



# IMPACTO BIOLÓGICO DEL PROTO-ONCOGÉN *c-fos* EN CÉLULAS MADRES/PROGENITORAS NEURALES

Tesis para optar por el Título de Doctor en Ciencias Químicas  
Licenciada en Bioquímica Clínica Fabiola Noelia Velazquez

Directora de Tesis

Dra. Beatriz Leonor Caputto

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba-CIQUIBIC

Dpto. de Química Biológica- Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba-Argentina

R-T

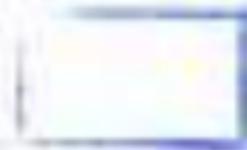
572.8845

✓  
13850

Auler ✓

02/10/20

1ml



**Comisión de Tesis:**

Dr. José Luis Bocco

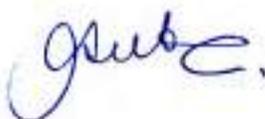
Dr. Bruno Maggio

Dra. Claudia Bregonzio

Handwritten signatures in blue ink corresponding to the names listed to the left. The first signature is for José Luis Bocco, the second for Bruno Maggio, and the third for Claudia Bregonzio.

**Evaluador externo:**

Dra. Ángela María Suburo

Handwritten signature in blue ink corresponding to the name listed to the left.

## Agradecimientos

En primer lugar a Bety, por recibirme, por confiar, por su apoyo permanente, por la formación brindada, por sus retos y consejos, porque para ella siempre hay una salida, pero principalmente por la buena onda, los consejos y el apoyo extralaboral.

Al Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC) y al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba por brindarme el lugar de trabajo para cumplir este objetivo.

A los miembros de mi comisión de tesis: Dr. José Luis Bocco, Dr. Bruno Maggio y Dra. Claudia Bregonzio, por el seguimiento, sus aportes y revisiones a lo largo de la tesis. A la evaluadora externa, Dra. Ángela María Suburo, por su tiempo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y al Ministerio de Ciencia y Tecnología (Mincyt) por el apoyo económico otorgado.

A los jefes, investigadores, becarios y al personal no docente del CIQUIBIC porque siempre que necesite ayuda la encontré. En especial a Dani y Lau por su paciencia y ayuda permanente.

Al Dr. François Boussin por abrirme las puertas de su laboratorio y por la enseñanza brindada. A su grupo de investigación, en especial a Olivier, Maya y David por su importante aporte en esta tesis.

A mi queridísimo grupo: el Lab Caputto. A los que estuvieron: Diego, por enseñarme los primeros pasos, a Rubén y Gabi, por los lindos momentos que compartimos. Gabi muchas gracias por tu enorme aporte inicial, aprendí mucho. A quienes están: Germán, en los momentos importantes nos defendes a todos; Ruso, cómo nos haces reír; Andrés, el aporte de seriedad al laboratorio; Anita y Lu, mis compañeras de regreso a casa luego del trabajo, siempre dando una palabra de apoyo en todo momento, excelentes personas y amigas, gracias por todo. Porque el ambiente de trabajo no puede ser mejor, estamos todos locos! Las cosas pueden no salir pero siempre hay una palabra de ánimo, una ayuda. Más allá del trabajo encontré buenos amigos, personas en las que puedo confiar, gracias por bancarme en los malos momentos, los quiero.

A Cesár, que más te puedo decir, sin vos todo hubiese sido muy difícil, porque sos mi compañero de trabajo, somos un equipo, porque estuviste ayudándome y acompañándome cuando las cosas no salían, hasta que un día todo se va solucionando.

Pero principalmente gracias por tu amistad, tus consejos, retos y tu ayuda incondicional, por estar presente en todo momento. Conocí a una excelente persona, te quiero mucho y no te vas a liberar tan fácilmente de mí .... Volveré!

A Mauge, Lu, Chany, Nati y Lauri por las salidas de after. A las amigas que el trabajo me brindó. A Dani por su ayuda en lo laboral, sus consejos y su preocupación permanente, porque siempre estas. A Rosa y Carito, por los divertidos momentos y charlas. En especial a Lau y Sabri porque fueron y son un apoyo importante, agradezco haberlas cruzado en mi camino, son mi catarsis permanente, oído y consejo al mismo tiempo

A mis amigos de la facu: Pablito, Ceci y Lau. Por las juntadas, por las risas, las historias, porque fueron y son mi salida a la realidad, porque siempre están.

A mis amigas de Jujuy: Mariachi, Mari, Rosa, Lu y Pau, porque están presentes a la distancia, preguntando como va eso y brindando palabras de apoyo. A Noe porque es como una hermana, la distancia no cambia nada, y a su familia.

A mis tíos, primos y a mi abu porque siempre se acuerda de todos. A esas tres personas que partieron temprano, a un lugar mejor, porque confiaban en mí.

A las cuatro personas más importantes de mi vida: a mi papá Victor y a mi mamá Norma, sin ustedes no hubiese logrado todo esto, por el apoyo incondicional, porque son el ejemplo del amor más sincero, apostar, confiar y apoyar sin preguntar para que ni porque, simplemente un dale para adelante y cuidate, los quiero tanto! A mis hermanos Beto y Nahuel, porque tienen una manera inexplicable de hacerme sentir bien, los necesito siempre!

En fin, a todos los que de alguna u otra forma estuvieron presentes en este largo camino, espero no olvidarme de nadie, simplemente GRACIAS!

# ÍNDICE

RESUMEN .....	5
ABREVIATURAS .....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
- ASPECTOS GENERALES DE LA PROTEÍNA c-Fos .....	8
I- Expresión de <i>c-fos</i> .....	8
II- Estructura de la proteína c-Fos.....	10
III- Modificaciones post-traduccionales de c-Fos.....	11
- c-Fos COMO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN .....	12
I- Rol de c-Fos durante la proliferación .....	14
II- Rol de c-Fos en apoptosis .....	15
III- Rol de c-Fos en la tumorigénesis .....	15
IV- Rol de c-Fos en diferenciación .....	16
- c-Fos COMO ACTIVADOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS .....	17
- c-Fos EN EL DESARROLLO DE RATONES.....	18
I- Alteraciones a nivel del SNC en animales <i>c-fos</i> <i>-/-</i> .....	20
- EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL .....	21
I- Revisión general del proceso de la neurogénesis en la corteza cerebral embrionaria (telencéfalo dorsal).....	22
II- Poblaciones celulares involucradas en la neurogénesis embrionaria.....	24
III- Resumen de la neurogénesis en el telencéfalo dorsal (pallium) y el aporte de la neurogénesis a nivel del telencéfalo ventral (subpallium) .....	29
- NEUROGÉNESIS EN EL ADULTO .....	31
Células madre neurales (NSCs) en la zona sub-ventricular (SVZ).....	32
- ESTUDIO <i>in vitro</i> DE LAS POBLACIONES CELULARES INVOLUCRADAS EN LA NEUROGÉNESIS.....	33
- RELACIÓN ENTRE c-Fos Y EL DESARROLLO DEL SNC .....	34
OBJETIVOS.....	36

RESULTADOS .....	38
- CAPITULO 1. FENOTIPO DEL ADULTO .....	38
I- Desarrollo alcanzado por animales adultos <i>c-fos</i> <i>+/+</i> y <i>c-fos</i> <i>-/-</i> . ....	38
II- SNC de animales adultos <i>c-fos</i> <i>+/+</i> y <i>c-fos</i> <i>-/-</i> .....	40
- CAPITULO 2. COMPORTAMIENTO <i>in vitro</i> DE LAS CÉLULAS MADRE/PROGENITORAS NEURALES DE EMBRIONES <i>c-fos</i> <i>-/-</i> .....	43
I- Cuantificación funcional de NSPCs de E14.5 <i>c-fos</i> <i>+/+</i> y <i>c-fos</i> <i>-/-</i> . ....	43
II- Las NSPCs <i>c-fos</i> <i>-/-</i> presentan una menor capacidad para proliferar y una mayor muerte celular luego de tiempos prolongados en cultivo. ....	45
III- Las NPSCs <i>c-fos</i> <i>-/-</i> son multipotentes pero presentan una menor capacidad de auto-renovación en comparación a sus contrapartes normales. ....	47
IV- Las NSPCs presentan una menor tendencia a la diferenciación neuronal.....	48
V- Expresión de c-Fos y su rol molecular en el comportamiento <i>in vitro</i> de NSPCs...	49
- CAPITULO 3. ANÁLISIS DE LA NEUROGENESIS EN EMBRIONES <i>c-fos</i> <i>-/-</i> ..	53
I- La corteza cerebral de E14.5 <i>c-fos</i> <i>-/-</i> presenta un menor espesor en comparación a sus contrapartes normales. ....	53
II- Mitosis y apoptosis en la corteza cerebral de E14.5 <i>c-fos</i> <i>-/-</i> y <i>c-fos</i> <i>+/+</i> . ....	55
III- Análisis del ciclo celular en la corteza cerebral de E14.5 <i>c-fos</i> <i>-/-</i> y <i>c-fos</i> <i>+/+</i> .....	58
IV- Distribución de la población de NSPCs en la corteza cerebral de E14.5 <i>c-fos</i> <i>+/+</i> y <i>c-fos</i> <i>-/-</i> . ....	62
V- La población de células neuronales post-mitóticas se encuentra reducida en los E14.5 <i>c-fos</i> <i>-/-</i> . ....	64
VI- La expresión de los marcadores de diferenciación neuronal NeuN y MAP2 se encuentra reducido en E14.5 <i>c-fos</i> <i>-/-</i> . ....	66
VII- NSPCs <i>c-fos</i> <i>-/-</i> presentan una menor tendencia a la diferenciación neuronal.....	68
VIII- La menor diferenciación neuronal de la corteza cerebral de E14.5 <i>c-fos</i> <i>-/-</i> se extiende a otras regiones del cerebro y se mantiene en estadios avanzados del desarrollo. ....	71

IX- Las diferencias en neurogénesis entre embriones <i>c-fos</i> <i>+/+</i> y <i>c-fos</i> <i>-/-</i> comienzan a ser detectadas a los 13.5 días de desarrollo embrionario (E13.5).....	73
X- Estudio de la función citosólica y nuclear de c-Fos en la corteza cerebral de E14.5 .....	75
- CAPITULO 4. BREVE ESTUDIO DE LA NEUROGÉNESIS EN RATONES ADULTOS <i>c-fos</i> <i>-/-</i> .....	80
DISCUSIÓN.....	86
- Efecto de la falta de c-Fos en el desarrollo de animales <i>c-fos</i> <i>-/-</i> .....	86
- Estudio comparativo del SNC entre animales adultos <i>c-fos</i> <i>+/+</i> y <i>c-fos</i> <i>-/-</i> .....	91
- Análisis de la neurogénesis en embriones <i>c-fos</i> <i>-/-</i> .....	92
- Rol molecular de c-Fos durante la neurogénesis embrionaria.....	99
- Breve estudio de la neurogénesis en la SVZ de animales adultos <i>c-fos</i> <i>+/+</i> y <i>c-fos</i> <i>-/-</i> .....	100
- Comentarios finales .....	101
- Resumen .....	103
MATERIALES Y MÉTODOS.....	104
- Animales.....	104
- Determinación del peso total y del porcentaje de peso seco de órganos procedentes de animales adultos. ....	104
- Comparación del tamaño celular de células obtenidas a partir de órganos procedentes de animales adultos.....	105
- Cuantificación de núcleos totales en la corteza cerebral adulta .....	105
- Obtención de embriones de 13.5 (E13.5), 14.5 (E14.5) y 16.5 (E16.5) días de gestación .....	106
- Ensayos de inyección dual con EdU y BrdU.....	106
- Obtención de cerebros embrionarios para su posterior análisis por inmunofluorescencia.....	107
- Inmunofluorescencia de tejido embrionario .....	107
- Medición del espesor de la corteza cerebral en desarrollo .....	109
- Cuantificación de células en mitosis y apoptosis .....	109

- Cuantificación de marcadores celulares .....	110
- Orientación del ángulo de división mitótico .....	111
- Disociación del telencéfalo de E14.5 para la obtención de cultivo de células madre progenitoras neurales (NSPCs).....	111
- Cultivo de neuroesferas .....	111
- Ensayo de proliferación de neuroesferas.....	112
- Apoptosis.....	112
- Ensayo de auto-renovación y multipotencialidad.....	112
- Ensayo de formación de colonias (NCFC Assay: Neural Colony Forming Cell Assay) .....	113
- Marcación <i>in vitro</i> de fosfolípidos .....	114
- Ensayo de movilidad electroforética (EMSA) .....	115
- Western Blot.....	116
- Administración de BrdU en animales adultos.....	118
- Inmunofluorescencia de cerebros adultos.....	118
- Análisis de la SVZ de adultos .....	119
- Análisis estadístico .....	119
BIBLIOGRAFÍA.....	120

**RESUMEN**



**RESUMEN**

c-Fos es una proteína codificada por un gen perteneciente a la familia de genes de expresión inmediata temprana. Junto a otras proteínas (Fra-1, Fra-2, FosB y  $\Delta$ FosB), c-Fos es miembro de una familia de factores de transcripción que forma hetero-dímeros con proteínas pertenecientes a la familia Jun, para así constituir el factor de transcripción tipo AP-1. Como factor de transcripción, c-Fos regula la expresión de diversos genes blanco, pero además de su función nuclear, a nivel citosólico activa enzimas claves de la vía de síntesis de fosfolípidos, incrementando la misma. A pesar de su reconocida participación en eventos de proliferación, diferenciación y apoptosis, ratones *knock-out* para este proto-oncogén resultan viables, por lo que constituyen un modelo adecuado para el estudio del rol de esta proteína en el desarrollo y funcionalidad de los diferentes órganos y sistemas.

Teniendo en cuenta las alteraciones de comportamiento que presentan los ratones *c-fos*  $-/-$  y la reducción en el tamaño de su corteza cerebral respecto a los animales *wild-type*, se evaluó la importancia de c-Fos para el adecuado funcionamiento de las células madres/progenitoras neurales (NSPCs) localizadas en la corteza cerebral en desarrollo de embriones *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ . El análisis *in vivo* muestra una reducción de  $\sim 15\%$  en el espesor de la corteza cerebral en embriones *c-fos*  $-/-$  de 14.5 días de gestación comparado a los embriones *c-fos*  $+/+$ , lo cual se relaciona con una disminución en el número de células diferenciadas y un incremento en la muerte celular por apoptosis en la zona ventricular. No se observaron diferencias en la tasa de mitosis celular, aunque el ángulo de división mitótico resulta ser predominantemente vertical en los embriones *c-fos*  $-/-$ , sugiriendo una menor tendencia de las NSPCs *c-fos*  $-/-$  a diferenciar. Al evaluar el rol molecular de c-Fos en términos de su actividad como factor de transcripción y como activador de la síntesis de lípidos, a partir de extractos de la corteza cerebral en desarrollo, se encuentran diferencias en el contenido y composición del factor de transcripción AP-1, sin observar cambios significativos en la marcación de fosfolípidos. Los resultados obtenidos permiten postular a c-Fos como una proteína que, por medio de su función nuclear como factor de transcripción, participa en la regulación de la neurogénesis embrionaria.

# ABREVIATURAS

## ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AMPc: Adenosina monofosfato cíclico
- AP-1: Proteína Activadora-1
- ARE: Elemento de respuesta a agentes anti-oxidantes
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- ATF: Factor de transcripción activador
- BD: Dominio Básico
- BMP: Proteína morfogénica de hueso
- BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina
- bZIP: Dominio de cremallera de leucina básico
- CBP: Proteína de unión a CREB
- CP: Plato Cortical
- CREB: Proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc
- c-Ser: Proteína tirosina quinasa CSK
- DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
- DXC: Doblecortina
- EdU: 5-Etínil-2'-desoxiuridina
- EGF: Factor de crecimiento epidermal
- FBJ-MSV: Virus de sarcoma murino Finkel-Biskis-Jinkins
- FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
- GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
- GLAST: Transportador aspartato-glutamato
- H3P: Histona 3 fosforilada
- <sup>3</sup>H-T: Timidina marcada con hidrógeno radioactivo
- IEG: Gen de expresión inmediata
- IL-2: Interleucina 2
- INM: Migración nuclear intercinética
- IPCs: Células progenitoras intermedias
- IZ: Zona Intermedia
- ko: knock-out
- MAF: Fibrosarcoma musculoaponeurótico
- MAP-2: Proteína asociada a microtúbulos 2

MARES: Elementos de respuesta al factor MAF

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NS: Neuroesfera

NSC: Célula Madre Neural

NSPCs: Células Madres/Progenitoras Neurales

<sup>32</sup>P-ATP- $\gamma$ : Adenosina Trifosfato marcada en el grupo fosfato gamma con fósforo radioactivo

PBS: Tampón fosfato salino

PFA: Para-formaldehído

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI: Ioduro de Propidio

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

RE: Retículo Endoplásmico

RGC: Células Radiales Gliales

SFB: Suero Fetal Bovino

SNC: Sistema Nervioso Central

SVZ: Zona Sub-ventricular

TC-PTP: Proteína tirosina fosfatasa de las células T

TGF $\alpha$ : Factor de crecimiento transformante  $\alpha$

TGF $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

TRE: Elemento de respuesta a TPA

5'UTR: Región no traducible 5'

UV: Ultra-violeta

VZ: Zona Ventricular

*wt*: wild-type

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

### - ASPECTOS GENERALES DE LA PROTEÍNA c-Fos

El término *fos* fue inicialmente utilizado para referirse al oncogén codificado por el virus Finkel-Biskis-Jenkins (FBJ-MSV), responsable de generar el sarcoma osteogénico murino; posteriormente fue descrita la versión no patológica de éste oncogén: el proto-oncogén *c-fos*. Este proto-oncogén se encuentra localizado en el cromosoma 12 del genoma de ratón (*Mus musculus*) y codifica para una proteína de 380 aminoácidos (c-Fos). c-Fos, junto a las proteínas Fra-1, Fra-2, FosB y  $\Delta$ FosB (éstas últimas dos generadas por splicing alternativo), constituyen la familia de proteínas Fos.

La primera función descrita para c-Fos fue la de regular la expresión de diversos genes blancos mediante su participación en la formación del factor de transcripción dímérico AP-1 (AP-1: activator protein 1). Mediante esta función nuclear que es dependiente de diversos factores, entre ellos la composición del dímero AP-1, c-Fos participa en diversos procesos celulares como proliferación, apoptosis, diferenciación y transformación oncogénica (Angel and Karin 1991; Thomas, Sunter et al. 2000). Con el tiempo se describió una nueva función para c-Fos (independiente de su función nuclear) que es su capacidad de asociarse a las membranas del retículo endoplásmico y activar enzimas claves de la vía de síntesis de lípidos, incrementando la tasa de la misma (Bussolino, Guido et al. 2001; Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. 2011). A través de su rol como activador en la vía de síntesis de lípidos, c-Fos también participa en la regulación de eventos de proliferación y diferenciación celular (Gil, Bussolino et al. 2004).

### 1- Expresión de *c-fos*

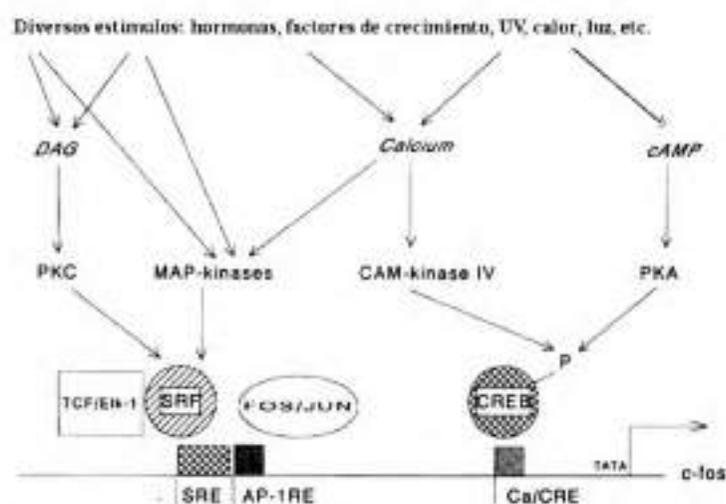
En la mayoría de los tipos celulares, la expresión de *c-fos* se encuentra finamente regulada y sólo se encuentran niveles elevados de c-Fos durante períodos cortos de tiempo (Morgan and Curran 1988), ya que su expresión continua o desregulada puede conducir a transformación oncogénica en algunos tipos celulares (Miller, Curran et al. 1984; Lee, Lin et al. 1988; Holt 1992; Miao and Curran 1994).

Dependiendo del tipo celular, diversos estímulos pueden activar la expresión de *c-fos*, incluyendo hormonas, factores de crecimiento y diferenciación (EGF, FGF, NGF, PDGF), citoquinas (TGF $\beta$ ), iones metálicos (potasio, bario), inóforos de calcio, ésteres

de forbol (TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), neurotransmisores, radiación UV, calor, shock eléctrico, luz, entre otros (Distel and Spiegelman 1990; Caputto and Guido 2000; Ting, Huang et al. 2014; Wright, Hollis et al. 2015). La inducción de la expresión de *c-fos* ocurre en forma rápida y transitoria, se inicia dentro de los 5 minutos posteriores al estímulo y se mantiene por 15-20 minutos (Greenberg, Greene et al. 1985). El ARN mensajero (ARNm) de *c-fos* se acumula y alcanza su pico máximo a los 30-45 minutos post-estímulo (Muller, Bravo et al. 1984; Bussolino, Guido et al. 2001), luego de éste tiempo los niveles de ARNm disminuyen rápidamente ya que los mismos presentan una vida media relativamente corta de 12 minutos. La síntesis de la proteína c-Fos ocurre luego de la transcripción de su ARNm, presentando un tiempo de vida media de 1-2 horas (Curran, Miller et al. 1984). Esta expresión de c-Fos se observa en presencia de inhibidores de la síntesis proteica, sugiriendo que las proteínas necesarias para su síntesis están presentes en células no estimuladas y son activadas por modificaciones post-traduccionales. Este rasgo clasifica a *c-fos* como un gen de expresión inmediata temprana (por sus siglas en inglés IEG: immediate early gen) (Curran and Morgan 1987).

Los estímulos mencionados anteriormente que inducen la expresión de c-Fos, desencadenan vías de transducción de señales mediadas por diversas quinasas (Nishizuka 1984; Riabowol, Gilman et al. 1988), las cuales convergen en la activación de proteínas que regulan la expresión de *c-fos* a través de elementos regulatorios localizados en la posición 5' de su región no traducible (por sus siglas en inglés 5'UTR: 5' untranslated region) (Figura 1) (Montminy, Sevarino et al. 1986; Prywes and Roeder 1987).

Si bien se trata de un IEG, su expresión sostenida ha sido observada durante el desarrollo normal de diversos órganos y tejidos. Durante el desarrollo temprano de ratones, se reportó una expresión sostenida y elevada de *c-fos* principalmente en tejidos extraembrionarios (placenta y tejido amniótico) (Muller, Slamon et al. 1982). Esta expresión se extiende (aunque en niveles más bajos) a otros tejidos en desarrollo como hígado (debido a su actividad hematopoyética), células sanguíneas circulantes, tejido óseo y cartilaginoso, piel y sistema nervioso central (SNC) (Caubet 1989). En el adulto, la expresión de c-Fos se encuentra limitada a tejidos en remodelación (tejido óseo, piel), tejidos con activo recambio celular (sistema hematopoyético) (Panterne, Hatzfeld et al. 1992) y a determinadas regiones del cerebro luego de algún tipo de estímulo externo (Morgan and Curran 1991).

Figura 1. Diagrama de la activación de la expresión de *c-fos*.

Se representan algunos de los elementos regulatorios localizados en la posición 5' de la región no traducible (5'UTR) de *c-fos*: elemento de respuesta a Calcio y AMPc (Ca/CRE: Calcium cAMP response element), elemento de respuesta a suero (SER: serum response element) y el sitio de unión a AP-1 (AP-1RE). El factor de respuesta a suero (SRF), el complejo TCF/Elk-1 y la proteína de unión al sitio Ca/CRE (CREB: cAMP response element binding protein) son blancos de diferentes sistemas de traducción de señales, incluyendo proteína quinasa A y C (PKA y PKC), quinasas dependientes de calcio-calmodulina (CaM kinase) y quinasas activadas por mitógenos (MAP-kinase).

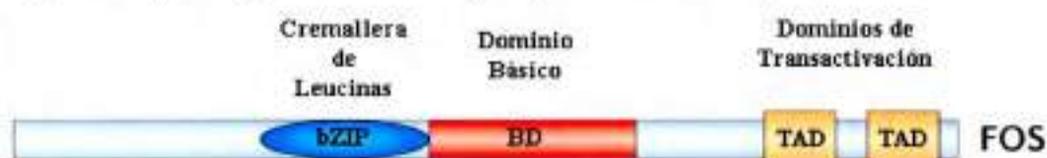
Modificado de "c-Fos as a transcription factor (re)view from a functional map" Krisztina J Kavács, *Neurochemistry*, 1998.

## II- Estructura de la proteína c-Fos

*c-Fos* es una proteína de 380 aminoácidos (aa), que presenta en su estructura dos regiones principales: un dominio de cremallera o cierre de leucinas (bZIP) involucrado en la heterodimerización con proteínas de la familia Jun, y un dominio básico (BD: basic domain) que constituye el sitio de unión al ADN cuando se encuentra formando dímeros AP-1 (Figura 2). Estos dominios son altamente conservados dentro de la familia de proteínas Fos (Wisdom and Verma 1993), mientras que los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminal presentan un menor grado de homología (15%-30%) dentro de ésta familia.

El extremo C terminal de *c-Fos* presenta dominios de transactivación, los cuales se encuentran presentes en FosB pero ausentes en las proteínas Fra-1 y Fra-2. Estas porciones de la proteína se encuentran directamente involucradas en su función como activador transcripcional a través de la formación de múltiples contactos con los componentes de la maquinaria transcripcional, estabilizando el complejo de pre-iniciación de la transcripción y/o facilitando su formación.

Figura 2. Esquema representativo de los principales dominios de la proteína c-Fos.



### III- Modificaciones post-traduccionales de c-Fos

Una vez sintetizada la proteína c-Fos puede ser blanco de numerosas modificaciones post-traduccionales como por ejemplo fosforilación, reacciones de óxido reducción, o-glicosilación y sumoilación.

El patrón de fosforilación de la proteína c-Fos es complejo, ocurre sobre diversos sitios (serina (Ser), treonina (Tre) o Tirosina (Tyr)), dependiendo del tipo de estímulo y del contexto celular. Se ha reportado que la región comprendida entre los aminoácidos 58-139 es sustrato de fosforilación por la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC) y p34cdc2; mientras que la región comprendida entre los aminoácidos 321-380 sólo es fosforilada por la PKA y p34cdc2 (Anderson 1994). Ciertos patrones de fosforilación sobre los dominios de transactivación de c-Fos incrementan su capacidad como activador transcripcional. Esto ha sido observado en eventos tanto *in vivo* como *in vitro* tras el estímulo con luz UV, el cual desencadena una cascada de señales intracelulares que activan a p38MAPK (Tanos, Marinissen et al. 2005). Algo similar fue observado tras la activación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (por sus siglas en inglés Erk's: extracellular signal regulated kinases) (Murphy, Smith et al. 2002; Monje, Hernandez-Losa et al. 2005). Por otro lado, en nuestro laboratorio encontramos que c-Fos también puede ser fosforilado sobre los residuos tirosina (Tyr) 10 y 30 de su extremo N terminal, modificando su función como activador de la síntesis de lípidos (Ferrero, Velazquez et al. 2012). La fosforilación de c-Fos en dichos residuos impide su asociación a las membranas del retículo endoplásmico (RE) pero cuando se encuentra de-fosforilado, se asocia a las membranas del RE y activa la síntesis de lípidos. La quinasa c-Src es la encargada de fosforilar los residuos Tyr de c-Fos, mientras que la fosfatasa TC-PTP actúa de-fosforilando los mismos y permitiendo su asociación al RE.

Otras modificaciones pueden repercutir en forma negativa sobre la función de c-Fos como es el caso de la sumoilación. Las tres isoformas de la proteína SUMO pueden actuar sobre el residuo lisina 265 de c-Fos, disminuyendo su actividad transcripcional debido a una asociación de la proteína sumoilada a la fracción insoluble del núcleo (Bossis, Malnou et al. 2005).

c-Fos es una proteína con un tiempo de vida media relativamente corto de aproximadamente 1-2 horas, lo cual se debe a que los estímulos extracelulares que inducen su activación y expresión, también incrementan su degradación por parte del proteosoma (Salvat, Jariel-Encontre et al. 1998), por una vía tanto dependiente como independiente de ubiquitinación (Bossis, Ferrara et al. 2003). Esta degradación de c-Fos depende de mecanismos estabilizantes y desestabilizantes que operan simultáneamente sobre sus extremos N y C terminal.

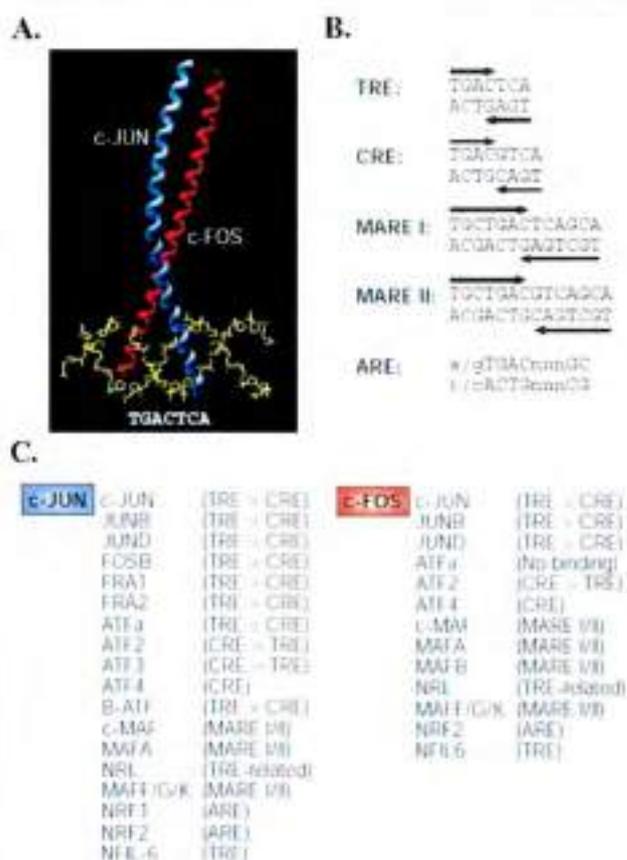
### - c-Fos COMO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN

El factor de transcripción AP-1 fue descrito inicialmente como un complejo proteico capaz de activar la expresión de genes que responden al estímulo iniciado por ésteres de fòrbol (Angel, Imagawa et al. 1987). El aislamiento de dicho complejo fue realizado mediante cromatografía de afinidad; a través de ensayos de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, se logró purificarlo y demostrar su capacidad de interactuar con promotores que presentan la secuencia de reconocimiento para el mismo (Lee, Mitchell et al. 1987). Ensayos de inmunoprecipitación y transcripción *in vitro* permitieron determinar que dicho complejo se encontraba formado principalmente por la proteína c-Fos (Chiu, Boyle et al. 1988; Sassone-Corsi, Lamph et al. 1988) y c-Jun (Halazonetis, Georgopoulos et al. 1988), aunque con el correr de los años se identificaron otras proteínas capaces de formar dicho complejo (Nakabeppu, Ryder et al. 1988; Nakabeppu and Nathans 1991; Piu, Aronheim et al. 2001). Si bien algunos trabajos sostienen que el complejo AP-1, formado por las proteínas c-Fos y c-Jun, no resulta estable en solución (Del Boca, Caputto et al. 2005), otros estudios muestran mediante ensayos de transferencia de energía entre fluorocromos (FRET) que ambas proteínas pueden interactuar y formar el dímero AP-1 en ausencia de ADN (Rauscher, Voulalas et al. 1988), aunque en presencia del mismo la estabilidad del dímero aumenta significativamente (Kohler and Schepartz 2001).

Actualmente, el factor de transcripción AP-1 se define como un homo- o heterodímero formado por proteínas pertenecientes a las familias Jun, Fos, ATF (por sus siglas en inglés ATF: activating transcription factor), JDP (por sus siglas en inglés: Jun dimerization protein) o MAF (por sus siglas en inglés MAF: musculoaponeurotic fibrosarcoma) (Figura 3A). Diferentes combinaciones de homo- y heterodímeros generan una gran variedad de factores tipo AP-1 que difieren en su afinidad por sus genes blanco.

La secuencia consenso de reconocimiento para el complejo AP-1 es TGACTCA (secuencia TRE: TPA-responsive element), inicialmente identificada en el gen de la metaloproteínasa 1 (MMPI) (Angel and Karin 1991). Existen otras secuencias que pueden ser reconocidas por el complejo AP-1 (Figura 3B) (Nakabeppu and Nathans 1989; Seldeen, McDonald et al. 2009). La afinidad de unión por una misma secuencia AP-1 varía dependiendo de las regiones flanqueantes a la misma. Esto puede deberse a que estas secuencias estabilizan el complejo ADN-proteína (por contacto directo con la proteína) o, por el contrario, ciertas secuencias pueden disminuir la afinidad de unión entre el complejo AP-1 y el DNA (por impedimento estérico) (Ryseck and Bravo 1991). Asimismo diferentes dímeros AP-1 varían en su estabilidad y en su afinidad de unión a sus genes blanco (Figura 3C) (Eferl and Wagner 2003; Verde, Casalino et al. 2007; Seldeen, Deegan et al. 2011).

c-Fos, como los otros miembros de su familia, hetero-dimeriza con proteínas de la familia Jun (c-Jun, JunB, JunD) (Nakabeppu, Ryder et al. 1988), pero no es capaz de formar homodímeros como si sucede con las proteínas de la familia Jun. No existen diferencias en la capacidad de los miembros de la familia Fos para formar dímeros con la familia Jun aunque la estabilidad de los distintos complejos varía (Ryseck and Bravo 1991; Seldeen, Deegan et al. 2011). c-Fos también puede hetero-dimerizar con ATF-4 (Hai and Curran 1991) y CBP (por sus siglas en inglés CBP: cAMP response element-binding protein) (Hoeffler, Lustbader et al. 1991).



**Figura 3. Factor de transcripción AP-1.**

A. El factor de transcripción AP-1 es un dímero (homo o hetero) formado por diferentes familias de proteínas, las cuales interaccionan entre sí por medio de sus dominios b-ZIP. Estos dímeros reconocen su secuencia consenso en el promotor o en la región activadora de diferentes genes blanco. El dímero c-Jun/c-Fos es el principal complejo tipo AP-1. B. El principal elemento de reconocimiento para el factor AP-1 es el elemento de respuesta a ésteres de forbol (TRE) pero diferentes dímeros pueden unirse en forma preferencial a distintos elementos como son: el elemento de respuesta a AMPc (CRE), el elemento de reconocimiento a MAF (MAREs) y el elemento de respuesta a antioxidantes (ARE). C. Diferentes partners o parejas de c-Jun y de c-Fos y los elementos de respuesta que estos dímeros unen.

Modificado de "AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis" de Robert Erfel y Erwin F Wagner, *Nature*, 2003.

## I- Rol de c-Fos durante la proliferación

Diversos son los hallazgos que involucran a *c-fos* en esta función:

- Su expresión es rápidamente inducida en respuesta a diversos mitógenos como son EGF, FGF, PDGF, entre otros (Kruijer, Cooper et al. 1984; Treisman 1985; Price, Hill et al. 1996; Wang, Falasca et al. 1998).
- Regula la expresión de genes involucrados en la proliferación celular, como es el caso de TGF $\alpha$ , TGF $\beta$  e IL-2 (Muegge, Williams et al. 1989; Birchenall-Roberts, Ruscetti et al. 1990).
- El contenido de su ARNm es menor en células arrestadas (en estado de quiescencia) que en células en crecimiento (Curran, Bravo et al. 1985; Bussolino, Guido et al. 2001).
- Su expresión de-regulada (como también sucede para el caso de c-Jun) conduce a transformación neoplásica (Schuermann, Neuberg et al. 1989; Peng, Zeng et al. 2015).

- El bloqueo de su función y/o expresión conduce a una inhibición de la síntesis de ADN y de la proliferación celular en fibroblastos en cultivo (Riabowol, Vosatka et al. 1988).
- El tratamiento de cultivos celulares con agentes oncogénicos (scr, H-ras, raf) incrementa la actividad AP-1 (Imler and Wasylyk 1989; Jeffy, Hockings et al. 2005).

## II- Rol de c-Fos en apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular regulado, caracterizada por cambios morfológicos específicos como son encogimiento celular, condensación de la cromatina nuclear y fragmentación celular con formación de cuerpos apoptóticos. Este proceso fisiológico parece estar regulado por proteínas que participan en eventos de proliferación y diferenciación. En el caso de *c-fos* se ha observado en distintos sistemas experimentales que su expresión induce apoptosis (Colotta, Polentarutti et al. 1992; Wu, Chang et al. 1993; Zhang, Zhang et al. 2007), aunque existen otros estudios que lo asocian a un rol anti-apoptótico (Suda, Itoh et al. 2014; Bai, Mao et al. 2015). Como sucede para otras funciones, el efecto específico de c-Fos en este evento celular parece depender de diversos factores: su partner o pareja en el complejo AP-1, el tipo celular involucrado, las modificaciones post-traduccionales del complejo que afectan su función activadora o represora, la presencia de otras proteínas que modifiquen su función, etcétera; en definitiva es el contexto celular el que determinará cómo será la regulación final de c-Fos sobre la apoptosis.

## III- Rol de c-Fos en la tumorigénesis

El factor de transcripción AP-1 puede tener una función anti-oncogénica, por inducción de apoptosis, o puede ser oncogénico por la generación de señales de supervivencia. Muchas de las proteínas AP-1 (como c-Fos, FosB y c-Jun) pueden transformar células *in vitro* al activar la expresión de genes involucrados en dicho proceso, ya que presentan potentes dominios de transactivación (Jochum, Passegue et al. 2001). Para el caso de c-Fos, su sobre-expresión en ratones causa formación de osteosarcoma por transformación de condroblastos y osteoblastos (Grigoriadis, Schellander et al. 1993). Por su lado, c-Jun estaría involucrado en el desarrollo de tumores de piel e hígado (Eferl and Wagner 2003), mientras que otras proteínas AP-1

tienen una débil capacidad de transformación (Fra-1 y Fra-2) o ausencia de la misma (JunB y JunD).

Se han descrito roles putativos en angiogénesis y metástasis tumoral para algunos genes blanco de AP-1. Ambos procesos requieren de la degradación de la matriz extracelular para permitir la formación de vasos sanguíneos y la migración celular, respectivamente. Dímeros AP-1 que contienen c-Fos, son capaces de regular la expresión de metaloproteinasas tipo 1 y 3 (MMP1 y MMP3) (Hu, Mueller et al. 1994), de proteasas del sistema activador del plasminógeno y uroquinasa (Kustikova, Kramerov et al. 1998) y del factor angiogénico VEGF-D (factor D de crecimiento vasculo endotelial) (Marconcini, Marchio et al. 1999).

Dos de las características más importantes de los tumores malignos es su capacidad invasiva y la transición epitelio-mesenquimal (por sus siglas en inglés EMT: epithelial mesenchymal transition). c-Fos y c-Jun pueden inducir dicha transición al generar una pérdida de la polaridad celular en células epiteliales mamarias (Reichmann, Schwarz et al. 1992). Por otro lado, la importancia de c-Fos en la invasión tumoral ha sido demostrada *in vivo*, ya que la progresión de papilomas a carcinoma de células escamosas invasivas (inducida químicamente) se encuentra imposibilitada en ratones deficientes en c-Fos (Sacz, Rutberg et al. 1995).

#### IV- Rol de c-Fos en diferenciación

Además de su participación en eventos de proliferación, apoptosis y transformación oncogénica, diversos hallazgos demuestran una implicancia de c-Fos en la diferenciación de algunos tipos celulares. Los primeros indicios de su participación en esta función fueron observados en la línea de células madre de teratocarcinoma de ratón (F9) en las cuales la sobre-expresión o inhibición de *c-fos* afectaba la diferenciación celular (Muller and Wagner 1984). Posteriormente aparecieron otros ejemplos que involucran a c-Fos en los siguientes eventos:

- Diferenciación de adipocitos (Abbott and Holt 1997)
- Diferenciación de osteoclastos (Matsuo, Owens et al. 2000)
- Diferenciación de condrocitos (Thomas, Sunters et al. 2000)
- Diferenciación de células de leucemia mieloide (U937) a macrófagos (William, Wagner et al. 1990)

- Diferenciación neuronal de células de feocromocitoma de ratas (PC12) (Gil, Bussolino et al. 2004; Eriksson, Taskinen et al. 2007)
- Maduración de células dendríticas (Dunand-Sauthier, Santiago-Raber et al. 2011)

Dos son los factores principales que dificultan determinar el rol exacto de *c-Fos* en los eventos de diferenciación mencionados. Por un lado el factor de transcripción AP-1 presenta una extrema complejidad determinada por: la variedad en su composición, las diferentes modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir, la influencia de otros factores sobre su función, la diferencia de afinidad que presenta por sus secuencias blanco y la posibilidad de redundancia en la regulación de la expresión de ciertos genes. Por otro lado la expresión tanto de *c-fos* como de las otras proteínas tipo AP-1 puede variar a medida que la diferenciación transcurre, modificando la cantidad de cada factor. Asimismo, la posibilidad de la participación de *c-Fos* como activador de la síntesis de lípidos en los eventos de diferenciación complica el estudio de su rol en este proceso.

### - *c-Fos* COMO ACTIVADOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS

Los lípidos (fosfolípidos, glicolípidos y colesterol) junto a las proteínas, son los componentes esenciales de las membranas biológicas y son sintetizados a nivel del Retículo Endoplásmico (RE) pudiendo ser modificados en las membranas del Golgi. Los procesos celulares que demandan alta tasa de biogénesis de membrana celular (como proliferación y diferenciación) requieren un alto índice de síntesis de lípidos.

Además de su función nuclear (donde regula la expresión de genes blanco AP-1), *c-Fos* presenta una función citosólica, independiente de su función nuclear, mediante la cual activa la síntesis de lípidos. Este rol ha sido observado en diversos procesos celulares tanto normales como patológicos, entre los que cabe mencionar:

- En células ganglionares y foto-receptoras de la retina de pollos, luego de su estimulación con luz (Guido, de Arriba Zerpa et al. 1996; Bussolino, de Arriba Zerpa et al. 1998).
- En células de fibroblasto de ratón en crecimiento (NIH-3T3) (Bussolino, Guido et al. 2001).
- En células de feocromocitoma de rata (PC12) inducidas a diferenciación (Gil, Bussolino et al. 2004; Crespo, Silvestre et al. 2008).

- En tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) y Periférico (SNP), tanto de origen murino como humano (Silvestre, Gil et al. 2010; Gil, Silvestre et al. 2012).
- En tumores humanos malignos de mama (Motrich, Castro et al. 2013).

En todos los sistemas mencionados anteriormente, tanto ensayos *in vitro* como *in vivo* evidencian la participación de c-Fos en la activación de la síntesis de lípidos, lo que sugiere la presencia de mecanismos de activación compartidos en respuesta a una gran demanda de membrana celular, independientemente del estímulo inicial (fisiológico o patológico).

La activación de la vía de síntesis de lípidos por c-Fos requiere su asociación a las membranas del RE; dicha asociación se encuentra regulada por el estado de fosforilación de residuos tirosina de c-Fos (Ferrero, Velazquez et al. 2012). Una vez asociada al RE, c-Fos incrementa la actividad de enzimas claves de la vía de síntesis de fosfolípidos (de Arriba Zerpa, Guido et al. 1999; Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. 2011) y glicolípidos (Crespo, Silvestre et al. 2008), las cuales son enzimas que traslocan o son integrales de las membranas del RE. La interacción de c-Fos con las enzimas que activa involucra a su dominio N terminal, mientras que la activación de las mismas se lleva a cabo a través de su dominio BD (Alfonso Pecchio, Cardozo Gizzi et al. 2011).

Dentro de la familia Fos, la proteína Fra-1 presenta un dominio BD altamente homólogo al de c-Fos y también se encuentra involucrada en el incremento del índice de síntesis de fosfolípidos en algunos sistemas celulares como en tumores malignos de mama (Motrich, Castro et al. 2013). Al presente se está determinando si esta activación involucra los mismos mecanismos moleculares por medio de los cuales actúa c-Fos.

## - c-Fos EN EL DESARROLLO DE RATONES

A través de experimentos de pérdida de función usando la tecnología de células madres embrionarias, se pudo comenzar a dilucidar las funciones específicas de las distintas proteínas AP-1 en el desarrollo embrionario y la organogénesis del ratón (Jochum, Passegue et al. 2001). Con respecto al desarrollo embrionario, las proteínas Fos y Jun pueden agruparse en dos categorías: aquellas que son dispensables (c-Fos, FosB, JunD) y las que son indispensables ya que su carencia resulta letal (c-Jun, JunB, Fra-1).

Los estudios de *c-fos* durante el desarrollo fueron realizados utilizando ratones que carecen de los dos alelos funcionales para este gen (animales *knock-out (ko)* o *c-fos* *-/-*) (Johnson, Spiegelman et al. 1992; Wang, Ovitt et al. 1992). Estos animales, si bien resultan viables, sólo sobreviven hasta un máximo de 7 meses de edad (la muerte se produce por fallas multi-orgánicas) y presentan una variedad de diferencias fenotípicas respecto a la condición normal (animales *wild-type (wt)* o *c-fos* *+/+*), que se describen a continuación:

- Los animales *c-fos* *-/-* presentan una marcada pérdida de la viabilidad asociada al nacimiento, ya que sólo el 40% de ellos sobrevive a este evento (Johnson, Spiegelman et al. 1992). Asimismo los fetos *ko* (como así también sus placentas) presentan a los 15.5 días de desarrollo embrionario (E15.5) un menor peso en comparación a la condición *wt*. Sin embargo las diferencias en peso corporal ya no se observan a los 5 días posteriores al nacimiento (P5).
- Aquellos animales *c-fos* *-/-* que sobreviven al nacimiento son indistinguibles de sus hermanos *wt* hasta los 10 días post-natales (P10). A partir de esta edad, su crecimiento empieza a ser más lento y, a las 5 semanas de vida, presentan 1/3 o la mitad del tamaño de sus contrapartes normales junto a la aparición de alteraciones en diversos sistemas:
  - A nivel óseo el fenotipo característico de estos animales involucra el desarrollo de osteopetrosis, caracterizado por defectos en el crecimiento óseo que incluyen: ausencia de brote dentario, desarrollo anormal de los huesos largos con una desorganización en la epifisis y la metáfisis, huesos corticales delgados y poco desarrollados y osificación de la médula ósea. Este fenotipo evidencia el rol de *c-Fos* en la diferenciación de condrocitos y osteocitos, lo cual resulta en una falla de la resorción ósea y de cartilago por parte de los osteoclastos.
  - Si bien el número de eritrocitos se encuentra en el rango normal, hay una reducción en un 75% en el número de linfocitos (en 4 de 5 animales mutantes). Se observa hematopoyesis extra-medular a nivel del bazo.
  - A nivel del sistema reproductivo se observa un desarrollo anormal de los folículos ováricos en las hembras y de los túbulos seminíferos en los machos. Estos últimos presentan una espermatogénesis anormal y una reducción en la motilidad de los espermatozoides maduros. Estas anomalías sumado al comportamiento sexual alterado que presentan, resulta en una pérdida de la fertilidad en estos animales (Johnson, Spiegelman et al. 1992).



