mejor con los datos de la dispersión tangencial de células, que principalmente ocurriría dentro de cada prosómero, así como con los datos de Rgs4. Sería necesario explorar la expresión de otros genes y realizar mapas de destino precisos del prosómero terminal para ver si nuestra propuesta se sostiene. Por otro lado, nuestra propuesta también concuerda mejor con el recorrido de algunos tractos de fibras, como el pedúnculo cerebral, la comisura anterior y el fórnix, todos ellos siguiendo principalmente el prosómero peduncular. Es más, teniendo en cuenta el recorrido dorsoventral del fórnix a lo largo del prosómero peduncular, es muy posible que los cuerpos mamilares pertenezcan al mismo prosómero, en lugar del terminal que es donde se ha situado en la última revisión del modelo prosomérico (Puelles y Rubenstein 2015). No obstante, ésto no significa que no pueda haber trasvases de neuronas entre prosómeros, aunque éstas sean menos frecuentes. De hecho se ha propuesto la existencia de migraciones tangenciales desde el prosómero 3 al

prosencéfalo secundario en base al mapa de destino de células con linaje de Foxb1 (Zhao *et al*. 2008). Nuestros resultados también muestran migraciones entre ambos dominios preópticos.

Por otro lado, estudios previos han demostrado que el POC produce células con expresión de Shh para una parte de la EAme, además de producir otras poblaciones celulares para otras partes del telencéfalo (García-López *et al*. 2008; Carney *et al*. 2010; Bupesh *et al*. 2011a, 2014). Estas migraciones desde el POC a la EAme y otras partes del telencéfalo también se describieron en aves (Abellán y Medina 2009). En estudios previos se pensó que el POv (rico en células con Islet1) no producía células para la amígdala (Bupesh *et al*. 2011b). Sin embargo, los datos de esta tesis indican que tanto el POC como el POv producen neuronas para la amígdala, incluyendo tanto el BSTM como la amígdala medial. Ésto podría ayudar a explicar algunas de las neuronas con Islet1 observadas en el BSTM, que podrían proceder del POv. Habría que realizar más estudios para entender mejor la distribución y el fenotipo de las neuronas de la EAme con origen en distintas partes de la región preóptica.

# 5. Conclusiones

# 5. CONCLUSIONES

**1.** El dominio supraopto-paraventricular (SPV) se puede identificar desde el estadio embrionario E9.5, como una zona libre de expresión de Islet1 situada en la región alar del prosencéfalo secundario, entre tres dominios ricos en este factor de transcripción: el dominio preóptico (PO, dorsalmente), el dominio quiasmático o subparaventricular (Ch/SPa, ventralmente) y el dominio pretalámico (caudalmente). En E10.5, el dominio SPV presenta expresión del factor de transcripción Otp en las proximidades de la base del pedículo óptico. La expresión de Otp se extiende a la mayor parte del manto del SPV desde E11.5.

**2.** Desde el estadio E12.5 se pueden distinguir las dos divisiones prosoméricas del dominio SPV, la terminal y la peduncular, en base a la expresión de Rgs4. Ambas divisiones expresan el factor de transcripción Otp pero únicamente la peduncular expresa Rgs4.

**3.** La expresión combinatoria de Otp, Rgs4 y Islet1, junto con los resultados obtenidos en los ensayos de migración celular proporcionan evidencia sobre la contribución diferencial de las divisiones terminal y peduncular del dominio SPV al hipotálamo y al telencéfalo. Además, la comparación con la glía radial muestra que se producen tanto migraciones celulares radiales como tangenciales desde ambos subdominios, y que la dispersión tangencial se produce desde estadios embrionarios tempranos (E11.5, E12.5).

**4.** El SPV terminal (SPVt) produce células para una región rostral del hipotálamo, y además produce células que migran tangencialmente tanto dorsalmente, al área preóptica ventral (POv), como ventralmente, al dominio quiasmático terminal (Cht/TSPa), ambos Islet1 positivos. La distribución de las células migradas tangencialmente que derivan del SPVt se relaciona con la expresión de Otp encontrada en el POv y en el Cht/TSPa. Mientras que en el POv las células Otp y Islet1 se entremezclan desde E11.5 sin llegar a colocalizar, en el Cht/TSPa se encuentran inicialmente segregadas, ocupando las células Islet1 una posición medial con respecto a las células Otp, que se encuentran a nivel superficial. La población superficial de células Otp observada a nivel del dominio Cht/TSPa se vuelve muy importante en E12.5 - E13.5, pero más tarde va perdiendo densidad celular de forma gradual (E14.5, E16.5), en parte debido a una migración más ventral de las células. Algunas de las células que migran ventralmente al Cht/TSPa parecen contribuir al

núcleo supraóptico tuberal, situado en el hipotálamo basal. A partir de E14.5, se observa otra migración celular tangencial ventral desde el SPVt, que cursa periventricuarmente, y podría ser el origen de las células Otp del núcleo supraquiasmático.

**5.** El SPV peduncular (SPVp) da lugar al complejo nuclear paraventricular (PVN), al núcleo supraóptico principal (SO) y a una subdivisión hipotalámica del núcleo medial del lecho de la *stria terminalis* (BSTM), todos en la dimensión radial del SPVp. Esta subdivisión hipotalámica del BSTM, localizada en el aspecto más dorsal del SPVp, se deforma formando una espiga que toca el telencéfalo y que expresa Otp. En esta zona, las células Otp y Islet1 se mantienen segregadas.

**6.** La distribución de las células derivadas del SPVp migradas tangencialmente al telencéfalo y a otras partes del hipotálamo se relaciona con la expresión de Otp encontrada en esas zonas. El SPVp produce células para el área preóptica comisural (POC), la amígdala medial extendida (EAme), el dominio quiasmático peduncular (Chp/PSPa) y otras áreas más ventrales del hipotálamo peduncular, así como el dominio pretalámico. En partes preópticas y posterolaterales del BSTM, las células Islet1 se entremezclan con las Otp sin llegar a colocalizar, mientras que en la Me y en el Chp/PSPa las células Islet1 y Otp se encuentran totalmente segregadas.

**7.** En contraste con nuestra hipótesis inicial que proponía una contribución diferencial de las distintas subdivisiones del SPV a la EAme, nuestros resultados muestran que es únicamente la parte peduncular la que proporciona células a distintas subdivisiones de la EAme, incluyendo la amígdala medial (Me), la región sublenticular de la EAme, y las partes hipotalámica y telencefálica del BSTM.

**8.** Desde el estadio embrionario E13/13.5, se observa expresión del RNA mensajero (RNAm) de los neuropéptidos vasopresina (VP) y oxitocina (OT) en células de los núcleos PVN y/o SO principal hipotalámicos del SPVp. A partir de E14.5, se observan también células con el RNAm de VP y OT en el hipotálamo lateral (LH) del mismo dominio SPVp, así como en otros territorios hipotalámicos, como el dominio Ch/SPa y el hipotálamo basal, y extrahipotalámicos, como la EAme. Al principio, las células con VP y con OT sólo se encuentran en el prosómero peduncular, pero a partir de E14.5 también se observan en el terminal.

**9.** Dentro del hipotálamo terminal, las primeras células con VP y OT se observan en la zona quiasmática superficial y el núcleo supraóptico tuberal (SOtu, en el hipotálamo basal). A partir de E16.5, también se observan células con VP en el núcleo supraquiasmático (SCh) y, células con VP u OT en una división terminal y alar del núcleo supraóptico.

**10.** Los datos obtenidos de la expresión de estos neuropéptidos, y la del marcador peduncular Rgs4 y los resultados de los ensayos de migración celular muestran que el SPVp es el origen de las neuronas VP y OT del núcleo paraventricular, el SO principal, el AH/LH, de algunas áreas ventrales hipotalámicas y de la EAme. Estas últimas se localizan en el BSTM, la zona sublenticular de la EAme y en la amígdala medial. Por otra parte, la comparación con Rgs4 (ausente en la zona terminal alar) y los ensayos de migración celular sugieren que las neuronas VP y OT que se localizan en los núcleos SCh y SOtu se originarían en el SPVt.

**11.** Las divisiones del dominio preóptico, ventral (POv) y comisural (POC), contribuyen de manera diferencial a la EAme. Nuestros resultados muestran que desde ambos subdominios preópticos se producen migraciones celulares al BSTM y la Me. El POC también produce células para el BSTL, el estriado y otras áreas ventrales subpaliales.

**12**. Los resultados sugieren que la división ventral del dominio preóptico se encuentra en el prosómero terminal y recibe principalmente células que emigran desde el SPVt, mientras que la comisural se encuentra en el prosómero peduncular y recibe mayormente células que emigran del SPVp. Además, los ensayos de migración muestran migraciones tangenciales interprosoméricas desde el POv al POC y viceversa.

**13.** Los resultados sugieren que la vesícula óptica se relaciona con las dos partes del SPV, la terminal y la peduncular, de forma que la terminal sería continua con el verdadero tallo óptico (por donde cursarán los axones de las células ganglionares de la retina) y la parte neural de la retina, mientras que la peduncular guarda relación con el epitelio pigmentario.

# 6. Referencias bibliográficas

# 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abellán A, Desfilis E, Medina L (2014) Combinatorial expression of Lef1, Lhx2, Lhx5, Lhx9, Lmo3, Lmo4, and Prox1 helps to identify comparable subdivisions in the developing hippocampal formation of mouse and chicken. Front Neuroanat 8:59. doi: 10.3389/fnana.2014.00059

Abellán A, Desfilis E, Medina L (2013) The olfactory amygdala in amniotes: an evo-devo approach. Anat Rec 296:1317–32. doi: 10.1002/ar.22744

Abellán A, Legaz I, Vernier B, et al (2009) Olfactory and amygdalar structures of the chicken ventral pallium based on the combinatorial expression patterns of LIM and other developmental regulatory genes. J Comp Neurol 516:166–186. doi: 10.1002/cne.22102

Abellán A, Medina L (2009) Subdivisions and derivatives of the chicken subpallium based on expression of LIM and other regulatory genes and markers of neuron subpopulations during development. J Comp Neurol 515:465–501. doi: 10.1002/cne.22083

Abellán A, Medina L (2008) Expression of cLhx6 and cLhx7/8 suggests a pallido-pedunculo-preoptic origin for the lateral and medial parts of the avian bed nucleus of the stria terminalis. Brain Res Bull 75:299–304. doi: 10.1016/j.brainresbull.2007.10.034

Abellán A, Vernier B, Rétaux S, Medina L (2010) Similarities and differences in the forebrain expression of Lhx1 and Lhx5 between chicken and mouse: Insights for understanding telencephalic development and evolution. J Comp Neurol 518:3512–28. doi: 10.1002/cne.22410

Acampora D, Postiglione MP, Avantaggiato V, et al (1999) Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. Genes Dev 13:2787–800.

Acampora D, Postiglione MP, Avantaggiato V, et al (2000) The role of Otx and Otp genes in brain development. Int J Dev Biol 44:669–77.

Aggleton J (2000) The Amygdala: A functional analysis., 2nd Ed. Oxford University Press

Albers HE (2015) Species, sex and individual differences in the vasotocin/vasopressin system: Relationship to neurochemical signaling in the social behavior neural network. Front Neuroendocrinol 36:49–71. doi: 10.1016/j.yfrne.2014.07.001

Alheid G, de Olmos J, Beltramino C (1995) Amygdala and extended amygdala. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system, 2nd ed. Academic Press, San Diego, pp 495–578

Alheid GF, Heimer L (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. Neuroscience 27:1–39.

Alonso A (2007) Estudio experimental de la regionalización prosencefálica. Universidad de La Laguna

Al-Shamma HA, De Vries GJ (1996) Neurogenesis of the sexually dimorphic vasopressin cells of the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala of rats. J Neurobiol 29:91–8.

Alvarez-Bolado G, Rosenfeld MG, Swanson LW (1995) Model of forebrain regionalization based on spatiotemporal patterns of POU-III homeobox gene expression, birthdates, and morphological features. J Comp Neurol 355:237–95. doi: 10.1002/cne.903550207

Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW (2008) Neuroanatomy of autism. Trends Neurosci 31:137–45. doi: 10.1016/j.tins.2007.12.005. Epub 2008 Feb 6

Amico JA, Johnston JM, Vagnucci AH (1994) Suckling-induced attenuation of plasma cortisol concentrations in postpartum lactating women. Endocr Res 20:79–87.

Andari E, Duhamel J-R, Zalla T, et al (2010) Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. Proc Natl Acad Sci U S A 107:4389–94. doi: 10.1073/pnas.0910249107

Anderson S, Marín O, Horn C, et al (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. Development 128:353–63.

Banerjee P, Joy KP, Chaube R (2017) Structural and functional diversity of nonapeptide hormones from an evolutionary perspective: A review. Gen Comp Endocrinol 241:4–23. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.04.025

Banerjee S, Riordan M, Bhat MA (2014) Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models. Front Cell Neurosci 8:58. doi: 10.3389/fncel.2014.00058

Bardet SM (2007) Organización morfológica y citogenética del hipotálamo del pollo sobre base de mapas moleculares. Universidad de Murcia

Bardet SM, Ferran JLE, Sanchez-Arrones L, Puelles L (2010) Ontogenetic expression of sonic hedgehog in the chicken subpallium. Front Neuroanat. doi: 10.3389/fnana.2010.00028

Bardet SM, Martinez-de-la-Torre M, Northcutt RG, et al (2008) Conserved pattern of OTP-positive cells in the paraventricular nucleus and other hypothalamic sites of tetrapods. Brain Res Bull 75:231–5. doi: 10.1016/j.brainresbull.2007.10.037. Epub 2007 Nov 20

Baron-Cohen S, Ring HA, Bullmore ET, et al (2000) The amygdala theory of autism. Neurosci Biobehav Rev 24:355–64.

Bergquist H, Kallen B (1953) On the development of neuromeres to migration areas in the vertebrate cerebral tube. Acta Anat (Basel) 18:65–73.

Bickart KC, Dickerson BC, Barrett LF (2014) The amygdala as a hub in brain networks that support social life. Neuropsychologia 63:235–48. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2014.08.013

Bielsky IF, Hu S-B, Young LJ (2005) Sexual dimorphism in the vasopressin system: lack of an altered behavioral phenotype in female V1a receptor knockout mice. Behav Brain Res 164:132–6. doi: 10.1016/j.bbr.2005.06.005

Bielsky IF, Young LJ (2004) Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. Peptides 25:1565–1574. doi: 10.1016/j.peptides.2004.05.019

Birnbaumer M (2000) Vasopressin receptors. Trends Endocrinol Metab 11:406–10.

Bishop K, Garel S, Nakagawa Y, et al (2003) Emx1 and Emx2 cooperate to regulate cortical size, lamination, neuronal differentiation, development of cortical efferents, and thalamocortical pathfinding. J Comp Neurol 457:345–60.

Bishop K, Goudreau G, O'Leary D (2000) Regulation of area identity in the mammalian neocortex by Emx2 and Pax6. Science 288:344–9.

Born J, Lange T, Kern W, et al (2002) Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. Nat Neurosci 5:514–516. doi: 10.1038/nn849

Boyd SK, Tyler CJ, de Vries GJ (1992) Sexual dimorphism in the vasotocin system of the bullfrog (Rana catesbeiana). J Comp Neurol 325:313–325. doi: 10.1002/cne.903250213

Briscoe J, Ericson J (2001) Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. Curr Opin Neurobiol 11:43–9.

Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. Cell 101:435–45.

Brox A, Puelles L, Ferreiro B, Medina L (2003) Expression of the genes GAD67 and Distal-less-4 in the forebrain of Xenopus laevis confirms a common pattern in tetrapods. J Comp Neurol 461:370–393. doi: 10.1002/cne.10688

Buijs RM, Swaab DF, Dogterom J, van Leeuwen FW (1978) Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Cell Tissue Res 186:423–33.

Bulfone A, Martinez S, Marigo V, et al (1999) Expression pattern of the Tbr2 (Eomesodermin) gene during mouse and chick brain development. Mech Dev 84:133–8.

Bulfone A, Smiga SM, Shimamura K, et al (1995) T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. Neuron 15:63–78.

