



UNIVERSIDAD DE MURCIA

**ESCUELA INTERNACIONAL DE
DOCTORADO**

**Estudio de la migración tangencial
intrahipotalámica del núcleo ventral premamilar y
posibles mecanismos causales**

Andrea Lara López González

2021



UNIVERSIDAD DE MURCIA

**DPTO. ANATOMÍA HUMANA Y
PSICOBIOLOGÍA**

**Estudio de la migración tangencial
intrahipotalámica del núcleo ventral premamilar y
posibles mecanismos causales**

Andrea Lara López González

2021

Director: Luis Puelles López

Parte de los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral han sido publicados en el siguiente artículo:

López-González, L., Alonso, A., García-Calero, E., de Puellas, E., Puellas, L. (2021). Tangential intrahypothalamic migration of the mouse ventral premamillary nucleus and Fgf8 signaling. *Front. Cell Dev. Biol.* doi: 10.3389/fcell.2021.676121

A mis padres

A Miguel

Agradecimientos

La escritura de esta página es un símbolo de la cercanía a la meta, y de un cambio de etapa. Para cualquier doctorando, llegar aquí es un pensamiento recurrente, que normalmente sucede después de una transformación profunda en la que hay intercambios con tu entorno y con las personas que lo forman. En el fondo, en eso consiste la realización de una tesis doctoral: tú le das a ese proyecto una parte muy importante de ti, que se enriquece con cada elemento, cada punto de vista y cada situación disponibles a tu alcance. Me siento inmensamente agradecida por todo lo que he podido vivir y aprender en este período.

Me siento afortunada de haber tenido un director de tesis como Luis, referente por su sabiduría, por transmitirme su visión de una ciencia honesta y rigurosa, por darme libertad en el laboratorio, y mostrarme los caminos que necesitaba recorrer para adquirir los aprendizajes pertinentes.

A Margaret, Pilar, Faustino y Antonia, por su amabilidad, por sus consejos y palabras de ayuda, siempre útiles. Especialmente a Antonia, por guiarme por los laboratorios cuando más perdida estaba, siempre con buena cara.

A Mari Carmen Morga, Mónica y Loli, les agradezco su implicación en el laboratorio, su interés en ayudar a resolver los problemas que comúnmente van de la mano con los experimentos. Gracias por estar siempre disponibles.

A Marta, Isa, Ángel, y todos los compañeros con los que he compartido los momentos más divertidos: comidas, cafés, San Viernes, charlas en los despachos, etc. Gracias por ponerle la nota de color a nuestro largo pasillo gris.

A Alice Davy y todos mis compañeros en Francia, por su calurosa acogida y su generosidad. Indirectamente, gracias a esta estancia conocí la ciudad de Toulouse, en la que me sorprendía cada tarde descubriendo y confirmando que el Canal du Midi era uno de los parajes más bonitos donde había entrenado.

A Elena, mi gran apoyo durante estos años. Muchas gracias por tu ayuda constante y desinteresada. Admiro tu integridad, tu honestidad, tu ética profesional y personal, que de alguna manera me gustaría ver reflejadas en mí. Hemos compartido muchas experiencias que se quedarán grabadas en mi memoria. Sin duda, lo más valioso que me llevo de Murcia es tu amistad.

A mis padres, que son las personas más generosas que conozco. No sólo conmigo por ser su hija, si no con todos los que se han cruzado en su camino. A mí siempre me han dado lo que tenían y lo que no. Necesitaría escribir otra tesis para enumerar todas las cosas que mi padre ha hecho y hace por mí. Mi madre es la que me ha inculcado lo importante que era/es estudiar a través del ejemplo, y también el amor a la naturaleza. Gracias por poner a mi alcance todas las facilidades y recursos que a ti no se te permitieron. Esta tesis es tuya en origen.

A Miguel, mi persona de confianza con quien lo comparto todo, también en la distancia. Desde que te conozco admiro tu forma de pensar y tu capacidad resolutive, que logra compensar algunos de mis momentos de indecisión. Gracias por mostrarme que existe un entendimiento y comprensión profundos que, tras años de experiencias vividas, no necesitan palabras.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
RESUMEN	16
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN	21
1. Modelos alternativos columnar y prosomérico. Posición morfológica del hipotálamo en el tubo neural	22
2. Dimensión axial y dorsoventral del hipotálamo. Centros organizadores	25
3. Hipotálamo basal de mamíferos en el modelo prosomérico. Divisiones transversales y longitudinales. Principales dominios histogenéticos, áreas progenitoras, o microzonas.	30
4. Estructura nuclear del hipotálamo basal en relación con los dominios histogenéticos	32
5. Migración neuronal durante el desarrollo	36
6. El núcleo ventral premamilar. Posición en el adulto. Receptores. Conectividad. Función. Primeras nociones sobre su migración	40
OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. Animales de experimentación	46
2. Técnicas moleculares para la preparación de ribosondas	47
2.1. Clonaje	47
2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48
2.3. Ligación	51
2.4. Transformación	51
2.5. Linealización	55
2.6. Síntesis de la ribosonda	55
2.7. Obtención de sondas previamente almacenadas	56
3. Hibridación <i>in situ</i>	58
4. Técnicas de inmunodetección	60
4.1. Inmunohistoquímica	60
4.2. Inmunofluorescencia	61
5. Cultivos organotípicos y su marcaje	62
5.1. Mantenimiento de cultivos organotípicos <i>in vitro</i>	62
5.2. Mapa de marcaje en cultivos organotípicos	64
RESULTADOS	66

1. Búsqueda preliminar de marcadores del núcleo VPM.....	67
2. Análisis descriptivo del área RM y del núcleo VPM	69
2.1. Marcadores retromamilares y su expresión diferencial en los núcleos VPM y/o STh	69
3. Demostración experimental de la migración del núcleo VPM y composición celular de la corriente migratoria (VPMms).....	84
3.1. Origen de la migración	85
3.2. Tipos celulares en la corriente migratoria	90
3.3. Perfil temporal de la corriente migratoria	94
4.1. Análisis de la vía de señalización Ntn1/DCC	96
4.2. Análisis del ligando ephrin-B2 en la población VPM	101
4.3. Influencia de Fgf8 en las poblaciones del área RM y núcleo VPM.....	107
ANEXO RESULTADOS	114
DISCUSIÓN	122
1. Acotación temporal de la migración del núcleo VPM	124
2. Diversidad de poblaciones retromamilares	125
3. La migración del núcleo VPM en el modelo prosomérico.....	129
4. Posible mecanismo complejo en la regulación de la migración del VPM	133
5. Fgf8 en el desarrollo del núcleo VPM.....	134
CONCLUSIONES.....	137
CONCLUSIONS	140
BIBLIOGRAFÍA	142

ABREVIATURAS

A/B	límite alar/basal
ABasM	núcleo anterobasal medial
ANR	<i>anterior neural ridge</i> /anillo neural anterior
Arc	núcleo arcuato
BST	<i>bed nucleus of the stria terminalis</i>
Cb	cerebelo
cDNA	DNA codificante
DM	núcleo dorsomedial
DMc	<i>core</i> del núcleo dorsomedial
DPM	núcleo dorsal premamilar
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
HDB	límite hipotálamo-diencefálico
hp1	prosómero hipotálamo-telencefálico 1
hp2	prosómero hipotálamo-telencefálico 2
IF	inmunofluorescencia
IHQ	immunohistoquímica
Is	istmo
ISH	hibridación <i>in situ</i>
M	área mamilar
m	mesencéfalo
ME	eminencia media
ML	núcleo mamilar lateral

MM	núcleo mamilar medial
NHy	neurohipófisis
OCh	quiasma óptico
P-DM	núcleo dorsomedial peduncular
PBas	núcleo posterobasal
PHy	hipotálamo peduncular
PM	área perimamilar
PPa	área paraventricular peduncular
PSPa	área subparaventricular peduncular
PRM	área perirretromamilar
PSTh	núcleo parasubtalámico
Pt	pretecho
PTh	pretálamo
r1	rombómero 1
r2	rombómero 2
RM	área retromamilar
RML	núcleo retromamilar lateral
RMM	núcleo retromamilar medial
RTuD	área retrotuberal dorsal
RTuI	área retrotuberal intermedia
RTuV	área retrotuberal ventral
SHH	<i>sonic hedgehog</i> (morfógeno)
SNC	sistema nervioso central
STh	núcleo subtalámico
T-DM	núcleo dorsomedial terminal
Tel	telencéfalo
Th	tálamo

THy	hipotálamo terminal
TPa	área paraventricular terminal
TSPa	área subparaventricular terminal
TuD	área tuberal dorsal
TuI	área tuberal intermedia
TuV	área tuberal ventral
VM	núcleo ventromedial
VPM	núcleo ventral premamilar
VPMc	<i>core</i> del núcleo VPM
VPMLat	parte lateral del núcleo VPM
VPMms	<i>ventral premamilar migratory stream</i>
ZLi	<i>zona limitans</i> intratalámica

RESUMEN

El núcleo ventral premamilar hipotalámico (VPM) es una estructura descrita en mamíferos, que integra las señales olfativas y energéticas con el comportamiento reproductivo, y está involucrado en el desarrollo de la pubertad, así como en comportamientos de lucha o huida. Aunque hay información disponible acerca de su función y conectividad, no se conoce cómo se forma durante el desarrollo embrionario. El presente estudio aporta evidencia descriptiva y experimental sobre el proceso migratorio de sus componentes celulares durante los días E12.5 y E13.5 en ratón. Estas células se originan en la mitad dorsal del área retromamilar (RM), y desde este territorio comienzan su migración tangencial, esquivando los cuerpos mamilares y cruzando un territorio molecularmente distinto, la banda perimamilar (PM), hasta alcanzar una posición tuberal relativamente rostroventral.

Corroborando estudios transcriptómicos recientes en los que se identifican diversos tipos neuronales glutamatérgicos en el VPM, en el presente estudio se detectó que parte de esta heterogeneidad emerge de manera temprana en el desarrollo. Durante la migración tangencial, se detectaron 2-3 poblaciones, con diferencias en la expresión de determinados genes, posiblemente derivadas de zonas ligeramente distintas en el área RM. Estas poblaciones se distribuyen de manera segregada entre el *core* y el *shell* del VPM

Se analizaron proteínas de señalización cuya expresión sugiriese un papel en el desarrollo del VPM. Aunque se detectó expresión de la pareja Netrina1/DCC, así como del ligando ephrin-B2 en la migración del VPM y/o en zonas adyacentes, no se observaron alteraciones en el núcleo en ratones deficientes en estas proteínas. Además, el área acroterminal es fuente del morfógeno Fgf8 y existe expresión de su receptor Fgfr2 en el hipotálamo basal. Se evaluó la posible influencia de Fgf8 en el desarrollo del VPM, mediante el análisis de ratones hipomorfos (Fgf8^{neo/null}). Estos resultados revelaron un rol trófico de Fgf8 en el área RM y las células que migran tangencialmente a partir de este territorio (VPM

y el núcleo subtalámico). Los hipomorfos presentan una celularidad reducida y cierta desorganización en las estructuras derivadas del área RM a partir de E15.5, sin una alteración específica de estas migraciones.

SUMMARY

The tuberal hypothalamic ventral premamillary nucleus (VPM) described in mammals links olfactory and metabolic cues with mating behavior, and it is involved in the onset of puberty. We offer here descriptive and experimental evidence on a migratory phase in the development of this structure in mice at E12.5-E13.5. Its cells originate at the retromamillary area (RM) and then migrate tangentially rostralward, eschewing the mamillary body, and crossing the molecularly distinct perimamillary band, until they reach a definitive relatively superficial rostroventral tuberal location.

Corroborating recent transcriptomic studies reporting a variety of adult glutamatergic cell types in the VPM, and different projections in the adult, we found that part of this populational heterogeneity emerges already early in development, during tangential migration, in the form of differential gene expression properties of at least 2-3 mixed populations possibly derived from subtly different parts of the RM. These partly distribute differentially in the core and shell parts of the final VPM.

We analyzed signaling proteins whose expression suggested a role in VPM development. Although Netrin1/DCC pair, as well as Ephrin-B2 expression was detected in the VPM migration and/or in adjacent areas, no alteration was observed in mice deficient in these proteins.

Since there is a neighboring acroterminal source of Fgf8, and Fgfr2 is expressed at the early RM, we evaluated a possible influence of Fgf8 signal on VPM development using hypomorphic Fgf8^{neo/null} embryos. These results suggested a trophic role of Fgf8 on RM and all cells migrating tangentially out of this area (VPM and the subthalamic nucleus), leading in hypomorphs to reduced cellularity after E15.5 without alteration of the migrations proper.

INTRODUCCIÓN

1. Modelos alternativos columnar y prosomérico. Posición morfológica del hipotálamo en el tubo neural

El hipotálamo es un territorio anatómico y funcionalmente complejo, altamente conservado entre las especies, que actúa como elemento regulador de la homeostasis. Esta parte del cerebro ha sido objeto de numerosos estudios funcionales, pero todavía sigue siendo controvertido su desarrollo, su posición topológica en la placa y en el tubo neural, y la división de su territorio en las distintas áreas progenitoras.

Existen dos modelos principales de organización del cerebro: el modelo columnar (Swanson, 2003, 2012) y el modelo prosomérico actualizado (Puelles y Rubenstein, 2003; Puelles y col., 2012), que discrepan en el posicionamiento de los ejes anatómicos en el encéfalo, y principalmente en el cerebro anterior, ocasionando una interpretación diametralmente opuesta de la posición del hipotálamo.

El modelo columnar (Fig.1A) tiene su origen en los estudios funcionales de Herrick (1910). Este autor superpuso el eje longitudinal del cerebro en el surco limitante de His, a nivel del rombencéfalo y mesencéfalo, continuando paralelo al surco diencefálico, y terminando en el telencéfalo, el territorio más rostral según este modelo. Por lo tanto, no se tienen en cuenta los movimientos de flexión del tubo neural que acontecen durante el desarrollo. Las llamadas columnas son implícitamente entidades "longitudinales", a las que los seguidores de este modelo atribuyen funciones específicas. El hipotálamo sería, en su totalidad, la columna más "ventral" del diencefalo.

El modelo prosomérico (Fig.1B) está basado en patrones de expresión génica y análisis de mapas de destino. En este caso, el eje longitudinal en el

prosencefalo es definido por la interacción causal entre la notocorda y la placa del suelo del tubo neural en estadios tempranos (placa neural, tubo neural). Más tarde en el desarrollo, el eje resultante es paralelo a la flexura cefálica, terminando en el hipotálamo, cuya región media acroterminal (desde la comisura anterior hasta el cuerpo mamilar) es la zona topológicamente más rostral. Este eje queda representado asimismo por el límite alar-basal, que separa las placas alar y basal. Además, existen otros dos dominios longitudinales (paralelos al límite alar-basal) a lo largo del tubo neural: la placa del techo (dorsal), y la placa del suelo (ventral). Los neurómeros (prosómeros, en el cerebro anterior) son los dominios unitarios transversales al eje longitudinal en los que se divide el tubo neural. Cada uno de ellos contiene sus propios sectores de placa del techo, placa alar, placa basal y placa del suelo. Cada uno de estos prosómeros está posicionado en un determinado nivel anteroposterior (AP) o rostrocaudal.

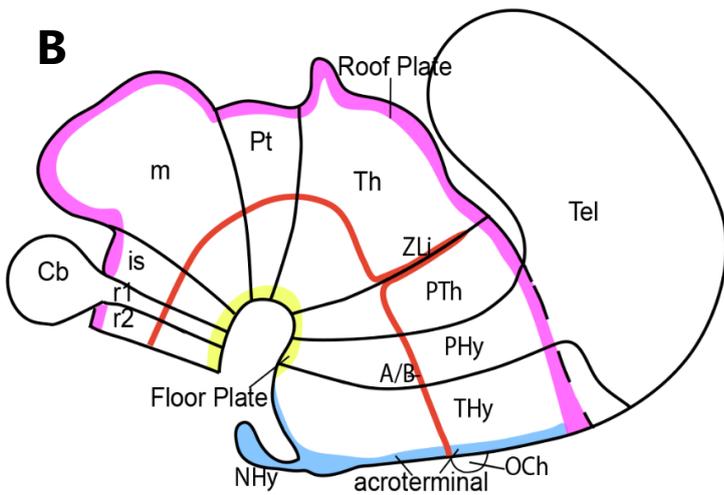
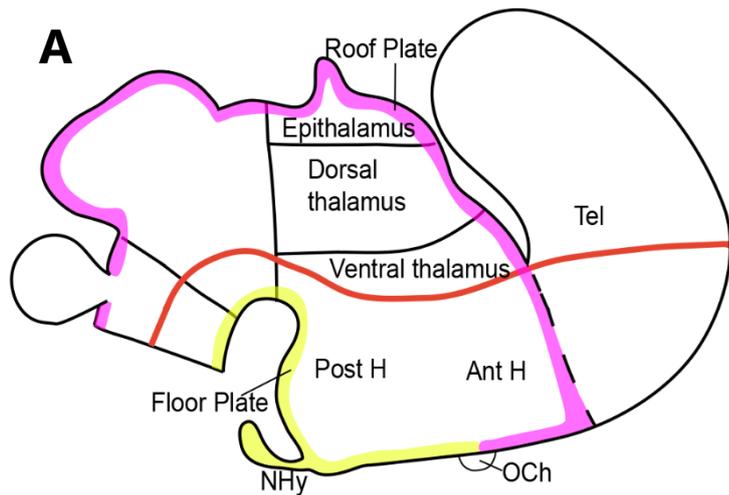


Figura 1. Comparación modelo

columnar vs modelo prosomérico. (A)

Esquema que ilustra el modelo de organización columnar del cerebro. El eje longitudinal está representado con una línea roja. La placa del techo está indicada en rosa y la placa del suelo en amarillo. Nótese la discordancia de estas entidades longitudinales a nivel del cerebro anterior, donde la placa del suelo y la placa del techo son perpendiculares al eje longitudinal (topológico). El hipotálamo (columna diencefálica "ventral") está dividido en partes: anterior (la parte cercana al telencéfalo) y posterior (la parte cercana a los cuerpos mamilares y flexura cefálica). (B) Esquema que ilustra el modelo prosomérico de organización del cerebro. La línea roja representa el límite alar-basal longitudinal (A/B), cuyo final rostral es ventral al quiasma óptico (OCh). La placa del techo (rosa) y la placa del suelo (amarillo) en este caso son coherentes con el eje (paralelas a él). En este modelo se incluye el dominio acroterminal (azul) que constituye el territorio anteromedial del tubo neural, que identifica su extremo rostral a través de los cuatro compartimentos longitudinales suelo, basal, alar, y techo. Las líneas negras perpendiculares a las entidades longitudinales separan cada uno de los prosómeros. Consultar lista de abreviaturas.

2. Dimensión axial y dorsoventral del hipotálamo. Centros organizadores

Según el modelo prosomérico, basado en datos moleculares, el hipotálamo presenta dos secciones transversales anteroposteriores, o prosómeros hp2 y hp1 que, por definición, están divididas en dominios longitudinales (Puelles y col., 2012; Puelles y Rubenstein, 2015). Existen señales morfogenéticas que especifican estas regiones dorsoventrales y anteroposteriores en la placa (estadios precoces del desarrollo neural) y en el tubo neural (tras la fusión de los extremos laterales de la placa neural). Estas señales aportan información posicional a las células capacitadas para recibirlas, que pueden generar una respuesta diferencial en función de su localización, o del periodo temporal en el que estén sometidas a esa señalización. Los morfógenos, o proteínas difusibles de diversos centros organizadores, son las señales primordiales que pueden ocasionar la activación o represión de determinados factores de transcripción en poblaciones celulares concretas, produciendo una especificación en las mismas, y reduciendo el abanico de vías de diferenciación posibles.

Uno de estos centros organizadores, es la notocorda (Fig.2), estructura mesodérmica longitudinal, situada en la línea media en todos los miembros del filo de los cordados, transitoria en algunos vertebrados, y fuente de señales que aportan información posicional a los tejidos de su alrededor. Una de sus funciones bien estudiadas en el sistema nervioso central (SNC), es la inducción de la placa del suelo. En los experimentos de Placzek y col. (1990), y Yamada y col. (1991), se comprobó que, si se realizaba un trasplante de la notocorda junto a la médula espinal de embriones de pollo, a medio camino entre la placa del suelo y la placa del techo, las células neurales adyacentes a la notocorda ectópica adquirirían características morfológicas de placa del suelo. En el tejido neuroectodérmico circundante a estos explantes, se reprimía la expresión de marcadores dorsales como *Pax3* o *Pax6* (Goulding y col., 1993). Por otro lado, la

extirpación de fragmentos de la notocorda en embriones de pollo durante estadios tempranos previene la expresión de marcadores del suelo, como SC1 o FP1 (Yamada y col., 1991). La notocorda expresa y secreta la proteína Sonic Hedgehog (SHH), que difunde hacia los tejidos cercanos ofreciendo información posicional (morfógeno). SHH primero se produce en la notocorda, y después en la placa neural que contacta con ella (Echelard y col., 1993). El desarrollo normal de la médula espinal depende de dos centros de señalización diferentes: la notocorda y la placa del suelo. (Echelard y col. 1993). El límite rostral de la placa del suelo (Fig.2) ha sido un tema controvertido a lo largo de la historia en el campo de la neurociencia. Kingsbury (1922) posicionaba el extremo rostral de la placa del suelo en el límite ístmico-mesencefálico, negando la existencia de una estructura de este tipo en el diencefalo o en el mesencefalo. Sin embargo, Johnston (1923) afirmaba que la placa del suelo se extendía rostralmente más allá del istmo. También se ha situado este extremo rostral de la placa del suelo en el infundíbulo, bajo el hipotálamo, supuestamente basal (Swanson, 2003). El extremo rostral de la notocorda, en fases muy tempranas, llega hasta el área mamilar y después se separa tras la formación de la flexura cefálica (Puelles y col., 2012; Puelles y Rubenstein, 2015; Díaz y Puelles, 2020). El límite rostral de la placa del suelo coincide con el límite rostral de la notocorda, esto es, en el hipotálamo a nivel medial del área mamilar. Esta conclusión se apoya, tanto en las características morfológicas de este tejido que ha estado en contacto con la notocorda, como en el patrón de expresión de genes marcadores de placa del suelo, como *Ntn1*, *Lmx1a* o *Lmx1b* (Puelles y col 2012).

Otro centro organizador es la placa precordal (Fig.2), una estructura mesodérmica media de origen nodal cuyas células migran dorsalmente (desde el suelo al techo neural) por delante del dominio acroterminal hipotalámico. Experimentos en los que se trasplantaba o extirpaba la placa precordal en ratón, demostraron su rol en la especificación del cerebro anterior (Shimamura y Rubenstein, 1997). Posteriormente, los experimentos de García-Calero y col.

(2008) mostraron una pérdida de la diferenciación de la placa basal en el prosencéfalo secundario, diencéfalo y mesencéfalo, además de holoprosencefalia cuando se extirpaba la placa precordal completa en embriones de pollo de estadios tempranos. La placa precordal es una población que migra tempranamente del nodo (Izpisúa-Belmonte, 1993), por lo tanto, sus efectos siguen una secuencia temporal topológicamente ventro-dorsal en la inducción basal-alar en el cerebro anterior (Puelles y Rubenstein, 2015). Tanto la notocorda como la placa precordal secretan el morfógeno SHH. A lo largo del tubo neural, las células responden de manera diferencial a esta proteína (Shimamura y Rubenstein, 1997). La notocorda ejerce un rol ventralizante a lo largo del tubo neural siendo esencial para el desarrollo del suelo y placa basal neurales. En contraste, las señales procedentes de la placa precordal actúan a través del dominio acroterminal en dirección rostro-caudal, de manera dependiente del tiempo (Díaz y Puelles, 2020). La placa precordal es crucial en la organización anteroposterior del hipotálamo y en la separación bilateral de los ojos y el telencéfalo.

Al igual que en el resto de los sectores neuroméricos de placa del suelo, en el suelo del hipotálamo se activa la expresión de *Shh* tras su inducción por parte de la notocorda. La expresión de este morfógeno se extiende a la placa basal hipotalámica. Este efecto organizativo de la placa del suelo retromamilar (RM) y mamilar (M) y subsecuente extensión a la placa basal, estaría implicado en la diferenciación dorsoventral hipotalámica, así como en el posicionamiento del límite alar-basal indicado por la expresión del gen *Nkx2.2* (Puelles y col., 2012; Díaz y Puelles, 2020).

El área acroterminal (Fig.2) constituye el territorio transversal más rostral del tubo neural (Puelles y col., 2012). Sus partes alar y basal expresan diferentes combinaciones que implican una función organizativa. Por ejemplo, las subregiones alar y tuberal basal expresan el factor de transcripción *Six3* (Ferrán y

col., 2015; Yu y col., 2017) que se sabe que antagoniza la acción de WNT (caudalizante) en el cerebro anterior (Lagutin y col., 2003). La región acroterminal basal expresa *Tbx3*, *Fgf8* y *Fgf10* (Pontecorvi y col., 2008; Fu y col., 2017; Díaz y Puelles, 2020). El factor de transcripción *Tbx3* está relacionado con la represión local parcial de *Shh*, necesaria para la formación de estructuras como el infundíbulo tuberal, la eminencia media, el núcleo arcuato y la neurohipófisis (Manning y col., 2006). Los miembros de la familia de los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs) controlan la proliferación o la apoptosis en varios territorios del neuroectodermo. Recientemente, se ha reportado que *Fgf10* ejerce un rol negativo en la proliferación de algunas poblaciones celulares del hipotálamo (Goodman y col., 2020). La señal *Fgf8* difunde en dirección caudal desde esta localización, probablemente afectando en su organización a las áreas mamilar (M) y retromamilar (RM). *Fgf8* ejerce un rol en la regulación de factores de transcripción necesarios para la especificación de ciertas áreas. Por ejemplo, en el hipotálamo del pez cebra, actúa reprimiendo la expresión de *Otp* (Del Giacco y col., 2006). Además, se demostraron efectos en el mantenimiento de la proliferación de ciertas áreas como la adenohipófisis (Ericson y col., 1998).

El anillo neural anterior (ANR; Fig.2) es un organizador que constituye el límite rostral bilateral del neuroectodermo en estadios de placa neural, y posteriormente representa la placa del techo septo-comisural o telencéfalo-hipotalámica (Cobos y col., 2001). El ANR expresa proteínas de la familia FGF y antagoniza el efecto ventralizante de la señal secretada en la placa del suelo (Crossley y Martin, 1995; Crossley y col., 2001; Storm y col., 2003, 2006).

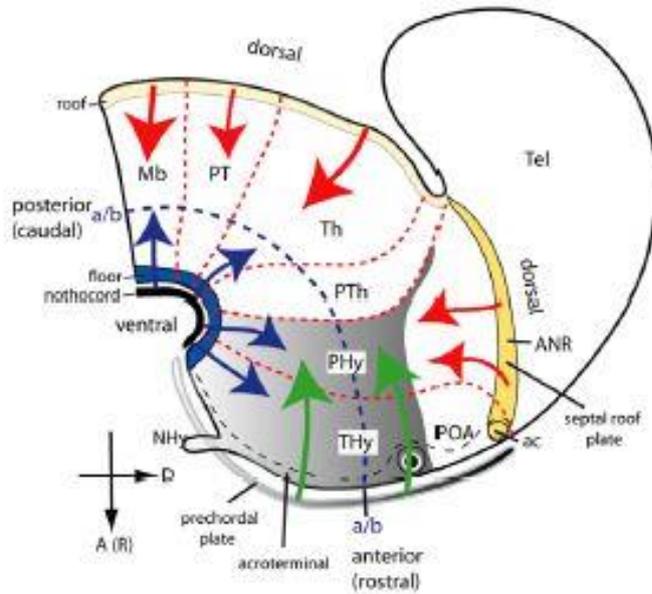


Figura 2. Esquema de las señales que influyen la regionalización ventro-dorsal y rostro-caudal en el hipotálamo (gris). Las flechas azules indican la dirección ventro-dorsal del gradiente de señales ventralizantes producido en la notocorda (negra) y en la placa del suelo (azul). Las flechas verdes indican la dirección rostrocaudal del gradiente señalizador de la placa precordial (gris) y del área acrotterminal (línea negra discontinua). Las flechas rojas indican la dirección dorsoventral de las señales dorsalizantes del ANR, como parte más rostral de la placa del techo (amarillo). Imagen tomada de Díaz y Puelles (2020)

3. Hipotálamo basal de mamíferos en el modelo prosomérico. Divisiones transversales y longitudinales. Principales dominios histogenéticos, áreas progenitoras, o microzonas.

La información posicional que reciben las células progenitoras neuroepiteliales en forma de gradiente a lo largo del tubo neural permite su regionalización. Como se ha visto previamente, el hipotálamo está sujeto a una combinatoria de señales procedentes de los centros organizadores que derivan en la regionalización anteroposterior y dorsoventral que se describe a continuación.

El modelo prosomérico divide el hipotálamo en dos dominios transversales, hp1 y hp2 (en orden caudo-rostral); hp2 termina en el dominio anteromedial acroterminal (Puelles y col. 2012; Puelles y Rubenstein, 2015). Los dos prosómeros están divididos en sus porciones alar y basal, caudalmente continuos con las correspondientes divisiones longitudinales diencefálicas (Puelles y col., 2012; Morales-Delgado y col., 2014; Ferran y col., 2015; Puelles y Rubenstein 2015). La zona terminal hipotalámica (THy), más rostral, coincide con hp2, mientras que la zona peduncular (PHy), más caudal, coincide con hp1.

Además, el hipotálamo está dividido en los siguientes dominios longitudinales (Puelles y col., 2012; Puelles y col., 2015), de dorsal a ventral, en la placa alar, se diferencian áreas: paraventricular terminal y paraventricular peduncular (TPa/PPa), así como áreas subparaventricular terminal y subparaventricular peduncular (TSPa/PSPa). En la placa basal (Fig.3), aparecen de dorsal a ventral las áreas: tuberal dorsal, en hp2 y retrotuberal dorsal en hp1 (TuD/RTuD), tuberal intermedio y retrotuberal intermedio (TuI/RTuI), tuberal ventral y retrotuberal ventral (TuV/RTuV), perimamilar y perirretromamilar (PM/PRM), y por último, mamilar y retromamilar (M/RM).

A continuación, se describirán algunas características moleculares de los dominios del hipotálamo basal, donde se localizan el área RM y el núcleo ventral premamilar (VPM), objetos de análisis de este estudio.

Los dominios estrechos tuberal dorsal y retrotuberal dorsal (TuD/RTuD; Fig.3) constituyen la zona más dorsal del hipotálamo basal, situándose ventralmente junto al límite alar-basal, que en THy se sitúa ventral al quiasma óptico (Puelles y col., 2012). Existen diferencias de expresión entre las regiones terminal y peduncular de este dominio. Por ejemplo, la zona acroterminal en TuD, o zona anterobasal medial (ABasM) expresa selectivamente el gen *Ret*, y comparte diversos marcadores con la parte no acroterminal de TuD, por ejemplo: *Nr5a1*, *Fbxw7* o *Sema3a*. El factor de transcripción *Nxk2.2* marca el límite de la placa basal en el prosencéfalo, sin embargo, está ausente en la zona ABasM. *Lhx6* se expresa principalmente en la región RTuD (Puelles y col., 2012; Puelles y Rubenstein, 2015; Ferran y col., 2015).

Las partes tuberal intermedia y retrotuberal intermedia (Tul/RTul; Fig.3) subyacentes constituyen el área longitudinal más amplia del hipotálamo basal. En la zona acroterminal correspondiente a este dominio existen diversas formaciones particulares, como el núcleo arcuato (Arc), la eminencia media (ME) o la neurohipófisis (NHy). Algunos marcadores moleculares se expresan específicamente en esta zona acroterminal Tul como *Fgf8* o *Fgf10* (Ferran y col., 2015; Díaz y Puelles, 2020), mientras que existen otros que abarcan todo este dominio terminal de Tul (*Rgs4*, *Lef1*). *Plagl1* es un marcador específico de la región RTul. Además, hay otros genes que se expresan rostrocaudalmente en este dominio longitudinal Tul/RTul, como *Rax*, *Nkx2.1*, y algunos miembros de la familia *Dlx* (Puelles y col., 2012).

El dominio tuberal ventral y retrotuberal ventral (TuV/RTuV; también identificado como "tuberomamilar" en la literatura; Fig.3) es un área estrecha, situada entre el dominio longitudinal Tul/RTul y la banda longitudinal PM/PRM,

que presenta la particularidad de generar la población histaminérgica hipotalámica, detectable en estadios postnatales. Durante el desarrollo, algunos genes como *Lhx6*, *Bsx* o *Hdc* se expresan en esta área longitudinal TuV/RTuV (Shimogori y col., 2010; Puelles y col., 2012; Schredelseker y col., 2020).

La banda perimamilar/perirretromamilar (PM/PRM; Fig.3) más amplia en su porción PRM, se estrecha rostralmente en PM, signo diferenciador de hp1 y hp2 en esta región. Ambos dominios rostrocaudales expresan selectivamente *Otp* y *Zic1*. Comparte la señal de *Sim1* con M y la de *Ebf3* con RM.

El dominio longitudinal más ventral del hipotálamo está constituido por las áreas mamilar/retromamilar (M/RM; Fig.3). Ambas son diferentes en cuanto a sus patrones de expresión y a las estructuras derivadas de ellas, quizá porque reciben gran influencia de señales cercanas de la notocorda y placa del suelo y, también, de la placa precordal y el territorio acroterminal. El área RM expresa selectivamente algunos genes de la familia *lrx*, *Lmx1a*, *Lmx1b*, mientras que el área M expresa *Foxb1* o *Six3*.

4. Estructura nuclear del hipotálamo basal en relación con los dominios histogenéticos

En el hipotálamo, las poblaciones celulares se organizan principalmente en núcleos mediales (periventriculares), intermedios o superficiales, aunque también existen poblaciones dispersas más laxamente organizadas. El modelo prosomérico clasifica estas agrupaciones en función de los dominios histogenéticos, o áreas discretas del neuroepitelio donde se origina cada una de ellas. Tras su proliferación, las neuronas originadas a partir de cada microzona pueden permanecer en el mismo dominio radial histogenético, si no realizan migración tangencial y se depositan meramente de fuera adentro (células más antiguas superficiales), o pueden invadir un dominio diferente al que les dio

origen, en el caso de que se desplacen mediante migración tangencial (poblaciones foráneas).