El cambio fenotípico más llamativo que presentan los animales *c-fos* *-/-* es la marcada reducción en el tamaño corporal final que alcanzan en relación a sus hermanos *wt* de camada. Teniendo en cuenta la participación de c-Fos en eventos de proliferación y de crecimiento celular (tanto como factor de transcripción y como activador de la síntesis de lípidos), estas diferencias podrían ser determinadas por un menor número de células totales que constituyen los órganos del animal y/o un menor tamaño de las mismas.

### **I- Alteraciones a nivel del SNC en animales *c-fos* *-/-***

Los animales *c-fos* *-/-* presentan una serie de alteraciones en su comportamiento. Las primeras observaciones indican que tienen una respuesta disminuida a estímulos externos pero al mismo tiempo resultan ser más hiperactivos que sus contrapartes normales (Johnson, Spiegelman et al. 1992). Resultados obtenidos a partir de ensayos en laberinto de agua de Morris (Morris water task) demostraron que los animales *c-fos* *-/-* presentan alteraciones en el aprendizaje y la memoria a largo plazo sin modificaciones en el aprendizaje de tareas simples (Paylor, Johnson et al. 1994)

El comportamiento sexual de los animales machos *ko* también es diferente al de los animales *wt*, ya que presentan una menor tendencia a montar a las hembras en estro (hembras receptivas) (Baum, Brown et al. 1994).

El estado de alerta o vigilia de los ratones *c-fos* *-/-* es mayor que el de los animales *c-fos* *+/+*, es decir que permanecen mayor tiempo despiertos y presentan una reducción en el tiempo del sueño de ondas lentas o SWS (por sus siglas en inglés: slow wave sleep,) (Shiromani, Basheer et al. 2000).

Las alteraciones mencionadas sugieren que c-Fos participaría en diversas cascadas de traducción de señales modificando la expresión de genes involucrados en la génesis y/o persistencia de los eventos antes mencionados, por lo que su ausencia impediría que los mismos ocurran de forma normal (Watanabe, Johnson et al. 1996; Flavell and Greenberg 2008). Alternativamente, su actividad como regulador del índice de síntesis de membrana, también podría estar involucrado. Asimismo, el desarrollo normal del SNC podría encontrarse alterado en animales *c-fos* *-/-*, conduciendo a cambios estructurales en determinadas áreas del cerebro.

## - EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

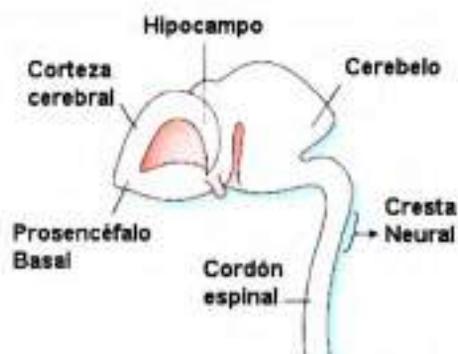
El sistema nervioso central (SNC) está constituido por dos poblaciones celulares principales: las células nerviosas (neuronas) y las células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales). Estas poblaciones celulares se originan a partir de una misma célula, de origen glial, denominada célula radial glial (RGC: Radial Glial Cell), la cual es considerada la célula madre neural (NSC: neural stem cell) encargada de generar células neuronales y gliales a lo largo del desarrollo y en la etapa post-natal. Si bien existen diversas acepciones, vamos a considerar a la NSC como la célula progenitora primaria presente a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo a partir de la cual se inicia el compromiso de linaje hacia la generación de neuronas o células gliales diferenciadas. Estos linajes celulares finales no siempre se generan por división directa de las NSCs sino que también pueden ser generados a través de uno o múltiples estadios de amplificación, los cuales implican la participación de precursores celulares con un potencial de diferenciación más restringido que el de la célula madre original. Nos referiremos a esta población de células amplificadoras en tránsito (transit amplifying cells) derivadas de la NSCs como células progenitoras intermedias (IPCs: intermediate progenitor cells). Las IPCs pueden generar neuronas (nIPCs) o células gliales, tanto astrocitos (aIPCs) como oligodendrocitos (oIPCs). Resulta interesante aclarar que el término glial se aplica para referirse tanto a la población de células progenitoras (RGCs) como a la población celular diferenciada (astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales).

Desde los inicios del desarrollo se observa la presencia de diversas poblaciones de células madres neurales distribuidas a lo largo de diferentes regiones del sistema nervioso embrionario [cordón espinal (Kalyani, Piper et al. 1998), telencéfalo (Qian, Shen et al. 2000), cerebelo (Laywell, Rakic et al. 2000)] (Figura 4).

**Figura 4. Sitios de neurogénesis en el embrión.**

Algunos de los sitios principales en los cuales se ha descrito la presencia de células madres neurales durante el desarrollo embrionario.

Modificado de "The development of neural stem cells" Sally Temple, *Nature*, 2001.



## I- Revisión general del proceso de la neurogénesis en la corteza cerebral embrionaria (telencéfalo dorsal)

En el caso del SNC, la mayor parte del conocimiento acerca de la neurogénesis se obtuvo a partir del estudio de la corteza cerebral en desarrollo o neocorteza (a nivel del telencéfalo dorsal o pallium), y estos conocimientos han sido posteriormente extendidos al resto de las regiones neurogénicas (Temple 2001; Urban and Guillemot 2014). La formación de la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario implica la concomitancia de dos procesos coordinados: neurogénesis y migración (Kriegstein 2005).

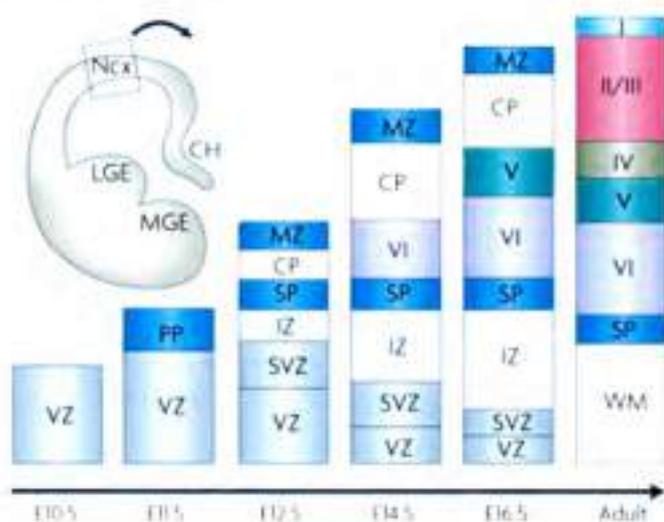
El proceso de la neurogénesis en los roedores comienza alrededor del día 10-11 de gestación (E10-E11), cuando las células neuroepiteliales del epitelio pseudoestratificado de origen ectodermal que lindan con la superficie del tubo neural comienzan a adquirir rasgos asociados al de células gliales, las cuales van a ocupar la región conocida como zona ventricular (VZ: ventricular zone).

En el telencéfalo dorsal embrionario las neuronas destinadas a formar las distintas capas del plato cortical (CP: cortical plate, región precursora de la corteza cerebral adulta) son generadas en dos regiones proliferativas. Una de ellas es la VZ, un epitelio pseudo-estratificado que linda con el ventrículo lateral y que constituye la región inicial en donde se generan las primeras neuronas corticales, mientras que otras neuronas son generadas en la zona sub-ventricular (SVZ), una región proliferativa que se superpone con la VZ basal y se extiende dentro de la zona intermedia (IZ).

El desarrollo de la corteza cerebral se inicia con la formación del pre-plato seguido por la aparición del CP. Como resultado del proceso de la neurogénesis, el espesor de la corteza cerebral se incrementa principalmente debido al aumento del

tamaño del CP por la adición de neuronas que migran radialmente desde la VZ y SVZ. Esta migración establece las distintas capas neuronales (6 capas para el caso de la corteza de mamíferos) mediante la migración de neuronas a lo largo de las capas previamente establecidas para así situarse en capas más superficiales. Es decir que las capas corticales más profundas (V y VI) son generadas al comienzo de la neurogénesis, mientras que las neuronas más jóvenes forman parte de las capas corticales IV, III y II (gradiente corticogénico "inside-out") (Angevine and Sidman 1961) (Figura 5). Este proceso, que tiene lugar entre los días 10 (E10) y 17 (E17) de gestación (Takahashi, Nowakowski et al. 1995), va a dar lugar a la generación de prácticamente la totalidad de las neuronas del CP.

Figura 5. Esquema de la generación de neuronas corticales a partir de los progenitores de la VZ y SVZ por un proceso "inside-out".



Las primeras neuronas generadas constituyen el pre-plato (PP), el cual luego se divide en la capa superficial llamada zona marginal (MZ) y la capa profunda llamada sub-plato (SP). El plato cortical (CP), que da lugar a las multicapas de la neocorteza (II-VI), se desarrolla entre estas dos capas (SP y MZ), de forma tal que las neuronas más jóvenes que arriban al CP deben migrar a través de las neuronas más tempranas (proceso "inside-out"). Nex: neocorteza. WM: materia blanca. IZ: zona intermedia. LGE: eminencia lateral ganglionar. MGE: eminencia ganglionar media. CH: hem cortical

Modificado de "Neuronal subtype specification in the cerebral cortex" Molyneaux BJ, et al. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007.

## II- Poblaciones celulares involucradas en la neurogénesis embrionaria

### \* El origen embrionario de las células radiales gliales (RGCs)

Como se mencionó anteriormente, la neurogénesis cortical en los ratones comienza alrededor del día 10-11 de gestación (E10-E11) momento en el cual las células neuroepiteliales (del epitelio pseudo-estratificado que linda con la superficie del tubo neural) comienzan a adquirir rasgos asociados con células gliales, originando la población de RGCs. Estas células permanecen en contacto tanto con la superficie ventricular como con la superficie pial (en contacto con la piamadre) a través de sus prolongaciones, mientras que sus cuerpos celulares permanecen retenidos en la zona ventricular (VZ), la región más próxima al ventrículo (Boulder 1970). A medida que la neurogénesis progresa, las RGCs experimentan cambios morfológicos (tales como alargamiento de sus prolongaciones) (Gadisseux and Evrard 1985) e inician la expresión de una serie de marcadores astrogliales, el transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST: astrocyte specific glutamate transporter), la proteína que une lípidos cerebrales (BLBP: brain lipid-binding protein) y tenascina C (TN-C: Tenascin C) (Campbell and Gotz 2002). Estas células también expresan una serie de filamentos intermedios que incluyen vimentina, nestina, los epítopes RC1 y RC2 (Mori, Buffo et al. 2005), y en algunas especies la proteína ácida fibrilar glial (GFAP: glial fibrillary acidic protein) (Benjelloun-Touimi, Jacque et al. 1985). Al mismo tiempo desarrollan uniones de tipo adherentes y comienzan a establecer contactos con las células epiteliales de la neo-vasculatura del cerebro en desarrollo (Gotz and Huttner 2005). Sin embargo, las RGCs también conservan algunas de las características de las células neuroepiteliales, como por ejemplo su polaridad ápico-basal, se ubican en la superficie que linda con el ventrículo lateral y experimentan el proceso de migración nuclear intercinética (INM: interkinetic nuclear migration), manteniendo las características de un epitelio pseudoestratificado dentro de la VZ.

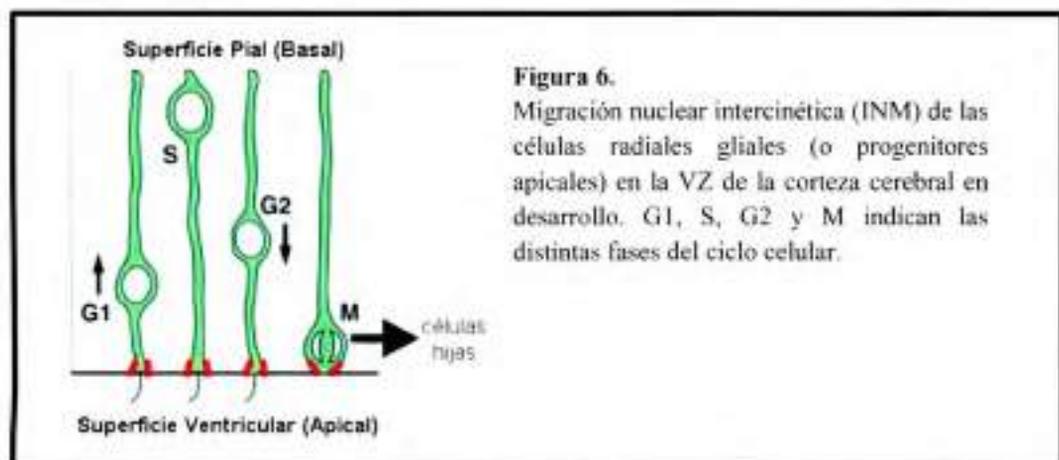
Diversos estudios en animales transgénicos han demostrado que las RGCs funcionan como células progenitoras de la mayoría (prácticamente el total) de las neuronas del SNC (Noctor, Flint et al. 2002; Malatesta, Hack et al. 2003; Anthony, Klein et al. 2004), y que su potencial neurogénico está regulado en forma dinámica, tanto desde el punto de vista temporal como espacial. Es decir que existen diferentes

subpoblaciones de RGCs que difieren principalmente en la cinética de su ciclo celular y en su potencial como célula progenitora neural.

### A. La migración nuclear intercinética en las RGCs

Una de las características más importantes de las RGCs es el comportamiento mitótico que presentan conocido como migración nuclear intercinética (INM: interkinetic nuclear migration). La INM es el proceso durante el cual el núcleo de la célula migra, entre la superficie apical y basal de una región, en forma coordinada con el pasaje a través de las distintas fases del ciclo celular, llevando a cabo la mitosis sobre la superficie apical. Es decir que durante la fase S del ciclo celular, los núcleos se encuentran alejados de la superficie ventricular, durante la fase M lindan con la superficie ventricular, y a lo largo de la fase G1 y G2 transitan entre una y otra posición (Miyata 2008) (Figura 6).

Si bien no se conoce con exactitud el significado funcional de la INM, se ha propuesto que podría regular la neurogénesis modulando la exposición de los núcleos progenitores a señales proliferativas y/o neurogénicas, como ocurre, por ejemplo, con la señalización mediada por Notch (Del Bene, Wehman et al. 2008).

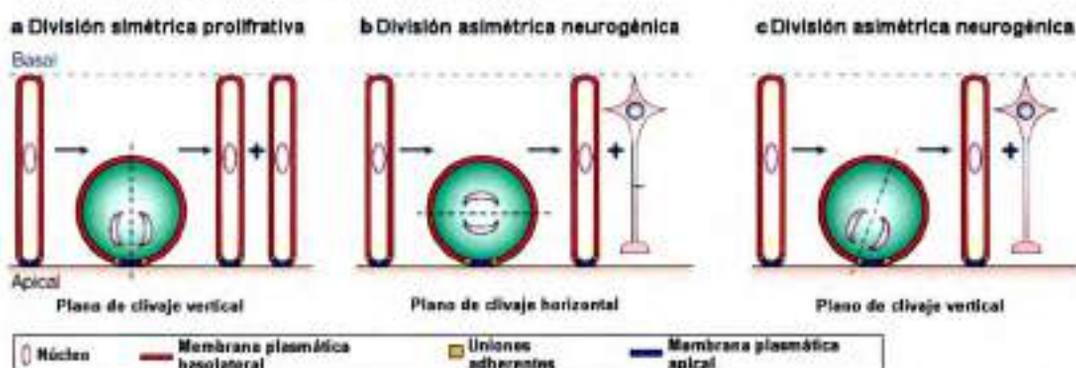


### B. Biología celular de la división mitótica de las RGCs

A lo largo de la neurogénesis, las RGCs mantienen su polaridad ápico-basal, una característica de suma importancia para definir el tipo de división celular que llevan a cabo, la cual puede ser básicamente de dos tipos: simétrica o asimétrica. Cuando la distribución de los componentes celulares hacia las dos células hijas es igual, hablamos de una división simétrica, mientras que cuando esta distribución no es equitativa, la división es de tipo asimétrica.

Un parámetro comúnmente utilizado para determinar el tipo de división celular que experimentan las RGCs es el plano de clivaje (plano que se forma entre las dos células hijas en división), el cual cuando está orientado en forma perpendicular a la superficie ventricular (plano de clivaje vertical) resulta en una división simétrica y proliferativa de las RGCs, ya que los constituyentes basales y apicales serán distribuidos equitativamente entre las dos células hijas (Figura 7a). Por el contrario, cuando el plano de clivaje es paralelo a la superficie ventricular (plano de clivaje horizontal) resulta en una división asimétrica y neurogénica de las RGCs, porque los constituyentes apicales serán heredados por una de las células hijas mientras que los componentes basales serán heredados por la otra célula hija (Chenn and McConnell 1995) (Figura 7b). Sin embargo el plano de clivaje completamente horizontal es raro; es por ello que en un sentido estricto, un plano de clivaje que no es completamente vertical pero si cercano al mismo puede dar lugar a una división de tipo asimétrica y neurogénica (Figura 7c). Esto último se debe a que la definición del tipo de división celular (proliferativa/simétrica o neurogénica/asimétrica) parece estar íntimamente asociada a la herencia de los componentes apicales de la membrana plasmática (Figura 7). Existen distintos mecanismos celulares que influyen en la orientación final del plano de clivaje. Se ha demostrado que algunos factores de transcripción, como EMX2 (Heins, Cremisi et al. 2001) y PAX6 (Heins, Malatesta et al. 2002), regulan el destino de las células hijas y el modo apropiado de división celular de una manera coordinada, pero los mecanismos subyacentes a los mismos aún no han sido dilucidados.

**Figura 7. División simétrica vs División asimétrica**



La figura muestra la relación entre la polaridad apico-basal, la orientación del plano de clivaje y el tipo de división simétrica o asimétrica. **a)** Plano de clivaje vertical que resulta en una división simétrica proliferativa. **b)** Plano de clivaje horizontal que resulta en una división asimétrica neurogénica. **c)** Plano de clivaje vertical que resulta en una división asimétrica neurogénica.

Modificado de "The cell biology of neurogenesis" Gotz M, *Nature Reviews*, 2005.

La orientación del plano de clivaje de las RGCs está determinada por la posición de los polos del huso mitótico, la cual se encuentra regulada de manera muy precisa por diversos mecanismos (Kosodo, Roper et al. 2004); pequeños cambios en su posición relativo al eje ápico-basal de las RGCs es suficiente para modificar la distribución de los componentes apicales de la membrana plasmática y por lo tanto el tipo de división celular (proliferativa o neurogénica).

#### **\* Surgimiento de las células progenitoras intermedias (IPCs)**

A medida que la neurogénesis progresa, las RGCs pueden generar neuronas ya sea en forma directa o bien de manera indirecta a través de una segunda población de células progenitoras, más restringidas en su potencial de diferenciación, conocidas como células progenitoras intermedias (IPCs) o células progenitoras basales, las cuales se ubican principalmente en la SVZ (Noctor, Martínez-Cerdeno et al. 2007).

Las IPCs presentan generalmente varios procesos celulares, no contactan con la superficie pial ni ventricular, no experimentan INM, y presentan una división mitótica con un plano de clivaje paralelo a la superficie ventricular. A diferencia de las RGCs las cuales se dividen en forma predominantemente asimétrica durante el pico de neurogénesis (que ocurre en el día 14.5 de gestación (Bayer and Altman 1991)), las IPCs experimentan división de tipo simétrica para producir dos neuronas o dos IPCs (Haubensak, Attardo et al. 2004). De esta forma funcionan como una célula amplificadora en tránsito, y el número de veces que se divide varía dependiendo de la región del cerebro.

Las IPCs tienen una implicancia muy importante en el desarrollo del SNC de mamíferos y en la evolución. Esto se debe a que se ha demostrado que en el telencéfalo, a lo largo de la neurogénesis, los progenitores basales (IPCs) pueden generar el doble de neuronas que los progenitores apicales (RGCs), resultando así en la principal fuente de neuronas corticales (Haubensak, Attardo et al. 2004). De hecho la relación entre el tamaño de la SVZ y de la VZ experimenta un incremento a lo largo de la evolución (Rakic 2003).

#### **\* Población de células neuronales post-mitóticas**

A lo largo de la corteza cerebral en desarrollo existen gradientes de diferentes sustancias, tales como BMP (bone morphogenic protein) y Shh (Sonic hedgehog), que

influyen en la expresión de factores de transcripción en la población de las RGCs y de las IPCs. Estos gradientes se encuentran íntimamente asociados a la producción de diferentes tipos de neuronas (Hochstim, Deneen et al. 2008). Las poblaciones de células progenitoras (tanto RGCs como IPCs) deben detectar estos gradientes y en respuesta a ellos expresar un programa único de factores de transcripción que dispare la generación de diferentes poblaciones neuronales dentro de la corteza en desarrollo. Algunos de los factores de transcripción que han sido implicados en este proceso son: Pax6, Emx1, Gsh1, Gsh2, Er81, Sp8, Nkx2.1, Dlx1, Dlx2 y Olig2 (Long, Swan et al. 2009), los cuales, junto con otros genes pro-neurales como Ngn2 y Mash1 (Guillemot 2007), determinan el tipo celular específico generado tanto por las RGCs como por las IPCs. Es decir que un programa de expresión dinámico de factores de transcripción controla el comportamiento de las RGCs y de las IPCs en función del tiempo y del espacio.

Independientemente del tipo neuronal generado, existen una serie de marcadores celulares que se encuentran relacionados con distintos estadios de diferenciación neuronal. Entre estos marcadores cabe mencionar:

- $\beta$ III-tubulina: proteína expresada no sólo en neuronas post-mitóticas inmaduras y neuronas ya diferenciadas, sino también en algunos precursores neuronales que se dividen activamente (Lee, Tuttle et al. 1990).
- NeuN: una proteína nuclear específica de neuronas, cuya expresión se inicia en estadios terminales de diferenciación (Mullen, Buck et al. 1992).
- MAP-2: proteína del citoesqueleto, específica de neuronas que se encuentra débilmente expresada en los precursores neuronales pero, a medida que la diferenciación progresa, su expresión se hace más pronunciada (aproximadamente un día después de la expresión de  $\beta$ III-tubulina) (Dehmelt and Halpain 2005).
- Doblecortina (DCX): proteína asociada a microtúbulos, expresada en neuronas en migración y en estadios tempranos de desarrollo neuronal (Francis, Koulakoff et al. 1999).

Una vez generadas, las neuronas post-mitóticas inician un proceso de maduración que les permitirá alcanzar una estructura altamente especializada necesaria para propagar señales eléctricas o potenciales de acción y establecer los circuitos de comunicación inter-neuronales, proceso que culmina en la etapa post-natal.

### **III- Resumen de la neurogénesis en el telencéfalo dorsal (pallium) y el aporte de la neurogénesis a nivel del telencéfalo ventral (subpallium)**

Si bien el proceso de neurogénesis descrito a nivel del telencéfalo dorsal genera la mayor parte de las neuronas presentes en la neocorteza, resulta importante mencionar que existen otros sitios neurogénicos que también contribuyen con neuronas que mediante procesos migratorios van a ubicarse en esta región del cerebro. Dos grandes grupos de neuronas constituyen la neocorteza: neuronas excitatorias glutamatérgicas (células estrelladas espinosas y piramidales) e interneuronas inhibitorias GABA-(ácido  $\gamma$ -aminobutírico)-érgicas (Hensch 2005).

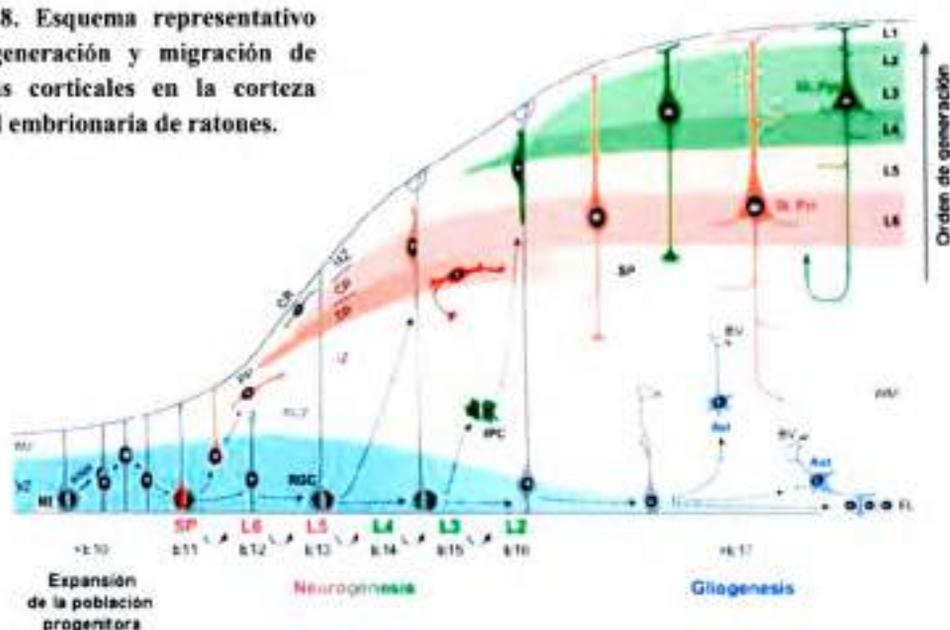
Las neuronas excitatorias glutamatérgicas constituyen la mayoría de las células de la neocorteza y proyectan sus axones estableciendo contactos dentro de la corteza pero también con regiones distantes del cerebro. Por su parte las interneuronas forman circuitos locales responsables de señales inhibitorias y, si bien sólo constituyen el 20% de las neuronas de la neocorteza, juegan un rol esencial en la modulación de las señales y la plasticidad neuronal (Markram, Toledo-Rodriguez et al. 2004).

Durante el desarrollo, las neuronas excitatorias son generadas en la VZ y la SVZ de la corteza cerebral y migran radialmente hacia el plato cortical como se describió en detalle en los puntos I y II (Figura 8).

Las interneuronas neocorticales son producidas en el telencéfalo ventral (subpallium) en desarrollo y migran tangencialmente hasta alcanzar su destino final en la neocorteza (Figura 9).

De esta manera se generan las neuronas responsables de las funciones más complejas del SNC de mamíferos, cuya integridad funcional resulta esencial en numerosos procesos como cognición y percepción sensorial, aprendizaje, memoria, etc (Tomassy, Lodato et al. 2010).

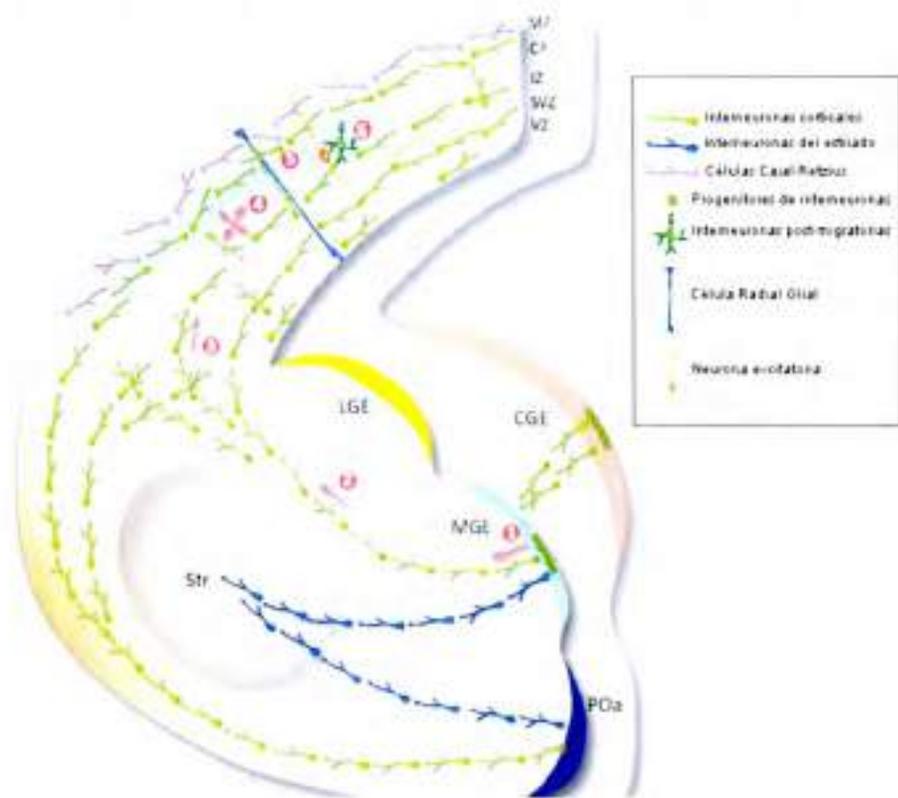
Figura 8. Esquema representativo de la generación y migración de neuronas corticales en la corteza cerebral embrionaria de ratones.



Previo al inicio de la neurogénesis, las células NE presentes en la VZ de la neocorteza en desarrollo, expanden el pool de células progenitoras mediante una división de tipo simétrica. Aproximadamente al día 11 (E11) de gestación, las células NE adquieren morfología de RGCs y, si bien continúan dividiéndose en forma simétrica, comienzan a dividirse asimétricamente para generar neuronas, las cuales migran lejos de la superficie ventricular guiadas por la prolongación basal de la RGC para alcanzar la superficie pial. Las primeras neuronas generadas se sitúan en el PP para formar el CP naciente, el cual se convertirá en las capas 2 a 6 (L2-L6) de la corteza cerebral adulta. Luego de la generación del PP, las nuevas neuronas que se incorporan lo dividen en la MZ y el SP. A medida que la neurogénesis progresa, diferentes tipos de neuronas son generadas a partir de la división asimétrica de las RGCs. Por lo tanto, las neuronas destinadas a formar el SP son generadas primero, seguidas por las neuronas de las capas 6 y 5 del CP, y finalmente se incorporan las neuronas de las capas restantes (4, 3 y 2) (proceso "inside-out"). Algunas de las células hijas de las RGCs se convierten en IPCs, las cuales se localizan lejos de la superficie ventricular y experimentan división simétrica neurogénica en la SVZ. De esta forma la actividad proliferativa de las IPCs contribuye significativamente a las capas más profundas del CP. Al final de la neurogénesis, aproximadamente al día 17 de gestación (E17), se inicia el proceso de la gliogénesis por parte de las RGCs que también darán origen a la capa de células EL (que linda con la superficie ventricular) y la población de NSCs que van a persistir en el adulto tanto en la región subgranular como en la zona sub-ventricular. NE: neuroepiteliales, PP: pre-plato, CP: plato cortical, MZ: zona marginal, SP: sub-plato, EL: endocelulares, BV: vasos sanguíneos, CR: neuronas de Cajal-Retzius, DL Pyr: capa profunda de neuronas piramidales, VZ: zona ventricular, SVZ: zona sub-ventricular, IZ: zona intermedia, UL Pyr: capa superficial de neuronas piramidales, WM: materia blanca.

Modificado de "Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex" Kwan KY, *Development*, 2012.

Figura 9: Patrón de migración de las interneuronas en el telencéfalo en desarrollo



Esquema correspondiente a un corte coronal a través del telencéfalo de ratón a los 15 días de gestación (E15). Las interneuronas derivadas de la eminencia ganglionar media (MGE, verde), el área preóptica (Poa, violeta), o la eminencia ganglionar caudal (CGE, naranja) abandonan la región proliferativa e inician su migración hacia la neocorteza en desarrollo y el cuerpo estriado (Str). En el caso de la neocorteza, las interneuronas transitan a través de la zona marginal (MZ), subplato (SP), la zona intermedia (IZ) y la zona subventricular (SVZ). Una vez finalizada la migración tangencial, las interneuronas inician una migración local hasta que alcanzan su posición final dentro del plato cortical (CP) e inician la formación de sinapsis funcionales con neuronas excitatorias específicas.

Modificado de "Decision making during interneuron migration in the developing cerebral cortex" de Guo J y Anton ES, *Trends Cell Biol*, 2014.

## - NEUROGÉNESIS EN EL ADULTO

Las NSCs presentes en el cerebro en desarrollo persisten en determinadas regiones tanto en la etapa postnatal como en la adultez, y continúan produciendo células gliales y neuronas (Alvarez-Buylla and Lim 2004; Ming and Song 2005). En el neonato

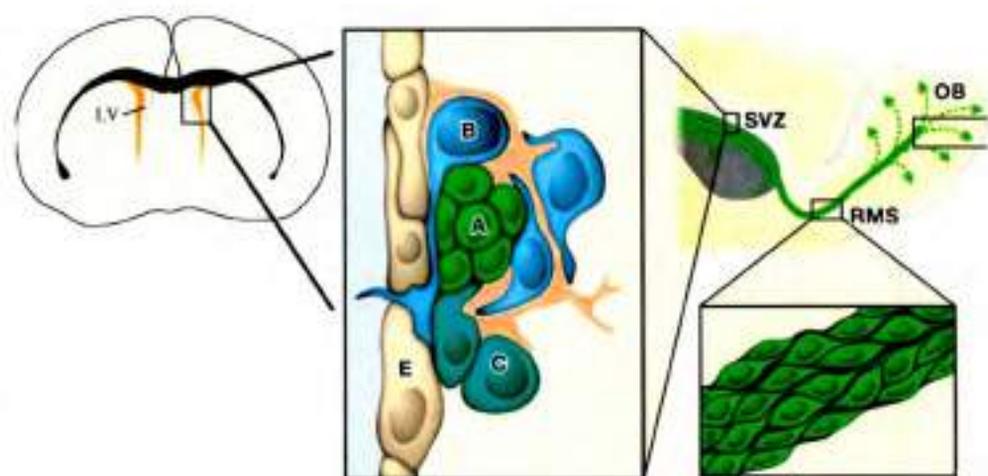
(Luskin 1993) y en el adulto (Lois and Alvarez-Buylla 1994), nuevas neuronas son generadas en la SVZ de la pared del ventrículo lateral, las cuales migran al bulbo olfatorio donde reemplazan diferentes poblaciones de interneuronas (Imayoshi, Sakamoto et al. 2008). La neurogénesis también continúa en el hipocampo, específicamente en la capa subgranular del giro dentado (Gould and Cameron 1996).

### **Células madres neurales (NSCs) en la zona sub-ventricular (SVZ)**

En los mamíferos adultos la neurogénesis ocurre principalmente en la SVZ de la pared del ventrículo lateral, una región relacionada con la SVZ embrionaria, sitio donde se localizan las IPCs durante el desarrollo temprano. La SVZ contiene NSCs relativamente quiescentes, conocidas como células B, las cuales dan lugar a las llamadas células C que proliferan activamente y funcionan como IPCs (Mirzadeh, Merkle et al. 2008). Las células C dan lugar a neuroblastos inmaduros (denominados células A) los cuales migran a través de una cadena migratoria (RMS: rostral migratory stream) hacia el bulbo olfatorio (Lois and Alvarez-Buylla 1994; Belluzzi, Benedusi et al. 2003), donde diferencian a interneuronas (Carleton, Petreanu et al. 2003) (Figura 10). A pesar de ser NSCs, las células designadas como células B presentan características ultraestructurales y marcadores de células astrogiales, incluyendo la expresión de GFAP y GLAST (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997; Colak, Mori et al. 2008), por lo que las células B también son conocidas como astrocitos de la SVZ. La naturaleza astrocítica de las NSCs presentes en la SVZ ha sido demostrada por distintos ensayos con ratones transgénicos (Doetsch, Caille et al. 1999; Morshead, Garcia et al. 2003). Las células B también retienen algunas de las características de las RGCs, ya que las mismas se localizan por debajo de las células ependimales pero presentan procesos cortos que mantienen su contacto con el ventrículo (Mirzadeh, Merkle et al. 2008; Shen, Wang et al. 2008).

Las interneuronas generadas en la SVZ de adultos se integran a circuitos existentes en el bulbo olfatorio y juegan un rol importante en algunas formas de aprendizaje y memoria relacionados a estímulos olfatorios.

Figura 10. Neurogénesis en la SVZ



Disposición de las células B, C y A (neuroblastos) en la SVZ adyacente a las células ependimales (E) que lindan con la superficie del ventrículo lateral. Los neuroblastos alcanzan el bulbo olfatorio (OB) a través de la cadena migratoria (RMS: rostral migratory stream) y experimentan cambios morfológicos y fisiológicos antes de integrarse en circuitos pre-existentes.

Modificado de "Neurogenesis in adult subventricular zone" de Alvarez Buyla A. y García-Verdugo JM, *Journal of Neuroscience*, 2002.

## - ESTUDIO *in vitro* DE LAS POBLACIONES CELULARES INVOLUCRADAS EN LA NEUROGÉNESIS

Debido a la ausencia de un marcador de superficie único y de un fenotipo morfológico claramente distinguible, las células madres neurales son definidas y estudiadas sobre la base de una serie de criterios funcionales. En un sentido estricto, estas propiedades son: su capacidad ilimitada de auto-renovación y su potencial de diferenciación (multi-potencialidad). La propiedad de auto-renovación (self-renewal) hace referencia a la capacidad de mantener su población celular a lo largo del tiempo, con las mismas propiedades celulares iniciales (sin evidencias de transformación celular), mientras que su potencial de diferenciación alude a la capacidad de diferenciar hacia determinados linajes celulares maduros: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

La caracterización *in vitro* de las células madres neurales se inicia con la disección de la región de interés (una región en donde haya sido demostrado la presencia de células que se dividen *in vivo*), y la posterior disociación de la misma hasta obtener una suspensión unicelular, la cual luego se cultiva en presencia de agentes

mitogénicos particulares. En el caso de las células madres neurales, estas pueden crecer en monocapas sobre superficies adherentes o bien en suspensión formando neuroesferas. Independientemente del tipo de cultivo utilizado, el mismo puede ser posteriormente manipulado para evaluar las propiedades de auto-renovación y multipotencialidad.

Resulta importante notar que la caracterización *in vitro* de las células madres presenta algunos inconvenientes. Por un lado su estricta definición habla de una ilimitada capacidad de auto-renovación, característica que resulta fácil definir *in vivo*: la perpetuación de una población celular a lo largo de la vida de un organismo es un criterio aceptado aunque a medida que un organismo envejece, determinadas poblaciones de células madres parece disminuir (Dulken and Brunet 2015). Sin embargo, resulta más complicado la distinción de una capacidad ilimitada de auto-renovación mediante ensayos *in vitro*, debido a que luego de tiempos prolongados de cultivo (más de diez pasajes para células madres neurales) se empiezan a observar eventos de transformación, reflejados como alteraciones en la cinética de proliferación, en la dependencia de los factores de crecimiento, en la adhesión celular y en la expresión de genes particulares (Morshead, Benveniste et al. 2002). Si bien luego de transcurrido este tiempo prolongado de cultivo (generalmente 60 días), las células pueden mantener su potencial de auto-renovación y su capacidad de diferenciación, también pueden generar tumores sólidos al ser inyectadas en ratones en forma subcutánea (Morshead, Benveniste et al. 2002), indicando que han sufrido eventos de transformación que les confirieron propiedades tumorigénicas. Las células que muestran capacidad de auto-renovación y diferenciación luego de eventos de transformación son diferentes de la población celular inicial, y por lo tanto no constituyen el mismo tipo celular. Es por ello que el estudio *in vitro* de las propiedades de las células madres neurales debe ser realizado en periodos cortos de cultivo, para así evitar cambios oncogénicos que puedan alterar sus propiedades celulares iniciales.

## **- RELACIÓN ENTRE c-Fos Y EL DESARROLLO DEL SNC**

Es generalmente aceptado que la inducción de *c-fos* en cerebros de animales adultos, refleja la actividad funcional de las neuronas (Duncan, Knapp et al. 1996; Katche, Dorman et al. 2013), ya que se trata de un proto-oncogén importante para transformar señales externas en cambios fenotípicos a largo plazo asociados con la

plasticidad neuronal. Además de estar involucrado en su funcionalidad, *c-fos* podría estar implicado en la maduración neuronal ya que su patrón de expresión durante el desarrollo así lo sugiere (Caubet 1989). Al día 12 de gestación, la expresión de *c-fos* se extiende hacia todo el cerebro y la médula espinal, mientras que al día 16 y 18 su expresión se limita a regiones específicas, como son: región anterior de la médula espinal, ganglio de la raíz dorsal, bulbo olfatorio, capa ganglionar de la retina, cerebelo y corteza cerebral (Caubet 1989). El día posterior al nacimiento, c-Fos se expresa en determinadas regiones del SNC: bulbo olfatorio, hipocampo, corteza restoespinal, núcleo parafascicular del tálamo y diversos núcleos del nervio craneal (Smeyne, Curran et al. 1992). Dado que la expresión de c-Fos aparece durante periodos específicos y en tipos celulares particulares durante el desarrollo embrionario y post-natal, acompañando el desarrollo y los cambios morfológicos de diversas regiones del SNC, se ha postulado una posible participación de c-Fos en su ontogenia (Gubits, Hazelton et al. 1988).

Si bien los ratones *ko* para el proto-oncogén *c-fos* sobreviven y no presentan claras disrupciones morfológicas a nivel del SNC (como sí sucede para otros tejidos), muestran algunas alteraciones importantes en su comportamiento. Algunas de estas alteraciones incluyen una respuesta disminuida a estímulos externos y una alteración en la respuesta adaptativa a largo plazo; estos hallazgos sugieren que la ausencia de c-Fos podría generar un desorden en el desarrollo normal del sistema nervioso lo cual se ve reflejado en el comportamiento anormal de los animales *ko* (Wang, Ovitt et al. 1992). Para poder dilucidar el rol de c-Fos durante el desarrollo del SNC es necesario relacionar su expresión a eventos particulares del desarrollo, tema que será tratado en el presente trabajo de tesis doctoral.

# OBJETIVOS

## OBJETIVOS

Los animales *c-fos*  $-/-$  fueron generados hace más de 20 años y algunas de las alteraciones fenotípicas que presentan han sido estudiadas en profundidad (como es el caso de las alteraciones a nivel óseo y hematopoyético). No obstante, existen algunos puntos claves que aún no han sido estudiados en profundidad. Una de las características fenotípicas más llamativas es la marcada reducción en el tamaño corporal (de ~40%) de los ratones *c-fos*  $-/-$  respecto a sus hermanos *wt*, lo cual podría deberse a un menor contenido celular en algunos órganos de estos animales teniendo en cuenta la participación de este proto-oncogén en proliferación celular, ya sea como factor de transcripción tipo AP-1 o como activador de la síntesis de lípidos. Al mismo tiempo, la implicancia de c-Fos en apoptosis deja abierta la posibilidad de que modificaciones en la regulación de este evento celular participe en el balance total del número celular final que alcancen los animales *c-fos*  $-/-$ . La participación de c-Fos en la generación de uno de los componentes más abundantes de las membranas celulares, los fosfolípidos, podría colocarlo como una pieza importante en la determinación del tamaño celular final; de hecho en eventos de diferenciación neuronal se ha demostrado la implicancia de esta actividad de c-Fos en el crecimiento de procesos celulares. Esto plantea la posibilidad de que ante la ausencia de este proto-oncogén las células *c-fos*  $-/-$  presenten un menor tamaño que las células *c-fos*  $+/+$ .

En cada tejido y órgano el número final de células así como sus características van a estar determinadas por la actividad de las células madres/progenitoras específicas del mismo. Es por ello que utilizando como modelo de estudio ratones *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ , se estableció como *objetivo general* de este trabajo de tesis analizar el impacto biológico del proto-oncogén *c-fos* en la población de células madres/progenitoras tanto *in vivo* como *in vitro*, puesto que el comportamiento adecuado de esta población celular es clave para un desarrollo normal del animal. En particular se optó por el estudio de la población de células madres/progenitoras neurales (NSPCs) debido a que existen importantes diferencias en el comportamiento de los animales *ko* respecto a la condición *wt*, las cuales han sido evaluadas en detalle desde el punto de vista observacional (cambios en el sueño, en el comportamiento sexual, en el aprendizaje y la memoria), pero las bases subyacentes a las mismas no han sido aún indagadas. El adecuado funcionamiento del SNC es lo que finalmente comanda el comportamiento de cada animal, y si bien la falta de *c-fos* repercute en los circuitos de señalamiento neuronal y

en su plasticidad, su ausencia desde el nacimiento también podría impactar en el desarrollo normal de este sistema.

Como *objetivos específicos* del presente trabajo de tesis se plantean los siguientes puntos:

**I-** Determinar si las diferencias en el tamaño corporal entre animales *c-fos* *+/+* y animales *c-fos* *-/-* son debidas a diferencias en el número celular y/o en el tamaño celular.

**II-** Establecer el rol de *c-fos* en el comportamiento *in vitro* de la población de células madres/progenitoras neurales (NSPCs) procedentes del telencéfalo de embrión.

**III-** Estudiar las consecuencias de la falta del proto-oncogén *c-fos* en el desarrollo de la corteza cerebral embrionaria.

**IV-** Determinar por medio de cuál/cuales de sus funciones (ya sea como factor de transcripción o como activador de la síntesis de lípidos) c-Fos participa en la regulación del desarrollo de la corteza cerebral embrionaria.

**V-** Establecer si existen diferencias entre el nicho neurogénico presente en la zona sub-ventricular (SVZ) de ratones adultos *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*.

# RESULTADOS

## RESULTADOS

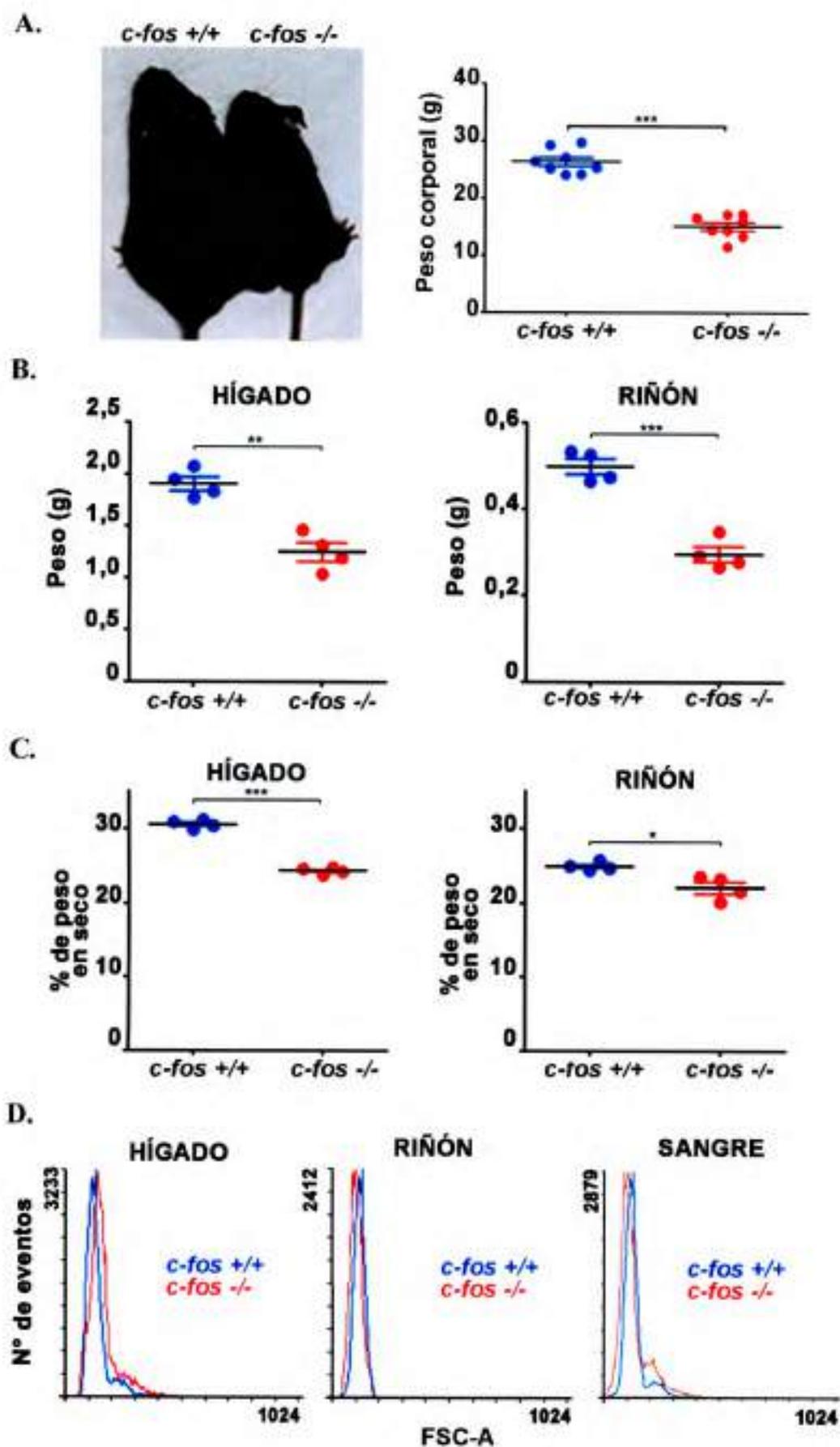
### - CAPITULO I. FENOTIPO DEL ADULTO

Como se mencionó anteriormente, una de las principales características fenotípicas de los ratones *c-fos*  $-/-$  es la marcada reducción en su tamaño corporal respecto a sus hermanos *wt*. Para poder determinar las causas de estas diferencias, y abordar de esta forma el objetivo específico I, se analizaron animales adultos *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$  comparando diferentes órganos en cuanto a masa total y tamaño de sus células constituyentes. Teniendo en cuenta las alteraciones en el comportamiento que presentan los animales *ko*, se hizo especial hincapié en el análisis del cerebro de estos animales.