Bupesh M, Abellán A, Medina L (2011b) Genetic and experimental evidence supports the continuum of the central extended amygdala and a mutiple embryonic origin of its principal neurons. J Comp Neurol 519:3507–31. doi: 10.1002/cne.22719

Bupesh M, Legaz I, Abellán A, Medina L (2011a) Multiple telencephalic and extratelencephalic embryonic domains contribute neurons to the medial extended amygdala. J Comp Neurol 519:1505–25. doi: 10.1002/cne.22581

Bupesh M, Vicario A, Abellán A, et al (2014) Dynamic expression of tyrosine hydroxylase mRNA and protein in neurons of the striatum and amygdala of mice, and experimental evidence of their multiple embryonic origin. Brain Struct Funct 219:751–776. doi: 10.1007/s00429-013-0533-7

Burbach J, Young L, Russell J (2006) Oxytocin: synthesis, secretion and reproductive functions. In: Neill J (ed) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, pp 3055–3128

Caldwell H, Wersinger S, Young W 3rd (2008) The role of the vasopressin 1b receptor in aggression and other social behaviours. Prog Brain Res 170:65–72. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00406-8

Caldwell H, Young W (2006) Oxytocin and Vasopressin: Genetics and Behavioral Implications. In: Lim R (ed) Neuroactive Proteins and Peptides, 3rd ed. Springer, pp 573–607

Caldwell JD, Song Y, Englöf I, et al (2003) 5alpha-Reduced androgens block estradiol-BSA-stimulated release of oxytocin. Brain Res 976:259–61.

Canteras NS, Goto M (1999) Connections of the precommissural nucleus. J Comp Neurol 408:23–45.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. J Comp Neurol 360:213–245. doi: 10.1002/cne.903600203

Caqueret A, Boucher F, Michaud JL (2006) Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus. Dev Biol 298:95–106. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.06.019

Caqueret A, Yang C, Duplan S, et al (2005) Looking for trouble: a search for developmental defects of the hypothalamus. Horm Res 64:222–30. doi: 10.1159/000088977

Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002) Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. Neurosci Biobehav Rev 26:321–52.

Carney RSE, Mangin J-M, Hayes L, et al (2010) Sonic hedgehog expressing and responding cells generate neuronal diversity in the medial amygdala. Neural Dev 5:14. doi: 10.1186/1749-8104-5-14

Caronna EB, Milunsky JM, Tager-Flusberg H (2008) Autism spectrum disorders: clinical and research frontiers. Arch Dis Child 93:518–523. doi: 10.1136/adc.2006.115337

Carter C, Grippo A, Pournajafi-Nazarloo H, et al (2008) Oxytocin, vasopressin and sociality. Prog Brain Res 170:331–336. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00427-5

Carter CS (2007) Sex differences in oxytocin and vasopressin: implications for autism spectrum disorders? Behav Brain Res 176:170–86. doi: 10.1016/j.bbr.2006.08.025

Carter CS (2003) Developmental consequences of oxytocin. Physiol Behav 79:383–397. doi: 10.1016/S0031-9384(03)00151-3

Carter CS, DeVries AC, Getz LL (1995) Physiological substrates of mammalian monogamy: the prairie vole model. Neurosci Biobehav Rev 19:303–14.

Carter CS, DeVries AC, Taymans SE, et al (1997) Peptides, steroids, and pair bonding. Ann N Y Acad Sci 807:260–72.

Carter CS, Keverne EB (2002) The neurobiology of social affiliation and pair bonding. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, et al. (eds) Hormones, Brain and Behavior, vol. 1, Academic P. pp 299–337

Champagne F, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ (2001) Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 98:12736–41. doi: 10.1073/pnas.221224598

Chiodera P, Salvarani C, Bacchi-Modena A, et al (1991) Relationship between plasma profiles of oxytocin and adrenocorticotropic hormone during suckling or breast stimulation in women. Horm Res 35:119–23.

Cho MM, DeVries AC, Williams JR, Carter CS (1999) The effects of oxytocin and vasopressin on partner preferences in male and female prairie voles (Microtus ochrogaster). Behav Neurosci 113:1071–9.

Choi GB, Dong H-W, Murphy AJ, et al (2005) Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. Neuron 46:647–60. doi: 10.1016/j.neuron.2005.04.011

Choleris E, Cazzin L, Lymer JM, et al (2013) Acute corticosterone sexually dimorphically facilitates social learning and inhibits feeding in mice. Neuropharmacology 75:191–200. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.07.011

Choleris E, Clipperton-Allen AE, Phan A, Kavaliers M (2009) Neuroendocrinology of social information processing in rats and mice. Front Neuroendocrinol 30:442–459. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.05.003

Choleris E, Little SR, Mong JA, et al (2007) Microparticle-based delivery of oxytocin receptor antisense DNA in the medial amygdala blocks social recognition in female mice. Proc Natl Acad Sci U S A 104:4670–5. doi: 10.1073/pnas.0700670104

Colas JF, Schoenwolf GC (2001) Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. Dev Dyn 221:117–45. doi: 10.1002/dvdy.1144

Coolen LM, Wood RI (1998) Bidirectional connections of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster brain: simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. J Comp Neurol 399:189–209.

Cushing BS, Kramer KM (2005) Mechanisms underlying epigenetic effects of early social experience: the role of neuropeptides and steroids. Neurosci Biobehav Rev 29:1089–105. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.04.001

D'Hanis W, Linke R, Yilmazer-Hanke DM (2007) Topography of thalamic and parabrachial calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive neurons projecting to subnuclei of the amygdala and extended amygdala. J Comp Neurol 505:268–91. doi: 10.1002/cne.21495

Davis M (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. Annu Rev Neurosci 15:353–375. doi: 10.1146/annurev.ne.15.030192.002033

Davis M (1998) Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? Biol Psychiatry 44:1239–1247. doi: 10.1016/S0006-3223(98)00288-1

Davis MC, Lee J, Horan WP, et al (2013) Effects of single dose intranasal oxytocin on social cognition in schizophrenia. Schizophr Res 147:393–397. doi: 10.1016/j.schres.2013.04.023

De Berardis D, Marini S, Iasevoli F, et al (2013) The role of intranasal oxytocin in the treatment of patients with schizophrenia: a systematic review. CNS Neurol Disord Drug Targets 12:252–64.

de Olmos J (1969) A cupric-silver method for impregnation of terminal axon degeneration and its further use in staining granular argyrophilic neurons. Brain Behav Evol 2:213–237.

de Olmos J (1972) The amygdaloid projection field in the rat as studied with the cupric-silver method. In: Eleftherious B (ed) The neurobiology of the amygdala. Plenum Press, New York,

de Olmos J, Alheid G, Beltramino C (1985) Amygdala. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system. Academic Press, Sydney, pp 223–334

de Olmos J, Beltramino C, Alheid G (2004) Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical and chemoarchitectonical survey. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system, 3rd Ed. Elsevier Academic press, San Diego, pp 510–601

de Olmos JS, Heimer L (1999) The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. Ann N Y Acad Sci 877:1–32.

de Vries GJ (2008) Sex differences in vasopressin and oxytocin innervation of the brain. Prog Brain Res 170:17–27. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00402-0

De Vries GJ, Miller MA (1998) Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain. Prog Brain Res 119:3–20.

De Vries GJ, Panzica GC (2006) Sexual differentiation of central vasopressin and vasotocin systems in vertebrates: different mechanisms, similar endpoints. Neuroscience 138:947–55. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.07.050

DeVries GJ, Buijs RM, Van Leeuwen FW, et al (1985) The vasopressinergic innervation of the brain in normal and castrated rats. J Comp Neurol 233:236–54. doi: 10.1002/cne.902330206

Díaz C, Morales-Delgado N, Puelles L (2015) Ontogenesis of peptidergic neurons within the genoarchitectonic map of the mouse hypothalamus. Front Neuroanat 8:162. doi: 10.3389/fnana.2014.00162

Domes G, Heinrichs M, Gläscher J, et al (2007) Oxytocin attenuates amygdala responses to emotional faces regardless of valence. Biol Psychiatry 62:1187–90. doi: 10.1016/j.biopsych.2007.03.025

Domes G, Lischke A, Berger C, et al (2010) Effects of intranasal oxytocin on emotional face processing in women. Psychoneuroendocrinology 35:83–93. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.06.016

Domínguez L, González A, Moreno N (2010) Sonic hedgehog expression during Xenopus laevis forebrain development. Brain Res 1347:19–32. doi: 10.1016/j.brainres.2010.06.007

Domínguez L, González A, Moreno N (2015) Patterns of hypothalamic regionalization in amphibians and reptiles: common traits revealed by a genoarchitectonic approach. Front Neuroanat 9:3. doi: 10.3389/fnana.2015.00003

Domínguez L, Morona R, González A, Moreno N (2013) Characterization of the hypothalamus of Xenopus laevis during development. I. The alar regions. J Comp Neurol 521:725–759. doi: 10.1002/cne.23222

Donaldson ZR, Young LJ (2008) Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. Science 322:900–4. doi: 10.1126/science.1158668

Dumais KM, Alonso AG, Immormino MA, et al (2016) Involvement of the oxytocin system in the bed nucleus of the stria terminalis in the sex-specific regulation of social recognition. Psychoneuroendocrinology 64:79–88. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.11.007

Ebstein RP, Knafo A, Mankuta D, et al (2012) The contributions of oxytocin and vasopressin pathway genes to human behavior. Horm Behav 61:359–379. doi: 10.1016/j.yhbeh.2011.12.014

Engelmann M, Landgraf R (1994) Microdialysis administration of vasopressin into the septum improves social recognition in Brattleboro rats. Physiol Behav 55:145–9.

Ericson J, Muhr J, Jessell TM, Edlund T (1995) Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube. Int J Dev Biol 39:809–16.

Fan CM, Kuwana E, Bulfone A, et al (1996) Expression patterns of two murine homologs of Drosophila single-minded suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. Mol Cell Neurosci 7:519.

Fazzari P, Paternain A V, Valiente M, et al (2010) Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. Nature 464:1376–80. doi: 10.1038/nature08928. Epub 2010 Apr 14

Feifel D (2012) Oxytocin as a potential therapeutic target for schizophrenia and other neuropsychiatric conditions. Neuropsychopharmacology 37:304–305. doi: 10.1038/npp.2011.184

Feifel D, Reza T (1999) Oxytocin modulates psychotomimetic-induced deficits in sensorimotor gating. Psychopharmacology (Berl) 141:93–8.

Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ (2001) Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. J Neurosci 21:8278–85.

Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, et al (2000) Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. Nat Genet 25:284–288. doi: 10.1038/77040

Ferguson JN, Young LJ, Insel TR (2002) The neuroendocrine basis of social recognition. Front Neuroendocr 23:200–224. doi: 10.1006/frne.2002.0229

Ferrán JL, de Oliveira ED, Merchán P, et al (2009) Genoarchitectonic profile of developing nuclear groups in the chicken pretectum. J Comp Neurol 517:405–451. doi: 10.1002/cne.22115

Ferrán JL, Puelles L, Rubenstein JLR (2015) Molecular codes defining rostrocaudal domains in the embryonic mouse hypothalamus. Front Neuroanat 9:46. doi: 10.3389/fnana.2015.00046

Ferrán JL, Sánchez-Arrones L, Sandoval JE, Puelles L (2007) A model of early molecular regionalization in the chicken embryonic pretectum. J Comp Neurol 505:379–403. doi: 10.1002/cne.21493

Ferris CF, Gold L, De Vries GJ, Potegal M (1990) Evidence for a functional and anatomical relationship between the lateral septum and the hypothalamus in the control of flank marking behavior in Golden hamsters. J Comp Neurol 293:476–85. doi: 10.1002/cne.902930310

Flames N, Pla R, Gelman DM, et al (2007) Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. J Neurosci 27:9682–95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2750-07.2007

Fode C, Ma Q, Casarosa S, et al (2000) A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. Genes Dev 14:67–80.

Freese J, Amaral D (2009) Neuroanatomy of the primate amygdala. In: Whalen P, Phelps E (eds) The human amygdala. The Guilford Press, New York, pp 3–42

Fuhrmann S (2010) Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. Curr Top Dev Biol 93:61–84. doi: 10.1016/B978-0-12-385044-7.00003-5

García-López M, Abellán A, Legaz I, et al (2008) Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. J Comp Neurol 506:46–74. doi: 10.1002/cne.21524

García-Moreno F, Pedraza M, Di Giovannantonio LG, et al (2010) A neuronal migratory pathway crossing from diencephalon to telencephalon populates amygdala nuclei. Nat Neurosci 13:680–9. doi: 10.1038/nn.2556. Epub 2010 May 23

Geller B, Tillman R, Badner JA, Cook EH (2005) Are the arginine vasopressin V1a receptor microsatellites related to hypersexuality in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype? Bipolar Disord 7:610–6. doi: 10.1111/j.1399-5618.2005.00259.x

Gimpl G, Reitz J, Brauer S, Trossen C (2008) Oxytocin receptors: ligand binding, signalling and cholesterol dependence. Prog Brain Res 170:193–204. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00417-2

González A, López JM, Sánchez-Camacho C, Marín O (2002) Regional expression of the homeobox gene NKX2-1 defines pallidal and interneuronal populations in the basal ganglia of amphibians. Neuroscience 114:567–75.

Goodson JL (2013) Deconstructing sociality, social evolution and relevant nonapeptide functions. Psychoneuroendocrinology 38:465–78. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.12.005. Epub 2013 Jan 4

Goodson JL, Bass AH (2001) Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. Brain Res Brain Res Rev 35:246–65.

Goodson JL, Bass AH (2000) Forebrain peptides modulate sexually polymorphic vocal circuitry. Nature 403:769–72. doi: 10.1038/35001581

Goodson JL, Thompson RR (2010) Nonapeptide mechanisms of social cognition, behavior and species-specific social systems. Curr Opin Neurobiol 20:784–94. doi: 10.1016/j.conb.2010.08.020. Epub 2010 Sep 17

Gorski JA, Talley T, Qiu M, et al (2002) Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. J Neurosci 22:6309–14. doi: 20026564

Goshu E, Jin H, Lovejoy J, et al (2004) Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. Mol Endocrinol 18:1251–62. doi: 10.1210/me.2003-0372

Grillet N, Dubreuil V, Dufour HD, Brunet J-F (2003) Dynamic expression of RGS4 in the developing nervous system and regulation by the neural type-specific transcription factor Phox2b. J Neurosci 23:10613–21.

Grillet N, Pattyn A, Contet C, et al (2005) Generation and characterization of Rgs4 mutant mice. Mol Cell Biol 25:4221–8. doi: 10.1128/MCB.25.10.4221-4228.2005

Grinevich V, Desarménien MG, Chini B, et al (2015) Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders. Front Neuroanat 8:164. doi: 10.3389/fnana.2014.00164

Grossmann R, Jurkevich A, Köhler A (2002) Sex dimorphism in the avian arginine vasotocin system with special emphasis to the bed nucleus of the stria terminalis. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 131:833–7.

Guastella AJ, Einfeld SL, Gray KM, et al (2010) Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders. Biol Psychiatry 67:692–694. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.09.020

Guastella AJ, Ward PB, Hickie IB, et al (2015) A single dose of oxytocin nasal spray improves higher-order social cognition in schizophrenia. Schizophr Res 168:628–633. doi: 10.1016/j.schres.2015.06.005

Hallonet M, Hollemann T, Wehr R, et al (1998) Vax1 is a novel homeobox-containing gene expressed in the developing anterior ventral forebrain. Development 125:2599–610.

Hammock E a D, Young LJ (2006) Oxytocin, vasopressin and pair bonding: implications for autism. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 361:2187–98. doi: 10.1098/rstb.2006.1939

Han TM, De Vries GJ (2003) Organizational effects of testosterone, estradiol, and dihydrotestosterone on vasopressin mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis. J Neurobiol 54:502–510. doi: 10.1002/neu.10157

Harony H, Wagner S (2010) The contribution of oxytocin and vasopressin to mammalian social behavior: potential role in autism spectrum disorder. Neurosignals 18:82–97. doi: 10.1159/000321035. Epub 2010 Dec 11

Heimer L (2003) A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. Am J Psychiatry 160:1726–1739. doi: 10.1176/appi.ajp.160.10.1726

Heinrichs M, Meinlschmidt G, Neumann I, et al (2001) Effects of suckling on hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress in postpartum lactating women. J Clin Endocrinol Metab 86:4798–804. doi: 10.1210/jcem.86.10.7919

Herrick C (1910) The morphology of the forebrain in amphibia and reptilia. J Comp Neurol 20:413–547.

Herrick C (1948) The Brain of the Tiger Salamander, Amblystoma tigrinum. Chicago, The University of Chicago Press

Hevner RF, Shi L, Justice N, et al (2001) Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. Neuron 29:353–66.

Hirata T, Li P, Lanuza GM, et al (2009) Identification of distinct telencephalic progenitor pools for neuronal diversity in the amygdala. Nat Neurosci 12:141–9. doi: 10.1038/nn.2241. Epub 2009 Jan 11

Holmgren N (1925) Points of view concerning forebrain morphology in higher vertebrates. Acta Zool 6:413–477.

Ingraham HA, Chen RP, Mangalam HJ, et al (1988) A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. Cell 55:519–29.

Insel T, Young L (2001) The neurobiology of attachment. Nat Rev Neurosci 2:129–36.

Insel T, Young L (2000) Neuropeptides and the evolution of social behavior. Curr Opin Neurobiol 10:784–9.