El desarrollo del hipotálamo se realiza en un patrón "*outside-in*" o "de fuera hacia dentro": las primeras células que nacen quedan en las capas más superficiales, mientras que las últimas células en nacer se localizan en las capas más internas (Shimada y Nakamura, 1973; Altman y Bayer, 1986). Este concepto se ha complicado en los últimos años debido a la identificación de numerosas poblaciones que alcanzan su localización final en el adulto realizando migraciones tangenciales. A continuación, se describirán los derivados más remarcables de los dominios histogénéticos del hipotálamo basal, indicando algunas de las migraciones tangenciales previamente descritas en la literatura:

El dominio histogénético TuD produce principalmente neuronas glutamatérgicas. Los marcadores *Nkx2.2* y *Nr5a1* revelan poblaciones que nacen en este lugar y se desplazan ventralmente, a partir de E13.5, formando el primordio del prominente núcleo ventromedial hipotalámico (VM; Puelles y col., 2012; Díaz y Puelles, 2020). A partir de esta región TuD también se forma la población autóctona dopaminérgica A12/A13 (Puelles y col., 2012).

El dominio histogénético RTuD produce el núcleo autóctono posterobasal (PBas; Puelles y col., 2012), y también algunas poblaciones migradas ventralmente, formando parte del *core* de la porción peduncular del núcleo dorsomedial (P-DMc; Puelles y col. 2012). Otras células nacidas en este dominio RTu, parecen migrar dorsalmente a la región paraventricular (Pa) en el hipotálamo alar.

Los dominios histogénéticos Tul/RTul, de manera general, producen neuronas GABAérgicas. La parte acroterminal de Tul origina el núcleo arcuato (Arc), mientras que la región Tul no acroterminal origina la mayoría de las neuronas que forman la parte terminal del núcleo dorsomedial (T-DM; Puelles y

col., 2012). De manera análoga, la región RTul origina la mayor parte de la porción peduncular del núcleo dorsomedial (P-DM; Puelles y col., 2012).

El dominio histogenético TuV/RTuV (también conocido en la literatura como "tuberomamilar") se encuentra separando la banda PRM/PM de los núcleos DM y Arc. Esta región "tuberomamilar" es el único lugar donde hay una población particular de neuronas histaminérgicas (Puelles y col., 2012; Mickelsen y col., 2020). Estas células ocupan toda la extensión radial de este dominio y algunas migran tangencialmente, rodeando al cuerpo mamilar. Además, en este territorio se observa la distorsión ocasionada por la población del núcleo ventral premamilar (VPM).

El dominio histogenético PRM/PM, caracterizado por la expresión longitudinal de *Otp*, genera neuronas glutamatérgicas. El núcleo dorsal premamilar (DPM) parece ser un derivado terminal de este dominio que expresa selectivamente el gen *Fezf2* (Puelles y col., 2012).

El dominio histogenético M da lugar a las poblaciones autóctonas que forman los núcleos mamilares: el núcleo mamilar medial (MM), de mayor tamaño, y el núcleo mamilar lateral (ML), de tamaño más reducido (Puelles y col., 2012). Interesantemente, la región M también es la zona donde nacen las neuronas *Foxb1*-positivas, que migran tangencial y subpialmente, en dirección dorsal hasta alcanzar la región terminal paraventricular alar (TPa) (Celio, 1990; Alvarez-Bolado y col., 2000; Bilella y col., 2014, 2016). Las células derivadas del área mamilar son glutamatérgicas.

La región RM (también conocida como "supramamilar" en la literatura que sigue la tradición columnar) también es progenitora de células con perfil glutamatérgico. De manera similar a lo que ocurría con el área M, la región RM origina las poblaciones autóctonas retromamilar medial (RMM) y retromamilar lateral (RML), y las poblaciones migradas que forman el complejo subtalámico/parasubtalámico (STh/PSTh; Keyser, 1972, 1979; Marchand, 1987;

Altman y Bayer, 1986; Jiao y col., 2000; Martin y col., 2002, 2004; Skidmore y col., 2008). Estas migraciones se dirigen subpialmente en dirección dorsal hasta alcanzar la zona basal RTu, donde el núcleo STh queda separado del PSTh por el pedúnculo cerebral. Se ha sugerido el área RM como zona progenitora de las células del núcleo ventral premamilar (VPM), que alcanzarían su localización en el adulto en TuI-TuV, realizando una hipotética migración tangencial (Puelles y col., 2012). Esta población VPM y su migración son los objetos de estudio de este trabajo.

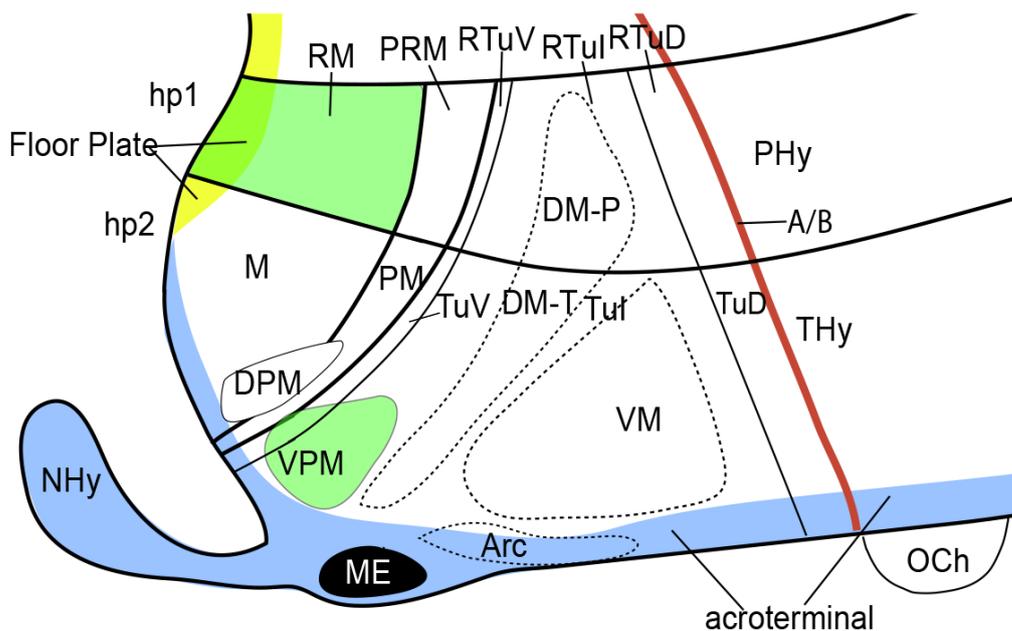


Figura 3. Esquema con las principales estructuras del hipotálamo basal. La línea roja representa el límite alar basal (A/B). la placa del suelo está dibujada en amarillo, y el dominio transversal acroterminal en azul. Las líneas transversales (negras) al eje longitudinal (rojo) delimitan los prosómeros hp2(rostral) y hp1 (caudal). De dorsal a ventral y caudal a rostral se representan los siguientes dominios longitudinales en el hipotálamo basal: Retrotuberal dorsal y tuberal dorsal (RTuD/TuD); retrotuberal intermedio (RTuI) con la parte peduncular del núcleo dorsomedial (DM-P) y tuberal intermedio (TuI) con el núcleo ventromedial (VM), la parte terminal del núcleo dorsomedial (DM-T) y parte dorsal del núcleo premamilar ventral (VPM); retrotuberal ventral y tuberal ventral (RTuV/TuV; también "tuberomamilar"), donde hay neuronas histaminérgicas, y donde se sitúa la parte ventral del núcleo premamilar ventral (VPM; verde); el dominio perirretromamilar/perimamilar (PRM/PM), con el núcleo premamilar dorsal (DPM) cerca

de su parte PM; el dominio RM (verde)/M próximos a la placa del suelo. Se representan las principales especializaciones acroterminales basales; núcleo arcuato (Arc), eminencia media (EM) y neurohipófisis (NHy), así como la especialización alar del quiasma óptico (OCh).

5. Migración neuronal durante el desarrollo

Después de su nacimiento en la zona ventricular del tubo neural, determinadas poblaciones neuronales adquieren la capacidad de migrar radial y/o tangencialmente hasta alcanzar su localización final. El fenómeno de migración neuronal está finamente regulado: las neuronas en desarrollo siguen una vía específica en un periodo de tiempo concreto hasta que paran su movimiento en una posición definida (Rakic, 1988). El fenómeno de migración parece ser importante para que se produzca una conectividad efectiva (Hatten, 2002). Se han descrito, principalmente, dos tipos distintos de migración en el sistema nervioso: radial y tangencial.

En la migración radial (Fig.4A,A') las neuronas inmaduras avanzan desde el ventrículo hacia la superficie del tubo neural, ayudándose de las prolongaciones de las células de la glía radial (Rakic, 1988). En la migración tangencial (Fig.4B,B'), las neuronas inmaduras avanzan paralelas a la superficie ventricular (Rakic, 1988), abandonando su dominio histogenético radial. Esto dificulta la identificación de los nichos progenitores de poblaciones que siguen una vía migratoria tangencial, en estadios posteriores al evento migratorio.

Las neuronas inmaduras presentes en la capa ventricular que siguen una vía de migración radial, utilizan la prolongación que extienden las células de la glía radial hacia la superficie. En este caso el "*leading process*" o la/s neurita/s de las neuronas inmaduras en migración, que se encargan de recibir información del microambiente donde se encuentran, presentan morfología bipolar, siguiendo la dirección de la prolongación de la glía radial (Kriegstein y Noctor, 2004; Valiente

y Marin, 2010). En las neuronas que siguen un estilo de migración tangencial, las neuritas que componen el *“leading process”* se estabilizan o retraen en función de las moléculas de guía neuronal disponibles en su microambiente, que modelan la direccionalidad del movimiento (Martini y col. 2009). Se ha observado que las neuronas pueden cambiar su modo de migración de radial a tangencial o viceversa (Noctor y col., 2004; Brignani y Pasterkamp, 2017).

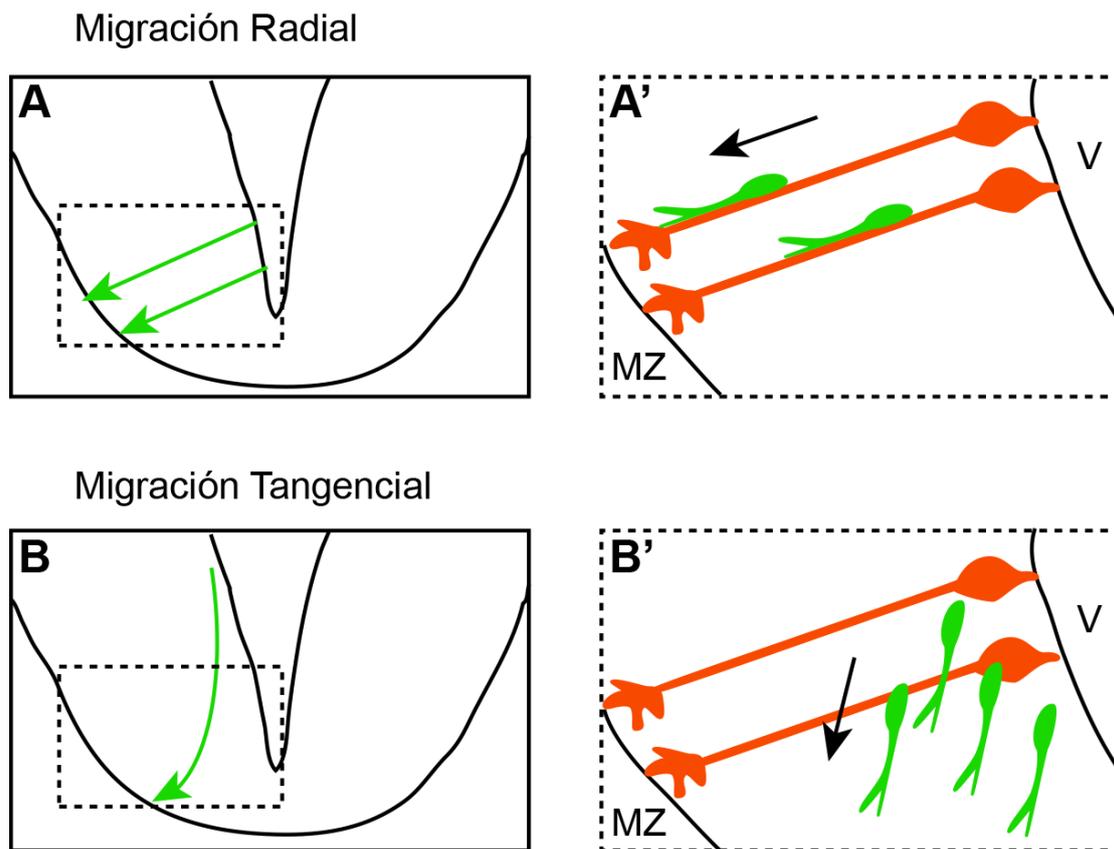


Figura 4. Comparación de migración radial vs migración tangencial. Dibujos en los que se muestra de manera esquematizada la dirección que sigue un movimiento neuronal radial (A), desde la zona ventricular (V) hasta la zona marginal (MZ) en la superficie, y tangencial (B). Se muestran detalles en A', que representa la migración radial, con las células de la glía radial en naranja, y las neuronas inmaduras que se desplazan en verde, con morfología bipolar. B' representa el detalle de la migración neuronal tangencial, con las neuronas que realizan el

desplazamiento en verde y las células de la glía radial en naranja. Las flechas negras indican la dirección del movimiento. Imagen adaptada de Moffat y col., 2015.

Existen numerosas familias de proteínas implicadas en la actividad migratoria neuronal. Un ejemplo serían las netrinas. Su componente más conocido es la Netrina-1, proteína secretada que se expresa en la placa del suelo (Serafini y col., 1996). Se sabe que determinadas poblaciones en rombencéfalo y médula espinal, que expresan su receptor DCC, son atraídas hacia su gradiente creciente (Kim y col., 2014; Chen, 2017). Se han detectado defectos en migraciones rombencefálicas en ratones *knockout* para la Netrina-1, o su receptor DCC (Moreno-Bravo y col., 2018; García-Guillén y col., 2020). Otras moléculas de señalización son Slit/Robo que, de manera general, ejercen un rol repulsivo, impidiendo el paso de neuronas que expresan Robo hacia zonas con altos niveles de proteínas de la familia Slit (Chen, 2017). La señalización mediada por la familia de los ligandos ephrin_s (ephrin-A_s o ephrin-B_s) y sus receptores (Eph_s) puede ser bidireccional. Tanto los receptores como los ligandos son proteínas transmembrana, la población que migra puede expresar un ligando (señalización *forward*) o un receptor (señalización *reverse*). Normalmente, la unión de ligando y receptor establece los límites de la vía migratoria de una población neuronal, ocasionando una señal de parada (Niethamer y Bush, 2019). De manera general, los receptores de la familia Eph-B, presentan mayor afinidad por ligandos de la familia ephrin-B, y los receptores de la familia Eph-A por los ligandos ephrin-A, con excepción del receptor Eph-A4, que presenta mayor afinidad por los ligandos ephrin-B1y ephrin-B2 (Niethamer y Bush, 2019). Esta familia regula migraciones en células de la cresta neural (Davy y Soriano, 2007), en el hipocampo (Robichaux y col., 2016; Chumley y col., 2007), o en la corteza (Sentürk y col., 2011). Las Semaforinas también se han relacionado con procesos migratorios a través de su interacción con proteínas de las familias Plexina y Neuropilina (Chédotal y col., 1998; Marín y col., 2001; Limoni y Niquille, 2021). La variedad de proteínas que pueden estar implicadas en procesos de migración neuronal (además de las

citadas, cadherinas, integrinas, reelina, etc) se suma a la posibilidad de que existan efectos redundantes en su función.

Históricamente se consideró que el principal modelo migratorio existente en el hipotálamo era radial, con la excepción de la población del núcleo STh (Keyser, 1972, 1979; Marchand, 1987; Altman y Bayer, 1986; Jiao y col., 2000; Martin y col., 2002; Martin y col., 2004; Skidmore y col., 2008). El patrón radial de desarrollo del hipotálamo "*outside-in*" ("de fuera hacia dentro") establece que las primeras células en nacer son las que quedan posicionadas más lateralmente en el parénquima cerebral, mientras que las últimas que nacen quedan en una posición cercana al ventrículo (Shimada y Nakamura, 1973; Altman y Bayer, 1986), por lo cual, en realidad no hay ninguna migración radial, sólo el paso de las neuronas postmitóticas al manto más cercano. Este patrón de estratificación, que puede tomarse como válido de manera general, presenta algunas excepciones, por ejemplo: determinadas poblaciones neuronales del hipotálamo tuberal, que naciendo en los días E8.5, o E10.5, posteriormente se localizan juntas, en una zona subpial lateral (Alvarez-Bolado y col., 2012), o las neuronas POMC-positivas (más laterales) y NPY-positivas (más mediales) del núcleo Arc, aunque se sitúen a distintos niveles medio-laterales, ambas poblaciones nacen en el mismo intervalo temporal, entre E11.5-E12.5 (Padilla y col., 2010). En un análisis reciente (Aslanpour y col., 2020) se ha comprobado el patrón general "*outside-in*" en determinadas poblaciones del hipotálamo tuberal, con excepciones en el Arc (neuronas nacidas en E9.5) o neuronas nacidas tardíamente (E13.5) que, sin embargo, quedan superficialmente situadas en el parénquima cerebral. Las migraciones tangenciales, más abundantes en el hipotálamo de lo que se creía antes, alteran el patrón de desarrollo "*outside-in*".

La población subtalámica migrada tangencialmente (Keyser, 1972, 1979; Marchand, 1987; Altman y Bayer, 1986; Jiao y col., 2000; Martin y col., 2002, 2004; y col., 2008), sigue una vía conocida: desde la región RM inicia un movimiento

migratorio subpial en dirección dorsal, cruzando varios dominios longitudinales hasta alcanzar su posición final en el área RTul (Puelles y col., 2012). De manera similar, en el área M se ha descrito otra migración subpial en dirección dorsal, que termina en el hipotálamo alar, cuyas neuronas expresan *Foxb1* (Celio, 1990; Alvarez-Bolado y col., 2000; Bilella y col., 2014, 2016). Un estudio reciente ha reportado dos migraciones tangenciales más con origen en el área RM que toman dirección caudal hacia distintas localizaciones en el diencefalo (Murcia-Ramón y col., 2020). También se han identificado otras migraciones tangenciales en otros dominios longitudinales del hipotálamo, como es el caso de las poblaciones que involucran neuronas peptidérgicas (Morales y col., 2011, 2014, Díaz y col. 2015), o neuronas que forman parte del núcleo VM (Puelles y col., 2012; Díaz y Puelles, 2020).

6. El núcleo ventral premamilar. Posición en el adulto. Receptores. Conectividad. Función. Primeras nociones sobre su migración

El núcleo ventral premamilar (VPM) es una estructura ovoidal bilateral situada en la capa del manto, entre los cuerpos mamilares y el infundíbulo hipofisario. En el ratón adulto queda posicionado entre las regiones TuV y Tul, observándose su contorno negativo encajado en la población histaminérgica TuV. Este núcleo fue por primera vez identificado por Gurdjian (1927), quien además identificó el núcleo dorsal premamilar (DPM). Ambos toman su nombre de la localización en rata adulta bajo perspectiva columnar, empleando planos de corte coronales. Paradójicamente, la situación topológica de estos dos núcleos es la contraria según el modelo prosomérico; situándose el núcleo DPM justamente ventral al núcleo VPM (comparar Figs.1A;B y Fig.3).

Las células del VPM en ratón presentan receptores para las hormonas leptina e insulina (Donato y Fuzeti, 2011; Elmquist y col., 1998) relacionadas con

el balance energético. También contiene receptores de andrógenos (Donato y Fuzeti, 2011; Simerly y col., 1990), cerca del 50% de células que tienen el receptor de leptina también contienen el receptor de andrógenos (Cara y col., 2020). Las neuronas de este núcleo son glutamatérgicas (Ziegler y col., 2002), pero también expresan neuropéptidos moduladores como CART, Substancia P (Tac1), PACAP, neuropéptido Y (NPY) o encefalina (Donato y Fuzeti, 2011). Recientemente, en su estudio transcriptómico del hipotálamo, Mickelsen y col. (2020) han identificado 8 *subclusters* celulares glutamatérgicos en el núcleo VPM adulto de ratón. Curiosamente, dos de ellos están formados por neuronas que expresan genes relacionados con la neurotransmisión catecolaminérgica, como el transportador de dopamina (DAT), la enzima DOPA descarboxilasa (Ddc) y el transportador de monoaminas VMAT2. Sin embargo, no hay expresión de tirosina hidroxilasa (Th) en estas células, por lo que no existe producción de catecolaminas en las mismas.

Canteras y col. (1992) y Merlino y col. (2019) estudiaron las proyecciones del VPM, que manda eferencias a la sustancia gris periacueductal, el área tuberal lateral, el núcleo arcuato, el núcleo paraventricular hipotalámico, el área preóptica, varios núcleos BST paraseptales, el núcleo ventral lateral septal, y el núcleo amigdalario amígdalo-hipocámpal. El VPM recibe inputs de estructuras del cerebro anterior relacionadas con el sistema vomeronasal (Cavalcante y col., 2014).

Las neuronas del núcleo VPM regulan el desarrollo de la pubertad, recibiendo señales de leptina y estimulando a la hormona liberadora de gonadotropina (Donato y col., 2011, Childs y col., 2021). En este proceso, parecen tener especial importancia las neuronas del VPM que contienen el neuropéptido modulador PACAP (Ross y col., 2018). Anteriormente, se reportó que el núcleo VPM modula la liberación de hormona luteinizante a través de una vía desencadenada por la recepción de odorantes (Beltramino y Taleisnik, 1985). Recientemente, se ha reportado que las neuronas glutamatérgicas del VPM que

expresan el transportador de dopamina (DAT), regulan comportamientos de agresividad en ratones macho, estableciendo roles de dominancia y sumisión (Stagkourakis y col., 2018, Chen y col., 2020). Estos autores observaron que la activación de proyecciones de neuronas DAT positivas del VPM a la porción lateral del VM, desencadenan comportamientos de ataque, mientras que la activación de proyecciones de neuronas DAT a núcleos retromamilaes favorecen comportamientos de recompensa (Stagkourakis y col., 2018).

Aunque se ha estudiado el perfil molecular, la conectividad y la función del núcleo VPM, no existen estudios que traten directamente su desarrollo embrionario. Puelles y col. (2012) sugieren un origen RM de la población VPM, basado en el análisis descriptivo de expresión de los genes *Irx5*, *Nos1*, *Pknox2* y *Tac1* en diversos estadios embrionarios. Estos autores postulan que esta población, posiblemente, se origina en el área RM, y subsecuentemente migra tangencialmente hasta su localización final. Nouri y Awatramani (2017), de manera independiente, sugieren la existencia de una migración tangencial que forma el "núcleo premamilar" a partir de una población que proviene de la placa del suelo, tras su análisis de la señal del marcador *Foxa2* en ratones prenatales. Sin embargo, no hay análisis experimentales que confirmen estos postulados.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la ausencia de estudios experimentales enfocados en el análisis del desarrollo embrionario del núcleo VPM, se planteó el primer objetivo general:

1. Testar la hipótesis planteada en Puellas y col. (2012) consistente en el origen RM del núcleo VPM y la migración tangencial de sus células hasta su localización final. Para este objetivo, además de la profundización en el análisis descriptivo con marcadores adicionales, se realizó una serie exhaustiva de marcajes experimentales con el fin de visualizar la migración tangencial *in vitro*.

Los objetivos específicos que se plantearon fueron los siguientes:

- 1.1. Acotar la zona del neuroepitelio en la que se originan las neuronas del VPM.
- 1.2. Acotar temporalmente el evento migratorio.
- 1.3. Describir la vía migratoria que siguen las neuronas inmaduras del núcleo VPM

Un segundo objetivo planteado para este trabajo fue:

2. Identificación de moléculas de señalización implicadas en el desarrollo del núcleo VPM. Para llevar a cabo este objetivo se analizó la expresión de determinadas moléculas implicadas en la proliferación, especificación y/o migración, y se estudió el fenotipo de algunos mutantes deficientes en ellas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

De manera general se emplearon cerebros de ratones *wildtype* (cepa Swiss) en edades comprendidas entre E12.5 y E18.5. Además, se analizaron varios tipos de ratones transgénicos:

- Ratones reporteros del ligando proteico Efnb2 (*Efnb2::GFP*), construido mediante la inserción del cassette de cDNA H2B-GFP en el primer exón del gen Efnb2 (Davy y col., 2006) Procesado en el laboratorio de Alice Davy, Universidad de Toulouse, CNRS-CBI (Toulouse, Francia)
- Ratones *knockout* condicionales para el ligando ephrin-B2 (*Efnb2^{CKO}*), generados mediante el cruce de hembras *Efnb2^{lox/lox}* con machos *Nestin::Cre*. Los animales de la camada que contienen el gen *Efnb2^{lox/lox}* y la recombinasa Cre bajo la acción del promotor de *Nestin*, pierden el gen específicamente en los progenitores neurales aproximadamente en el día E10. Estos ratones fueron procesados en el laboratorio de Alice Davy, Universidad de Toulouse, CNRS-CBI (Toulouse, Francia).
- Ratones *knockout* completos para la proteína Netrina-1 (*Ntn1^{-/-}*), generosamente cedidos por Alain Chédotal (Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris, Francia)
- Ratones *knockout* completos para el receptor de la Netrina-1, DCC (*Dcc^{-/-}*), generosamente cedidos por Alain Chédotal (Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris, Francia).
- Ratones hipomorfos severos para el morfógeno Fgf8 (*Fgf8^{neo/null}*), en los que queda sólo un 20% de proteína. Estos ratones fueron generosamente cedidos por Eduardo Puelles, Instituto de Neurociencias de Alicante (Alicante, España).

En todos los casos, se consideró día E0.5 a la primera mañana de la gestación, en la que se puede ver el tapón vaginal.

Todos los cerebros extraídos para la realización de inmunohistoquímica o hibridación *in situ* fueron fijados mediante inmersión en paraformaldehído (PF) al 4% en búfer fosfato salino (PBS) durante una noche. Los cerebros que no se procesaron inmediatamente se guardaron en etanol 70% para preservarlos a largo plazo. Para cortar los cerebros se prepararon bloques de agarosa al 4% en PBS; se orientaba el cerebro en función del plano de corte y, una vez sólido, se seccionaba en el vibratomo (Leica) a 100 μm de grosor, si el tejido estaba destinado para hibridación *in situ*, o de 50 μm de grosor, si el tejido estaba destinado a inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

2. Técnicas moleculares para la preparación de ribosondas

La técnica de hibridación *in situ*, utilizada con frecuencia en este trabajo, consiste en la detección de RNA mensajero en un tejido, a través de la unión de una ribosonda monocatenaria de secuencia complementaria. A continuación, se explican los pasos realizados para la obtención de las ribosondas.

2.1. Clonaje

La mayoría de las ribosondas empleadas en este trabajo estaban disponibles en el laboratorio, con excepción de la específica para el producto de RNA mensajero del gen *Foxa1*. Para disponer de esta ribosonda, primero se clonó parte de su DNA codificante en un vector plasmídico conocido, p-GEM-T Easy (Promega), que después se replicó en bacterias competentes, para la obtención de múltiples copias y síntesis de la ribosonda. Las bacterias competentes con el plásmido que contiene el inserto de DNA de interés (en este caso *Foxa1*) se almacenan a -80°C , pudiéndose recurrir a ellas cada vez que sea necesario.

2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En este caso, se clonó un fragmento de 909 pares de bases (pb) necesario para construir la ribosonda de *Foxa1*. La PCR lo amplificó de manera específica, para posteriormente llevar a cabo su unión al plásmido p-GEM-T Easy (Promega).

La PCR es una técnica de biología molecular que produce múltiples copias de un fragmento concreto de DNA. Este proceso tiene lugar a través de una serie de ciclos: desnaturalización de la doble cadena de DNA, hibridación con el cebador, y amplificación del fragmento. Los componentes esenciales que marcan la especificidad del fragmento a amplificar son los cebadores, por lo que el primer paso fue su diseño mediante el uso de herramientas bioinformáticas (NCBI, ensembl). Los cebadores son oligonucleótidos (aproximadamente 20 bases) que flanquean la secuencia que se quiere amplificar, en este caso parte de la secuencia del gen *Foxa1*. Fueron construidos por la casa MWG-Biotech AG (Fisher Scientific Bonsai, España).

Los cebadores que se utilizaron fueron los siguientes:

-Izquierdo: MLFoxA1-02 AATACTACCGACTCCATACC

-Derecho: MRFoxA1-02 AACACCACGTCCAACACTGTGG

El molde para la amplificación consistió en DNA codificante (cDNA) de cerebros en E14.5, momento en el que hay una elevada expresión del gen *Foxa1*. Para este trabajo se utilizó cDNA almacenado en condiciones óptimas, que se obtuvo previamente a partir de la retrotranscripción de RNA mensajero presente en tejido cerebral.

Reactivos	Volumen (µL)
Buffer 5X	5
dNTPs	0,5
Taq Polimerasa	0,25
Cebador izq.	2
Cebador der.	2
cDNA	0,5
Agua (Sigma)	14.75

Tabla 1: Reacción para la PCR de amplificación del fragmento de cDNA de *Foxa1*

Fases	Tiempo	Temperatura(°C)
Desnaturalización inicial	5'	94
Desnaturalización	30''	94
Hibridación	1'	58
Elongación	1'	72
Elongación final	20'	72
Mantenimiento		4

38X

Tabla 2: Programa del termociclador en el que se realizó la PCR

Para aislar el fragmento de interés, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBS, que separa moléculas de ácidos nucleicos en función de su tamaño. El gel de agarosa se sumerge en una cubeta en tampón a pH 8, bajo el cual las moléculas de DNA presentan carga negativa, desplazándose hacia el polo positivo. Durante este proceso, el polímero de agarosa actúa como una matriz a través de la cual los ácidos nucleicos de menor peso molecular recorren distancias más largas, mientras que los de mayor peso molecular quedan más retrasados.

En el caso presente se utilizó un gel de agarosa al 1% en TBS (Fig.5), puesto que los fragmentos de DNA esperados son mayores de 500 pb. Por cada 50 ml de agarosa se añade 0.25 μ L de RedSafe (Roche), una tinción para la detección de ácidos nucleicos que emite fluorescencia verde. Después, se deja polimerizar la mezcla a 4 °C en un soporte, con los peines para formar los pocillos en los que se carga el producto de la PCR. Una vez polimerizado, se cargaron varios pocillos del gel, dejando el primero y el último libres para cargar un marcador de pesos moleculares para tener una referencia del tamaño de los fragmentos obtenidos (Fig.5).

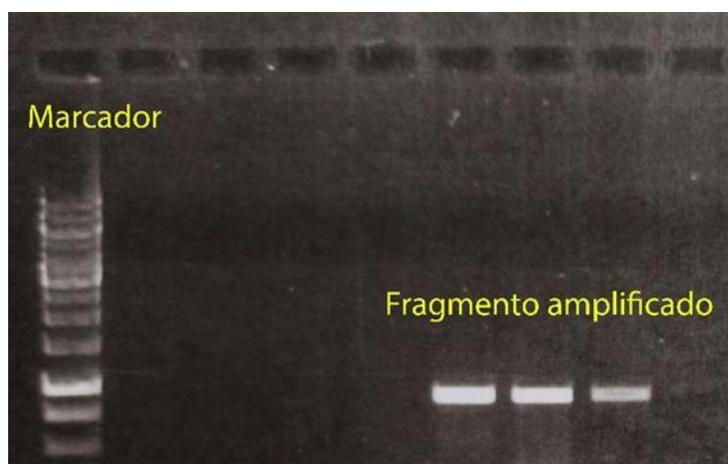


Figura 5. Gel de agarosa, una vez finalizada la electroforesis, con el marcador de pesos moleculares a la izquierda y los fragmentos de DNA amplificados a la derecha

Una vez terminada la electroforesis, se visualizaron las bandas bajo fluorescencia, y se cortaron cuidadosamente las que eran compatibles con el fragmento de interés. Cada sección de agarosa con una banda aislada se introdujo en un tubo ependorf, y después se realiza un protocolo de extracción de DNA con un kit comercial (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen).

2.3. Ligación

En este proceso se une el fragmento aislado previamente, a un plásmido bacteriano. Esto tiene como finalidad el almacenamiento permanente del fragmento de DNA, que sirve para construir la sonda, en bacterias competentes. De esta forma, se podrá recurrir a él cada vez que se precise, aprovechando el crecimiento rápido de las bacterias y su capacidad para replicar plásmidos de manera independiente de su DNA genómico. Se utilizó el plásmido comercial p-GEM-T Easy Vector (Promega). Una vez preparada la reacción, se dejó a 4°C durante toda la noche.

2.4. Transformación

Se trata de introducir el plásmido con el gen de interés (inserto) en bacterias competentes, para su futuro almacenamiento y replicación. Se utilizaron bacterias de la cepa XL1-Blue (Aligent technologies), sin endonucleasas, ni recombinasas. Se preparó en hielo una alícuota de bacterias por cada inserto de DNA experimental, además de una "control" con el plásmido pUC18, que sirvió para comprobar que la transformación había sido óptima. A continuación, para potenciar el proceso de transformación se añadió β -mercaptoetanol (1.7 μ L por cada 100 μ L de bacterias) y se dejó la mezcla 10 minutos incubando en hielo. Transcurrido este tiempo se añaden 50 ng del plásmido con el inserto a cada tubo

experimental, y 1 μL de vector pUC18 al tubo control, permitiendo que incubara en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se realizó un choque térmico para aumentar la porosidad de la membrana, y permitir la penetración del material genético sin afectar a la supervivencia bacteriana. Se depositaron los tubos con las bacterias y los plásmidos en un baño a 42°C durante 45 segundos, y después se volvieron a depositar en hielo por 2 minutos. Entonces se añadieron 200 μL de medio S.O.C (Invitrogen, Cat. No. 15544-034) precalentado a 42 °C, y se incubaron las bacterias a 37°C durante 1 hora en un agitador (250 rpm).

Es necesario distinguir las bacterias que han conseguido introducir el plásmido con el inserto de las que no. Para ello se plaqueó el volumen del cultivo bacteriano (200 μL) en placas de Agar-LB. De esta forma, crecieron colonias bacterianas aisladas que forman un mismo clon, de modo que se puede testar si llevan el plásmido con el gen. Para comprobar si el proceso de transformación fue eficiente se plaquearon 5 μL de las bacterias con el plásmido pUC18 en placas de Agar-LB con resistencia a ampicilina. Se dejaron incubando durante 17 horas a 37°C.

Media hora antes de plaquear las bacterias, se añadió IPTG (100 μL a 10mM) y X-Gal (100 μL al 2%) a las placas de Agar-LB. La ampicilina sólo permite el crecimiento de las bacterias que presentan un gen de resistencia a este antibiótico. El IPTG y el X-Gal permiten que se diferencien las colonias bacterianas entre aquellas que tienen plásmidos con inserto, que serán blancas; o aquellas que tienen plásmidos sin inserto, que serán azules. Esto ocurre porque el fragmento de DNA se inserta en mitad del gen *LacZ*, truncando así su expresión. El IPTG es inductor de la expresión de *LacZ*, en presencia del sustrato X-Gal, cuyo producto de oxidación es de color azul. Por este motivo, una vez crecidas las bacterias, se seleccionaron colonias aisladas blancas.