#### I- Desarrollo alcanzado por animales adultos *c-fos* $+/+$ y *c-fos* $-/-$ .

En concordancia con los datos de bibliografía (Johnson, Spiegelman et al. 1992), los animales adultos *c-fos*  $-/-$  presentan una clara disminución en el tamaño corporal respecto de sus contrapartes normales, lo cual se refleja en una reducción en un 40-60% de su masa corporal total respecto de los ratones *c-fos*  $+/+$  (Figura 11A). Asimismo, al comparar la masa total de algunos órganos, tales como hígado y riñón (Figura 11B), también se observa que los órganos *c-fos*  $-/-$  presentan una menor masa total en comparación a los órganos *c-fos*  $+/+$ . Esta disminución en la masa de los órganos de los animales *c-fos*  $-/-$  puede ser explicada por un menor número de células totales en estos animales, por un menor tamaño de las células *c-fos*  $-/-$  respecto de las células *c-fos*  $+/+$  y/o por una diferencia en el contenido de agua entre ambos tipos de animales.

Los órganos están constituidos tanto por componentes celulares como por componentes extracelulares (matriz extracelular); es por ello que para poder tener un panorama más claro acerca de si las diferencias en el peso total son debidas a diferencias en el contenido de agua entre ambos genotipos, se analizó el peso seco de algunos órganos. Como puede observarse en la Figura 11C, los animales *c-fos*  $+/+$  presentan un mayor porcentaje de peso seco respecto del peso total del órgano analizado (hígado o riñón) en comparación a los animales *c-fos*  $-/-$ . Estos resultados muestran que las diferencias en el peso de los órganos analizados, pueden ser debidas a un menor número de células contenidas en los animales *c-fos*  $-/-$  o a un menor tamaño de las



**Figura 11. Análisis del fenotipo adulto de animales *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*.**

**A.** Fotografía representativa de animales *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*, hermanos de camada, de dos meses de edad (izquierda). La masa corporal de animales adultos *c-fos* *-/-* es significativamente menor que la de los animales *c-fos* *+/+* (derecha). Los resultados muestran la media de la masa corporal (g)  $\pm$  SEM (n=8). **B y C.** La masa total (B) y el porcentaje de peso seco (C) de hígado y riñón de animales *c-fos* *-/-* resulta ser menor que el de los animales *c-fos* *+/+*. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM (n=4). Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  en animales *c-fos* *-/-* respecto a los animales *c-fos* *+/+*. **D.** Células de la sangre, hígado y riñón de animales *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* fueron analizadas por citometría de flujo y sus tamaños celulares comparados (FSC-A). Los histogramas muestran el número de eventos vs. FSC-A.

mismas. Para comparar el tamaño celular se analizaron células procedentes de la sangre de ratones *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* como así también células de hígado y riñón mediante citometría de flujo (Figura 11D). En ninguno de los casos analizados se observó una población de células *c-fos* *-/-* con un tamaño significativamente diferente a las células *c-fos* *+/+*.

Estos resultados sugieren que las diferencias en el peso total de algunos órganos se deben, al menos en parte, a un menor contenido de células en los órganos de los animales *c-fos* *-/-* respecto de sus contrapartes normales, sin diferencias significativas en el tamaño de las mismas.

## II- SNC de animales adultos *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*.

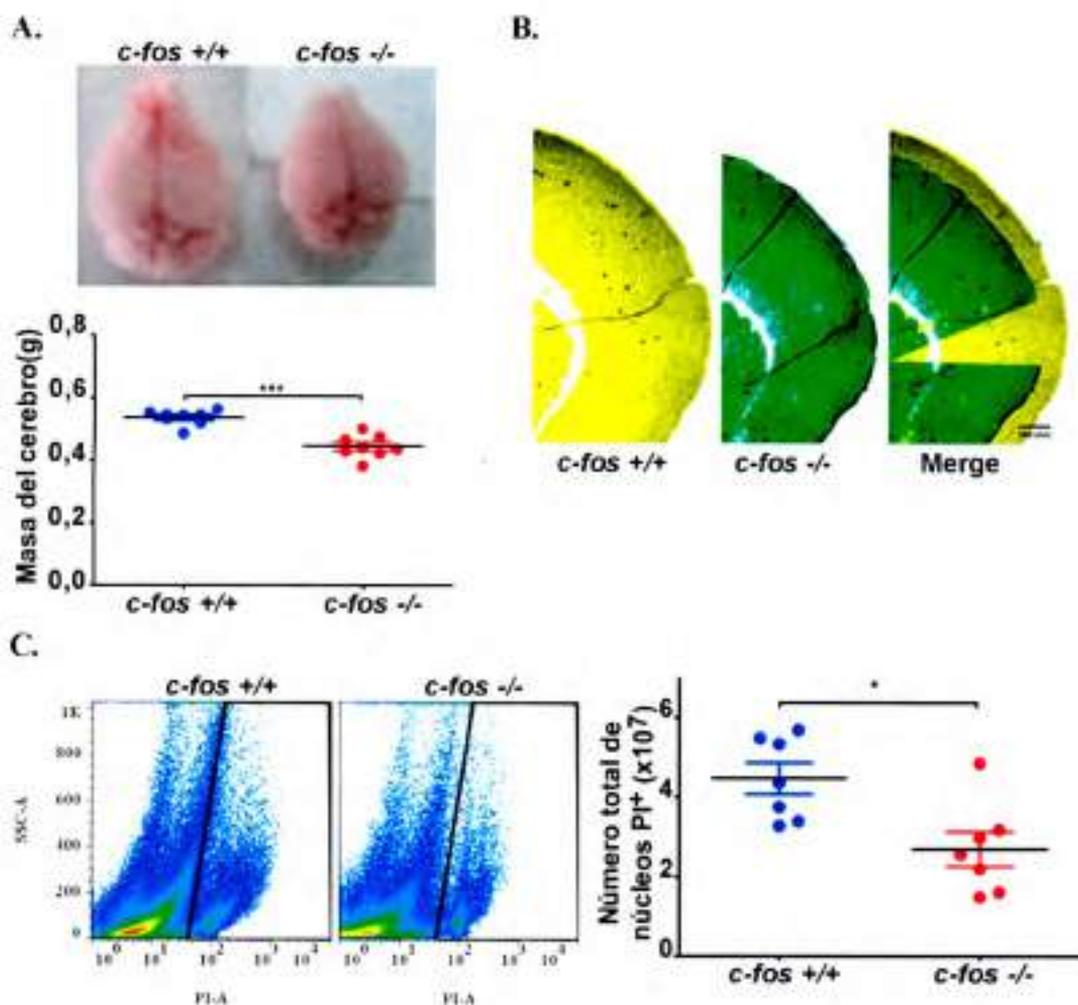
Los animales *c-fos* *-/-* presentan diferentes alteraciones fenotípicas que afectan una gran variedad de órganos y tejidos. Como se mencionó en la Introducción, entre los trastornos que involucran el funcionamiento del SNC se encuentran: hiperactividad, disminución en la respuesta a estímulos externos, deficiencia en el aprendizaje de tareas complejas y en la memoria a largo plazo, comportamiento sexual alterado y períodos de vigilia prolongados. Estas alteraciones han sido ampliamente descriptas desde el punto de vista comportamental pero poco se sabe acerca de la fisio-patogenia por la cual la falta de *c-fos* genera estas perturbaciones. Es por ello que nos abocamos a estudiar en forma más detallada el SNC de animales *c-fos* *-/-* comparado con el de animales *c-fos* *+/+*.

Al igual que lo observado cuando se compararon órganos como hígado y riñón entre animales *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*, estos últimos también presentan un cerebro de

menor tamaño y menor masa total en comparación a los animales *wt* (Figura 12A). Asimismo, al analizar cortes coronales de cerebros adultos, se observó una clara reducción en el espesor de la corteza de animales *c-fos* *-/-* en comparación a la condición *wt* (Figura 12B). Resulta importante aclarar que al analizar la relación entre masa del cerebro y masa corporal total no se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos ( $0.026 \pm 0.003$  para animales *c-fos* *-/-* y  $0.023 \pm 0.001$  para animales *c-fos* *+/+*,  $p = 0.1234$ ), indicando que los animales *ko* presentan un tamaño cerebral acorde a su tamaño corporal.

Debido a la arquitectura propia del sistema nervioso, caracterizada por la presencia de poblaciones celulares con una morfología celular particular (neuronas y células gliales), comparar el tamaño de células procedentes del cerebro mediante citometría de flujo resultaría poco representativo de lo que realmente ocurre en el tejido. Es por ello que para establecer si existen diferencias en el número total de células que repercutan en el tamaño final alcanzado por el cerebro, se comparó el número de células de la corteza cerebral adulta de animales *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* mediante tinción de núcleos con Ioduro de Propidio (PI) y posterior análisis del número de núcleos positivos mediante citometría de flujo. Se encontró que la corteza cerebral adulta de animales *c-fos* *-/-* de dos meses de edad presenta un menor número de células totales respecto a sus contrapartes normales (Figura 12C).

Los resultados obtenidos al analizar el cerebro de animales adultos *c-fos* *-/-* indican que los mismos resultan ser de un menor tamaño respecto al de animales *c-fos* *+/+* y que además presentan un menor número de células totales en su corteza cerebral.



**Figura 12.** El cerebro de animales *c-fos -/-* presenta un menor tamaño que el cerebro de animales *c-fos +/+*.

**A.** Imágenes representativas del cerebro de animales adultos *c-fos +/+* y *c-fos -/-* hermanos de camada (arriba). La masa total del cerebro de animales *c-fos -/-* es significativamente menor que la de los animales *c-fos +/+* (abajo). Los resultados muestran la media de la masa total del cerebro (g)  $\pm$  SEM (n=8). Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \*\*\*p < 0.001 en animales *c-fos -/-* respecto a los animales *c-fos +/+*. **B.** Fotografías representativas de cortes coronales del cerebro de ratones *c-fos +/+* (izquierda, pseudo-coloreada en amarillo), *c-fos -/-* (medio, pseudo-coloreada en verde) y de ambas imágenes superpuestas (derecha). Las imágenes fueron obtenidas con microscopio de contraste de fase (Axioplan 135) usando un objetivo 2.5X. Escala de la barra: 100 $\mu$ m. **C.** Núcleos celulares aislados de la corteza cerebral adulta fueron teñidos con PI y las células positivas fueron cuantificadas mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran los núcleos celulares ubicados en un gráfico de SSC-A (Side Scatter Area) en función de la tinción para PI (PI-A). Para seleccionar los núcleos en función de su tinción para PI se trazó una línea de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos. Este tipo de análisis permite la cuantificación de núcleos individuales en un volumen conocido de muestra y permite excluir los restos celulares presentes a la izquierda de la línea trazada. A la derecha del histograma se muestra la cuantificación del número de núcleos presentes en la corteza cerebral de ratones adultos *c-fos +/+* y *c-fos -/-*. Los resultados muestran la media del número de núcleos PI positivos  $\pm$  SEM de 7 experimentos independientes. Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 en animales *c-fos -/-* respecto a los animales *c-fos +/+*.

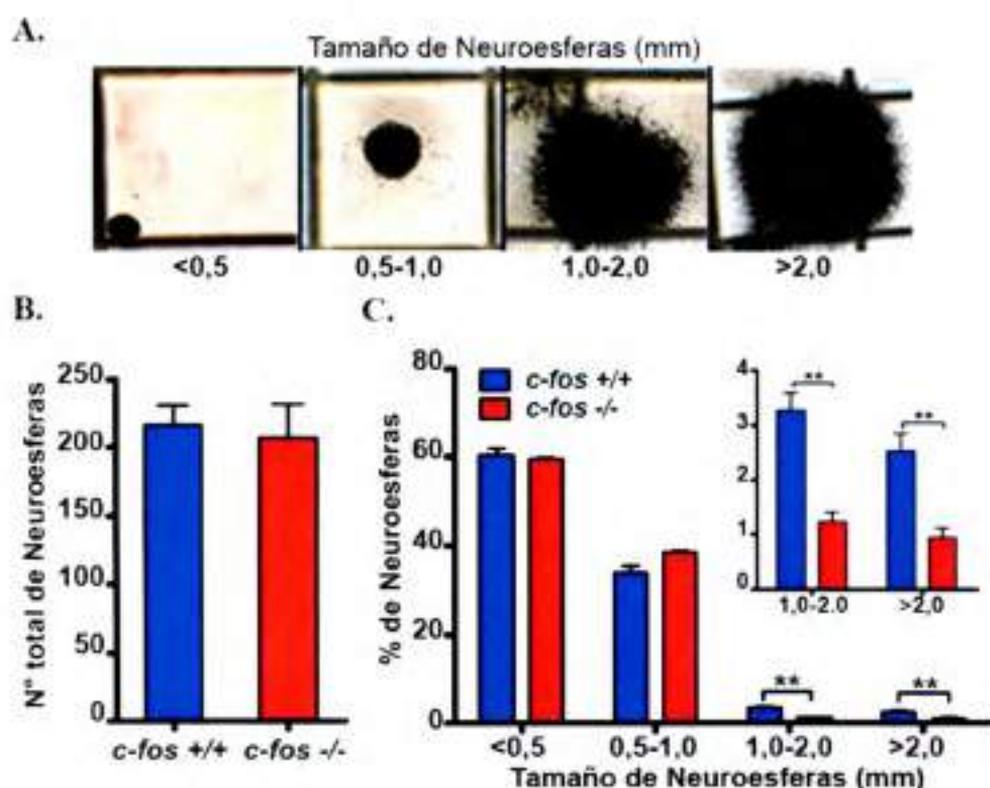
## - CAPITULO 2. COMPORTAMIENTO *in vitro* DE LAS CÉLULAS MADRE/PROGENITORAS NEURALES DE EMBRIONES *c-fos*<sup>-/-</sup>.

Teniendo en cuenta que las observaciones anteriores indican que ratones adultos *c-fos*<sup>-/-</sup> presentan un menor número total de células en su corteza cerebral y que una gran proporción de células presentes en esta región son generadas por la actividad proliferativa y de diferenciación de las NSPCs presentes en la corteza en desarrollo, inicialmente nos abocamos a comparar el comportamiento *in vitro* de esta población celular procedente de la corteza cerebral de embriones *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup> de 14.5 días de desarrollo (de ahora en más designados como E14.5 *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup>), puesto que, como se mencionó en la Introducción, es el estadio del desarrollo considerado como el pico de neurogénesis.

### I- Cuantificación funcional de NSPCs de E14.5 *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup>.

La cuantificación funcional de las NSPCs implica distinguir la población de células madres neurales de la población de células progenitoras neurales en función de sus capacidades proliferativas. Para realizar esta caracterización se utilizó el ensayo de formación de colonias (Neural Colony Forming Cell (NCFC) Assay kit) el cual consiste en sembrar células aisladas de la corteza cerebral en desarrollo en un medio semi-sólido rico en factores de crecimiento durante 21 días. Tanto para el caso de la corteza cerebral de embriones *c-fos*<sup>+/+</sup> como *c-fos*<sup>-/-</sup> se cultivaron 7500 células/placa de 35mm (en 2,5mL de medio completo), una densidad lo suficientemente baja como para considerar que cada colonia que se forme procede de una célula única. Para cada embrión analizado se evaluaron en total cinco placas de 35mm. Luego de transcurrido el tiempo de cultivo, se observó la presencia de colonias celulares o neuroesferas (NS: neurosphere) de diferentes tamaños (Figura 13A). Las colonias con un tamaño mayor a 2mm se consideran procedentes de una célula madre neural, mientras que cuando su tamaño es menor a 2mm se acepta que provienen de una célula progenitora neural (Louis, Rietze et al. 2008). Al analizar cinco embriones por cada genotipo no se observaron diferencias significativas en el número total de colonias generadas a partir de animales *wt* y *ko* (Figura 13B), pero al comparar el porcentaje (%) de colonias dentro de cada rango de tamaño (menor a 0,5mm, entre 0,5-1,0mm, entre 1,0-2,0mm y mayor a 2,0mm) se observó un menor porcentaje de colonias con un tamaño mayor a 2mm en los

cultivos provenientes de E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup> (Figura 13C), lo cual sugiere un menor porcentaje de células madres neurales en la condición *ko*. Otra interpretación posible a estos resultados es que las células madres *c-fos*<sup>-/-</sup> presenten un comportamiento proliferativo o de muerte celular diferentes al de las normales, en cuyo caso ambas características puede contribuir a determinar este menor tamaño alcanzado por las NS *c-fos*<sup>-/-</sup>. Se analizará la capacidad proliferativa y la muerte celular de las NSPCs *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup> en el siguiente punto.

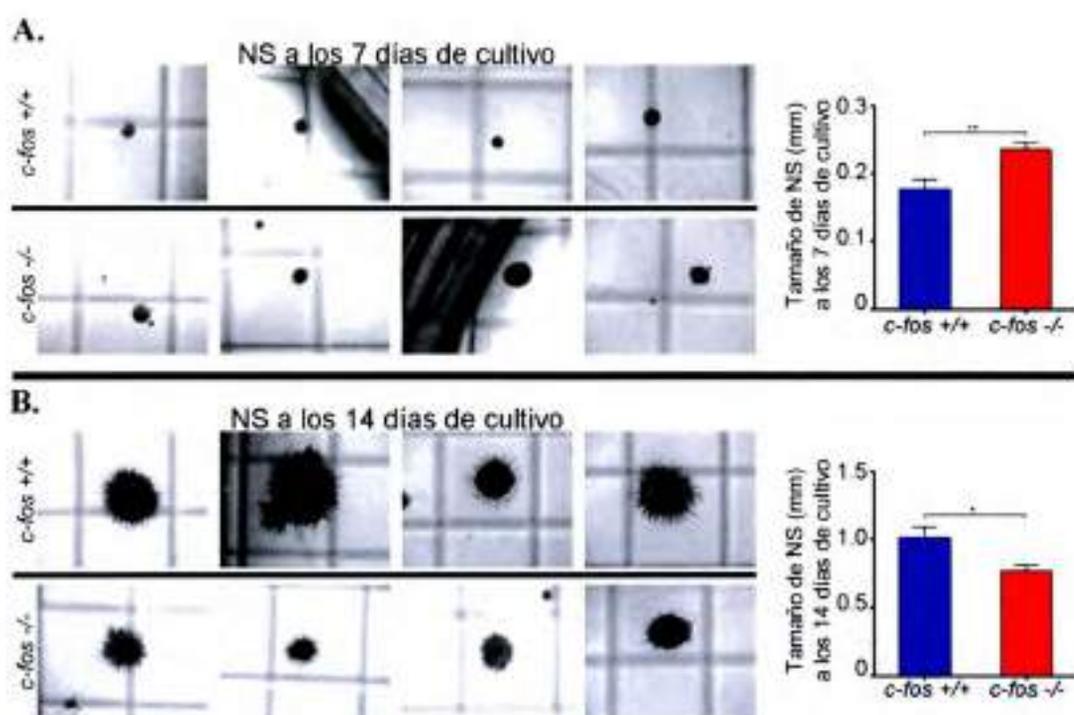


**Figura 13. Ensayo de formación de colonias.**

**A.** Imágenes representativas de colonias pertenecientes a los cuatro rangos de tamaño considerados al realizar el análisis del ensayo de formación de colonias. **B.** El número total de colonias formadas a partir de células procedentes de la corteza cerebral en desarrollo de embriones *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup> no resulta ser significativamente diferente al analizar cinco placas de 35mm de cada condición (7500 células iniciales por placa). Los resultados muestran la media del número de colonias  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). **C.** Histogramas representativos de la distribución por rango de tamaño del porcentaje de colonias en los cultivos de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup>. Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \* $p<0.05$  en animales *c-fos*<sup>-/-</sup> respecto a los animales *c-fos*<sup>+/+</sup>.

## II- Las NSPCs *c-fos*<sup>-/-</sup> presentan una menor capacidad para proliferar y una mayor muerte celular luego de tiempos prolongados en cultivo.

Al realizar los ensayos de formación de colonias se observó que en los primeros días de cultivo, las colonias derivadas de las NSPCs *c-fos*<sup>-/-</sup> presentaban un mayor tamaño que las formadas por las células *wt*; no obstante, luego de una semana de cultivo esta relación se invierte (Figura 14).

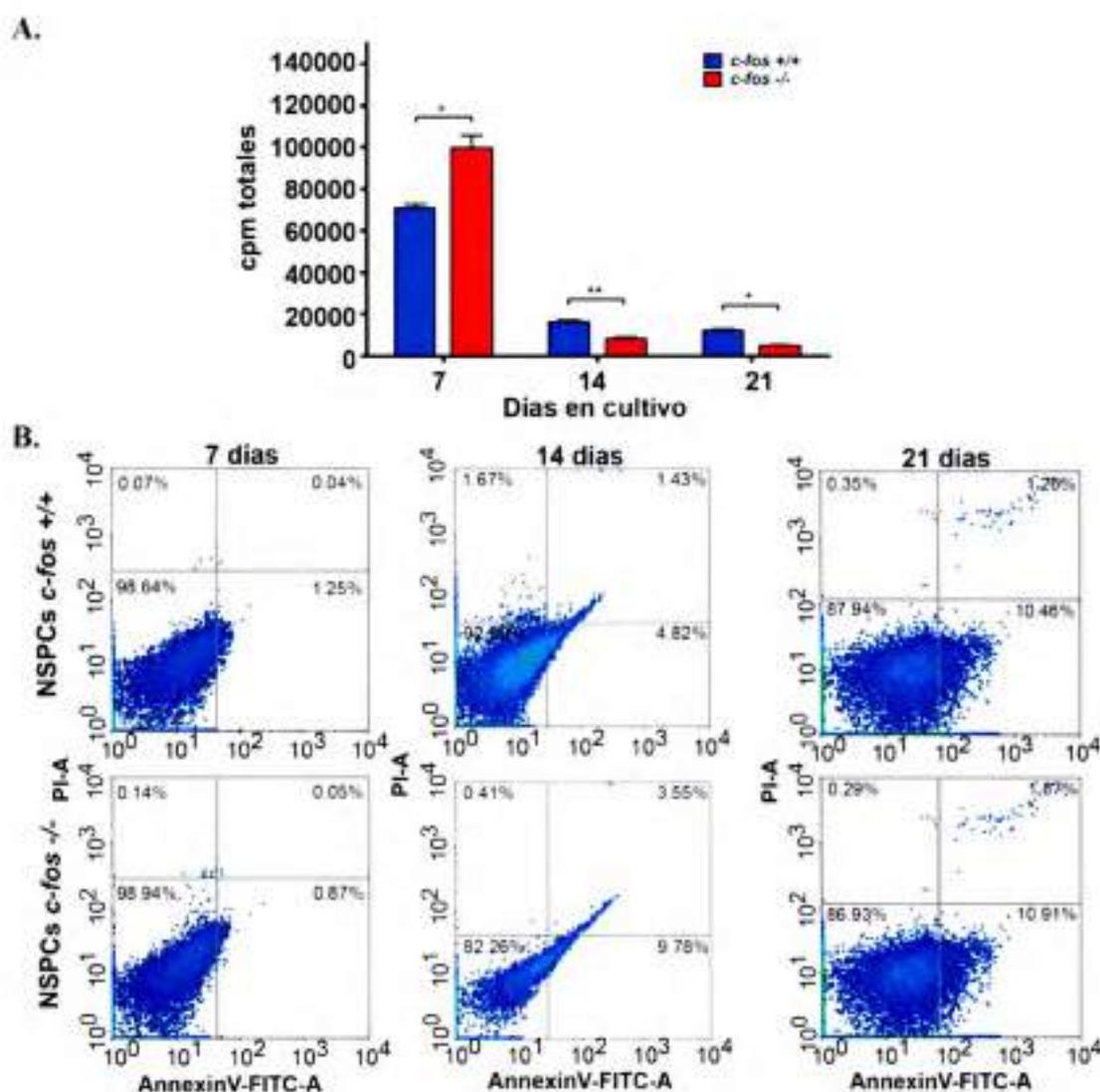


**Figura 14. Tamaño de neuroesferas *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup>.**

Imágenes representativas de neuroesferas (NS) formadas a partir de células procedentes de la corteza cerebral en desarrollo de embriones *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup> a los 7 (A) y 14 (B) días de iniciado el ensayo de formación de colonias. A la derecha se muestra el histograma correspondiente al tamaño medio de las NS (mm) medido a los 7 (A) y 14 (B) días de iniciado el ensayo de formación de colonias. Los resultados muestran la media del tamaño de NS (mm)  $\pm$  SEM (n=10). Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  en animales *c-fos*<sup>-/-</sup> respecto a los animales *c-fos*<sup>+/+</sup>.

Estas últimas observaciones sugieren que, a medida que transcurren los días del cultivo de colonias, la capacidad de proliferación y/o muerte celular de las NSPCs *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup> resultan diferentes. Es por ello que se decidió evaluar la capacidad de proliferación de las NSPCs mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada (<sup>3</sup>H-T) a diferentes tiempos de cultivo celular primario (7, 14 y 21 días). Estos ensayos muestran, llamativamente, que las NSPCs *c-fos*<sup>-/-</sup> presentan mayor incorporación de

$^3\text{H-T}$  que las NSPCs *c-fos*  $+/+$  a los 7 días de cultivo, pero a los 14 y 21 días de cultivo, la proliferación de las células *c-fos*  $+/+$  resulta ser significativamente mayor que el de las *c-fos*  $-/-$  (Figura 15A). En paralelo a los ensayos de proliferación se comparó la muerte celular entre ambos cultivos mediante ensayos de marcación con Anexina V. Estos ensayos mostraron que las NSPCs *c-fos*  $-/-$  presentan mayor muerte celular a los 14 días de cultivo (Figura 15B).



**Figura 15. Proliferación y muerte celular en los cultivos de NSPCs *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ .**

**A.** Histograma representativo del número de cpm totales incorporadas en 10000 células luego del tratamiento durante 6 horas con  $^3\text{H-T}$ , a los 7, 14 y 21 días de iniciado el cultivo primario de NSPCs *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ . Cada condición fue evaluada por quintuplicado. Los resultados se muestran como la media de cpm totales  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  en animales *c-fos*  $-/-$  respecto a los animales *c-fos*  $+/+$ . **B.** Gráficos de dot plots en donde se muestra la marcación para PI (eje Y) y Anexina V (eje X) de NSPCs a los 7 (panel izquierdo), 14 (panel medio) y 21 (panel derecho) días de cultivo. Se delimitan los cuadrantes que representan las distintas

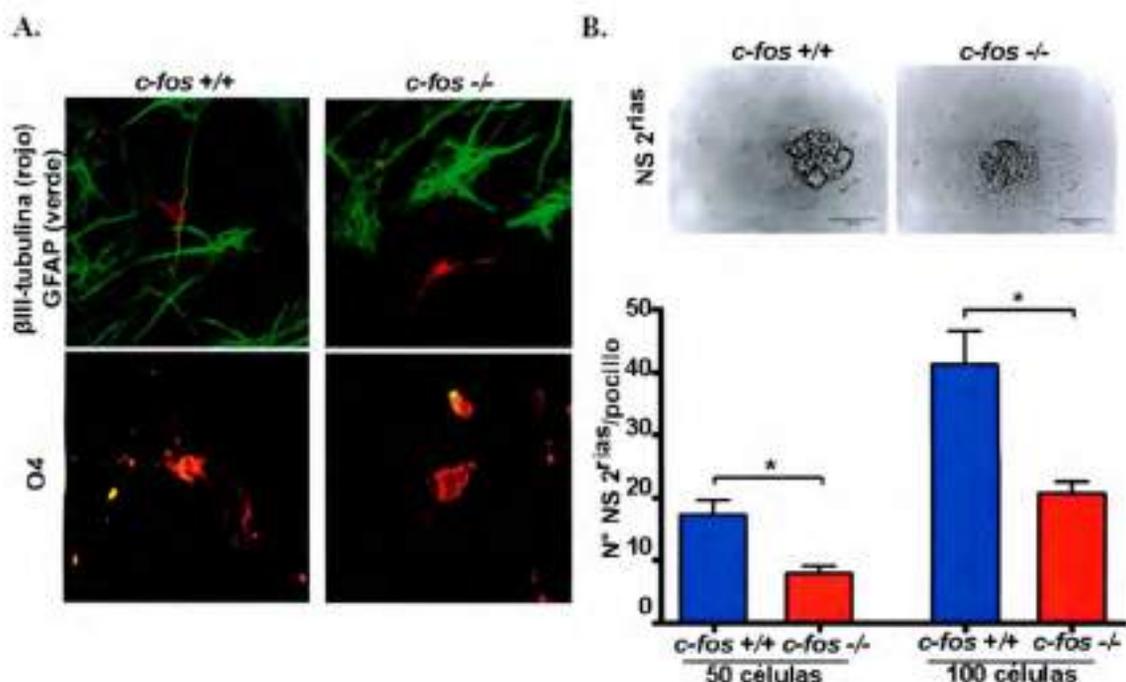
poblaciones celulares: células PI simple positivas (células en vía de muerte por necrosis), células Anexina V simple positivas (células en etapa de apoptosis temprana), células doble positivas para PI y Anexina V (células en apoptosis tardía o en necrosis) y células negativas para ambos marcadores (células vivas). Se indica el porcentaje de células presentes en cada cuadrante de un experimento representativo de 4 ensayos.

En resumen, estos resultados muestran una menor capacidad proliferativa de las NSPCs *c-fos* *-/-* más allá de los 7 días de cultivo lo que, sumado a la mayor muerte celular observada a los 14 días de cultivo, podría explicar las diferencias en el menor tamaño de las neuroesferas observadas en la Figura 14 y el menor porcentaje de colonias pertenecientes a los rangos de tamaño superior (entre 1,0-2,0mm y mayor a 2,0mm), cuantificadas en los ensayos de formación de colonias del punto 1.

### III- Las NSPCs *c-fos* *-/-* son multipotentes pero presentan una menor capacidad de auto-renovación en comparación a sus contrapartes normales.

Las células madres son definidas *in vitro* por la concomitancia de dos propiedades: multipotencialidad y auto-renovación. En el caso de las células madres neurales, el término multipotencialidad hace referencia a su capacidad de diferenciar a astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. Para evaluar esta propiedad, las NSPCs (obtenidas a partir de neuroesferas primarias formadas luego de 7 días de cultivo) fueron cultivadas sobre placas adherentes en medio de cultivo sin factores de crecimiento y en presencia de suero. Luego de 7 días de cultivo, se realizó la inmunofluorescencia correspondiente para detectar la presencia de células positivas para:  $\beta$ III-tubulina (marcador de neuronas), GFAP (marcador de astrocitos) y O4 (marcador de oligodendrocitos). Tanto las NSPCs *c-fos* *+/+* como *c-fos* *-/-* diferenciaron a los tres linajes celulares (Figura 16A).

La auto-renovación hace referencia a la capacidad de las células madre neurales de mantener su población celular. Existen distintos ensayos que permiten evaluar la auto-renovación *in vitro*; en este caso se tomó el número de neuroesferas secundarias (NS 2<sup>rias</sup>) formadas a partir de células individuales obtenidas luego de la disociación de NS 1<sup>rias</sup>, como una medida de la capacidad de auto-renovación de las células madres neurales. Estos ensayos de formación clonal de colonias sugieren que las NSPCs *c-fos* *+/+* presentan una mayor capacidad de auto-renovación que las NSPCs *c-fos* *-/-* (Figura 16B).



**Figura 16. Multipotencialidad y auto-renovación.**

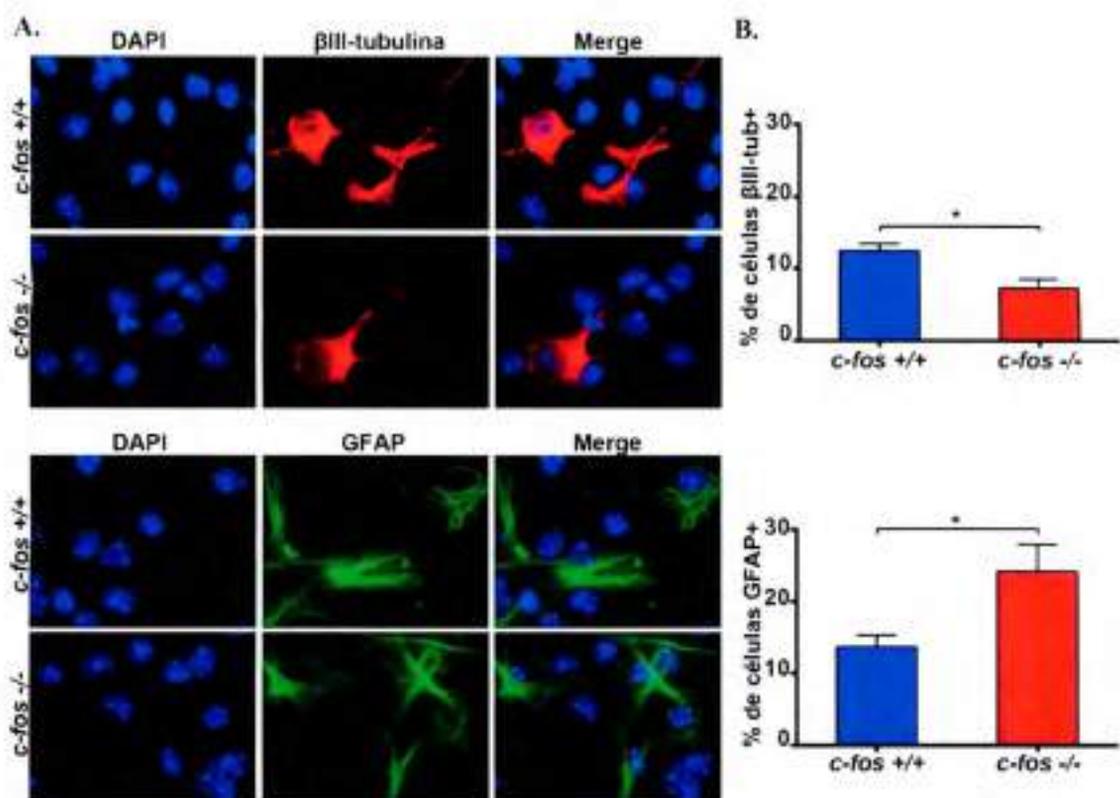
**A.** Inmunofluorescencia para  $\beta$ III-tubulina (neuronas), GFAP (astrocitos) y O4 (oligodendrocitos) de NSPCs *c-fos +/+* y *c-fos -/-* diferenciadas durante 7 días de cultivo en condiciones adherentes, ausencia de factores de crecimiento y presencia de suero. **B.** Fotografías representativas de neuroesferas secundarias (NS 2<sup>nd</sup> pas) *c-fos +/+* y *c-fos -/-* (panel superior). Histograma del número de NS 2<sup>nd</sup> pas cuantificadas por pocillo de placa de 96 wells luego de sembrar 50 o 100 células procedentes de la disociación de NS 1<sup>st</sup> pas *c-fos +/+* y *c-fos -/-* (panel inferior). Se evaluaron 5 animales por genotipo y cada condición fue ensayada en diez pocillos. Los resultados se expresan como la media del número de NS 2<sup>nd</sup> pas formadas  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). \* $p < 0.05$  en animales *c-fos -/-* respecto a los animales *c-fos +/+*.

Es decir que tanto las NSPCs *c-fos +/+* como las NSPCs *c-fos -/-* resultan ser multipotentes pero estas últimas presentan una menor capacidad de auto-renovación *in vitro* en comparación a sus contrapartes normales.

#### IV- Las NSPCs presentan una menor tendencia a la diferenciación neuronal

Si bien tanto las NSPCs *c-fos +/+* como *c-fos -/-* son multipotentes (Figura 16A), se decidió evaluar si la tendencia a la diferenciación neuronal y glial resulta ser la misma entre ambos genotipos. Una suspensión de NSPCs, obtenidas a partir de la disociación de neuroesferas primarias formadas luego de 7 días de cultivo, fue cultivada sobre placas adherentes en medio sin factores de crecimiento pero en presencia de Suero Fetal Bovino al 1%. Luego de 7 días de cultivo, se cuantificó la diferenciación mediante la determinación del porcentaje de neuronas y astrocitos formados. Para ello, se realizó la inmunomarcación de  $\beta$ III-tubulina (marcador de neuronas) y GFAP (marcador de

astrocitos), mientras que la tinción con DAPI permitió establecer el número total de células presentes luego de la diferenciación (Figura 17A).



**Figura 17. Diferenciación neuronal y glial de las NSPCs *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ .**

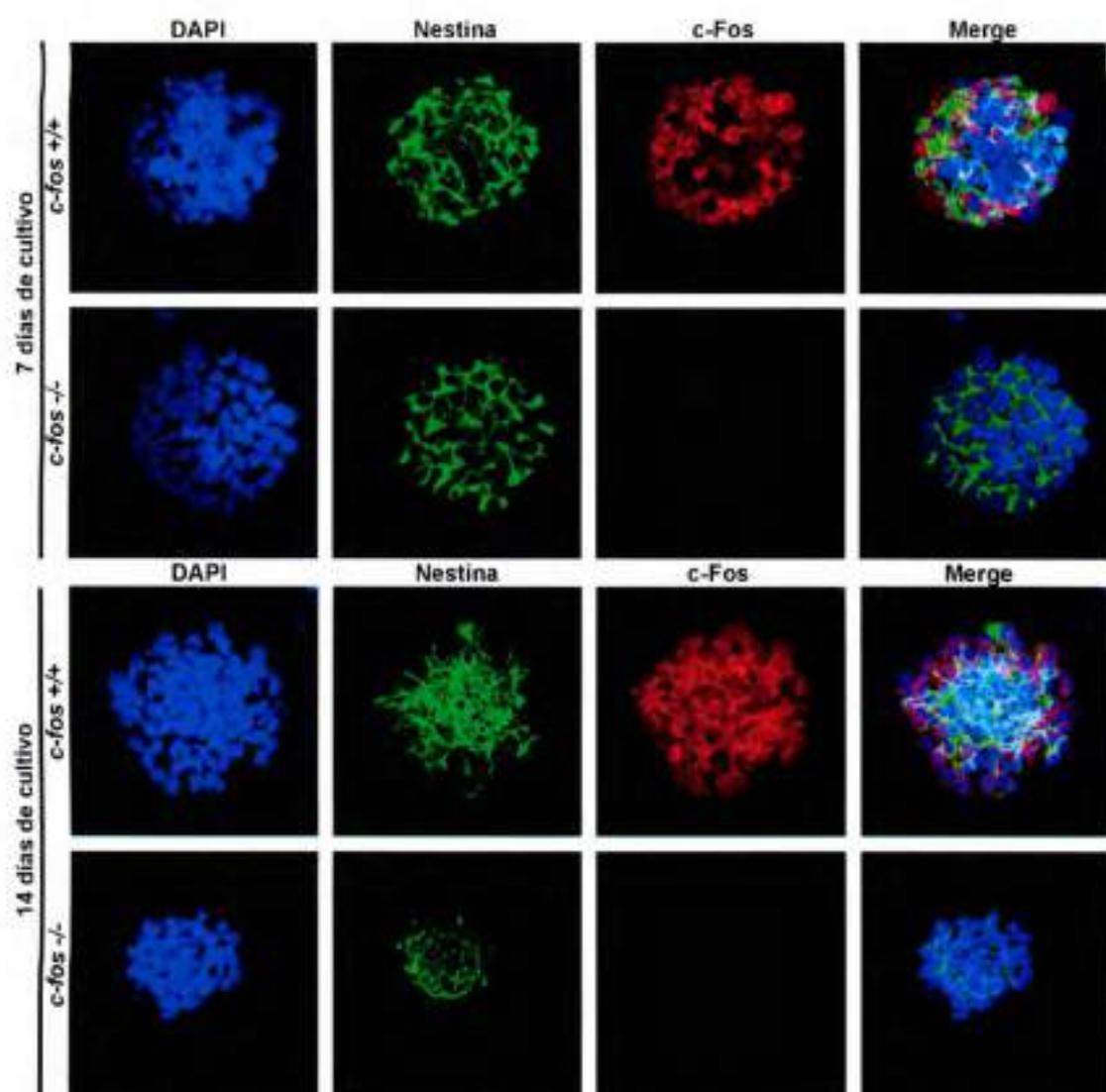
**A.** Inmunofluorescencia para  $\beta$ III-tubulina (rojo) y GFAP (verde) de NSPCs *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$  según se indica, diferenciadas durante siete días en condiciones adherentes, ausencia de factores de crecimiento y presencia de suero. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). **B.** Histogramas representativos del porcentaje de células diferenciadas a neuronas (panel superior) y astrocitos (panel inferior) respecto del total de células. Los resultados se representan como la media del % de células positivas para  $\beta$ III-tubulina o GFAP  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch; \* $p<0.05$  en animales *c-fos*  $-/-$  respecto a los animales *c-fos*  $+/+$ .

Los resultados obtenidos muestran una menor tendencia de las NSPCs *c-fos*  $-/-$  a la diferenciación neuronal conjuntamente con una mayor tendencia a la diferenciación glial en comparación a las NSPCs *c-fos*  $+/+$  (Figura 17B).

## V- Expresión de c-Fos y su rol molecular en el comportamiento *in vitro* de NSPCs

Con el objetivo de determinar si hay expresión de c-Fos en los cultivos de NSPCs, se realizaron ensayos de inmunomarcación de NS 1<sup>rias</sup> y 2<sup>rias</sup> obtenidas a los 7 y 14 días de cultivo, respectivamente, teniendo en cuenta que son los tiempos en los

cuales se observan las principales diferencias en proliferación y apoptosis. Estos ensayos muestran expresión de c-Fos para el caso de las NSPC *c-fos* *+/+*, mientras que (como es de esperar) no se observa marcación en las NSPCs *c-fos* *-/-* (control negativo de expresión). Al mismo tiempo se realizó la inmunomarcación para Nestina, un filamento intermedio marcador de células en estadios tempranos del desarrollo del SNC (Figura 18).



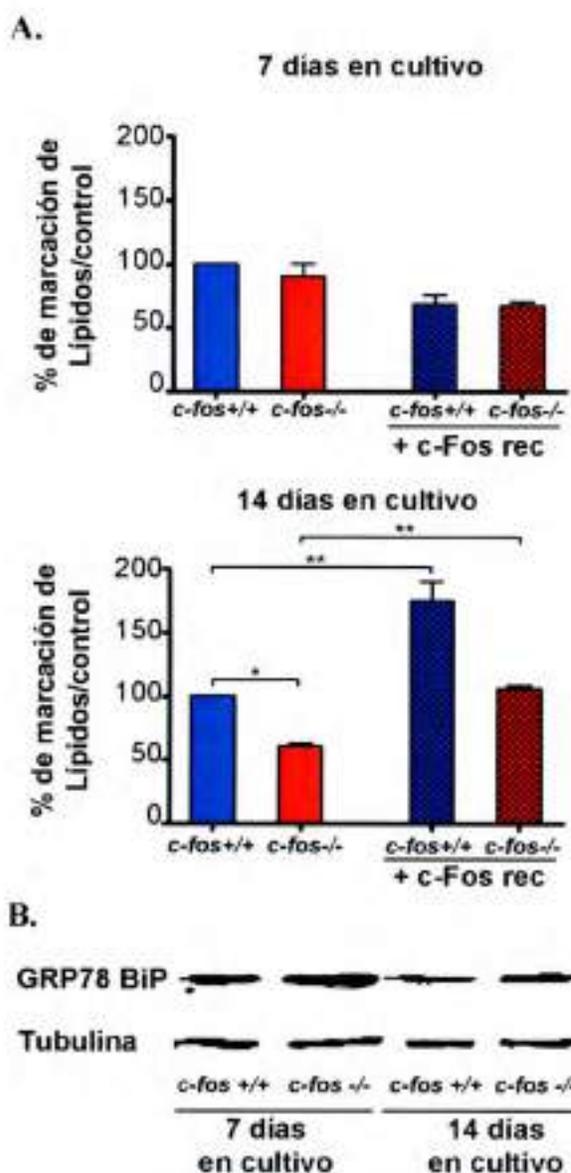
**Figura 18. Expresión de c-Fos en NS**

Inmunofluorescencia de NS *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* a los 7 y 14 días de cultivo celular para Nestina (verde) y c-Fos (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Teniendo en cuenta la expresión de c-Fos en los cultivos de NSPCs *c-fos* *+/+* y las diferencias en proliferación observadas a los 7 y 14 días de cultivo se decidió evaluar si c-Fos estaba involucrado en la determinación de estas diferencias mediante su

función como activador de la síntesis de lípidos. Se obtuvieron extractos totales de NSPCs a los 7 y 14 días de cultivo para realizar la marcación de fosfolípidos *in vitro* utilizando  $^{32}\text{P}$ -ATP- $\gamma$  como precursor radioactivo. A los 7 días de cultivo no se observaron diferencias en la marcación entre los extractos *wt* y *ko*, y el agregado de c-Fos recombinante no modificó esta marcación como sí sucede para otros sistemas en los cuales c-Fos activa la síntesis de lípidos (Silvestre, Gil et al. 2010; Gil, Silvestre et al. 2012). Por su parte a los 14 días de cultivo sí se observó una mayor marcación de fosfolípidos *in vitro* para extractos de NSPCs *c-fos* *+/+* en comparación a las NSPCs *c-fos* *-/-*, y el agregado de c-Fos recombinante incrementó dicha marcación en ambos casos (Figura 19A). Estos resultados sugieren que c-Fos participa como inductor de la síntesis de lípidos en periodos prolongados de cultivo y que esta función podría estar determinando la mayor incorporación de  $^3\text{H}$ -T observada en las NSPCs *c-fos* *+/+* en los ensayos de proliferación a los 14 días de cultivo.