Insel TR (2010) The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. Neuron 65:768–79. doi: 10.1016/j.neuron.2010.03.005

Insel TR, O'Brien DJ, Leckman JF (1999) Oxytocin, vasopressin, and autism: is there a connection? Biol Psychiatry 45:145–57.

Insel TR, Winslow JT, Wang Z, Young LJ (1998) Oxytocin, vasopressin, and the neuroendocrine basis of pair bond formation. Adv Exp Med Biol 449:215–24.

Insel TR, Young L, Wang Z (1997) Molecular aspects of monogamy. Ann N Y Acad Sci 807:302–16.

Jacob S, Brune CW, Carter CS, et al (2007) Association of the oxytocin receptor gene (OXTR) in Caucasian children and adolescents with autism. Neurosci Lett 417:6–9. doi: 10.1016/j.neulet.2007.02.001

Jennings JH, Sparta DR, Stamatakis AM, et al (2013) Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. Nature 496:224–8. doi: 10.1038/nature12041

Johnston J (1923) Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. J Comp Neurol 35:337–481. doi: 10.1002/cne.900350502

Källén B (1951) On the ontogeny of the reptilian forebrain; nuclear structures and ventricular sulci. J Comp Neurol 95:307–47.

Kang YS, Park JH (2000) Brain uptake and the analgesic effect of oxytocin--its usefulness as an analgesic agent. Arch Pharm Res 23:391–5.

Karim MA, Sloper JC (1980) Histogenesis of the supraoptic and paraventricular neurosecretory cells of the mouse hypothalamus. J Anat 130:341–7.

Kato M, Dobyns W (2005) X-linked lissencephaly with abnormal genitalia as a tangential migration disorder causing intractable epilepsy: proposal for a new term,“interneuronopathy”. J Child Neurol 20:392–7.

Kelly AM, Goodson JL (2013) Functional significance of a phylogenetically widespread sexual dimorphism in vasotocin/vasopressin production. Horm Behav 64:840–6. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.09.006. Epub 2013 Oct 5

Keyser A (1972) The development of the diencephalon of the Chinese hamster. An investigation of the validity of the criteria of subdivision of the brain. Acta Anat Suppl (Basel) 59:1–178.

Kirsch P, Esslinger C, Chen Q, et al (2005) Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. J Neurosci 25:11489–93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3984-05.2005

Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, et al (2002) Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. Nat Genet 32:359–69. doi: 10.1038/ng1009. Epub 2002 Oct 15

Kudo T, Konno K, Uchigashima M, et al (2014) GABAergic neurons in the ventral tegmental area receive dual GABA/enkephalin-mediated inhibitory inputs from the bed nucleus of the stria terminalis. Eur J Neurosci 39:1796–809. doi: 10.1111/ejn.12503

Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, et al (2012) Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. J Neurosci 32:18035–46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4057-12.2012

Kuhlenbeck H (1973) The central nervous system of vertebrates. In: Overall morphological pattern. Vol. 3, part II. Basel, Karger,

Langman J, Sadler T (2001) Embriología médica. Editorial Médica Panamericana

LeDoux J, Schiller D (2009) The human amygdala: insights from other animals. In: Whalen P, Phelps E (eds) The human amygdala. The Guilford Press, New York, pp 43–60

LeDoux JE, Farb C, Ruggiero DA (1990) Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. J Neurosci 10:1043–54.

Lee H-J, Macbeth AH, Pagani JH, Young WS (2009) Oxytocin: the great facilitator of life. Prog Neurobiol 88:127–51. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.04.001. Epub 2009 Apr 10

Lee MR, Wehring HJ, McMahon RP, et al (2013) Effects of adjunctive intranasal oxytocin on olfactory identification and clinical symptoms in schizophrenia: Results from a randomized double blind placebo controlled pilot study. Schizophr Res 145:110–115. doi: 10.1016/j.schres.2013.01.001

Leng G, Meddle S, Douglas A (2008) Oxytocin and the maternal brain. Curr Opin Pharmacol 8:731–734. doi: 10.1016/j.coph.2008.07.001

Lerer E, Levi S, Salomon S, et al (2008) Association between the oxytocin receptor (OXTR) gene and autism: relationship to Vineland Adaptive Behavior Scales and cognition. Mol Psychiatry 13:980–988. doi: 10.1038/sj.mp.4002087

Li S, Crenshaw EB, Rawson EJ, et al (1990) Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. Nature 347:528–33. doi: 10.1038/347528a0

Lim MM, Bielsky IF, Young LJ (2005) Neuropeptides and the social brain: potential rodent models of autism. Int J Dev Neurosci 23:235–43. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2004.05.006

Lim MM, Young LJ (2006) Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. Horm Behav 50:506–17. doi: 10.1016/j.yhbeh.2006.06.028. Epub 2006 Aug 4

Linke R, Braune G, Schwegler H (2000) Differential projection of the posterior paralaminar thalamic nuclei to the amygdaloid complex in the rat. Exp brain Res 134:520–32.

Liu W, Pappas GD, Carter CS (2005) Oxytocin receptors in brain cortical regions are reduced in haploinsufficient (+/-) reeler mice. Neurol Res 27:339–45. doi: 10.1179/016164105X35602

Ludwig M (1998) Dendritic Release of Vasopressin and Oxytocin. J Neuroendocrinol 10:881–95. doi: 10.1046/j.1365-2826.1998.00279.x

Ludwig M, Leng G (2006) Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. Nat Rev Neurosci 7:126–136. doi: 10.1038/nrn1845

Lukas M, Neumann ID (2013) Oxytocin and vasopressin in rodent behaviors related to social dysfunctions in autism spectrum disorders. Behav Brain Res 251:85–94. doi: 10.1016/j.bbr.2012.08.011. Epub 2012 Aug 17

Lupo G, Harris WA, Lewis KE (2006) Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. Nat Rev Neurosci 7:103–14. doi: 10.1038/nrn1843

Marín O, Baker J, Puelles L, Rubenstein JLR (2002) Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. Development 129:761–73.

Marín O, Rubenstein J (2002) Patterning, Morphogenesis, and Organogenesis. In: Mouse Development. Academic Press, pp 75–106

Marín O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. Nat Rev Neurosci 2:780–90. doi: 10.1038/35097509

Marín O, Smeets WJ, González A (1998) Basal ganglia organization in amphibians: chemoarchitecture. J Comp Neurol 392:285–312.

Marín O, Yaron A, Bagri A, et al (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. Science (80- ) 293:872–875. doi: 10.1126/science.1061891

Martínez S, Puelles E, Puelles L, Echevarria D (2012) Molecular regionalization of the developing neural tube. In: Watson C, Paxinos G, Puelles L (eds) The mouse nervous system. Academic Press-Elsevier, pp 2–18

Martínez-Marcos A, Halpern M (1999) Differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb to the medial amygdala in the opossum, Monodelphis domestica. Eur J Neurosci 11:3789–99.

Martínez-Morales J, Rodrigo I, Bovolenta P (2004) Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. BioEssays 26:766–777. doi: 10.1002/bies.20064

McCall C, Singer T (2012) The animal and human neuroendocrinology of social cognition, motivation and behavior. Nat Neurosci 15:681–688. doi: 10.1038/nn.3084

McClive PJ, Sinclair AH (2001) Rapid DNA extraction and PCR-sexing of mouse embryos. Mol Reprod Dev 60:225–6. doi: 10.1002/mrd.1081

McDonald AJ (2003) Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective. Ann N Y Acad Sci 985:1–21.

Medina L (2007) Fields homologies. In: Kaas J, Striedter G, Rubenstein J (eds) Evolution of Nervous Systems: A comprenhensive reference. Volume 1: Theories, Development, Invertebrates. Academic Press-Elsevier, Amsterdam, pp 73–87

Medina L (2008a) Evolution and embryological development of forebrain. In: Binder M, Hirokawa N, Windhorst U (eds) Encyclopedia of Neuroscience. Springer, Berlin, pp 1172–1192

Medina L (2008b) Basal ganglia: evolution. In: Squie L (ed) Encyclopedia of Neuroscience. Elsevier, Amsterdam, pp 67–85

Medina L, Abellán A (2012) Subpallial Structures. In: Watson C, Paxinos G, Puelles L (eds) The mouse nervous system, 1st Ed. Academic Press, pp 173–220

Medina L, Abellán A (2009) Development and evolution of the pallium. Semin Cell Dev Biol 20:698–711. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.04.008. Epub 2009 Apr 22

Medina L, Abellán A, Vicario A, et al (2017) The Amygdala, 2nd Ed. Elsevier

Medina L, Bupesh M, Abellán A (2011) Contribution of genoarchitecture to understanding forebrain evolution and development, with particular emphasis on the amygdala. Brain Behav Evol 78:216–36. doi: 10.1159/000330056. Epub 2011 Aug 23

Medina L, Legaz I, González G, et al (2004) Expression of Dbx1, Neurogenin 2, Semaphorin 5A, Cadherin 8, and Emx1 distinguish ventral and lateral pallial histogenetic divisions in the developing mouse claustroamygdaloid complex. J Comp Neurol 474:504–23. doi: 10.1002/cne.20141

Medina L, Reiner A (2000) Do birds possess homologues of mammalian primary visual, somatosensory and motor cortices? Trends Neurosci 23:1–12.

Medina L, Reiner A (1995) Neurotransmitter organization and connectivity of the basal ganglia in vertebrates: implications for the evolution of basal ganglia. Brain Behav Evol 46:235–58.

Meyer-Lindenberg A (2008) Impact of prosocial neuropeptides on human brain function. Prog Brain Res 170:463–70. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00436-6

Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M (2011) Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. Nat Rev Neurosci 12:524–38. doi: 10.1038/nrn3044

Meyer-Lindenberg A, Kolachana B, Gold B, et al (2009) Genetic variants in AVPR1A linked to autism predict amygdala activation and personality traits in healthy humans. Mol Psychiatry 14:968–975. doi: 10.1038/mp.2008.54

Mezey E, Kiss JZ (1991) Coexpression of vasopressin and oxytocin in hypothalamic supraoptic neurons of lactating rats. Endocrinology 129:1814–20. doi: 10.1210/endo-129-4-1814

Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan CM (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. Genes Dev 12:3264–75.

Miura H, Yanazawa M, Kato K, Kitamura K (1997) Expression of a novel aristaless related homeobox gene “Arx” in the vertebrate telencephalon, diencephalon and floor plate. Mech Dev 65:99–109.

Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Úbeda-Bañón I, et al (2007) Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. Eur J Neurosci 25:2065–2080. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05472.x

Montag C, Brockmann E-M, Bayerl M, et al (2013) Oxytocin and oxytocin receptor gene polymorphisms and risk for schizophrenia: a case-control study. world J Biol psychiatry 14:500–8. doi: 10.3109/15622975.2012.677547. Epub 2012 May 31

Montag C, Brockmann E-M, Lehmann A, et al (2012) Association between oxytocin receptor gene polymorphisms and self-rated “empathic concern” in schizophrenia. PLoS One 7:e51882. doi: 10.1371/journal.pone.0051882

Morales-Delgado N, Castro-Robles B, Ferrán JL, et al (2014) Regionalized differentiation of CRH, TRH, and GHRH peptidergic neurons in the mouse hypothalamus. Brain Struct Funct 219:1083–111. doi: 10.1007/s00429-013-0554-2

Morales-Delgado N, Merchan P, Bardet SM, et al (2011) Topography of somatostatin gene expression relative to molecular progenitor domains during ontogeny of the mouse hypothalamus. Front Neuroanat 5:10. doi: 10.3389/fnana.2011.00010

Moreno N, Bachy I, Rétaux S, González A (2004) LIM-homeodomain genes as developmental and adult genetic markers of Xenopus forebrain functional subdivisions. J Comp Neurol 472:52–72. doi: 10.1002/cne.20046

Moreno N, Domínguez L, Rétaux S, González A (2008a) Islet1 as a marker of subdivisions and cell types in the developing forebrain of Xenopus. Neuroscience 154:1423–39. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.029

Moreno N, González A (2006) The common organization of the amygdaloid complex in tetrapods: New concepts based on developmental, hodological and neurochemical data in anuran amphibians. Prog Neurobiol 78:61–90. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.12.005

Moreno N, González A, Rétaux S (2009) Development and evolution of the subpallium. Semin Cell Dev Biol 20:735–743. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.04.007

Moreno N, Morona R, López JM, et al (2012) Characterization of the bed nucleus of the stria terminalis in the forebrain of anuran amphibians. J Comp Neurol 520:330–363. doi: 10.1002/cne.22694

Moreno N, Morona R, López JM, González A (2010) Subdivisions of the turtle Pseudemys scripta subpallium based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. J Comp Neurol 518:4877–902. doi: 10.1002/cne.22493

Moreno N, Rétaux S, González A (2008b) Spatio-temporal expression of Pax6 in Xenopus forebrain. Brain Res 1239:92–99. doi: 10.1016/j.brainres.2008.08.052

Morris J (2006) Vasopressin and oxytocin. In: Kastin AJ (ed) Handbook of Biologically Active Peptides. Burlington, MA: Elservier Inc., pp 621–628

Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM (2008) Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. J Comp Neurol 506:851–859. doi: 10.1002/cne.21536

Mueller T, Wullimann MF (2009) An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. Brain Behav Evol 74:30–42. doi: 10.1159/000229011

Nakai S, Kawano H, Yudate T, et al (1995) The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. Genes Dev 9:3109–21.

Neumann ID, Landgraf R (2012) Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. Trends Neurosci 35:649–59. doi: 10.1016/j.tins.2012.08.004

Newman SW (1999) The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. Ann N Y Acad Sci 877:242–57.

Nieuwenhuys R, Puelles L (2016) Towards a New Neuromorphology. Springer International Publishing

Osório J, Mueller T, Rétaux S, et al (2010) Phylotypic expression of the bHLH genes Neurogenin2, Neurod, and Mash1 in the mouse embryonic forebrain. J Comp Neurol 518:851–71. doi: 10.1002/cne.22247

Otero-García M, Agustín-Pavón C, Lanuza E, Martínez-García F (2016) Distribution of oxytocin and co-localization with arginine vasopressin in the brain of mice. Brain Struct Funct 221:3445–73. doi: doi: 10.1007/s00429-015-1111

Otero-García M, Martin-Sanchez A, Fortes-Marco L, et al (2014) Extending the socio-sexual brain: arginine-vasopressin immunoreactive circuits in the telencephalon of mice. Brain Struct Funct 219:1055–81. doi: 10.1007/s00429-013-0553-3

Palmgren A (1921) Embryological and morphological studies on the midbrain and cerebellum of vertebrates. Acta Zool 2:1–94. doi: doi:10.1111/j.1463-6395.1921.tb00464.x

Pare D, Duvarci S (2012) Amygdala microcircuits mediating fear expression and extinction. Curr Opin Neurobiol 22:717–23. doi: 10.1016/j.conb.2012.02.014

Paul MJ, Terranova JI, Probst CK, et al (2014) Sexually dimorphic role for vasopressin in the development of social play. Front Behav Neurosci 8:58. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00058

Paxinos G, Franklin K (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego

Paxinos G, Franklin K (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates., 3rd Ed. Academic Press

Pessoa L (2008) On the relationship between emotion and cognition. Nat Rev Neurosci 9:148–158. doi: 10.1038/nrn2317

Petrovic P, Kalisch R, Singer T, Dolan RJ (2008) Oxytocin attenuates affective evaluations of conditioned faces and amygdala activity. J Neurosci 28:6607–15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4572-07.2008

Phelps E (2004) Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. Curr Opin Neurobiol 14:198–202. doi: 10.1016/j.conb.2004.03.015

Phelps E, LeDoux J (2005) Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. Neuron 48:175–87. doi: 10.1016/j.neuron.2005.09.025

Pombal MA, Megías M, Bardet SM, Puelles L (2009) New and old thoughts on the segmental organization of the forebrain in lampreys. Brain Behav Evol 74:7–19. doi: 10.1159/000229009

Puelles L (2001) Brain segmentation and forebrain development in amniotes. Brain Res Bull 55:695–710.

Puelles L (2009) Contributions to Neuroembryology of Santiago Ramon y Cajal (1852-1934) and Jorge F. Tello (1880-1958). Int J Dev Biol 53:1145–60. doi: 10.1387/ijdb.082589lp

Puelles L (2011) Pallio-pallial tangential migrations and growth signaling: new scenario for cortical evolution? Brain Behav Evol 78:108–27. doi: 10.1159/000327905

Puelles L, Amat JA, Martinez-de-la-Torre M (1987) Segment-related, mosaic neurogenetic pattern in the forebrain and mesencephalon of early chick embryos: I. Topography of AChE-positive neuroblasts up to stage HH18. J Comp Neurol 266:247–68. doi: 10.1002/cne.902660210

Puelles L, Harrison M, Paxinos G, Watson C (2013) A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. Trends Neurosci 36:570–578. doi: 10.1016/j.tins.2013.06.004

Puelles L, Kuwana E, Puelles E, et al (2000) Pallial and Subpallial Derivatives in the Embryonic Chick and Mouse Telencephalon , traced by the Expression of the Genes Dlx-2 , Emx-1 , Nkx-2.1 , Pax-6 , and Tbr-1. J Comp Neurol 424:409–38.