Al día siguiente, se comprobó que en la placa control había aproximadamente 50 colonias (para el volumen de 5µL), tal y como aparece en el protocolo de la casa comercial. Como el resultado fue óptimo, se consideró que el proceso de transformación tuvo éxito. El siguiente paso necesario fue identificar qué colonias contienen el inserto de *Foxa1*. Se realizaron dos pasos paralelos: una PCR "colony" que determina si en una colonia particular está el DNA de interés, y una siembra en placa de Agar-LB con resistencia a ampicilina, para obtener mayor cantidad de los clones bacterianos que contenían el inserto. En primer lugar, se preparó la mezcla para la PCR y se repartió en los tubos (1 por colonia). Después, se seleccionaron colonias blancas bien aisladas y se pinchó, de una en una, con una punta desechable de pipeta que se agitó en uno de los tubos de PCR. Después, con esa misma punta se sembró en una sección bien dividida de la placa de Agar-LB. Se repitió el proceso con cada colonia para realizar la PCR en el termociclador, y después se incubó la placa de Agar-LB hasta el día siguiente (37°C).

La PCR "colony" se realiza con los cebadores M13 (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCAC -3'; 5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3', que hibridan con las secuencias M13 que flanquean el sitio de clonación del plásmido pGEM-T.

Reactivos	Volumen (µL)
Buffer PCR 5X	2.5
dNTP mix 10X	0.25
M13 F (10pmol)	0.5
M13 R (10pmol)	0.5
Taq Pol (Promega)	0.063
Agua (Sigma)	8.68

Tabla 3: Reacción para la PCR "colony"

Fases	Tiempo	Temperatura(°C)	
Desnaturalización inicial	5'	94	
Desnaturalización	30''	94	
Hibridación	1'	58	38X
Elongación	1'	72	
Elongación final	20'	72	
Mantenimiento		4	

Tabla 4: Programa del termociclador para la PCR "colony"

Al finalizar la PCR, se realiza la electroforesis pertinente en gel de agarosa al 1%, se fotografía el gel, y se comprueba qué clones contienen un fragmento de un tamaño susceptible de ser el inserto. Al día siguiente se cultivan las colonias que contienen el inserto, con la doble finalidad de conservar las bacterias a -80°C para acceder a este material genético, cuando se precise, y para aislar el DNA plasmídico y enviarlo a secuenciar, comprobando definitivamente la secuencia del inserto. El aislamiento del DNA plasmídico se realiza mediante el kit comercial para miniprep (Qiagen), que se basa en la lisis bacteriana y purificación del plásmido.

Para saber qué RNA Polimerasa es la adecuada para transcribir la secuencia en cada clon, hay que conocer la posición del inserto en el plásmido de los clones que se vayan a utilizar. Para ello se realizó una PCR de orientación, similar a la PCR "colony", con la particularidad de que en este caso se utiliza sólo uno de los

cebadores (M13F o M13R) para cada tubo de reacción. El cebador con el que se consigue amplificación indica la orientación del inserto.

2.5. Linealización

Para transcribir la ribosonda primero se debe obtener una molécula lineal a partir del DNA plasmídico circular. Este proceso se puede realizar mediante restricción enzimática o por medio de PCR. En este caso se realizó por PCR, utilizando cebadores específicos de las secuencias del bacteriófago M13, que flanquean el inserto más los sitios de reconocimiento de las enzimas necesarias para la síntesis de la ribosonda. Se utilizan 0.2 μ L del DNA diluido (1/100) resultado de la miniprep.

Después de la PCR se realizó una electroforesis para aislar las bandas con el lineal, y posteriormente se purificó en el kit de extracción de gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen).

2.6. Síntesis de la ribosonda

Consiste en una transcripción *in vitro*, cuyo producto es la molécula monocatenaria de RNA complementaria al RNA mensajero del gen que nos interesa, *Foxa1*. Para esta reacción se necesita, fundamentalmente, una RNA Polimerasa y el DNA lineal obtenido previamente. Es importante tener en cuenta la orientación del inserto en el vector plasmídico para sintetizar el RNA antisentido, que será el complementario del RNA mensajero que se quiere detectar. Consultando los resultados que se obtienen en la PCR de orientación del fragmento, se identifica qué RNA Polimerasa se debe emplear, en este caso la T7. Se prepara la mezcla de reacción y se incuba a 37°C durante dos horas. Después se puede testar si se ha sintetizado bien la ribosonda utilizando 1 μ L del

producto de la reacción y realizando una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, en el que se cargará también el lineal de DNA como control.

Reactivos	Volumen (μL)
Bufer transcripción (10X)	2
dNTPs-digoxigenina (10X)	2
Inhibidor RNAasa	0.5
RNA Polimerasa T7	2
cDNA (0.2-2 ng/μL)	-
Agua (Sigma)	Ajustar
	20 (vol. Final)

Tabla 5: Reacción de transcripción in vitro para la obtención de ribosondas

A continuación, se precipitó la ribosonda en cloruro de litio y etanol 100° a -20°C durante un mínimo de dos horas. Después se centrifugó (11.000 rpm, 4°C) durante 15 minutos, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 500 μL de etanol 70° frío. Se volvió a centrifugar, y de nuevo se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Una vez seco, se resuspendió en 30 μL de agua purificada (Sigma). Para su correcta preservación a -20°C se añadieron 30 μL de formamida desionizada.

2.7. Obtención de sondas previamente almacenadas

Se utilizaron otras sondas que ya estaban almacenadas previamente en bacterias transformadas, en glicerol y a -80°C. En estos casos, se realizó un cultivo

de dichas bacterias que contienen el plásmido con el gen que codifica para la sonda de interés. Primero se realizó un pre-cultivo picando en el tubo que contiene las bacterias con una punta de pipeta y depositándola en 7 ml de LB con ampicilina. Este pre-cultivo se incubó durante 2 horas a 37°C en agitación. Transcurrido este tiempo, y una vez comprobado que el medio está turbio, se añade este volumen a un matraz con 43 mL de LB+ Ampicilina, y se incuba durante toda la noche en las mismas condiciones previamente descritas. Este cultivo de mayor volumen se realiza con el fin de obtener suficiente cantidad de plásmido, que se aislará mediante midiprep (Qiagen). Una vez aislado el plásmido bacteriano se obtuvo el plásmido lineal, en este caso por enzimas de restricción (2 horas a 37°C). El motivo de utilizar enzimas de restricción fue el diverso origen de las sondas seleccionadas, en algunos casos procedentes de otros laboratorios, y en otros casos comerciales. Los plásmidos recombinantes eran diferentes, y resultó más sencillo utilizar las enzimas de restricción. En estos casos, después del protocolo de linealización por restricción, es necesario realizar un protocolo de purificación del lineal obtenido, para retirar restos de enzima y de búfer de restricción. Una vez purificado el lineal se sintetiza la sonda como se describió en el apartado anterior.

Reactivos	Volumen (µL)
Buffer restricción	5
Enzima de restricción	2
DNA (5 µL)	-
Agua (Sigma)	Ajustar
	50

Tabla 6: Reacción para la obtención de lineal mediante digestión enzimática.

Ribosonda	Enzima de restricción	RNA Polimerasa	Fuente
<i>Ebf3</i>	XhoI	T7	Sonia Garel lab.
<i>Efnb2</i>	SphI, SacII	SP6	Luis Puelles lab.
<i>Fezf2</i>	EcoRI/HindIII	T3	imaGenes
<i>Foxb1</i>	SphI/NcoI/SacII	SP6	Luis Puelles lab.
<i>Nr4a2</i>	SpeI, Sall, SacI, NsiI	T7	Luis Puelles lab.
<i>Sim1</i>	EcoRI	T7	Cheng Ming Fan lab.

Tabla 7: Información para la síntesis de ribosondas utilizadas

3. Hibridación *in situ*

Esta técnica sirve para detectar la expresión de un gen determinado en un tejido. Todas las ribosondas empleadas fueron sintetizadas con nucleótidos marcados con digoxigenina. El fundamento consiste en la hibridación de la ribosonda complementaria con el RNA mensajero, que posteriormente será detectada con un anticuerpo selectivo para la digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina. La señal azul que revela la presencia del anticuerpo y la sonda, y por tanto del RNA mensajero en el tejido, se produce mediante una reacción enzimática en presencia de la fosfatasa alcalina y de sus sustratos NBT/BCIP (Roche).

La hibridación *in situ* se realizó en cortes flotantes de 100 µm de grosor, contenidos en una placa de seis pocillos. El primer día se comenzó permeabilizando el tejido con varios lavados de PBT de 10 minutos de duración. A continuación, se realizó un lavado intermedio en PBT-Búfer de hibridación (1:1), y después el paso de pre-hibridación, consistente en la incubación del tejido con búfer de hibridación en un baño a 60°C. La placa con el tejido se colocó sobre

una gradilla, sin contacto directo con el agua del baño. Este paso de pre-hibridación ha de durar un mínimo de una hora. Después se realizó la hibridación, incubando el tejido con la ribosonda diluida en búfer de hibridación nuevo durante toda la noche en el baño a 60 °C.

El segundo día, tras el reciclado de la sonda, se realizan dos lavados con el búfer 1 (30 minutos cada uno, 60°C), y a continuación dos lavados con el búfer 2 (30 minutos cada uno, 60°C), de diferentes concentraciones salinas. Después se lavó con MABT (10 minutos), y a continuación, se realizó un paso de bloqueo (1 *Boehringer blocking reagent: 2 Sheep serum*), para disminuir la probabilidad de uniones inespecíficas del anticuerpo anti-digoxigenina. Para finalizar el segundo día de reacción, se añadió el anticuerpo diluido en solución de bloqueo y se dejó incubando durante toda la noche.

El tercer día comienza con cinco lavados de MABT de 30 minutos de duración, cada uno. Después se incubó durante 20 minutos con la solución NTMT en la que se va a producir la reacción coloreada, en este caso sin los sustratos NBT/BCIP. A continuación, se cambió la solución añadiendo NTMT con NBT/BCIP y se dejó revelar, revisando frecuentemente, y teniendo en cuenta que puede tardar varias horas.

Una vez finalizada la reacción se lavó el tejido varias veces con PBS, se ordenaron los cortes y se montaron en portaobjetos. Tras su secado, se deshidrataron en sucesivos pasos de etanol (70, 90, 100) y xilol, y finalmente se montaron con cubreobjetos y medio de montaje Eukitt.

4. Técnicas de inmunodetección

Detectan proteínas concretas mediante anticuerpos específicos, pudiendo identificar así las células, o poblaciones celulares, que expresan una proteína particular

4.1. Inmunohistoquímica

Se utilizaron anticuerpos primarios policlonales, capaces de unirse a varios epítopos de un antígeno particular (la proteína que se va a detectar). Los anticuerpos secundarios, que se unen al primario, estaban conjugados con biotina. Cada molécula de biotina tiene la capacidad de unir cuatro moléculas de avidina. Se aprovecha esta capacidad para amplificar la señal. El complejo avidina-streptavidina (Complejo ABC, Vectastain) que contiene la peroxidasa de rábano, se une al anticuerpo secundario. La peroxidasa de rábano en presencia de agua oxigenada y diaminobencidina (DAB) provoca una reacción coloreada marrón en aquellas poblaciones que contienen los anticuerpos y, por tanto, la proteína que se desea detectar.

El protocolo de inmunohistoquímica que se siguió se completó en dos días, en cortes flotantes de cerebro de 100 μm de grosor. Habitualmente, después de haber sido procesados con la técnica de hibridación *in situ*. El primer día se realizaron tres lavados con PBT en agitación. Después, para inhibir a la peroxidasa endógena del embrión, se incubaron los cortes con H_2O_2 al 0.3% en PBS en oscuridad (placa cubierta con papel de aluminio) durante 15 minutos. A continuación, se lavaron los cortes, al menos tres veces, con PBT (10 minutos). Posteriormente, se realizó el paso de bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PBT. Por último, se añadió el anticuerpo primario a la concentración indicada por el fabricante, y se deja incubando a 4°C durante 24 o 48 horas.

El segundo día se realizaron varios lavados en PBT de 10 minutos cada uno, tras reciclar el anticuerpo primario. Después, se incubó el tejido con un anticuerpo secundario biotinilado, y apropiado para el anticuerpo primario que se había utilizado. Por ejemplo, si se utilizó un anticuerpo anti-Foxa1 desarrollado en conejo, se utilizó un anticuerpo anti-conejo desarrollado en cabra. Los anticuerpos secundarios se utilizaron a la concentración de 1:200. El tejido se incubó con el anticuerpo secundario durante dos horas. Tras este periodo se realizan varios lavados con PBT, después de los cuales se incubó el tejido con el complejo ABC (Vectastain, 1/350 en PBT), previamente enfriado a 4°C, durante 1 hora y 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavó el tejido sucesivas veces con PBT y después con Tris-HCl pH 7.5 0.05 M (x3 10 minutos). Después se cambió por medio de revelado (0.01DAB en 1 ml de Tris-HCl, 2 ml en cada pocillo de la placa) y se incubó durante 20 minutos en agitación. Para revelar el anticuerpo, se añadieron 4 µL de H₂O₂ al 0.3% en agua filtrada, y se permitió que se produjera la reacción en agitación y en oscuridad. El anticuerpo se revela durante la primera media hora tras la reacción, revisándose varias veces en la lupa en este intervalo. Después se lavaron los cortes varias veces con Tris-HCl. Se ordenaron, cortaron, y montaron de la misma manera que los cortes a los que se les realizó hibridación *in situ*.

4.2. Inmunofluorescencia

Se detectan proteínas de interés, en células o poblaciones celulares, mediante un anticuerpo secundario con un fluorocromo conjugado, que emite a una longitud de onda particular. Esta característica permite detectar co-localización de señales en la misma célula. Por este motivo, esta técnica se realizó sobre cultivos organotípicos, o como doble inmunofluorescencia, para detectar varias señales simultáneamente. Se realizó sobre los explantes enteros previamente fijados (apartado 5) o sobre cortes de 50 µm de grosor, de cerebros

previamente extraídos y fijados. Se utilizaron los mismos anticuerpos primarios policlonales que en la inmunohistoquímica clásica, revelada en Tris-HCl-DAB.

Anticuerpos primarios	Fuente
Rabbit anti Foxa1 (1:200)	ab23738, Abcam
Goat anti Nr4a2 (1:200)	AF2156, RyD Systems
Rabbit anti Otp (1:50)	Antonio Simeone lab.
Anticuerpos secundarios (1:200)	Fuente
Biotinylated goat anti rabbit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Donkey anti-goat Alexa 594	Thermo Fisher Scientific
Donkey anti-rabbit Alexa 488	Thermo Fisher Scientific
Donkey anti rabbit Alexa 647	Thermo Fisher Scientific

Tabla 8: Lista de los anticuerpos primarios y secundarios y concentración a la que se usaron.

5. Cultivos organotípicos y su marcaje

5.1. Mantenimiento de cultivos organotípicos *in vitro*

Con el fin de visualizar la hipotética corriente migratoria tangencial, se realizó una aproximación experimental *in vitro*, que consistió en el marcaje fluorescente de explantes del tubo neural obtenidos en los días E11.5, E12.5 y E13.5, intervalo en el que debería ocurrir la postulada migración tangencial.

Los embriones se extrajeron rápidamente y se decapitaron en medio ACSF a pH 7.4 (4 mM KCl, 1.5 CaCl₂, 0.75 mM MgCl₂, 129 mM NaCl), manteniéndose las cabezas en este mismo medio enfriado en hielo, durante el todo el periodo de procesamiento. Tras liberar completamente el cerebro de la piel y las

meninges, se descartaron las vesículas telencefálicas, y se separaron ambas mitades del tubo neural por la línea media. Cuidadosamente, con ayuda de una pipeta estéril de plástico ancha, los explantes se depositaron en insertos de cultivo con una membrana de 0,4 μ M de poro (Millicell Millipore, PICM0RG50) con la parte superficial del cerebro en contacto con la membrana y la parte ventricular en contacto con el aire. Los insertos con los explantes se depositaron en placas de Petri pequeñas e individuales a las que se les añadió un mililitro de medio de cultivo MEM suplementado (1% PenStrep, 0.065% glucosa, 0.5% glutamina, y 1% de suero bovino fetal con el complemento inactivado por temperatura). De esta forma, el explante quedaba fijo en la membrana, permitiendo el intercambio de oxígeno por su parte superior, y de nutrientes del medio de cultivo por su parte inferior. Después de una hora de aclimatación en un incubador (37°C, 5% CO₂), se realizó el marcaje de los explantes en la zona de interés, y se cambió el medio MEM por Neurobasal suplementado (1% PenStrep, 0.065% glucosa, 0.5% glutamina, y 1% de suplemento B27. Los cultivos organotípicos estuvieron en incubación durante 48 horas (37°C, 5% CO₂).

Para realizar el marcaje de los explantes, se utilizó el marcador fluorescente CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetato; ThermoFisher, C2925) que emite en el rango de la fluoresceína (verde). Este trazador presenta dos ventajas a la hora de estudiar migraciones neuronales. La primera es que, puesto que se trata de un marcador hidrofílico, no marca conexiones neuronales como sí ocurre con el Dil (carbocianina lipofílica). El CMFDA se internaliza en el citoplasma de las células vivas sin marcar conexiones neuronales y permitiendo así una visión más clara de las células en movimiento. La segunda ventaja consiste en la posibilidad de realizar inmunofluorescencia sobre el marcaje con CMFDA, sin perder su señal. Esto no es posible con el trazador Dil, que se pierde con los lavados de PBT, necesarios para permeabilizar el tejido durante la inmunohistoquímica. El CMFDA se preparó sobre partículas de tungsteno (BioRad,#165229) como se describe en Alifragis, 2002.

Después del periodo de incubación de 48 horas, los explantes se fijaron con PF al 4% en PBS durante 10 minutos (4°C). Después se lavaron y mantuvieron en PBS para, posteriormente, realizar una inmunofluorescencia simple o doble que permitiese identificar las células migradas.

5.2. Mapa de marcaje en cultivos organotípicos

Para colocar de manera coherente una partícula de tungsteno con CMFDA en todos los especímenes, diseñamos un mapa arbitrario del área RM. En primer lugar, se dividió este área aproximadamente en sus mitades dorsal y ventral. Tras analizar los primeros resultados experimentales, se observó escasa migración desde la parte ventral, y más actividad en la parte dorsal. Por lo tanto, para acotar la microzona donde existe más actividad migratoria se dividió la mitad dorsal de RM en tres partes "ventrodorsales" adicionales. Estas particiones ventrodorsales se identificaron numéricamente: 4 (la mitad ventral del área RM), 3,2,1 constituyen la mitad dorsal, en la que 3 es la parte más cercana a la mitad ventral y 1 es la parte más dorsal, en contacto con la banda PRM. 2 es la parte que se sitúa entre la zona 3 y la 1. Además, se realizaron divisiones rostrocaudales del territorio que se designaron con las letras: C (caudal), M (intermedio, del inglés "*middle*") y R (rostral). Los casos se clasificaron según las coordenadas de su marcaje. Por ejemplo, si se había marcado rostralmente en la subdivisión más dorsal del mapa, se denominó "1R".

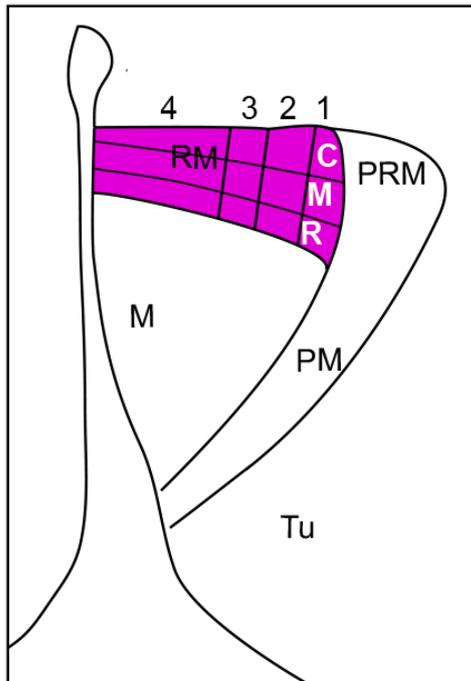


Figura 6. Esquema diseñado para los marcajes de cultivos organotípicos. Se representan las estructuras que componen la parte ventral del hipotálamo basal: Tu (tuberal), PM (perimamilar), PRM (perirretromamilar), M (mamilar) y RM (retromamilar en morado). El área RM se divide ventrodorsalmente en las partes 4, 3, 2, 1. Nótese que la parte 4 corresponde a la mitad ventral del área RM y 3,2,1 a la mitad dorsal. La división en tres partes adicionales fue una modificación posterior, debido a la mayor tasa de éxito al realizar el marcaje en esta mitad dorsal. Además, se realizó una división caudo-rostral del territorio RM, que se identifica con las letras blancas: C (caudal), M (intermedio, del inglés "middle") y R (rostral).

6. Procesamiento y análisis de imagen

Se escanearon los portaobjetos con los cortes de ISH o ISH/IHQ para obtener imágenes de alta resolución con el software Aperio ImageScope (Leica Biosystems). Las imágenes de IF en material previamente fijado, o cultivos organotípicos se obtuvieron con un microscopio confocal Leica SP8, de manera secuencial cada $3\mu\text{m}$ (Z). Las planchas se construyeron con los softwares Adobe Photoshop y Adobe Illustrator.

RESULTADOS

1. Búsqueda preliminar de marcadores del núcleo VPM

Se realizó una búsqueda preliminar de marcadores del núcleo VPM con la herramienta AGEA del Allen Developing Mouse Brain Atlas (<https://developingmouse.brain-map.org>), en los días de desarrollo E13.5, E15.5, E18.5 y P14. De los 22 genes seleccionados (Tabla 9), 14 se expresan en el área RM durante E13.5 y 16 durante E15.5. Otros genes que no se expresan en el área RM (*Ar*, *Foxp1*, *LepR*, *Tac1*) marcan tardíamente el VPM.

Además, se analizó la expresión en el núcleo subtalámico (STh) y en el núcleo premamilar dorsal (DPM). Genes como *Foxa1*, *Lmx1a*, *Lmx1b* y *Pbx3* son marcadores tanto del núcleo VPM, como del complejo nuclear STh. El gen *Nr4a2* es marcador de los núcleos VPM y DPM, pero no del complejo STh. Los marcadores *Bcl11a* y *Grik2* son comunes a todas estas estructuras.

Se seleccionaron los genes *Foxa1* y *Nr4a2* para realizar un análisis descriptivo detallado del área RM y del núcleo VPM. Ambos marcadores tienen en común su expresión tanto en el área RM como en el núcleo VPM, pero difieren en su expresión en el núcleo STh (positivo para *Foxa1* y negativo para *Nr4a2*) y en el núcleo DPM (positivo para *Nr4a2* y negativo para *Foxa1*).

Gene	RM				VPM			STh			DPM		
	E13.5	E15.5	E18.5	P14									
<i>Alcam</i>	X	X	X	X	X	X	X						
<i>Ar</i>							X						X
<i>Bcl11a</i>	X	X	X		X	X		X	X		X	X	
<i>Calb2</i>	X	X	X	X		X	X		X	X		X	X
<i>Foxa1</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
<i>Foxp1</i>						X			X			X	
<i>Foxp2</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
<i>Grik2</i>	X	X	X		X	X			X		X	X	
<i>Irs4</i>					X	X	X						
<i>Irx1</i>	X	X			X	X	X						
<i>Irx3</i>	X	X			X	X	X						
<i>Irx5</i>	X	X			X	X	X						
<i>LepR</i>							X						
<i>Lmx1a</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
<i>Lmx1b</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
<i>Nos1</i>		X	X	X	X	X	X			X			X
<i>Nr4a2</i>	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
<i>Pbx3</i>	X	X	X		X	X	X		X	X			
<i>Pknox2</i>	X	X	X			X						X	
<i>Satb1</i>		X	X	X	X	X	X						
<i>Slc6a3</i>							X						
<i>Tac1</i>						X	X		X	X			X

Tabla 9. Marcadores del núcleo VPM seleccionados del Allen Developing Mouse Brain Atlas.

Se analizó la expresión de estos marcadores en RM en los días E13.5, E15.5, E18.5 y P14. También se analizó la expresión en VPM, el núcleo subtalámico y el núcleo DPM a partir de su formación, en E15.5, E18.5 y P4.

2. Análisis descriptivo del área RM y del núcleo VPM

2.1. Marcadores retromamilares y su expresión diferencial en los núcleos VPM y/o STh

Para ilustrar algunos de los patrones de expresión encontrados en la búsqueda preliminar, se seleccionaron imágenes de ISH del *Allen Developing Mouse Brain Atlas* en los días E13.5 y E18.5.

Lmx1a aparece fuertemente expresado en E13.5 en toda la extensión del área RM. Secciones mediales en plano sagital muestran señal en el área ventricular, posiblemente en los niveles de suelo y placa basal (Fig.7A). La incipiente posible corriente migratoria ventral premamilar (será denominada VPMms, por el inglés "migratory stream") aparece en secciones laterales en la zona del manto (Fig.7B). En E18.5 permanece marcada el área RM, así como los dos núcleos VPM y STh, que se sitúan a distintos niveles medio-laterales, siendo el último más superficial que el primero. El núcleo parasubtalámico (PSTh), también aparece marcado con *Lmx1a*. Se trata de otro posible derivado del área RM que se sitúa más rostral que el núcleo STh en el dominio RTu (Fig.7C,D).

El patrón de *Foxa1* es similar al de *Lmx1a* (RM, VPM, STh, PSTh; Fig.7E-H). Los transcritos del primero, también están presentes en la capa ventricular del suelo y basal. Lateralmente, esta población RM *Foxa1* se encuentra ventral al tracto mamilotegmental (mtg), siendo negativa la parte dorsal de este dominio en comparación con los otros marcadores (comparar Fig.7F con Fig.7B,J,N,R). Tanto las poblaciones STh/PSTh, como el núcleo ventral son positivos para este marcador (Fig.7G,H)

La señal de *Nr4a2* se extiende en las placas del suelo y basal de RM en E13.5 (Fig.7I,J). A nivel lateral se observa, similar a como ocurría con el gen *Lmx1a*, el posible inicio de la VPMms (Fig.7J). En E18.5 *Nr4a2* se expresa selectivamente

en el núcleo VPM, siendo el complejo STh/PSTh negativo para este marcador (Fig.7K,L).

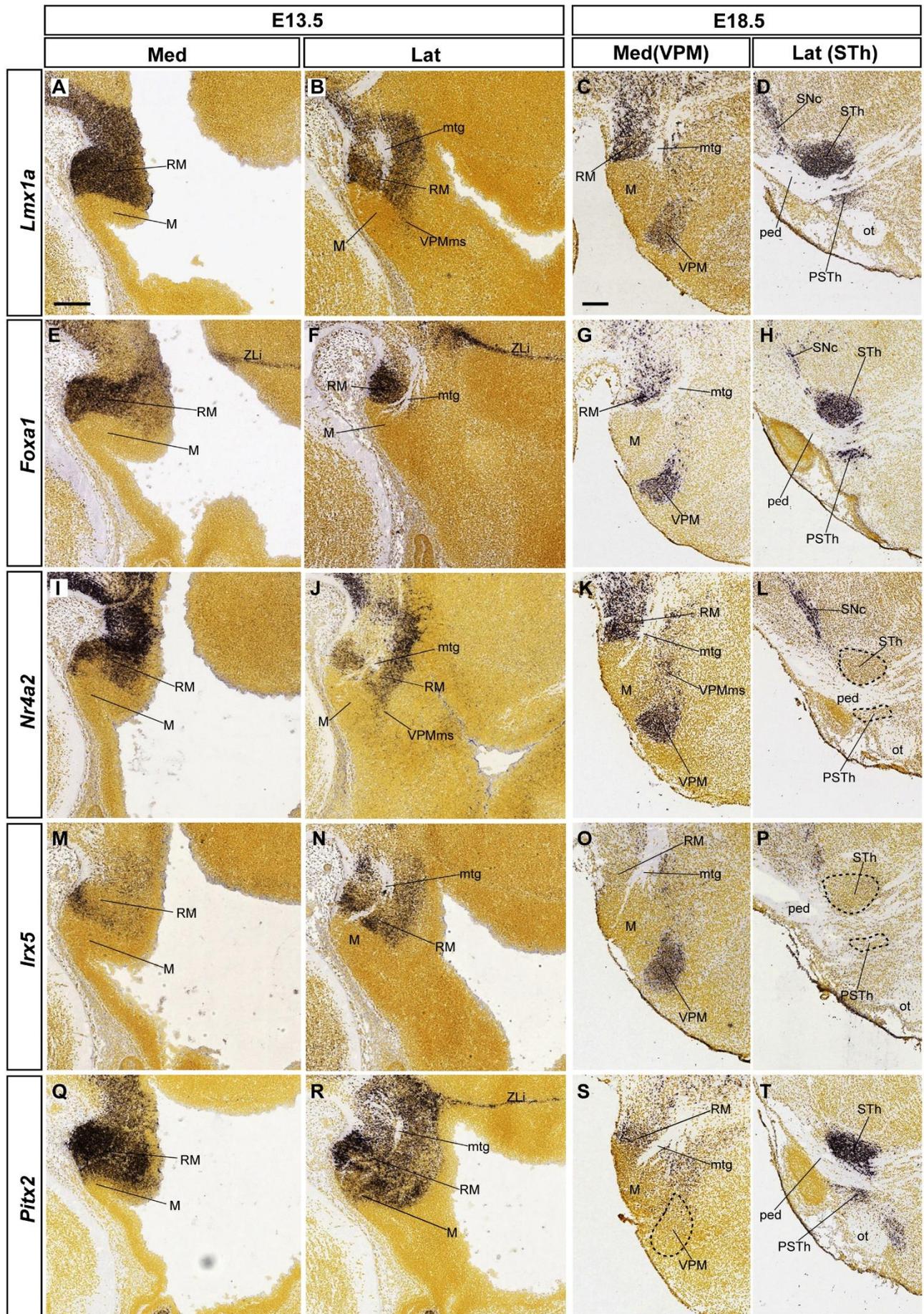
El gen *Irx5* marca una subpoblación escasa en la parcela rostral del área RM a nivel medial (Fig.7M). En secciones más laterales aparece ampliamente, bordeando ventral y dorsalmente el tracto mamilotegmental (Fig.7N). Este gen, como *Nr4a2*, marca VPM, pero excluye las poblaciones STh y PSTh (Fig.7O,P)

Finalmente, los transcritos de *Pitx2* son abundantes en el área RM en E13.5. Esta expresión invade la región M más próxima a RM, mostrando continuidad medio-lateral en este día del desarrollo (Fig.7Q,R). Curiosamente, en E18.5, este gen, que continúa expresándose en el área RM, no revela el núcleo VPM, pero sí da señal en el complejo STh/PSTh (Fig.7S,T).

Estos patrones revelan que el área RM puede estar compuesta por varias subpoblaciones.



Figura 7: Varios marcadores retromamilares y su participación diferencial en migraciones tangenciales. Los cinco marcadores génicos indicados se expresan, al menos parcialmente en el área RM en E13.5 (secciones sagitales medio-laterales en **A, B; E, F; I, J; M, N; Q, R**; imágenes del *Allen Developing Mouse Brain Atlas*). Se comparan con secciones medio-laterales equivalentes en E18.5 (**C, D; G, H; K, L; O, P; S, T**) que muestran tres tipos de resultados de marcaje en cuanto al núcleo VPM, y al complejo STh y PSTh, migrados desde el área RM. *Lmx1a* y *Foxa1* marcan todas estas estructuras (VPM, STh/PSTh en **C, D; G, H**); *Nr4a2* o *Irx5* sólo marcan el VPM (**K, L; O, P**); *Pitx2* sólo marca los núcleos STh/PSTh (**S, T**). Las barras de escala equivalen a 200 μ m.



2.2. Posición del núcleo VPM, el área RM y su puente de unión en el hipotálamo basal.

Se seleccionaron marcadores de las estructuras vecinas al área RM y al núcleo VPM para conocer con precisión su disposición en el hipotálamo basal al final de su desarrollo embrionario. Estos genes seleccionados fueron: *Ebf3*, *Fezf2*, *Foxb1*, *Nkx2.1* y *Sim1*. Además, se analizaron postnatalmente los genes *Hdc*, selectivo de las neuronas histaminérgicas del dominio longitudinal TuV/RTuV y *Gad2*, marcador de neuronas GABAérgicas en la región TuI/RTuI.

En E18.5 *Nr4a2* se expresa en el área RM y en los núcleos VPM y DPM (Fig.8A,B). Ambos quedan conectados con el área RM por medio de un "puente" de células *Nr4a2* positivas, sugiriendo que se producen migraciones tangenciales para formar estas estructuras.

La señal de *Nkx2.1* marca el manto de la placa basal hipotalámica, con excepción de RM, VPM y su puente de unión. La porción de PM ocupada por DPM, posiblemente migrado, presenta una señal considerablemente más baja (Fig.8C, D).

Ebf3 se expresa en la banda PM, así como en parte del área RM y PRM. Algunas células *Ebf3* quedan solapando con las propias del puente de conexión entre RM y VPM, en el lugar donde éste atraviesa la banda PM (Fig.8E). *Fezf2* es marcador selectivo del núcleo DPM. Esta estructura se sitúa justamente ventral al núcleo VPM, formándose en el área que ocupa la banda PM y solapando parcialmente con la porción dorsal del cuerpo mamilar (Fig.8F).

Foxb1 es un marcador selectivo del área M. En la zona donde se localiza el núcleo DPM, la señal *Foxb1* disminuye su intensidad (Fig.8G). *Sim1* se expresa tanto en el área M, como en el dominio PRM-PM, incluyendo el núcleo DPM. Estos dos marcadores están ausentes tanto de RM como de VPM (Fig.8H). En

contraste, *Nr4a2*, *Foxa1*, y también otros como *Irx5* y *Lmx1a* marcan RM y VPM, y dejan negativas las áreas M, PM y PRM.