Estudios previos han demostrado que sistemas tisulares con una elevada actividad proliferativa presentan un contenido de membranas de retículo endoplásmico (RE) significativamente mayor comparado con sistemas en donde la actividad proliferativa es muy baja (Silvestre, Maccioni et al. 2009). Se ha postulado que estos hallazgos se encuentran relacionados a la necesidad del sistema de generar membranas con una alta tasa, ya que no puede haber proliferación celular sin la correspondiente duplicación de las organelas celulares, y es el RE el principal sitio de síntesis de lípidos, componente mayoritario de las membranas celulares. Teniendo en cuenta que el agregado de c-Fos recombinante sólo modifica la marcación de fosfolípidos totales en extractos totales de 14 días de cultivo pero no en extractos totales de 7 días de cultivo, se decidió comparar el contenido de retículo endoplásmico (RE) entre ambas condiciones. Se analizó la expresión de GRP78 BiP (marcador de RE) en extractos totales de NSPCs *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* obtenidas a los 7 y 14 días de cultivo celular. Los ensayos de western blot indican que el contenido relativo de GRP78 BiP resulta ser mayor en extractos proteicos de NSPCs obtenidos a los 7 días de cultivo comparado con extractos de 14 días de cultivo (tanto para la condición *wt* como para la *ko*) (Figura 19B). Estos resultados sugieren que la maquinaria metabólica responsable de generar los lípidos para la génesis de las membranas biológicas se encuentra completamente activada en NSPCs a los 7 días de cultivo en ambas condiciones, y por lo tanto la presencia de c-Fos (ya sea *in situ* o mediante el agregado externo) no afecta dicha actividad.



**Figura 19. Marcación *in vitro* de fosfolípidos**

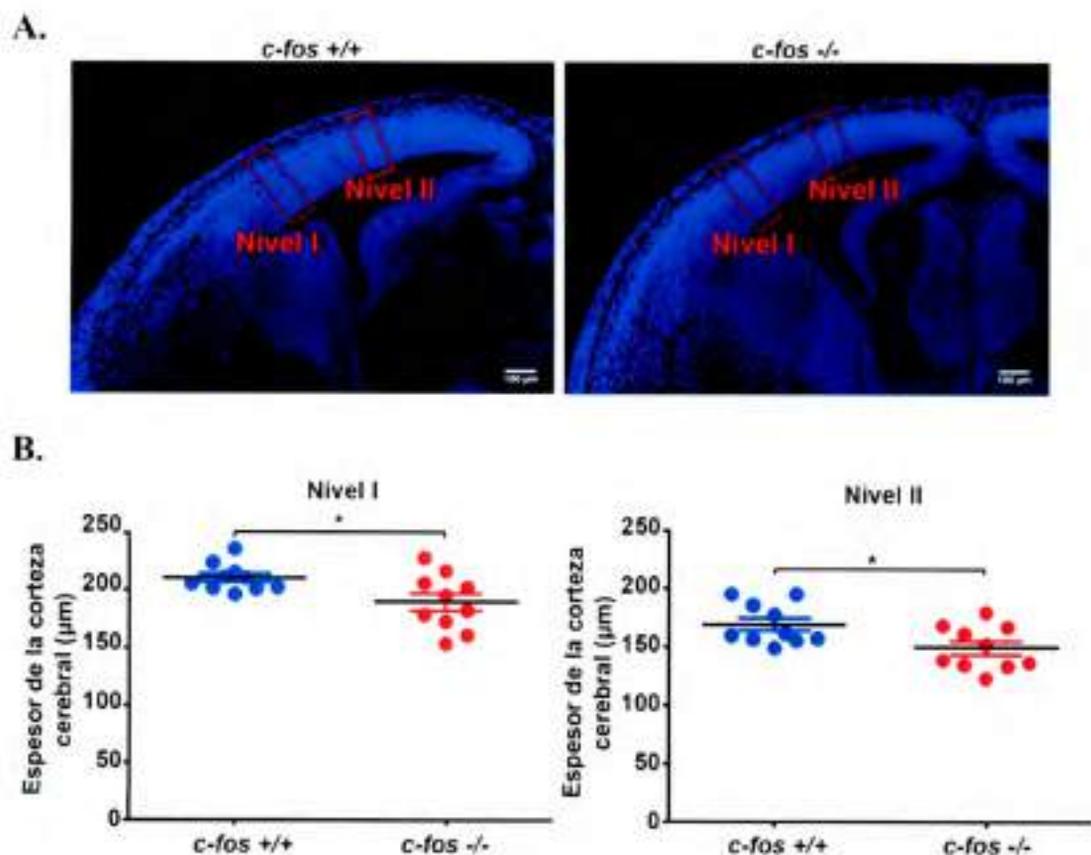
**A.** Histogramas del porcentaje de marcación de lípidos totales respecto al control para extractos totales de neuroesferas *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup> a los 7 y 14 días de cultivo primario. La muestra *wt* sin el agregado de *c-Fos* recombinante se considera la condición control. Cada determinación se realizó por quintuplicado. Los resultados se muestran como la media del % de marcación de lípidos  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  en animales *c-fos*<sup>-/-</sup> respecto a los animales *c-fos*<sup>+/+</sup>. **B.** Western Blot para GRP78 BiP (marcador de retículo endoplásmico) de extractos totales de neuroesferas *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup> a los 7 y 14 días de cultivo primario. La marcación para tubulina se utilizó como control de carga de los geles.

### - CAPITULO 3. ANÁLISIS DE LA NEUROGÉNESIS EN EMBRIONES *c-fos* -/-

El adecuado comportamiento de la población de NSPCs resulta de fundamental importancia para la generación de la corteza cerebral adulta. Los estudios realizados indican que las NSPCs procedentes de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* -/- presentan un comportamiento *in vitro* diferente al de las NSPCs *c-fos* +/+. No obstante, teniendo en cuenta que es la actividad *in vivo* de las NSPCs la que realmente determinará el desarrollo normal de la corteza cerebral, y que el comportamiento celular *in vitro* no siempre representa lo que realmente ocurre en el tejido, resulta importante analizar el comportamiento *in vivo* de la población de NSPCs durante el desarrollo de la corteza cerebral de embriones *c-fos* +/+ y *c-fos* -/-. En particular nos centramos en estudiar el proceso de la neurogénesis, debido a que diversos antecedentes indican que *c-fos* participa en algunos modelos de diferenciación neuronal (Gil, Bussolino et al. 2004; Eriksson, Taskinen et al. 2007) y que un adecuado desarrollo de las diferentes capas de la corteza cerebral es de fundamental importancia para un comportamiento normal del animal, situación no alcanzada por los ratones *c-fos* -/- (Baum, Brown et al. 1994; Paylor, Johnson et al. 1994). Como se indicó en la Introducción, el proceso de la neurogénesis ocurre entre los 11 y 17 días de desarrollo embrionario (E11 y E17 respectivamente) con un pico máximo a los 14.5 días (E14.5), por lo que el análisis se inició en este día del desarrollo embrionario.

#### **I- La corteza cerebral de E14.5 *c-fos* -/- presenta un menor espesor en comparación a sus contrapartes normales.**

Se analizó el espesor total de la corteza cerebral de E14.5, para lo cual cortes coronales de los cerebros embrionarios *c-fos* +/+ y *c-fos* -/- fueron teñidos con DAPI y visualizados bajo microscopio de epi-fluorescencia. El espesor total de la corteza fue analizada en dos niveles diferentes según se indica en cuadros rojos en la Figura 20A. Ambos niveles (nivel I y nivel II) muestran que el espesor de la corteza cerebral de embriones *c-fos* -/- resulta significativamente menor a la de embriones *c-fos* +/+ examinados en paralelo (Figura 20B).



**Figura 20. Análisis del espesor de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*.**

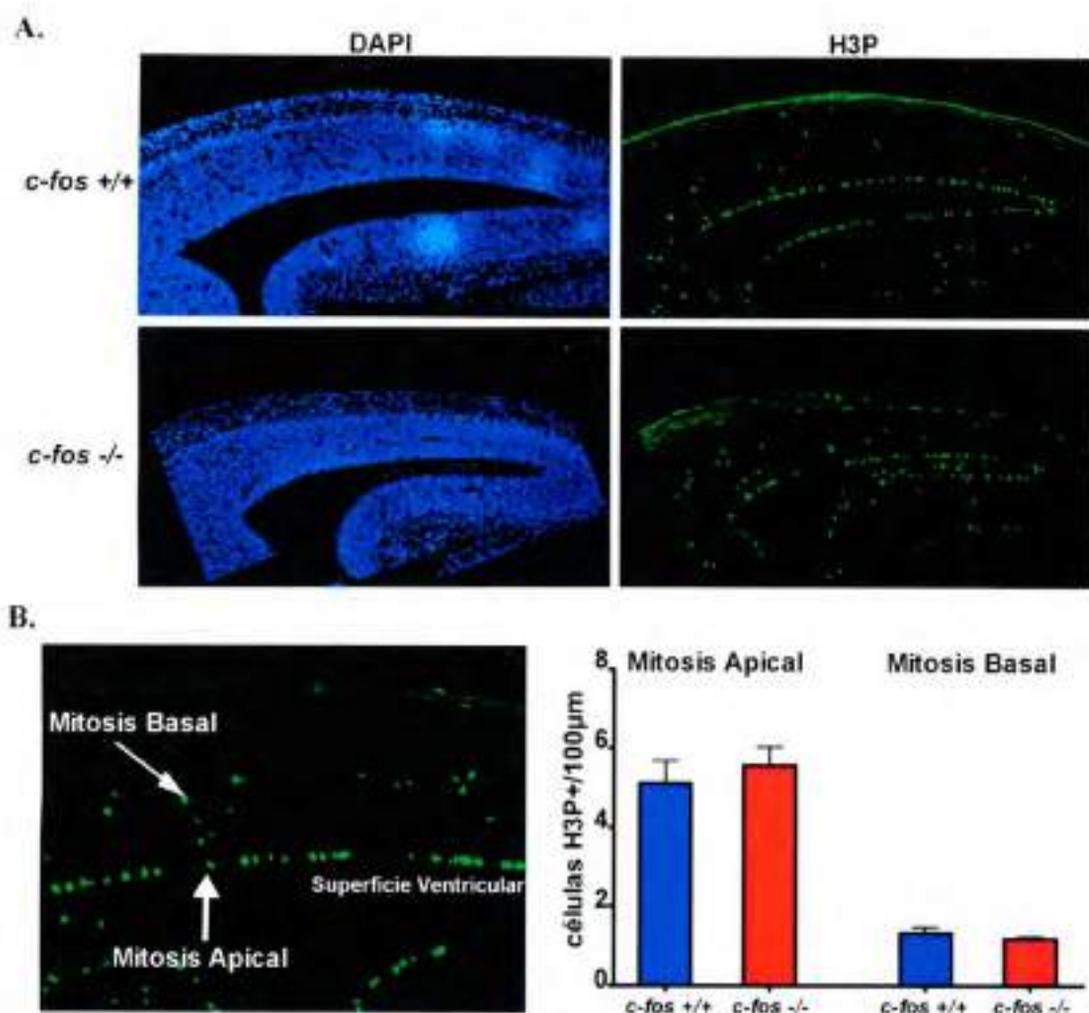
**A.** Cortes coronales de corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* fueron teñidos con DAPI y visualizados bajo microscopio de epi-fluorescencia. Los cuadros en rojo muestran los sectores utilizados para la cuantificación representada en B. **B.** El espesor total de la corteza cerebral fue medido en dos sectores diferentes localizados a distintos niveles en el eje derecha-izquierda (nivel I y II) como se muestra en A. Cuatro determinaciones fueron realizadas para cada muestra. Los resultados se expresan como la media del espesor total de la corteza cerebral ( $\mu\text{m}$ )  $\pm$  SEM ( $n=10$ ). Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \* $p<0.05$  en animales *c-fos* *-/-* respecto a los animales *c-fos* *+/+*.

El análisis del fenotipo adulto (capítulo I) indica que la corteza cerebral adulta de ratones *c-fos* *-/-* presenta un menor número total de células en comparación a ratones *c-fos* *+/+*, por lo que en el estadio embrionario podría postularse una situación similar. Es decir, que el menor espesor de la corteza cerebral en desarrollo de E14.5 *c-fos* *-/-* podría deberse a un menor número de células en esa región del cerebro. Una disminución en mitosis y/o un incremento en la muerte celular en los embriones *c-fos* *-/-*, una alteración en la diferenciación y/o migración de las NSPCs *c-fos* *-/-* o una concomitancia de más de uno de estos eventos podrían ser la explicación al menor espesor de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *-/-*. A continuación se analizarán algunos de estos aspectos de la neurogénesis en los E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*.

## II- Mitosis y apoptosis en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* $+/+$ y *c-fos* $-/-$ .

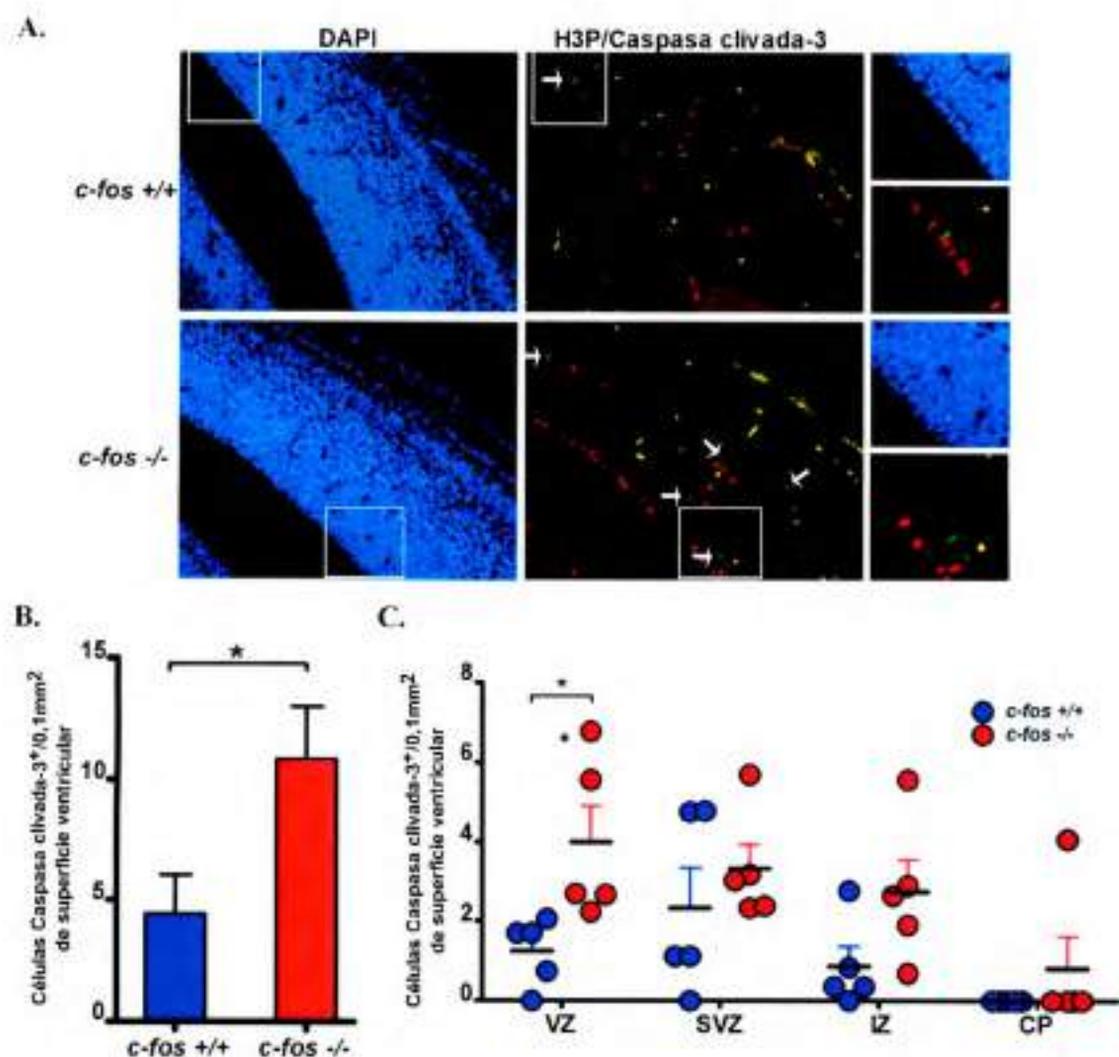
Para determinar si una disminución en mitosis en los embriones *c-fos*  $-/-$  contribuye a las diferencias observadas en el tamaño de la corteza cerebral embrionaria y por ende en el tamaño final alcanzada por la misma en la etapa adulta (Figura 12B), se analizó el número de células en mitosis presentes en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$  mediante inmunotinción de cortes coronales de la neocorteza con el marcador de células en fase M del ciclo celular, Histona H3 Fosforilada (H3P: Phospho Histone H3) (Gurley, D'Anna et al. 1978) (Figura 21A). Para cuantificar el número de células positivas, se realizó la distinción entre aquellas células que experimentan una mitosis de tipo apical (sobre la superficie ventricular del neuroepitelio) o una mitosis de tipo basal (mitosis no superficial). No se encontraron diferencias significativas en el número de eventos mitóticos, tanto apicales como basales, entre los embriones *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$  (Figura 21B), indicando que el menor tamaño de la corteza cerebral de animales *c-fos*  $-/-$  no estaría determinado por diferencias en el número de células en mitosis entre ambos grupos de animales, al menos en esta etapa del desarrollo.

El número de células en apoptosis fue examinado por inmunomarcación de cortes coronales de la neocorteza con un anticuerpo contra casapasa clivada-3 (anti caspasa clivada-3) y posterior cuantificación del número de células que además de ser positivas para caspasa clivada-3, presentaban un núcleo picnótico (Figura 22A). Un mayor número total de células apoptóticas fue observado en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*  $-/-$  en comparación a sus contrapartes normales (Figura 22B). Asimismo, las células positivas fueron diferenciadas de acuerdo a su localización dentro de la corteza en desarrollo en las siguientes regiones: zona ventricular (VZ), zona subventricular (SVZ), zona intermedia (IZ) y plato cortical (CP). Al realizar esta distinción se observó que el mayor número de células apoptóticas se localiza principalmente en la VZ de la corteza de E14.5 *c-fos*  $-/-$  (Figura 22C), indicando que un incremento en la muerte celular en la VZ contribuye al menor espesor de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*  $-/-$  y al menor número de células presentes en la corteza cerebral adulta de ratones *c-fos*  $-/-$ .



**Figura 21.** Mitosis apical y basal en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-*.

**A.** Inmunofluorescencia de cortes coronales de la neocorteza de E14.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-* revelados para el marcador de mitosis Histona H3 Fosforilada (H3P). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **B.** Fotografía representativa de un corte coronal de la neocorteza en desarrollo en donde se indica la localización de una célula en mitosis basal y una en mitosis apical (izquierda). Esta distinción fue considerada al realizar la cuantificación del número de células en mitosis. Los resultados se representan en un histograma y se expresan como la media del número de células positivas para H3P/100 $\mu$ m  $\pm$  SEM (n=6) (derecha). Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. No se observaron diferencias significativas entre la condición *wt* y *ko*.



**Figura 22. Apoptosis celular en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-*.**

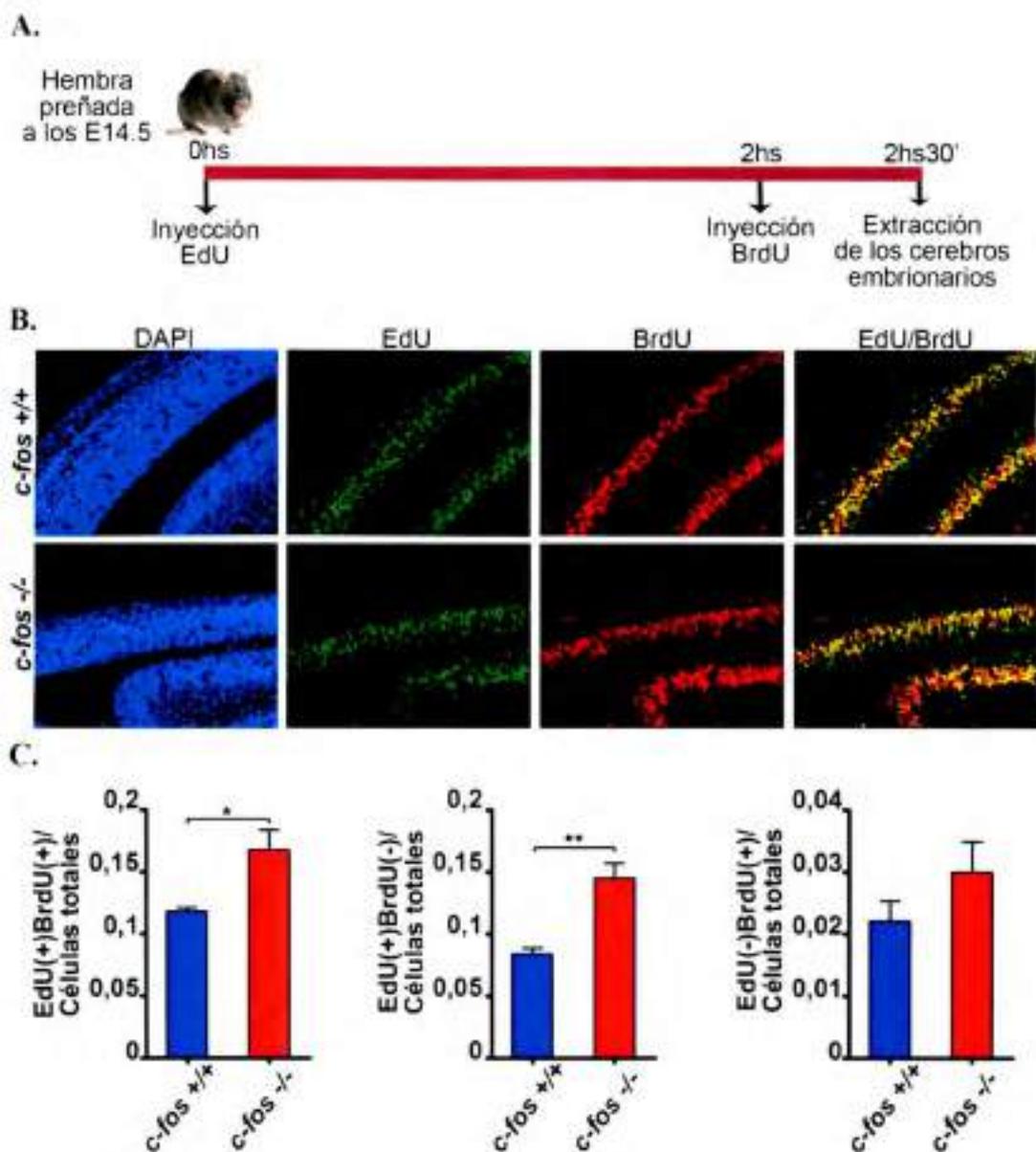
**A.** Inmunofluorescencia de cortes coronales de la neocorteza de E14.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-* revelados para Histona H3 Fosforilada (H3P) (rojo) y caspasa clivada-3 (marcador de células en apoptosis) (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las flechas muestran células en apoptosis (células positivas para caspasa clivada-3) y el área recuadrada se muestra magnificada en la columna derecha. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) usando un objetivo 40X de magnificación **B.** Cuantificación del número total de células positivas para caspasa clivada-3 por 0,1mm<sup>2</sup> de superficie de corteza cerebral en desarrollo para E14.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-*. **C.** Cuantificación del número total de células positivas para caspasa clivada-3 por 0,1mm<sup>2</sup> de superficie de corteza cerebral en desarrollo para E14.5 *c-fos +/+* (puntos azules) y *c-fos -/-* (puntos rojos) en función de su localización en: zona ventricular (VZ), zona sub-ventricular (SVZ), zona intermedia (IZ) y plato cortical (CP). Los resultados se muestran como la media del número de células positivas para caspasa clivada-3/0,1mm<sup>2</sup> de superficie ventricular ± SEM (n=4). Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch (para el punto B) y ANOVA doble con test de Bonferroni (para el punto C). \*p<0.05 en animales *c-fos -/-* respecto a los animales *c-fos +/+*.



### III- Análisis del ciclo celular en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* $-/-$ y *c-fos* $+/+$ .

Una adecuada regulación del ciclo celular resulta crítico para la generación de las diferentes poblaciones neuronales presentes en la corteza cerebral. Diversos estudios han permitido determinar la duración de las distintas fases del ciclo celular en la población de células progenitoras presentes en la corteza cerebral en desarrollo, y como varían a medida que la neurogénesis transcurre. Uno de los ensayos que permite evaluar el pasaje de las poblaciones progenitoras a través de las distintas fases del ciclo celular es el ensayo de inyección dual con EdU y BrdU, dos análogos de timidina que se incorporan durante la fase S del ciclo.

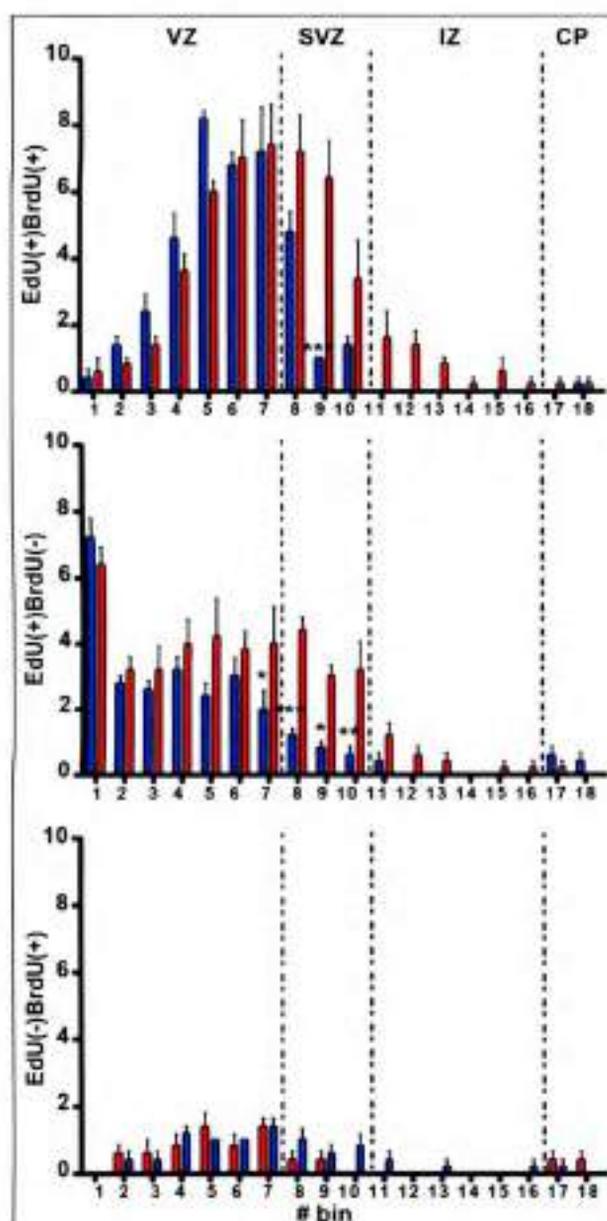
Con el objetivo de poder comparar entre E14.5 *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ , la distribución de las poblaciones celulares progenitoras a través de las distintas fases del ciclo celular, se realizaron ensayos de inyección dual con EdU y BrdU en hembras preñadas a los E14.5. El esquema de inyección utilizado (Figura 23A) permite distinguir células en las siguientes fases del ciclo celular: i) células en fase S, son las células EdU y BrdU positivas [EdU(+) BrdU(+)]; ii) células en fase G2 temprana al momento de la inyección con BrdU o S tardía al momento de la inyección con EdU, son las células EdU(+) pero BrdU(-) y iii) células en fase G1 al momento de la inyección con EdU o S temprana al momento de la inyección con BrdU, son células BrdU(+) pero EdU(-). Luego de aplicado el esquema de inyección, los cerebros embrionarios fueron extraídos y procesados para realizar la detección por inmunofluorescencia de las células que incorporaron EdU, BrdU o ambos, a nivel de la región dorso-medial de la corteza cerebral en desarrollo (Figura 23B). Los preparados fueron visualizados bajo microscopio de epi-fluorescencia e imágenes representativas para cada caso fueron tomadas. La cuantificación de las fotografías fue realizada utilizando una grilla graduada que divide la neocorteza en 18 rectángulos iguales de 10 $\mu$ m de alto por 100 $\mu$ m de ancho (según se indica en Materiales y Métodos). El número total de células EdU(+) BrdU(+) respecto al total de células (DAPI positivas) presentes en la superficie ventricular analizada (180 $\mu$ m x 100 $\mu$ m) resultó mayor para el caso de E14.5 *c-fos*  $-/-$  (Figura 23C, panel izquierdo). Al analizar la distribución de esta población celular en la neocorteza, puede observarse que este incremento se debe a un mayor número de células EdU(+)BrdU(+) en la SVZ (región correspondiente a la bin 8 a 10) (Figura 24, panel superior) de los E14.5 *c-fos*  $-/-$  en comparación a sus contrapartes normales.



**Figura 23. Ensayos de inyección dual con EdU y BrdU.**

**A.** Esquema de inyección dual con EdU (1mg/mL) y BrdU (5mg/mL) en hembras preñadas a los 14,5 días de gestación. Se tomó como tiempo 0 el momento de la inyección con EdU, 2 horas posteriores a la misma se realizó la inyección con BrdU y a los 30 minutos, luego de esta última inyección, se extrajeron y fijaron los cerebros embrionarios. Todas las inyecciones se realizaron por vía IP. **B.** Inmunofluorescencia de cortes coronales de la región dorso-medial de la corteza cerebral de E14,5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-*, para EdU (verde, segunda columna) y BrdU (rojo, tercera columna); en la última columna se muestra la superposición de ambas tinciones. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (primera columna). Los embriones utilizados fueron obtenidos a partir de hembras preñadas sometidas al esquema de inyección mostrado en A. **C.** Histogramas representativos de la cuantificación del número total de núcleos EdU(+)/BrdU(+), EdU(+)/BrdU(-) y EdU(-)/BrdU(+)/número total de células (núcleos DAPI positivos), para cortes coronales de E14,5 *c-fos +/+* (barras azules) y *c-fos -/-* (barras rojas). Los resultados se muestran como la media del número de núcleos positivos para cada condición  $\pm$  SEM (n=4). Se realizaron cuatro cuantificaciones por cada caso analizado. Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  en animales *c-fos -/-* respecto a los animales *c-fos +/+*.

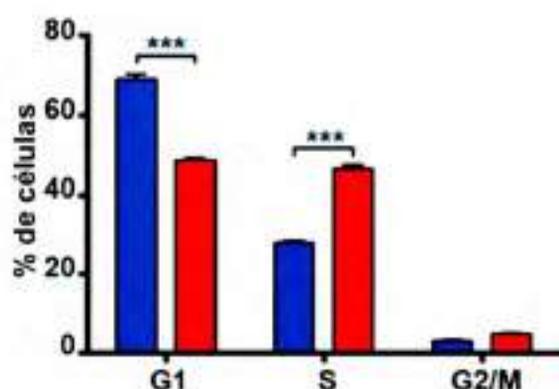
Por otro lado, la cuantificación de la población celular  $\text{EdU}(+)\text{BrdU}(-)$  relativa al número total de células, muestra un incremento de esta población celular en la corteza cerebral de  $E14.5$   $c\text{-fos}^{-/-}$  (Figura 23C) en comparación a los animales  $wt$ . Este incremento se debe a la presencia de un mayor número de células  $\text{EdU}(+)\text{BrdU}(-)$  en posiciones alejadas a la superficie ventricular (desde la bin 7 a la 10) en la corteza cerebral de embriones  $ko$  (Figura 24, panel medio). En condiciones normales, la mayor parte de las células en fase G2 se localizan cerca de la superficie ventricular (Etienne, Bery et al. 2014); cambios en esta distribución sugieren alteraciones en la migración nuclear intercinética. Para el caso de la población celular  $\text{EdU}(-)\text{BrdU}(+)$ , no se observaron diferencias entre ambos genotipos (Figura 23C y Figura 24, panel inferior)



**Figura 24**

Histogramas correspondientes al número de núcleos  $\text{EdU}(+)\text{BrdU}(+)$  (panel superior),  $\text{EdU}(+)\text{BrdU}(-)$  (panel medio) y  $\text{EdU}(-)\text{BrdU}(+)$  (panel inferior)/bin para cortes coronales de  $E14.5$   $c\text{-fos}^{+/+}$  (barras azules) y  $c\text{-fos}^{-/-}$  (barras rojas). Las distintas regiones de la neocorteza como se describe en la figura 22C, son indicadas. Los resultados se muestran como la media del número de núcleos positivos para cada condición  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). Se realizaron cuatro cuantificaciones por cada caso analizado. Análisis estadístico ANOVA doble con test de Bonferroni. \*\*\* $p<0.001$ , \*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$  en animales  $c\text{-fos}^{-/-}$  respecto a los animales  $c\text{-fos}^{+/+}$ .

Estos resultados indican que en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup> un mayor número de células progenitoras se encuentran en la fase S del ciclo celular. Sin embargo, este incremento no se ve reflejado en un aumento en el número de células en mitosis (Figura 21) pero si se observa mayor muerte celular en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup> en comparación a la condición *wt* (Figura 22). El incremento de células en fase S sin un aumento de células en fase M sugiere un incremento en la duración del ciclo celular de la población progenitora de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup>. Al realizar ensayos de marcación con PI de NSPCs procedentes de la corteza cerebral de E14.5 luego de 4 días de cultivo celular, se observó un mayor porcentaje de células en fase S y una disminución del porcentaje de células en fase G1 del ciclo celular en las NSPCs *c-fos*<sup>-/-</sup> en comparación a las NSPCs *c-fos*<sup>+/+</sup> (Figura 25). Teniendo en cuenta que no existen diferencias significativas en el número de células en mitosis, los últimos resultados sugieren que las NSPCs *c-fos*<sup>-/-</sup> permanecen más tiempo en la fase S del ciclo lo que determinaría un incremento en la duración de su ciclo celular en comparación a las NSPCs *c-fos*<sup>+/+</sup>.

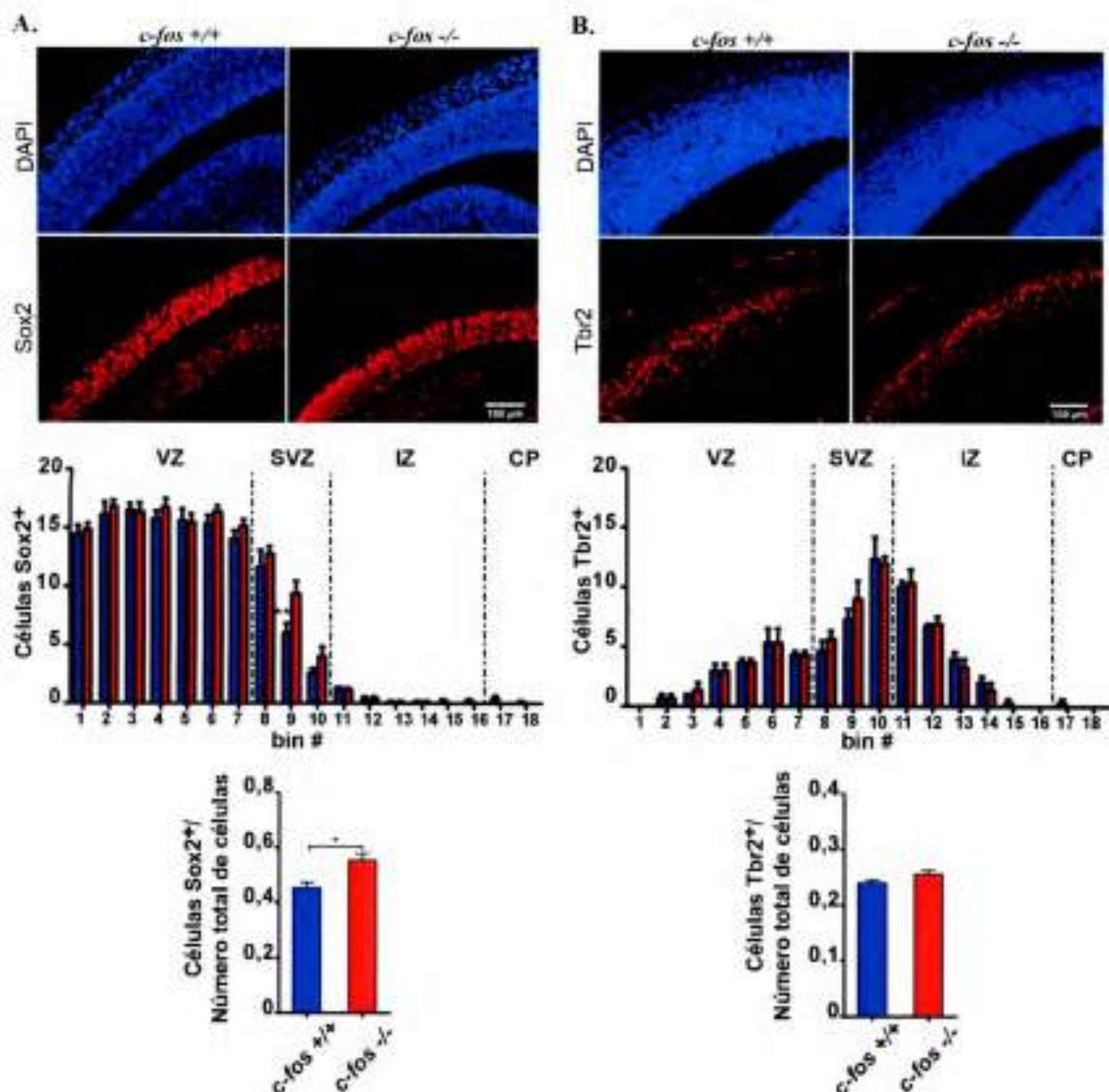


**Figura 25**

Histograma representativo del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular (fase G1, fase S, fase G2/M) luego de la tinción con PI de NSPCs *c-fos*<sup>+/+</sup> (barras azules) y *c-fos*<sup>-/-</sup> (barras rojas), obtenidas de la corteza cerebral de E14.5 y crecidas durante 4 días en cultivo celular. Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \*\*\* $p < 0.001$  en animales *c-fos*<sup>-/-</sup> respecto a los animales *c-fos*<sup>+/+</sup>.

#### IV- Distribución de la población de NSPCs en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*.

Durante el desarrollo de la neocorteza se distinguen dos poblaciones de NSPCs: la población de RGCs, menos diferenciadas, y la población de células progenitoras intermedias (IPCs) (Englund, Fink et al. 2005). La presencia de estas dos poblaciones celulares fue analizada mediante inmunomarcación de cortes coronales de la corteza cerebral en desarrollo de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*. El factor de transcripción Sox2 fue utilizado como marcador de la población de RGCs y IPCs tempranas (Graham, Khudyakov et al. 2003; Hutton and Pevny 2011), mientras que Tbr2 fue empleado para la identificación de la población de IPCs (Martinez-Cerdeno, Noctor et al. 2006). Luego de realizar la inmunotinción con los anticuerpos correspondientes y con DAPI para la detección de los núcleos, los preparados fueron visualizados bajo microscopio de epifluorescencia e imágenes representativas para cada caso fueron tomadas. La cuantificación de las fotografías fue realizada utilizando una grilla graduada que divide la neocorteza en 18 rectángulos iguales de 10 $\mu$ m de alto por 100 $\mu$ m de ancho (según se indica en Materiales y Métodos). El número total de células Sox2 positivas respecto al número total de células (DAPI positivas) presentes en la superficie ventricular analizada (180 $\mu$ m x 100 $\mu$ m) resultó mayor para el caso de E14.5 *c-fos* *-/-*. Al analizar esta población celular en función de su localización dentro de la neocorteza, puede observarse que este incremento se debe a un mayor número de células Sox2 positivas en la SVZ (región correspondiente a la bin 8 a 10) (Figura 26A) de los E14.5 *c-fos* *-/-* en comparación a sus contrapartes normales. No se observaron diferencias significativas en la expresión de Tbr2 entre ambos grupos de embriones (Figura 26B), indicando que la falta de *c-fos* podría impactar sobre poblaciones celulares particulares dependiendo del estadio de diferenciación de los progenitores neurales.



**Figura 26.** Análisis de la población de RGCs y IPCs en E14.5 *c-fos* <sup>+/+</sup> y *c-fos* <sup>-/-</sup>.

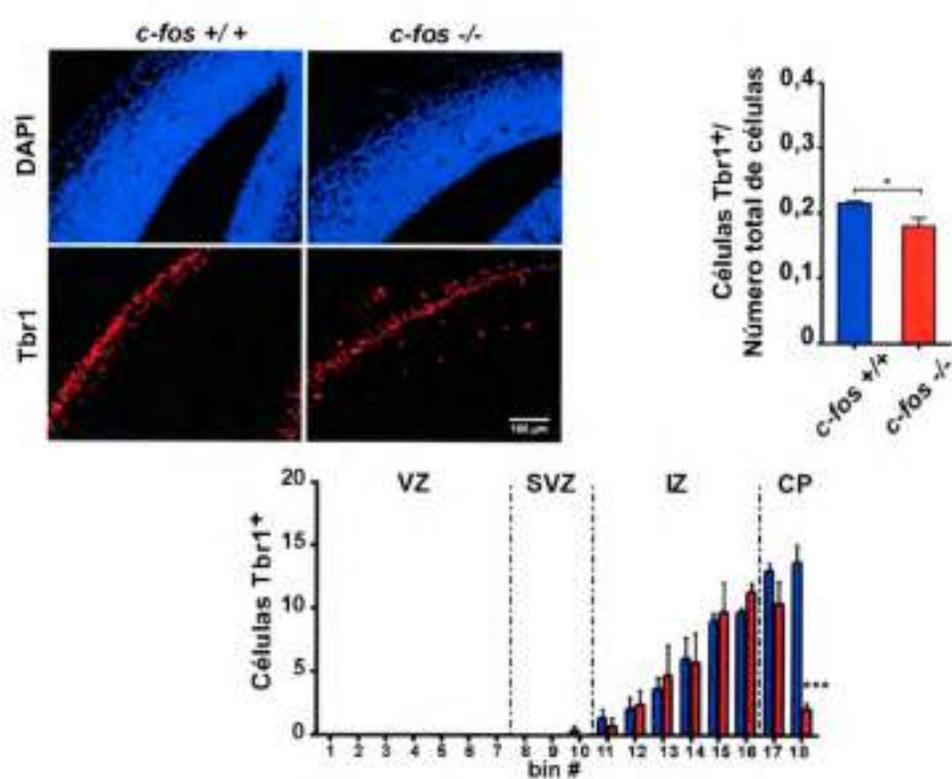
Cortes coronales de la corteza cerebral de E14.5 fueron analizados en el sector dorso-medial de la pared cerebral. Este sector fue dividido en 18 rectángulos (bin) iguales de 100µm de longitud en su eje medio-lateral y 10µm de altura en su eje radial. Los rectángulos fueron alineados de modo tal que el primero se encuentre adyacente a la superficie del ventrículo (V). Se muestran inmunofluorescencias representativas para Sox2 (A) y Tbr2 (B) de cortes coronales de E14.5 *c-fos* <sup>+/+</sup> y *c-fos* <sup>-/-</sup>. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y las imágenes visualizadas con microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) usando un objetivo 40X de magnificación. Los histogramas del panel inferior muestran la cuantificación del número total de núcleos Sox2 (A) o Tbr2 (B) positivos/número total de células (núcleos DAPI positivos), mientras que los del panel medio muestran las cuantificaciones correspondientes al número de núcleos Sox2 (A) o Tbr2 (B) positivos/bin para cortes coronales de E14.5 *c-fos* <sup>+/+</sup> (barras azules) y *c-fos* <sup>-/-</sup> (barras rojas). Las distintas regiones de la neocorteza como se describen en la figura 22C, son indicadas. Los resultados se muestran como la media del número de núcleos positivos para cada marcador ± SEM (n=4). Se realizaron cuatro cuantificaciones por cada caso analizado. Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch (para el panel inferior del punto A y B) y ANOVA doble con test de Bonferroni (para el panel medio del punto A y B). \*\*p<0.01, \*p<0.05 en animales *c-fos* <sup>-/-</sup> respecto a los animales *c-fos* <sup>+/+</sup>.

## V- La población de células neuronales post-mitóticas se encuentra reducida en los E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup>.

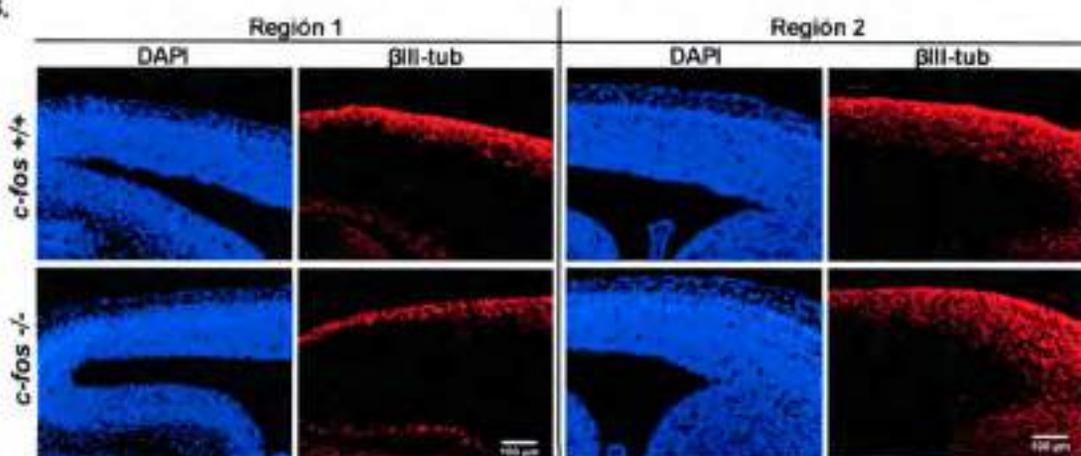
La transición desde IPC a neuronas post-mitóticas está marcada por la disminución en la expresión del factor de transcripción Tbr2 y un incremento en la expresión de Tbr1 (Bedogni, Hodge et al. 2010). Es por ello que para analizar la población de neuronas post-mitóticas de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup> y *c-fos*<sup>+/+</sup>, se estudió el patrón de expresión de Tbr1 mediante inmunotinción de cortes coronales de cerebro embrionario. La región positiva para Tbr1 resultó ser de menor espesor en E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup>, ya que la cuantificación correspondiente muestra la ausencia de células Tbr1<sup>+</sup> en la posición 18 (bin #18) de la corteza cerebral en desarrollo de embriones *c-fos*<sup>-/-</sup> (Figura 27A). Asimismo, el número total de células Tbr1<sup>+</sup> respecto al número total de células presentes en la superficie ventricular analizada (180µm x 100µm), resulta menor en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup> en comparación a la condición *wt* (Figura 27A). En conjunto, estos resultados sugieren una disminución de la población de células neuronales post-mitóticas en E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup> en comparación a los E14.5 *c-fos*<sup>+/+</sup>.

Con el objetivo de confirmar esta reducción en la población de células neuronales post-mitóticas en E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup>, se analizó el marcador de diferenciación neuronal βIII-tubulina (un marcador pan-neuronal temprano) (Lee, Tuttle et al. 1990). Una reducción en el espesor de la región positiva para βIII-tubulina como así también en el espesor total de la corteza cerebral fue observada en ambas zonas examinadas de la región dorso-medial de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup> en comparación a los E14.5 *c-fos*<sup>+/+</sup> (Figura 27B y cuantificación en Figura 27C). No se encontraron diferencias significativas en el espesor de la región negativa para βIII-tubulina (Figura 27C).