Puelles L, Martínez S, Martínez-de-la-Torre M (2008) Neuroanatomía. Editorial Médica Panamericana

Puelles L, Martínez S, Martínez-de-la-Torre M, Rubenstein J (2004) Gene maps and related histogenetic domains in the forebrain and midbrain. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system, 3rd Ed. Elsevier, pp 3–25

Puelles L, Martínez S, Martínez-de-la-Torre M, Rubenstein J (2014) Gene maps and related histogenetic domains in the forebrain and midbrain. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system, 4th edn. Academic Press-Elsevier, New York, pp 3–24

Puelles L, Martínez-de-la-Torre M, Bardet S, Rubenstein J (2012) Hypothalamus. In: Watson C, Paxinos G, Puelles L (eds) The mouse nervous system. Academic Press-Elsevier, pp 221–312

Puelles L, Martinez-de-la-Torre M, Paxinos G, et al (2007) The Chick Brain in Stereotaxic Coordinates. An Atlas Featuring Neuromeric Subdivisions and Mammalian Homologies. Academic Press, San Diego

Puelles L, Medina L (2002) Field homology as a way to reconcile genetic and developmental variability with adult homology. Brain Res Bull 57:243–55.

Puelles L, Medina L, Borello U, et al (2016a) Radial derivatives of the mouse ventral pallium traced with Dbx1-LacZ reporters. J Chem Neuroanat 75:2–19. doi: 10.1016/j.jchemneu.2015.10.011

Puelles L, Morales-Delgado N, Merchán P, et al (2016b) Radial and tangential migration of telencephalic somatostatin neurons originated from the mouse diagonal area. Brain Struct Funct 221:3027–65. doi: 10.1007/s00429-015-1086-8

Puelles L, Rubenstein JL (1993) Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. Trends Neurosci 16:472–9.

Puelles L, Rubenstein JLR (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. Trends Neurosci 26:469–76. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00234-0

Puelles L, Rubenstein JLR (2015) A new scenario of hypothalamic organization: rationale of new hypotheses introduced in the updated prosomeric model. Front Neuroanat 9:27. doi: 10.3389/fnana.2015.00027

Redies C, Puelles L (2001) Modularity in vertebrate brain development and evolution. Bioessays 23:1100–11. doi: 10.1002/bies.10014

Remedios R, Huilgol D, Saha B, et al (2007) A stream of cells migrating from the caudal telencephalon reveals a link between the amygdala and neocortex. Nat Neurosci 10:1141–50. doi: 10.1038/nn1955

Rendahl H (1924) Embryologische und Morphologische Studien über das Zwischenhirn beim Huhn. Acta Zool 5:241–344.

Ricardo JA, Koh ET (1978) Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. Brain Res 153:1–26.

Rich ME, Caldwell HK (2015) A Role for Oxytocin in the Etiology and Treatment of Schizophrenia. Front Endocrinol (Lausanne) 6:90. doi: 10.3389/fendo.2015.00090

Rood BD, De Vries GJ (2011) Vasopressin innervation of the mouse (Mus musculus) brain and spinal cord. J Comp Neurol 519:2434–2474. doi: 10.1002/cne.22635

Rood BD, Stott RT, You S, et al (2013) Site of origin of and sex differences in the vasopressin innervation of the mouse (Mus musculus) brain. J Comp Neurol 521:2321–58. doi: 10.1002/cne.23288

Roper J, O'Carroll A, Young W 3rd, Lolait S (2011) The vasopressin Avpr1b receptor: molecular and pharmacological studies. Stress 14:98–115. doi: 10.3109/10253890.2010.512376

Rosenblatt JS, Mayer AD, Giordano AL (1988) Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. Psychoneuroendocrinology 13:29–46.

Rubenstein JL, Martinez S, Shimamura K, Puelles L (1994) The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. Science (80- ) 266:578–80.

Sabatier N, Brown CH, Ludwig M, Leng G (2004) Phasic spike patterning in rat supraoptic neurones in vivo and in vitro. J Physiol 558:161–80. doi: 10.1113/jphysiol.2004.063982

Sanes D, Reh T, Harris W (2006) Development of the Nervous System., 2nd Ed. Academic Press-Elsevier

Schonemann MD, Ryan AK, McEvilly RJ, et al (1995) Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2. Genes Dev 9:3122–35.

Schüle C, Baghai TC, Eser D, Rupprecht R (2009) Hypothalamic–pituitary–adrenocortical system dysregulation and new treatment strategies in depressionHypothalamic-pituitary-adrenocortical system dysregulation and new treatment strategies in depression. Expert Rev Neurother 9:1005–19. doi: 10.1586/ern.09.52

Schulkin J (2007) Autism and the amygdala: an endocrine hypothesis. Brain Cogn 65:87–99. doi: 10.1016/j.bandc.2006.02.009

Sharp ZD, Morgan WW (1996) Brain POU-er. BioEssays 18:347–50. doi: 10.1002/bies.950180503

Shimamura K, Rubenstein JL (1997) Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. Development 124:2709–18.

Shimogori T, Lee DA, Miranda-Angulo A, et al (2010) A genomic atlas of mouse hypothalamic development. Nat Neurosci 13:767–775. doi: 10.1038/nn.2545

Shipley M, Ennis M, Puche A (2004) Olfactory System. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system, 3rd Ed. Elsevier Academic press, pp 923–964

Shughrue PJ, Lane M V, Merchenthaler I (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. J Comp Neurol 388:507–25.

Simeone A, D'Apice MR, Nigro V, et al (1994) Orthopedia, a novel homeobox-containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and Drosophila. Neuron 13:83–101.

Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, et al (1990) Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. Genes Dev 4:695–711.

Simoes-Costa M, Bronner ME (2015) Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. Development 142:242–257. doi: 10.1242/dev.105445

Soma M, Aizawa H, Ito Y, et al (2009) Development of the mouse amygdala as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. J Comp Neurol 513:113–28. doi: 10.1002/cne.21945

Stanley B, Siever LJ (2010) The interpersonal dimension of borderline personality disorder: toward a neuropeptide model. Am J Psychiatry 167:24–39. doi: 10.1176/appi.ajp.2009.09050744

Stenman J, Yu RT, Evans R, Campbell K (2003) Tlx and Pax6 co-operate genetically to establish the pallio-subpallial boundary in the embryonic mouse telencephalon. Development 130:1113–22. doi: 10.1242/dev.00328

Stoop R (2012) Neuromodulation by Oxytocin and Vasopressin. Neuron 76:142–159. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.025

Striedter GF (1997) The telencephalon of tetrapods in evolution. Brain Behav Evol 49:179–213.

Stühmer T, Anderson SA, Ekker M, Rubenstein JLR (2002) Ectopic expression of the Dlx genes induces glutamic acid decarboxylase and Dlx expression. Development 129:245–52.

Swanson L (1987) The hypothalamus. In Handbook of chemical neuroanatomy. Part I. Elsevier Publishing Company, Amsterdam

Swanson L, Petrovich G (1998) What is the amygdala? Trends Neurosci 21:323–31.

Swanson LW (2000) Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. Brain Res 886:113–164.

Takayanagi Y, Yoshida M, Bielsky IF, et al (2005) Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 102:16096–101. doi: 10.1073/pnas.0505312102

Ter Horst GJ, de Boer P, Luiten PG, van Willigen JD (1989) Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. Neuroscience 31:785–97.

Thompson R, Gupta S, Miller K, et al (2004) The effects of vasopressin on human facial responses related to social communication. Psychoneuroendocrinology 29:35–48.

Thompson RR, George K, Walton JC, et al (2006) Sex-specific influences of vasopressin on human social communication. Proc Natl Acad Sci 103:7889–94. doi: 10.1073/pnas.0600406103

Tobin V, Leng G, Ludwig M (2012) The involvement of actin, calcium channels and exocytosis proteins in somato-dendritic oxytocin and vasopressin release. Front Physiol 3:261. doi: 10.3389/fphys.2012.00261

Tokita K, Inoue T, Boughter JD (2009) Afferent connections of the parabrachial nucleus in C57BL/6J mice. Neuroscience 161:475–88. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.03.046

Tole S, Remedios R, Saha B, Stoykova A (2005) Selective requirement of Pax6, but not Emx2, in the specification and development of several nuclei of the amygdaloid complex. J Neurosci 25:2753–60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3014-04.2005

Treier M, Rosenfeld MG (1996) The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. Curr Opin Cell Biol 8:833–43.

Turner RA, Altemus M, Enos T, et al (1999) Preliminary research on plasma oxytocin in normal cycling women: investigating emotion and interpersonal distress. Psychiatry 62:97–113.

Ugrumov M V. (2002) Magnocellular vasopressin system in ontogenesis: development and regulation. Microsc Res Tech 56:164–171. doi: 10.1002/jemt.10021

Ukkola LT, Onkamo P, Raijas P, et al (2009) Musical aptitude is associated with AVPR1A-haplotypes. PLoS One 4:e5534. doi: 10.1371/journal.pone.0005534

Vaage S (1969) The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (Gallus domesticus). A morphological, histochemical and autoradiographical investigation. Ergeb Anat Entwicklungsgesch 41:3–87.

Vicario A, Abellán A, Desfilis E, Medina L (2014) Genetic identification of the central nucleus and other components of the central extended amygdala in chicken during development. Front Neuroanat 8:90. doi: 10.3389/fnana.2014.00090

Vicario A, Abellán A, Medina L (2015) Embryonic Origin of the Islet1 and Pax6 Neurons of the Chicken Central Extended Amygdala Using Cell Migration Assays and Relation to Different Neuropeptide-Containing Cells. Brain Behav Evol 85:139–69. doi: 10.1159/000381004

Vicario A, Mendoza E, Abellán A, et al (2017) Genoarchitecture of the extended amygdala in zebra finch, and expression of FoxP2 in cell corridors of different genetic profile. Brain Struct Funct 222:481–514. doi: 10.1007/s00429-016-1229-6

Waclaw R, Ehrman L, Pierani A, Campbell K (2010) Developmental origin of the neuronal subtypes that comprise the amygdalar fear circuit in the mouse. J Neurosci 30:6944–53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5772-09.2010

Walker DL, Davis M (2008) Role of the extended amygdala in short-duration versus sustained fear: a tribute to Dr. Lennart Heimer. Brain Struct Funct 213:29–42. doi: 10.1007/s00429-008-0183-3

Walum H, Westberg L, Henningsson S, et al (2008) Genetic variation in the vasopressin receptor 1a gene (AVPR1A) associates with pair-bonding behavior in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 105:14153–6. doi: 10.1073/pnas.0803081105

Wang W, Lufkin T (2000) The Murine Otp Homeobox Gene Plays an Essential Role in the Specification of Neuronal Cell Lineages in the Developing Hypothalamus. Dev Biol 227:432–449. doi: 10.1006/dbio.2000.9902

Wang Z, Ferris CF, De Vries GJ (1994) Role of septal vasopressin innervation in paternal behavior in prairie voles (Microtus ochrogaster). Proc Natl Acad Sci U S A 91:400–4.

Weiskrantz L (1956) Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. J Comp Physiol Psychol 49:381–91.

Wermter A-K, Kamp-Becker I, Hesse P, et al (2010) Evidence for the involvement of genetic variation in the oxytocin receptor gene (OXTR) in the etiology of autistic disorders on high-functioning level. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 153B:629–39. doi: 10.1002/ajmg.b.31032

Whalen P, Phelps E (2009) The Human Amygdala. Guilford Press

Wilson J, Foster D (1992) Williams Textbook of Endocrinology., 8th Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia

Wilson SW, Houart C (2004) Early steps in the development of the forebrain. Dev Cell 6:167–81.

Wilson SW, Rubenstein JL (2000) Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. Neuron 28:641–51.

Winslow JT, Insel TR (2004) Neuroendocrine basis of social recognition. Curr Opin Neurobiol 14:248–53. doi: 10.1016/j.conb.2004.03.009

Wu S, Jia M, Ruan Y, et al (2005) Positive association of the oxytocin receptor gene (OXTR) with autism in the Chinese Han population. Biol Psychiatry 58:74–7. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.03.013

Wullimann MF, Mueller T (2004) Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. J Comp Neurol 475:143–162. doi: 10.1002/cne.20183

Xu Q, Tam M, Anderson SA (2008) Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. J Comp Neurol 506:16–29. doi: 10.1002/cne.21529

Yamamoto Y, Cushing B, Kramer K, et al (2004) Neonatal manipulations of oxytocin alter expression of oxytocin and vasopressin immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in a gender-. Neuroscience 125:947–55. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.02.028

Yamasue H, Kuwabara H, Kawakubo Y, Kasai K (2009) Oxytocin, sexually dimorphic features of the social brain, and autism. Psychiatry Clin Neurosci 63:129–40. doi: 10.1111/j.1440-1819.2009.01944.x

Yang H-P, Wang L, Han L, Wang SC (2013) Nonsocial functions of hypothalamic oxytocin. ISRN Neurosci 2013:179272. doi: 10.1155/2013/179272

Yang Y, Li H, Ward R, et al (2014) Novel oxytocin receptor agonists and antagonists : a patent review (2002-2013). Expert Opin Ther Pat 24:29–46. doi: 10.1517/13543776.2014.845168. Epub 2013 Oct 5

Yasui Y, Saper CB, Cechetto DF (1991) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive projections from the thalamus to the striatum and amygdala in the rat. J Comp Neurol 308:293–310. doi: 10.1002/cne.903080212

Ylisaukko-oja T, Alarcón M, Cantor RM, et al (2006) Search for autism loci by combined analysis of Autism Genetic Resource Exchange and Finnish families. Ann Neurol 59:145–55. doi: 10.1002/ana.20722

Young L, Wang Z, Insel TR (1998) Neuroendocrine bases of monogamy. Trends Neurosci 21:71–5.

Young LJ (1999) Frank A. Beach Award. Oxytocin and vasopressin receptors and species-typical social behaviors. Horm Behav 36:212–21.

Young LJ, Muns S, Wang Z, Insel TR (1997) Changes in oxytocin receptor mRNA in rat brain during pregnancy and the effects of estrogen and interleukin-6. J Neuroendocrinol 9:859–65.

Young LJ, Murphy Young AZ, Hammock EAD (2005) Anatomy and neurochemistry of the pair bond. J Comp Neurol 493:51–57. doi: 10.1002/cne.20771

Young LJ, Wang Z (2004) The neurobiology of pair bonding. Nat Neurosci 7:1048–54. doi: 10.1038/nn1327

Yrigollen CM, Han SS, Kochetkova A, et al (2008) Genes controlling affiliative behavior as candidate genes for autism. Biol Psychiatry 63:911–6. doi: 10.1016/j.biopsych.2007.11.015

Yun K, Potter S, Rubenstein JL (2001) Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. Development 128:193–205.

Zhao T, Szabó N, Ma J, et al (2008) Genetic mapping of Foxb1-cell lineage shows migration from caudal diencephalon to telencephalon and lateral hypothalamus. Eur J Neurosci 28:1941–55. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06503.x

Zink CF, Meyer-Lindenberg A (2012) Human neuroimaging of oxytocin and vasopressin in social cognition. Horm Behav 61:400–9. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.01.016

# ANEXOS

## ANEXO I. Reactivos y disoluciones empleadas

Esta sección está formada por los reactivos y la elaboración de las disoluciones empleadas en las técnicas descritas. Está ordenado alfabéticamente para facilitar la búsqueda.

### *AMPICILINA (Amp)*

Uso: 100 µg/ml

Preparación: se diluye 1 g de Ampicilina (Sigma, Cat. No. A9518) en 100 ml de agua pura (Sigma, Cat. No. W4502) y se filtra (filtro de 0.22 µm).

Alícuotas de 1 ml y se conserva a -20 ºC.

Stock: 10 mg/ml

### *BBR (Boerhinger Blocking Reagent)*

Preparación de 100 ml:

Se mezclan 10 g BBR (Roche, Cat. No. 11096176001) en 100 ml MAB1x y se autoclava para que se disuelva. Se deja reposar hasta que el poso blanquecino precipite. Entonces, decantar y alicuotar.

Conservar a -20 ºC.

### *CLORANFENICOL (Cam)*

Uso: 25 µg/ml

Preparación: se diluye x g de Cloranfenicol (Sigma, Cat. No. C6455) en etanol absoluto.

Alícuotas de 1 ml y se conserva a -20 ºC.

Stock: 34 mg/ml

### *DISOLUCIÓN AR (Antigen retrieval)*

Preparación de 1 litro:

Se disuelve 2.94 g de citrato sódico tribásico dihidratado (Sigma, Cat. No. S4641) en agua destilada.

Se ajusta el pH a 6 con ácido clorhídrico.