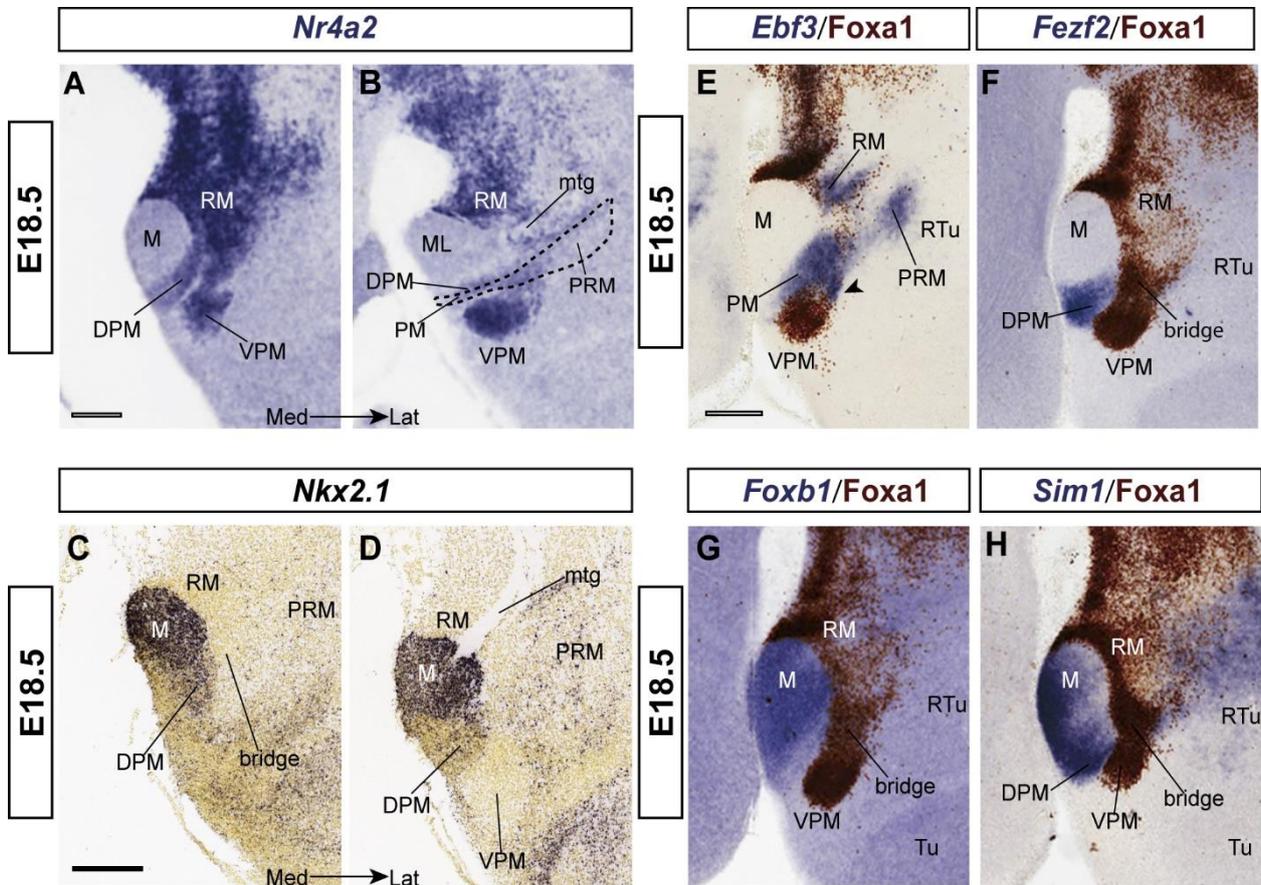


Figura 8. Marcaje de algunas estructuras vecinas próximas a RM y VPM en E18.5. (A, B) Dos secciones sagitales medio-laterales mostrando el núcleo DPM ventral al VPM; esta pequeña población también parece realizar una migración tangencial desde la zona RM (A) al área PM (contorno discontinuo en B); donde también se observa cierto marcaje de baja intensidad con el factor de transcripción *Nr4a2*. (C, D) Dos secciones sagitales medio-laterales de imágenes de ISH de *Nkx2.1* extraídas del *Allen Developing Mouse Brain Atlas*. Se trata de un gen que marca ampliamente la placa basal hipotalámica, con excepción del área RM (C, D), también deja sin marcaje el puente RM-VPM (C), y el núcleo VPM (D). (E-H) Imágenes seleccionadas de ISH con los marcadores *Ebf3*, *Fezf2*, *Foxb1* y *Sim1* combinadas con inmunorreacción del anticuerpo *Foxa1*, muestran el contraste entre la región RM, VPM y su puente con la región mamilar (M en G, H),

perimamilar/perirretromamilar (PM/PRM en **E**), y la señal DPM (en **F, H**). Las barras de escala equivalen a 200 μm .

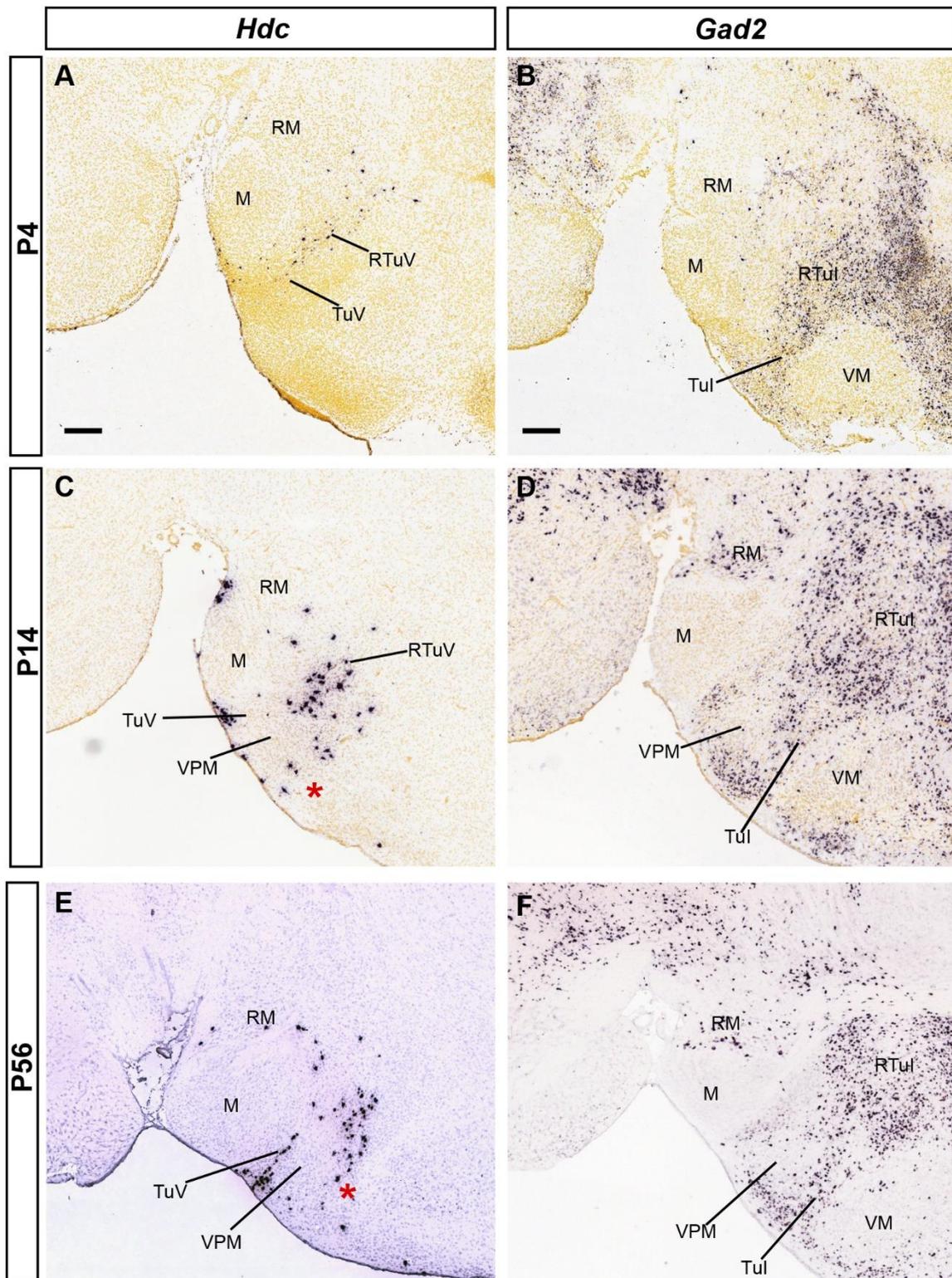
Hdc es un gen de expresión tardía en el desarrollo, cuyos transcritos se visualizan en TuV/RTuV, dominio caracterizado por la presencia de neuronas histaminérgicas (Fig.9A). Paralelamente, *Gad2* se expresa en Tul/RTul, dejando negativo el dominio TuV/RTuV (Fig.9B). En estadios posteriores, las neuronas histaminérgicas aparecen más dispersas, probablemente debido a fenómenos de migración (asterisco rojo en Fig.9C,E). El contorno negativo del núcleo VPM se distingue con ambos marcadores *Hdc* y *Gad2* (Fig.9C-F), siendo sugestivo de que se trata de una población no autóctona, localizada en el área de transición entre las áreas TuV-Tul.



Figura 9: Posición relativa del núcleo VPM con respecto de las poblaciones *Hdc* y *Gad2*.

Secciones sagitales en estadios postnatales tomadas del *Allen Developing Mouse Brain Atlas*.

(**A,C,E**) Secciones con reacción de ISH con la sonda *Hdc*, marcadora de las neuronas histaminérgicas en el dominio TuV/RTuV. Se puede ver el contorno del núcleo VPM entre este dominio. Los asteriscos rojos en **C,E** indican la dispersión local de las neuronas *Hdc*. (**B,D,E**) Secciones con reacción de ISH con la sonda *Gad2*, marcadora de neuronas GABAérgicas del dominio Tul/RTul. Se pueden apreciar los contornos negativos de los núcleos VPM y VM. Las barras de escala representan 200 μm .



2.3. Distribución heterogénea de Foxa1 y Nr4a2 durante el desarrollo del VPM

Con el objetivo de seguir las etapas principales en el desarrollo del núcleo VPM, se realizaron hibridaciones *in situ* e inmunofluorescencias con los marcadores seleccionados, *Foxa1* y *Nr4a2*, en cerebros de embriones entre los días E12.5 y E18.5 del desarrollo. En algún caso, combinando con el marcador *Otp* de la región adyacente PRM/PM.

El primordio mamilar es claramente negativo para ambos marcadores en los días E12.5/E13.5 (Figs.10A-D,J,L,O,P; 11A-D). *Nr4a2* se expresa fuertemente en la placa basal meso-diencefálica y en el área RM hipotalámica. El primordio del núcleo VPM no es identificable aún en estos días del desarrollo (Fig.10A-D,I-K). Sin embargo, la corriente migratoria del VPM (VPMms) se observa de manera incipiente medio-lateralmente a E12.5, y comienza a cruzar el dominio PM a E13.5 (Figs.10B-D,J,K; 11D; 12). *Foxa1* se transcribe a lo largo de toda la extensión radial del área RM (ventrículo, manto y superficie), mientras que la extensión de *Nr4a2* queda restringida a la capa del manto. El gen *Foxa1* se expresa principalmente en la parte ventral, tanto del área RM, como de la VPMms (Fig.10O,P). Existe una zona intermedia en el área RM donde hay solapamiento (células amarillas; cabezas de flecha blancas en Fig.11C) de los dos marcadores, *Foxa1* y *Nr4a2*.

Como previamente se mencionó, las áreas M y RM están dorsalmente delimitadas por un dominio longitudinal molecularmente distinto, definido como perimamilar/ perirretromamilar (PM/PRM). Esta banda expresa selectivamente el gen *Otp*. En E13.5, se observa a la VPMms a través de este dominio por su parte terminal estrecha, PM. Este cruce se visualiza con los dos marcadores, *Foxa1* y *Nr4a2* (Fig.12).

En secciones parasagittales laterales se observa, desde E13.5, una extensión subpial dorsal de células *Foxa1*-positivas desde el área RM. Se trata de la corriente

migratoria conocida de los núcleos subtalámico (STh) y parasubtalámico (PSTh), cuyo curso queda restringido caudalmente en PHy, finalizando en el área retrotuberal (RTu) (Comparar Fig.7F con 7J, y Fig.7H con 7L). Esta corriente migratoria queda completamente separada de la VPMms (Figs.11I,J; 13A,B). Como se comentó previamente, las células Nr4a2 no participan en esta corriente migratoria de los núcleos STh/PSTh.

En este mismo día del desarrollo, E13.5, se observa ventral a la VPMms, una corriente de células *Nr4a2*, que podría corresponder a las células que formarán el núcleo DPM. Esta corriente diverge de la VPMms en THy (Fig.10K). Ambas estructuras son fácilmente diferenciables; la VPMms sobrepasa el dominio PM hasta alcanzar Tul, mientras que la corriente *Nr4a2* invade el área PM, sin alcanzar el dominio TuV o Tul.

En E14.5, continúa el patrón RM marcadamente dividido en una zona ventral con mayoría de células *Foxa1* (verde), y otra dorsal con mayor proporción de células *Nr4a2* (magenta) (Fig.11E,F). Estos subdominios retromamilares están conectados por una banda estrecha de células que posiblemente contienen ambos factores de transcripción (cabezas de flecha blancas señalando población amarilla, *Foxa1-Nr4a2* positiva en la Fig.11E). En este día del desarrollo, la VPMms se extiende rostralmente de manera oblicua hacia la región tuberal. En este momento, el primordio nuclear VPM comienza a emerger (Figs.10E,F,L,M,Q; 11F), identificando estos mismos tres tipos celulares: *Foxa1* en la zona ventro-lateral, y células *Foxa1-Nr4a2* en la parte central del núcleo, donde también hay células dispersas *Nr4a2* positivas (Fig.11F,F'.F''.F'''.F''''). La VPMms diverge lateralmente hasta encontrarse cerca del límite del dominio local acroterminal (infundíbulo y área rostromedial tuberomamilar), quedando posicionado en el dominio TuV-Tul (Fig.10L,M).

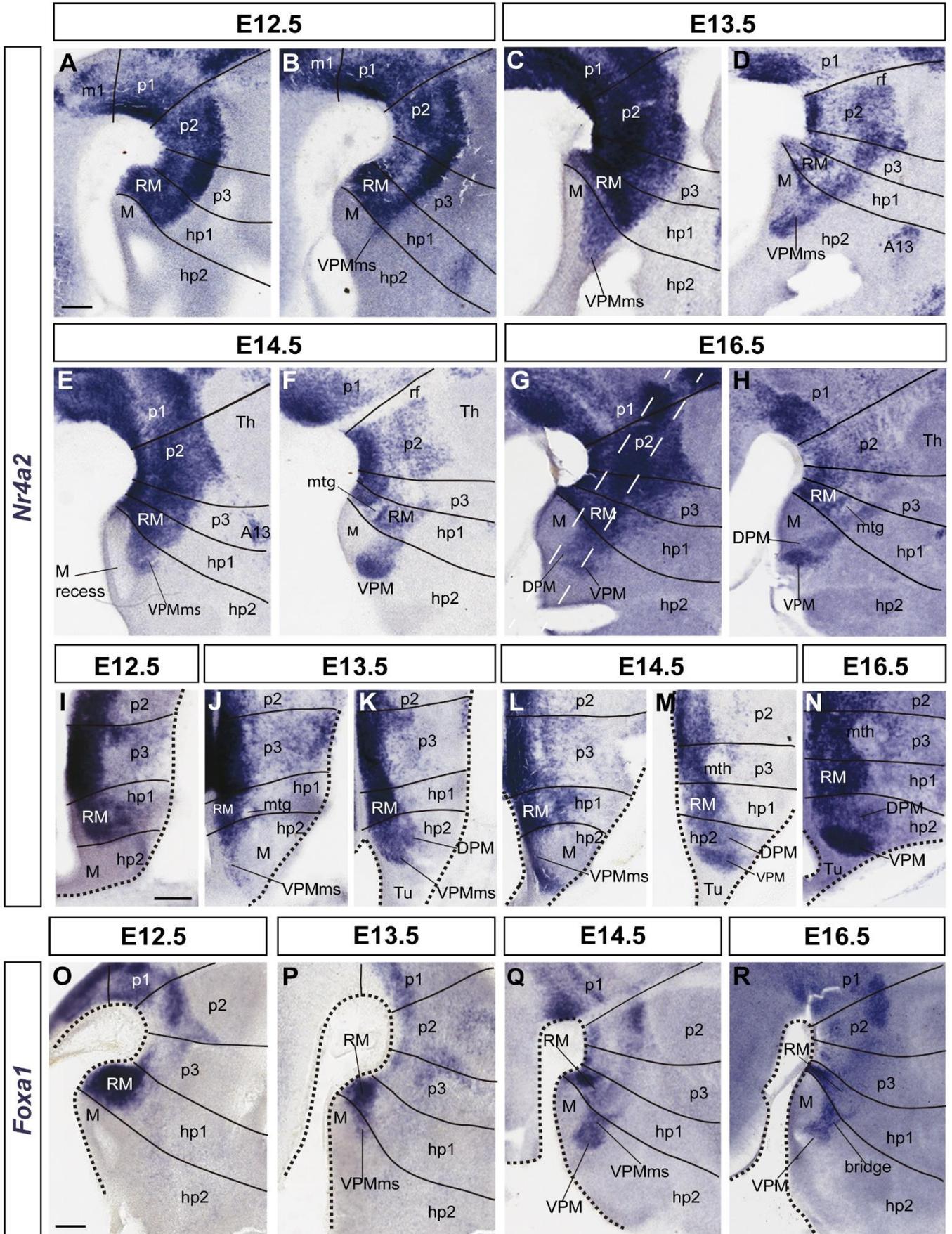
El primordio subyacente DPM (*Nr4a2* positivo) que se forma en la banda PM, muestra mayor intensidad de expresión *Nr4a2* en E14.5 que en días embrionarios previos (Fig.10M).

En E16.5, la VPMms disminuye en densidad, y tanto VPM como DPM están localizados en sus posiciones definitivas de THy (en TuV-TuI y PM, respectivamente; Fig.10G,H,N). Sin embargo, persiste un puente de conexión de ambos núcleos con el área RM, que continúa presente más tarde (Figs.10G,H,N;11G,I,J,K;13B). Este puente es visible postnatalmente con el gen *Irs4* para el caso de VPM (Fig.11K).

En E18.5 continúa la distribución heterogénea de células *Foxa1* y *Nr4a2* tanto en el área RM, como en el VPM. Las células *Foxa1* están densamente agrupadas ventralmente, mientras que las células *Nr4a2* se encuentran agrupadas dorsalmente, definiendo el borde dorsal de RM (Fig.11G) El puente de conexión RM-VPM, que permanece en E18.5, queda constituido mayoritariamente por células *Foxa1*. La población *Foxa1* predomina particularmente en la parte más lateral del núcleo VPM, alcanzando el estrato superficial (VPMlat en Fig.11I,I',J,J'). Ambos tipos celulares, *Foxa1* y *Nr4a2*, así como células *Foxa1-Nr4a2*, se encuentran poblando densamente la parte central, o core del VPM (VPMc en Fig.11H,H',J,J').

Figura 10. Detalles de la evolución de la VPMms y la formación del núcleo VPM durante el desarrollo embrionario. (A-H) Secciones sagitales de hibridación *in situ* con la sonda *Nr4a2* entre E12.5 y E16.5. (I-N) Secciones horizontales de hibridación *in situ* con la sonda *Nr4a2* entre E12.5 y E16.5. (O-R) Secciones sagitales de hibridación *in situ* con la sonda *Foxa1* entre E12.5 y E16.5. Las líneas negras en todas las imágenes marcan los límites interprosoméricos hipotalámico, diencefálico, y rostral mesencefálico (hp2, hp1, p3, p2, p1, m1), perpendiculares a las referencias longitudinales, aquí en la placa del suelo (comparar con la Fig.1B). En A-H cada día embrionario se representa en dos secciones sagitales, siendo la primera de nivel más medial que la segunda. Los planos de las secciones horizontales (particularmente J, M) se indican con líneas discontinuas

en **G**. Cada par de secciones horizontales de un mismo día embrionario contienen una sección ventral, cruzando el área mamilar (**J, L**) seguida de una sección dorsal, a través de la VPMms (**K, M**). (**O-R**) Las secciones sagitales marcadas con *Foxa1* revelan su predominancia en la parte ventral de RM (comparando con la señal *Nr4a2* en **A-H**). Las barras de escala equivalen a 200 μ m.



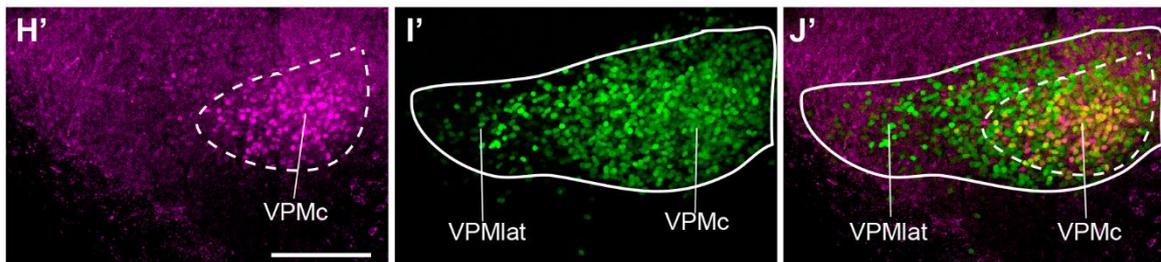
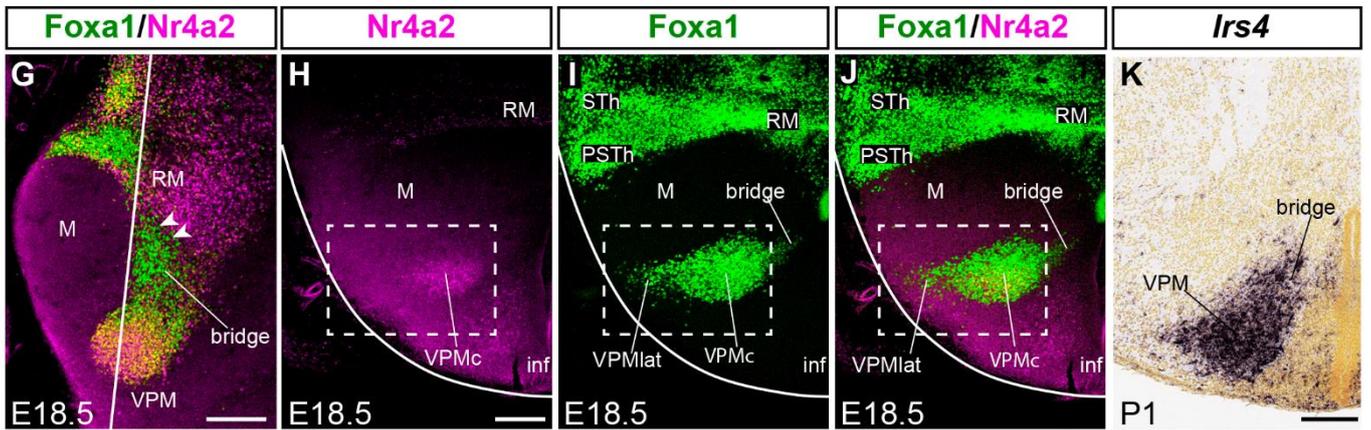
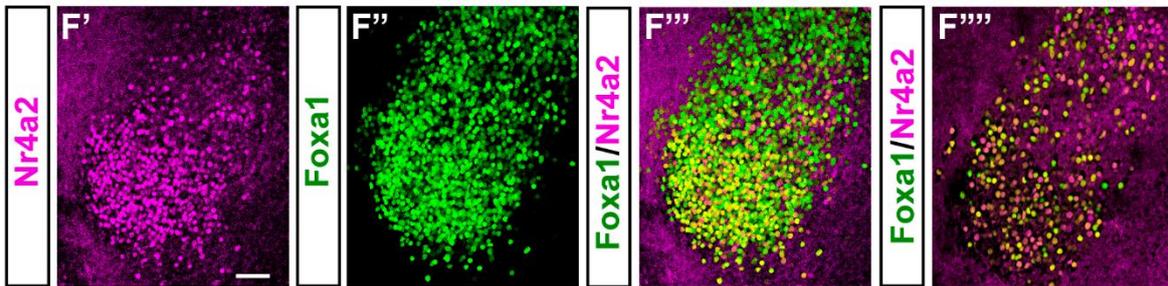
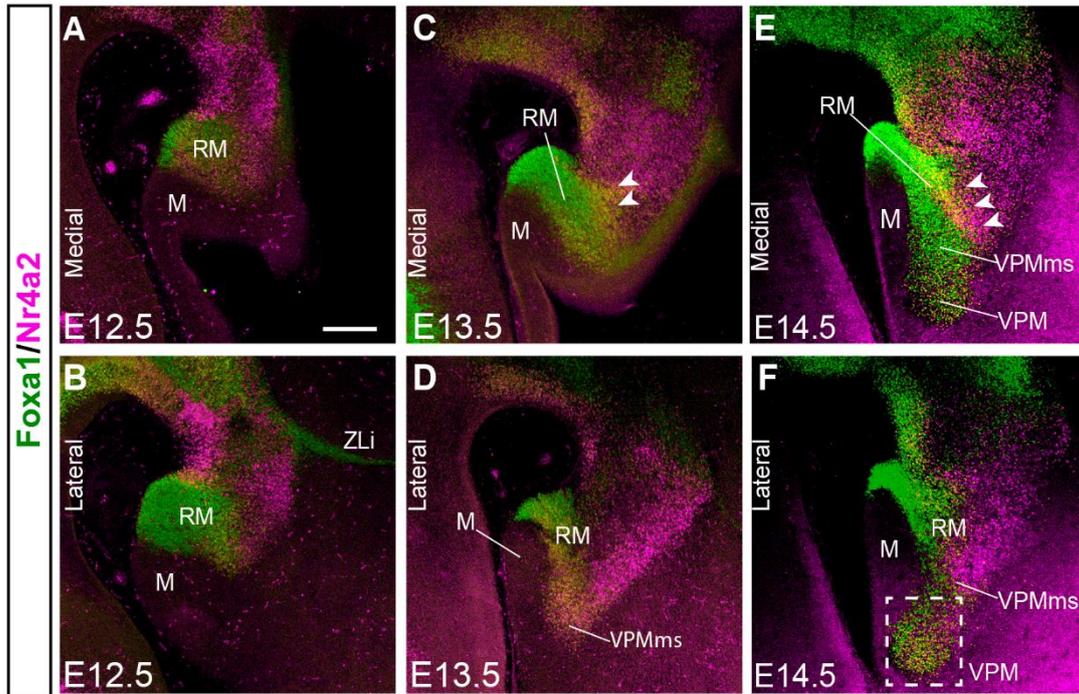


Figura 11. Comparación de la señal de Foxa1 y Nr4a2 durante el desarrollo. (A-F) Doble inmunofluorescencia de Foxa1 (verde) y Nr4a2 (magenta) en secciones sagitales mediales (A, C, E) y laterales (B, D, F) en embriones de ratón de días E12.5, E13.5 y E14.5, mostrando RM, M, VPMms, y el prospectivo núcleo VPM. Se observan diferencias en la distribución de ambos factores de transcripción, con un área intermedia con señal amarilla (Foxa1+Nr4a2), que se visualiza mejor en C y E (cabezas de flecha blancas). (F'-F''') Imágenes de mayor magnificación del área recuadrada alrededor del núcleo VPM en F muestran los canales separados y su conjunción, donde se aprecia la distribución de células únicamente Foxa1 positivas en la parte ventral del VPM. Estas imágenes son reconstrucciones tridimensionales de 50 µm de grosor de las imágenes tomadas secuencialmente en el microscopio confocal de 3 µm de grosor. La imagen en F'''' es una de las secciones de 3 µm, indicando la presencia de co-localización de marcadores Foxa1-Nr4a2 en el núcleo VPM. (G) Sección sagital en E18.5 ilustrando la distribución diferencial de Foxa1 y Nr4a2 en RM, VPM y su puente de conexión, ventralmente compuestos por células Foxa1 (cabezas de flecha blancas). La línea blanca indica la sección del plano utilizado para los paneles H-J. (H-J) Secciones horizontales mostrando la distribución medio-lateral de Foxa1 y Nr4a2 en las células del VPM en el día E18.5. (H, H') Nr4a2 marca el área RM y el core de VPM -VPMc-. (I, I', J, J') Foxa1 marca el área RM, y las partes lateral y core de VPM -VPMlat, VPMc-, así como las poblaciones separadas migradas STh y PSTh. La población mayoritaria que marca el VPMc parece ser positiva tanto para Foxa1 como para Nr4a2 (células amarillas). (K) Esta sección horizontal, con un plano aproximado al que se muestra en H-J, ilustra con hibridación *in situ* para *Irs4* en un ratón postnatal P1, el VPM y su persistente puente de conexión. Las barras de escala en A equivalen a 200 µm, siendo válidas para B-F. Las barras de escala en G y H equivalen a 200 µm, siendo la de H válida para I-J. La barra de escala en K equivale a 200 µm. Las barras de escala en F' equivalen a 75 µm, siendo válidas para F'', F''' y F'''''. La barra en H' equivale a 200 µm, siendo válida para I', J'.

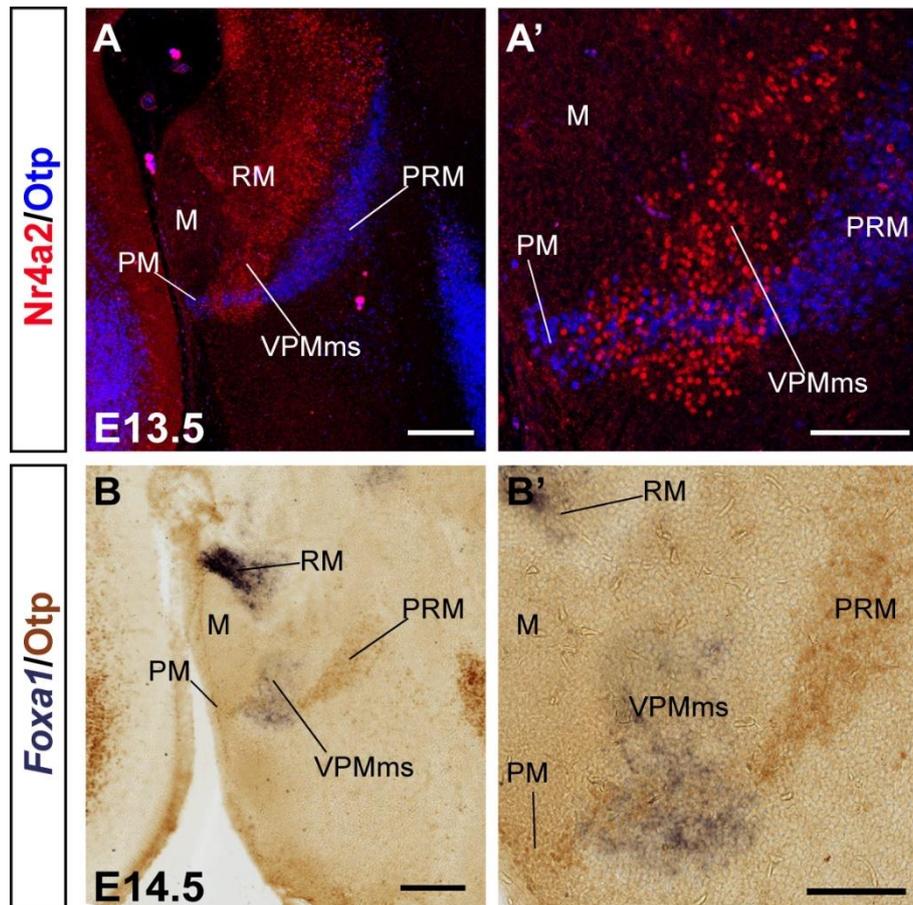


Figura 12: VPMms cruza de manera oblicua la banda PRM-PM en E13.5. (A, A') Sección de doble inmunofluorescencia para Nr4a2 (rojo) y Otp (azul) a E13.5 y su aumento muestran la VPMms positiva para células Nr4a2 a través de la banda PM. (B, B') Sección sagital a E14.5 de hibridación *in situ* para la sonda *Foxa1* (azul oscuro), combinada con inmunohistoquímica para Otp (marrón) y su aumento. Las células migradas *Foxa1* positivas de la VPMms se observan a través de la banda PM. Las barras de escala en A, B representan 200 μ m. Las barras de escala en A', B' representan 100 μ m.

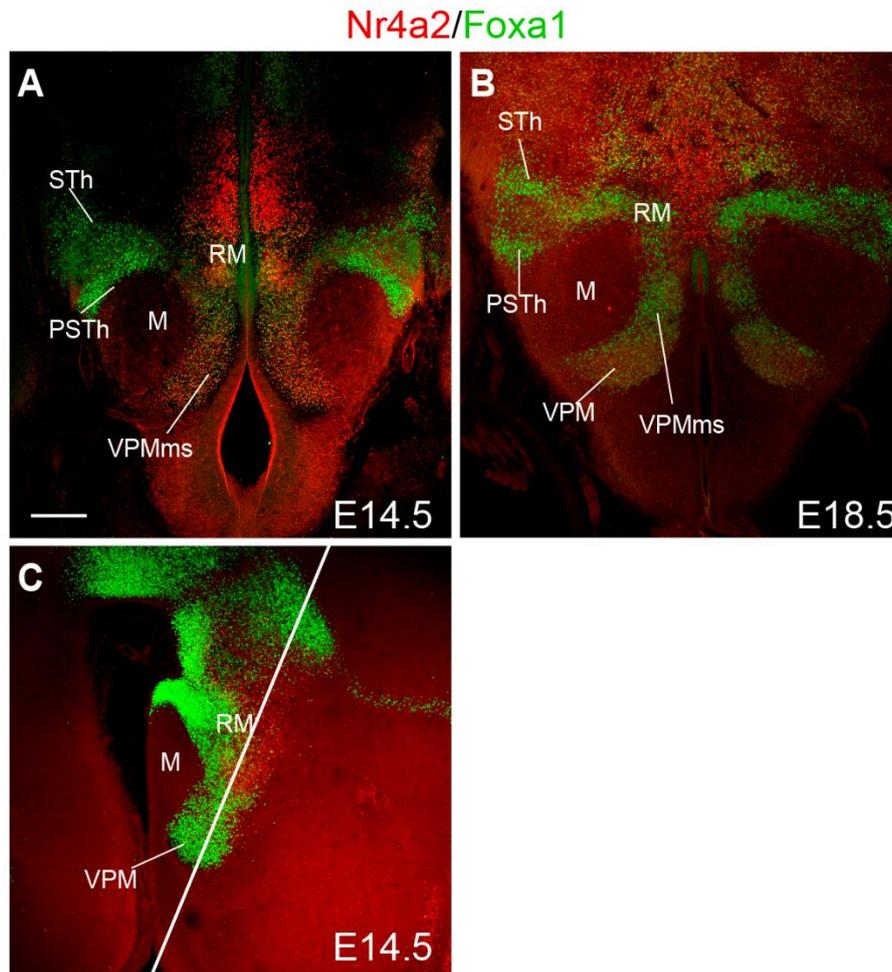


Figura 13: Vías migratorias procedentes del área RM. Secciones con doble inmunofluorescencia Nr4a2(rojo)/Foxa1(verde). El plano de corte de **A**, **B** se indica en **C** con una línea blanca. **A**, **B** muestran las vías migratorias del complejo STh/PSTh y del núcleo VPM, que van perpendiculares una respecto de la otra. La barra de escala representa 200 μ m

3. Demostración experimental de la migración del núcleo VPM y composición celular de la corriente migratoria (VPMms)

Se realizaron una serie de cultivos organotípicos con ratones de días E11.5, E12.5, y E13.5, intervalo temporal en el cual ocurre la migración de la población VPM según los datos descriptivos. Para marcar el avance de las células en migración, se colocó una pequeña partícula de tungsteno recubierta con CMFDA (verde fluorescente) en un área seleccionada de la superficie ventricular. Todos los explantes se mantuvieron durante 48 horas en incubación, en condiciones de 5% CO₂ y 37°C (Se nombraron indicando el día de marcaje y el día de fijación, e.g., E12.5-E14.5). Se investigó la extensión y el perfil temporal de la migración, determinando aproximadamente la microzona retromamilar donde se originan las células del núcleo VPM. Para ello, se dividió arbitrariamente el área RM en cuatro secciones dorsoventrales, y tres rostrocaudales (Apartado 5.2 de la sección "Material y Métodos"). Esto ayudó a identificar que el éxito del marcaje dependía de la zona de colocación del marcador en RM (o a lo largo de la VPMms (Figs.14A,B;15A,B).