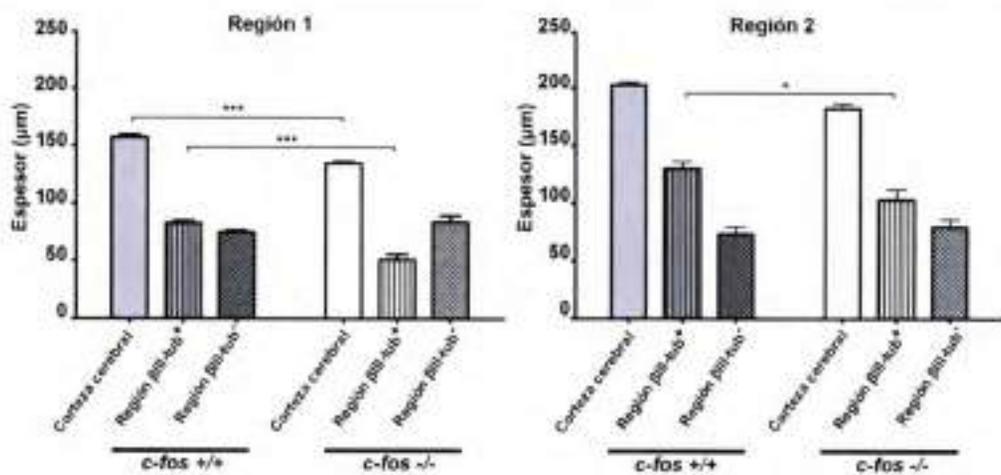
A.



B.



C.

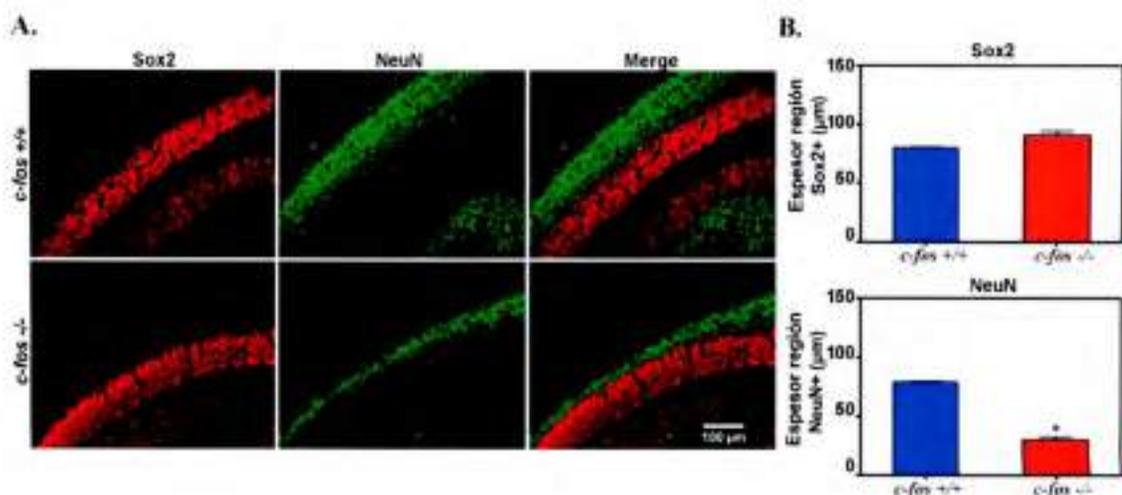


**Figura 27. Población de células neuronales post-mitóticas en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*.**

**A.** Inmunofluorescencia para Tbr1 de cortes coronales de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y las imágenes visualizadas con microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) usando un objetivo 40X de magnificación. Las imágenes fueron analizadas usando el mismo criterio descrito en la Figura 23. El histograma del panel derecho muestra la cuantificación del número total de núcleos Tbr1 positivos/número total de células (núcleos DAPI positivos), mientras que en el panel inferior se representa la cuantificación correspondiente del número de núcleos Tbr1 positivos/bin para cortes coronales de E14.5 *c-fos* *+/+* (barras azules) y *c-fos* *-/-* (barras rojas). Las distintas regiones de la neocorteza son indicadas. Los resultados se muestran como la media del número de núcleos Tbr1 positivos  $\pm$  SEM (n=4). Se realizaron cuatro cuantificaciones por cada caso analizado. **B.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias de cortes coronales de dos regiones diferentes del sector dorsal de la pared cerebral de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* teñidos para DAPI (azul) y  $\beta$ III-tubulina (rojo). **C.** Cuantificación del espesor de la zona positiva para  $\beta$ III-tubulina, de la zona negativa para  $\beta$ III-tubulina y del espesor total de la corteza cerebral de las regiones mostradas en B para E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*. Los resultados se muestran como la media del espesor ( $\mu$ m)  $\pm$  SEM (n=4). Se realizaron cuatro cuantificaciones para cada caso analizado. Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch (para el panel derecho superior del punto A) y ANOVA doble con test de Bonferroni (para el panel inferior del punto A y para la cuantificación en C). \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 en animales *c-fos* *-/-* respecto a los animales *c-fos* *+/+*.

## **VI- La expresión de los marcadores de diferenciación neuronal NeuN y MAP2 se encuentra reducida en E14.5 *c-fos* *-/-*.**

Teniendo en cuenta la disminución en la población de células Tbr1+ y la menor expresión de  $\beta$ III-tubulina en E14.5 *c-fos* *-/-*, se analizaron otros marcadores de diferenciación neuronal. Uno de estos marcadores es NeuN, proteína nuclear ampliamente expresada en neuronas maduras post-mitóticas (Mullen, Buck et al. 1992), el cual fue analizado junto con la expresión de Sox2 en cortes coronales del cerebro de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*. El espesor de la región positiva para Sox2 no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de embriones (Figura 28A, primera columna, y cuantificación en Figura 28B), mientras que el espesor de la región positiva para NeuN fue significativamente reducida en la condición *ko* (Figura 28A, segunda columna, y cuantificación en la Figura 28B). La tercera columna de la Figura 28A muestra la superposición de las inmunomarcaciones indicadas anteriormente.



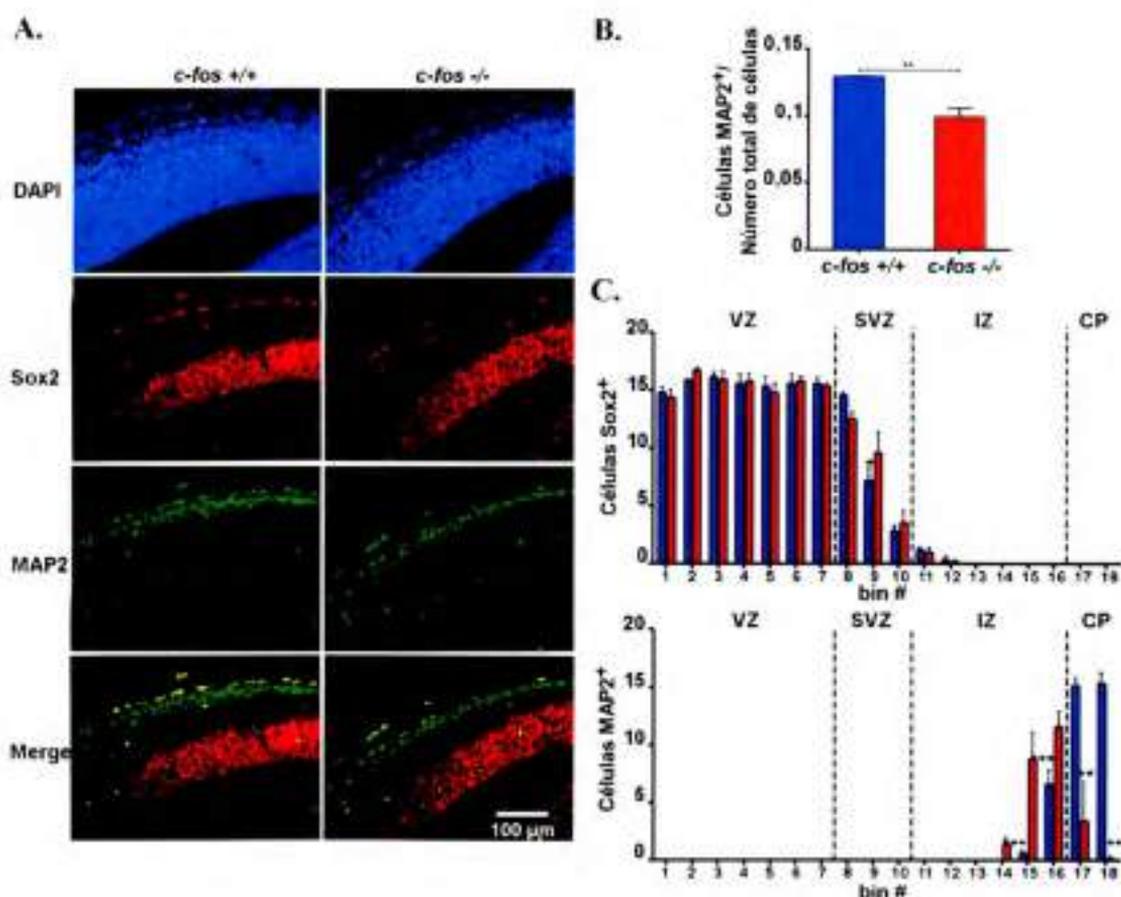
**Figura 28**

**A.** Fotografías representativas de la región dorso-medial de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* +/+ y *c-fos* -/- marcadas para Sox2 (rojo) y NeuN (verde). Las imágenes fueron obtenidas con microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) usando un objetivo 40X de magnificación. **B.** Cuantificación del espesor de la región positiva para Sox2 y NeuN de las regiones mostradas en A, para E14.5 *c-fos* +/+ y *c-fos* -/-. Se muestra la media del espesor de la región positiva para cada marcador (µm) ± SEM (n=4). Se realizaron cuatro cuantificaciones para cada caso analizado. Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \* $p < 0.05$  en animales *c-fos* -/- respecto a los animales *c-fos* +/+.

Otro marcador de diferenciación neuronal es la proteína MAP2, una proteína que estabiliza los microtúbulos de las dendritas en neuronas post-mitóticas y permite establecer el límite del plato cortical en la corteza cerebral en desarrollo (Izant and McIntosh 1980; Garner, Tucker et al. 1988). Para evaluar la presencia de las proteínas Sox2 y MAP2 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia sobre cortes coronales del cerebro de E14.5 *c-fos* +/+ y *c-fos* -/- (Figura 29A). Como se indicó anteriormente, el espesor de la región positiva para Sox2 (Figura 28B) no muestra diferencias significativas entre ambos grupos de embriones aunque un mayor número de células Sox2 positivas fue encontrada en la SVZ de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* -/- en comparación a los E14.5 *c-fos* +/+ (Figura 26A y Figura 29C). Al analizar la inmunomarcación para MAP2, la corteza cerebral E14.5 *c-fos* -/- presentó un menor número de células MAP2 positivas respecto al número total de células (DAPI positivas) en una superficie ventricular de 180µm x 100µm comparado a los E14.5 *c-fos* +/+. Asimismo, la distribución en la IZ y el CP de las células MAP2 positivas resultó claramente diferente en comparación a los E14.5 *c-fos* +/+ (Figura 29C).

Los marcadores de diferenciación neuronal analizados (NeuN y MAP2) sugieren, en concordancia con los resultados obtenidos al realizar la inmunomarcación para Tbr1 y βIII-tubulina, una menor diferenciación neuronal y por ende una

disminución de la población de células neuronales post-mitóticas en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*<sup>-/-</sup> al compararlos con la condición *wt*.



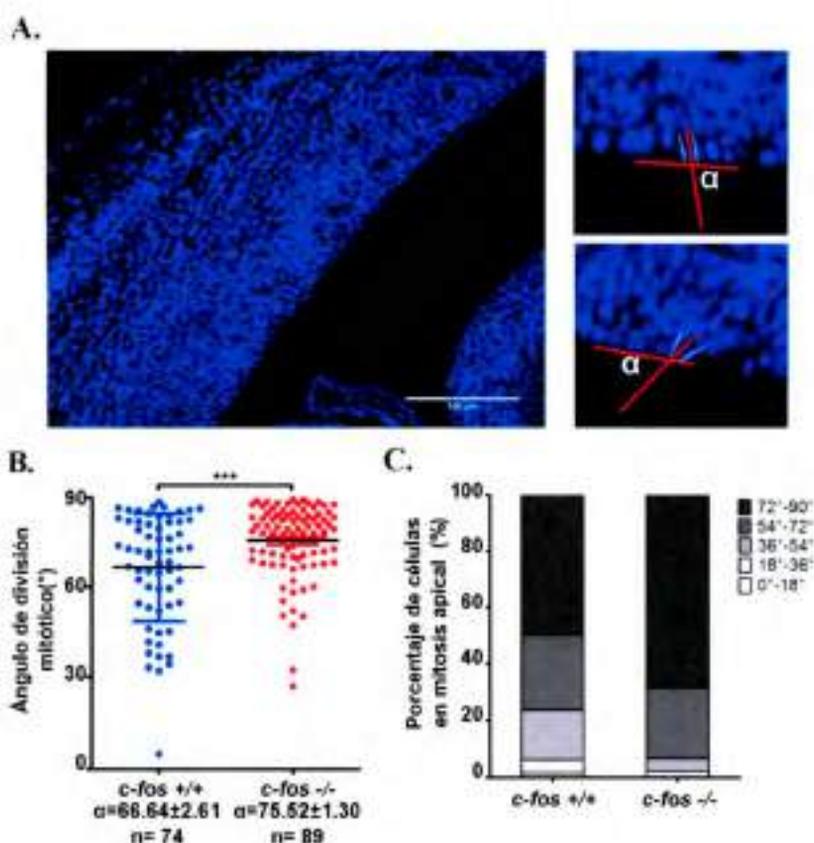
**Figura 29**

**A.** Inmunofluorescencia para Sox2 (rojo) y MAP2 (verde) de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup>. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y la superposición de las tinciones para Sox2 y MAP2 se muestra en la última fila. **B.** Cuantificación del número de células MAP2 positivas/número total de células en una superficie ventricular de 180 μm x 100 μm correspondiente a la región dorso-medial de la corteza cerebral mostrada en A. La media del número de células positivas/número total de células ± SEM fue calculada a partir de cinco muestras por genotipo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. **C.** Histogramas representativos de la distribución del número de núcleos positivos para Sox2 y MAP2/bin ± SEM (n=5). Se realizaron cuatro cuantificaciones para cada muestra analizada. Las diferentes regiones de la corteza cerebral son indicadas (VZ, SVZ, IZ y CP). Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch (punto B) y ANOVA doble con test de Bonferroni (punto C). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 en animales *c-fos*<sup>-/-</sup> respecto a los animales *c-fos*<sup>+/+</sup>.

## VII- NSPCs *c-fos*<sup>-/-</sup> presentan una menor tendencia a la diferenciación neuronal

Para algunos autores, el ángulo de división mitótico de las NSPCs que experimentan una mitosis de tipo apical (células radiales gliales o progenitores apicales), es un parámetro, aunque discutido, utilizado para evaluar el destino de las

células hijas producto de esa división celular (Haydar, Ang et al. 2003; Wilcock, Swedlow et al. 2007). Se considera que células que se comprometen hacia un determinado linaje celular (diferenciación) muestran un ángulo de división mitótico predominantemente horizontal (división asimétrica), mientras que células que expanden su población celular (auto-renovación) presentan un ángulo de división mitótico predominantemente vertical (división simétrica) (Haydar, Ang et al. 2003). Al analizar este ángulo de división en varios progenitores apicales, se observó que un mayor porcentaje de progenitores apicales *c-fos*<sup>-/-</sup> presentan un ángulo de división mitótico predominantemente vertical, en un rango entre 72°-90°, en comparación a los progenitores apicales *c-fos*<sup>+/+</sup> (68.54% vs 50.00% para progenitores *c-fos*<sup>-/-</sup> y *c-fos*<sup>+/+</sup>, respectivamente) (Figura 30B y Figura 30C). Estos resultados indican una preferencia de los progenitores *c-fos*<sup>-/-</sup> por la expansión de su población celular en detrimento de la diferenciación neuronal.

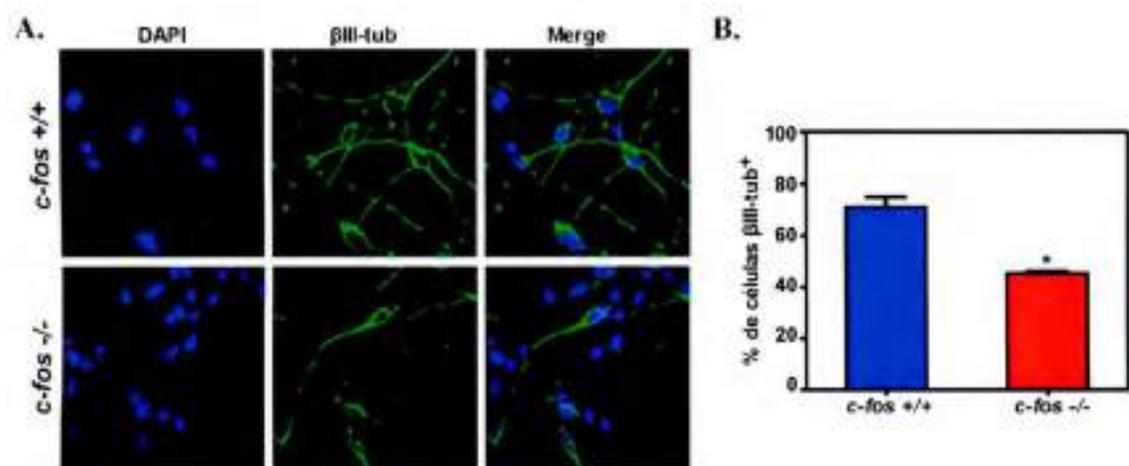


**Figura 30. Ángulo de división mitótico de progenitores apicales *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup>.**

**A.** Imagen representativa de un corte coronal de la corteza cerebral en desarrollo teñido con DAPI, en la cual el ángulo de las células en mitosis apical fue medido (izquierda). A la derecha se muestra la magnificación de una célula con un ángulo de división mitótico cercano a un ángulo vertical (arriba) y otra con un ángulo cercano a uno horizontal (abajo). **B.** La distribución de los ángulos de división mitótico de varios progenitores apicales fue medido. Los resultados se expresan como la media del ángulo

( $\alpha$ )  $\pm$  SEM. Las mediciones se realizaron en 4 embriones de cada genotipo y el n indicado corresponde al número total de divisiones mitóticas cuantificadas. C. De acuerdo a las mediciones obtenidas los valores del ángulo de división mitótico fueron distribuidos en 5 grupos, cada uno con un rango de  $18^\circ$  ( $0-18^\circ$ ,  $18^\circ-36^\circ$ ,  $36^\circ-54^\circ$ ,  $54^\circ-72^\circ$  y  $72^\circ-90^\circ$ ). Los resultados se expresan como el porcentaje de células en mitosis apical perteneciente a cada rango de ángulo para cada genotipo. Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \*\*\* $p < 0.001$  en animales *c-fos*<sup>-/-</sup> respecto a los animales *c-fos*<sup>+/+</sup>.

Para obtener otro parámetro que apoyara estas últimas observaciones, se comparó la capacidad de diferenciación neuronal de cultivos primarios obtenidos a partir de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup> tratados con el factor de crecimiento nervioso (NGF por sus siglas en inglés: Nerve Growth Factor) como inductor de diferenciación neuronal. Luego de cinco días de cultivo se realizó la inmunomarcación para  $\beta$ III-tubulina y DAPI (Figura 31A). Un menor porcentaje de células positivas para  $\beta$ III-tubulina fue cuantificado en la condición *ko* en comparación a la condición *wt* (Figura 31B) sin diferencias significativas en la muerte celular entre ambos cultivos celulares (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con la menor tendencia a la diferenciación neuronal de las NSPCs *c-fos*<sup>-/-</sup> observada al realizar los ensayos de diferenciación a partir de células obtenidas por disociación de neuroesferas primarias (luego de 7 días de cultivo primario) (Figura 17).

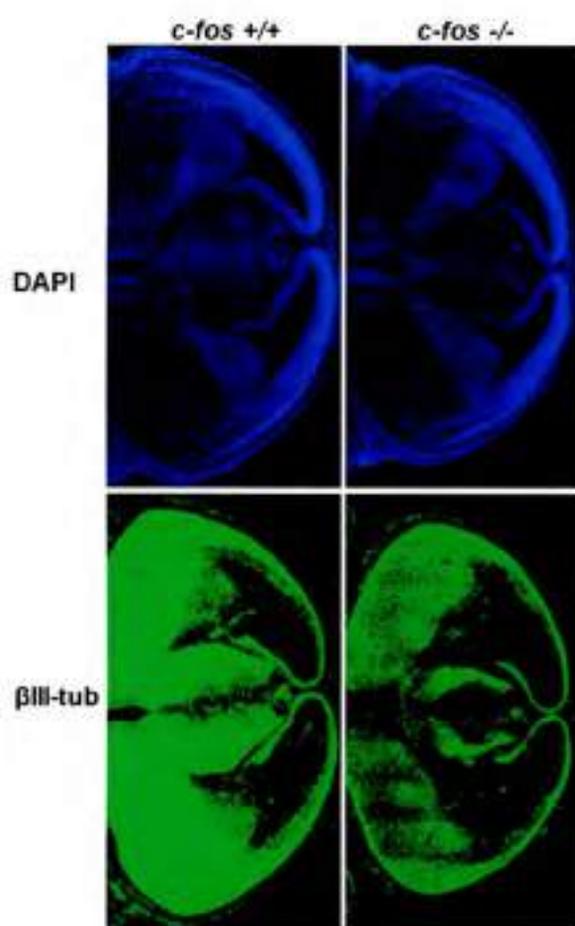


**Figura 31. Diferenciación neuronal en cultivos primarios de NSPCs *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup>.**

A. NSPCs obtenidas a partir de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*<sup>+/+</sup> y *c-fos*<sup>-/-</sup> fueron inducidas a diferenciación neuronal en cultivo durante cinco días mediante el agregado de 40ng/ml de NGF y posteriormente analizadas mediante inmunofluorescencia para  $\beta$ III-tubulina (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). B. Cuantificación del porcentaje de células positivas para  $\beta$ III-tubulina luego de la diferenciación mostrada en A. Los resultados se muestran como la media del porcentaje de células positivas para  $\beta$ III-tubulina  $\pm$  SEM (n=3). Las imágenes cuantificadas fueron obtenidas con microscopio de fluorescencia (Olympus FV-1000) usando un objetivo 20X de magnificación. Para cada caso analizado se cuantificaron diez imágenes diferentes. El número total de células con núcleo íntegro (de acuerdo a la tinción con DAPI) fue considerado como el 100% de células. Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \* $p < 0.01$  en animales *c-fos*<sup>-/-</sup> respecto a los animales *c-fos*<sup>+/+</sup>.

**VIII- La menor diferenciación neuronal de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* <sup>-/-</sup> se extiende a otras regiones del cerebro y se mantiene en estadios avanzados del desarrollo.**

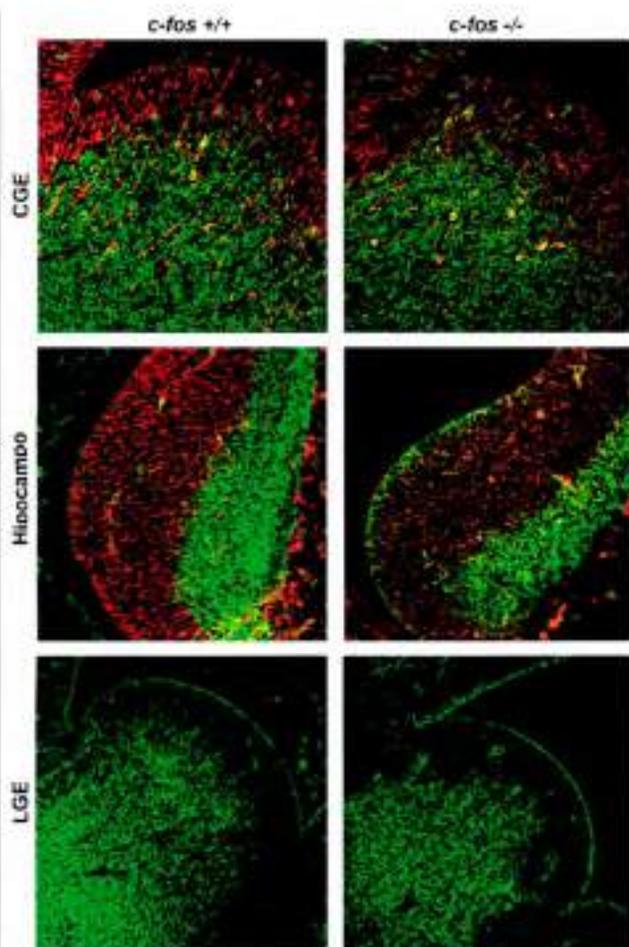
A los 14.5 días de desarrollo embrionario el proceso de diferenciación neuronal es un evento que no sólo se limita a la corteza cerebral sino que se extiende hacia otras regiones. Con el objetivo de comparar la diferenciación neuronal en otras regiones del cerebro entre E14.5 *c-fos* <sup>+/+</sup> y *c-fos* <sup>-/-</sup>, se analizó la inmunomarcación del cerebro embrionario completo para  $\beta$ III-tubulina (Figura 32). Se encontró una disminución de dicha marcación en E14.5 *c-fos* <sup>-/-</sup> en comparación a la condición *wt*.



**Figura 32**

Fotografías representativas de los ventrículos cerebrales teñidos con DAPI (azul) y  $\beta$ III-tubulina (verde) correspondiente a cortes coronales de la corteza cerebral en E14.5 *c-fos* <sup>+/+</sup> y *c-fos* <sup>-/-</sup>. Se observa una clara diferencia en la región positiva para  $\beta$ III-tubulina entre ambos grupos de embriones.

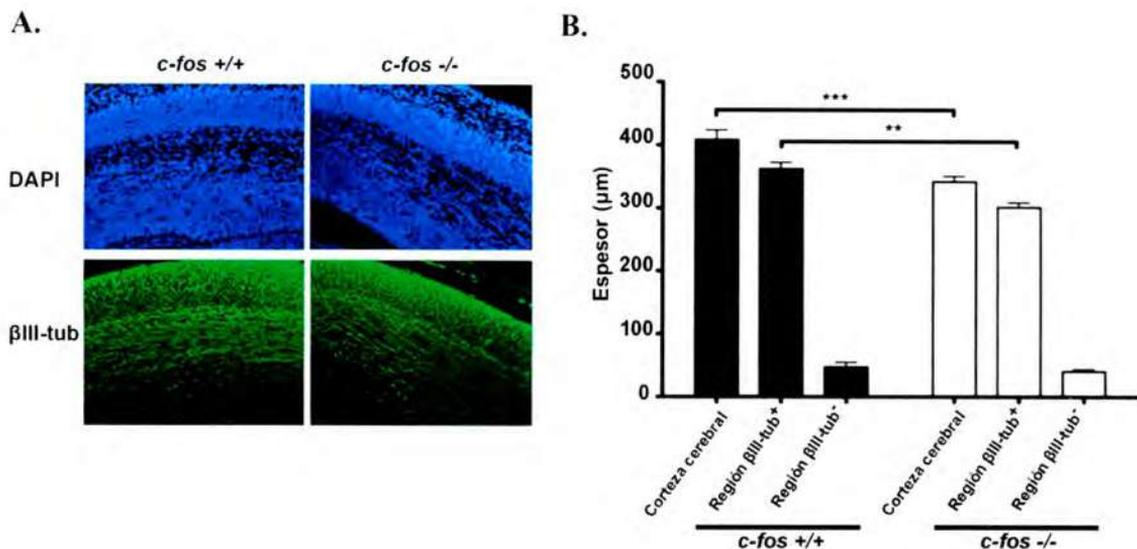
Asimismo, resultados similares se obtuvieron al analizar en mayor detalle regiones como hipocampo, eminencia ganglionar caudal y eminencia ganglionar lateral (Figura 33). Teniendo en cuenta estos resultados podemos proponer que la menor diferenciación neuronal, evaluada a través de la inmunomarcación para  $\beta$ III-tubulina, observada en E14.5 *c-fos* <sup>-/-</sup> no parece limitarse solamente al telencéfalo dorsal.



**Figura 33**

Inmunofluorescencia para  $\beta$ III-tubulina (verde) y Nestina (rojo) de cortes coronales del cerebro de E14.5 *c-fos*  $+/+$  (izquierda) y *c-fos*  $-/-$  (derecha). Se muestran imágenes representativas de la eminencia ganglionar caudal (CGE), del hipocampo y de la eminencia ganglionar lateral (LGE) (esta última marcada sólo para  $\beta$ III-tubulina), las cuales fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia (Olympus FV-1000) usando un objetivo 40X (para la CGE e hipocampo) y 20X (para la LGE) de magnificación.

Con el objetivo de poder determinar si la menor diferenciación neuronal se mantiene más allá de los 14.5 días de desarrollo embrionario, se analizaron cortes coronales de embriones de 16.5 días de desarrollo (E16.5) *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ . Estos cortes fueron sometidos a inmunomarcación para  $\beta$ III-tubulina (Figura 34A). Luego de realizar la cuantificación correspondiente, se observó un menor espesor total de la corteza cerebral y de la región positiva para  $\beta$ III-tubulina en E16.5 *c-fos*  $-/-$  en comparación a los E16.5 *c-fos*  $+/+$  (Figura 34B) sin diferencias significativas en el espesor de la región negativa para  $\beta$ III-tubulina. Por lo tanto, podemos concluir que la menor diferenciación neuronal observada en E14.5 *c-fos*  $-/-$  en relación a los E14.5 *c-fos*  $+/+$  se mantiene a lo largo del desarrollo y resulta evidente en estadios más avanzados del mismo.

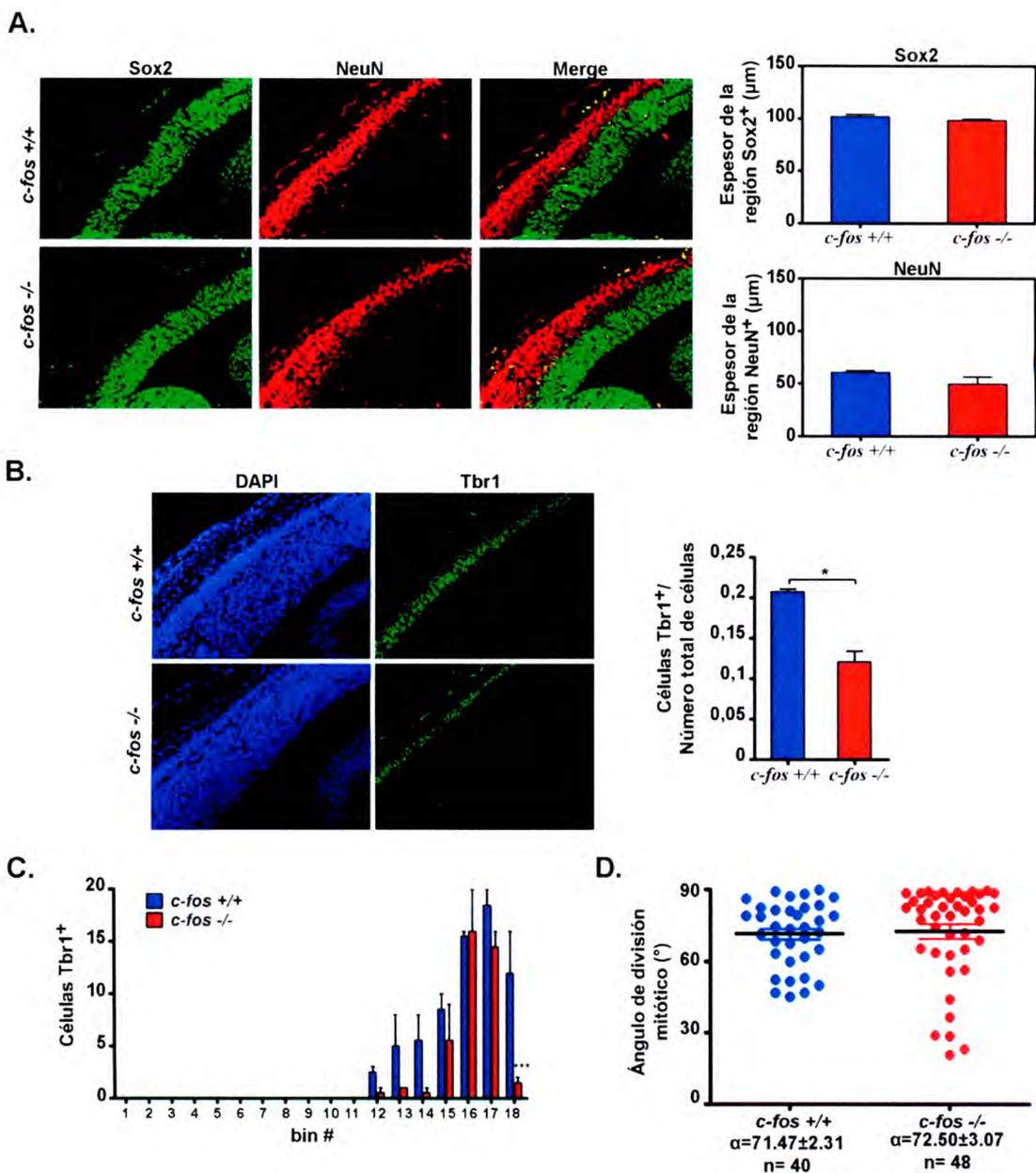


**Figura 34. Población de células neuronales post-mitóticas en la corteza cerebral de E16.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-*.**

**A.** Inmunofluorescencias de cortes coronales de la región dorso-medial de la pared cerebral de E16.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-* teñidos para DAPI (azul) y  $\beta\text{III-tubulina}$  (verde). Las imágenes fueron visualizadas con microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) usando un objetivo 40X de magnificación. **B.** Cuantificación del espesor de la zona positiva para  $\beta\text{III-tubulina}$ , de la zona negativa para  $\beta\text{III-tubulina}$  y del espesor total de la corteza cerebral de las regiones mostradas en A para E16.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-*. Los resultados se muestran como la media del espesor ( $\mu\text{m}$ )  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Se realizaron cuatro cuantificaciones por cada caso analizado. Análisis estadístico: ANOVA doble con test de Bonferroni. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  en animales *c-fos -/-* respecto a los animales *c-fos +/+*.

### **IX- Las diferencias en neurogénesis entre embriones *c-fos +/+* y *c-fos -/-* comienzan a ser detectadas a los 13.5 días de desarrollo embrionario (E13.5).**

Como se mencionó al comienzo de éste capítulo, el pico máximo de actividad neurogénica ocurre aproximadamente al día 14.5 de desarrollo embrionario, pero se trata de un proceso que tiene lugar entre los días 11.5 y 17.5 de desarrollo embrionario. Este proceso está sujeto a una estricta regulación espacio-temporal y da como resultado final la generación de las 6 capas corticales de la corteza cerebral adulta, de modo tal que primero se generan las capas corticales más profundas (L6) y al final del proceso se generan las capas corticales más superficiales (L2) (Figura 8 de Introducción). Por esta razón resulta interesante determinar en qué estadio del desarrollo comienzan a ser evidentes las diferencias en neurogénesis entre la condición *wt* y *ko*. Para ello, algunos de los estudios realizados en E14.5 fueron también efectuados en E13.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-*. Al analizar en la corteza cerebral de E13.5, el espesor de la región positiva para el marcador Sox2 y NeuN (Figura 35A) como así también la distribución del ángulo de división mitótico de los progenitores apicales (Figura 35D), no se observaron diferencias significativas entre los E13.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-*. Sin embargo, al evaluar la



**Figura 35. Análisis de la corteza cerebral de E13.5 *c-fos* +/+ y *c-fos* -/-.**

**A.** Fotografías representativas de cortes coronales de la región dorso-medial de la corteza cerebral de E13.5 *c-fos* +/+ y *c-fos* -/- teñidos para Sox2 (verde) y NeuN (rojo). Las cuantificaciones correspondientes a la región positiva para Sox2 y NeuN se muestran en el panel derecho. **B.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias para Tbr1 (verde) de cortes coronales de la región dorso-medial de la corteza cerebral de E13.5 *c-fos* +/+ and *c-fos* -/-. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) usando un objetivo 40X de magnificación. El histograma del panel derecho muestra la cuantificación del número total de núcleos Tbr1 positivos/número total de células (núcleos DAPI positivos) en una superficie ventricular de 180µm x 100µm correspondiente a la región dorso-medial de la corteza cerebral mostrada. **C.** Histograma correspondiente a la cuantificación del número de núcleos positivos para Tbr1/bin en la corteza cerebral de E13.5 *c-fos* +/+ and *c-fos* -/-. Los resultados se muestran como la media del número de núcleos positivos para Tbr1/bin ± SEM (n=4). Se realizaron cuatro cuantificaciones para cada caso analizado. **D.** Gráfico representativo de la distribución del ángulo de división mitótico para progenitores apicales. Los resultados se expresan como la media del ángulo ( $\alpha$ ) ± SEM. Las mediciones se realizaron en 3 embriones de cada genotipo y el n indicado corresponde al número total de divisiones mitóticas cuantificadas.

Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch (para el punto B) y ANOVA doble con test de Bonferroni (para el punto C). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  en animales *c-fos*  $-/-$  respecto a los animales *c-fos*  $+/+$ .

inmunomarcación para Tbr1 se observó una disminución del número de células positivas para Tbr1 respecto al número total de células (Figura 35B) en un área específica de superficie ventricular de la corteza cerebral de E13.5 *c-fos*  $-/-$  en comparación a la condición wt, lo cual se refleja en un menor número de células Tbr1 positivas en el CP de E13.5 *c-fos*  $-/-$  (Figura 35C). Estos resultados sugieren que las diferencias en neurogénesis recién comienzan a ser aparentes en este estadio del desarrollo (E13.5).

## X- Estudio de la función citosólica y nuclear de c-Fos en la corteza cerebral de E14.5

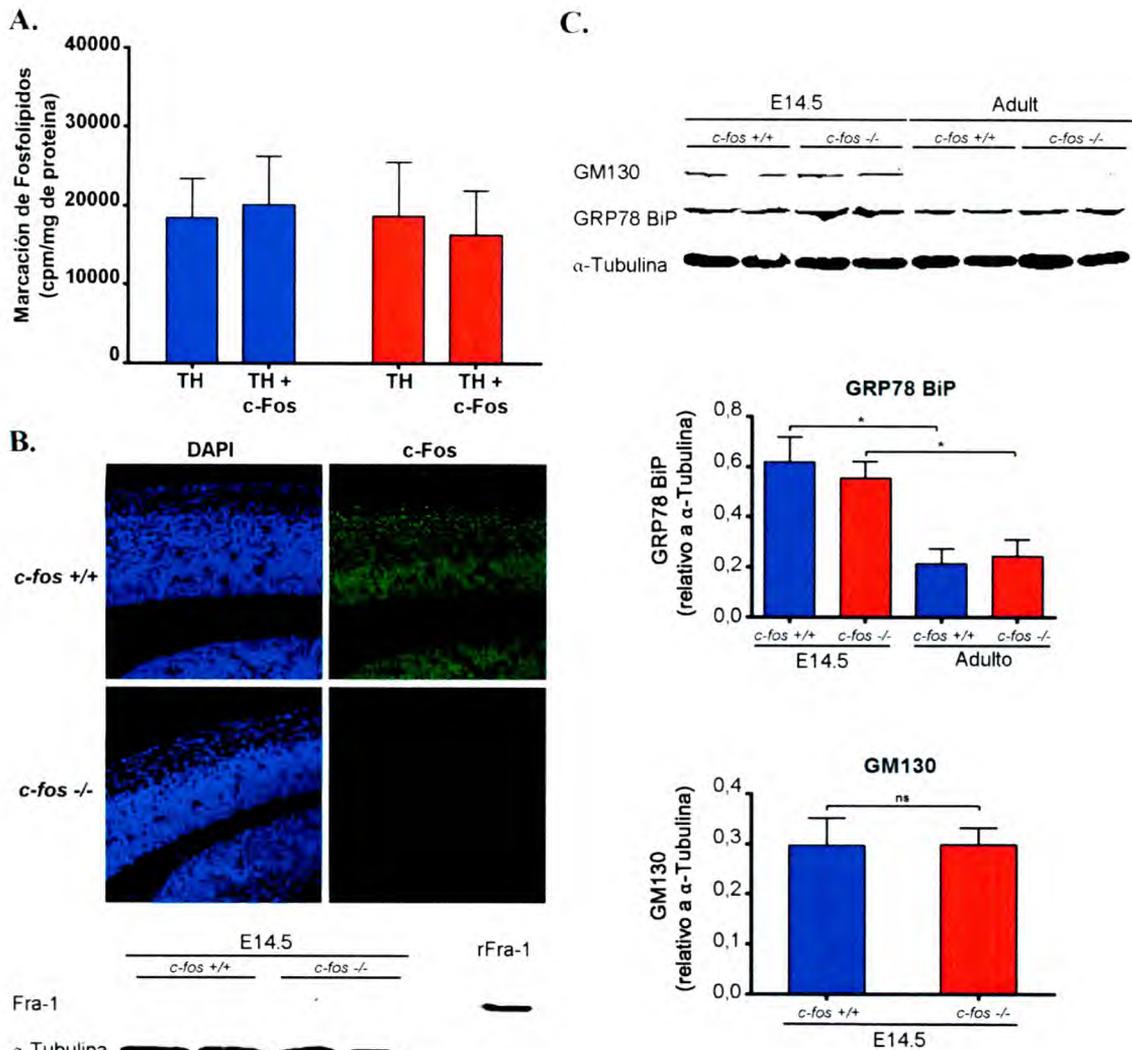
Como se explicó en la Introducción, c-Fos presenta dos funciones celulares distintas, una como factor de transcripción AP-1 (actividad nuclear) y otra como activador de la síntesis de lípidos (actividad citosólica) (Bussolino, Guido et al. 2001; Cardozo Gizzi and Caputto 2013). Con el objetivo de poder determinar por medio de cuál/es de estas funciones c-Fos participa en el establecimiento de las diferencias observadas entre las cortezas cerebrales de E14.5 *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ , se evaluó la marcación *in vitro* de fosfolípidos y el contenido AP-1 en homogenatos preparados a partir de cortezas cerebrales de E14.5.

La marcación *in vitro* de fosfolípidos fue realizada utilizando homogenatos totales de E14.5 *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ . No se observaron diferencias significativas en la marcación de fosfolípidos totales entre ambos grupos de embriones, a pesar de que embriones *c-fos*  $+/+$  muestran una elevada expresión de c-Fos lo cual contrasta con su ausencia en embriones *c-fos*  $-/-$  (Figura 36B). Además, el agregado de c-Fos recombinante al ensayo de marcación no incrementa la incorporación de  $^{32}\text{P}$  a partir de  $^{32}\text{P}$ -ATP- $\gamma$  en los fosfolípidos totales (Figura 36A).

Dentro de la familia de proteínas Fos, Fra-1 también ha sido documentada como una proteína con una capacidad similar a la de c-Fos para activar la síntesis de fosfolípidos en tejidos mamarios (Motrich, Castro et al. 2013). Es por ello que evaluamos la expresión de Fra-1 en extractos totales de corteza cerebral de E14.5 *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$  con el objetivo de establecer si esta proteína estaba compensando la falta de c-Fos en los embriones *ko* actuando como activador de la síntesis de fosfolípidos. No

se observó expresión de Fra-1 en ninguno de los casos analizados, excluyendo la posibilidad de un efecto de Fra-1 sobre la síntesis de lípidos (Figura 36B).

Como se indicó en el Capítulo II, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que en estadios embrionarios tempranos, en los cuales hay una elevada actividad proliferativa, el cerebro en desarrollo presenta un contenido de membranas de Golgi y retículo endoplásmico (RE) significativamente mayor al del cerebro adulto, donde la actividad proliferativa es muy baja (Silvestre, Maccioni et al. 2009). Teniendo en cuenta estos hallazgos, se analizó la expresión de GM130 (marcador de Golgi) y de GRP78 BiP (marcador de RE) en extractos totales de la corteza cerebral de E14.5 y de animales adultos *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*. En concordancia con los datos de bibliografía, el contenido relativo de GRP78 BiP resulta ser significativamente menor en cerebro adulto *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* en comparación a su estadio embrionario correspondiente, mientras que la expresión de GM130 se encuentra por debajo de su límite de detección en los animales adultos (Figura 36C). Teniendo en cuenta estos resultados y lo observado en los ensayos de marcación de fosfolípidos *in vitro*, es posible plantear como hipótesis que la maquinaria metabólica responsable de generar los lípidos de las membranas biológicas ya se encuentra activada en ambos grupos de embriones evaluados, y por lo tanto la presencia de c-Fos (ya sea *in situ* o mediante el agregado externo) no afecta dicha actividad. Estas últimas observaciones se corresponden con los resultados obtenidos al realizar la marcación *in vitro* de fosfolípidos, utilizando como fuente de proteínas extractos totales de NSPCs a los 7 y 14 días de cultivo celular (Figura 19). Analizando ambos resultados, es posible postular que a los 7 días de cultivo celular las NSPCs aún conservan un elevado contenido de membranas de RE procedente del estadio embrionario, y por ello el agregado de c-Fos recombinante no incrementa la marcación de fosfolípidos totales. A medida que transcurre el tiempo de cultivo celular (NSPCs a los 14 días de cultivo), el contenido de membranas de RE parece disminuir, de manera comparable a lo que ocurre en el estadio adulto, por lo que en estas condiciones c-Fos sí participa como activador de la síntesis de lípidos (Figura 19A) (Silvestre, Gil et al. 2010).