Se añaden 0.5 ml de Tween-20 (Sigma, Cat. No. P7949)

***DISOLUCIÓN BLOQUEANTE***

Preparación de 100 ml:

Se mezclan 60 ml de MABT1x, 20 ml de BBR y 20 ml de Sheep Serum (Sigma, Cat. No. S2263) inactivado térmicamente previamente (56 ºC durante 30 minutos).

***MAB 5x***

Preparación de 500 ml:

Se disuelven 29 g de ácido málico (Sigma, Cat. No. M0375), 19 g de NaOH (Sigma, 221465) y 21.76 g de NaCl (Sigma, S3014) en agua Milli-Q.

Se ajusta el pH a 7.5.

***MABT 1x (MAB 1X + TWEEN 01%)***

Preparación de 100 ml:

Se mezclan 20 ml de MAB 5x y 0.1 ml de Tween-20 y se enrasa con agua Milli-Q.

***MEDIO DMEM ENRIQUECIDO***

Preparación de 51.25 ml:

Se mezclan 48 ml de medio DMEM (Gibco, Cat. No. 41965039), 0.5 ml penicilina/estreptomicina (Gibco, Cat. No. 15140122, 10000 U/ml) , 0.25 ml L-glutamina (Gibco, Cat. No. 25030024, 200 mM) y 2.5 ml de suero bovino fetal (Gibco) inactivado térmicamente.

Se prepara bajo campana de flujo laminar.

***MEDIO LB LÍQUIDO***

Preparación de 250 ml:

Se disuelven 2.5 g triptona (Pronadisa, 1612.00), 1.25 g de extracto de levadura (Pronadisa, 1702.00) y 2.5 g de NaCl con agua Milli-Q.

Se ajusta el pH a 7.2-7.5.

Se autoclava y se almancena a 4 ºC.

***MEDIO LB-AGAR***

Preparación de 250 ml:

Se disuelven 2.5 g triptona, 1.25 g de extracto de levadura, 2.5 g de NaCl y 3.75 g de agar bacteriológico (Pronadisa, 1800.00) con agua Milli-Q.

Se ajusta el pH a 7.2-7.5.

Se autoclava y se almancena a 4 ºC.

***MEDIO NEUROBASAL ENRIQUECIDO***

Preparación de 52.25 ml:

Se mezclan 48 ml de medio NEUROBASAL (Gibco, Cat. No. 21103049), 1 ml de suplemento B27 (Gibco, Cat. No. A1895601), 0.5 ml penicilina/estreptomicina , 0.25 ml glutamina y 2.5 ml de suero bovino fetal inactivado térmicamente.

Se prepara bajo campana de flujo laminar.

***PARAFORMALDEHIDO AL 4% (PFA)***

Preparación de 250 ml:

Se disuelven 10 g de paraformaldehido (Sigma, Cat. No. 158127) en 240 ml de PBS 0.1M a 65 ºC. Para facilitar la disolución, se le añaden un par de gotas de NaOH (Sigma, Cat. No. 221465) 10M.

Se ajusta el pH a 8-8.5 y se filtra. Almacenar a 4 ºC.

***PBS 1M (Tampón fosfato salino)***

Preparación de 1 litro:

Se disuelven en agua Milli-Q 80g NaCl, 2g KCl (Sigma, Cat. No. P9541), 14.4 g $Na_2HPO_4$ (Sigma, Cat. No. S3264) y 2.4 g $KH_2PO_4$ (Sigma, Cat. No. P9791).

Se enrasa a volumen final y se ajusta el pH a 7.4.

Se filtra con filtro *Stericup Filter Unit 0.22 µm* (Millipore, Cat. No. SCGVU05RE).

Se conserva a temperatura ambiente.

***PBS 0.1M***

Preparación de 1 litro:

Se mezclan 100 ml de PBS 1M con 900 ml de agua Milli-Q.

Se conserva a temperatura ambiente.

***SSC 0.2x pH 7.5***

Preparación de 100 ml:

Se mezcla 1 ml SSC 20x pH 7.5 en 99 ml de agua Milli-Q.

***SSC 20x pH 7.5***

Preparación de 500 ml:

Se disuelven 87.65 g de NaCl y 44.1 g de citrato sódico tribásico (Sigma, Cat. No. S4641) en agua Milli-Q.

Se ajusta el pH a 7.5.

Se autoclava y se alicuota para conservar a -20 ºC.

***SUERO GLUCOSADO***

Preparación de 1 litro:

Se disuelven en agua Milli-Q los siguientes reactivos en este orden:

- 7.24 g de NaCl
- 0.3728 g de KCl
- 0.162 g de $KH_2PO_4$
- 0.32 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma, Cat. No. M7804)
- 2.18 g de $NaHCO_3$ (Sigma, Cat. No. S6297)
- 0.34 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Sigma, Cat. No. C7902)
- 1.8 g de D-Glucosa anhidra (Sigma, Cat. No. G7021)

Se filtra con filtro *Stericup Filter Unit 0.22 µm* (Millipore, Cat. No. SCGVU05RE) bajo campana de flujo laminar.

Conservar a 4 ºC.

***TAE 50x***

Preparación de 1 litro:

Se disuelven en agua Milli-Q 242 g TRIS BASE (Sigma, Cat. No. T1503), 57.1 ml de ácido acético glacial (Panreac, Cat. No. 141008) y 100 ml EDTA 0.5M pH 8 (Sigma, Cat. No. E7889).

Se enrasa a volumen final.

***TAE 1x***

Para 1 litro:

Se mezclan 20 ml de TAE 50x con 980 ml de agua Milli-Q.

***TAMPÓN DE HIBRIDACIÓN 1$^{er}$ DÍA (BH 1$^{er}$ día)***

Preparación de 50ml:

Mezclamos los siguientes reactivos en este orden:

- 25 ml de formamida molecular (Sigma, Cat. No. F9037)
- 3.25 ml de SSC 20x (*Standard saline citrate*), pH 5 [66.53 % de NaCl y 33.47 % de citrato sódico tribásico disueltos en agua Milli-Q y ajustado a pH 5]
- 0.5 ml EDTA 0.5M pH 8 (Sigma, Cat. No. E7889)
- 5 ml de ARNt (Sigma, Cat. No. R6625). Se disuelven 0.5 g de ARNt en 25 ml de agua pura (Sigma, Cat. No. W4502) y 25 ml de formamida molecular.
- 0.1 ml Tween-20
- 100 µl heparina (Sigma, Cat. No. H3393). Uso: 50mg/ml

Enrasar hasta 50 ml con agua pura.

Se agita durante varias horas en agitador orbital a 4 ºC.

Conservar a -20 ºC.

***TAMPÓN DE HIBRIDACIÓN 2º DÍA (BH 2º día)***

Preparación de 50ml:

Mezclamos los siguientes reactivos en este orden:

- 25 ml de formamida molecular (Sigma, Cat. No. F7503)
- 3.25 ml de SSC 20x (*Standard saline citrate*), pH 5 (66.53 % de NaCl y 33.47 % de citrato sódico tribásico disueltos en agua Milli-Q y ajustado a pH 5)
- 0.5 ml EDTA 0.5M pH 8
- 0.1 ml Tween-20

Enrasar hasta 50 ml con agua pura.

Se agita durante varias horas en agitador orbital a 4 ºC.

Conservar a -20 ºC.

***TAMPÓN TRIS 0.05M***

Preparación de 100 ml:

Se prepara a partir del *Trizma hydrochloride* 1M, pH 8 (Sigma, Cat. No. T3038).

Se mezclan 5 ml de Tris comercial con 95 ml de agua Milli-Q.

***TNB***

Preparación de 50 ml:

Se mezclan 30 ml de TNT, 10 ml de BBR y 10 ml Sheep Serum desactivado térmicamente.

***TNT***

Preparación de 50 ml:

Se mezclan 5 ml de Trizma hydrochloride 1M pH8, 0.45 g de NaCl y 2.5 µl Tween-20 en agua Milli-Q.

***TSA PLUS STOCK SOLUTION***

El TSA plus Cy3 (PerkinElmer, Cat. No. NEL744001KT) se disuelve en 150 µl de dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma, Cat. No. D8418).

El DMSO a 4 ºC se encuentra congelado, por lo que hay que atemperarlo antes de usarlo.

***TSA PLUS WORKING SOLUTION***

*TSA Plus Stock solution* se diluye 1:100 en 1x Amplification diluent (PerkinElmer, Cat. No. NEL744001KT).

## ANEXO II. Ejemplares utilizados en este estudio

**Tabla de animales usados para los ensayos de hibridación *in situ* o inmunohistoquímica**

| Estadio | Ratona | Embrión | Orientación | Experimento | Sexo |
|---|---|---|---|---|---|
| E10.5 | mBe058 | 10 | Oblicuo | Inmunofluorescencia Otp/Islet | ♀ |
| E11.5 | mBe060 | 9 | Oblicuo | Inmunofluorescencia Otp/Islet/RC2 | ♀ |
| E12.5 | mBe025 | 1 | Oblicuo | Inmunohistoquímica Otp/Islet | |
| | | 3 | Sagital | Inmunohistoquímica Otp/Islet | |
| | | 6 | Transversal | Inmunohistoquímica Otp/RC2 | |
| | mBe028 | 1 | Oblicuo | Inmunohistoquímica Otp/RC2 | ♂ |
| | | 2 | Transversal | Inmunohistoquímica Otp/RC2 | ♂ |
| | mBe039 | 1 | Oblicuo | Hibridación OT/VP | ♀ |
| | | 2 | Oblicuo | Hibridación Rgs4/VP | ♂ |
| | mBe047 | 3 | Oblicuo | Inmunohistoquímica Otp/RC2 | ♀ |
| | | 4 | Oblicuo | Inmunohistoquímica Otp/Islet | ♀ |
| | | 5 | Oblicuo | Inmunohistoquímica Otp/Islet | ♂ |
| | | 6 | Oblicuo | Inmunohistoquímica Otp/RC2 | ♂ |
| | mBe050 | 1 | Oblicuo | Doble inmunofluorescencia Otp-Islet | ♂ |
| | | 2 | Oblicuo | Doble inmunohist-inmunofluor. Otp-RC2 | ♂ |
| | | 3 | Oblicuo | Inmunohistoquímica Otp /Islet | ♂ |
| | | 5 | Oblicuo | Doble inmunofluor. Otp-Islet | ♀ |
| | mBe055 | 1 | Oblicuo | Triple inmuno. Otp-Islet-RC2 | ♂ |
| | | 3 | Oblicuo | Doble inmunofluor. Otp-Islet | ♂ |
| | mBe076 | 1 | Oblicuo | Hibridación OT/Rgs4 | ♀ |
| | | 2 | Oblicuo | Hibridación VP/Rgs4 | ♂ |
| | | 3 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♀ |
| | | 4 | Oblicuo | Hibridación VP/Rgs4 | ♀ |
| | | 5 | Oblicuo | Hibridación OT/Rgs4 | ♀ |
| E13.5 | mBe026 | 1 | Oblicuo | Hibridación Otp/OT | |
| | | 2 | Oblicuo | Hibridación Otp/VP | |
| | | 3 | Oblicuo | Inmunohistoquímica Otp/Islet | |
| | | 5 | Transversal | Hibridación VP | |
| | | 6 | Oblicuo | Hibridación OT/VP | |
| | mBe030 | 1 | Transversal | Inmunohistoquímica Otp/RC2 | ♂ |
| | | 2 | Oblicuo | Inmunohistoquímica Otp/RC2 | ♀ |
| | mBe048 | 1 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/RC2 | ♀ |
| | | 2 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/Islet | ♀ |
| | | 4 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/Islet | ♀ |
| | | 5 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/RC2 | ♂ |
| | | 8 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/Islet | ♂ |

| Estadio | Ratona | Embrión | Orientación | Experimento | Sexo |
|---|---|---|---|---|---|
| E14.5 | mBe021 | 1 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/RC2 | ♀ |
| | | 4 | Oblicuo | Hibridación Otp/CRF | ♀ |
| | | 5 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/TH | ♂ |
| | | 8 | Transversal | Hibridación OT/VP | |
| | mBe041 | 7 | Oblicuo | Hibridación Otp/OT | ♂ |
| | | 8 | Oblicuo | Hibridación Otp/VP | ♂ |
| | | 9 | Oblicuo | Hibridación Otp/CRF | ♂ |
| | mBe046 | 7 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/RC2 | ♀ |
| | | 8 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/Islet | ♀ |
| | | 9 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/Islet | ♂ |
| | mBe049 | 8 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp | ♀ |
| | | 10 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/Islet | ♂ |
| | mBe070 | 7 | Sagital | Hibridación VP/Otp | ♀ |
| | | 8 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♂ |
| | | 9 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♀ |
| | | 10 | Sagital | Hibridación OT/Otp | ♂ |
| | mBe072 | 8 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♀ |
| | | 11 | Oblicuo | Hibridación Rgs4/OT | ♀ |
| | | 12 | Oblicuo | Hibridación Rgs4/VP | ♀ |
| | | 13 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♀ |
| | mBe073 | 7 | Oblicuo | Hibridación Rgs4/VP | ♀ |
| E15.5 | mBe023 | 2 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/VP | |
| | | 3 | Oblicuo | Hibridación OT/CRF | |
| | | 4 | Oblicuo | Inmunohistoq.TH | |
| | | 5 | Oblicuo | Inmunohistoq. VP/TH | |
| | mBe062 | 2 | Oblicuo | Hibridación OT/VP | ♀ |
| | | 3 | Oblicuo | Hibridación OT/VP | ♂ |
| E16.5 | mBe029 | 1 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/VP/RC2 | ♀ |
| | | 6 | Transversal | Inmunohistoq. Otp/VP/RC2 | ♀ |
| | mBe045 | 2 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/Islet | ♂ |
| | | 6 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/VP | ♂ |
| | mBe053 | 1 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/VP | ♂ |
| | | 2 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/VP | ♀ |
| | | 3 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/VP | ♂ |
| | mBe066 | 1 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♀ |
| | | 2 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♂ |
| | | 5 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♀ |
| | | 6 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♂ |
| | mBe077 | 1 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♂ |
| | | 2 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♀ |
| | | 3 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♀ |
| | | 6 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♂ |

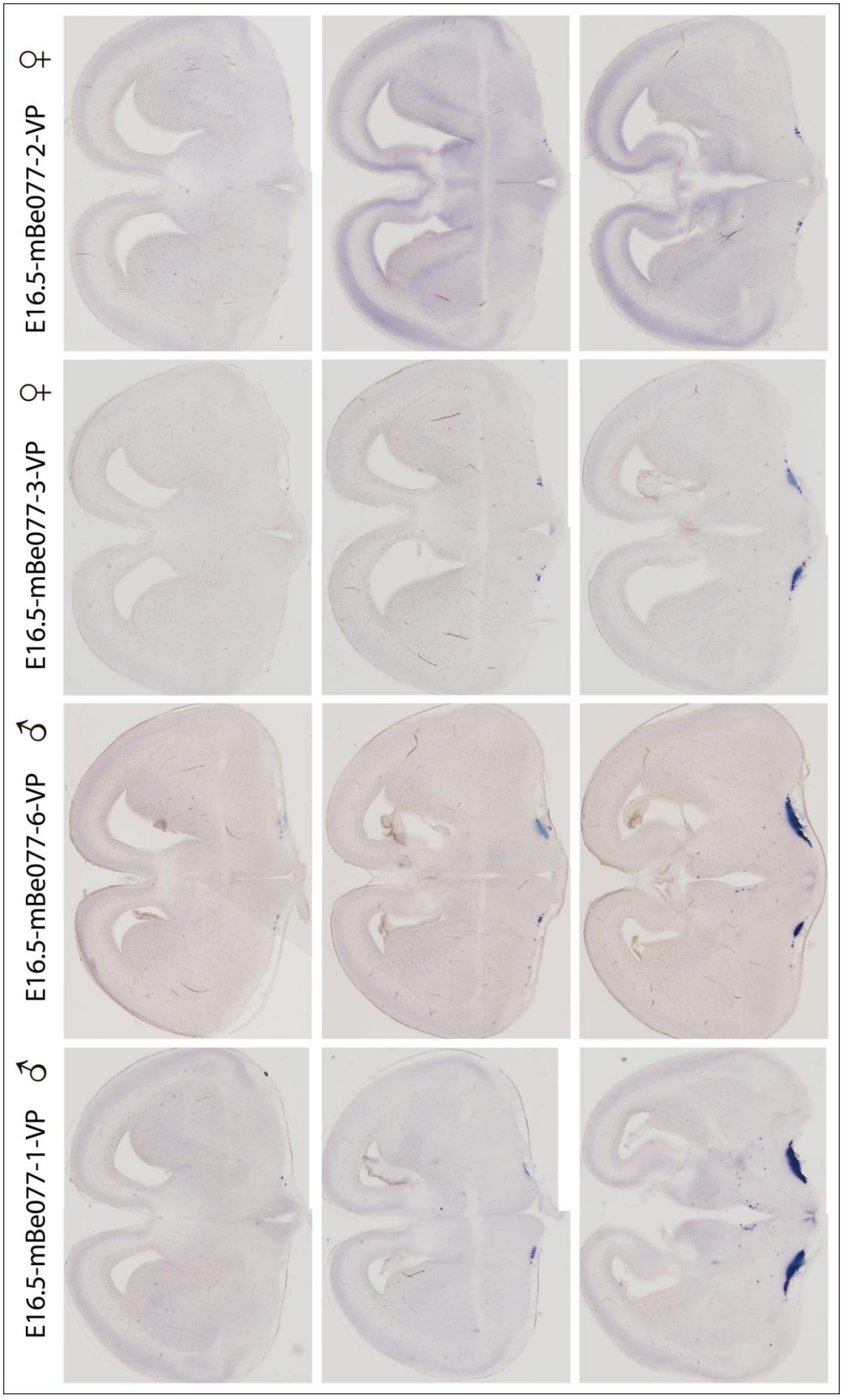
| Estadio | Ratona | Embrión | Orientación | Experimento | Sexo |
|---|---|---|---|---|---|
| E17.5 | mBe027 | 3 | Oblicuo | Hibridación Otp/CRF/OT | |
| | mBe042 | 1 | Oblicuo | Hibridación OT/Rgs4 | |
| | | 2 | Oblicuo | Hibridación VP/Rgs4 | |
| E18.5 | mBe024 | 1 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/VP | |
| | | 2 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/VP | |
| | | 4 | Oblicuo | Inmunohistoq. Otp/VP/TH | |
| | mBe063 | 5 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♂ |
| | | 6 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♂ |
| | | 7 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♀ |
| | | 8 | Oblicuo | Hibridación VP/OT | ♀ |
| P0 | mBe032 | 6 | Oblicuo | Inmunohistoq. VP | ♂ |
| | mBe043 | 1 | Oblicuo | Inmunohistoq. VP/Otp/TH | |
| | | 2 | Oblicuo | Inmunohistoq. VP/Otp/TH | |
| P3 | mBe031 | 1 | Oblicuo | Inmunohistoq. VP/TH | ♂ |
| P7 | mBe033 | 7 | Oblicuo | Inmunohistoq. VP/TH | ♂ |