Además, para visualizar de manera precisa la posición relativa de las células de la VPMms, se procesaron los explantes sistemáticamente con inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-Nr4a2. En algunas ocasiones se realizó doble inmunodetección añadiendo el anticuerpo anti-Foxa1 o anti-Otp. Como controles, se marcaron los explantes en regiones vecinas, fuera del área RM, incluyendo el área mamilar (M; Fig.14C), el límite mamilar/retromamilar (M/RM; Fig.14D) y la banda perirretromamilar (PRM; Fig.14E).

Se consideró un caso como positivo siempre y cuando se observaran células marcadas fuera del área RM, en dirección rostral, hacia el dominio Tu. Se comprobó que estas células siguieron esta dirección realizando IF con los marcadores de referencia (Nr4a2, Foxa1 y Otp).

En relación con la temporalidad, cabe mencionar que no se obtuvo ningún caso positivo entre los experimentos E11.5-E13.5, mientras que la mayoría de los casos exitosos con densidad alta de migración se realizaron en E12.5-E14.5 (Tabla S1 en Anexos; n=79). En el 62.02% de estos casos se visualizaba una corriente migratoria con número significativo de células. Cuando se marcó en E13.5-E15.5 (Tabla S2 en Anexos; n=17) se obtuvo un 52.94% de casos con corriente migratoria hacia el área tuberal. No obstante, se observó menor distancia recorrida y menor número de células en movimiento. Además, en algunos casos (29.14%) se observaron células CMFDA a lo largo de la VPMms, sin llegar a la posición final tuberal. Estos patrones comparados, pueden indicar un retraso del marcaje en los casos E13.5-E15.5 con respecto del comienzo de la migración tangencial (Fig. 18). Los puntos efectivos de marcaje fueron deducidos a partir de la posición donde se colocó la partícula de CMFDA, de acuerdo con el mapa preparado *ad hoc* del área RM (Figs.14A,B;15A,B), independientemente de la difusión fluorescente alrededor de éste punto. Para mayor claridad, se ha colocado un círculo negro en las imágenes de los experimentos, indicando la zona discreta donde la partícula de CMFDA se posicionó. Varios experimentos marcados en el límite M/RM revelaron una corriente rostro-ventral hacia el área M (cabeza de flecha blanca en Fig.14D).

3.1. Origen de la migración

Ninguno de los cultivos organotípicos control marcados en M (Fig.14C, n=5) o PRM (Fig.14E, n=5) fue positivo. Tampoco los casos marcados en el límite M/RM. No obstante, en varios de este tipo se visualizó la corriente rostro-ventral previamente mencionada (cabeza de flecha blanca en Fig.14D, n=10). A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada una de las posiciones en el área RM, en los experimentos E12.5-E14.5, intervalo temporal en el que el marcaje de la migración resultó ser más exitoso.

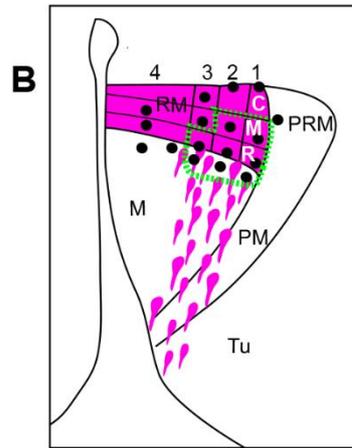
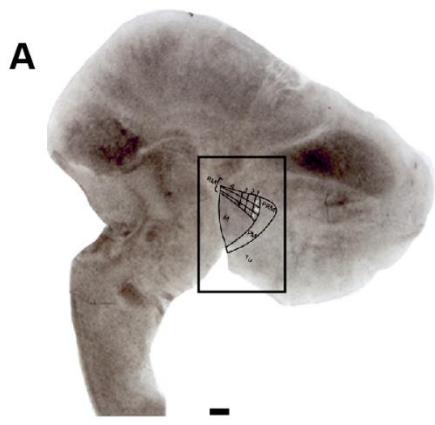
-Experimentos marcados en la posición 4: Esta zona representa la mitad ventral del área RM. Ninguno de los casos marcados en esta posición resultó positivo para la VPMms (Fig.14F,G;n=3)

-Experimentos marcados en la posición 3: Se trata del nivel más ventral de la mitad dorsal del área RM. No se observaron células migrando en la porción caudal (3C; Fig.15C; n=2), ni en la intermedia (3M; Fig.15D; n=3). Los casos positivos obtenidos en este nivel fueron los marcados en la zona rostral (3R; Fig.15E; n=12), o los marcados al principio de la VPMms (3VPMms Fig.15F; n=12). La distancia recorrida por las células CMFDA en la posición 3R al final del proceso (48 horas *in vitro*), se corresponde, aproximadamente, con la longitud de la VPMms (señal de inmunofluorescencia Nr4a2 en magenta).

-Experimentos marcados en la posición 2: Esta zona corresponde, aproximadamente, con el área de transición entre la señal ventral predominante de Foxa1, con la señal de Nr4a2 (datos descriptivos) en el área RM. Cuando se marcó caudalmente no se observaron células en migración (2C; Fig.15G; n=1). Sin embargo, fueron positivos todos los casos marcados en 2M (Fig.15H; n=3), 2R (Fig.15I n=6), y en el inicio de la VPMms (Fig.15J; n=8). Los casos 2M fueron los más caudales, de toda la serie de casos E12.5-E14.5 en los que se detectaron células de la VPMms.

-Experimentos marcados en la posición 1: Este nivel es el más dorsal del área RM. El marcaje caudal no reveló células en migración (1C; Fig.15K, n=1). Los casos 1M fueron positivos (Fig.15L, n=3), así como los casos 1R (Fig.15M, n=2) y los propiamente marcados en 1VPMms (Fig.15N; n=3).

Según los datos obtenidos con referencia al mapa de marcaje diseñado, la migración tangencial del VPM arranca desde la mitad dorsal del área RM, y preferentemente en sus partes más rostrales.



E12.5-E14.5 *Nr4a2*/CMFDA

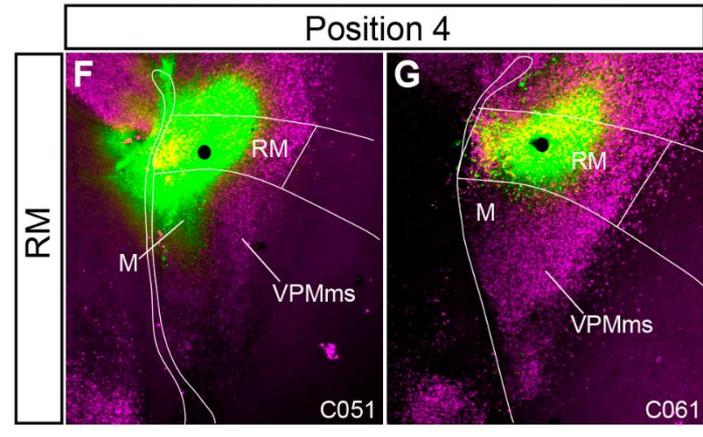
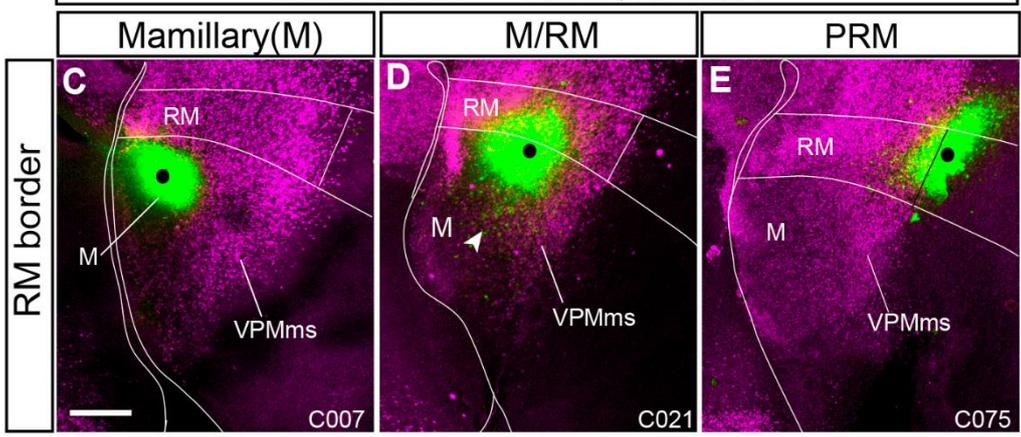


Figura 14. Experimentos control ilustrando las posiciones de marcaje que, sistemáticamente, fueron negativas para la VPMs. Para acotar el área de inicio de la migración de las células VPM, se marcaron diversas zonas, una por explante, dentro y fuera del área RM (ver Material y Métodos) usando un sistema de subdivisión *ad hoc*. La señal de CMFDA se muestra en verde y la inmunofluorescencia con el anticuerpo Nr4a2 en magenta. El número de identificación de cada caso experimental aparece en la esquina inferior derecha. **(A)** Ejemplo de cultivo organotípico, en el que se han identificado las áreas RM, M, PRM y PM. **(B)** Esquema del sistema de división arbitrario del área RM diseñado para el marcaje de los cultivos. Se dividió el área RM (magenta) en mitades aproximadas dorsoventrales. La "mitad" ventral corresponde al grupo 4, y la "mitad" dorsal, se subdividió a su vez en tres grupos longitudinales (3,2,1). Estos grupos además se dividieron en sectores rostro-caudales (rostral-R-, medio-M-, y caudal-C-). Los círculos negros representan los sitios de marcaje en los casos experimentales, algunos de ellos mostrados. Los experimentos marcados fuera del área delimitada en verde (líneas discontinuas) fueron negativos, mientras que los marcados dentro de ese área resultaron en casos positivos (corriente de células verdes CMFDA positivas en Fig.15). **(C)** No se observó ninguna corriente migratoria cuando la partícula con CMFDA se depositó en el área mamilar (M; n=5). **(D)** Cuando la partícula se colocaba en el borde RM/M, se observaban algunos desplazamientos celulares hacia la zona mamilar (cabeza de flecha blanca en **D**, n=10). **(E)** El marcaje CMFDA no reveló ningún movimiento migratorio cuando se depositó en PRM, aunque estuviese cercano al área RM (n=5). **(F, G)** Los experimentos marcados en la mitad ventral del área RM (posición 4 en el esquema en B) no marcaron ninguna corriente migratoria (n=3). Las barras de escala representan 200 μ m.

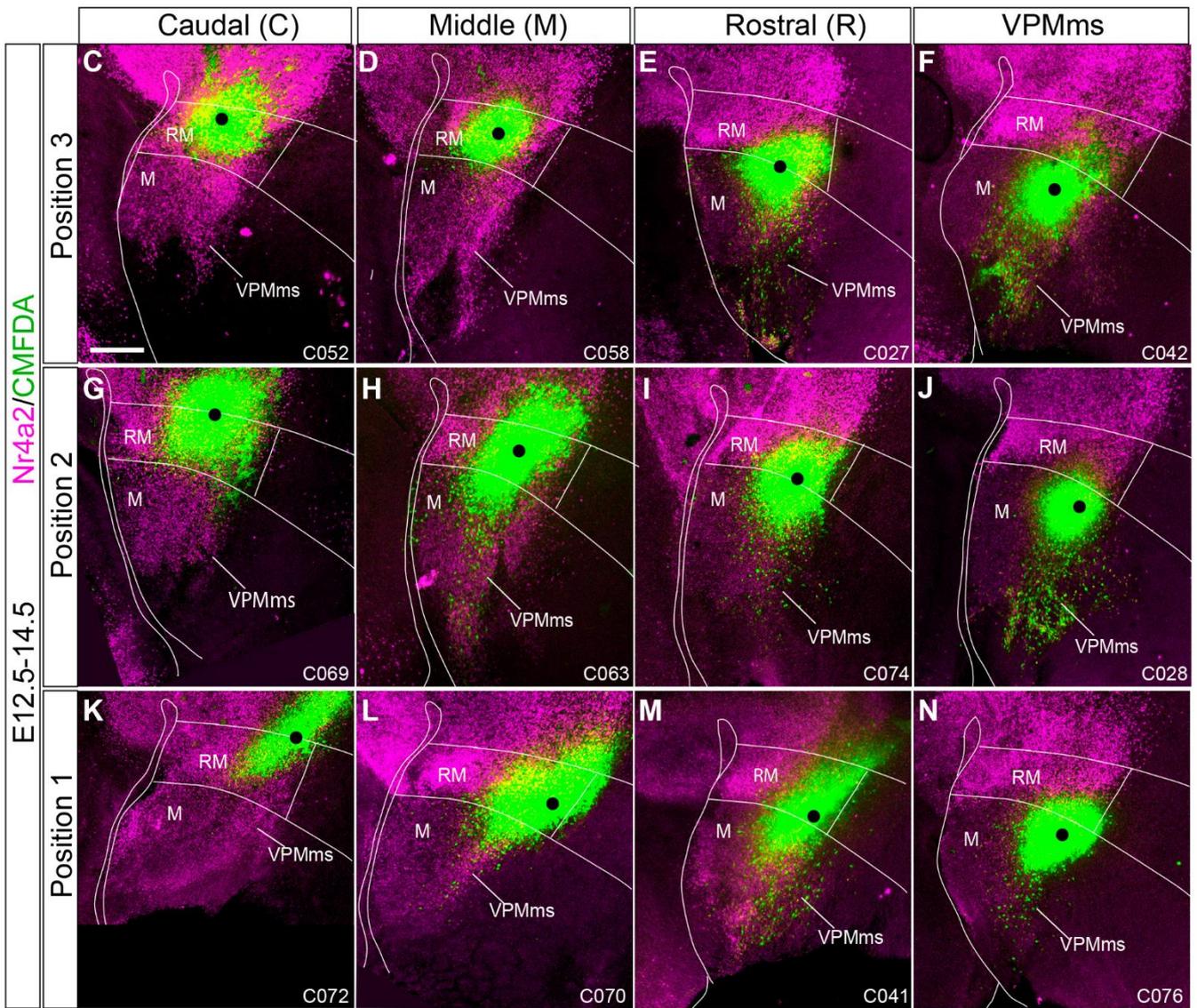
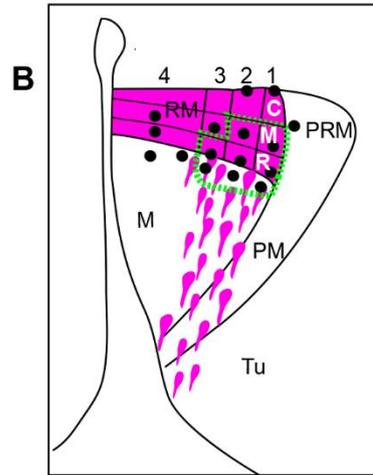
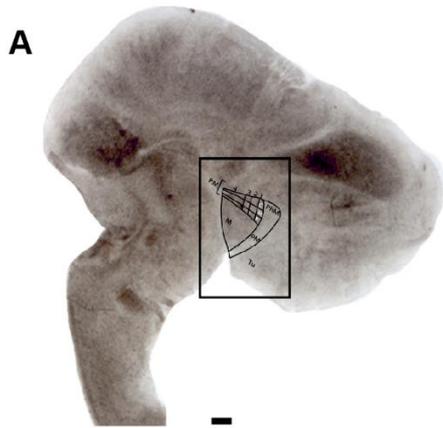


Figura 15. Origen de la VPMms en la mitad dorsal del área RM. En esta figura se ilustran casos representativos con posiciones de marcaje en la mitad dorsal del área RM, parte de los cuales revelaron la VPMms. Algunos explantes quedan marcados rostralmente al área RM, en la parte inicial de la VPMms. **(A, B)** Se muestra el mismo ejemplo de explante organotípico, y el mismo sistema de referencia que en la figura 14, empleado en todos los casos (posiciones dorsoventrales 1-3 y posiciones rostro-caudales C/M/R). La señal CMFDA es verde, mientras que la inmunofluorescencia Nr4a2 se visualiza en magenta. El número serial de cada caso se indica en la esquina inferior derecha (Tabla de casos en Anexos). Todos los casos marcados en C o M, de la posición 3 fueron negativos (**C, D**; 3C -n=2-; 3M -n=3-). De igual manera, los casos marcados en C de las posiciones 2 o 1 tampoco revelaron la VPMms (G, K; 2C -n=1-. 1C -n=1). Todos los demás casos fueron positivos y mostraron células CMFDA positivas (parte de la VPMms) a lo largo de la VPMms Nr4a2 positiva (E, F, H-J,L-N; 3R -n=12; 3VPMms -n=12-; 2M -n=3-; 2R -n=6-; 2VPMms -n=8-; 1M -n=3-; 1R -n=2-; 1VPMms -n=3-). Las barras de escala representan 200 μ m.

3.2. Tipos celulares en la corriente migratoria

Para mostrar la co-localización CMFDA/Nr4a2 en las células de la VPMms, se seleccionaron cuatro casos E12.5-E14.5 con alta densidad de células que adquirieron el trazador CMFDA (Fig.16B,E,H,K). Las imágenes revelan la participación tanto de neuronas Nr4a2-positivas (CMFDA/Nr4a2, en amarillo, o Nr4a2 en magenta), como de neuronas Nr4a2-negativas (CMFDA-positivas en verde), con perfil molecular desconocido (Fig.16C',C'',F',F'',I',I'',L'). Para comprobar si estas células son Foxa1-positivas, se les realizó la doble inmunofluorescencia (Foxa1/Nr4a2) a algunos de los cultivos organotípicos E12.5-E14.5 (n=4, ejemplo en Fig.17). Las células de la VPMms que se marcaron con CMFDA, resultaron en su mayoría ser del tipo Foxa1-Nr4a2(Fig.17B,B' células CMFDA/Foxa1/Nr4a2, en blanco), aunque, como se esperaba, también se marcaron células que sólo presentaban Foxa1 (Fig.17B,B'; CMFDA/Foxa1, azul claro) y células que sólo contenían Nr4a2 (Fig.17B.B'; CMFDA/Nr4a2, amarillo), además de células CMFDA partícipes de la VPMms que no contenían ninguno de estos marcadores (Fig17.B,B'; CMFDA; verde). Estas últimas, sugieren que existen otros marcadores

que caracterizan las células que componen el núcleo VPM y su corriente migratoria, apoyando la heterogeneidad de estas estructuras RM, VPMms y VPM.

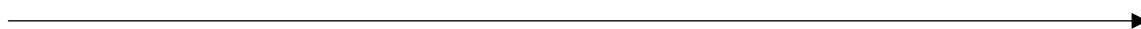
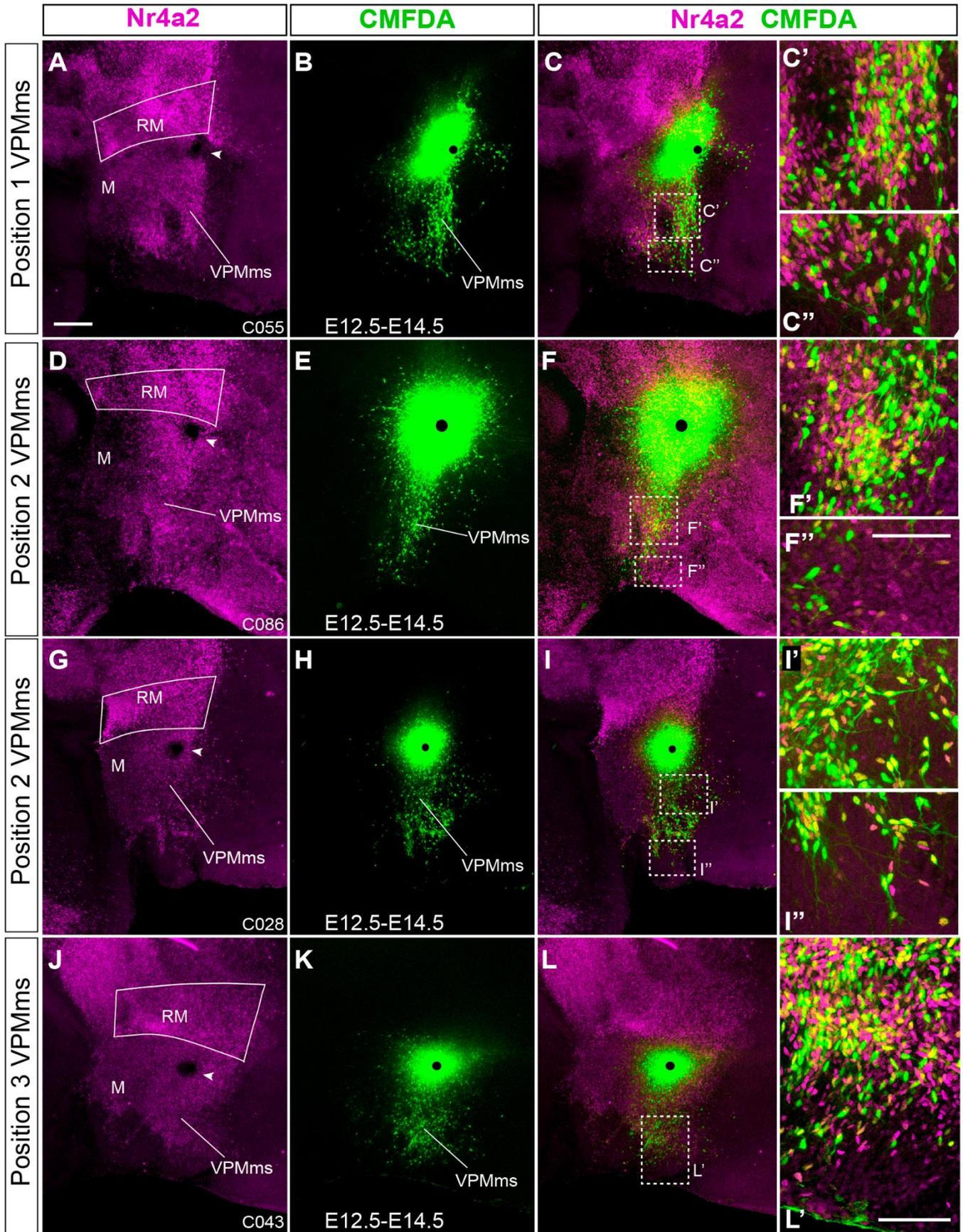


Figura 16. Ejemplos de casos experimentales E12.5-E14.5 marcados en la VPMms. (A-C), (D-F), (G-I) y (J-L) ilustran cada caso completo. En (A, D, G, J) se muestra la inmunofluorescencia Nr4a2 en magenta, donde además se delimita el área RM, y en (B, E, H, K) la señal CMFDA correspondiente a cada caso. Los círculos negros indican los puntos de marcaje. (C, F, I, L) Se muestran las imágenes de confocal para ambos canales CMFDA/Nr4a2. (C', C'', F', F'', I', I'', L') Imágenes de mayor magnificación de las zonas recuadradas en C, F, I, L muestran células amarillas co-localizando CMFDA/Nr4a2. Las células magenta son, probablemente, células Nr4a2 migradas que no han adquirido el marcador CMFDA. Las células verdes son células migradas que no expresan Nr4a2 (Por ejemplo, pueden ser Foxa1 positivas, o expresar otro marcador). La barra de escala en A representa 200 μm , siendo válida para D, G y J. La barra de escala en F'' representa 100 μm , siendo válida para C', C'', F', I', I''. La barra de escala en L' representa 100 μm .



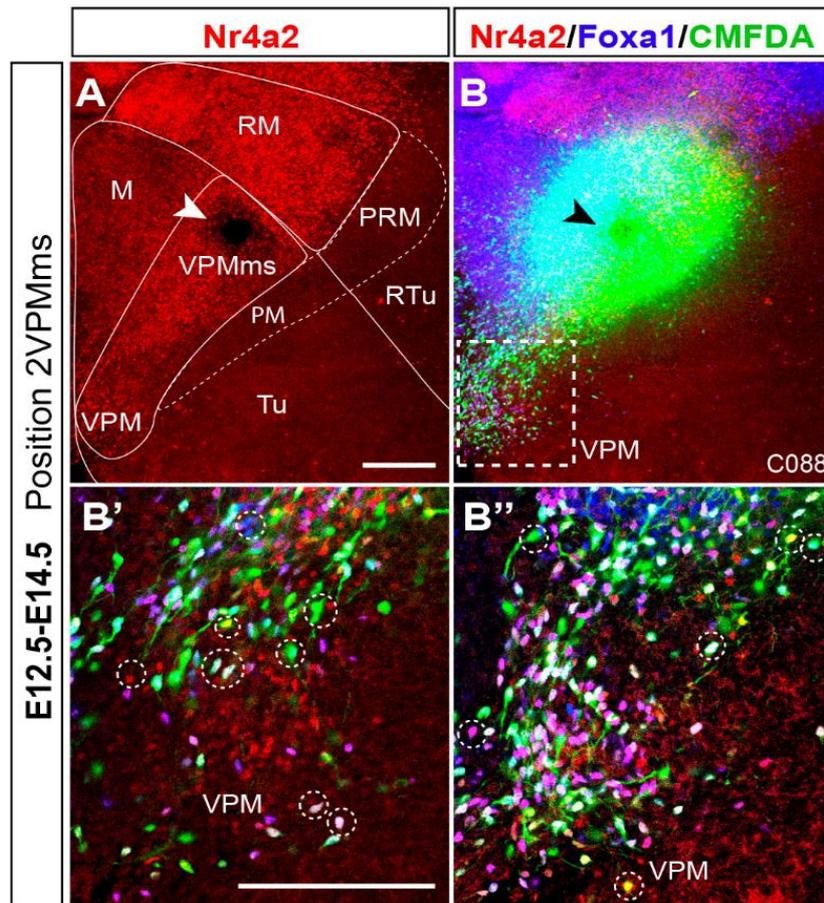


Figura 17. Análisis de la diversidad molecular de la VPMms. (A) Inmunofluorescencia Nr4a2 (rojo) para el caso que se ilustra. En esta sección se muestran los límites relevantes de la región hipotalámica ventro-basal. La cabeza de flecha blanca indica la posición donde se colocó la partícula recubierta con CMFDA, en 2VPMms. (B) El mismo caso mostrando la doble inmunofluorescencia Nr4a2 (rojo), Foxa1 (azul), además de la señal CMFDA en verde. (B', B'') Secciones de confocal de mayor magnificación de 3 μm de grosor ampliadas de la zona recuadrada en B. Se indican las diversas combinaciones posibles en círculos discontinuos alrededor de los distintos tipos celulares: Nr4a2+CMFDA (células amarillas), Foxa1+CMFDA (azul claro), Nr4a2+Foxa1+CMFDA (blanco), CMFDA (verde, en este caso las células VPMms presentan un perfil molecular no identificado en este estudio). Las barras de escala representan 200 μm

3.3. Perfil temporal de la corriente migratoria

Para determinar si existen diferencias cualitativas entre los experimentos positivos E12.5-E14.5 y, los más tardíos, E13.5-E15.5, se seleccionaron casos representativos, con la misma posición de marcaje (3VPMms) y con doble inmunofluorescencia Nr4a2/Otp (Fig.18). Los casos experimentales E12.5-E14.5 (Fig.18A-F') presentaron mayor número de células marcadas en la VPMms atravesando la banda PM, y mayor longitud en su distancia recorrida. Los casos E13.5-E15.5 (Fig.18G-L') mostraron un avance limitado de la VPMms, quedando algunas de las células CMFDA positivas a medio camino en la VPMms visualizada con la señal Nr4a2. Algunos casos mostraban células escasas CMFDA salientes más cercanas al área RM que al núcleo VPM (Indicado en la Tabla S2 en Anexos).

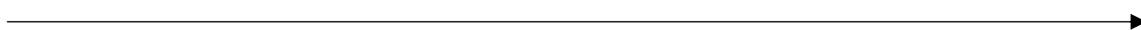
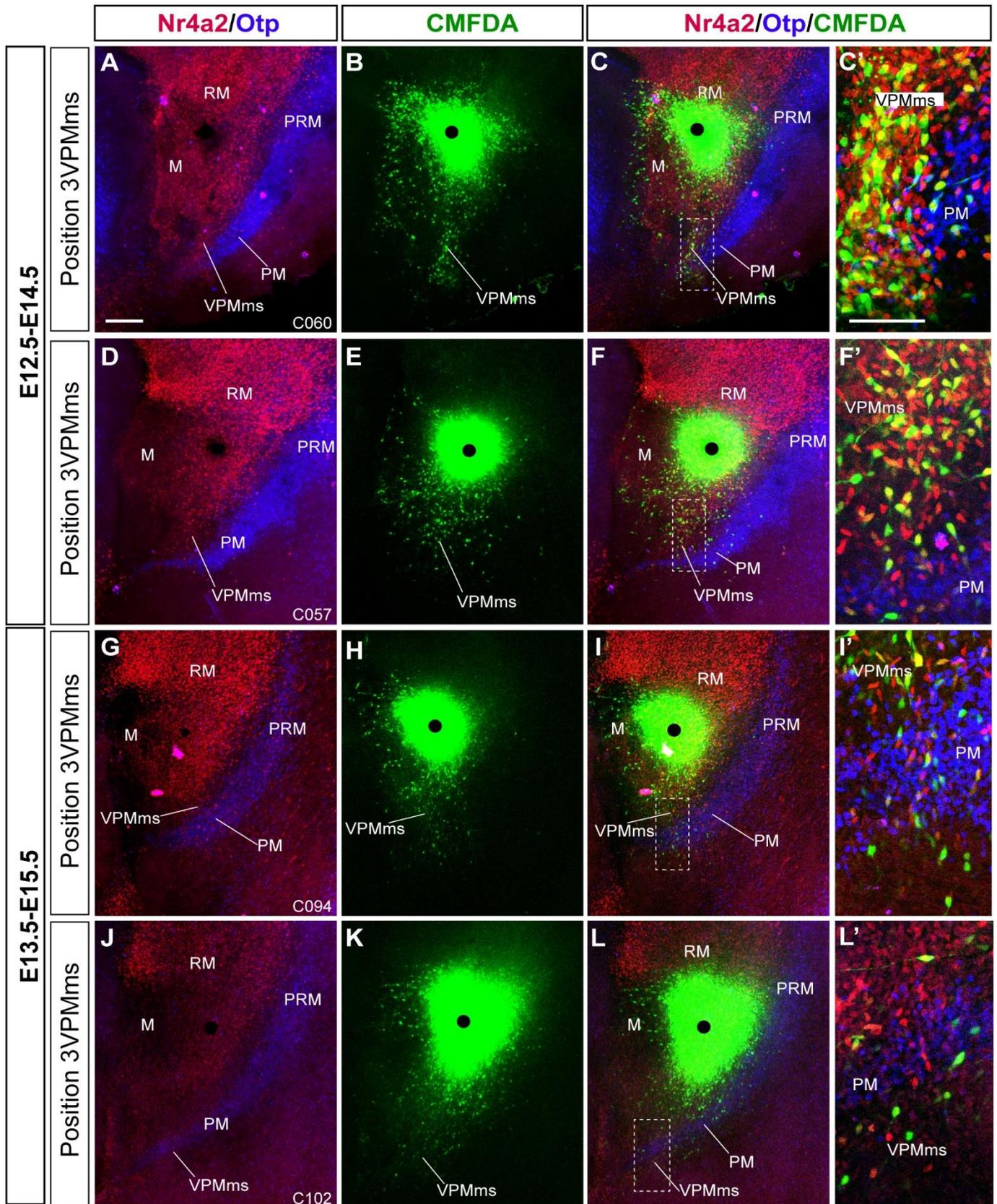


Figura 18. Comparación de casos 3VPMms marcados en E12.5 y en E13.5. (A-C; E-F) Se ilustran dos ejemplos representativos E12.5-E14.5 y (G-I; J-L) y dos ejemplos E13.5-E15.5. (A, D, G, J) Para cada uno de ellos se muestran, por separado, las secciones de inmunofluorescencia doble Nr4a2 (rojo) y Otp (azul), (B, E, H, K) las correspondientes al marcaje de las células migradas CMFDA, (C, F, I, L) y la combinación Nr4a2/Otp/CMFDA. El número de neuronas en migración es, generalmente, menor en los casos E13.5-E15.5. (C', F', I', L') Las imágenes de mayor aumento muestran detalles de las neuronas VPMms en migración de los recuadros en C, F, I, L. En casos E12.5-E14.5 aparecen más células CMFDA+Nr4a2 (amarillas) que en E13.5-E15.5. La barra de escala en A representa 200 μ m, válido para B-L. La barra de escala en C' representa 100 μ m, siendo válido para F'-L'.



4. Estudio de mecanismos causales en el desarrollo del núcleo VPM

Con el objetivo de identificar vías señalizadoras implicadas en el desarrollo del VPM, se analizó el fenotipo de ciertos ratones transgénicos, deficientes en proteínas con rol conocido durante el desarrollo embrionario: Netrina-1/DCC, cuya acción más establecida es la de actuar como señal de atracción; ephrin-B2, ligando para receptores Eph-B y Eph-A4, cuyo contacto supone un freno para poblaciones celulares en migración; Fgf8, morfógeno implicado en la proliferación, apoptosis y especificación celular a través de la regulación de la expresión de determinados factores de transcripción.

4.1. Análisis de la vía de señalización Ntn1/DCC

Principalmente se ha reportado la acción atractiva que ejerce la Netrina-1 (*Ntn1*) sobre las poblaciones celulares que expresan su receptor "*deleted in colorectal cancer*", DCC. Para comprobar si estas proteínas se expresan en el área RM y la VPMms, o en estructuras de su vecindad, se consultó el *Allen Developing Mouse Brain Atlas*.