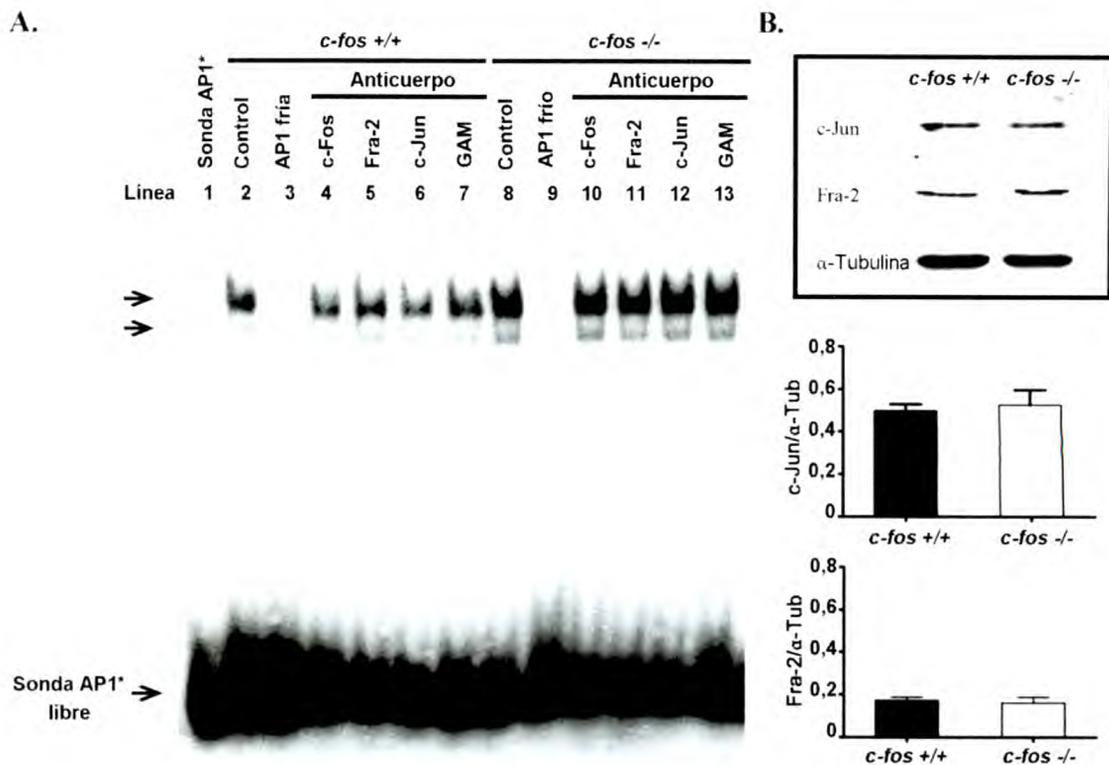


**Figura 36. Estudio de la función de c-Fos como activador de la síntesis de fosfolípidos.**

**A.** La corteza cerebral de E14.5 *c-fos +/+* (barras azules) y *c-fos -/-* (barras rojas) fueron utilizadas para preparar homogenatos totales (HT) en agua. Los HTs fueron utilizados para evaluar la capacidad de síntesis de fosfolípidos en ausencia (HT) o presencia (HT + c-Fos) de c-Fos recombinante a una concentración de 1ng de c-Fos recombinante/ $\mu$ g de proteína de HT. Los resultados se muestran como la media de las cpm incorporadas en fosfolípidos totales/mg de proteína  $\pm$  SEM (n=4). Cada muestra se evaluó por cuadruplicado. **B.** Fotografías representativas de la inmunofluorescencia para c-Fos (verde) y DAPI (azul) de la región dorso-medial de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-*. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) usando un objetivo 40X de magnificación. El panel de abajo muestra un western blot para la detección de la proteína Fra-1 en homogenatos totales preparados a partir de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos +/+* (primeras dos líneas) y *c-fos -/-* (línea 3 y 4). La última línea corresponde a Fra-1 recombinante (rFra-1) usado como control positivo de tinción. **C.** La expresión del marcador de Golgi GM130 (fila de arriba), del marcador de retículo endoplásmico (ER) GRP78 BiP y de  $\alpha$ -Tubulina usado como control de carga fueron determinados mediante western blot en extractos totales de la corteza cerebral de E14.5 y de animales adultos *c-fos +/+* y *c-fos -/-*. Los histogramas de abajo muestran el nivel de expresión relativo a  $\alpha$ -Tubulina para GRP78 BiP (arriba) y GM130 (abajo). El nivel de expresión de GM130 se encuentra por debajo de su límite de detección en las muestras de adultos *c-fos +/+* y *c-fos -/-*, mientras que ambas muestras de E14.5 *c-fos +/+* y *c-fos -/-* presentan niveles relativos de GRP78 BiP significativamente mayores a los de sus respectivas muestras de adultos. Análisis estadístico: ANOVA doble con test de Bonferroni. \* $p < 0.05$  en animales *c-fos -/-* respecto a los animales *c-fos +/+*.

c-Fos pertenece a la familia de factores de transcripción tipo AP-1 y forma hetero-dímeros con proteínas miembros de la familia Jun, principalmente con c-Jun (Angel and Karin 1991). Para examinar el contenido total del factor AP-1 en la corteza cerebral de estos embriones en desarrollo, se realizaron ensayos de movilidad electroforética retardada (EMSA) utilizando extractos nucleares de la corteza cerebral de E14.5. Las muestras de embriones *c-fos* *-/-* mostraron un mayor contenido del dímero AP-1 en cuatro de los seis ensayos realizados (línea 2 y 8 de la Figura 37A), sugiriendo que la falta de *c-fos* resulta en una modificación en el contenido de AP-1, lo cual podría ser parcialmente responsable del incremento en apoptosis y la disminución en la diferenciación neuronal observada en E14.5 *c-fos* *-/-* comparados a los E14.5 *c-fos* *+/+*.

Para determinar si la composición de estos dímeros AP-1 difiere entre ambos grupos de animales, anticuerpos contra c-Fos, Fra-2 y c-Jun fueron utilizados en ensayos de super-retardamiento. Como puede ser observado en la Figura 37A, los dímeros AP-1 de los embriones *c-fos* *+/+* contienen c-Fos y c-Jun (si bien no se observa un retardamiento de la banda correspondiente al complejo AP-1, la intensidad de la banda correspondiente disminuye al agregar anticuerpo anti c-Jun o anti c-Fos). Con respecto a Fra-2, tres de los seis ensayos realizados con embriones *c-fos* *+/+* mostraron una disminución del complejo AP-1 frente a la presencia del anticuerpo anti Fra-2 mientras que los otros tres casos no mostraron diferencias significativas en presencia o ausencia del anticuerpo. Por otro lado, para el caso de los embriones *c-fos* *-/-* no se encontraron diferencias en la intensidad del complejo AP-1 ante el agregado de los anticuerpos anti Fra-2 o anti c-Jun, a pesar de que la corteza de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* contienen cantidades similares de Fra-2 y c-Jun, como se muestra en los ensayos de western blot de la Figura 34B. Estos resultados indican que la falta de *c-fos* en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *-/-* provoca una modificación en el contenido y/o estabilidad del factor de transcripción AP-1 al compararlo con la condición *wt*.

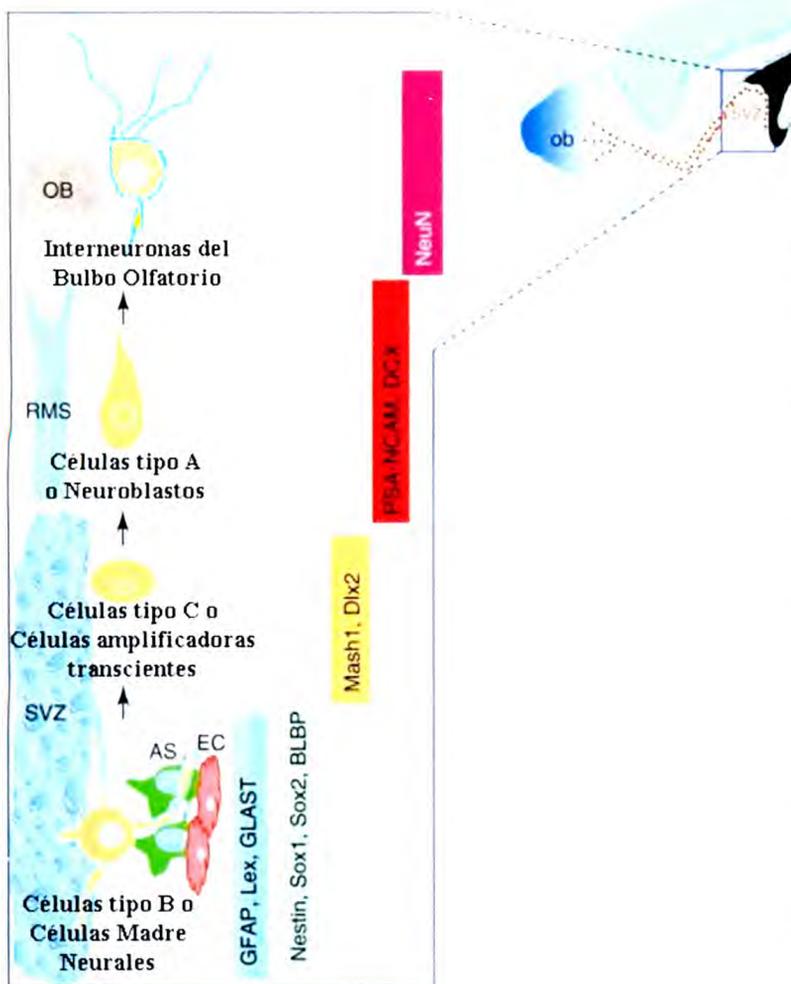


**Figura 37. Estudio de la función de c-Fos como factor de transcripción tipo AP-1.**

**A.** Determinación mediante EMSA del contenido de AP-1 en extractos nucleares de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* +/+ y *c-fos* -/-. Las flechas de arriba indican la posición de complejos DNA-AP-1. Las líneas 2 a 7 corresponde a los embriones *c-fos* +/+ y las líneas 8 a 13 a los *c-fos* -/-. La competencia con sonda AP-1 fría (100X) fue realizada en las líneas 3 y 9. La composición del complejo AP-1 fue evaluada mediante el agregado de los anticuerpos contra c-Fos (línea 4 y 10), Fra-2 (línea 5 y 11), c-Jun (línea 6 y 12) y un anticuerpo no relacionado (anticuerpo secundario de cabra anti mouse, GAM) (línea 7 y 13). Se utilizaron iguales cantidades de proteína nuclear en cada línea excepto en la línea 1 que no contiene extracto nuclear. Se realizaron seis ensayos independientes. **B.** Ensayos de western blot muestran la expresión de c-Jun, Fra-2 y  $\alpha$ -tubulina en extractos totales obtenidos a partir de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* +/+ y *c-fos* -/- (panel superior). En los dos paneles inferiores se muestra la cuantificación de la expresión de c-Jun (arriba) y Fra-2 (abajo) relativa a la expresión de  $\alpha$ -tubulina. Los resultados se muestran como la media de la expresión relativa  $\pm$  SEM (n=5). No se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos.

## - CAPITULO 4. BREVE ESTUDIO DE LA NEUROGÉNESIS EN RATONES ADULTOS *c-fos* $-/-$ .

Una de las principales observaciones que surge de los resultados descritos hasta el momento, es que durante el periodo embrionario hay una menor diferenciación neuronal en la corteza cerebral en desarrollo de E14.5 *c-fos*  $-/-$  en comparación a la corteza de E14.5 *c-fos*  $+/+$ , lo cual se correlaciona con la menor capacidad de diferenciación neuronal de las NSPCs *c-fos*  $-/-$  en cultivo. Es sabido que durante la etapa adulta persiste actividad neurogénica en sitios específicos del SNC. Una de estos sitios es la zona sub-ventricular (SVZ) que se encuentra adyacente a las células endoteliales que lindan con la superficie del ventrículo lateral. Este nicho neurogénico presenta un microambiente altamente especializado donde residen las NSCs, las cuales permanecen en un estado relativamente quiescente aunque en condiciones normales una proporción de las mismas se encuentran activas. Las NSCs adultas, también conocidas como células tipo B, presentan un fenotipo astrocítico y dan lugar a las células amplificadoras transcientes (denominadas células tipo C), las cuales presentan una gran actividad proliferativa y generan los neuroblastos o también conocidas como células tipo A (Figura 10). Los neuroblastos migran tangencialmente hacia el bulbo olfatorio en donde finalmente diferencian a interneuronas de la región glomerular y periglomerular del bulbo olfatorio. En el caso de los roedores, la generación de nuevas interneuronas que se integran en el bulbo olfatorio resultaría importante en la mejora del discernimiento de nuevos olores (Rocheffort, Gheusi et al. 2002; Utsugi, Miyazono et al. 2014). El uso de diversos marcadores permite distinguir las diferentes poblaciones celulares mencionadas (Lazarov, Mattson et al. 2010; Ming and Song 2011; Braun and Jessberger 2014) (Figura 38).

**Figura 38**

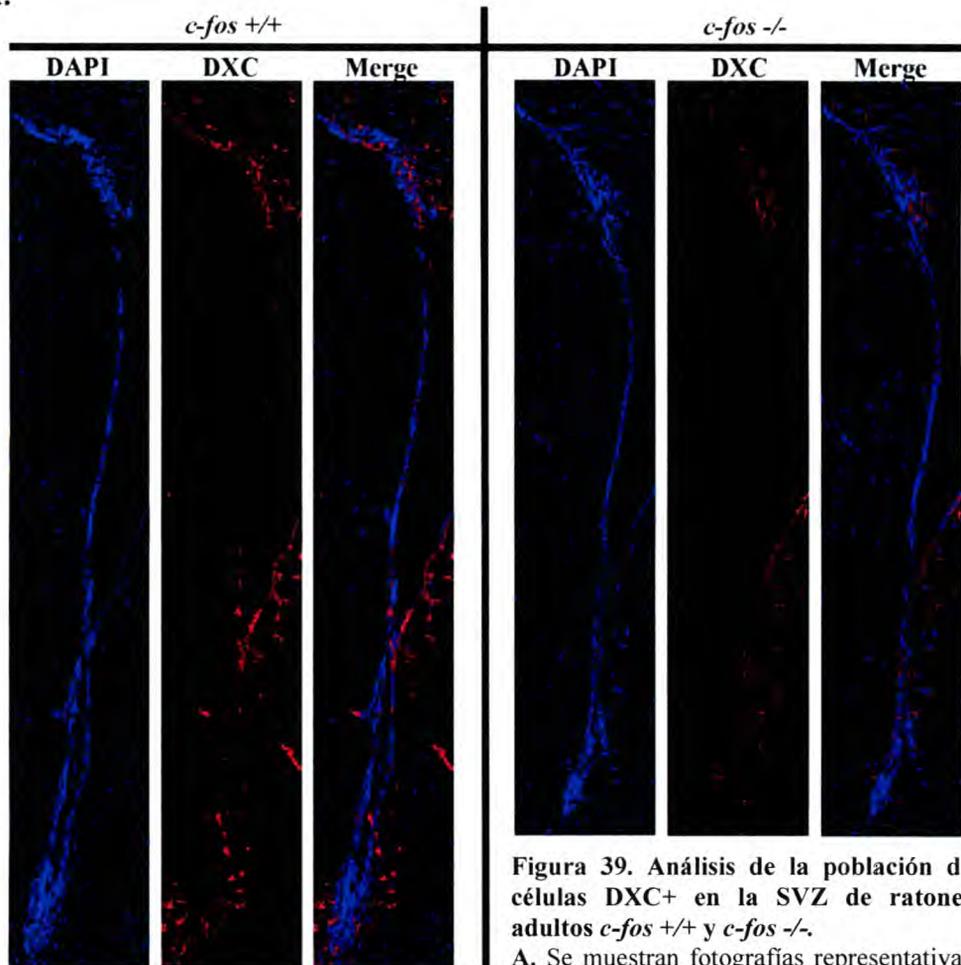
Corte sagital del cerebro adulto de ratón donde se muestra la localización de la zona sub-ventricular (SVZ) y el camino migratorio de los neuroblastos generados en esta región hasta alcanzar el bulbo olfatorio (OB). El recuadro ampliado representa los distintos estadios de diferenciación a medida que transcurre la neurogénesis adulta, desde las células madre neuronales hasta las interneuronas maduras. Las diferentes localizaciones como así también algunos de los marcadores utilizados para los distintos tipos celulares son indicados. RMS: cadena migratoria; EC: células endocelulares; AS: astrocitos. Modificado de Lasarov O *et al.* "When neurogenesis encounters aging and disease" Trends in Neurosciences, 2010.

Con el objetivo de determinar si la actividad neurogénica en el estadio adulto de animales *c-fos* *-/-* se encuentra disminuida (como ocurre en el estadio embrionario) se comparó la población de neuroblastos presente en la SVZ entre la condición *wt* y la *ko*. Para ello se utilizó como marcador de la población de neuroblastos, la proteína asociada a microtúbulos denominada Doblecortina (DXC). Se realizaron cortes coronales de cerebro de animales *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*. Para los distintos casos analizados siempre se utilizaron animales hermanos de camada. Luego de realizar la inmunomarcación, se analizó la región SVZ de cada muestra, comparando siempre cortes de la misma posición (según se indica en Materiales y Métodos) (Figura 39A). Al realizar la determinación del porcentaje de células positivas para DXC en la SVZ respecto al total de células, se observó que animales *c-fos* *-/-* presentan un menor porcentaje de neuroblastos en comparación a la condición *wt* (Figura 39B) sugiriendo que en la etapa

adulto, al igual que en la etapa embrionaria, la actividad neurogénica se encuentra reducida en los animales *c-fos* *-/-*.

En tres de los cuatro casos analizados, la SVZ presentó un menor tamaño en los animales *c-fos* *-/-* respecto a sus hermanos *wt* de camada, como puede observarse en la tinción con DAPI de la Figura 39A. En el caso restante no se observaron diferencias significativas. Las fotografías que se comparan corresponden a cortes procedentes de la misma posición coronal. El menor tamaño de la SVZ se correlaciona con el menor tamaño y masa total de los cerebros de animales adultos *c-fos* *-/-* (Figura 12).

A.

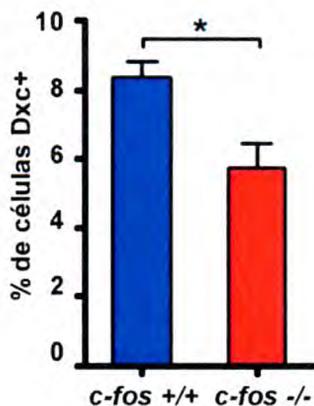


**Figura 39.** Análisis de la población de células DXC+ en la SVZ de ratones adultos *c-fos* +/+ y *c-fos* -/-.

**A.** Se muestran fotografías representativas de inmunofluorescencia para Doblecortina (DXC) (panel medio) de cortes coronales de la región sub-ventricular (SVZ) de animales adultos *c-fos* +/+ y *c-fos* -/-. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (panel izquierdo) y en el panel derecho se muestra la superposición entre DAPI y DXC. Las imágenes fueron tomadas usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti y la SVZ completa fue reconstituida usando el programa ImageJ.

**B.** Histograma representativo del porcentaje de células positivas para DXC respecto al total de células. Se muestra la media del % de células DXC+  $\pm$  SEM (n=4). Cada caso analizado fue cuantificado por cuadruplicado. Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \* $p < 0.05$  en animales *c-fos* -/- respecto a los animales *c-fos* +/+.

B.

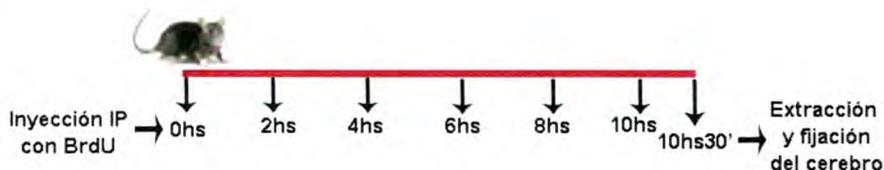


A nivel de la SVZ es posible distinguir dos poblaciones celulares que se diferencian entre sí por su ritmo de proliferación: una población de células que se

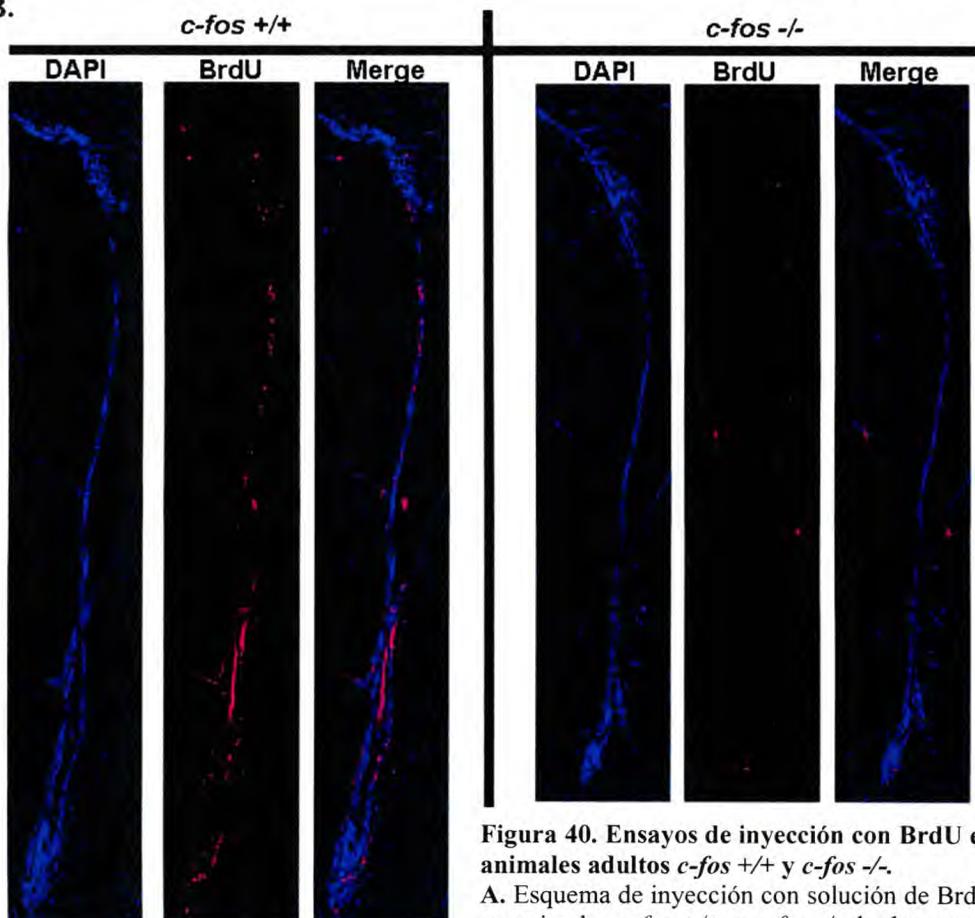
encuentra activamente proliferando (células tipo C y neuroblastos), y otra representada por células que se encuentran relativamente quiescente (las células madres neuronales) (Nowakowski, Lewin et al. 1989) (Belvindrah, Rougon et al. 2002; Nieoullon, Belvindrah et al. 2005). La administración en animales adultos de análogos de timidina, que se incorporan durante la fase S del ciclo celular, permite identificar estas poblaciones celulares; no obstante la distinción de una población respecto de la otra, requiere del uso de diferentes esquemas de exposición (Belvindrah, Rougon et al. 2002; Nieoullon, Belvindrah et al. 2005). La exposición a BrdU (análogo de timidina) durante un periodo de 10 horas permite marcar a la población de células que se encuentra activamente proliferando. Con el objetivo de poder comparar esta última población celular entre los animales *wt* y *ko*, y de esta manera tener una idea acerca de la actividad proliferativa en la SVZ de ambos animales, se realizaron inyecciones intra-peritoneales con BrdU en animales adultos. El tiempo de exposición a BrdU fue entre 10-11 horas (Figura 40A); pasado este tiempo, los animales fueron sacrificados y sus cerebros analizados. A partir de cortes coronales de la SVZ se realizó la inmunomarcación para detectar la presencia de células que hayan incorporado BrdU. Al comparar cortes de la misma posición se pudo ver un menor número de células positivas para BrdU en las muestras procedentes de animales *c-fos* *-/-* (Figura 40B), lo cual se refleja al realizar la determinación del porcentaje de células positivas para BrdU respecto al total de células de la SVZ (Figura 40C). Estos resultados sugieren que la actividad proliferativa en la SVZ de animales *c-fos* *-/-* es menor que en sus hermanos *wt* de camada, lo cual estaría relacionado con la menor actividad neurogénica observada anteriormente. Por lo tanto, la menor actividad neurogénica observada en la etapa embrionaria de los animales *c-fos* *-/-* parece ser un hecho que se extiende a la etapa adulta.

Resta por determinar si existen diferencias en la población de células madres neuronales de la SVZ entre ratones adultos *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*, ya que una disminución en ésta población celular podría ser lo que determina la menor actividad proliferativa y por ende la menor neurogénesis observada en los animales *c-fos* *-/-*.

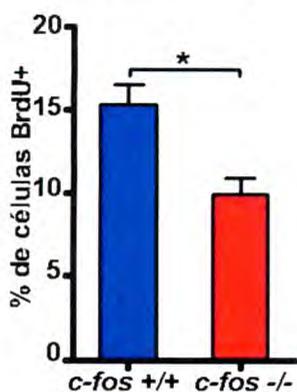
A.



B.



C.



**Figura 40. Ensayos de inyección con BrdU en animales adultos *c-fos +/+* y *c-fos -/-*.**

**A.** Esquema de inyección con solución de BrdU en animales *c-fos +/+* y *c-fos -/-* de dos meses de edad. En cada inyección se administró 50mg/kg de masa corporal mediante inyección intraperitoneal (IP) de una solución 10mg/mL de BrdU. **B.** Fotografías representativas de inmunofluorescencia para BrdU (columna del medio) de cortes coronales de la región subventricular (SVZ) de animales adultos *c-fos +/+* y *c-fos -/-* tratados de acuerdo al esquema mostrado en A. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (columna de la izquierda) y a la derecha se muestra la superposición entre DAPI y BrdU. Las imágenes fueron tomadas usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti y la SVZ completa fue reconstituida usando el programa ImageJ. **C.** Histograma representativo del porcentaje de células positivas para BrdU respecto al total de células. Se muestra la media del % de células BrdU+  $\pm$  SEM (n=4). Cada caso analizado fue cuantificado por cuadruplicado. Análisis estadístico: Test t con corrección de Welch. \* $p < 0.05$  en animales *c-fos -/-* respecto a los animales *c-fos +/+*.



## DISCUSIÓN

Durante el desarrollo embrionario, los diferentes órganos se generan por la actividad proliferativa y de diferenciación de células madres/progenitoras específicas de cada órgano. Es por ello que una adecuada regulación de su función resulta fundamental para un desarrollo normal. En el presente trabajo de investigación nos centramos en el estudio del rol de la proteína c-Fos en el comportamiento de la población de NSPCs presentes en la corteza cerebral en desarrollo de embriones de 14.5 días de gestación (E14.5). Como modelo de estudio se utilizaron ratones *c-fos* *-/-*, los cuales si bien resultan viables, presentan importantes alteraciones en funciones que involucran al SNC. Se observó que la falta de c-Fos conduce a un incremento en la muerte celular programada (apoptosis), a modificaciones en la duración del ciclo celular y a una disminución de la capacidad de diferenciación neuronal de las NSPCs de la corteza cerebral de E14.5. Estas alteraciones en el comportamiento de las NSPCs conducen a una reducción en el número de células neuronales post-mitóticas con la concomitante reducción en el espesor del plato cortical en E14.5 *c-fos* *-/-*. Estas diferencias comienzan a ser evidentes a los 13.5 días de gestación, se mantienen a lo largo del desarrollo y dan origen a una corteza cerebral adulta de menor espesor en los animales *c-fos* *-/-* en comparación a los animales *c-fos* *+/+*. Los estudios de la función citosólica y nuclear de c-Fos a partir de extractos de la corteza cerebral en desarrollo, indican que en embriones *c-fos* *-/-*, la falta de la proteína c-Fos conduce a modificaciones en el contenido y tipo de AP-1, por lo que es posible postular que c-Fos participa en la regulación de la neurogénesis embrionaria por medio de su función nuclear (como factor de transcripción).

### **- Efecto de la falta de c-Fos en el desarrollo de animales *c-fos* *-/-*.**

Como primer objetivo de este trabajo de tesis se planteó determinar en forma general si las diferencias en el tamaño corporal entre animales *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* eran debidas a diferencias en el número y/o tamaño celular. El fenotipo del ratón adulto *c-fos* *-/-* muestra que la falta de *c-fos* conduce a una reducción de aproximadamente el 40% de la masa corporal total comparado con la de sus contrapartes normales de la misma edad. El tamaño de un animal y de sus órganos depende del número y tamaño de sus

células como así también de la cantidad de matriz extracelular y fluidos. Al estudiar órganos como hígado y riñón observamos que los animales *c-fos* *-/-* presentan órganos de menor masa total comparado a los órganos *wt*, como así también un menor peso seco. El análisis del tamaño de las células procedentes de estos órganos, mediante citometría de flujo, no detectó diferencias en el tamaño de las distintas poblaciones celulares entre ambos genotipos.

El análisis del tamaño celular mediante citometría de flujo presenta varios puntos a tener en consideración. Uno de ellos es que requiere la disgregación del órgano por lo que el análisis del tamaño celular puede no ser representativo de lo que ocurre realmente en el tejido. Además, al realizar el análisis de extractos totales de los órganos se obtiene una mezcla de diferentes tipos celulares que dificultan el análisis, sumado a que se trata de una metodología variable en donde la presencia de pequeñas diferencias en el tamaño celular pueden no ser detectadas. No obstante, el análisis de células sanguíneas (Figura 11D), que no requieren disgregación tisular, no muestra diferencias significativas en el tamaño celular entre ambos genotipos. Además, el análisis mediante microscopia de contraste de fase del tamaño celular de cultivos primarios de fibroblastos, no evidencia diferencias notables entre la condición *wt* y la *ko* (datos no mostrados). Si bien existen otras metodologías que no requieren la disgregación de los órganos (Gundersen and Jensen 1987; Lazarov, Mattson et al. 2010), algo importante de recalcar es que aunque las diferencias en el tamaño celular pueden contribuir a diferencias en el tamaño de un animal, las diferencias en el número celular usualmente produce mayores efectos. Es así que, por ejemplo, un hombre de 70 Kg contiene aproximadamente  $10^{13}$  células, mientras que un ratón de 25g contiene  $3 \times 10^9$  células (Baserga 1985). La diferencia en masa (2800 veces) puede ser explicada mayormente por la diferencia en el número celular total (3333 veces) más que por el tamaño de las células individuales.

A partir de los resultados anteriores podemos decir que la menor masa de los órganos procedentes de animales *c-fos* *-/-* son debidas a un menor contenido en el número de células totales en comparación a los animales *c-fos* *+/+*, más que a diferencias en el tamaño celular. La observación de que los animales analizados presentan diferencias en el número celular pero no así en el tamaño celular, apoya estudios previos en donde se postula que el crecimiento celular y la proliferación celular son eventos regulados independientemente (Nowakowski, Lewin et al. 1989; Braun and Jessberger 2014). Es así por ejemplo que, a diferencia de lo observado en el presente

trabajo, la disminución en el contenido normal de la proteína quinasa 1 dependiente de fosfo-inosítido 3 (PDK1) durante el desarrollo embrionario de ratones conduce a una reducción en el tamaño corporal y de los órganos debido a una reducción en el tamaño celular sin modificaciones en el número de células (Lawlor, Mora et al. 2002).

Si bien mucho se sabe acerca de los principios básicos del desarrollo, poco se ha estudiado acerca de uno de sus aspectos fundamentales: ¿Cómo se determina el tamaño de un animal y de sus órganos? ¿Cómo un órgano “sabe” el tamaño final que debe alcanzar? Está claro que los genes juegan un rol predominante en este aspecto, pero no se conoce el mecanismo exacto por el cual regulan este aspecto fundamental del desarrollo. Se sabe qué factores extrínsecos e intrínsecos controlan el tamaño final de un órgano pero su contribución varía dependiendo del tipo de órgano y de la especie (Conlon and Raff 1999; Belvindrah, Rougon et al. 2002; Nieoullon, Belvindrah et al. 2005). En el modelo analizado en este trabajo de tesis se observaron diferencias en el tamaño de los órganos entre animales *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ , las cuales son atribuidas a diferencias en el número de células que componen esos órganos. El número total de células en un determinado órgano depende del balance entre proliferación y muerte celular, eventos que al mismo tiempo se encuentran regulados por programas intracelulares y moléculas de señalamiento extracelular. Estos programas han sido dilucidados en forma detallada en insectos (Nijhout, Riddiford et al. 2014) pero no así en mamíferos. Las señales extracelulares que afectan el crecimiento de los órganos van a regular tres eventos principales:

- Proliferación celular: Agentes extracelulares activan vías de señalamiento intracelular que estimulan la producción y/o actividad de componentes del sistema de control del ciclo celular que promueven la progresión a través del ciclo (Sherr 1994; Lim and Kaldis 2012).
- Apoptosis: Durante el desarrollo, una célula necesita señales extracelulares para crecer y dividirse pero también para sobrevivir (factores de supervivencia). En ausencia de estos factores o de la posibilidad de poder responder en forma apropiada a los mismos, se activa un programa de muerte celular programada. Las señales de supervivencia actúan, al menos en parte, modificando la actividad y la cantidad de proteínas intracelulares que controlan la muerte celular (especialmente proteínas de la familia Bcl2 e inhibidores de la apoptosis (Nicholson and Thornberry 1997).

- Arresto celular: El arresto de la proliferación celular durante el desarrollo puede ser regulada por un mecanismo extracelular (reducción de un agente mitogénico o factor de crecimiento o un incremento de inhibidores extracelulares) o por un mecanismo intracelular (activación de un mecanismo de freno de la proliferación, desmantelamiento del sistema de control del ciclo celular) o una combinación de estos mecanismos. Ha sido postulado que el tamaño de algunos órganos es controlado por la secreción de moléculas inhibitorias que son producidas por el órgano y suprime en forma específica la división celular en dicho órgano (Goss 1978).

La expresión de c-Fos durante el desarrollo se extiende a tejidos extraembrionarios como así también a hígado, corazón, cerebro, hueso y sistema hematopoyético, entre otros, por lo que no resulta sorprendente que su falta de expresión afecte al desarrollo global del animal. Es una proteína que, al formar parte del factor de transcripción AP-1, participa en la regulación de procesos de proliferación, diferenciación, apoptosis y oncogénesis. La gran variedad de funciones en las cuales participa puede ser explicada por la diversidad de dímeros que forma con proteínas de la familia Jun, los cuales presentan diferentes propiedades y funciones. Asimismo existen diversos dímeros AP-1, que si bien tienen propiedades diferentes pueden también superponerse, al menos parcialmente, en sus funciones. Algo interesante de mencionar es que ratones *ko* para *c-fos* que expresan *fra-1* bajo el promotor de *c-fos* (ratones *c-fos fra-1* knock-in), presentan un fenotipo normal en cuanto al tamaño corporal y ausencia de varias de las alteraciones que presentan los animales *c-fos -/-* (Fleischmann, Hafezi et al. 2000; Lim and Kaldis 2012). Esto sugiere que Fra-1 puede reemplazar la falta de c-Fos al menos en algunas de sus funciones. Ratones *ko* para otras proteínas miembros de la familia Fos también han sido diseñados pero ninguno evidencia un fenotipo similar al de los ratones *c-fos -/-*. No obstante, ratones deficientes en la proteína ATF2 (ratones ATF2 *-/-*), la cual también forma dímeros activos tipo AP-1 al interaccionar con la proteína c-Jun, muestran una disminución en la viabilidad y crecimiento, hipocondroplasia y diversas alteraciones relacionadas a un desarrollo anormal del SNC (Reimold, Grusby et al. 1996; Pilaz, Patti et al. 2009). Es decir que tanto ratones *c-fos -/-* como ATF *-/-* presentan un fenotipo similar relacionado al tamaño corporal, por lo que ambas proteínas podrían participar (mediante mecanismos relacionados entre sí o independientes uno del otro) en la regulación del crecimiento del animal.

A diferencia de la regulación del crecimiento de los órganos, que involucra interacciones celulares locales y la influencia de factores locales y sistémicos de crecimiento, el tamaño global del cuerpo se encuentra controlado principalmente por factores sistémicos. En el caso de los vertebrados, el tamaño corporal total se encuentra regulado por la hormona de crecimiento circulante y por el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Butler and Le Roith 2001; Bartke, Sun et al. 2013). La carencia de IGF-1 en ratones conduce a una alta tasa de letalidad postnatal, un retardo en el crecimiento, infertilidad y graves defectos en el desarrollo de la mayoría de los órganos (Liu, Yakar et al. 2000). Debido a la reducción significativa del tamaño de los animales *c-fos* *-/-* en comparación a la condición normal, resultaría interesante realizar mediciones de los niveles de estos factores, para así determinar si una reducción en los mismos contribuye al fenotipo observado.

Teniendo en cuenta la complejidad de los mecanismos que regulan el tamaño de los órganos y del cuerpo, que en el caso de mamíferos no se conoce con exactitud la forma en que operan dichos mecanismos durante el desarrollo pero si se sabe que hay un control preciso para que cada órgano alcance su tamaño final (Efstratiadis 1998), y la gran variedad de factores de transcripción tipo AP-1 con funciones diferentes y superpuestas, resulta complicado determinar el/los mecanismos por el cual la falta de *c-fos* determina una reducción en el tamaño corporal y de los órganos, al menos sólo mediante el uso de un modelo de ratones *ko*. Lo que sí se puede afirmar es que ante la ausencia de *c-fos* durante el desarrollo, el crecimiento de los diferentes órganos y por ende del animal, es menor que en condiciones normales debido a una reducción en el número total de las células que lo conforman.

Como se indicó anteriormente, el control del tamaño corporal se encuentra influenciado por factores genéticos, hormonales y ambientales. El entendimiento completo acerca de la forma en la que actúan cada uno de estos factores, requiere de una combinación de estudios genéticos, fisiológicos y evolutivos. Estos estudios no sólo permitirán conocer aspectos importantes del desarrollo, sino también ayudarán a entender mejor ciertas enfermedades humanas asociadas con una desregulación del crecimiento y proliferación celular.

## - Estudio comparativo del SNC entre animales adultos *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*.

Al analizar el cerebro de animales adultos *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* se observó que el cerebro de ratones *c-fos* *-/-* presenta un menor tamaño y masa total comparado al cerebro de sus contrapartes normales. Esta reducción en el tamaño cerebral resulta proporcional al tamaño del animal, ya que la relación masa total del cerebro/masa corporal total no varía significativamente entre ambos genotipos. La cuantificación del número total de células procedentes de la corteza cerebral adulta muestra una reducción de aproximadamente el 40% en los animales *c-fos* *-/-* comparado a los *c-fos* *+/+*. Asimismo ensayos de inmunomarcación para NeuN (marcador de neuronas post-mitóticas) indican que el porcentaje de núcleos positivos presentes en los extractos de la corteza cerebral adulta *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* es similar (datos no mostrado), lo cual indica que la reducción en el número total de células de la corteza cerebral adulta no afecta específicamente a la población de células neuronales.

Existen varios estudios en animales mutantes que muestran una alteración en el tamaño cerebral y en la organización de determinadas estructuras del SNC (Chen, Zhang et al. 2014; Yang, Yang et al. 2015). Es así por ejemplo que ratones IGF1 *-/-* presentan una reducción en el tamaño cerebral determinado por una reducción tanto en el número como en el tamaño celular, disminución en la mielinización de axones y alteración en la arquitectura del hipocampo (Beck, Powell-Braxton et al. 1995). En línea con estas observaciones, es el hallazgo que la sobreexpresión de IGF1 determina la generación de un cerebro de mayor tamaño al normal (Ye, Popken et al. 2004). Otros ejemplos incluyen modelos animales de autismo en donde se observa una alteración en la organización de las capas corticales que se relaciona con cambios en el comportamiento de estos animales (Pucilowska, Vithayathil et al. 2015). En el presente trabajo se muestra una reducción en el espesor de la corteza cerebral de ratones *c-fos* *-/-* en relación a los animales *wt* (Figura 12B), lo cual se correlaciona con una reducción en el número total de núcleos presentes en esta región. Sin embargo, resultaría interesante realizar un estudio más detallado de la corteza cerebral adulta para determinar si existen cambios importantes en la citoarquitectura de la misma, si alguna capa cortical se encuentra mayormente afectada o si la reducción resulta ser proporcional en todas las capas.

La corteza cerebral es la estructura más grande y compleja del cerebro de mamíferos (Sporns 2013); juega un rol central en el procesamiento cognitivo y emocional. Una organización adecuada de esta estructura es esencial para las funciones de aprendizaje, memoria y comportamiento. En su dirección radial se encuentra organizada en seis capas corticales, cada una de las cuales está constituida por una población heterogénea de neuronas que presentan una morfología, conectividad y funcionalidad diferentes a las de otras capas. En su dirección tangencial, la corteza cerebral también se encuentra dividida en áreas, las cuales son subdivisiones funcionales únicas que se distinguen unas de otras por su cito y quimio-arquitectura, sus conexiones intrínsecas y con otras zonas del cerebro, y por su patrón de expresión de genes (Rash and Grove 2006). Existe una variabilidad en el tamaño de las distintas áreas de la corteza cerebral entre individuos de una misma especie (Airey, Robbins et al. 2005). No obstante, variaciones en el tamaño de las diferentes áreas de la corteza cerebral pueden tener dramáticas consecuencias en el comportamiento del animal (Leingartner, Thuret et al. 2007). La generación de áreas corticales de un tamaño adecuado se encuentra influenciado por distintos parámetros intra- y extracelulares, y resulta de fundamental importancia para lograr un correcto funcionamiento de las mismas. Como se indicó en la Introducción, los animales *c-fos* *-/-* presentan una serie de alteraciones en su comportamiento (hiperactividad, alteraciones del sueño, en el comportamiento sexual, el aprendizaje y la memoria). Si bien *c-Fos* constituye un IEGs que a nivel neuronal media la generación de respuestas a largo plazo luego de un estímulo y que por lo tanto su ausencia en los animales *ko* podría contribuir a las alteraciones de comportamiento observadas, el menor tamaño de la corteza cerebral de ratones *c-fos* *-/-* también podría estar asociado a las diferencias de comportamiento entre los animales *ko* y *wt*.

### **- Análisis de la neurogénesis en embriones *c-fos* *-/-*.**

Durante la generación de la corteza cerebral de mamíferos (corticogénesis) dos compartimentos germinales (la zona ventricular y sub-ventricular, VZ y SVZ respectivamente) que limitan con los ventrículos cerebrales generan las neuronas piramidales (neuronas excitatorias glutamatérgicas) como así también una fracción de las neuronas inhibitorias (neuronas inhibitorias GABA-érgicas) de la corteza cerebral

(Marin and Rubenstein 2001; Paridaen and Huttner 2014). En la VZ se localizan las células radiales gliales (RGCs), las cuales se dividen en la superficie apical y experimentan migración nuclear intercinética (INM) durante la fase G1 y G2 de su ciclo celular (Reiner, Sapir et al. 2012). Posteriormente la mitosis también ocurre en la superficie basal de la VZ para dar lugar a la SVZ donde los progenitores (células progenitoras intermedias = IPCs) no experimentan INM. Aunque la SVZ deriva de precursores de la VZ, existen claras diferencias en la expresión de genes entre las poblaciones celulares presentes en ambas regiones (Frantz, Weimann et al. 1994; Wu, Goebbels et al. 2005). Estas diferencias están relacionadas con las diferentes progenies neuronales que originan: mientras que la VZ está involucrada en la generación de neuronas de las capas corticales profundas, la SVZ genera neuronas de capas corticales superficiales.

En el caso de roedores, la neurogénesis cortical comienza alrededor del día 11 de gestación. Las primeras neuronas formadas constituyen el pre-plato cortical el cual luego es dividido por neuronas del plato cortical generando la zona marginal externa y el sub-plato interno (Marin-Padilla 1978; Caviness 1982; Marin-Padilla 1992). A medida que la corticogénesis progresa, nuevas neuronas generadas migran radialmente desde el compartimento progenitor para integrarse al plato cortical formando así las seis capas corticales. El tipo de neurona generada y por ende su localización, va a estar determinada por el momento en el que ocurre la última división celular a partir de la cual fue generada la misma (Angevine and Sidman 1961; Rakic 1974; He, Li et al. 2015). Alrededor del día 17 de gestación, culmina la neurogénesis aunque la formación de una corteza cerebral completamente madura implica diferentes eventos que continúan en la etapa postnatal. De hecho, la muerte celular de neuronas de la neocorteza parietal de ratones tiene lugar durante las primeras dos semanas postnatales, ocurre en forma uniforme sin ningún tipo de patrón pero parece estar asociada con el desarrollo de conectividades neuronales (Spreafico, Frassoni et al. 1995; Verney, Takahashi et al. 2000).

Al analizar la corteza cerebral en desarrollo de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* se observó una reducción en el espesor total de ésta última respecto a los animales *c-fos* *+/+*. Dicha reducción no resulta evidente en E13.5, pero se mantiene a lo largo del desarrollo, ya que también se observa a los 16.5 días de gestación y en el estadio adulto. El análisis de las distintas poblaciones celulares presentes en esta región, mediante el uso de marcadores específicos, indica que la reducción en el espesor total de la corteza

se debe principalmente a una significativa disminución en la población de neuronas post-mitóticas. Así lo demuestra la menor marcación para Tbr1, NeuN, MAP2 y  $\beta$ III-tubulina en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*  $-/-$  en comparación a la de E14.5 *c-fos*  $+/+$ . En el caso de NeuN y  $\beta$ III-tubulina, se observa un menor espesor de la región positiva para esos marcadores, mientras que para el caso de Tbr1 y MAP2 hay una disminución en el número total de células positivas para este marcador. La menor tinción para estos marcadores indica una reducción en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*  $-/-$  de las regiones correspondientes al plato cortical principalmente, y a la zona intermedia (IZ) la cual corresponde a la región negativa para Sox2 y MAP2 en las inmunofluorescencias mostradas en la Figura 29A. La diferencia en el espesor de estas regiones resulta también evidente en los E16.5, como puede observarse en la Figura 34 donde la tinción para  $\beta$ III-tubulina corresponde al plato cortical, sub-plato y la IZ. Si bien en E13.5 no existen diferencias significativas en el espesor de la corteza cerebral, comienza a observarse una menor diferenciación neuronal marcada por la reducción en el número de células positivas para Tbr1.

Los resultados del análisis de la inmunomarcación para los marcadores de neuronas post-mitóticas en la corteza cerebral en desarrollo indican que la falta de *c-fos* podría afectar la capacidad de diferenciación de la población de células madres/progenitoras neurales hacia el linaje neuronal. En concordancia con estos resultados, los ensayos de diferenciación *in vitro*, tanto a partir de cultivos primarios de la corteza cerebral en desarrollo como a partir de neuroesferas, muestran que las NSPCs *c-fos*  $-/-$  presentan un menor porcentaje de diferenciación hacia el linaje neuronal. Asimismo, el menor porcentaje de células positivas para DXC en la SVZ de animales adultos *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$  indica una disminución de la población de neuroblastos en los animales *c-fos*  $-/-$  en comparación a los *c-fos*  $+/+$ , lo cual sugiere que las células madres neurales adultas *c-fos*  $-/-$  de la SVZ presentan una menor tendencia a diferenciar a inter-neuronas del bulbo olfatorio en comparación a la condición *wt*.

Estudios previos indican que la diferenciación de la línea celular de feocromocitoma de rata PC12 al fenotipo neuronal requiere de la presencia de c-Fos (Sassone-Corsi, Der et al. 1989; Gil, Bussolino et al. 2004). Los resultados presentados aquí indican que si bien *c-fos* no resulta esencial para la diferenciación neuronal de las células madres/progenitoras neurales, su ausencia afecta la diferenciación de las mismas. c-Fos también ha sido involucrada en la diferenciación de otros tipos celulares (Muller, Curran et al. 1985; Distel, Ro et al. 1987; Matsuo, Owens et al. 2000) por lo

que su señal podría ser postulada como una señal conservada en la diferenciación celular.

Como se mencionó anteriormente, las células neuronales post-mitóticas de la corteza cerebral en desarrollo se originan por actividad de dos poblaciones celulares progenitoras (las RGCs y las IPCs). Para analizar estas poblaciones celulares utilizamos los marcadores Sox2, factor de transcripción expresado en las RGCs y en las IPCs tempranas, y Tbr2, expresado en la población de IPCs. En el caso de Tbr2 no observamos diferencias ni en el número ni en la distribución de la población de células positivas para este marcador. No obstante, el número total de células Sox2 positivas en relación al número total de células presentes en una determinada área de la corteza cerebral en desarrollo, resultó ser mayor para el caso de los E14.5 *c-fos*  $-/-$  en comparación a los E14.5 *c-fos*  $+/+$ . En particular, el incremento en el número de células positivas para Sox2 se observa en la región correspondiente a la SVZ (#bin 8 a 10) y se puede relacionar a la menor diferenciación neuronal observada en los E14.5 *c-fos*  $-/-$ .