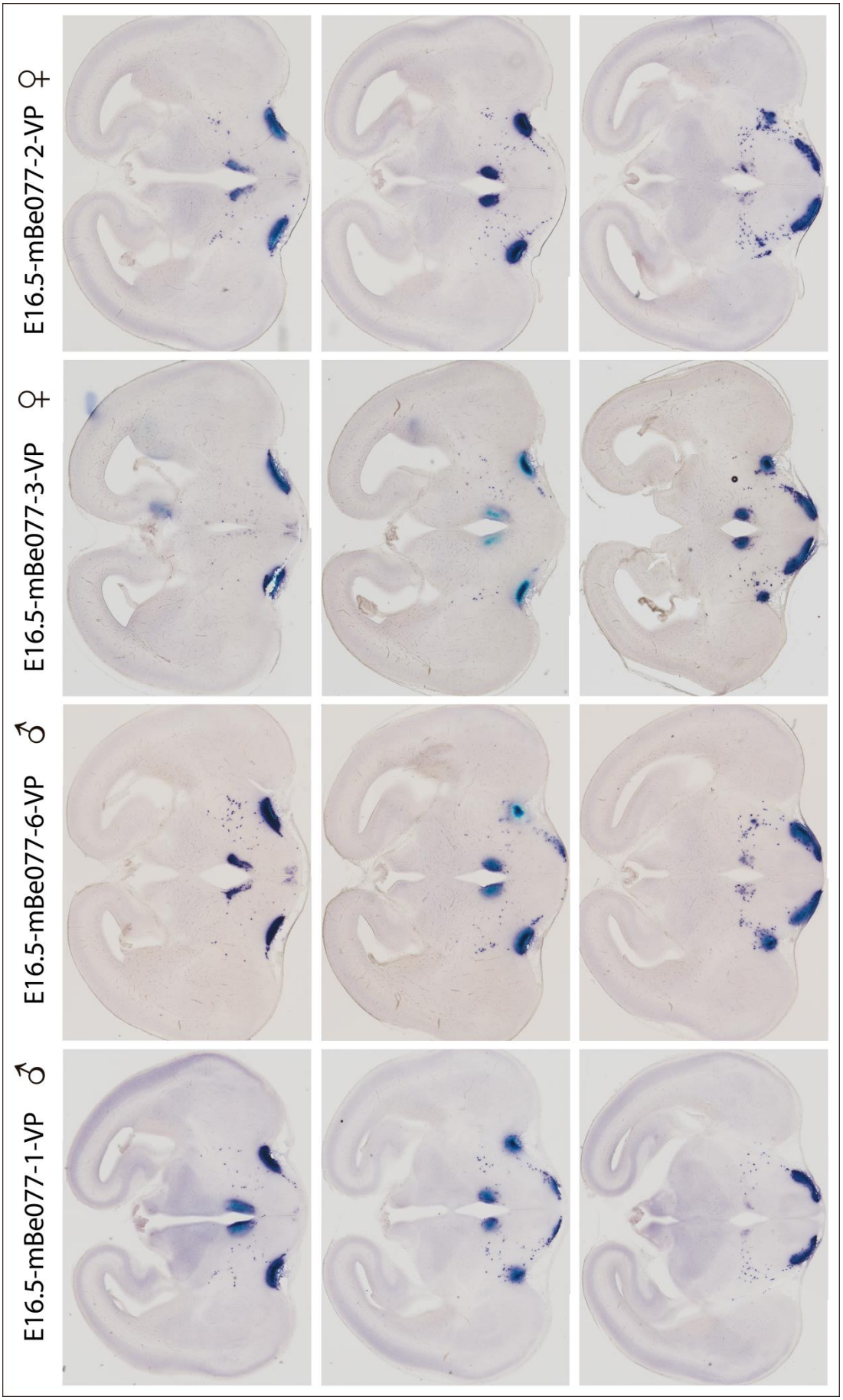
**Tabla de casos seleccionados de los ensayos de migración**

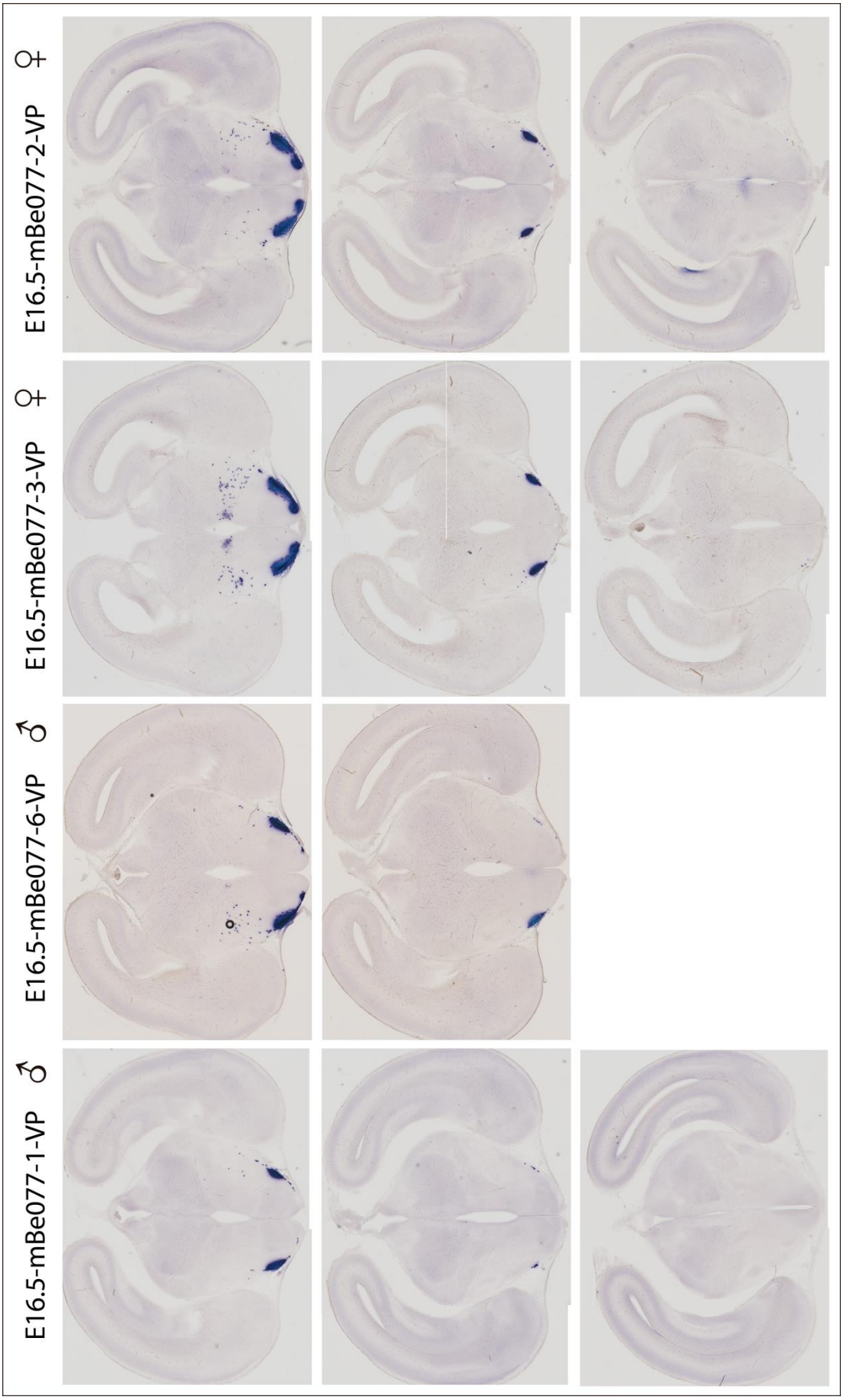
| Estadio | Ratona | Embrión | Caso | Orientación | Ubicación del trazador celular fluorescente CMFDA |
|---|---|---|---|---|---|
| E14.5 | mBe017 | 1 | 6a | Oblicuo | PO ventral |
| | | | 6b | Oblicuo | PO ventral |
| | | 4 | 1a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | mBe020 | 1 | 1a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 2a | Oblicuo | SPV basal |
| | | | 2b | Oblicuo | SPV basal |
| | | 3 | 1a | Asimétrico | PO ventral |
| | | | 3b | Oblicuo | SPV peduncular |
| | mBe021 | 2 | 3a | Oblicuo | PO ventral |
| | mBe034 | 4 | 2a | Oblicuo | PO comisural |
| | | | 2b | Oblicuo | PO comisural |
| | | 5 | 3a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | mBe035 | 3 | 1a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 1b | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 2a | Oblicuo | PO ventral |
| | mBe036 | 2 | 1a | Oblicuo | PO comisural |
| | | | 1b | Oblicuo | PO comisural |
| | mBe044 | 2 | 5a | Oblicuo | PO ventral |
| | | | 5b | Oblicuo | PO ventral |
| | mBe046 | 3 | 2a | Oblicuo | PO ventral + SPV terminal |
| | | | 2b | Oblicuo | SPV terminal |
| | | | 3b | Oblicuo | SPV peduncular |

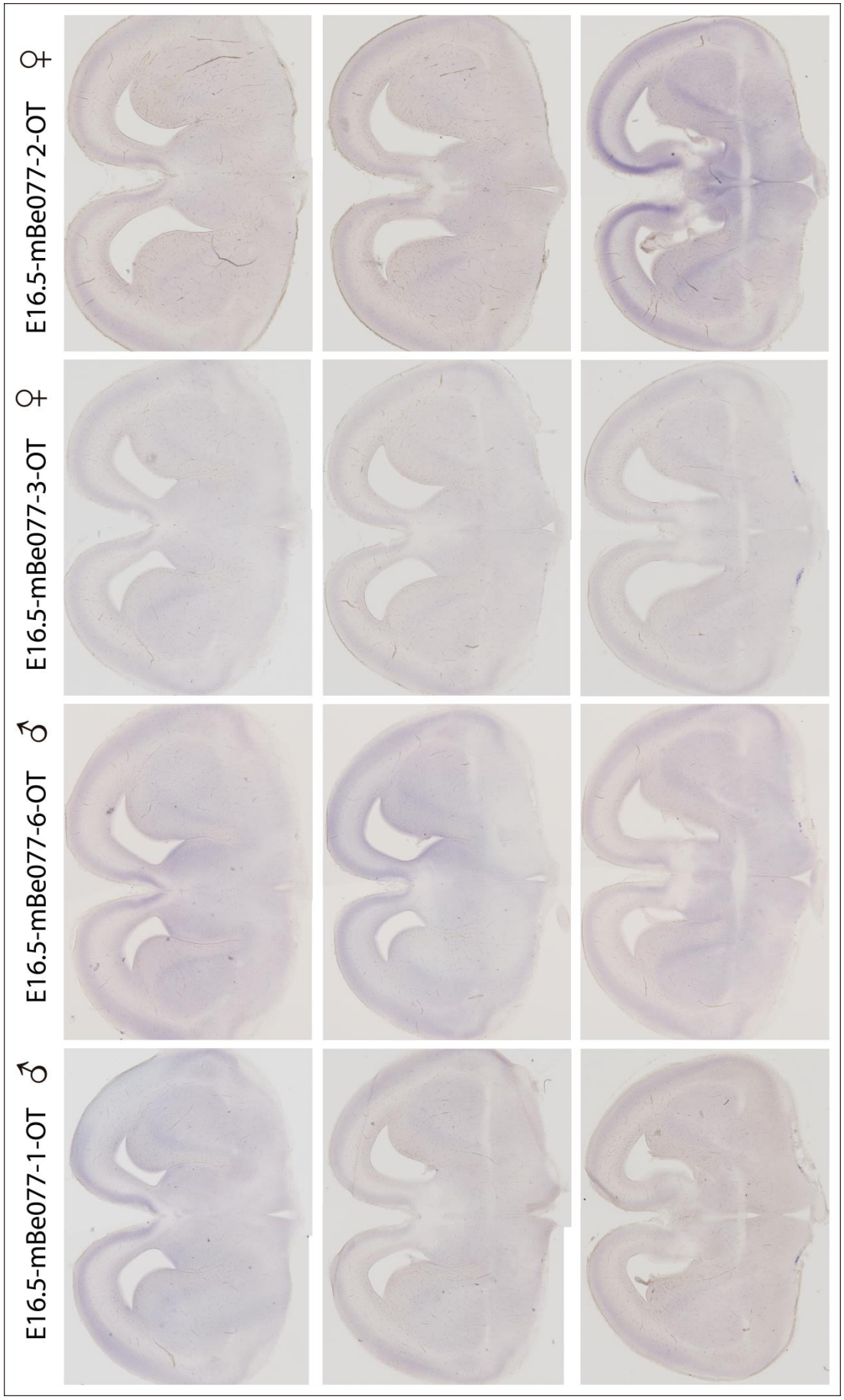
| Estadio | Ratona | Embrión | Caso | Orientación | Ubicación del trazador celular fluorescente CMFDA |
|---|---|---|---|---|---|
| E14.5 | mBe017 | 1 | 6a | Oblicuo | PO ventral |
| | | | 6b | Oblicuo | PO ventral |
| | | 4 | 1a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | mBe020 | 1 | 1a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 2a | Oblicuo | SPV basal |
| | | | 2b | Oblicuo | SPV basal |
| | | 3 | 1a | Asimétrico | PO ventral |
| | | | 3b | Oblicuo | SPV peduncular |
| | mBe021 | 2 | 3a | Oblicuo | PO ventral |
| | mBe034 | 4 | 2a | Oblicuo | PO comisural |
| | | | 2b | Oblicuo | PO comisural |
| | | 5 | 3a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | mBe035 | 3 | 1a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 1b | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 2a | Oblicuo | PO ventral |
| | mBe036 | 2 | 1a | Oblicuo | PO comisural |
| | | | 1b | Oblicuo | PO comisural |
| | mBe044 | 2 | 5a | Oblicuo | PO ventral |
| | | | 5b | Oblicuo | PO ventral |
| | mBe046 | 3 | 2a | Oblicuo | PO ventral + SPV terminal |
| | | | 2b | Oblicuo | SPV terminal |
| | | | 3b | Oblicuo | SPV peduncular |
| | mBe057 | 6 | 1a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | mBe064 | 1 | 1a | Oblicuo | SPV peduncular + inmunofluoresc. VP |
| | | | 1b | Oblicuo | SPV peduncular + inmunofluoresc. VP |
| | | | 4 | Oblicuo | SPV terminal |
| | | 4 | 3a | Oblicuo | PO ventral + inmunofluoresc. Islet1 |
| | | | 3b | Oblicuo | PO ventral + inmunofluoresc. Islet1 |
| | mBe067 | 1 | 3a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 3b | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | 4 | 3a | Oblicuo | PO ventral |
| | | | 3b | Oblicuo | PO ventral |
| | | | 5a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 5b | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | 5 | 5a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 5b | Oblicuo | SPV peduncular |
| | mBe070 | 3 | 3a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 3b | Oblicuo | SPV peduncular |
| | mBe071 | 2 | 3 | Oblicuo | SPV terminal |
| | | 3 | 1a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 1b | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | 5 | 1a | Oblicuo | SPV peduncular |
| | | | 1b | Oblicuo | SPV peduncular |
| | mBe071 | 3 | 3a | Oblicuo | SPV basal |
| | | | 3b | Oblicuo | SPV basal |
| | mBe078 | 1 | 2a | Oblicuo | SPV peduncular + hibridación VP |
| | | 3 | 2a | Oblicuo | SPV peduncular + hibridación VP |
| | | | 2b | Oblicuo | SPV peduncular + hibridación VP |
| | | 5 | 1a | Oblicuo | SPV peduncular + hibridación VP |
| | | | 2a | Oblicuo | SPV peduncular + hibridación VP |
| | | | 2b | Oblicuo | SPV peduncular + hibridación VP |