Tanto *Ntn1* como su receptor *DCC* se expresan en la placa del suelo RM hipotalámica durante E11.5, siendo la señal del primero de mayor intensidad que la del segundo. (Fig.19A,E)

En E13.5, momento en el que la VPMms es activa, la expresión de la *Ntn1* continúa de manera intensa a lo largo de la placa del suelo y basal RM. Más lateralmente se encuentran transcritos de *Ntn1* en el área PM y en una zona tuberal cercana a la futura localización del núcleo VPM (Fig.19B,C). Durante este mismo día embrionario, *DCC* se expresa en la placa basal RM y en la banda PRM/PM (Fig.19G; datos del *Allen Developing Mouse Brain Atlas*).

En E15.5, cuando la migración del VPM ya ha concluido, a niveles mediales se observa un patrón de expresión de la *Ntn1* complementario al área RM y parte de la VPMms, con señal en PRM, en TuV y en la zona mamilar que limita con la parte más ventral del área RM (Fig.19D). En este día del desarrollo, hay transcritos *DCC* en la región limitante entre las áreas RM y M(Fig.19H).

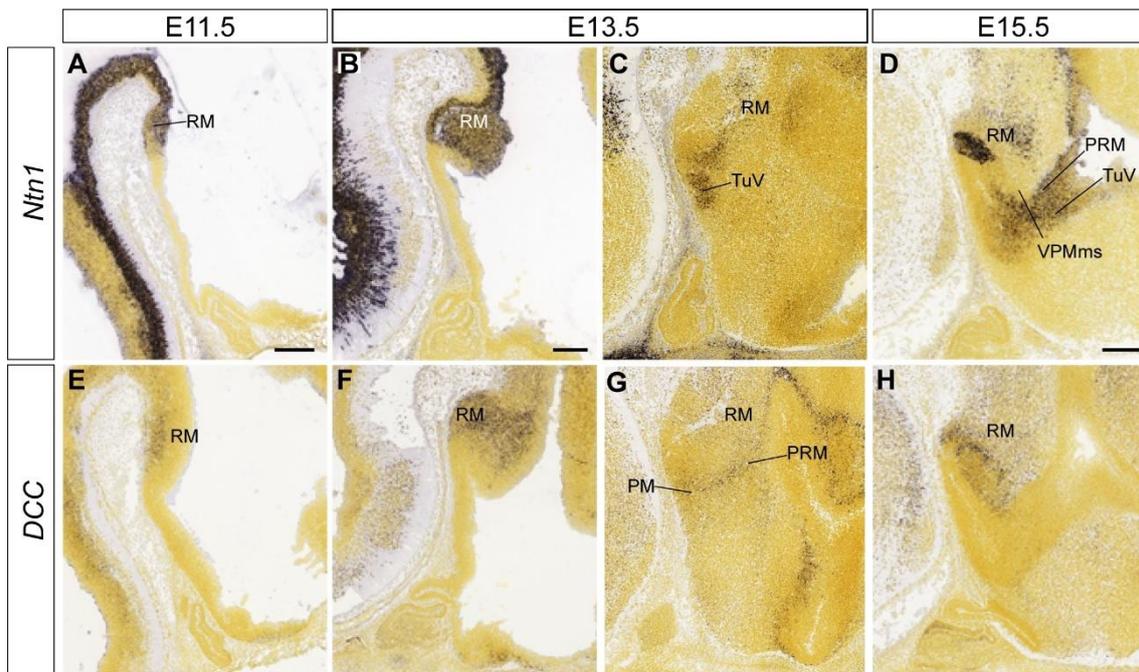


Figura 19. Patrón de expresión de la pareja *Ntn1/DCC* en los días E11.5, E13.5 y E15.5 de ratón. Secciones sagitales de hibridación *in situ*, próximas a la línea media, con las sondas *Ntn1* y *DCC* (*Allen Developing Mouse Brain Atlas*). Para que se pueda comparar la expresión de *Ntn1* y la de su receptor *DCC*, se han colocado en paralelo niveles similares de los mismos días embrionarios para las dos sondas (**A y E; B y F; C y G; D y H**). (**A-D**) Expresión de la *Ntn1* desde E11.5 hasta E15.5. **B y C** constituyen dos secciones de E13.5, la primera (**B**) medial y la segunda (**C**) lateral. Los transcritos de *Ntn1* se sitúan de manera generalizada en la placa del suelo y también se observan en la placa basal RM. (**D**) Curiosamente en E15.5 la señal *Ntn1* se encuentra en los límites que bordean al territorio RM y al puente RM-VPM, siendo positivas la región mamilar ventral y PRM/PM. (**E-H**) Expresión de *DCC* desde E11.5 hasta E15.5. **F y G** constituyen dos secciones de E13.5, la primera (**F**) medial, y la segunda (**G**) lateral. Aunque la señal *DCC* es más

débil que la de *Ntn1*, la placa basal RM es positiva en E13.5, y también el límite M/RM en E15.4. Las barras de escala representan 200 μ m.

Puesto que *Ntn1* se expresa a E13.5 en un área cercana al lugar de destino de las células VPM, en la región tuberal, y a E15.5 muestra un patrón de expresión intenso en las zonas que rodean a la región RM y la VPMms, se hipotetizó que esta señal podría favorecer la migración tangencial atrayendo estas células oblicuamente hacia el dominio tuberal intermedio. El receptor DCC se expresa durante E13.5 y E15.5 en células del área RM, por lo que podría estar mediando la respuesta de las células retromamilaes a la Netrina-1.

Para intentar responder a esta hipótesis, analizamos dos tipos de ratones mutantes, un transgénico *full knockout*, en el que no hay expresión de *Ntn1* (*Ntn1*^{-/-}, n=2), y otro *full knockout*, en el que no hay expresión de *DCC* (*DCC*^{-/-}, n=2). Se visualizaron las estructuras de interés realizando hibridación *in situ* con la sonda *Nr4a2* sobre los mutantes y sus controles de la misma camada, todos ellos en el día E16.5. Teóricamente, en ambos tipos de ratones mutantes se truncaría la vía de señalización Ntn1/DCC, por lo que en cada uno de ellos se buscaron los mismos defectos cualitativos en la formación del VPM, tales como ausencia de este, o de la VPMms, y acumulación ectópica de células *Nr4a2* en RM o a lo largo de la vía de migración. Sin embargo, no se observó ninguna alteración de las estructuras analizadas en ninguno de los ratones transgénicos, *Ntn1*^{-/-} (Fig.20B,D,F,H) o *DCC*^{-/-} (Fig.21B,D,F,H) en comparación con los embriones controles de su camada (Figs.20A,C,E,G; 21A,C,E,G). Estos resultados sugieren que estas dos proteínas por sí solas no son indispensables en el desarrollo del VPM.

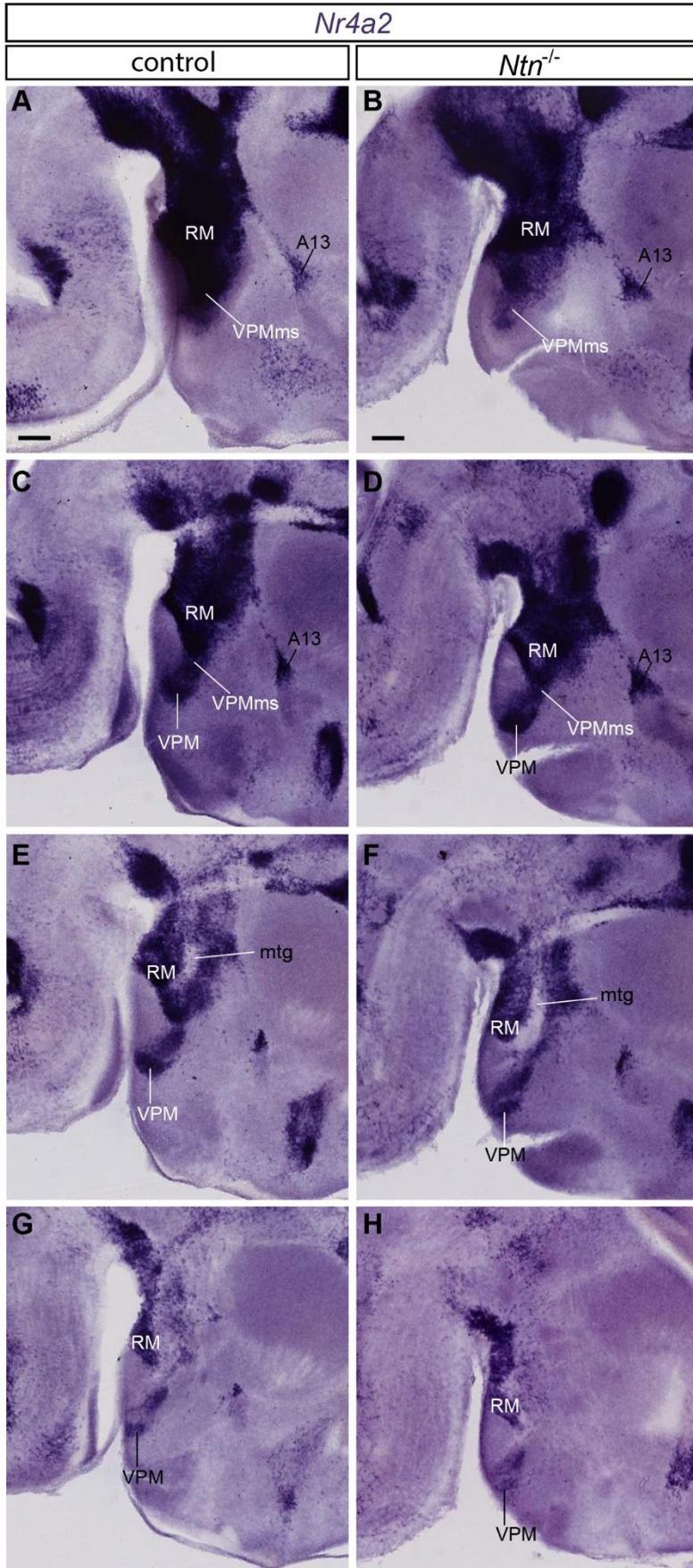


Figura 20. Comparación de las estructuras RM, VPM y su puente de unión, mediante la expresión *Nr4a2*, entre un ratón *Ntn1^{-/-}* y su control, en el día de desarrollo E16.5. (A,B; C,D; E,F y G,H) Secciones equivalentes medio-laterales, la primera de cada pareja perteneciente al ratón control y la segunda al ratón mutante *Ntn1^{-/-}*. No se observan diferencias cualitativas significativas en ninguno de los niveles mostrados. Las barras de escala representan 200 μ m.

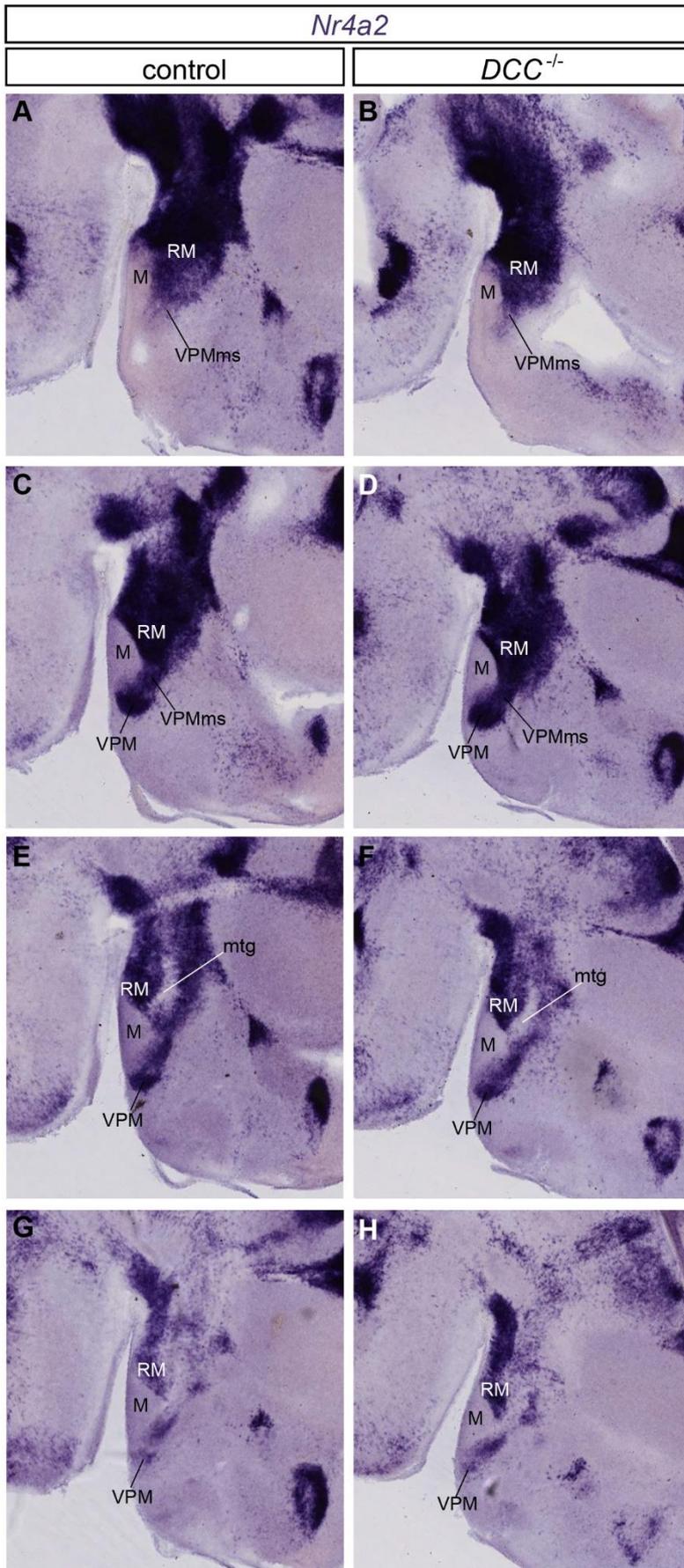


Figura 21. Comparación de las estructuras RM, VPM y su puente de unión, mediante la expresión *Nr4a2*, entre ratones *DCC*^{-/-} (KO completos) controles de la misma camada) a E16.5. (A,B; C,D; E,F y G,H) Secciones equivalentes medio-laterales, la primera de cada pareja perteneciente al ratón control, y la segunda al ratón mutante *DCC*^{-/-}. No se observan diferencias cualitativas significativas en ninguno de los niveles mostrados. Las barras de escala representan 200 μ m.

4.2. Análisis del ligando ephrin-B2 en la población VPM

Los ligandos ephrin-As, ephrin-Bs y sus receptores (Eph-As y Eph-Bs) son proteínas transmembrana tirosina kinasas, que actúan como señal de parada en la migración de varias poblaciones celulares durante el desarrollo. Los receptores Eph-As tienen mayor afinidad por las ephrin-As, mientras que los Eph-Bs por las ephrin-Bs, a excepción del receptor Eph-A4, que se une preferentemente a los ligandos ephrin-B1 y ephrin-B2 (Niethamer y Bush, 2019). Se analizó el patrón de expresión de algunos genes de estas familias en el hipotálamo basal, con el objeto de conocer si estas proteínas son candidatas para regular la migración del VPM.

El gen *Efnb2* (que codifica para el ligando ephrin-B2) se expresa en el área RM en E11.5 y en E13.5 (Fig.22A,B). A nivel más lateral hay señal de este transcrito alrededor de la región PM (Fig.22C). En E15.5 se revela un solapamiento parcial entre la señal de hibridación *in situ* *Efnb2* y la señal del anticuerpo Foxa1 en RM, VPM y su puente de unión (Fig.22D,E). Además, *Efnb2* también se expresa en la zona perimamilar, donde se sitúa el DPM, y de manera menos intensa en la región M (Fig.22D,E).

Paralelamente, se analizó la expresión de receptores, afines al ligando ephrin-B2. Se encontró que, a E13.5 el receptor *Eph-B1* se expresa en el área M, la zona más ventral de la placa basal del diencefalo más próxima al área RM, el dominio PRM, y el primordio del núcleo VM (Fig.22F). Este patrón de expresión se mantiene dos días más tarde, en E15.5 (Fig.22G). Varios de los lugares donde hay expresión *Eph-B1*, limitan con la región RM, por lo que parece posible la interacción entre esta molécula y el ligando ephrin-B2, que se expresa en la región RM. Además, en E15.5 se observó expresión del receptor *Eph-A4* en la región tuberal ventral y tuberal intermedia, donde la VPMms frena su avance (Fig.22H).

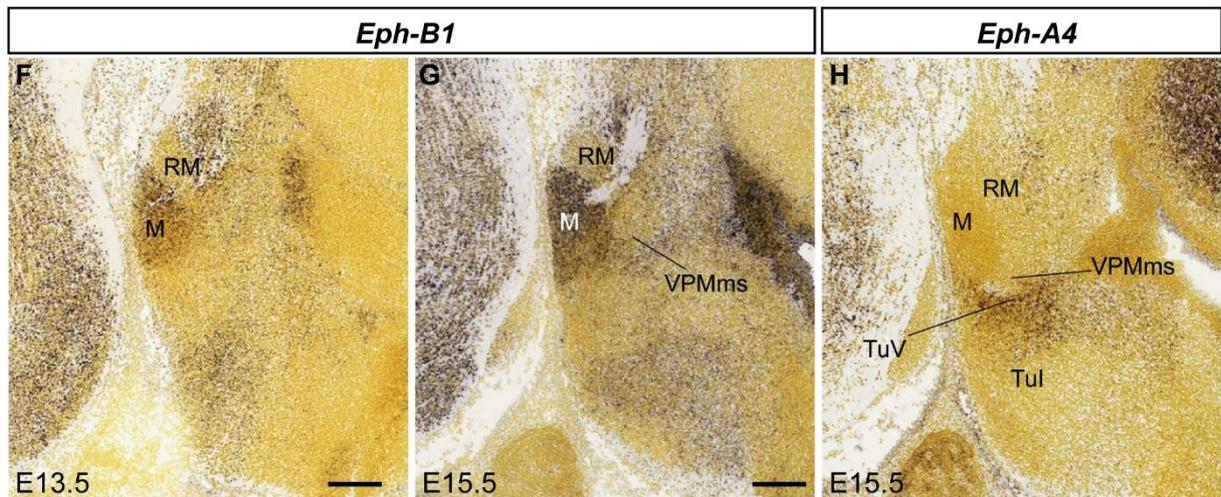
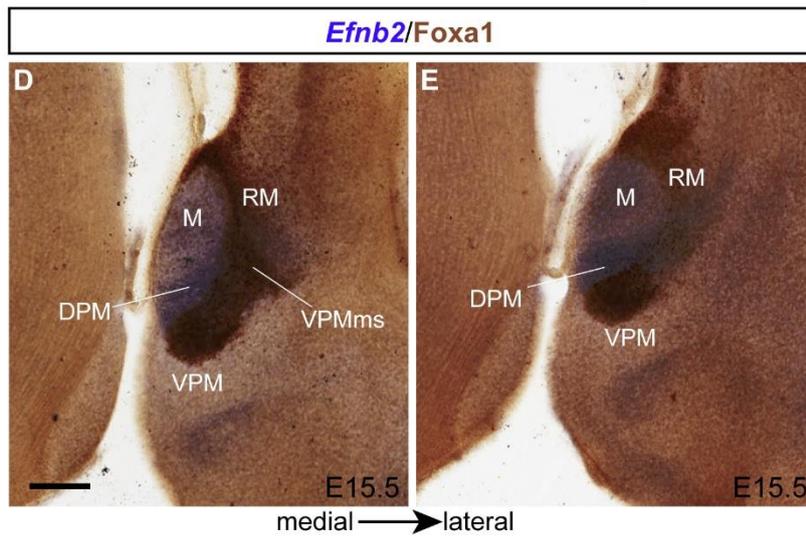
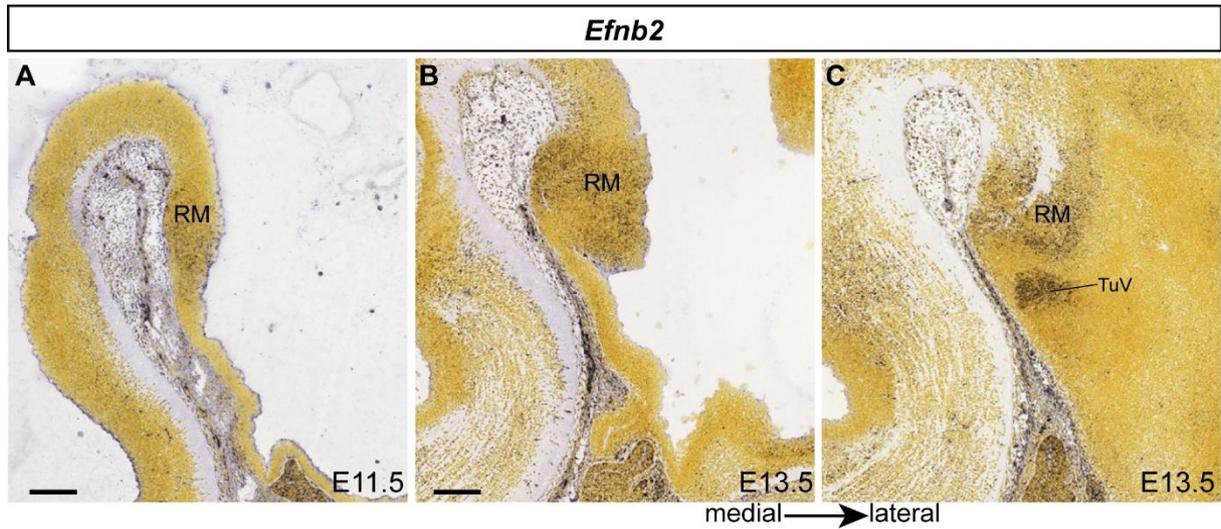


Figura 22. Patrón de expresión del ligando ephrin-B2 (*Efnb2*) y sus receptores, *Eph-B1* y *Eph-A4* en el hipotálamo basal durante el desarrollo de ratón. (A-C) Secciones parasagitales de hibridación *in situ* con la sonda *Efnb2* en días E11.5 y E13.5 procedentes del *Allen Developing Mouse Brain Atlas*. (D-E) Secciones de hibridación *in situ* de *Efnb2* (azul) combinada con inmunohistoquímica anti-Foxa1 en E15.5. (F-G) Secciones sagitales de hibridación *in situ* con la sonda *Eph-B1* en los días E13.5 y E15.5 procedentes del *Allen Developing Mouse Brain Atlas*. (H) Sección sagital de hibridación *in situ* con la sonda *Eph-A4* en E15.5, procedente del *Allen Developing Mouse Brain Atlas*. Las barras de escala representan 200 μm .

El patrón de expresión del ligando ephrin-B2, y sus receptores Eph-B1 y Eph-A4 sugiere que estas proteínas pueden estar implicadas en el posicionamiento de las células del núcleo VPM. Para comprobar que las células de la VPMms contienen el ligando ephrin-B2, se realizó doble inmunofluorescencia Nr4a2/Foxa1 a ratones transgénicos reporteros, que producen esta molécula unida a la proteína verde fluorescente (*Efnb2::GFP*, n=3, Fig.23). Se confirmó que existe co-localización Foxa1-Nr4a2-GFP (ephrin-B2) en el núcleo VPM (células blancas en Fig.23B',D'). Este resultado indica que las células retromamilares que forman el VPM, potencialmente pueden responder a los receptores Eph-B y Eph-A4.

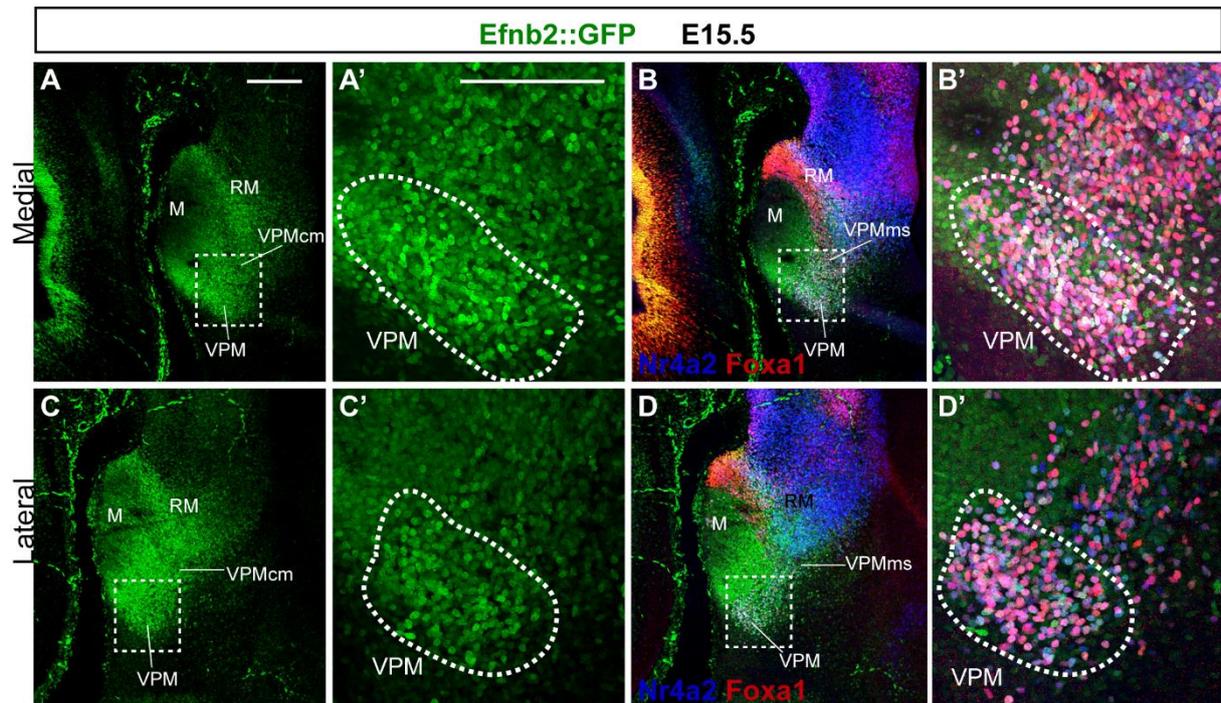


Figura 23. Los ratones reporteros del ligando ephrin-B2 (*Efnb2::GFP*), contienen GFP en células del VPM durante E15.5. Se muestran dos secciones sagitales, una (A-B') medial y otra (C-D') más lateral, en las que se aparecen las estructuras de interés, RM, VPMms y VPM. (A, C) La señal GFP revela las células que contienen la proteína ephrin-B2. (A', C') Aumentos de las secciones recuadradas en A y C muestran que el núcleo VPM (área bordeada) contiene células GFP con el ligando ephrin-B2. (B, D) La doble inmunofluorescencia Nr4a2 (azul) y Foxa1 (rojo) confirma la posición de la VPMms y del núcleo VPM. (B', D') Las imágenes de mayor magnificación revelan que algunas de las células son triplemente positivas ephrin-B2+Nr4a2+Foxa1 (células blancas). Las barras de escala representan 200 μ m.

Los receptores Eph_s y ligandos ephrin_s son conocidos por actuar como señal de parada en migraciones celulares, cuando interactúan (Rudolph y col., 2010; Villar-Cerviño y col., 2013, 2015). El receptor Eph-B1 se expresa en el área M y el receptor Eph-A4 lo hace en la región tuberal, ambos parecen limitar la vía de paso de la VPMms. Las células del núcleo VPM contienen el ligando ephrin-B2, con capacidad para unirse a los dos receptores. Por lo tanto, se hipotetizó que los lugares donde se expresan *Eph-B1* y *Eph-A4* son no permisivos para las células ephrin-B2 positivas de la VPMms. Para responder esta postulación, se procesaron ratones que pierden la expresión del gen *Efnb2* de todos los progenitores neurales. Estos ratones se obtienen mediante el cruce de especímenes con la expresión de la recombinasa Cre bajo la regulación del promotor de Nestina (proteína marcadora de progenitores neurales), con especímenes que tienen el gen *Efnb2* flanqueado por secuencias loxP. Por lo tanto, se pierde la expresión del gen *Efnb2* en los progenitores neurales de los animales *Efnb2^{lox/lox}* que contengan el gen Nes-Cre1 (*Efnb2^{ckO}*).

Se procesaron ratones *Efnb2^{ckO}* en estadios post-migratorios (E16.5 y E18.5), con doble inmunofluorescencia Nr4a2/Foxa1, para visualizar el núcleo VPM (Fig.24). En este caso se buscaron defectos relacionados con la falta de territorios no permisivos para su migración: células ectópicas en la región M, o que migran sobrepasando las regiones TuV-Tul. Sin embargo, no hubo diferencias en la posición de las neuronas del núcleo VPM entre los ratones control (n=4) y los transgénicos *Efnb2^{ckO}* (E16.5 n=3, y E18.5 n=2; Fig.24D-F comparar con A-C; H comparar con G). En ambos tipos de ratones se identificaron los mismos tipos celulares: Foxa1, preferentemente en la porción ventral del núcleo, y Nr4a2 y Foxa1-Nr4a2 en el *core* (Fig.24G',H'). No se observaron células Foxa1, Nr4a2 o Foxa1-Nr4a2 ectópicas en ratones *Efnb2^{ckO}*, comparando con los animales control. Estos resultados sugieren que la pérdida selectiva del ligando Ephrin-B2 no provoca alteraciones en la migración de las células Nr4a2 y Foxa1 que van a formar parte del núcleo VPM.

Nr4a2/Foxa1

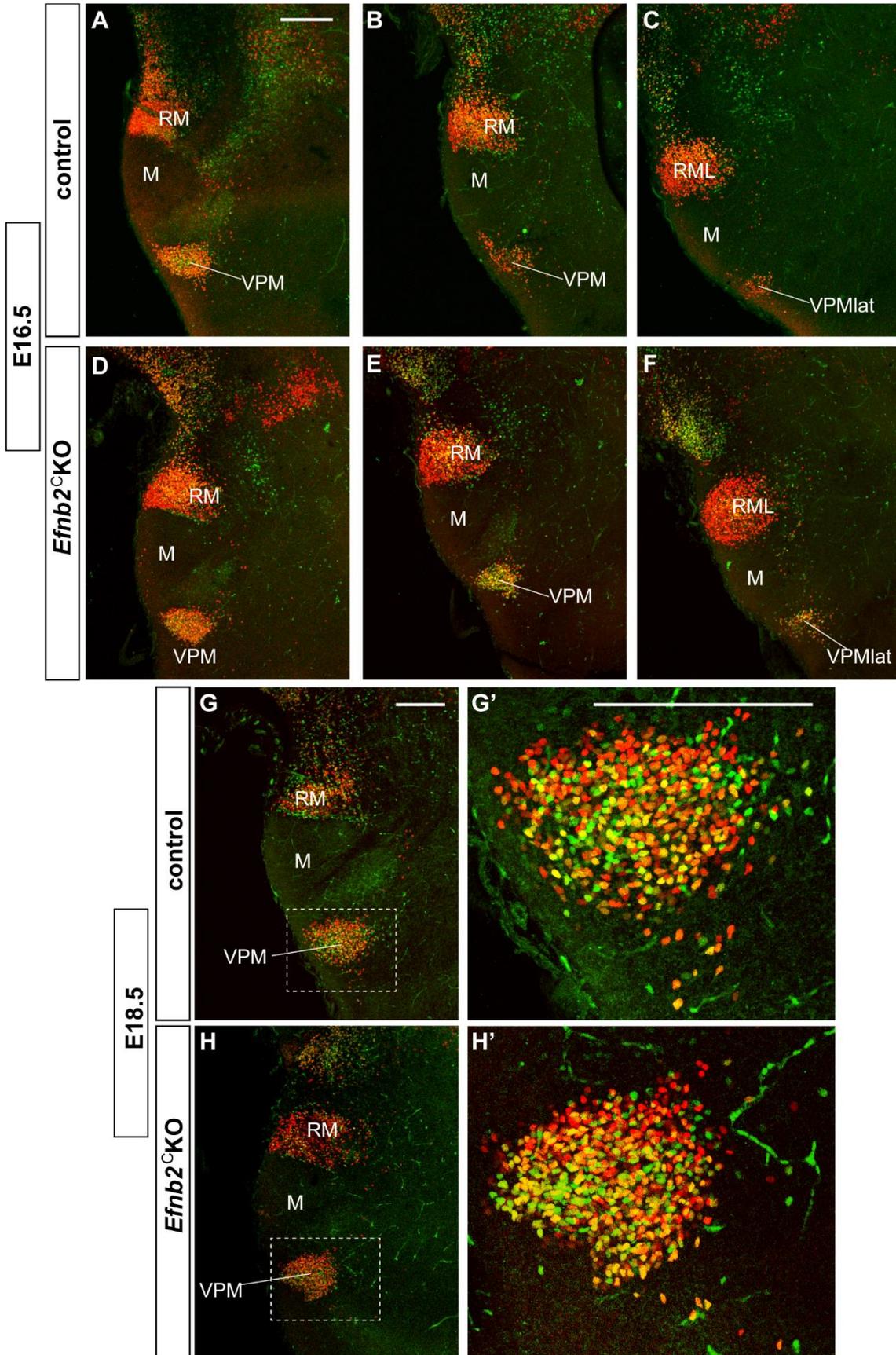


Figura 24. Los ratones *Efnb2*^{CKO} presentan un posicionamiento normal de las células del núcleo VPM en E16.5 y E18.5. Se realizó doble inmunofluorescencia anti-Foxa1 (verde) y anti-Nr4a2 (rojo) en ratones transgénicos *Efnb2*^{CKO}, y controles procedentes de la misma camada, para comparar su fenotipo. **(A-C)** Tres secciones sagitales, desde un nivel medio-lateral hasta un nivel latero-superficial, mostrando el VPM de animales control en el día de desarrollo E16.5. **(D-F)** Tres secciones sagitales de animales *Efnb2*^{CKO}, desde un nivel medio-lateral hasta un nivel latero-superficial, donde se muestra el VPM en el día E16.5. Las secciones análogas del animal control y del *Efnb2*^{CKO} aparecen enfrentadas en la imagen para facilitar la comparación. **(G,H)** Secciones sagitales de niveles equivalentes de un animal control, **(G)** y de un animal *Efnb2*^{CKO} **(H)** en el día E18.5 del desarrollo. **(G', H')** Imágenes de mayor aumento no revelan diferencias cualitativas en el VPM del control y del mutante. Las barras de escala representan 200 μ m.