Las células progenitoras neurales experimentan divisiones tanto de tipo simétricas como asimétricas, lo que les permite generar un gran número de diferentes tipos celulares. La orientación del plano de clivaje es uno de los factores que influye en la herencia de determinantes celulares y por ende en el destino de las células hijas. Un modelo que permite predecir el destino de las células hijas en la neocorteza de mamíferos se encuentra basado en la orientación del plano de clivaje. Divisiones celulares con un plano de clivaje perpendicular a la superficie ventricular (división vertical) son predictivas de ser divisiones simétricas (pueden ser neurogénicas o proliferativas), mientras que divisiones con un plano de clivaje con una orientación paralela a la superficie ventricular (división horizontal) son predictivas de divisiones neurogénicas asimétricas. Si bien en invertebrados la partición de los componentes celulares, que depende de la orientación del plano de clivaje, determina el rasgo adquirido por las células hijas (Knoblich 2008; Siller and Doe 2009), en mamíferos la contribución de la orientación del plano de clivaje no es tan directa ya que la disrupción de dicha orientación puede conducir a una gran variedad de fenotipos (Fietz and Huttner 2011; Peyre and Morin 2012; Shitamukai and Matsuzaki 2012). Diversos estudios han demostrado la implicancia de moléculas que regulan la orientación del huso mitótico en el destino de las células hijas. Es así por ejemplo que la pérdida de función de la proteína ASPM (Proteína asociada a microtúbulos) en el telencéfalo en desarrollo de ratones conduce a la aparición prematura de células con características neuronales en el

plato cortical (Fish, Kosodo et al. 2006). Asimismo, la disrupción del gen de la Huntingtina (Godin, Colombo et al. 2010), del gen *Tctex-1* (codifica para una dineína) (Gauthier-Fisher, Lin et al. 2009) o del gen *CDK5RAP2* (codifica para una proteína que regula la actividad de la quinasa dependiente de ciclina 5) (Buchman, Tseng et al. 2010), también resultan en una diferenciación neuronal prematura. Todas estas condiciones alteran la regulación de la orientación del plano de clivaje por lo que se postula que la diferenciación neuronal prematura observada puede ser consecuencia de una mayor frecuencia de divisiones con una distribución asimétrica de los dominios apicales de membrana. Esto determina un incremento en el número de células que abandonan la zona ventricular e inician una diferenciación neuronal temprana.

El ángulo de división mitótico de las RGCs que se dividen a nivel de la superficie apical es predominantemente vertical en los E14.5 *c-fos* *-/-* en comparación a la condición *wt*. Este resultado indica que las RGCs *c-fos* *-/-* presentan una mayor tendencia a la expansión de la población progenitora en detrimento de la diferenciación neuronal. El detrimento de la diferenciación neuronal se observa en la disminución de la población de células neuronales post-mitóticas mientras que la expansión de la población progenitora se refleja en el mayor número de células Sox2 positivas a nivel de la SVZ de E14.5 *c-fos* *-/-*.

En los últimos años se determinó la presencia de una nueva población de células progenitoras en la SVZ, las cuales fueron denominadas células progenitoras de la VZ ectópicas o RGCs ectópicas (oRGCs). Estas células presentan una gran similitud con las RGCs, ya que comparten la expresión de una serie de marcadores, pero carecen del contacto con la superficie apical aunque mantienen el contacto con la superficie pial. Esta población celular fue inicialmente descrita en la corteza de mamíferos girencefálicos (Hansen, Lui et al. 2010) y asociada a la evolución del cerebro lisencefálico al girencefálico, pero posteriormente fue identificada en el cerebro de roedores (Shitamukai, Konno et al. 2011; Wang, Tsai et al. 2011). En el caso de roedores, esta población celular es muy pequeña pero su actividad resulta ser muy importante en los cerebros más evolucionados. El incremento en el número de células Sox2 positivas en los E14.5 *c-fos* *-/-* podría relacionarse con un incremento de esta nueva población de células progenitoras oRGCs recientemente descrita. Esto último podría ser evaluado mediante el estudio detallado de la morfología de las células progenitoras conjuntamente con el uso de marcadores específicos.

Se espera que el incremento en la población de células Sox2 positivas en relación al número total de células en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *-/-* en comparación a la de E14.5 *c-fos* *+/+* se vea reflejado en un incremento de la población de neuronas post-mitóticas. No obstante, el espesor de la región positiva para  $\beta$ III-tubulina en la corteza cerebral de E16.5 resulta ser menor en la condición *ko* en comparación a la condición *wt*. Si bien resulta llamativo, estas últimas observaciones podrían estar relacionadas al incremento en el número de células apoptóticas presentes en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *-/-* en comparación a los E14.5 *c-fos* *+/+*, como lo muestran los ensayos de inmunomarcación para caspasa clivada-3. Dicho incremento resulta de un mayor número de células apoptóticas, en particular, a nivel de la VZ de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *-/-*, una zona en la cual se encuentran localizadas células progenitoras positivas para el marcador Sox2.

El hallazgo de un mayor número de células apoptóticas en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *-/-* que en *c-fos* *+/+* resulta llamativo si se considera que al menos en neuronas completamente diferenciadas, c-Fos presenta una función pro-apoptótica más que anti-apoptótica (Curran and Morgan 1995; Chen, Shen et al. 2015), aunque el rol de c-Fos en apoptosis depende de su “partner” en el complejo AP-1 (Suda, Itoh et al. 2014). Aún restan estudios que permitan determinar si diferentes combinaciones de componentes del complejo AP-1 o diferentes co-activadores, actuando sobre un mismo promotor dependiente de AP-1 regulan genes específicos en forma diferencial. Elaborar conclusiones claras acerca del rol fisiológico que c-Fos pueda ejercer en la regulación de la apoptosis en neuronas diferenciadas, en diferenciación o en progenitores aún no determinados, resulta complicado basados en la diversidad de funciones con las que ésta proteína ha sido asociada.

La mayor muerte celular en la población de células progenitoras y el menor número de células neuronales post-mitóticas en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *-/-* respecto de los E14.5 *c-fos* *+/+*, plantea los siguientes interrogantes: ¿la capacidad de diferenciación neuronal de las NSPCs *c-fos* *-/-* se encuentra realmente disminuida? o ¿es la mayor muerte celular de la población progenitora la causante de la menor población de neuronas post-mitóticas en la condición *ko*? La respuesta es que ambas situaciones ocurren concomitantemente, la mayor muerte celular en la corteza de E14.5 *c-fos* *-/-* claramente contribuye a la menor diferenciación neuronal observada en la condición *ko* en comparación a la condición *wt*. Asimismo, algunas observaciones también permiten proponer que las NSPCs *c-fos* *-/-* presentan menor capacidad de diferenciación neuronal

en comparación a las NSPCs *c-fos* +/+ : - el análisis del ángulo de división mitótico sugiere una mayor tendencia a la expansión de la población progenitora (incremento en el población de células Sox2 positivas) con detrimento de la diferenciación neuronal en la condición *ko*; - los ensayos de diferenciación a partir de cultivos primarios de la corteza cerebral en desarrollo muestran un menor porcentaje de diferenciación neuronal en el caso de E14.5 *c-fos* -/- en comparación a la condición *wt*.

La duración del ciclo celular es otro parámetro de fundamental importancia para la generación de las diferentes neuronas del plato cortical (tanto en número como tipo neuronal), por lo que cambios en este parámetro generan alteraciones en la neurogénesis (Caviness, Goto et al. 2003; Chang, Chen et al. 2013). Durante el desarrollo de la corteza cerebral, el compromiso al linaje neuronal de las células precursoras está asociado a un incremento en la duración de la fase G1 y una reducción en la duración de la fase S debido a una disminución en los requerimientos de control de la calidad del ADN. Al analizar el número de células en mitosis no se observan diferencias significativas entre los E14.5 *c-fos* +/+ y *c-fos* -/-, aunque los ensayos de inyección dual con EdU y BrdU indican un mayor número de células en fase S en la condición *ko* [incremento en el número de células EdU(+)BrdU(+)]. Estos resultados sugieren que la duración del ciclo celular de las células madres/progenitoras neurales *c-fos* -/- es diferente al de las células madres/progenitoras *c-fos* +/+. En este sentido, los ensayos de citometría mediante marcación con yoduro de propidio indican que luego de cuatro días de iniciado el cultivo de las NSPCs, un mayor porcentaje de células *c-fos* -/- se encuentran en fase S del ciclo celular en detrimento del porcentaje de células en fase G1. Teniendo en cuenta resultados previos que indican que la duración del ciclo celular de las NSPCs resulta similar tanto *in vivo* como *in vitro* (Shen, Wang et al. 2006) y que al día cuatro de cultivo celular menos del 40% de las NSPCs se encuentran en fase S del ciclo celular (Callaghan, Dong et al. 1999), los resultados obtenidos sugieren que la duración de las diferentes fases del ciclo celular en las NSPCs *c-fos* -/- es diferente al de las NSPCs *c-fos* +/+, con un incremento en la duración de la fase S y una disminución en la duración de la fase G1. Esta observación resulta interesante, por lo que es necesario profundizar en el estudio de la duración del ciclo celular de las NSPCs en la condición *ko* (Takahashi, Nowakowski et al. 1995), como así también analizar la expresión de diferentes proteínas involucradas en el control del ciclo celular, como p27, p21 y diferentes ciclinas.

### - Rol molecular de c-Fos durante la neurogénesis embrionaria.

Para establecer cuál de las funciones de *c-fos* está involucrada en la determinación de las diferencias observadas en la neocorteza en desarrollo, es decir, si es por medio de su función como activador de la síntesis de lípidos o como factor de transcripción tipo AP-1 (Cardozo Gizzi and Caputto 2013), ambas actividades fueron examinadas a partir de extractos de la corteza cerebral en desarrollo de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*. No se encontraron diferencias significativas en la marcación de fosfolípidos *in vitro* entre ambos genotipos, incluso después del agregado de c-Fos recombinante al medio de ensayo. Esto indica que la maquinaria de síntesis de fosfolípidos se encuentra sintetizando los componentes de membrana a una tasa lo suficientemente alta como para ser independiente de la activación mediada por c-Fos. En concordancia con esta última hipótesis, el contenido de membranas del retículo endoplásmico, donde la síntesis de fosfolípidos tiene lugar mayoritariamente, y de Golgi, es significativamente mayor en la corteza cerebral en desarrollo que en la corteza cerebral de animales adultos, en donde el agregado de c-Fos recombinante si afecta a la marcación *in vitro* de fosfolípidos (Silvestre, Maccioni et al. 2009).

Por otro lado, evaluamos el contenido del factor de transcripción AP-1 en extractos nucleares de la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*. Una mayor intensidad de la banda correspondiente al complejo AP-1/ADN se observó en los E14.5 *c-fos* *-/-* en comparación a la condición *wt*, sugiriendo un mayor contenido de complejo AP-1 en la condición *ko*. La forma canónica del complejo AP-1 es el hetero-dímero entre c-Jun y c-Fos, una combinación que resulta ser la más estable y se une más fuertemente a su secuencia consenso en el ADN comparado a los homo-dímeros de Jun (Halazonetis, Georgopoulos et al. 1988; O'Shea, Rutkowski et al. 1989; O'Shea, Rutkowski et al. 1992). La ausencia de c-Fos no afecta la expresión de las proteínas Jun en la corteza cerebral de embriones [como se muestra para c-Jun en el presente trabajo y en Ciapponi L (2002)], por lo que los homo-dímeros de Jun pueden formarse en los animales *c-fos* *-/-*. Si bien no se obtuvieron evidencias que indiquen que homo-dímeros de Jun estén reemplazando al hetero-dímero Jun/Fos en los embriones mutantes, evidentemente los homo-dímeros no pueden compensar la falta de la proteína c-Fos, lo cual se evidencia en el fenotipo de los animales *c-fos* *-/-*, indicando la necesidad de su presencia para el normal desarrollo y crecimiento de los ratones (Johnson, Spiegelman

et al. 1992; Wang, Ovitt et al. 1992). Una explicación posible al requerimiento de c-Fos para un fenotipo normal de ratón puede surgir de la observación de que, además de la menor estabilidad de los homo-dímeros Jun respecto a los hetero-dímeros Jun/Fos, los dominios de transactivación de c-Fos y c-Jun actúan sinérgicamente en la regulación de la expresión de genes en forma más eficiente que los homo-dímeros Jun (van Dam and Castellazzi 2001). Esto soporta la idea de que funciones bioquímicas distintas y complementarias de c-Fos y c-Jun determinan su función como reguladores transcripcionales (Abate, Luk et al. 1991).

También pueden formarse hetero-dímeros AP-1 entre las proteínas Jun y los otros miembros de la familia de proteínas Fos (Fra-1, Fra-2, FosB). Los dímeros AP-1 resultantes usualmente tienen tanto funciones que se superponen como funciones únicas tejido-específicas (Milde-Langosch 2005). Al analizar la expresión de Fra-1, se observó su ausencia, tanto en los embriones *c-fos* *+/+* como *c-fos* *-/-*, aunque sí se detectó la presencia de Fra-2. No obstante no se observaron evidencias de la presencia de dímeros AP-1 que contengan Fra-2 en su composición ni en los embriones *c-fos* *+/+* ni en los *c-fos* *-/-*. Todavía restan estudios que permitan determinar si diferentes combinaciones de componentes AP-1 regulan genes específicos involucrados en la diferenciación neuronal en forma diferencial o si una única combinación de componentes AP-1 juega un rol más general en la regulación de la expresión de varios genes (Yoon, Kim et al. 2013), generando un escenario muy complicado para el estudio de los distintos dímeros AP-1 y el resultado de su actividad en las células de mamíferos. Un estudio más detallado de la capacidad regulatoria de los distintos factores de transcripción AP-1, que contienen y no contienen c-Fos, podría ayudar a entender las diferencias fisiológicas observadas en los animales analizados.

### **- Breve estudio de la neurogénesis en la SVZ de animales adultos *c-fos**+/+* y *c-fos**-/-*.**

La neurogénesis adulta es un proceso que ocurre en dos regiones del cerebro adulto de mamíferos: la región subgranular del giro dentado y la región sub-ventricular (SVZ) ubicada a lo largo del ventrículo lateral. Existe un gran interés en poder entender los mecanismos moleculares y celulares que regulan la neurogénesis en el adulto (Suh, Deng et al. 2009) debido al potencial terapéutico de las células madres neuronales adultas (Miller 2006; Okano 2012). Recientemente, la señal mediada por ERK5 MAPK

ha sido postulada como la única candidata en regular el proceso de diferenciación neuronal en la región sub-granular del giro dentado (Pan, Zou et al. 2012).

En el caso de la SVZ las células madres neuronales residentes se denominan células tipo B y derivan de la población de RGCs presentes durante el desarrollo embrionario. Las mismas pueden estar en estado de quiescencia o ingresar al ciclo celular para dar lugar a las células amplificadoras transcientes (células tipo C), las cuales posteriormente originan las células tipo A o neuroblastos. Los neuroblastos migran hacia el bulbo olfatorio y una vez alcanzado el mismo, diferencian a interneuronas.

El análisis de cortes coronales del cerebro adulto de ratones evidenció que la SVZ de animales *c-fos* *-/-* presenta un menor tamaño que la SVZ de animales *wt*. Asimismo, los ensayos de incorporación con BrdU muestran que un menor porcentaje de células se encuentran en fase S del ciclo celular en la condición *ko*. Esto último, sumado al menor porcentaje de células positivas para el marcador de neuroblastos (DXC) en la SVZ de animales *c-fos* *-/-*, sugiere una menor actividad neurogénica en la condición *ko*. Aún resta profundizar con estudios que permitan por ejemplo, determinar si existen diferencias en la población de células madres neurales, si las mismas expresan c-Fos al salir del estado de quiescencia, si c-Fos regula la capacidad de diferenciación neuronal de las células madres neuronales adultas, etc. Teniendo en cuenta las alteraciones en el aprendizaje y la memoria que los animales *c-fos* *-/-* presentan, resultaría interesante estudiar el proceso de neurogénesis en la región subgranular del giro dentado, debido a que las neuronas generadas en este sitio se integran localmente y participan en los procesos de aprendizaje y memoria.

### - Comentarios finales

Los resultados del presente trabajo muestran que la proteína c-Fos participa, mediante su función como factor de transcripción AP-1, en la regulación del desarrollo normal de la corteza cerebral murina, ya que su ausencia en los animales *c-fos* *-/-* genera una corteza cerebral adulta de menor tamaño al normal. Estas observaciones, sumadas a estudios anteriores realizados en estos animales, permiten, una vez más, destacar la importancia del proto-oncogén c-Fos en la homeostasis tisular y en el desarrollo normal.

Las diferencias en el tamaño de la corteza cerebral entre animales *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* comienzan a ser evidentes en estadios tempranos del desarrollo embrionario,

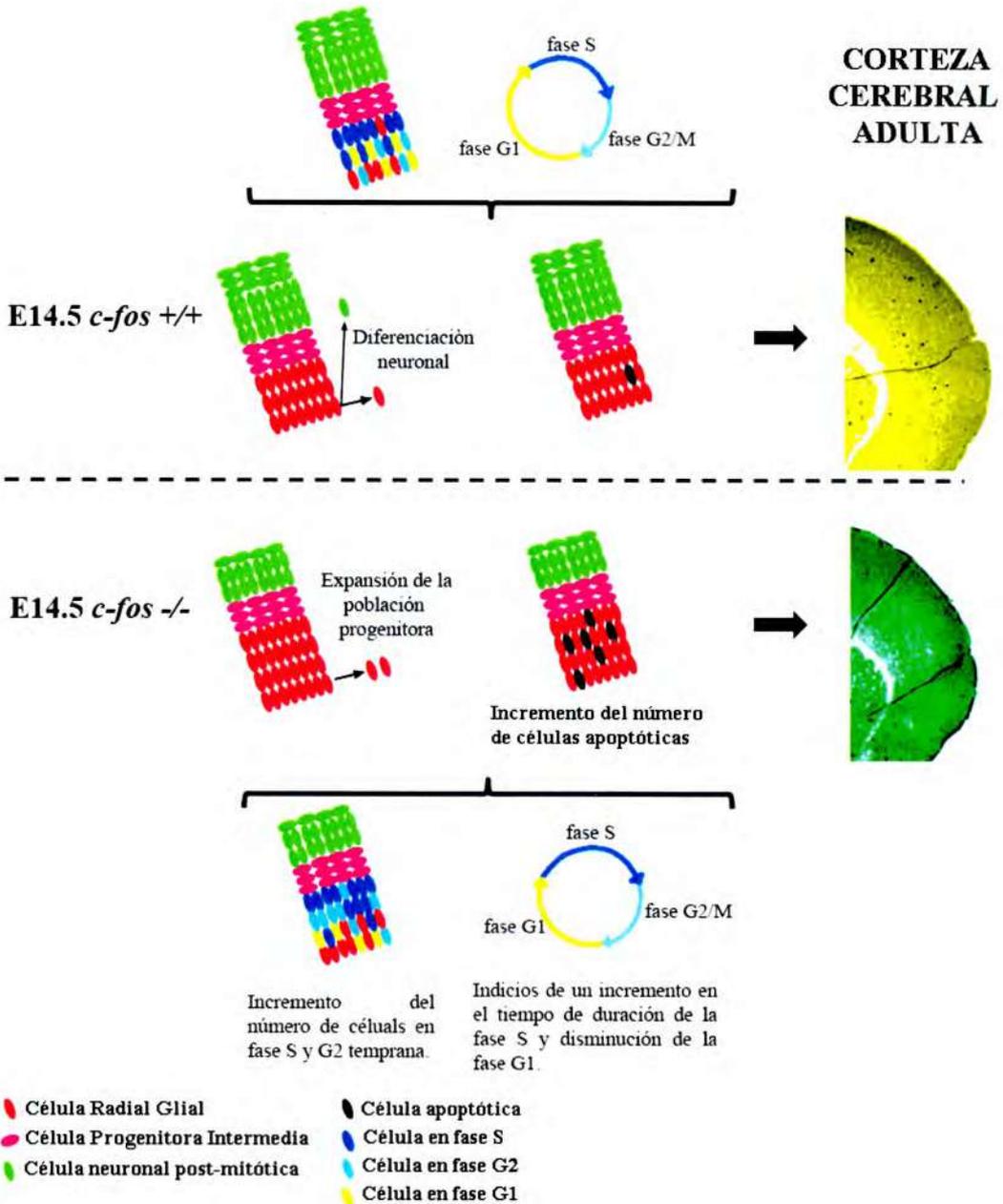
permanecen a lo largo del mismo y resultan claramente evidentes en la adultez. Estas diferencias resultan ser la consecuencia de la concomitancia de diferentes eventos incluyendo el incremento en el índice de apoptosis y la disminución en la tendencia a la diferenciación neuronal de las células madres/progenitoras neurales (NSPCs) *c-fos* *-/-*, con la consecuente reducción de la población de neuronas post-mitóticas observada al analizar la corteza cerebral de E14.5. Teniendo en cuenta la importancia de una adecuada regulación del ciclo celular para que la neurogénesis transcurra en forma normal (Pilaz, Patti et al. 2009; Lim and Kaldis 2012), las modificaciones en la duración de las distintas fases del ciclo (en particular en la fase G1 y S) en la población de células progenitoras *c-fos* *-/-* podrían ser responsables de la menor neurogénesis y la mayor muerte celular observada en la corteza cerebral de E14.5 *c-fos* *-/-* en comparación a los E14.5 *c-fos* *+/+*. El estudio del ciclo celular de esta población mediante ensayos *in vivo* resulta complejo desde el punto de vista experimental. Es por ello que en principio se proyecta comparar el comportamiento de esta población a través del uso de cultivos de neuroesferas mediante: ensayos de marcación con yoduro de propidio a diferentes días de cultivo (Alam, Sen et al. 2004) y luego del arresto celular con la proteína morfogénica de hueso tipo 4 (BMP4) (Sun, Hu et al. 2011), y ensayos de western blot que permitan comparar la expresión de algunas de las proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular (p21, p27, cdk4, cdk2).

Por otro lado, si bien la ausencia de c-Fos disminuye la capacidad de diferenciación neuronal de las NSPCs *c-fos* *-/-*, las mismas no se encuentran imposibilitadas de diferenciar a neuronas post-mitóticas. Es por ello que resultaría importante determinar si la ausencia de c-Fos afecta la diferenciación hacia un tipo neuronal particular, teniendo en cuenta el gran interés que existe en tratar de establecer los factores que participan en el control de la diferenciación hacia tipos neuronales específicos (Pluchino, Zanotti et al. 2005; Martino and Pluchino 2006).

Si bien el mecanismo molecular directo responsable de las diferencias observadas no ha sido estudiado, se pudo determinar que la falta de c-Fos durante el desarrollo embrionario modifica el contenido y la composición del factor de transcripción AP-1 entre animales *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*, por lo que es posible postular diferencias en la expresión de genes involucrados en el comportamiento de las NSPCs durante la neurogénesis como el factor responsable de las alteraciones observadas a lo largo del desarrollo de la corteza cerebral de embriones *c-fos* *-/-*. El estudio de la expresión de genes involucrados en la diferenciación neuronal y muerte celular por

apoptosis mediante ensayos de microarray en muestras obtenidas a partir de NSPCs *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ , podría arrojar datos interesantes acerca de los genes regulados, ya sea directa o indirectamente, por c-Fos.

**- Resumen**



**Figura 41**

Resumen de las principales diferencias observadas al comparar la corteza cerebral de E14.5 *c-fos*  $+/+$  y *c-fos*  $-/-$ . Las modificaciones en la duración de las distintas fases del ciclo celular podrían resultar en un incremento de la muerte celular por apoptosis y una menor tendencia a la diferenciación neuronal de las NSPCs *c-fos*  $-/-$ , generando una corteza cerebral adulta de menor tamaño comparada a la condición *wt*.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### - Animales

Ratones heterocigotas para la mutación nula en el proto-oncogén *c-fos* (*c-fos* +/-) (129X1/SvJ \* C57BL/6J) fueron adquiridos en la empresa The Jackson Laboratory. Estos animales fueron cruzados para conseguir animales *knock-out* para el proto-oncogén *c-fos* (*c-fos* -/-) (Johnson, Spiegelman et al. 1992). La determinación del genotipo de la progenie de estos cruzamientos fue realizada mediante PCR utilizando los siguientes primers:

FKO1 5'-GAGCAACTGAGAAGACTGGATAGAGCCGGC-3'

FKO2 5'-GGAGAGCCCATGCTGGAGAAGGAGTCG-3'

PN1 5'-GGCGAGGATCTCGTCGTGACC-3'

Los primers FKO1 y FKO2 amplifican un fragmento del alelo *wt* de *c-fos*, mientras que los primers FKO2 y PN1 permiten detectar el alelo mutante para el proto-oncogén *c-fos*.

Todos los animales son de la cepa C57BJ/6J y fueron crecidos bajo condiciones estándares. Los experimentos fueron desarrollados de acuerdo a las condiciones establecidas por la Guía de Cuidado y Uso de Animales Experimentales publicado por el Consulado Canadiense sobre Cuidado Animal y aprobado por el comité local (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, Exp. 15-99-39796).

### - Determinación del peso total y del porcentaje de peso seco de órganos procedentes de animales adultos.

Animales *c-fos* +/+ y *c-fos* -/- fueron monitoreados en peso luego del destete y entre los 2-4 meses de edad fueron sacrificados por dislocación cervical, algunos de sus órganos (hígado, riñón, páncreas, ovarios y testículos) fueron extraídos y conservados en tampón fosfato salino 10mM (PBS 10mM) fría. El peso total de cada órgano fue evaluado y una fracción de peso conocido de cada uno de ellos fue sometida a desecación al vacío, hasta alcanzar peso constante. Teniendo en cuenta el peso inicial de la fracción de órgano sometida a desecación y el peso final alcanzado luego del secado,

se calculó el porcentaje de peso seco para cada órgano. Cada órgano fue evaluado por triplicado.

#### **- Comparación del tamaño celular de células obtenidas a partir de órganos procedentes de animales adultos.**

Para realizar la comparación del tamaño celular de células procedentes de la sangre, se realizó la extracción de la misma a partir de la cola de animales *c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-* de entre 2-4 meses de edad. La sangre fue heparinizada (para evitar la coagulación de la misma) y posteriormente evaluada por citometría de flujo, en donde se analizaron los parámetros Side Scatter (SSC-A) y Foward Scatter (FSC-A).

Para el caso del análisis de hígado y riñón, una fracción de los mismos fue disociada primero mecánicamente y luego mediante el tratamiento en solución de tripsina 0,25% durante 10' a 37°C bajo agitación. Posteriormente se inactivo la tripsina y las muestras fueron filtradas a través de una malla de 40µm de diámetro de poro. La suspensión obtenida fue enjuagada dos veces en solución de PBS 10mM y finalmente analizada mediante citometría de flujo al igual que las muestras de sangre. En todos los casos se evaluaron 4 animales por cada genotipo.

#### **- Cuantificación de núcleos totales en la corteza cerebral adulta**

Siete animales adultos (de entre 2 a 4 meses de edad) de cada genotipo (*c-fos* *+/+* y *c-fos* *-/-*) fueron sacrificados por dislocación cervical, sus cerebros fueron extraídos y fijados en solución de para-formaldehído (PFA) al 4% durante 15-30 días. Luego del período de fijación las cortezas cerebrales fueron extraídas, pesadas y una fracción (de peso conocido) separada para su posterior procesamiento. A partir de esta fracción de muestra, se preparó una suspensión de núcleos mediante disociación mecánica en solución de Citrato de Sodio 40mM y Tritón X-100 al 1%. Esta solución produce la lisis del plasmalema preservando la envoltura nuclear intacta (Herculano-Houzel and Lent 2005). Se utilizó 1mL de solución de lisis por cada 100mg de tejido procesado.

Luego de la disociación mecánica, se tomó una alícuota de 30µL de la suspensión nuclear y se le agregó 150µL de una solución de Ioduro de Propidio (PI) en

PBS 10mM, para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Para cuantificar el número total de núcleos PI positivos dos parámetros fueron analizados: Side Scatter (SSC-A) y PI (PI-A). Este análisis permite establecer la región correspondiente a los núcleos PI positivos evitando la influencia de los restos celulares derivados del procesamiento de las muestras (Young, Flaherty et al. 2012). Todas las muestras fueron procesadas por duplicado.

#### **- Obtención de embriones de 13.5 (E13.5), 14.5 (E14.5) y 16.5 (E16.5) días de gestación**

Los ratones hembras jóvenes presentan cuatro etapas en su ciclo estral: estro, metaestro, diestro y proestro. Hembras *c-fos* +/- en estado de estro (etapa del ciclo estral en cual las hembras se muestran receptivas al apareo) fueron puestas a cruzar con machos *c-fos* +/- durante la tarde, a la mañana del día siguiente fueron separadas. La medianoche durante la cual se mantuvieron juntos machos y hembras se consideró el día cero (0) de preñez. Las hembras cruzadas fueron controladas y al día 13.5 (E13.5), 14.5 (E14.5) o 16.5 (E16.5) de gestación fueron sacrificadas y sus embriones extraídos.

Los embriones se mantuvieron en PBS 10mM hasta su procesamiento. Para determinar el genotipo de cada embrión se tomaron muestras de sus extremidades, dichas muestras se mantuvieron a -20°C hasta realizar la extracción de DNA para su posterior genotificación por PCR.

#### **- Ensayos de inyección dual con EdU y BrdU**

Hembras preñadas a los 14.5 días de gestación fueron inyectadas por vía intraperitoneal (IP) con 100µL de una solución 1mg/mL de EdU (Life Technologies). A las dos horas de inyección con EdU se realizó una inyección IP con 200µL de una solución 5mg/mL de BrdU (Life Technologies). Luego de transcurridos 30 minutos de la última inyección, los embriones fueron sacrificados y sus cerebros extraídos para su posterior procesamiento por inmunofluorescencia.

## **- Obtención de cerebros embrionarios para su posterior análisis por inmunofluorescencia**

Embriones de 13.5 (E13.5), 14.5 (E14.5) o 16.5 (E16.5) de gestación fueron sacrificados y sus cerebros extraídos y fijados durante 24 horas a 4°C en paraformaldehído (PFA) al 4%. Luego, las muestras fueron transferidas a PBS 10mM y conservadas a 4°C durante al menos 48 horas antes de ser procesadas.

Luego de ser fijados, los cerebros embrionarios fueron deshidratados e incluidos en parafina utilizando el procesador Tissue-Tek (VIP, Leica). Para el análisis histológico de las muestras se realizaron cortes coronales de 5µm de espesor utilizando un micrótopo RM 2125 RT Leica y los cortes fueron montados sobre portaobjetos con carga positiva.

Los cortes coronales de tejido cerebral embrionario fueron tratados con las siguientes soluciones para realizar la de-parafinación, hidratación y posterior activación antigénica de las muestras:

1- 3 lavados de 5' en tolueno

2- 2 lavados de 3' en etanol al 100%

3- 2 lavados de 3' en etanol al 95%

4- 2 lavados de 3' en etanol al 70%

5- 1 lavado de 5' en H<sub>2</sub>O

6- Activación antigénica mediante dos lavados de 10' en solución de citrato de sodio 10mM (pH6) en microondas a una potencia de 620W

7- Luego de dejar enfriar los vidrios, se realizó un enjuague durante 5' en H<sub>2</sub>O y se procedió a realizar la inmunomarcación.

## **- Inmunofluorescencia de tejido embrionario**

Luego de realizar la activación antigénica de los cortes coronales incluidos en parafina, las muestras fueron bloqueadas en solución de PBS 10mM suplementada con 7.5% de suero de cabra y 7.5% de suero fetal bovino (solución de bloqueo) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes fueron incubados toda la noche en cámara húmeda a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución

de bloqueo. Los anticuerpos primarios utilizados con sus correspondientes diluciones se indican en la tabla I.

ANTICUERPO	ESPECIE	DILUCIÓN	CATÁLOGO	EMPRESA
<b>Anti-cleaved caspase-3</b>	Conejo	1:200	9661	Cell Signaling
<b>Anti-Tbr2</b>	Conejo	1:200	ab23345	Abcam
<b>Anti-Tbr1</b>	Conejo	1:200	Ab31940	Abcam
<b>Anti-Phospho-HistoneH3 (Ser10)</b>	Ratón	1:200	9706	Cell Signaling
<b>Anti-βIII-tubulin (TUJ1)</b>	Conejo	1:200	MRB-435P	Covance
<b>Anti-MAP2</b>	Ratón	1:200	MAB3418	Chemicon
<b>Anti-Sox2</b>	Ratón	1:200	4900	Cell Signaling
<b>Anti-Sox2</b>	Conejo	1:200	AB5603	Chemicon
<b>Anti-NeuN</b>	Ratón	1:200	MAB377	Millipore
<b>Anti-Nestin</b>	Ratón	1:200	556309	BD Pharmingen

**Tabla I.** Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia de tejido embrionario.

Para la detección de EdU y BrdU, luego de realizar la activación antigénica los cortes fueron permeabilizados con solución de Tritón X-100 0,5% en PBS 10mM durante 10' a temperatura ambiente y luego fueron procesados para la detección de EdU siguiendo las indicaciones del fabricante (Click-iT EdU Alexs Fluor 488 imaging kit, C10337, Life Technologies). Luego del revelado de EdU, los cortes fueron tratados durante 30' a 37°C con una solución 0,5mg/mL de DNasa. Posteriormente los cortes fueron enjuagados en solución de PBS 10mM e incubados con anticuerpo primario anti-BrdU (preparado en solución de bloqueo, dilución 1:300, RPN20AB, Amersham) durante toda la noche a 4°C.

Después del tratamiento con el anticuerpo primario, las muestras fueron enjuagadas tres veces en PBS 10mM (5 minutos por lavado) y posteriormente incubadas durante una hora en oscuridad con el anticuerpo secundario apropiado conjugado a un fluorocromo Alexa (Alexa Fluor 594 o 488, dilución 1:500 en PBS 10mM, Life Technologies). Luego las muestras fueron enjuagadas en PBS 10mM e incubadas

durante diez minutos a temperatura ambiente con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para conseguir la tinción nuclear. Finalmente los cortes fueron montados en medio de montaje para fluorescencia (Fluoromount; Southern Biotechnologies Associates) y examinados utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51) con un objetivo de 40X. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software Photoshop (Adobe).

Todos los marcadores evaluados fueron analizados a nivel de la región dorso-medial de la corteza cerebral en desarrollo (Takahashi, Nowakowski et al. 1995).

### **- Medición del espesor de la corteza cerebral en desarrollo**

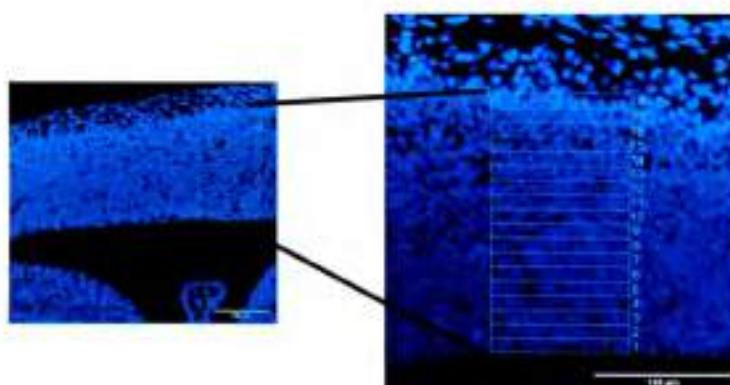
El espesor total de la corteza fue determinada en cortes coronales (5µm de espesor) teñidos con DAPI. Las mediciones fueron realizadas en dos regiones diferentes de ambos hemisferios comparando cortes de la misma posición antero-posterior. Para cada embrión analizado se realizaron tres mediciones de cada hemisferio. Diez embriones de cada genotipo fueron evaluados.

### **- Cuantificación de células en mitosis y apoptosis**

El número de células en mitosis (positivas para el marcador Fosfo-Histona H3 (H3P)) presentes en la región dorso-medial de la corteza cerebral fue cuantificado y diferenciado de acuerdo a su localización como: apical (mitosis superficial) o basal (mitosis no superficial). Cada embrión fue analizado cuantificando cuatro a cinco secciones diferentes, la longitud de cada sección analizada fue medida y los resultados expresados como el número de núcleos positivos para H3P/100µm de longitud. Las células apoptóticas fueron identificadas por su núcleo picnótico y su tinción positiva para caspasa clivada-3. Los núcleos apoptóticos fueron cuantificados de acuerdo a su localización en: zona ventricular (VZ), zona sub-ventricular (SVZ), zona intermedia (IZ) o plato cortical (CP). La longitud y el espesor de cada región analizada fue medida y los resultados expresados como número de células positivas para caspasa clivada-3/0,1mm<sup>2</sup> de superficie ventricular.

## - Cuantificación de marcadores celulares

Para la cuantificación de las células positivas para Sox2, Tbr2, Tbr1, MAP2, EdU y BrdU se analizó un sector de 100 $\mu$ m en su dimensión medial-lateral y de 5 $\mu$ m (correspondiente al espesor de cada corte) en su dimensión rostro-caudal. Dicho sector fue dividido utilizando una grilla que posee 18 rectángulos de 10 $\mu$ m de altura en su dimensión radial. Los rectángulos (bins) fueron enumerados y alineados de modo tal que el rectángulo N° 1 (#bin 1) se encuentra adyacente a la superficie ventricular, con su lado de mayor longitud paralelo a la superficie (Figura 42). El número de células positivas para cada marcador fue cuantificado en cada rectángulo y los resultados expresados como el número de células positivas para cada marcados vs su posición (# bin) o como el número de células positivas en la superficie total de la grilla utilizada (180 $\mu$ m x 100 $\mu$ m), según se indica en cada figura. Para cada embrión se analizaron entre 3 a 4 sectores consecutivos. El número de animales utilizados en los distintos análisis se indica en la leyenda de cada figura.



**Figura 42. Grilla utilizada para la cuantificación de los distintos marcadores examinados.**

Cortes coronales fueron analizados en la región dorso-medial de la corteza cerebral en desarrollo. La grilla utilizada presenta 100 $\mu$ m de longitud en su dimensión medial-lateral y está dividida en 18 rectángulos (bins) de 10 $\mu$ m de altura en su dimensión radial. La grilla fue alineada de tal forma que el rectángulo N° 1 (#bin 1) se encuentra adyacente a la superficie ventricular, con su lado de mayor longitud paralelo a la superficie.

El espesor de la región correspondiente a las células neuronales diferenciadas y a células determinadas a diferenciar hacia el linaje neuronal, fue determinado utilizando la tinción de cortes coronales con el marcador  $\beta$ III-Tubulina. Las mediciones se realizaron

en dos regiones diferentes de ambos hemisferios comparando cortes de la misma posición antero-posterior. Para cada embrión se realizaron tres mediciones en ambos hemisferios.

#### **- Orientación del ángulo de división mitótico**

La orientación del ángulo de división mitótico fue cuantificado utilizando el programa ImageJ (Godin, Colombo et al. 2010). La orientación de las cromátidas hermanas fue determinada trazando una línea que conecta el comienzo y el final de cada cromátida. El plano de clivaje fue definido como la línea media entre las dos líneas anteriormente graficadas. El ángulo formado entre el plano de clivaje y la línea paralela a la superficie ventricular fue medido.

#### **- Disociación del telencéfalo de E14.5 para la obtención de cultivo de células madre progenitoras neurales (NSPCs)**

Hembras preñadas a 14.5 días de gestación (E14.5) fueron sacrificadas por dislocación cervical y sus embriones fueron extraídos. Los embriones se mantuvieron en solución salina de HBSS (por sus siglas en inglés HBSS: Hank's Balanced Salt Solution) hasta la disociación de sus cerebros. Bajo lupa se realizó la extracción del telencéfalo, el cual fue disociado mecánicamente en DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Life Technologies). La suspensión obtenida fue centrifugada a 200xg durante 5 minutos y enjuagada dos veces en DMEM/F12. Luego del último lavado las células fueron filtradas a través de un filtro de 30µm (número de catálogo 130-041-407, Miltenyi Biotec), cuantificadas y sembradas en la densidad adecuada de acuerdo al ensayo a realizar.

#### **- Cultivo de neuroesferas**

Las NSPCs fueron cultivadas en medio libre de suero compuesto por DMEM/F12 suplementado con 20ng/mL de bFGF (basic Fibroblast Growth Factor, Life Technologies), 20ng/mL de EGF (Epidermal Growth Factor, Sigma), B27 (Life Technologies) y 100µg/mL de penecilina/estreptomicina como antibióticos. Para la

expansión de las NSPCs 100 células/ $\mu$ L fueron sembradas en placas de baja adherencia e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las neuroesferas fueron disociadas con tripsina 0,05% durante 5 minutos a 37°C. Luego de la incubación la tripsina fue removida y las células fueron disociadas mecánicamente en DMEM/F12, cuantificadas y sembradas para los ensayos correspondientes.

#### **- Ensayo de proliferación de neuroesferas**

La proliferación de las NSPCs fue medida mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada (<sup>3</sup>H-T) (Yang, Ellis et al. 2008) a los 7, 14 y 21 días de cultivo posteriores a la disociación de los cerebros embrionarios. Dos días anteriores a la medición 15000 células en 100 $\mu$ L de medio completo fueron sembradas en placas de 96 wells. El día correspondiente a la medición 1 $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-T fue agregado a cada well y las células fueron incubadas por 6 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron cosechadas en papel de fibra de vidrio, los cuales luego fueron secados y colocados en viales conteniendo 1mL de líquido de centelleo. Cada muestra fue medida por quintuplicado y se ensayaron al menos 6 embriones de cada genotipo.

#### **- Apoptosis**

La cuantificación de la apoptosis en las NSPCs fue realizada a los 7, 14 y 21 días de cultivo posteriores a la disociación de los cerebros embrionarios, utilizando tinción de Anexina V de acuerdo a las indicaciones del fabricante (FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit, número de catálogo V13242, Molecular Probes). Previo a la tinción las células fueron disociadas en una suspensión de células únicas. Anexina V marca células en apoptosis y necrosis pero las células necróticas son excluidas mediante la marcación con Ioduro de Propidio (PI). El número de células marcadas fue cuantificado mediante citometría de flujo.

#### **- Ensayo de auto-renovación y multipotencialidad**

La capacidad de auto-renovación de las NSPCs se evaluó mediante el ensayo clonal de formación de colonias, en el cual se determina la proporción de células que

son capaces de formar una nueva esfera. Para ello, una suspensión de células únicas obtenidas a partir de neuroesferas primarias (NS 1<sup>rias</sup>) (obtenidas luego de 7 días de cultivo en suspensión) fue sembrada en placas de 96-well con 50 y 100 células por well (Gomez-Nicola, Valle-Argos et al. 2011). Luego de 7 días de cultivo, las nuevas neuroesferas fueron visualizadas bajo microscopio de epifluorescencia, fotografiadas, cuantificadas y su diámetro medio determinado con la ayuda del programa ImageJ. Cada muestra fue evaluada en 10 wells independientes y los resultados fueron representados como el promedio del número de neuroesferas secundarias (NS 2<sup>rias</sup>)/well. Se analizaron 4 embriones por cada genotipo.

Para evaluar la multipotencialidad de las NSPCs, una suspensión única de células fue sembrada sobre slice de 8 wells cargados con poli-L-lisina en presencia de Suero Fetal Bovino al 10% y ausencia de factores de crecimiento (EGF y bFGF). 250000 células/well fueron cultivadas a 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 7 días de cultivo las células fueron sometidas a inmunofluorescencia para la detección de los tres linajes celulares: astrocitos, oligodendrocitos y neuronas.

#### **- Ensayo de formación de colonias (NCFC Assay: Neural Colony Forming Cell Assay)**

A partir del telencéfalo de embriones se obtuvo una suspensión de células únicas la misma fue sembrada en un medio especial (StemCells Technologies), el cual contiene 20ng/ml de EGF (sigma), 10ng/ml de bFGF (Invitrogen) y 30% (v/v) de colágeno (Stem cell Technologies). Las células fueron sembradas en placas de 35mm a una concentración de 7500 células/placa e incubadas por 3 semanas a 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos fueron suplementados semanalmente con factores de crecimiento, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Luego de transcurrido los 21 días de cultivo las colonias son visualizadas bajo microscopio de epifluorescencia y fotografiadas para su posterior cuantificación y medición. El tamaño de las colonias fue medido utilizando el programa ImageJ. De acuerdo a su tamaño las colonias fueron divididas en cuatro rangos de tamaño: menor a 0,5mm, entre 0,5-1,0mm, entre 1,0-2,0mm y mayores a 2,0mm. Todas aquellas colonias mayores a 2,0mm de diámetro se considera que provienen de una célula madre, mientras que aquellas colonias que poseen un diámetro menor a 2,0mm se considera que provienen

de progenitores neurales (Louis, Rietze et al. 2008). Los resultados fueron representados en un gráfico de columnas como % de colonias por rango de tamaño.

### - Marcación *in vitro* de fosfolípidos

A partir de cultivos de NSPCs o de la corteza cerebral en desarrollo de E14.5 se prepararon homogeneizados totales en H<sub>2</sub>O, la disociación completa de las muestras se obtuvo luego del sonicado de las mismas. La concentración de proteínas en estos homogenatos fue determinada por el método de Bradford.

Para realizar la marcación *in vitro* de fosfolípidos se incubaron 80µg de proteínas de homogenato total durante 1 hora a 37°C en 100µL de medio conteniendo: 140mM NaCl, 5mM KCl, 0,5mM MgCl<sub>2</sub>, 5,6mM Glucosa, 64mM HEPES ph 7,5 (buffer de reacción) y 6x10<sup>6</sup> cpm de <sup>32</sup>P-ATP-γ como fuente de fosfato radioactivo (actividad 3000 Ci/mmol a concentración 10mCi/mL, Perkin Elmer). Donde es indicado, se agregó a la mezcla de reacción 80ng de c-Fos recombinante. La obtención posterior de los fosfolípidos fue realizada de acuerdo al método ya descrito por Guido y Caputto (Guido and Caputto 1990).

La reacción de marcación fue detenida mediante la adición de 100µL de la mezcla ácido tricloroacético: ácido fosfotúngstico (TCA:PTA) 10:1 (v/v) y posterior centrifugación a 3200rpm durante 15' a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado y el precipitado (que contiene lípidos y proteínas) nuevamente resuspendido en 1mL de TCA: PTA 5:0,5 (v/v). Este procedimiento se repitió 5 veces y el último lavado fue realizado con 1mL de H<sub>2</sub>O. El precipitado final fue resuspendido en 1mL de solución de cloroformo: metanol 2:1 (v/v) de manera de solubilizar los lípidos presentes y dejar precipitadas las proteínas. Luego de aplicar un vortex, la muestra se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a viales en donde se evaporó hasta sequedad. Una vez evaporado el sobrenadante, se agregó 1mL de líquido de centelleo (OptiPhase-HiSafe3, Perkin Elmer), se agitó vigorosamente por al menos 2' cada vial y se midieron las cpm en contador de centelleo.

Cada muestra fue evaluada por quintuplicado y los resultados fueron expresados como % de marcación respecto al control, considerando el control la muestra *wt* sin el agregado de proteína recombinante.

### - Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)

Las proteínas nucleares fueron preparadas siguiendo un método modificado de Schreiber (Schreiber, Matthias et al. 1989). Cortezas cerebrales en desarrollo de E14.5 fueron homogeneizadas en 400 $\mu$ L de solución A fría (10mM HEPES ph 7,9, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 0,5mM PMSF, cocktail inhibidor de proteasas (# 1 719 386, Roche)). El tejido fue disociado mecánicamente e incubado durante 15' en hielo. Luego se agregó 20 $\mu$ L de una solución de NP-40 al 10%, se aplicó vortex por 10'' y se centrifugó la muestra 30'' a 6400rpm. El precipitado fue resuspendido en 120 $\mu$ L de solución B fría (20mM HEPES ph 7,9, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 420mM NaCl, 0,2mM EDTA, 25% (v/v) glicerol, 0,5mM PMSF, cocktail inhibidor de proteasas (# 1 719 386, Roche)) y se aplicó vortex por 10''. La muestra se incubó en hielo durante 30', aplicando vortex cada 5'. Finalmente la muestra fue centrifugada por 10' a 12000rpm, el sobrenadante conteniendo las proteínas nucleares fue guardado a -70°C y su concentración determinada mediante el método de Bradford.