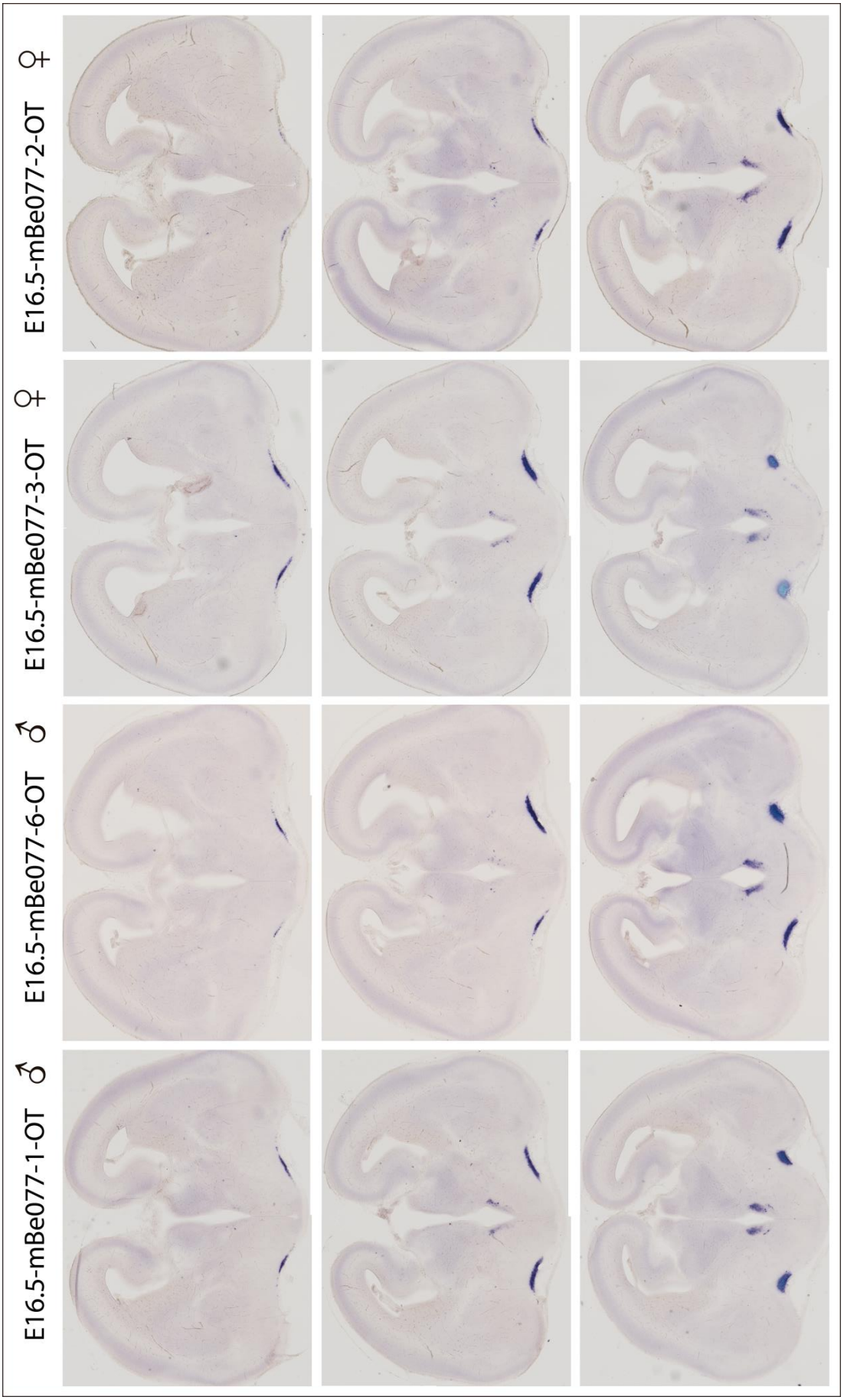
**ANEXO III. Comparación de expresión de VP y OT en machos y hembras**