4.3. Influencia de Fgf8 en las poblaciones del área RM y núcleo VPM

Fgf8 es un morfógeno difusible perteneciente a la familia FGFs. Se ha descrito su papel en la especificación de poblaciones en el telencéfalo y en el istmo. En el hipotálamo se han reportado alteraciones en la formación de la hipófisis en animales hipomorfos para esta proteína, así como poblaciones más reducidas de células peptidérgicas (McCabe y col.,2011; Brooks y col., 2010; Rodríguez y col., 2015). En varios estudios se ha establecido que Fgf8, además de un importante rol en la especificación, también ejerce un papel favoreciendo la proliferación y/o inhibiendo la apoptosis en el cerebro en desarrollo (Kawauchi y col.,2005; Storm y col.,2006; Chung y col.,2016; Botella-López y col.,2019). Además, se ha sugerido un rol de Fgf8 en la regulación de la migración de determinadas poblaciones, como las neuronas GnRH (Tsai y col., 2011).

Se investigó si existe expresión de éste morfógeno Fgf8 y alguno de sus receptores en el hipotálamo basal, con objeto de conocer si esta proteína fuese candidata para regular el desarrollo de las estructuras RM y VPM. Como previamente se ha reportado (Ferran y col., 2015; Díaz y Puelles, 2020), *Fgf8* se expresa en la región acroterminal basal durante E11.5 (Fig.25A). En E13.5 esta

expresión se difumina, permaneciendo en la región acroterminal más ventral, cercana al área M (Fig.25B). La presencia de transcritos *Fgf8* desaparece por completo a E15.5 (datos de Allen Developing Mouse Brain Atlas). Además, tanto en E11.5, como en E13.5 se expresa en la región RM el receptor *Fgfr2*, que responde a la señal *Fgf8* (Fig.25C,D). Este patrón de expresión permite postular a este morfógeno como posible regulador del desarrollo de las poblaciones del área RM.

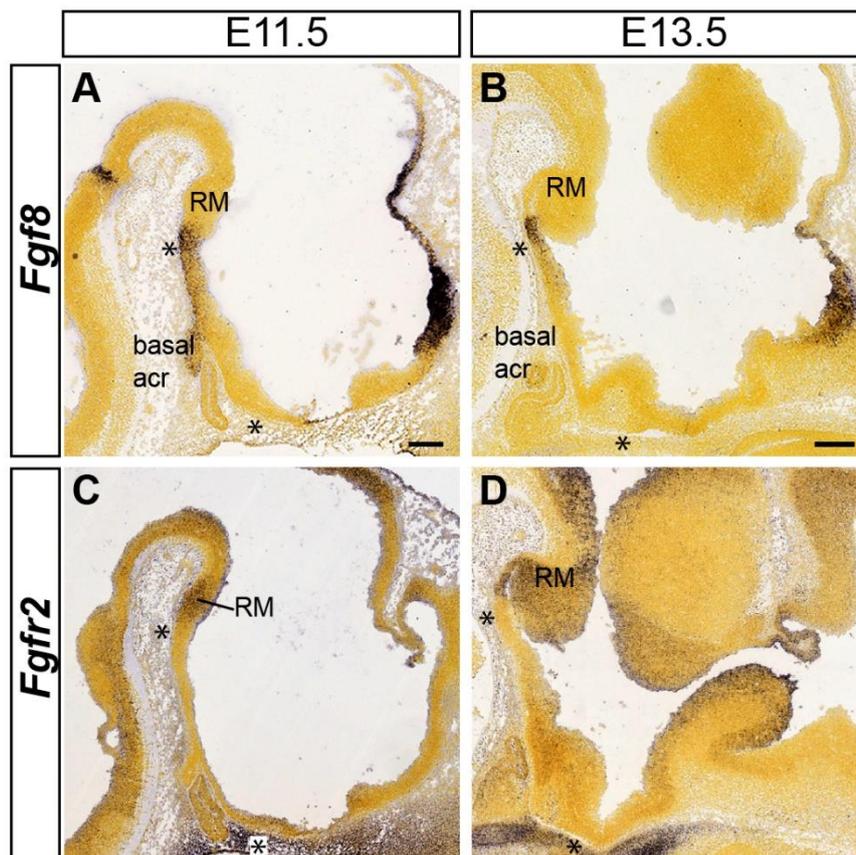


Figura 25. Expresión de *Fgf8* y *Fgfr2* en el desarrollo de ratón. Se muestran secciones sagitales equivalentes de los días E11.5 y E13.5 para cada sonda de hibridación *in situ*, *Fgf8* y *Fgfr2*. (A, B) El punto aproximado donde comienza y donde termina el dominio acroterminal basal está indicado con asteriscos negros. En E13.5 la expresión de *Fgf8* queda restringida ventralmente en comparación con la sección de E11.5. (C, D) Existe expresión en placa del suelo y placa basal hipotálica del receptor *Fgfr2* en los mismos días de desarrollo donde se produce expresión del morfógeno *Fgf8*. Las barras de escala representan 200 μ m.

Para saber si existen alteraciones en el núcleo VPM, se analizaron ratones hipomorfos severos (n=2) en los que los niveles de proteína Fgf8 disponible se encuentran muy reducidos (Meyers y col., 1998). Principalmente se relaciona este morfógeno con fenómenos de especificación, apoptosis y proliferación (Kawauchi y col.,2005; Storm y col.,2006; Chung y col.,2016; Botella-López y col.,2019). Si ocurren fallos en la especificación podría darse una desdiferenciación en las poblaciones del VPM, o alteraciones (indirectas) en su migración, como neuronas ectópicas, o acumulación en el área RM. Los fallos en la proliferación o inhibición de la apoptosis, podrían traducirse en la reducción celular de las poblaciones retromamilares y/o del núcleo VPM.

Se compararon las estructuras RM y VPM mediante doble IF Foxa1/Nr4a2 en ratones *wildtype* y $Fgf8^{neo/null}$ durante E15.5. La totalidad del núcleo VPM aparece más cercano a la línea media en los ratones $Fgf8^{neo/null}$ (Fig.26E-H) que en los *wildtype* (Fig. 26A-D), sugiriendo una atrofia parcial del hipotálamo basal. En el fenotipo mutante, la estructura del área RM presenta un aspecto desorganizado, tanto en niveles mediales como laterales, en relación con los marcadores analizados (Fig.26E-G comparada con Fig.26A-C). Además, existe una disminución notable de la población Foxa1-positiva del área RM y subtalámica en ratones $Fgf8^{neo/null}$ (Fig.26E-H comparada con Fig.26A-C). En línea con esto, la población Foxa1-positiva, normalmente localizada en la parte ventral del VPM, se encuentra muy reducida (Fig.26E' comparada con Fig.26C'). Curiosamente, en estos animales transgénicos hay células dispersas ectópicas en niveles laterales del VPM, estando ausente el VPMLat, que es fácilmente identificable en animales *wildtype* (Fig.26H, H' comparada con Fig.26D, D').

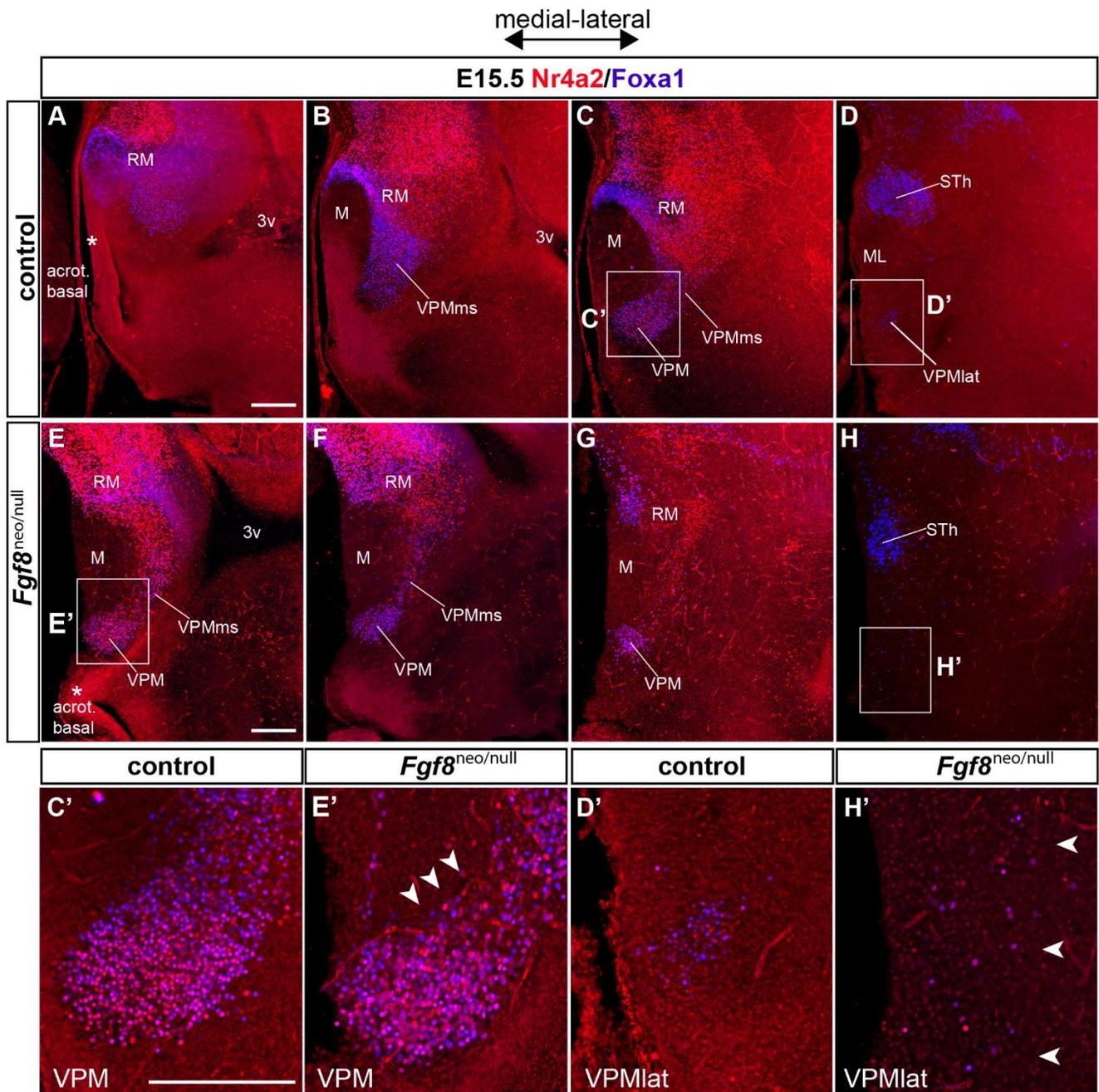


Figura 26. Fenotipo del ratón hipomorfo severo para *Fgf8* (*Fgf8*^{neo/null}) en E15.5. (A-D) Secciones medio-laterales de un embrión control marcado con doble inmunofluorescencia *Foxa1* (azul) y *Nr4a2* (rojo). (E-H) Secciones medio-laterales de un embrión hipomorfo *Fgf8*^{neo/null}, marcado de la misma forma con doble inmunofluorescencia *Foxa1*/*Nr4a2*. Las secciones en E-G corresponden aproximadamente con la sección en C, sugiriendo que parte de la VPMms, y el VPM quedan de manera anómala en una posición más medial. La población más lateral del núcleo VPM no es perceptible de manera organizada en los animales mutantes *Fgf8*^{neo/null}, cuando se compara

con los animales *wildtype*. Además, el núcleo subtalámico (STh) es visiblemente más pequeño en el hipomorfo, con respecto del animal *wildtype* (comparar STh en H con STh en **D**). (**C'**,**D'**,**E'**,**H'**) Las imágenes de mayor aumento de las áreas recuadradas en **C**,**D**,**E**,**H** permiten una comparación más precisa del VPM en animales control e hipomorfos. (**E'**) Aparentemente, la parte ventral del VPM del ratón hipomorfo contiene menos células Foxa1 (cabezas de flecha) que el ratón *wildtype*. (**H'**) El espécimen *Fgf8^{neo/null}* presenta células dispersas en niveles laterales (cabezas de flecha), donde se encuentra el VPM lateral en los animales *wildtype* (**D**, **D'**). Las barras de escala equivalen a 200 μ m.

Se amplió el análisis realizando hibridación *in situ* con la sonda *Foxa1* en hipomorfos de E18.5. Estos animales mostraron una reducción muy significativa del tamaño del cerebro. El patrón alterado continúa en este estadio en las estructuras RM-VPM y su puente de unión, así como en las migraciones de los núcleos STh y PSTh. Siguiendo la serie de secciones (se muestran dos hemisferios de un hipomorfo), se observa lateralmente este complejo nuclear STh/PSTh notablemente más reducido en el mutante (Fig.27B,C comparada con Fig.27A). En el siguiente nivel lateral aparece la población RM que migra para formar el complejo STh/PSTh, también reducida en el mutante (Fig.27E,F comparada con Fig.27D). De manera similar a las observaciones realizadas en E15.5, la parte VPM lateral que se puede identificar en el *wildtype* (asterisco en Fig.27D) no está presente en el ratón *Fgf8^{neo/null}* (asteriscos en Fig.27E,F). En las siguientes secciones se observan el área RM y el núcleo VPM. Ambas son más pequeñas en el ratón hipomorfo (Fig.27H,L comparadas con Fig.27G). La última sección, a nivel medial, muestra en el animal *wildtype* la parte medial o *core* del VPM, así como el puente remanente de su migración conectando con el área RM. En el ratón *Fgf8^{neo/null}*, el *core* del VPM presenta un tamaño muy reducido, así como el puente de conexión. La población Foxa1 del área RM se encuentra severamente reducida en el hipomorfo (flechas rojas en Fig.27K,L comparado con Fig.27J).

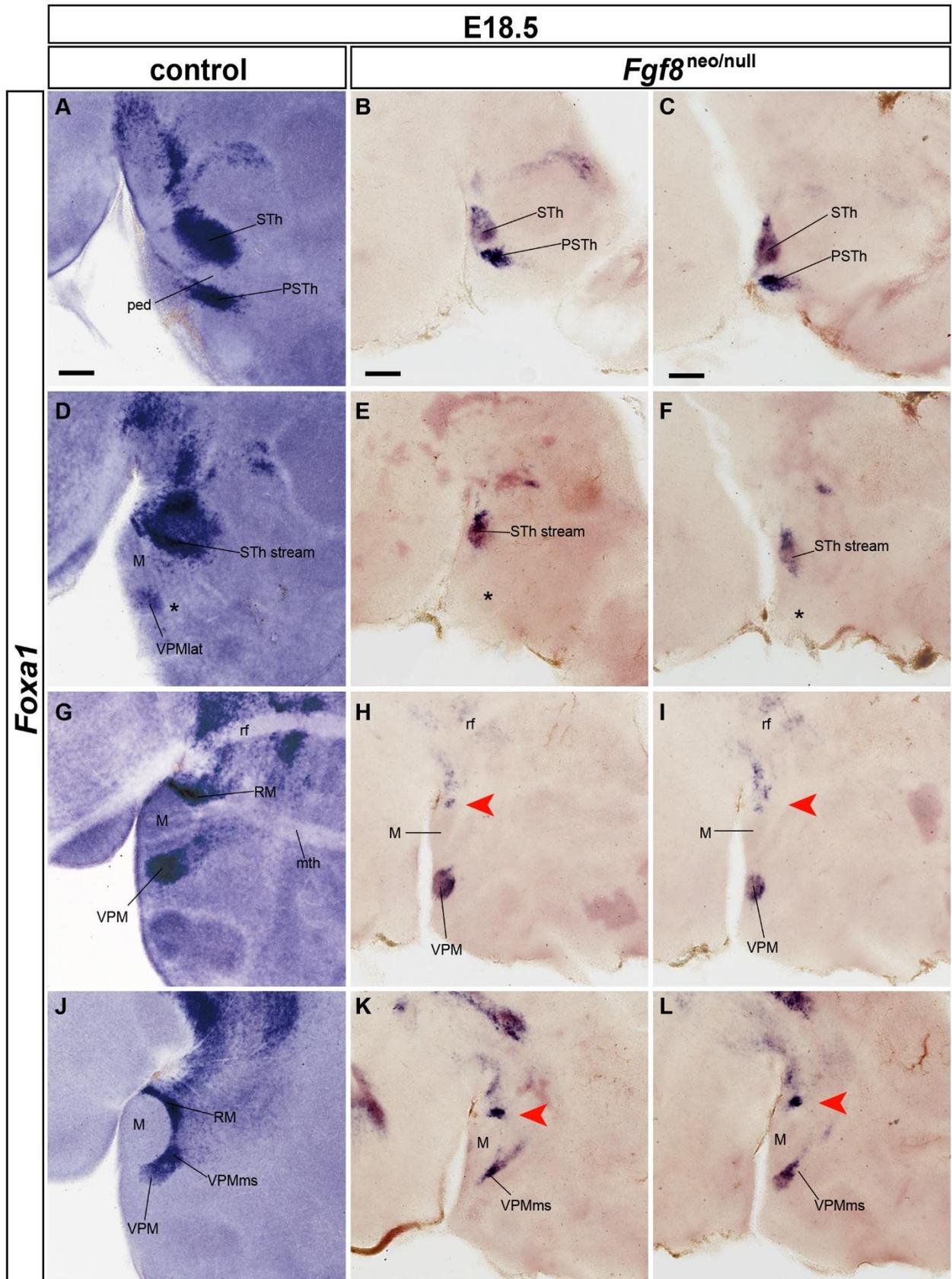


Figura 27. Hipomorfos severos $Fgf8^{neo/null}$ muestran alteraciones en el área RM, y los núcleos VPM, STh y PSTh en E18.5. (A,D,G,J) Secciones sagitales ordenadas latero-medialmente de un embrión *wildtype*, (B,E,H,K) el lado derecho de un embrión $Fgf8^{neo/null}$, y (C,F,I,L) el lado contralateral izquierdo correspondiente al mismo embrión $Fgf8^{neo/null}$. Todos ellos procesados con la sonda *Foxa1* de hibridación *in situ*. Existe una reducción generalizada en el tamaño del mutante comparado con el espécimen *wildtype* (la magnificación es la misma en ambos casos). Los asteriscos negros en E,F indican la ausencia de la porción lateral del VPM, y las cabezas de flecha rojas en H,I,K,L indican la reducción significativa de la celularidad del área RM. Las barras de escala representan 200 μ m

ANEXO RESULTADOS

Tabla S1. Se muestra la clasificación de los 79 experimentos E12.5-E14.5 marcados con CMFDA en cuanto al tipo de inmunofluorescencia que se les realizó (Anti-Nr4a2, anti-Nr4a2/anti-Otp, o anti-Nr4a2/anti-Foxa1), y la posición de su marcaje, fuera de la región retromamilar (RM): perirretromamilar (PRM), mamilar (M), y el borde entre mamilar y retromamilar (M/RM); o en las posiciones definidas en el área RM en el mapa de marcaje diseñado (sección 5.2 en "Material y Métodos): 4 ,3, 2 o 1/C(caudal), M (intermedio), R (rostral), o en el camino de la VPMms (visualizado con el anticuerpo anti-Nr4a2). Se indica si el caso fue positivo (pos), o negativo (neg) para células en migración CMFDA/Nr4a2hacia el área tuberal.

Case number (E12.5- E14.5)	Immunofluorescence			PRM	M	M/RM	Pos. 4	Position 3				Position 2				Position 1				Pos	Neg
	Nr4a2	Nr4a2/Otp	Nr4a2/Foxa1					(RM)	C(RM)	M(RM)	R(RM)	VPMms	C(RM)	M(RM)	R(RM)	VPMms	C(RM)	M(RM)	R(RM)		
C001	X								X												X
C002	X													X						X	
C006	X					X															X
C007	X				X																X
C008	X					X															X
C009	X					X															X
C011	X					X															X
C012	X						X														X
C013	X					X															X
C014	X								X											X	
C015	X					X															X
C017	X												X							X	
C018	X								X											X	
C019	X												X							X	
C020	X								X											X	
C021	X					X															X
C022	X				X																X
C023	X								X											X	
C024	X												X							X	
C025	X								X											X	
C026	X						X														X
C027	X								X											X	
C028														X						X	
C029	X									X										X	

Case number (E12.5- E14.5)	Immunofluorescence			PRM	M	M/RM	Pos4	Position 3				Position 2				Position 1				Pos	Neg			
	Nr4a2	Nr4a2/Otp	Nr4a2/Foxa1					(RM)	C(RM)	M(RM)	R(RM)	VPMms	C(RM)	M(RM)	R(RM)	VPMms	C(RM)	M(RM)	R(RM)			VPMms		
C030	X												X								X			
C031	X					X																X		
C033	X													X								X		
C034	X										X											X		
C035	X					X																	X	
C036	X										X											X		
C037	X										X											X		
C038	X					X																	X	
C039	X												X									X		
C040	X									X												X		
C041	X																	X				X		
C042	X										X											X		
C043	X										X											X		
C044	X										X											X		
C046	X									X												X		
C047	X										X											X		
C048	X														X							X		
C049	X									X												X		
C050		X									X											X		
C051		X					X																X	
C052		X						X															X	
C053		X												X								X		
C054		X							X														X	
C055		X																			X	X		
C057		X									X											X		

Case number (E12.5- E14.5)	Immunofluorescence			PRM	M	M/RM	Pos4	Position 3				Position 2				Position 1				Pos	Neg	
	Nr4a2	Nr4a2/Otp	Nr4a2/Foxa1					(RM)	C(RM)	M(RM)	R(RM)	VPMms	C(RM)	M(RM)	R(RM)	VPMms	C(RM)	M(RM)	R(RM)			VPMms
C058		X							X													X
C059		X			X																	X
C060		X									X										X	
C061		X					X															X
C062		X									X											X
C063		X											X									X
C064		X				X																X
C065		X								X												X
C066		X								X												X
C067		X				X																X
C068		X													X							X
C069		X										X										X
C070	X																X					X
C071	X				X																	X
C072	X														X							X
C073	X									X												X
C074	X													X								X
C075	X					X																X
C076	X																				X	X
C077	X																			X		X
C078	X																X					X
C079	X					X																X
C080	X					X																X
C082	X																X					X
C083	X																X					X

Case number (E12.5- E14.5)	Immunofluorescence			PRM	M	M/RM	Pos4	Position 3				Position 2				Position 1				Pos	Neg	
	Nr4a2	Nr4a2/Otp	Nr4a2/Foxa1					(RM)	C(RM)	M(RM)	R(RM)	VPMms	C(RM)	M(RM)	R(RM)	VPMms	C(RM)	M(RM)	R(RM)			VPMms
C084	X			X																		X
C085			X											X								X
C086			X											X								X
C087			X											X								X
C088			X											X								X

Tabla S2. Se muestra la clasificación de los 17 experimentos E13.5-E15.5 marcados con CMFDA, (todos con inmunofluorescencia anti-Nr4a2/anti-Otp) con relación a la posición de su marcaje, en el área RM (mapa de marcaje diseñado en la sección 5.2 en "Material y Métodos): 4 ,3, 2 o 1/C(caudal), M (intermedio), R (rostral), o en el camino de la VPMms (visualizado con el anticuerpo anti-Nr4a2). Se indica si el caso fue positivo (pos), o negativo (neg) para células en migración CMFDA/Nr4a2 hacia el área tuberal. Las cruces con asterisco identifican los casos en los que se observaron sólo células CMFDA dispersas en el recorrido de la VPMms (identificada con el anticuerpo Nr4a2), sin cruzar la banda PRM/PM, marcada con Otp.

Case number (E13.5- E15.5)	Immunofluorescence	Position 3				Position 2				Position 1				Pos	Neg
		Nr4a2/Otp	C(RM)	M(RM)	R(RM)	VPMms	C(RM)	M(RM)	R(RM)	VPMms	C(RM)	M(RM)	R(RM)		
C089	X						X							X*	
C090	X											X			X
C091	X								X					X	
C092	X							X						X*	
C093	X										X			X*	
C094	X				X									X	
C095	X						X							X	
C096	X		X												X
C097	X			X										X	
C098	X			X										X*	
C099	X				X										X
C100	X										X			X	
C101	X				X									X*	
C102	X				X									X	
C103	X							X						X	
C104	X												X	X	
C105	X			X										X	

DISCUSIÓN

1. Acotación temporal de la migración del núcleo VPM

Los resultados experimentales obtenidos permiten visualizar de manera sencilla la migración rostro-dorsal de células nacidas en el área RM que contienen los factores de transcripción Nr4a2 y Foxa1. Esto corrobora la idea inicialmente expuesta por Puelles y col. (2012), que surgió tras la observación de la extensión rostral de ciertos marcadores retromamilares a partir del día E12.5. Además, otros marcadores propios del área tuberal hipotalámica (el área invadida por las células VPMms en migración) que no se expresan en RM, ofrecen imágenes negativas de la penetración gradual de células VPM. Algunos ejemplos de estos genes son *Nkx2.1*, *Zfmx3* y *Cttnb1*.

En su estudio autorradiográfico del desarrollo hipotalámico de rata, Altman y Bayer (1986) identificaron que el área RM (su núcleo "supramamilar") y los cuerpos mamilares se originaban desde zonas progenitoras diferentes. Sin embargo, no relacionaron el núcleo VPM con la zona RM. Estos autores postularon que el origen de este núcleo tenía lugar en la vecindad del receso mamilar. Asimismo, reportaron una fecha relativamente temprana del nacimiento de las células del VPM, entre los días E13 y E15 en la rata (es interesante remarcar que, según estos autores, a las neuronas que componen los núcleos RM medial y lateral les corresponden una fecha más tardía de nacimiento, entre E15 y E17). Ello podría indicar que las células migratorias del VPM son de las primeras en nacer en el área RM.

La migración tangencial del VPM ocurre durante E12.5. Según nuestros datos experimentales, se trata del momento del desarrollo en el cual la VPMms está más activa. La migración continúa en E13.5 de manera más discreta. Estos datos son compatibles con el estudio autorradiográfico de Shimada y Nakamura (1973) en el que se notifica el nacimiento de las neuronas del VPM entre los días E11.5 y E14.5 en el ratón, período que comprende el pico de neurogénesis de

otras células hipotalámicas tempranas que responden a la leptina, en E12.5 (Ishii y Bouret, 2012).

2. Diversidad de poblaciones retromamilares

El hecho de que, aparentemente, existan varias estructuras hipotalámicas migradas desde el área RM (STh, PSTh, VPM y DPM), además de los dos núcleos retromamilares autóctonos (RMM y RML) ya sugiere que se trata de una región heterogénea en términos de poblaciones de progenitores neurales. Los resultados de este trabajo indican que existen varios tipos celulares tanto en la región RM, como en el propio núcleo VPM.

Los núcleos VPM y DPM comparten la expresión de varios genes (Tabla 9; por ejemplo: *Nr4a2*, *Bcl11a*, *Foxp1*, *Enc1*, *Pknox2*, además de otros relacionados con su perfil glutamatérgico común; Puelles y col., 2012). Otros marcadores están sólo presentes en VPM (Tabla 9) y otros en DPM (*Sim1*, *Fezf2*, *Ebf3*; datos presentes; *Dlk1*, *Synpr1*, *Stxbp6*; Mickelsen y col., 2020). Concordantemente, ambos presentan similitudes y diferencias en cuanto a conectividad y función. El DPM forma parte del circuito relacionado con la respuesta de ocultación o huida ante la exposición a odorantes de depredadores (Cezario y col., 2008). Este núcleo conecta con la porción dorsomedial del núcleo VM y con el núcleo anterior hipotalámico, en el área subparaventricular (SPa), y envía aferencias a la sustancia gris periacueductal (Gross y Canteras, 2012; Canteras y col., 2015). Los datos del presente análisis sugieren que, al menos, una subpoblación del DPM se origina en el área RM, pero se precisa un análisis más profundo enfocado en esta cuestión.

La migración del complejo STh/PSTh (Keyser, 1972, 1979; Marchand, 1987; Altman y Bayer, 1986; Jiao y col., 2000; Martin y col., 2002, 2004; Skidmore y col., 2008), que aparentemente comienza en la parte ventral del dominio RM, sigue

una vía dorsal subpial hasta el dominio RTu, asentándose en una región cercana al límite intrahipotalámico diencefálico (HDB), quedando parcialmente cubierto por el pedúnculo en estadios tardíos. Esta población STh/PSTh es divergente de la población VPM, y sin embargo también presenta similitudes con ella; comparten la expresión de numerosos genes durante el desarrollo (Tabla 9) y ambas poblaciones están constituidas por neuronas glutamatérgicas. Un hecho remarcable es que ratones deficientes en los factores de transcripción Pitx2 (selectivo de los núcleos STh y PSTs) y Foxa1 (en VPM y STh/PSTh) muestran fallos en la migración del complejo STh/PSTh (Martin y col., 2004; Gasser y col., 2016), sin haberse examinado la migración del VPM. En algunas de las imágenes del estudio de Gasser y col., se observan alteraciones en la formación del núcleo VPM, en ratones deficientes en Foxa1, aparentemente no observadas por los autores. El núcleo STh participa regulando el control motor en el circuito directo de los ganglios basales.

El núcleo VPM está involucrado en la regulación de la reproducción a través de las señales olfativas y energéticas, y también ejerce un papel en las respuestas de lucha entre machos de la misma especie (Beltramino y Taleisnik, 1985; Donato y col., 2011; Childs y col., 2021; Stagkourakis y col., 2018; Chen y col., 2020). Presenta conectividad con estructuras de la amígdala, el septo, área preóptica, núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo arcuato y sustancia gris periacueductal, entre otras (Canteras y col., 1992).

Los núcleos autóctonos RMM y RML reciben inputs del giro dentado en el hipocampo (Leranth y Hajszan, 2007), pero también envían conexiones a esta estructura, además de otras, como ciertas estructuras amigdalinas, septales, del área preóptica o del tálamo (Pan y McNaughton, 2004). Se ha relacionado a los núcleos retromamilares con funciones implicadas en el aprendizaje y la memoria espacial, y en la regulación del sueño (Li y col., 2020; Pedersen y col., 2017).

Aunque presenten algunas similitudes, existen claras divergencias en la posición anatómica, conectividad, y funciones de los núcleos RMM/RML, STh, VPM y DPM. Esto apoya la heterogeneidad primaria, previamente mencionada, del área RM. El tiempo relativo de la neurogénesis de estas estructuras puede ser factor clave en la especificación y destino de sus neuronas, originadas aparentemente en sectores muy próximos.

En el propio núcleo VPM existe diversidad de poblaciones neurales reportada recientemente por Mickelsen y col., 2020. Sin embargo, su estudio se realizó en ratón adulto, una vez finalizada la migración tangencial, y atendiendo principalmente a marcadores tardíos del VPM. Por tanto, estos autores no comparan las estructuras VPM y RM, atribuyendo la diversidad celular exclusivamente al núcleo VPM adulto. En el presente análisis, se muestra cierta diversidad celular primaria, en el área RM y en la VPMms, durante la migración tangencial. De manera similar, se ha descrito previamente una migración convergente de distintos tipos neuronales bien definidos en el núcleo interpeduncular de aves y ratón (Lorente-Cánovas y col., 2012; Moreno-Bravo y col., 2014; Ruiz-Reig y col., 2019; García-Guillén y col., 2020).

Los marcadores utilizados en el presente análisis revelan una multiplicidad de tipos celulares en las estructuras de interés. Tempranamente en el desarrollo, se encontraron diferencias en la distribución de los factores de transcripción *Foxa1* y *Nr4a2* en el área RM, así como en la VPMms y, posteriormente, en el emergente núcleo VPM. Aunque existe solapamiento entre ambos marcadores, medio-lateralmente, la señal de *Foxa1* predomina en la zona ventral del área RM, mientras que *Nr4a2* es prominente en su zona dorsal. Esto puede significar que existe una regionalización dorsoventral en el área RM. Además, el mayor número de casos de éxito para la visualización de la migración tangencial (CMFDA) ocurrió cuando se marcó la mitad rostródorsal del área RM. Tanto en el análisis descriptivo, como en los experimentos *in vitro*, se visualizan tres tipos celulares

en función de los marcadores utilizados: Foxa1, o Nr4a2, o Foxa1/Nr4a2. Es importante señalar que, en los experimentos *in vitro*, también aparecen células CMFDA que forman parte de la VPMs y que no contienen los marcadores anteriores, indicativo de que hay células adicionales con perfil molecular distinto, al menos en estadios tempranos.

De este patrón se puede deducir, en primer lugar, que hay tres áreas dorsoventrales en la región RM con relación a los marcadores utilizados, donde la intermedia co-expresa ampliamente Foxa1 y Nr4a2. En E14.5 ya hay diferencias de distribución en el núcleo VPM, que se observan de manera más clara a E18.5. La población *core* del núcleo VPM está constituida por células Foxa1/Nr4a2, así como células Nr4a2. El *core*, está rodeado por un *shell* de células Foxa1, que alcanzan el estrato superficial. En el análisis transcriptómico de Mickelsen y col. (2020) se identifican genes asociados con el *core* de VPM (*Tac1*, *Nos1*, *Calb2*, y *Foxp2*). En segundo lugar, se puede deducir que los elementos migrados, únicamente CMFDA positivos en los experimentos con doble inmunofluorescencia Foxa1/Nr4a2, indican la existencia de más tipos celulares adicionales que forman la VPMs, cuyo perfil molecular no incluye los factores de transcripción Foxa1 o Nr4a2.

En conjunto, los datos obtenidos apuntan a que las células que van a formar el núcleo VPM se originan en subzonas ligeramente separadas en el área RM, dando lugar a distintos tipos celulares, en origen, que participan en la migración tangencial.

Teóricamente, las posibilidades para que en una misma estructura existan distintas poblaciones celulares pueden ser diversas. Por ejemplo, puede establecerse una regionalización retromamilar ventrodorsal o rostrocaudal ocasionada por las señales procedentes de la placa del suelo o de la región acroterminal (Puelles y Rubenstein, 2015; Díaz y Puelles, 2020). También es posible la interacción inhibitoria entre células neuroepiteliales, que ocasiona un

patrón de “sal y pimienta” de diferentes progenitores uniformemente distribuidos (Sjöqvist y Anderson, 2019). Alternativamente, se puede producir un número limitado de progenitores neurales en distintas microzonas del área RM, que sólo tras haber completado sus migraciones (por ejemplo, en el caso de VPM o STh) dan lugar a un número mayor de tipos neuronales en función de influencias epigenéticas (trofismo, señales locales, señales retrógradas). La mayoría de los marcadores genéticos que definen los tipos celulares en el núcleo VPM (Mickelsen y col. 2020) son expresados una vez que su migración ha finalizado. Sería interesante determinar si las diferencias en la distribución de los factores *Foxa1* y *Nr4a2* derivan en diferentes fenotipos neuronales en el núcleo VPM adulto.