Para la detección del complejo AP-1 se utilizó una sonda doble cadena de DNA conteniendo la secuencia consenso AP-1 (# 3050, Promega), la cual fue marcada mediante fosforilación con quinasa T4 utilizando <sup>32</sup>P-ATP- $\gamma$  como fuente de fosfato radioactivo (actividad 3000 Ci/mmol a concentración 10mCi/mL, Perkin Elmer) según las indicaciones del fabricante. La remoción del radioactivo no incorporado se realizó utilizando columnas G-25 (# 27-5325-01, Amersham). El porcentaje de incorporación de <sup>32</sup>P en la sonda y la actividad de la sonda AP-1 marcada (AP-1\*) (cpm/ $\mu$ L) fue determinada mediante medición de radioactividad en contador de centelleo.

Los extractos nucleares con la sonda marcada fueron incubados 20' en hielo en una solución de 20 $\mu$ L de volumen final conteniendo: 10 $\mu$ g de proteína nuclear, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5mM EDTA, 0,5mM DTT, 10mM Tris-HCl, 0,5mg/mL BSA, 10% Glicerol y 10000cpm de AP-1\*. Para los ensayos de competición se utilizó sonda AP-1 fría a una concentración 100 veces mayor que la sonda marcada.

El estudio de la composición del complejo AP-1 se realizó mediante la incubación en hielo durante 90' de los extractos nucleares con 2  $\mu$ L de anticuerpo específico (anti-c-Fos (sc-52, Santa Cruz), anti-Fra2 (sc-604, Santa Cruz) o anti-c-Jun (sc1694, Santa Cruz)) previo al agregado de la sonda marcada.

Las muestras se corrieron en geles no desnaturizantes de acrilamida: bisacrilamida (60:1) al 4%, en buffer Tris-Borato-EDTA a una concentración 0.5X. La corrida se realizó a 150V durante 90' o hasta observar el frente de corrida a 3/4 del inicio del gel, para la observación del frente de corrida se sembró en una calle 2 $\mu$ L de buffer de siembra con colorante.

Luego de la corrida el gel fue secado al vacío durante 45' a 80°C y posteriormente expuesto en un cassette con pantalla sensible al radioactivo en cuestión (BAS 2340, FujiFilm) por 24 horas aproximadamente. La pantalla fue visualizada utilizando el equipo FLA 3000 (FujiFilm).

### - Western Blot

Se realizaron extractos totales de proteínas a partir de NSPCs o de tejido cerebral utilizando buffer RIPA modificado (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 150mM NaCl; 2mM EDTA; 1% NP-40; 1% Deoxicolato de Na; 0,1%SDS) suplementado con cocktail inhibidor de proteasas (# 1 719 386, Roche). Las muestras fueron disociadas mediante sonicado y luego incubadas durante 30' en hielo. Posteriormente se centrifugó a 13200rpm por 10' a 4°C y se tomó el sobrenadante en donde se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.

Para cada corrida se utilizaron 40 $\mu$ g de proteínas totales las cuales fueron desnaturizadas por calentamiento durante 5' en buffer de siembra (50mM TrisHCl ph 6,8, 2%SDS, 0,1% Azul de bromofenol, 10% Glicerol, 100mM  $\beta$ -Mercaptoetanol). La corrida se realizó en geles SDS-Page con una concentración final de acrilamida: bisacrilamida (29,2:0,8) del 12%, bajo condiciones reductoras y en buffer de corrida Tris-Glicina. Luego de la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Sigma) durante 70' a 300mA en buffer de corrida suplementado con metanol a una concentración final de 30% (v/v). Luego de la electrotransferencia se procedió a bloquear la membrana por 1 hora a temperatura ambiente en solución de leche al 5% (p/v) en PBS 10mM. A continuación la membrana fue lavada tres veces en solución de PBS 10mM-Tween 0,05% (v/v).

Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla II) en solución de leche al 2% en PBS 10mM-Tween 0,05% (v/v) durante 16 horas a 4°C.

ANTICUERPO	ESPECIE	DILUCIÓN	CATÁLOGO	EMPRESA
Anti-c-Fos	Conejo	1:1000	sc-52	Santa Cruz
Anti- $\alpha$ -tubulina	Ratón	1:3000	DM1A	Sigma
Anti-c-Jun	Conejo	1:250	sc-1694	Santa Cruz
Anti-Fra2	Conejo	1:250	sc-604	Santa Cruz
Anti-GRP78BiP	Conejo	1:3000	G8918	Sigma
Anti-GM130	Ratón	1:200	610822	BD Biosciences

**Tabla II.** Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de Western Blot

Al día siguiente las membranas se enjuagaron tres veces en solución de PBS 10mM- Tween 0,05% (v/v) y fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla III) preparado en solución de PBS 10mM durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Finalmente las membranas fueron enjuagadas tres veces en solución de PBS 10mM-Tween 0,05% y una vez en solución de PBS 10mM, para posteriormente ser reveladas utilizando el sistema de detección Infra-roja Odyssey (Infrared Imaging System, Li-Cor).

ANTICUERPO	ESPECIE	DILUCIÓN	CATÁLOGO	EMPRESA
anti-ratón IRDye 800CW	Cabra	1:25000	926-32210	Li-Cor Bioscience
anti-ratón IRDye 680CW	Cabra	1:25000	926-68070	Li-Cor Bioscience
anti-conejo IRDye 800CW	Cabra	1:25000	926-32211	Li-Cor Bioscience
anti-conejo IRDye 680CW	Cabra	1:25000	926-32221	Li-Cor Bioscience

**Tabla III.** Anticuerpos secundarios utilizados en los ensayos de Western Blot

### - Administración de BrdU en animales adultos

Ratones adultos de entre 10 a 12 semanas fueron inyectados por vía IP con 50mg de BrdU/kg de peso corporal (concentración de la solución inyectada: 5mg/mL BrdU). Se realizó una inyección cada dos horas durante 10 horas (5 inyecciones en total). Treinta minutos luego de la última inyección los animales fueron anestesiados (con solución de ketamina-silacina) y perfundidos a través del corazón por la aorta ascendente con 20mL de PBS 10mM, seguido de 25-50mL PFA al 4% en PBS 10mM. Los cerebros fueron extraídos, fijados por dos horas a 4°C en PFA al 4% y finalmente transferidos a una solución de sucrosa al 10% en PBS 10mM conteniendo azida sódica al 0.01%. Los cerebros se mantuvieron en esta última solución por al menos 48 horas a 4°C. Luego los cerebros fueron congelados rápidamente en aire líquido y se realizaron cortes coronales de 10µm de espesor en criostato (Leica CM1900). Los cortes fueron montados sobre vidrios cargados positivamente.

### - Inmunofluorescencia de cerebros adultos

Los cortes coronales de los cerebros adultos fueron bloqueados en solución al 10% de suero de caballo en PBS 10mM suplementado con 0.2% de Tween20 durante 30' a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes fueron enjuagados tres veces con PBS 10 mM (5 minutos por lavado) y tratados durante 30' a 37°C con una solución 0.5mg/mL de DNasa. Luego los cortes fueron enjuagados en solución de PBS 10mM e incubados durante toda la noche a 4°C con la solución de anticuerpo primario preparada en solución de bloqueo: anti-BrdU (dilución 1:300, RPN20AB, Amersham) y anti-DXC (dilución 1:100, C-18, Santa Cruz).

Después del tratamiento con el anticuerpo primario, las muestras fueron enjuagadas tres veces en PBS 10mM (5 minutos por lavado) y posteriormente incubadas durante una hora en oscuridad con el anticuerpo secundario apropiado conjugado a un fluorocromo Alexa (Alexa Fluor 594 o 488, dilución 1:500 en PBS 10mM, Life Technologies). Las muestras fueron enjuagadas en PBS 10mM e incubadas durante diez minutos a temperatura ambiente con 4' ,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para conseguir

la tinción nuclear. Finalmente los cortes fueron montados en medio de montaje para fluorescencia (Fluoromount; Southern Biotechnologies Associates).

### **- Análisis de la SVZ de adultos**

Después de procesados los cortes coronales de cerebro adulto fueron examinados utilizando microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti y varias imágenes representativas fueron tomadas, para posteriormente ser analizadas utilizando el programa ImageJ.

Para la cuantificación del número de células positivas para BrdU y DXC en la SVZ, el nivel al cual la comisura anterior converge con la línea media (Bregma - 0.14) fue usado como referencia para definir el borde caudal de la SVZ. Varios cortes coronales en dirección rostral (caudal-rostral) a partir de este punto, fueron tomadas entre las posiciones 0.14-0.6mm aproximadamente (la zona completa que contiene a la SVZ se encuentra entre el bregma 0.14-1.54mm) (Azim, Fiorelli et al. 2012). El número total de células en el borde lateral de la SVZ (definidas por su tinción con DAPI), el número de células DXC y BrdU positivas fueron cuantificadas en 4 cortes de cada animal analizado. Los resultados se representaron como el porcentaje de células positivas para cada marcador en relación al total de células cuantificadas.

### **- Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos fue realizado utilizando el programa Graphpad Prism (Version 5.0c) mediante la aplicación del Test t con corrección de Welch o ANOVA doble con test de Bonferroni, según se indica en la leyenda de cada figura. Nivel de significancia: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$ .

# BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFIA

- Abate, C., D. Luk, et al. (1991). "Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: interaction among multiple activator and regulatory domains." *Mol Cell Biol* **11**(7): 3624-32.
- Abbott, D. W. and J. T. Holt (1997). "Finkel-Biskis-Reilly osteosarcoma virus v-Fos inhibits adipogenesis and both the activity and expression of CCAAT/enhancer binding protein alpha, a key regulator of adipocyte differentiation." *J Biol Chem* **272**(51): 32454-62.
- Airey, D. C., A. I. Robbins, et al. (2005). "Variation in the cortical area map of C57BL/6J and DBA/2J inbred mice predicts strain identity." *BMC Neurosci* **6**: 18.
- Alam, S., A. Sen, et al. (2004). "Cell cycle kinetics of expanding populations of neural stem and progenitor cells in vitro." *Biotechnol Bioeng* **88**(3): 332-47.
- Alfonso Pecchio, A. R., A. M. Cardozo Gizzi, et al. (2011). "c-Fos activates and physically interacts with specific enzymes of the pathway of synthesis of polyphosphoinositides." *Mol Biol Cell* **22**(24): 4716-25.
- Alvarez-Buylla, A. and D. A. Lim (2004). "For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain." *Neuron* **41**(5): 683-6.
- Anderson, C. W. (1994). "Protein kinases and the response to DNA damage." *Semin Cell Biol* **5**(6): 427-36.
- Angel, P., M. Imagawa, et al. (1987). "Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor." *Cell* **49**(6): 729-39.
- Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." *Biochim Biophys Acta* **1072**(2-3): 129-57.
- Angevine, J. B., Jr. and R. L. Sidman (1961). "Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse." *Nature* **192**: 766-8.
- Anthony, T. E., C. Klein, et al. (2004). "Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system." *Neuron* **41**(6): 881-90.
- Azim, K., R. Fiorelli, et al. (2012). "3-dimensional examination of the adult mouse subventricular zone reveals lineage-specific microdomains." *PLoS One* **7**(11): e49087.
- Bai, L., R. Mao, et al. (2015). "ERK1/2 promoted proliferation and inhibited apoptosis of human cervical cancer cells and regulated the expression of c-Fos and c-Jun proteins." *Med Oncol* **32**(3): 57.
- Bartke, A., L. Y. Sun, et al. (2013). "Somatotropic signaling: trade-offs between growth, reproductive development, and longevity." *Physiol Rev* **93**(2): 571-98.
- Baserga, R. (1985). *The biology of cell reproduction*. Cambridge, Harvard University Press.
- Baum, M. J., J. J. Brown, et al. (1994). "Effect of a null mutation of the c-fos proto-oncogene on sexual behavior of male mice." *Biol Reprod* **50**(5): 1040-8.
- Bayer, S. A. and J. Altman (1991). "Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain." *Neuroscience* **45**(2): 391-412.
- Beck, K. D., L. Powell-Braxton, et al. (1995). "Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons." *Neuron* **14**(4): 717-30.
- Bedogni, F., R. D. Hodge, et al. (2010). "Tbr1 regulates regional and laminar identity of postmitotic neurons in developing neocortex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(29): 13129-34.
- Belvindrah, R., G. Rougon, et al. (2002). "Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice." *J Neurosci* **22**(9): 3594-607.
- Belluzzi, O., M. Benedusi, et al. (2003). "Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb." *J Neurosci* **23**(32): 10411-8.
- Benjelloun-Touimi, S., C. M. Jacque, et al. (1985). "Evidence that mouse astrocytes may be derived from the radial glia. An immunohistochemical study of the cerebellum in the normal and reeler mouse." *J Neuroimmunol* **9**(1-2): 87-97.

- Birchenall-Roberts, M. C., F. W. Ruscetti, et al. (1990). "Transcriptional regulation of the transforming growth factor beta 1 promoter by v-src gene products is mediated through the AP-1 complex." *Mol Cell Biol* **10**(9): 4978-83.
- Bossis, G., P. Ferrara, et al. (2003). "c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitinylation in vivo." *Mol Cell Biol* **23**(20): 7425-36.
- Bossis, G., C. E. Malnou, et al. (2005). "Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation." *Mol Cell Biol* **25**(16): 6964-79.
- Boulder, C. (1970). "Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee." *Anat Rec* **166**(2): 257-61.
- Braun, S. M. and S. Jessberger (2014). "Adult neurogenesis and its role in neuropsychiatric disease, brain repair and normal brain function." *Neuropathol Appl Neurobiol* **40**(1): 3-12.
- Buchman, J. J., H. C. Tseng, et al. (2010). "Cdk5rap2 interacts with pericentrin to maintain the neural progenitor pool in the developing neocortex." *Neuron* **66**(3): 386-402.
- Bussolino, D. F., G. A. de Arriba Zerpa, et al. (1998). "Light affects c-fos expression and phospholipid synthesis in both retinal ganglion cells and photoreceptor cells in an opposite way for each cell type." *Brain Res Mol Brain Res* **58**(1-2): 10-5.
- Bussolino, D. F., M. E. Guido, et al. (2001). "c-Fos associates with the endoplasmic reticulum and activates phospholipid metabolism." *FASEB J* **15**(3): 556-8.
- Butler, A. A. and D. Le Roith (2001). "Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles." *Annu Rev Physiol* **63**: 141-64.
- Callaghan, D. A., L. Dong, et al. (1999). "Neural precursor cells differentiating in the absence of Rb exhibit delayed terminal mitosis and deregulated E2F 1 and 3 activity." *Dev Biol* **207**(2): 257-70.
- Campbell, K. and M. Gotz (2002). "Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development." *Trends Neurosci* **25**(5): 235-8.
- Caputto, B. L. and M. E. Guido (2000). "Immediate early gene expression within the visual system: light and circadian regulation in the retina and the suprachiasmatic nucleus." *Neurochem Res* **25**(1): 153-62.
- Cardozo Gizzi, A. M. and B. L. Caputto (2013). "Mechanistic insights into the nongenomic regulation of phospholipid synthesizing enzymes." *IUBMB Life* **65**(7): 584-92.
- Carleton, A., L. T. Petreanu, et al. (2003). "Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb." *Nat Neurosci* **6**(5): 507-18.
- Caubet, J. F. (1989). "c-fos proto-oncogene expression in the nervous system during mouse development." *Mol Cell Biol* **9**(5): 2269-72.
- Caviness, V. S., Jr. (1982). "Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography." *Brain Res* **256**(3): 293-302.
- Caviness, V. S., Jr., T. Goto, et al. (2003). "Cell output, cell cycle duration and neuronal specification: a model of integrated mechanisms of the neocortical proliferative process." *Cereb Cortex* **13**(6): 592-8.
- Colak, D., T. Mori, et al. (2008). "Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells." *J Neurosci* **28**(2): 434-46.
- Colotta, F., N. Polentarutti, et al. (1992). "Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines." *J Biol Chem* **267**(26): 18278-83.
- Conlon, I. and M. Raff (1999). "Size control in animal development." *Cell* **96**(2): 235-44.
- Crespo, P. M., D. C. Silvestre, et al. (2008). "c-Fos activates glucosylceramide synthase and glycolipid synthesis in PC12 cells." *J Biol Chem* **283**(45): 31163-71.
- Curran, T., R. Bravo, et al. (1985). "Transient induction of c-fos and c-myc in an immediate consequence of growth factor stimulation." *Cancer Surv* **4**(4): 655-81.

- Curran, T., A. D. Miller, et al. (1984). "Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis." *Cell* **36**(2): 259-68.
- Curran, T. and J. I. Morgan (1987). "Memories of fos." *Bioessays* **7**(6): 255-8.
- Curran, T. and J. I. Morgan (1995). "Fos: an immediate-early transcription factor in neurons." *J Neurobiol* **26**(3): 403-12.
- Chang, S. L., S. Y. Chen, et al. (2013). "Ectopic expression of nol3-1 in neural progenitors promotes cell cycle exit/premature neuronal differentiation accompanying with abnormal apoptosis in the developing mouse telencephalon." *PLoS One* **8**(9): e74975.
- Chen, J. F., Y. Zhang, et al. (2014). "Microcephaly disease gene Wdr62 regulates mitotic progression of embryonic neural stem cells and brain size." *Nat Commun* **5**: 3885.
- Chen, X., J. Shen, et al. (2015). "Up-regulation of c-Fos associated with neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage." *Cell Mol Neurobiol* **35**(3): 363-76.
- Chenn, A. and S. K. McConnell (1995). "Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis." *Cell* **82**(4): 631-41.
- Chiu, R., W. J. Boyle, et al. (1988). "The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes." *Cell* **54**(4): 541-52.
- de Arriba Zerpa, G. A., M. E. Guido, et al. (1999). "Light exposure activates retina ganglion cell lysophosphatidic acid acyl transferase and phosphatidic acid phosphatase by a c-fos-dependent mechanism." *J Neurochem* **73**(3): 1228-35.
- Dehmelt, L. and S. Halpain (2005). "The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins." *Genome Biol* **6**(1): 204.
- Del Bene, F., A. M. Wehman, et al. (2008). "Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient." *Cell* **134**(6): 1055-65.
- Del Boca, M., B. L. Caputto, et al. (2005). "c-Jun interacts with phospholipids and c-Fos at the interface." *J Colloid Interface Sci* **287**(1): 80-4.
- Distel, R. J., H. S. Ro, et al. (1987). "Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos." *Cell* **49**(6): 835-44.
- Distel, R. J. and B. M. Spiegelman (1990). "Protooncogene c-fos as a transcription factor." *Adv Cancer Res* **55**: 37-55.
- Doetsch, F., I. Caille, et al. (1999). "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." *Cell* **97**(6): 703-16.
- Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (1997). "Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain." *J Neurosci* **17**(13): 5046-61.
- Dulken, B. and A. Brunet (2015). "Stem Cell Aging and Sex: Are We Missing Something?" *Cell Stem Cell* **16**(6): 588-90.
- Dunand-Sauthier, I., M. L. Santiago-Raber, et al. (2011). "Silencing of c-Fos expression by microRNA-155 is critical for dendritic cell maturation and function." *Blood* **117**(17): 4490-500.
- Duncan, G. E., D. J. Knapp, et al. (1996). "Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety." *Brain Res* **713**(1-2): 79-91.
- Eferl, R. and E. F. Wagner (2003). "AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis." *Nat Rev Cancer* **3**(11): 859-68.
- Efstratiadis, A. (1998). "Genetics of mouse growth." *Int J Dev Biol* **42**(7): 955-76.
- Englund, C., A. Fink, et al. (2005). "Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex." *J Neurosci* **25**(1): 247-51.
- Eriksson, M., M. Taskinen, et al. (2007). "Mitogen activated protein kinase-dependent activation of c-Jun and c-Fos is required for neuronal differentiation but not for growth and stress response in PC12 cells." *J Cell Physiol* **210**(2): 538-48.
- Etienne, O., A. Bery, et al. (2014). "Assessing cell cycle progression of neural stem and progenitor cells in the mouse developing brain after genotoxic stress." *J Vis Exp*(87).

- Ferrero, G. O., F. N. Velazquez, et al. (2012). "The kinase c-Src and the phosphatase TC45 coordinately regulate c-Fos tyrosine phosphorylation and c-Fos phospholipid synthesis activation capacity." *Oncogene* **31**(28): 3381-91.
- Fietz, S. A. and W. B. Huttner (2011). "Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis—a polarized perspective." *Curr Opin Neurobiol* **21**(1): 23-35.
- Fish, J. L., Y. Kosodo, et al. (2006). "Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10438-43.
- Flavell, S. W. and M. E. Greenberg (2008). "Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system." *Annu Rev Neurosci* **31**: 563-90.
- Fleischmann, A., F. Hafezi, et al. (2000). "Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice." *Genes Dev* **14**(21): 2695-700.
- Francis, F., A. Koulakoff, et al. (1999). "Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons." *Neuron* **23**(2): 247-56.
- Frantz, G. D., J. M. Weimann, et al. (1994). "Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum." *J Neurosci* **14**(10): 5725-40.
- Gadisseux, J. F. and P. Evrard (1985). "Glial-neuronal relationship in the developing central nervous system. A histochemical-electron microscope study of radial glial cell particulate glycogen in normal and reeler mice and the human fetus." *Dev Neurosci* **7**(1): 12-32.
- Garner, C. C., R. P. Tucker, et al. (1988). "Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites." *Nature* **336**(6200): 674-7.
- Gauthier-Fisher, A., D. C. Lin, et al. (2009). "Lfc and Tctex-1 regulate the genesis of neurons from cortical precursor cells." *Nat Neurosci* **12**(6): 735-44.
- Gil, G. A., D. F. Bussolino, et al. (2004). "c-Fos activated phospholipid synthesis is required for neurite elongation in differentiating PC12 cells." *Mol Biol Cell* **15**(4): 1881-94.
- Gil, G. A., D. C. Silvestre, et al. (2012). "Controlling cytoplasmic c-Fos controls tumor growth in the peripheral and central nervous system." *Neurochem Res* **37**(6): 1364-71.
- Godin, J. D., K. Colombo, et al. (2010). "Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis." *Neuron* **67**(3): 392-406.
- Gomez-Nicola, D., B. Valle-Argos, et al. (2011). "Interleukin-15 regulates proliferation and self-renewal of adult neural stem cells." *Mol Biol Cell* **22**(12): 1960-70.
- Goss, R. (1978). *The physiology of growth*, Academic Press
- Gotz, M. and W. B. Huttner (2005). "The cell biology of neurogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(10): 777-88.
- Gould, E. and H. A. Cameron (1996). "Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus." *Dev Neurosci* **18**(1-2): 22-35.
- Graham, V., J. Khudyakov, et al. (2003). "SOX2 functions to maintain neural progenitor identity." *Neuron* **39**(5): 749-65.
- Greenberg, M. E., L. A. Greene, et al. (1985). "Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells." *J Biol Chem* **260**(26): 14101-10.
- Grigoriadis, A. E., K. Schellander, et al. (1993). "Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice." *J Cell Biol* **122**(3): 685-701.
- Gubits, R. M., J. L. Hazelton, et al. (1988). "Variations in c-fos gene expression during rat brain development." *Brain Res* **427**(2): 197-201.
- Guido, M. E. and B. L. Caputto (1990). "Labeling of retina and optic tectum phospholipids in chickens exposed to light or dark." *J Neurochem* **55**(6): 1855-60.
- Guido, M. E., G. A. de Arriba Zerpa, et al. (1996). "Immediate early gene c-fos regulates the synthesis of phospholipids but not of gangliosides." *J Neurosci Res* **43**(1): 93-8.
- Guillemot, F. (2007). "Cell fate specification in the mammalian telencephalon." *Prog Neurobiol* **83**(1): 37-52.

- Gundersen, H. J. and E. B. Jensen (1987). "The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction." *J Microsc* **147**(Pt 3): 229-63.
- Gurley, L. R., J. A. D'Anna, et al. (1978). "Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells." *Eur J Biochem* **84**(1): 1-15.
- Hai, T. and T. Curran (1991). "Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9): 3720-4.
- Halazonetis, T. D., K. Georgopoulos, et al. (1988). "c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities." *Cell* **55**(5): 917-24.
- Hansen, D. V., J. H. Lui, et al. (2010). "Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex." *Nature* **464**(7288): 554-561.
- Haubensak, W., A. Attardo, et al. (2004). "Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 3196-201.
- Haydar, T. F., E. Ang, Jr., et al. (2003). "Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2890-5.
- He, S., Z. Li, et al. (2015). "Inside-Out Radial Migration Facilitates Lineage-Dependent Neocortical Microcircuit Assembly." *Neuron* **86**(5): 1159-66.
- Heins, N., F. Cremisi, et al. (2001). "Emx2 promotes symmetric cell divisions and a multipotential fate in precursors from the cerebral cortex." *Mol Cell Neurosci* **18**(5): 485-502.
- Heins, N., P. Malatesta, et al. (2002). "Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6." *Nat Neurosci* **5**(4): 308-15.
- Hensch, T. K. (2005). "Critical period plasticity in local cortical circuits." *Nat Rev Neurosci* **6**(11): 877-88.
- Herculano-Houzel, S. and R. Lent (2005). "Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain." *J Neurosci* **25**(10): 2518-21.
- Hochstim, C., B. Deneen, et al. (2008). "Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code." *Cell* **133**(3): 510-22.
- Hoeffler, J. P., J. W. Lustbader, et al. (1991). "Identification of multiple nuclear factors that interact with cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activating transcription factor-2 by protein-protein interactions." *Mol Endocrinol* **5**(2): 256-66.
- Holt, J. (1992). "Fos and Jun: inducible transcription factors regulating growth of normal and transformed cells." *Cancer Treat Res* **63**: 301-11.
- Hu, E., E. Mueller, et al. (1994). "Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes." *EMBO J* **13**(13): 3094-103.
- Hutton, S. R. and L. H. Pevny (2011). "SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon." *Dev Biol* **352**(1): 40-7.
- Imayoshi, I., M. Sakamoto, et al. (2008). "Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain." *Nat Neurosci* **11**(10): 1153-61.
- Imler, J. L. and B. Wasylyk (1989). "AP1, a composite transcription factor implicated in abnormal growth control." *Prog Growth Factor Res* **1**(2): 69-77.
- Izant, J. G. and J. R. McIntosh (1980). "Microtubule-associated proteins: a monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(8): 4741-5.
- Jeffy, B. D., J. K. Hockings, et al. (2005). "An estrogen receptor-alpha/p300 complex activates the BRCA-1 promoter at an AP-1 site that binds Jun/Fos transcription factors: repressive effects of p53 on BRCA-1 transcription." *Neoplasia* **7**(9): 873-82.
- Jochum, W., E. Passegue, et al. (2001). "AP-1 in mouse development and tumorigenesis." *Oncogene* **20**(19): 2401-12.

- Johnson, R. S., B. M. Spiegelman, et al. (1992). "Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene." *Cell* **71**(4): 577-86.
- Kalyani, A. J., D. Piper, et al. (1998). "Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture." *J Neurosci* **18**(19): 7856-68.
- Katche, C., G. Dorman, et al. (2013). "On the role of retrosplenial cortex in long-lasting memory storage." *Hippocampus* **23**(4): 295-302.
- Knoblich, J. A. (2008). "Mechanisms of asymmetric stem cell division." *Cell* **132**(4): 583-97.
- Kohler, J. J. and A. Schepartz (2001). "Kinetic studies of Fos-Jun DNA complex formation: DNA binding prior to dimerization." *Biochemistry* **40**(1): 130-42.
- Kosodo, Y., K. Roper, et al. (2004). "Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells." *EMBO J* **23**(11): 2314-24.
- Kriegstein, A. R. (2005). "Constructing circuits: neurogenesis and migration in the developing neocortex." *Epilepsia* **46 Suppl 7**: 15-21.
- Kruijjer, W., J. A. Cooper, et al. (1984). "Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein." *Nature* **312**(5996): 711-6.
- Kustikova, O., D. Kramerov, et al. (1998). "Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells." *Mol Cell Biol* **18**(12): 7095-105.
- Lawlor, M. A., A. Mora, et al. (2002). "Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice." *EMBO J* **21**(14): 3728-38.
- Laywell, E. D., P. Rakic, et al. (2000). "Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13883-8.
- Lazarov, O., M. P. Mattson, et al. (2010). "When neurogenesis encounters aging and disease." *Trends Neurosci* **33**(12): 569-79.
- Lee, M. K., J. B. Tuttle, et al. (1990). "The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis." *Cell Motil Cytoskeleton* **17**(2): 118-32.
- Lee, W., P. Mitchell, et al. (1987). "Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements." *Cell* **49**(6): 741-52.
- Lee, W. M., C. Lin, et al. (1988). "Activation of the transforming potential of the human fos proto-oncogene requires message stabilization and results in increased amounts of partially modified fos protein." *Mol Cell Biol* **8**(12): 5521-7.
- Leingartner, A., S. Thuret, et al. (2007). "Cortical area size dictates performance at modality-specific behaviors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 4153-8.
- Lim, S. and P. Kaldis (2012). "Loss of Cdk2 and Cdk4 induces a switch from proliferation to differentiation in neural stem cells." *Stem Cells* **30**(7): 1509-20.
- Liu, J. L., S. Yakar, et al. (2000). "Conditional knockout of mouse insulin-like growth factor-1 gene using the Cre/loxP system." *Proc Soc Exp Biol Med* **223**(4): 344-51.
- Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1994). "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain." *Science* **264**(5162): 1145-8.
- Long, J. E., C. Swan, et al. (2009). "Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control striatal patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways." *J Comp Neurol* **512**(4): 556-72.
- Louis, S. A., R. L. Rietze, et al. (2008). "Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay." *Stem Cells* **26**(4): 988-96.
- Luskin, M. B. (1993). "Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone." *Neuron* **11**(1): 173-89.
- Malatesta, P., M. A. Hack, et al. (2003). "Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate." *Neuron* **37**(5): 751-64.

- Marconcini, L., S. Marchio, et al. (1999). "c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9671-6.
- Marin-Padilla, M. (1978). "Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate." *Anat Embryol (Berl)* **152**(2): 109-26.
- Marin-Padilla, M. (1992). "Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory." *J Comp Neurol* **321**(2): 223-40.
- Marin, O. and J. L. Rubenstein (2001). "A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon." *Nat Rev Neurosci* **2**(11): 780-90.
- Markram, H., M. Toledo-Rodriguez, et al. (2004). "Interneurons of the neocortical inhibitory system." *Nat Rev Neurosci* **5**(10): 793-807.
- Martinez-Cerdeno, V., S. C. Noctor, et al. (2006). "The role of intermediate progenitor cells in the evolutionary expansion of the cerebral cortex." *Cereb Cortex* **16** Suppl 1: i152-61.
- Martino, G. and S. Pluchino (2006). "The therapeutic potential of neural stem cells." *Nat Rev Neurosci* **7**(5): 395-406.
- Matsuo, K., J. M. Owens, et al. (2000). "Fosl1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation." *Nat Genet* **24**(2): 184-7.
- Miao, G. G. and T. Curran (1994). "Cell transformation by c-fos requires an extended period of expression and is independent of the cell cycle." *Mol Cell Biol* **14**(6): 4295-310.
- Milde-Langosch, K. (2005). "The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis." *Eur J Cancer* **41**(16): 2449-61.
- Miller, A. D., T. Curran, et al. (1984). "c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene." *Cell* **36**(1): 51-60.
- Miller, R. H. (2006). "The promise of stem cells for neural repair." *Brain Res* **1091**(1): 258-64.
- Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." *Annu Rev Neurosci* **28**: 223-50.
- Ming, G. L. and H. Song (2011). "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions." *Neuron* **70**(4): 687-702.
- Mirzadeh, Z., F. T. Merkle, et al. (2008). "Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain." *Cell Stem Cell* **3**(3): 265-78.
- Miyata, T. (2008). "Development of three-dimensional architecture of the neuroepithelium: role of pseudostratification and cellular 'community'." *Dev Growth Differ* **50** Suppl 1: S105-12.
- Monje, P., J. Hernandez-Losa, et al. (2005). "Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1." *J Biol Chem* **280**(42): 35081-4.
- Montminy, M. R., K. A. Sevarino, et al. (1986). "Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(18): 6682-6.
- Morgan, J. I. and T. Curran (1988). "Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons." *Cell Calcium* **9**(5-6): 303-11.
- Morgan, J. I. and T. Curran (1991). "Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun." *Annu Rev Neurosci* **14**: 421-51.
- Mori, T., A. Buffo, et al. (2005). "The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis." *Curr Top Dev Biol* **69**: 67-99.
- Morshead, C. M., P. Benveniste, et al. (2002). "Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations." *Nat Med* **8**(3): 268-73.
- Morshead, C. M., A. D. Garcia, et al. (2003). "The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells." *Eur J Neurosci* **18**(1): 76-84.

- Motrich, R. D., G. M. Castro, et al. (2013). "Old players with a newly defined function: Fra-1 and c-Fos support growth of human malignant breast tumors by activating membrane biogenesis at the cytoplasm." *PLoS One* **8**(1): e53211.
- Muegge, K., T. M. Williams, et al. (1989). "Interleukin-1 costimulatory activity on the interleukin-2 promoter via AP-1." *Science* **246**(4927): 249-51.
- Mullen, R. J., C. R. Buck, et al. (1992). "NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates." *Development* **116**(1): 201-11.
- Muller, R., R. Bravo, et al. (1984). "Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc." *Nature* **312**(5996): 716-20.
- Muller, R., T. Curran, et al. (1985). "Induction of c-fos during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation." *Nature* **314**(6011): 546-8.
- Muller, R., D. J. Slamon, et al. (1982). "Differential expression of cellular oncogenes during pre- and postnatal development of the mouse." *Nature* **299**(5884): 640-4.
- Muller, R. and E. F. Wagner (1984). "Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c-fos proto-oncogenes." *Nature* **311**(5985): 438-42.
- Murphy, L. O., S. Smith, et al. (2002). "Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products." *Nat Cell Biol* **4**(8): 556-64.
- Nakabeppu, Y. and D. Nathans (1989). "The basic region of Fos mediates specific DNA binding." *EMBO J* **8**(12): 3833-41.
- Nakabeppu, Y. and D. Nathans (1991). "A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity." *Cell* **64**(4): 751-9.
- Nakabeppu, Y., K. Ryder, et al. (1988). "DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos." *Cell* **55**(5): 907-15.
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." *Trends Biochem Sci* **22**(8): 299-306.
- Nieoullon, V., R. Belvindrah, et al. (2005). "mCD24 regulates proliferation of neuronal committed precursors in the subventricular zone." *Mol Cell Neurosci* **28**(3): 462-74.
- Nijhout, H. F., L. M. Riddiford, et al. (2014). "The developmental control of size in insects." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **3**(1): 113-34.
- Nishizuka, Y. (1984). "The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion." *Nature* **308**(5961): 693-8.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, et al. (2002). "Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia." *J Neurosci* **22**(8): 3161-73.
- Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno, et al. (2007). "Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis." *Arch Neurol* **64**(5): 639-42.
- Nowakowski, R. S., S. B. Lewin, et al. (1989). "Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population." *J Neurocytol* **18**(3): 311-8.
- O'Shea, E. K., R. Rutkowski, et al. (1992). "Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer." *Cell* **68**(4): 699-708.
- O'Shea, E. K., R. Rutkowski, et al. (1989). "Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun." *Science* **245**(4918): 646-8.
- Okano, H. (2012). "Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**(4): 438-50.
- Pan, Y. W., J. Zou, et al. (2012). "Inducible and conditional deletion of extracellular signal-regulated kinase 5 disrupts adult hippocampal neurogenesis." *J Biol Chem* **287**(28): 23306-17.
- Panterne, B., J. Hatzfeld, et al. (1992). "c-fos mRNA constitutive expression by mature human megakaryocytes." *Oncogene* **7**(11): 2341-4.
- Paridaen, J. T. and W. B. Huttner (2014). "Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system." *EMBO Rep* **15**(4): 351-64.

- Paylor, R., R. S. Johnson, et al. (1994). "Behavioral assessment of c-fos mutant mice." Brain Res **651**(1-2): 275-82.
- Peng, C., W. Zeng, et al. (2015). "Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) is a key mediator for EGF-induced cell transformation mediated through the ELK4/c-Fos signaling pathway." Oncogene.
- Peyre, E. and X. Morin (2012). "An oblique view on the role of spindle orientation in vertebrate neurogenesis." Dev Growth Differ **54**(3): 287-305.
- Pilaz, L. J., D. Patti, et al. (2009). "Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(51): 21924-9.
- Plu, F., A. Aronheim, et al. (2001). "AP-1 repressor protein JDP-2: inhibition of UV-mediated apoptosis through p53 down-regulation." Mol Cell Biol **21**(9): 3012-24.
- Pluchino, S., L. Zanotti, et al. (2005). "Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders." Brain Res Brain Res Rev **48**(2): 211-9.
- Price, M. A., C. Hill, et al. (1996). "Integration of growth factor signals at the c-fos serum response element." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **351**(1339): 551-9.
- Prywes, R. and R. G. Roeder (1987). "Purification of the c-fos enhancer-binding protein." Mol Cell Biol **7**(10): 3482-9.
- Pucilowska, J., J. Vithayathil, et al. (2015). "The 16p11.2 deletion mouse model of autism exhibits altered cortical progenitor proliferation and brain cytoarchitecture linked to the ERK MAPK pathway." J Neurosci **35**(7): 3190-200.
- Qian, X., Q. Shen, et al. (2000). "Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells." Neuron **28**(1): 69-80.
- Rakic, P. (1974). "Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition." Science **183**(4123): 425-7.
- Rakic, P. (2003). "Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia." Cereb Cortex **13**(6): 541-9.
- Rash, B. G. and E. A. Grove (2006). "Area and layer patterning in the developing cerebral cortex." Curr Opin Neurobiol **16**(1): 25-34.
- Rauscher, F. J., 3rd, P. J. Voulalas, et al. (1988). "Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro." Genes Dev **2**(12B): 1687-99.
- Reichmann, E., H. Schwarz, et al. (1992). "Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion." Cell **71**(7): 1103-16.
- Reimold, A. M., M. J. Grusby, et al. (1996). "Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice." Nature **379**(6562): 262-5.
- Reiner, O., T. Sapir, et al. (2012). "Interkinetic nuclear movement in the ventricular zone of the cortex." J Mol Neurosci **46**(3): 516-26.
- Riabowol, K. T., M. Z. Gilman, et al. (1988). "Microinjection of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase induces expression of the c-fos gene." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **53 Pt 1**: 85-90.
- Riabowol, K. T., R. J. Vosatka, et al. (1988). "Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells." Mol Cell Biol **8**(4): 1670-6.
- Rochefort, C., G. Gheusi, et al. (2002). "Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory." J Neurosci **22**(7): 2679-89.
- Ryseck, R. P. and R. Bravo (1991). "c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins." Oncogene **6**(4): 533-42.
- Saez, E., S. E. Rutberg, et al. (1995). "c-fos is required for malignant progression of skin tumors." Cell **82**(5): 721-32.



- Salvat, C., I. Jariel-Encontre, et al. (1998). "Differential directing of c-Fos and c-Jun proteins to the proteasome in serum-stimulated mouse embryo fibroblasts." *Oncogene* **17**(3): 327-37.
- Sassone-Corsi, P., C. J. Der, et al. (1989). "ras-induced neuronal differentiation of PC12 cells: possible involvement of fos and jun." *Mol Cell Biol* **9**(8): 3174-83.
- Sassone-Corsi, P., W. W. Lamph, et al. (1988). "fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1." *Cell* **54**(4): 553-60.
- Schreiber, E., P. Matthias, et al. (1989). "Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells." *Nucleic Acids Res* **17**(15): 6419.
- Schuermann, M., M. Neuberger, et al. (1989). "The leucine repeat motif in Fos protein mediates complex formation with Jun/AP-1 and is required for transformation." *Cell* **56**(3): 507-16.
- Seldeen, K. L., B. J. Deegan, et al. (2011). "Energetic coupling along an allosteric communication channel drives the binding of Jun-Fos heterodimeric transcription factor to DNA." *FEBS J* **278**(12): 2090-104.
- Seldeen, K. L., C. B. McDonald, et al. (2009). "Single nucleotide variants of the TGACTCA motif modulate energetics and orientation of binding of the Jun-Fos heterodimeric transcription factor." *Biochemistry* **48**(9): 1975-83.
- Shen, Q., Y. Wang, et al. (2006). "The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells." *Nat Neurosci* **9**(6): 743-51.
- Shen, Q., Y. Wang, et al. (2008). "Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions." *Cell Stem Cell* **3**(3): 289-300.
- Sherr, C. J. (1994). "G1 phase progression: cycling on cue." *Cell* **79**(4): 551-5.
- Shiromani, P. J., R. Basheer, et al. (2000). "Sleep and wakefulness in c-fos and fos B gene knockout mice." *Brain Res Mol Brain Res* **80**(1): 75-87.
- Shitamukai, A., D. Konno, et al. (2011). "Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors." *J Neurosci* **31**(10): 3683-95.
- Shitamukai, A. and F. Matsuzaki (2012). "Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors." *Dev Growth Differ* **54**(3): 277-86.
- Silvestre, D. C., G. A. Gil, et al. (2010). "Growth of peripheral and central nervous system tumors is supported by cytoplasmic c-Fos in humans and mice." *PLoS One* **5**(3): e9544.
- Silvestre, D. C., H. J. Maccioni, et al. (2009). "Content of endoplasmic reticulum and Golgi complex membranes positively correlates with the proliferative status of brain cells." *J Neurosci Res* **87**(4): 857-65.
- Siller, K. H. and C. Q. Doe (2009). "Spindle orientation during asymmetric cell division." *Nat Cell Biol* **11**(4): 365-74.
- Smeyne, R. J., T. Curran, et al. (1992). "Temporal and spatial expression of a fos-lacZ transgene in the developing nervous system." *Brain Res Mol Brain Res* **16**(1-2): 158-62.
- Sporns, O. (2013). "Structure and function of complex brain networks." *Dialogues Clin Neurosci* **15**(3): 247-62.
- Spreafico, R., C. Frassoni, et al. (1995). "In situ labeling of apoptotic cell death in the cerebral cortex and thalamus of rats during development." *J Comp Neurol* **363**(2): 281-95.
- Suda, N., T. Itoh, et al. (2014). "Dimeric combinations of MafB, cFos and cJun control the apoptosis-survival balance in limb morphogenesis." *Development* **141**(14): 2885-94.
- Suh, H., W. Deng, et al. (2009). "Signaling in adult neurogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 253-75.
- Sun, Y., J. Hu, et al. (2011). "Interplay between FGF2 and BMP controls the self-renewal, dormancy and differentiation of rat neural stem cells." *J Cell Sci* **124**(Pt 11): 1867-77.
- Takahashi, T., R. S. Nowakowski, et al. (1995). "The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall." *J Neurosci* **15**(9): 6046-57.

- Tanos, T., M. J. Marinissen, et al. (2005). "Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light." *J Biol Chem* **280**(19): 18842-52.
- Temple, S. (2001). "The development of neural stem cells." *Nature* **414**(6859): 112-7.
- Thomas, D. P., A. Sunters, et al. (2000). "Inhibition of chondrocyte differentiation in vitro by constitutive and inducible overexpression of the c-fos proto-oncogene." *J Cell Sci* **113** (Pt 3): 439-50.
- Ting, C. H., H. N. Huang, et al. (2014). "The mechanisms by which pardaxin, a natural cationic antimicrobial peptide, targets the endoplasmic reticulum and induces c-FOS." *Biomaterials* **35**(11): 3627-40.
- Tomassy, G. S., S. Lodato, et al. (2010). "Development and regeneration of projection neuron subtypes of the cerebral cortex." *Sci Prog* **93**(Pt 2): 151-69.
- Treisman, R. (1985). "Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences." *Cell* **42**(3): 889-902.
- Urban, N. and F. Guillemot (2014). "Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles." *Front Cell Neurosci* **8**: 396.
- Utsugi, C., S. Miyazono, et al. (2014). "Hard-diet feeding recovers neurogenesis in the subventricular zone and olfactory functions of mice impaired by soft-diet feeding." *PLoS One* **9**(5): e97309.
- van Dam, H. and M. Castellazzi (2001). "Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis." *Oncogene* **20**(19): 2453-64.
- Verde, P., L. Casalino, et al. (2007). "Deciphering AP-1 function in tumorigenesis: fraternizing on target promoters." *Cell Cycle* **6**(21): 2633-9.
- Verney, C., T. Takahashi, et al. (2000). "Independent controls for neocortical neuron production and histogenetic cell death." *Dev Neurosci* **22**(1-2): 125-38.
- Wang, X., J. W. Tsai, et al. (2011). "A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex." *Nat Neurosci* **14**(5): 555-61.
- Wang, Y., M. Falasca, et al. (1998). "Activation of the c-fos serum response element by phosphatidylinositol 3-kinase and rho pathways in HeLa cells." *Cell Growth Differ* **9**(7): 513-22.
- Wang, Z. Q., C. Ovitt, et al. (1992). "Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos." *Nature* **360**(6406): 741-5.
- Watanabe, Y., R. S. Johnson, et al. (1996). "Null mutation of c-fos impairs structural and functional plasticities in the kindling model of epilepsy." *J Neurosci* **16**(12): 3827-36.
- Wilcock, A. C., J. R. Swedlow, et al. (2007). "Mitotic spindle orientation distinguishes stem cell and terminal modes of neuron production in the early spinal cord." *Development* **134**(10): 1943-54.
- William, F., F. Wagner, et al. (1990). "Multiple doses of diacylglycerol and calcium ionophore are necessary to activate AP-1 enhancer activity and induce markers of macrophage differentiation." *J Biol Chem* **265**(30): 18166-71.
- Wisdom, R. and I. M. Verma (1993). "Proto-oncogene FosB: the amino terminus encodes a regulatory function required for transformation." *Mol Cell Biol* **13**(5): 2635-43.
- Wright, K. N., F. Hollis, et al. (2015). "Methyl Supplementation Attenuates Cocaine-Seeking Behaviors and Cocaine-Induced c-Fos Activation in a DNA Methylation-Dependent Manner." *J Neurosci* **35**(23): 8948-58.
- Wu, F. Y., N. T. Chang, et al. (1993). "Vitamin K3-induced cell cycle arrest and apoptotic cell death are accompanied by altered expression of c-fos and c-myc in nasopharyngeal carcinoma cells." *Oncogene* **8**(8): 2237-44.
- Wu, S. X., S. Goebbels, et al. (2005). "Pyramidal neurons of upper cortical layers generated by NEX-positive progenitor cells in the subventricular zone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(47): 17172-7.
- Yang, M., S. L. Yang, et al. (2015). "Lin28 promotes the proliferative capacity of neural progenitor cells in brain development." *Development* **142**(9): 1616-27.

- Yang, Z. J., T. Ellis, et al. (2008). "Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells." Cancer Cell **14**(2): 135-45.
- Ye, P., G. J. Popken, et al. (2004). "Astrocyte-specific overexpression of insulin-like growth factor-I promotes brain overgrowth and glial fibrillary acidic protein expression." J Neurosci Res **78**(4): 472-84.
- Yoon, J., J. H. Kim, et al. (2013). "AP-1(c-Jun/FosB) mediates xFoxD5b expression in *Xenopus* early developmental neurogenesis." Int J Dev Biol **57**(11-12): 865-72.
- Young, N. A., D. K. Flaherty, et al. (2012). "Use of flow cytometry for high-throughput cell population estimates in brain tissue." Front Neuroanat **6**: 27.
- Zhang, X., L. Zhang, et al. (2007). "c-Fos as a proapoptotic agent in TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells." Cancer Res **67**(19): 9425-34.

**R-T**

**572.8845**

**V**

**13850**



**\*13850\***