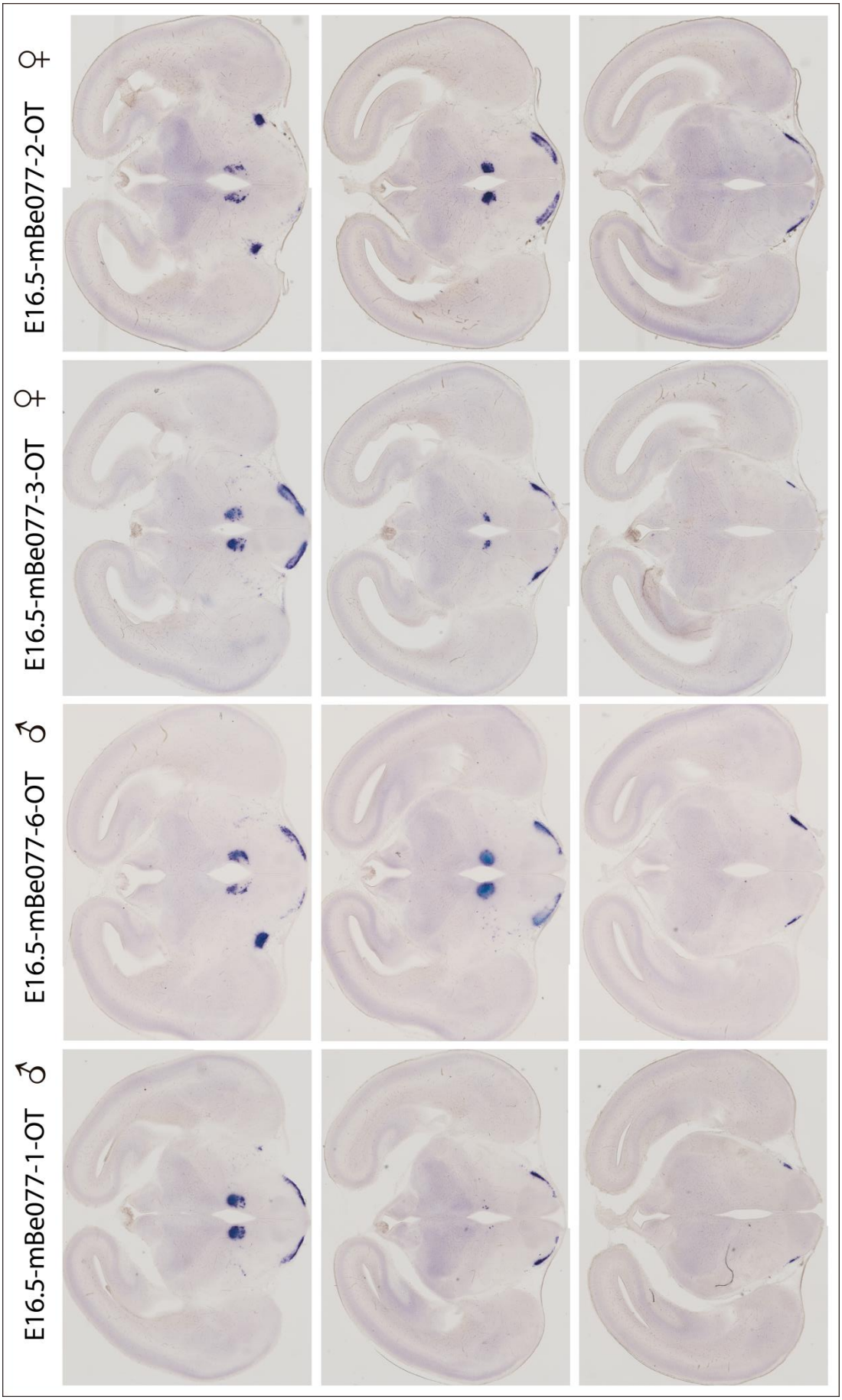


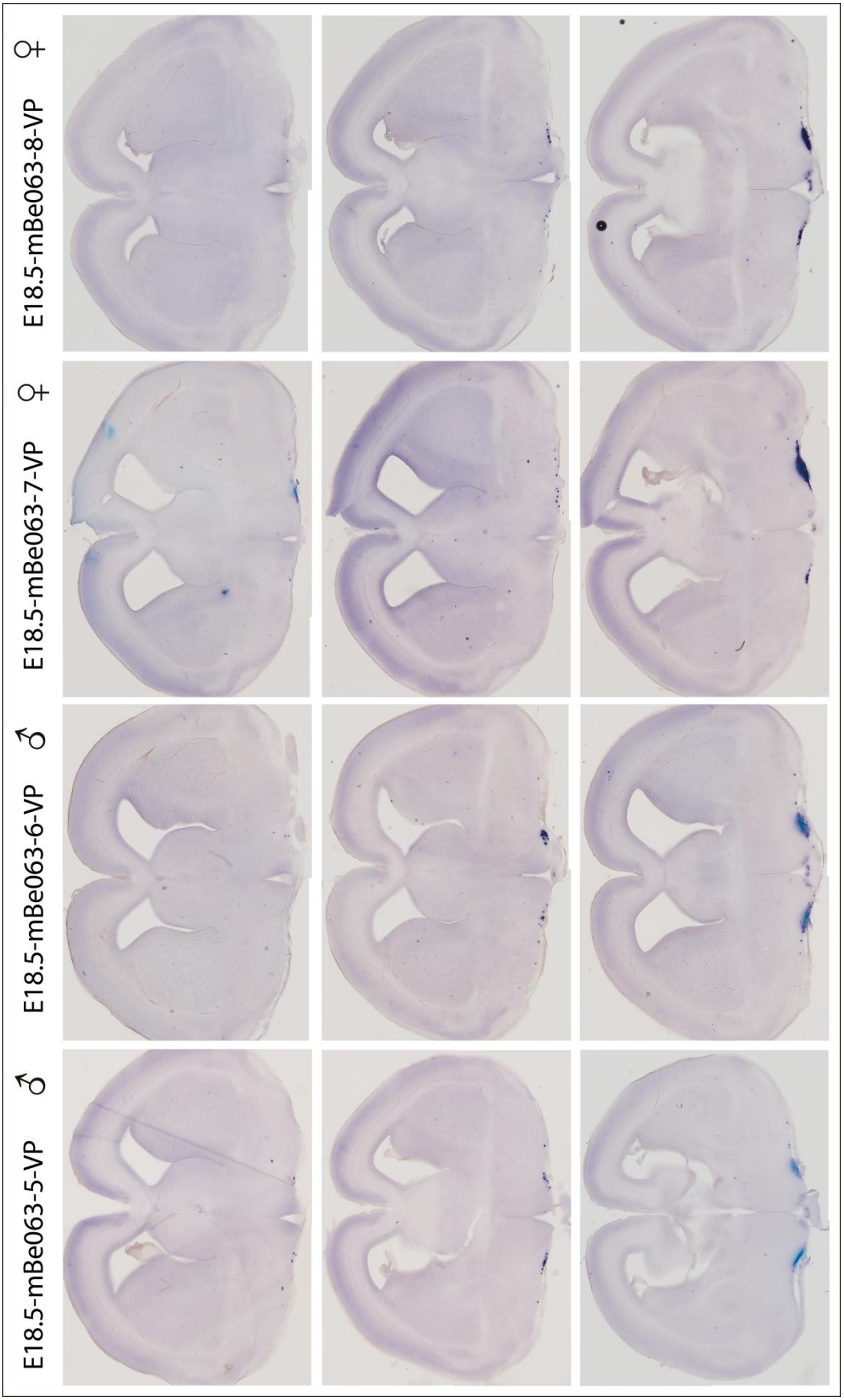

E16.5-mBe077-1-VP ♂
E16.5-mBe077-6-VP ♂
E16.5-mBe077-3-VP ♀
E16.5-mBe077-2-VP ♀

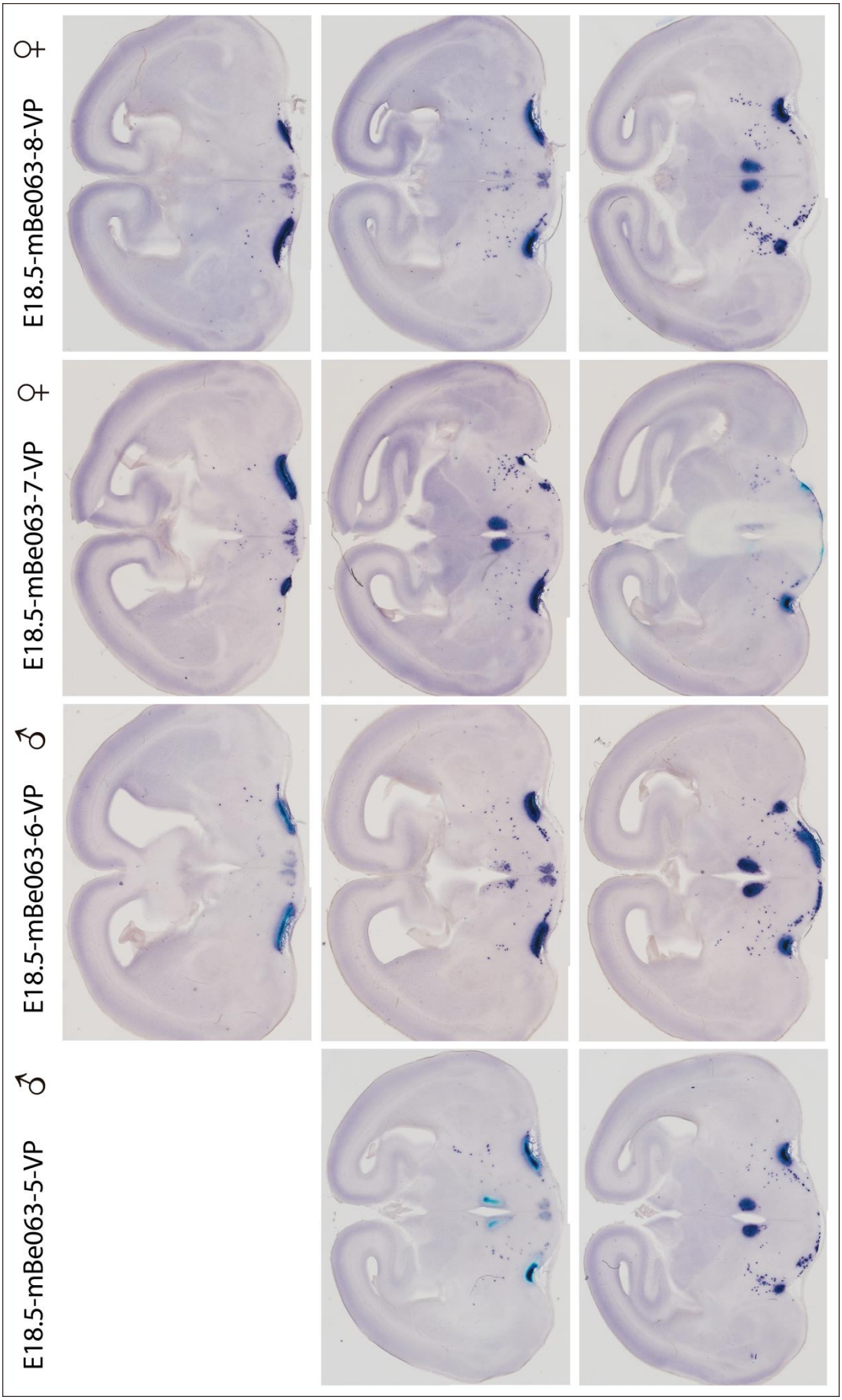

E16.5-mBe077-1-VP ♂
E16.5-mBe077-6-VP ♂
E16.5-mBe077-3-VP ♀
E16.5-mBe077-2-VP ♀

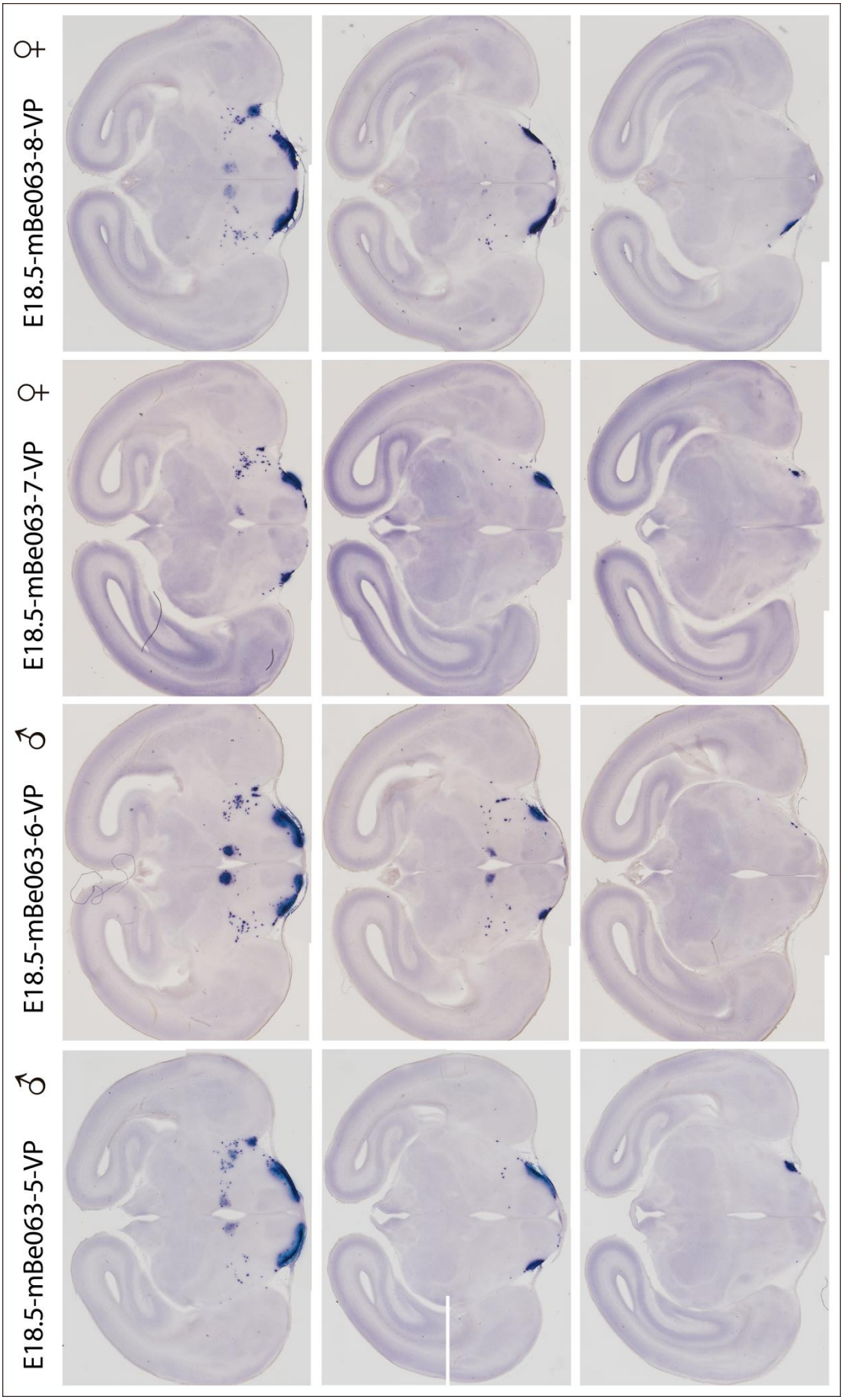

E16.5-mBe077-1-OT ♂
E16.5-mBe077-6-OT ♂
E16.5-mBe077-3-OT ♀
E16.5-mBe077-2-OT ♀

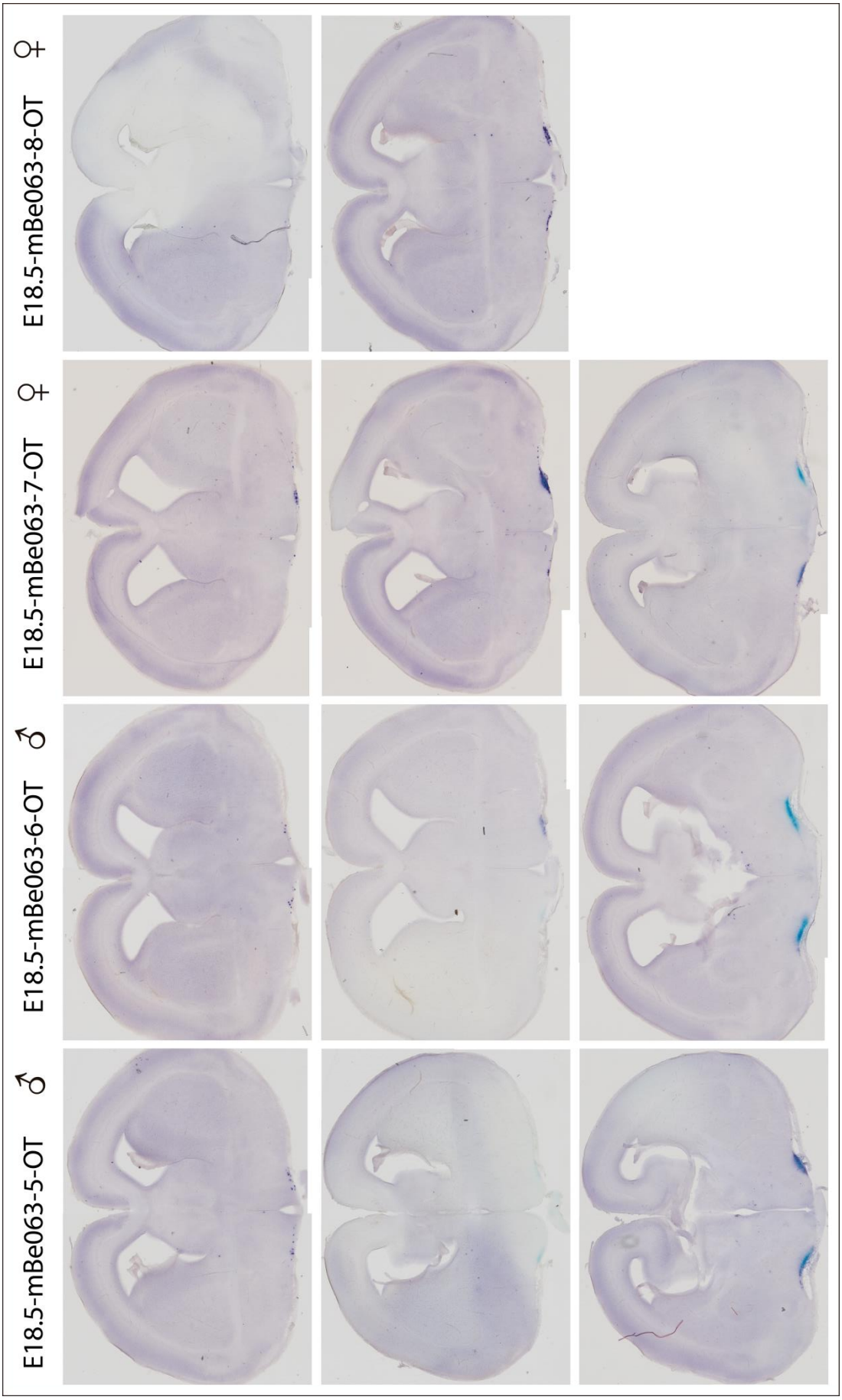

E16.5-mBe077-1-OT ♂
E16.5-mBe077-6-OT ♂
E16.5-mBe077-3-OT ♀
E16.5-mBe077-2-OT ♀

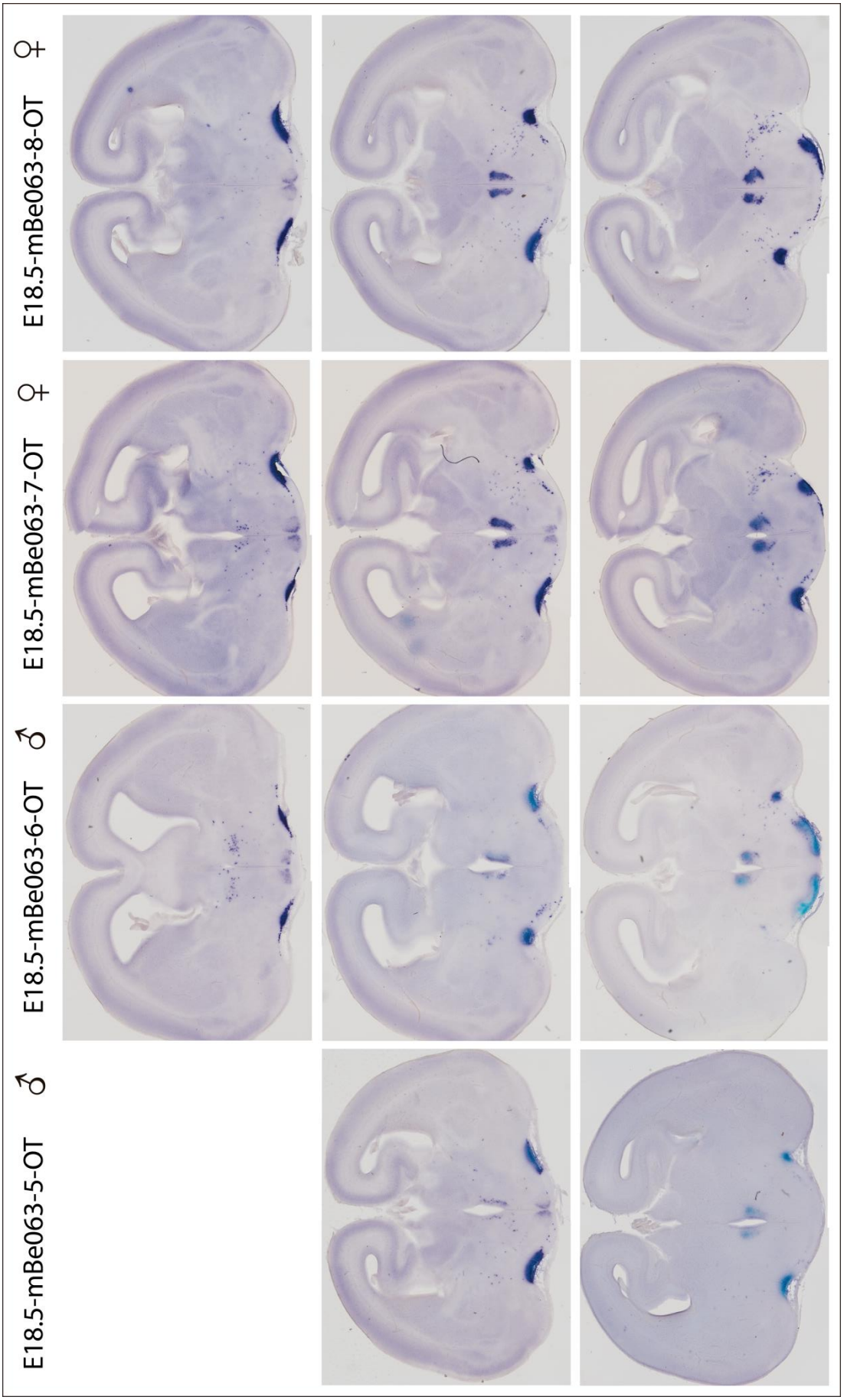

E16.5-mBe077-1-OT ♂
E16.5-mBe077-6-OT ♂
E16.5-mBe077-3-OT ♀
E16.5-mBe077-2-OT ♀

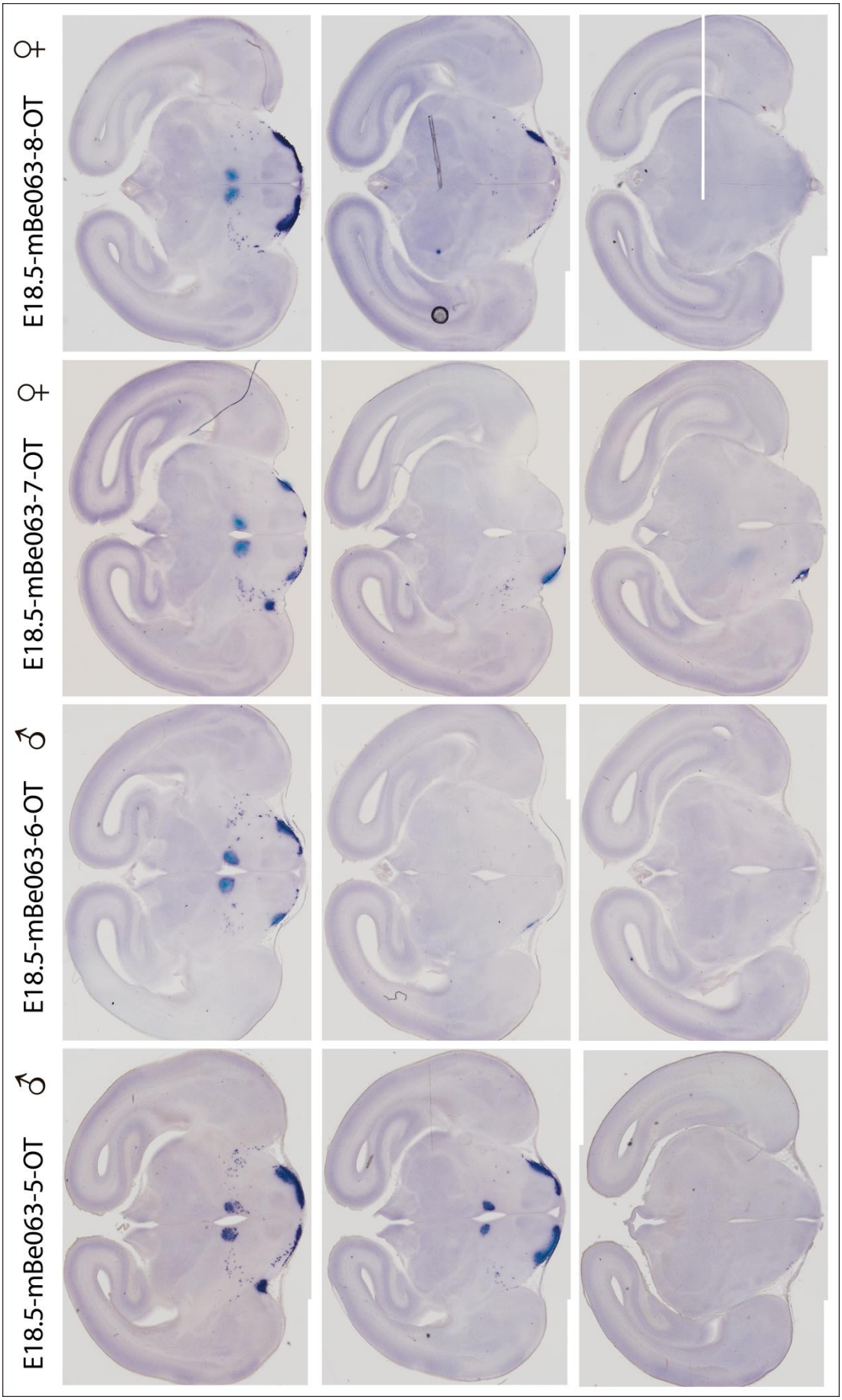

E18.5-mBe063-5-VP ♂
E18.5-mBe063-6-VP ♂
E18.5-mBe063-7-VP ♀
E18.5-mBe063-8-VP ♀


E18.5-mBe063-5-VP ♂
E18.5-mBe063-6-VP ♂
E18.5-mBe063-7-VP ♀
E18.5-mBe063-8-VP ♀


E18.5-mBe063-5-VP ♂
E18.5-mBe063-6-VP ♂
E18.5-mBe063-7-VP ♀
E18.5-mBe063-8-VP ♀


E18.5-mBe063-5-OT ♂
E18.5-mBe063-6-OT ♂
E18.5-mBe063-7-OT ♀
E18.5-mBe063-8-OT ♀


E18.5-mBe063-5-OT ♂
E18.5-mBe063-6-OT ♂
E18.5-mBe063-7-OT ♀
E18.5-mBe063-8-OT ♀


E18.5-mBe063-5-OT ♂
E18.5-mBe063-6-OT ♂
E18.5-mBe063-7-OT ♀
E18.5-mBe063-8-OT ♀