3. La migración del núcleo VPM en el modelo prosomérico

Asumiendo la histogénesis radial como el patrón fundamental del desarrollo nuclear en el hipotálamo, Altman y Bayer (1978, 1986) postularon el neuroepitelio del receso mamilar (algunas veces identificado en la literatura como “receso tuberomamilar”) como nicho de los progenitores neurales de los núcleos VPM y DPM. Sin embargo, los datos presentes demuestran un origen RM del primero y sugieren que, al menos en parte, el último también se origina en este dominio. En años recientes, diversos estudios en el hipotálamo han puesto el foco en la importancia de las migraciones tangenciales que tienen lugar de origen o destino en el hipotálamo basal (Zhao y col., 2008; Alvarez-Bolado, 2019; Morales-Delgado y col. 2011, 2014; Skidmore y col. 2008; Puelles y col. 2012; Díaz y col. 2015; Murcia-Ramón y col. 2020). Por tanto, esta posibilidad tiene que considerarse en cualquier análisis neurogénico.

El área RM se definió en la rata como “área supramamilar” por Gurdjian (1927), término que refleja el uso del clásico modelo columnar del cerebro. En este modelo, el hipotálamo es considerado en su totalidad como una columna longitudinal ventral del diencéfalo, con su nivel más caudal ocupado por las

regiones M y RM. El eje longitudinal en este modelo pasa paralelo al hipotálamo, terminando en el telencéfalo (Swanson, 2012).

En el presente análisis se ha usado como referencia el modelo prosomérico actualizado de Puelles y col. (2012), y Puelles y Rubenstein (2015), cuyo eje longitudinal es ortogonal al del modelo columnar en el hipotálamo. Esta revisión conceptual sienta sus bases en: (1) el análisis de marcadores genéticos de la línea media ventral longitudinal, que reflejan una inducción temprana de la placa del suelo por parte de la notocorda subyacente. Estrictamente, la placa del suelo no llega más allá del área mamilar (Fig.1B; Puelles y col., 2012, 2013, 2015); (2) el mapa destino que demuestra el final rostral de la placa del techo longitudinal fusionada durante la neurulación en el cruce medio de la comisura anterior (Fig.1B; Puelles y col., 1987; Cobos y col., 2001). Estos dominios únicos mediales y longitudinales (placas del suelo y del techo), ya son identificables en estadios de placa neural, y son fuente de señales ventralizantes y dorsalizantes que difunden en el tubo neural. Esta interacción antagónica dorsoventral, establece secundariamente, las placas longitudinales alar y basal, así como el límite entre ambas. Antiguamente, este límite era situado siguiendo características secundarias, tales como la diferenciación precoz de la placa basal para definir el surco limitante de His, paralelo al surco ventral diencefálico, terminando en el telencéfalo. Sin embargo, los datos moleculares definen mucho antes este límite según la expresión génica de determinados marcadores como *Nkx2.2*; *Nkx2.9* y *Ptc1*, entre otros. En este lugar existe un equilibrio entre efectos ventralizantes vs. dorsalizantes (Puelles y col., 2012; Puelles y Rubenstein, 2015).

El modelo prosomérico, incluye en el hipotálamo un dominio rostromedial y dorsoventral, nombrado "acroterminal" (Puelles y col. 2012; azul en Fig.1B y Fig.3). La parte basal de este dominio acroterminal incluye ciertas estructuras particulares, como el área anterobasal, la eminencia media, el infundíbulo, la neurohipófisis, el receso tuberomamilar y las partes rostromediales de la banda

perimamilar y el área mamilar. El modelo prosomérico asume una influencia de las señales ventralizantes procedentes de la placa del suelo (Por ejemplo, SHH) en la especificación de las áreas RM y M. De esta forma se puede explicar el patrón, topológicamente paralelo, de los dominios longitudinales (TuD, TuI, TuV, PM, M y suelo M). De manera similar, el dominio acroterminal es fuente de los morfógenos rostralizantes de la familia FGF (Puelles, 2017; Díaz y Puelles, 2020), lo que podría, al menos parcialmente, explicar las diferencias rostrocaudales entre Tu y RTu, PM y PRM o M y RM.

Los nombres de los núcleos “premamilar ventral” (VPM) y “premamilar dorsal” (DPM) reflejan el uso del modelo columnar, en el que la migración del núcleo VPM avanzaría en dirección ventral, mientras que la del STh lo haría en dirección rostral. Los dominios PM/PRM y Tu/RTuV no se identifican en este esquema clásico. Para evitar confusión, se han mantenido los nombres clásicos de los núcleos, excepto el actual RM (en Puelles y col., 2012 y Puelles, 2019 se tratan estos problemas de incoherencias semánticas en el cerebro).

En la región terminal del hipotálamo basal, las células que van a formar el núcleo VPM cruzan oblicualmente el dominio PM (*Otp* positivo). Algunos elementos de la VPMs en el adulto parecen “desplazar” a las neuronas histaminérgicas (*Hdc*-positivas) características de la banda TuV (El dominio RTuV/TuV también es conocido en la literatura como “tuberomamilar), mientras que otras células del VPM sobrepasan este estrecho dominio. Tanto la banda PM como la banda TuV rodean dorsalmente a los cuerpos mamilares (Shimogori y col., 2010; Puelles y col., 2012). Estas bandas curvadas, constituyen dominios topológicos longitudinales, que representan la regionalización dorsoventral del hipotálamo (Tu/RTu>dorsal a PM/PRM>dorsal a M/RM>dorsal a la placa del suelo).

La mayoría de las migraciones tangenciales en el cerebro siguen una vía longitudinal, o transversal desde su área de origen, realizando un movimiento

paralelo a alguno de los ejes (por ejemplo, las migraciones de la oliva inferior y del labio rómbico pontino; del núcleo motor facial y otras migraciones de motoneuronas; migraciones interpedunculares; células subpaliales migrando al palio). Por ejemplo, la migración del núcleo subtalámico emerge del mismo prosómero, hp1, dirigiéndose en dirección estrictamente dorsal, hacia RTu, en una vía transversal al eje longitudinal y paralela al límite intrahipotalámico. Sin embargo, se sabe que las neuronas que forman algunos de los núcleos ístmicos sí migran de manera oblicua (Puelles y Martínez-de-la-Torre, 1987).

Una explicación posible para el caso del núcleo VPM sería la presencia de un elemento atractor rostral sumado al hipotético atractor dorsal que ocasionaría el movimiento de las células del STh y PSTh (se trataría de un vector de movimiento resultante de la suma de dos vectores, uno en dirección dorsal y otro predominante en dirección rostral). Estas células no avanzan estrictamente en dirección rostral, en cuyo caso, su localización final estaría dentro del área M, esquivada en todo momento por la VPMms. Es plausible, por tanto, que en esta zona M pueda haber una señal no permisiva para la entrada de estas células que forman el VPM.

Además, la VPMms avanza periventricularmente y diverge lateralmente en TuV-Tul, donde las neuronas Foxa1 (negativas para Nr4a2) alcanzan el estrato superficial, formando el "shell" o porción lateral del VPM (VPMlat). Es posible que la VPMms alcance el límite entre THy y acroterminal, y que ésta última zona constituya un territorio no permisivo para esta corriente celular. El infundíbulo representa la estructura medial acroterminal que se sitúa más cercana al VPM, y queda completamente despejado de este tipo de células. Además, en esta zona existe variabilidad de expresión de moléculas relacionadas con la adhesión y la migración (proteínas de la familia de ligandos de ephrin_s y sus receptores Eph_s, netrinas_s, slit_s, etc). Es lógico pensar que ha de existir interacción entre las células

VPM y otros tipos celulares que asistan a esta población para alcanzar su lugar correcto.

4. Posible mecanismo complejo en la regulación de la migración del VPM

En el presente estudio se ha analizado la expresión en hipotálamo basal del ligando ephrin-B2, y las proteínas Netrina-1 y DCC, así como el fenotipo de animales deficientes en cada una de ellas. Aunque los patrones de expresión de todas ellas las hacen buenas candidatas en la regulación de la migración o posicionamiento de las células del VPM, no se encontraron diferencias en esta estructura entre los animales mutantes y los animales control. Es posible que existan mecanismos redundantes que controlen la migración, y la deficiencia de una sola proteína no sea crucial para el posicionamiento del núcleo. Por ejemplo, existe expresión más amplia de ligandos de la familia de las ephrins y sus receptores en las áreas RM y M y sus alrededores (*Efna5, Efnb3, Eph-A8, Eph-B2; Allen Developing Mouse Brain Atlas*). Sería interesante realizar un diseño experimental en el que varias de estas moléculas fueran bloqueadas en esta región.

La Netrina-1 es una proteína secretada por células de placa del suelo a lo largo del tubo neural y parte de la placa basal hipotalámica. La respuesta celular ante esta proteína puede ser de atracción o repulsión en función de sus receptores. Por ejemplo, DCC principalmente genera una respuesta atractiva hacia la fuente de Netrina-1, mientras que los receptores de la familia Unc5 generan una respuesta de repulsión (Yamagishi y col.,2021). Durante el desarrollo, DCC se expresa en el área RM. Puesto que hay expresión de *Ntn1* en la zona terminal de la placa basal hipotalámica, se postuló que la vía Ntn1/DCC podría regular la migración de las neuronas del VPM, favoreciéndola. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los fenotipos mutantes y control. De manera similar a lo que ocurría con la familia de las ephrins, existe expresión de otras

proteínas de la familia de las netrinas que podrían tener una acción redundante, por lo que la pérdida de una de ellas no afectaría al fenotipo. La Netrina-G2 se expresa en este territorio ventral en el hipotálamo basal. Previamente se ha relacionado esta proteína con defectos en migraciones radiales corticales (Heimer y col.,2020). Además, el receptor *Unc5d* de las netrinas se expresa en el área RM en el momento que tiene lugar la migración del VPM (Datos de *Eurexpress Atlas*, datos de *Allen Developing Mouse Brain Atlas*). Por otro lado, los experimentos realizados por Tsuchiya y col. (2009) revelan un posible rol de la Netrina-1 actuando como señal atractiva para los axones de los tractos mamilotegmental y mamilotalámico.

Además de las familias señalizadoras previamente mencionadas, cabe destacar la expresión amplia de genes Slit/Robo en el hipotálamo en desarrollo (Romanov y col.,2020), moléculas relacionadas con fenómenos de repulsión. Sería interesante profundizar en el posible rol de estas proteínas de señalización en las diversas migraciones tangenciales que tienen lugar en el hipotálamo durante el desarrollo, puesto que actualmente hay poca información sobre este tema en la literatura.

5. Fgf8 en el desarrollo del núcleo VPM

En el análisis fenotípico de los ratones hipomorfos severos $Fgf8^{neo/null}$, se encontró una reducción general de células en RM, VPMms y VPM, así como de las poblaciones vecinas STh/PSTh. Esta reducción principalmente afectó a la población Foxa1. Sin embargo, el VPM aparece en la zona terminal del hipotálamo (hp2) de igual manera que en los animales control, indicativo de que la migración tangencial se sigue produciendo. El borde RM de células Foxa1 tiene forma de "arco" rodeando los cuerpos mamilares en especímenes *wildtype*. En contraste, en los animales $Fgf8^{neo/null}$, sólo queda una población residual de células Foxa1 en secciones sagitales medio-laterales del hipotálamo. Además, en especímenes de E15.5 existe una desorganización generalizada de las células

retromamilares. En estos hipomorfos, la sección lateral, VPMLat, aparentemente es sustituida por células dispersas.

Varios estudios han notificado el rol de Fgf8 en la especificación de ciertos dominios neuroepiteliales a través de la regulación de algunos factores de transcripción: en el telencéfalo (Garel y col., 2003; Storm y col., 2006); tálamo (Botella-López y col., 2019), e istmo (Martínez y col., 1999; Liu y col., 1999). La acción de Fgf8 en el mantenimiento de la proliferación y/o disminución de la apoptosis de ciertas áreas está bien establecida (Kawauchi y col., 2005; Storm y col., 2006; Chung y col., 2016; Botella-López y col., 2019). Además, Tsai y col., (2011) comentan un posible rol de Fgf8 favoreciendo procesos de migración neuronal, que podría ser indirecto, como consecuencia de su acción positiva en la proliferación celular y en el crecimiento axonal. Estudios previos reportaron alteraciones en la pituitaria y en neuronas hipotalámicas productoras de péptidos en ratones hipomorfos para Fgf8 (Brooks y col., 2012; McCabe y col., 2011; Rodriguez y col., 2015). No es sorprendente que este morfógeno desempeñe un papel en el desarrollo del hipotálamo, dado su alto nivel de expresión en el dominio acroterminal (junto con otros miembros de la familia FGF; Ferran y col., 2015; Díaz y Puelles, 2020). Además, el receptor de FGFs, Fgfr2, está ampliamente distribuido en la placa basal hipotalámica.

Aunque existe una reducción generalizada en la celularidad, el núcleo VPM, aparece situado en la región Tu, de la misma manera que en los ratones control y *wildtype*. No hay una acumulación masiva de células ectópicamente. No obstante, sí se observa, lateralmente una dispersión de células en niveles donde se debería observar la sección lateral del VPM bien organizada. La reducción del número de las células Foxa1 en el área RM puede indicar una disminución en la proliferación o una excesiva apoptosis en esta zona, lo que podría explicar la distorsión en la forma de las estructuras derivadas de esta región y la desorganización de sus elementos. La afectación del VPMLat y la dispersión de

algunas células en nivel puede ser explicado por un efecto directo en la migración, o indirectamente, debido a la distorsión de la placa basal hipotalámica. Previamente se ha identificado que Fgf8 puede actuar favoreciendo la migración de determinadas células como oligodendrocitos (Cruz-Martínez y col., 2014) o células de la cresta neural (Dunkel y col., 2020). Este defecto en la organización de VPMLat, también puede ser explicado indirectamente, por una alteración en la especificación rostro-caudal de los territorios M/RM, lo que podría ocasionar el paso de las células RM por la región M. Hay que tener en cuenta que los ratones Fgf8^{neo/null} poseen algo de morfógeno funcional (alrededor del 20%) que puede ser suficiente para permitir el desarrollo de una migración del VPM casi normal.

CONCLUSIONES

1. El núcleo VPM es una estructura retromamilar en origen, cuyas neuronas realizan una migración tangencial desde este dominio progenitor hasta la zona TuV/TuL. Esta vía migratoria oblicua, no sólo supone un aporte celular interprosomérico en dirección rostral, sino que también implica un cambio ventro-dorsal en la posición final de los componentes del núcleo VPM.
2. El núcleo VPM muestra heterogeneidad celular primaria durante su migración, y también posteriormente, diferenciándose la porción central que forma el VPMc, de la porción lateral más superficial que forma el *shell* (VPMlat).
3. Tanto los marcadores analizados, como la zona RM rostródorsal desde la que arranca la VPMms, sumados al origen ventral de la migración del núcleo STh, sugieren que existe una regionalización dentro de éste área RM.
4. Probablemente existe una regulación compleja de las migraciones tangenciales producidas en la región ventral del hipotálamo basal, dada la variedad de expresión de moléculas implicadas en la repulsión y atracción, y los eventos migratorios de comienzan en este territorio durante el desarrollo.
5. El factor de crecimiento fibroblástico Fgf8 participa en el desarrollo del área RM y el núcleo VPM, posiblemente impidiendo la muerte neuronal o promoviendo la proliferación en este territorio. Su acción, directa o indirecta, está involucrada con el posicionamiento correcto de las células de la sección lateral del VPM (VPMlat).

CONCLUSIONS

1. The VPM nucleus is a retromamillar structure in origin, whose neurons migrate tangentially towards the TuV/Tul zone. This oblique migration path not only supposes an interprosomic cellular contribution, but also implies a ventro-dorsal change in the final position of the VPM neurons.
2. The VPM nucleus shows primary cellular heterogeneity during its migration, and later, differentiating the central portion that forms the VPMc, from the more superficial lateral portion that forms the shell (VPMlat).
3. The analyzed markers, and the rostro-dorsal RM zone from which the VPMs starts, added to the ventral origin of the STh migration, suggest a regionalization within the RM area.
4. A complex regulation of tangential migrations produced in the ventral region of the basal hypothalamus is presumable, given the expression patterns of genes involved in repulsion and attraction in this territory.
5. The fibroblast growth factor *Fgf8* participates in the development of the RM area and the VPM nucleus, possibly preventing neuronal death or promoting proliferation in this territory. A direct, or indirect role of *Fgf8* is involved in the correct positioning of the cells of the lateral section of the VPM (VPMlat).

BIBLIOGRAFÍA

- Alifragis, P., Parnavelas, J.G., Nadarajah, B. (2002). A novel method of labeling and characterizing migrating neurons in the developing central nervous system. *Exp. Neurol.* 74, 259-265. doi: 10.1006/exnr.2002.7870
- Altman, J., Bayer, S.A. (1978). Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 182, 945-971. doi: 10.1002/cne.901820511
- Altman, J., Bayer, S.A. (1986). The development of the rat hypothalamus. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 100, 1–178.
- Alvarez-Bolado, G., Zhou, X., Cecconi, F., Gruss, P. (2000). Expression of Foxb1 reveals two strategies for the formation of nuclei in the developing ventral diencephalon. *Dev. Neurosci.* 22, 197-206. doi: 10.1159/000017442
- Alvarez-Bolado, G., Paul, F.A., Blaess, S. (2012). Sonic hedgehog lineage in the mouse hypothalamus: from progenitor domains to hypothalamic regions. *Neural Dev.* doi: 10.1186/1749-8104-7-4.
- Alvarez-Bolado, G. (2019). Development of neuroendocrine neurons in the mammalian hypothalamus. *Cell Tiss. Res.* 375, 23-39. doi: 10.1007/s00441-018-2859-1
- Aslanpour, S., Han, S., Schuurmans, C., Kurrasch, D.M. (2020). Neurog2 acts as a classical proneural gene in the ventromedial hypothalamus and is required for the early phase of neurogenesis. *J. Neurosci.* 40, 3549-3563. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2610-19.2020
- Bilella, A., Alvarez-Bolado, G., Celio, M.R. (2014). Coaxiality of Foxb1- and parvalbumin-expressing neurons in the lateral hypothalamic PV1-nucleus. *Neurosci. Lett.* 566, 111-114. doi: 10.1016/j.neulet.2014.02.028

- Bilella, A., Alvarez-Bolado, G., Celio, M.R. (2016). The Foxb1-expressing neurons of the ventrolateral hypothalamic parvafox nucleus project to defensive circuits. *J. Comp. Neurol.* 524, 2955-2981. doi: 10.1002/cne.24057
- Botella-López, A., Garcia-Lopez, R., Pombero, A., Martinez, S. (2019). Radial glia fibers translate Fgf8 morphogenetic signals to generate a thalamic nuclear complex protomap in the mantle layer. *Brain Struct. Funct.* 224, 661-679. doi: 10.1007/s00429-018-1794-y
- Beltramino, C., Taleisnik, S. (1985). Ventral premammillary nuclei mediate pheromonal-induced LH release stimuli in the rat. *Neuroendocrinology.* 41, 119-124. doi: 10.1159/000124164
- Botella-López, A., Garcia-Lopez, R., Pombero, A., Martinez, S. (2019). Radial glia fibers translate Fgf8 morphogenetic signals to generate a thalamic nuclear complex protomap in the mantle layer. *Brain Struct. Funct.* 224, 661-679. doi: 10.1007/s00429-018-1794-y
- Brignani, S., Pasterkamp, R.J. (2017). Neuronal Subset-Specific Migration and Axonal Wiring Mechanisms in the Developing Midbrain Dopamine System. *Front. Neuroanat.* doi: 10.3389/fnana.2017.00055
- Brooks, L.R., Chung, W.C., Tsai, P.S. (2010). Abnormal hypothalamic oxytocin system in fibroblast growth factor 8-deficient mice. *Endocrine.* 38, 174-180. doi: 10.1007/s12020-010-9366-9
- Canteras, N.S., Simerly, R.B., Swanson, L.W. (1992). Projections of the ventral premammillary nucleus. *J. Comp. Neurol.* 324, 195-212. doi: 10.1002/cne.903240205
- Canteras, N.S., Pavesi, E., Carobrez, A.P. (2015). Olfactory instruction for fear: neural system analysis. *Front. Neurosci.* doi: 10.3389/fnins.2015.00276

- Cara, A.L., Myers, M.G., Elias, C.F. (2020). Lack of AR in LepRb Cells Disrupts Ambulatory Activity and Neuroendocrine Axes in a Sex-Specific Manner in Mice. *Endocrinology*. doi: 10.1210/endo/bqaa110
- Cavalcante, J.C., Bittencourt, J.C., Elias C.F. (2014). Distribution of the neuronal inputs to the ventral premammillary nucleus of male and female rats. *Brain Res.* 1582, 77-90. doi: 10.1016/j.brainres.2014.07.034
- Celio, M.R. (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*. 35, 375-475. doi: 10.1016/0306-4522(90)90091-h
- Cezario, A.F., Ribeiro-Barbosa, E.R., Baldo, M.V., Canteras N.S. (2008). Hypothalamic sites responding to predator threats-- the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1003-1015. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06392.x
- Chédotal, A., Del Rio, J.A., Ruiz, M., He, Z., Borrell, V., de Castro, F., Ezan, F., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., Soriano, E. (1998). *Development*. 125, 4313-4323.
- Chen, A.X., Yan, J.J., Zhang, W., Wang, L., Yu, Z.X., Ding, X.J., Wang, D.Y., Zhang, M., Zhang, Y.L., Song, N., Jiao, Z.L., Xu, C., Zhu, S.J., Xu, XH. (2020). Specific Hypothalamic Neurons Required for Sensing Conspecific Male Cues Relevant to Inter-male Aggression. *Neuron*. 108, 763-774. doi: 10.1016/j.neuron.2020.08.025
- Chen, J., Du, H., Zhang, Y., Chen, H., Zheng, M., Lin, P., Lan, Q., Yuan, Q., Lai, Y., Pan, X., Chen, R., Liu, N. (2017). Netrin-1 Prevents Rat Primary Cortical Neurons from Apoptosis via the DCC/ERK Pathway. *Front. Cell Neurosci.* doi: 10.3389/fncel.2017.00387

- Chi, C.L., Martinez, S., Wurst, W., Martin, G.R. (2003). The isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development*. 130, 2633–2644. doi: 10.1242/dev.00487
- Childs, G.V., Odle, A.K., MacNicol, M.C., MacNicol, A.M. (2021). The Importance of Leptin to Reproduction. *Endocrinology*. doi: 10.1210/endocr/bqaa204
- Chumley, M.J., Catchpole, T., Silvany, R.E., Kernie, S.G., Henkemeyer, M. (2007). EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* 27, 13481-13490. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4158-07.2007
- Chung, W.C., Linscott, M.L., Rodriguez, K.M., Stewart, C.E. (2016). The regulation and function of fibroblast growth factor 8 and its function during gonadotropin-releasing hormone neuron development. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. doi: 10.3389/fendo.2016.00114
- Cobos, I., Shimamura, K., Rubenstein, J.L., Martínez, S., Puellas, L. (2001). Fate map of the avian anterior forebrain at the four-somite stage, based on the analysis of quail-chick chimeras. *Dev. Biol.* 239, 46-67. doi: 10.1006/dbio.2001.0423
- Crossley, P.H., Martin, G.R. (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*. 121, 439-451
- Crossley, P.H., Martinez, S., Ohkubo, Y., Rubenstein, J.L. (2001). Coordinate expression of *Fgf8*, *Otx2*, *Bmp4*, and *Shh* in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience*. 108, 183-206. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00411-0
- Cruz-Martinez, P., Martinez-Ferre, A., Jaramillo-Merchán, J., Estirado, A., Martinez, S., Jones, J. (2014). FGF8 activates proliferation and migration in mouse post-natal oligodendrocyte progenitor cells. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0108241

- Davy, A., Soriano, P. (2007). Ephrin-B2 forward signaling regulates somite patterning and neural crest cell development. *Dev. Biol.* 304, 182-193. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.12.028
- Del Giacco, L., Sordino, P., Pistocchi, A., Andreakis, N., Tarallo, R., Di Benedetto, B., Cotelli, F. (2006). Differential regulation of the zebrafish orthopedia 1 gene during fate determination of diencephalic neurons. *BMC Dev. Biol.* doi: 10.1186/1471-213X-6-50
- Díaz, C., Morales-Delgado, N., Puellas, L. (2015). Ontogenesis of peptidergic neurons within the genoarchitectonic map of the mouse hypothalamus. *Front. Neuroanat.* doi: 10.3389/fnana.2014.00162
- Diaz, C., Puellas, L. 2020. Developmental genes and malformations in the hypothalamus. *Front. Neuroanat.* doi: 10.3389/fnana.2020.607111
- Donato, J. Jr., Elias, C.F. (2011). The ventral premammillary nucleus links metabolic cues and reproduction. *Front. Endocrinol.* doi: 10.3389/fendo.2011.00057
- Donato, J. Jr., Cravo, R.M., Frazão, R., Gautron, L., Scott, M.M., Lachey, J., Castro, IA., Margatho, L.O., Lee, S., Lee, C., Richardson, J.A., Friedman, J., Chua, S. Jr., Coppari, R., Zigman, J.M., Elmquist, J.K., Elias, C.F. (2011). Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J. Clin. Invest.* 121, 355-368. doi: 10.1172/JCI45106
- Dunkel, H., Chaverra, M., Bradley, R., Lefcort, F. (2020). FGF signaling is required for chemokinesis and ventral migration of trunk neural crest cells. *Dev. Dyn.* 249, 1077-1097. doi: 10.1002/dvdy.190
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell.* 75, 1417-1430. doi: 10.1016/0092-8674(93)90627-3

- Elmqvist, J.K., Bjørbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., Saper, C.B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 395, 535-547.
- Ericson, J., Norlin, S., Jessell, T.M., and Edlund, T. (1998). Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development.* 125, 1005–1015.
- Ferran, J.L., Puellas, L., Rubenstein, J.L. (2015). Molecular codes defining rostrocaudal domains in the embryonic mouse hypothalamus. *Front. Neuroanat.* doi: 10.3389/fnana.2015.00046
- Fu, T., Towers, M., Placzek, M.A. (2017). Fgf10+ progenitors give rise to the chick hypothalamus by rostral and caudal growth and differentiation. *Development.* 144, 3278-3288. doi: 10.1242/dev.153379
- García-Calero, E., Fernández-Garre, P., Martínez, S., Puellas, L. (2008). Early mammillary pouch specification in the course of prechordal ventralization of the forebrain tegmentum. *Dev. Biol.* 320, 366-377. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.05.545
- García-Guillén, I.M., Alonso, A., Morales-Delgado, N., Andrés, B., Puellas, L., López-Bendito, G., Marín, F., Aroca, P. (2020). Netrin-1/DCC signaling differentially regulates the migration of Pax7, Nkx6.1, Irx2, Otp, and Otx2 cell populations in the developing interpeduncular nucleus. *Front. Cell. Dev. Biol.* doi: 10.3389/fcell.2020.588851
- Garel, S., Marín, F., Mattéi, M.G., Vesque, C., Vincent, A., Charnay, P. (1997). Family of Ebf/Olf-1-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system. *Dev. Dyn.* 210, 191-205. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199711)210:3<191::AID-AJA1>3.0.CO;2-B

- Garel, S., Huffman, K.J., Rubenstein, J.L. (2003). Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in *Fgf8* hypomorphic mutants. *Development*. 130, 1903-1914. doi: 10.1242/dev.00416
- Gasser, E., Johannssen, H.C., Rülcke, T., Zeilhofer, H.U., Stoffel, M. (2016). *Foxa1* is essential for development and functional integrity of the subthalamic nucleus. *Sci. Rep.* doi: 10.1038/srep38611
- Gilbert, M.S. (1935). The early development of the human diencephalon. *J. Comp. Neurol.* 62, 81-116.
- Goulding, M.D., Lumsden, A., Gruss, P. (1993). Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development*. 117,1001-1016.
- Goodman, T., Nayar, S.G., Clare, S., Mikolajczak, M., Rice, R., Mansour, S., Bellusci, S., Hajihosseini, M.K. (2020). Fibroblast growth factor 10 is a negative regulator of postnatal neurogenesis in the mouse hypothalamus. *Development*. doi: 10.1242/dev.180950
- Gross, C.T., Canteras, N.S. (2012). The many paths to fear. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 651-658. doi: 10.1038/nrn3301
- Gurdjian, E.S. (1927). The diencephalon of the albino rat. *Studies on the brain of the rat. J. Comp. Neurol.* 43,1-144.
- Hatten, M.E. (2002). New directions in neuronal migration. *Science*. 297, 1660-1663. doi: 10.1126/science.1074572
- Heide, M., Zhang, Y., Zhou, X., Zhao, T., Miquelajáuregui, A., Varela-Echavarría, A., Alvarez-Bolado, G. (2015). *Lhx5* controls mamillary differentiation in the developing hypothalamus of the mouse. *Front. Neuroanat.* doi: 10.3389/fnana.2015.00113

- Heimer, G., van Woerden, G.M., Barel, O., Marek-Yagel, D., Kol, N., Munting, J.B., Borghei, M., Atawneh, O.M., Nissenkorn, A., Rechavi, G., Anikster, Y., Elgersma, Y., Kushner, S.A., Ben Zeev, B. (2020). Netrin-G2 dysfunction causes a Rett-like phenotype with areflexia. *Hum Mutat.* 4, 476-486. doi: 10.1002/humu.23945
- Herrick, C.J. (1910). The morphology of the forebrain in amphibia and reptilia. *J. Comp. Neurol.* 20, 413–547.
- Ishii, Y., Bouret, S.G. (2012). Embryonic birthdate of hypothalamic leptin-activated neurons in mice. *Endocrinology.* 153, 3657-3667. doi: 10.1210/en.2012-1328
- Izpisúa-Belmonte, J.C., De Robertis, E.M., Storey, K.G., Stern, C.D. (1993). The homeobox gene goosecoid and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm. *Cell.* 74, 645-659. doi: 10.1016/0092-8674(93)90512-o
- Jiao, Y., Medina, L., Veenman, C.L., Toledo, C., Puellas, L., Reiner, A. (2000). Identification of the anterior nucleus of the ansa lenticularis in birds as the homolog of the mammalian subthalamic nucleus. *J. Neurosci.* 20, 6998-7010. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-18-06998.2000
- Johnston, J.B. (1923). Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J. Comp. Neurol.* 36, 143–192.
- Kawauchi, S., Shou, J., Santos, R., Hébert, J.M., McConnell, S.K., Mason, I., Calof, A.L. (2005). Fgf8 expression defines a morphogenetic center required for olfactory neurogenesis and nasal cavity development in the mouse. *Development.* 132, 5211-5223. doi: 10.1242/dev.02143
- Keyser, A.J.M. (1972). The development of the diencephalon of the Chinese hamster. *Acta Anat. (Basel)* 83, 1-178.
- Keyser, A.J.M. (1979). Development of the hypothalamus in mammals. An investigation into its morphological position during ontogenesis. In *Handbook*

- of the Hypothalamus. Vol.I. Anatomy of the Hypothalamus (P.J.Morgane and J.Panksepp, eds). Dekker, New York and Basel; pp. 65-136.
- Kim, M., Farmer, W.T., Bjorke, B., McMahon, S.A., Fabre, P.J., Charron, F., Mastick, G.S. (2014). Pioneer midbrain longitudinal axons navigate using a balance of Netrin attraction and Slit repulsion. *Neural Dev.* doi: 10.1186/1749-8104-9-17
- Kim, D.W., Washington, P.W., Wang, Z.Q., Lin, S.H., Sun, C., Ismail, B.T., Wang, H., Jiang, L., Blackshaw, S. (2020). The cellular and molecular landscape of hypothalamic patterning and differentiation from embryonic to late postnatal development. *Nat. Commun.* doi: 10.1038/s41467-020-18231-z
- Kingsbury, B.F. (1922). The fundamental plan of the vertebrate brain. *J. Comp. Neurol.* 34, 461–491.
- Kriegstein, A.R., Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27, 392-399. doi: 10.1016/j.tins.2004.05.001
- Kuhlenbeck, H. (1973). The central nervous system of vertebrates. Vol. 3, part II: Overall morphological pattern. Basel: Karger.
- Lagutin, O.V., Zhu, C.C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puelles, L., Russell HR, McKinnon P.J, Solnica-Krezel L, Oliver G. (2003). Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev.* 17, 368-379. doi: 10.1101/gad.1059403
- Leranth, C., Hajszan, T. (2007). Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 163, 63-84. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63004-0
- Li, Y., Bao, H., Luo, Y., Yoan, C., Sullivan, H.A., Quintanilla, L., Wickersham, I., Lazarus, M., Shin, Y.I., Song, J. (2020). Supramammillary nucleus synchronizes with dentate gyrus to regulate spatial memory retrieval through glutamate release. *Elife.* doi: 10.7554/eLife.53129

- Limoni, G., Niquille, M. (2021). Semaphorins and Plexins in central nervous system patterning: the key to it all? *Curr. Opin. Neurobiol.* 66, 224-232. doi: 10.1016/j.conb.2020.12.014
- Liu, A., Losos, K., Joyner, A.L. (1999). FGF8 can activate Gbx2 and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain fate. *Development.* 126, 4827-4838.
- Lorente-Cánovas, B., Marín, F., Corral-San-Miguel, R., Hidalgo-Sánchez, M., Ferrán, J.L., Puellas, L., Aroca, P. (2012). Multiple origins, migratory paths and molecular profiles of cells populating the avian interpeduncular nucleus. *Dev. Biol.* 361, 12-26. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.09.032
- Manning, L., Ohyama, K., Saeger, B., Hatano, O., Wilson, S.A., Logan, M., Placzek, M. (2006). Regional morphogenesis in the hypothalamus: a BMP-Tbx2 pathway coordinates fate and proliferation through Shh downregulation. *Dev. Cell* 11, 873–885. doi: 10.1016/j.devcel.2006.09.021
- Marchand, R. Histogenesis of the subthalamic nucleus. (1987). *Neuroscience.* 1, 183-195. doi: 10.1016/0306-4522(87)90332-0
- Marín, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Rubenstein, J.L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science.* 293, 872-875. doi: 10.1126/science.1061891
- Marion, J.F., Yang, C., Caqueret, A., Boucher, F., Michaud, J.L. (2005). Sim1 and Sim2 are required for the correct targeting of mammillary body axons. *Development.* 132, 5527-5537. doi: 10.1242/dev.02142
- Martin, D.M., Skidmore, J.M., Fox, S.E., Gage, P.J., Camper, S.A. (2002). Pitx2 distinguishes subtypes of terminally differentiated neurons in the developing mouse neuroepithelium. *Dev. Biol.* 252, 84-99. doi: 10.1006/dbio.2002.0835
- Martin, D.M., Skidmore, J.M., Philips, S.T., Vieira, C., Gage, P.J., Condie, B.G., Raphael, Y., Martinez, S., Camper, S.A. (2004). PITX2 is required for normal

development of neurons in the mouse subthalamic nucleus and midbrain. *Dev. Biol.* 267, 93-108. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.10.035

Martini, F.J., Valiente, M., Lopez-Bendito, G., Szabo, G., Moya, F., Valdeolmillos, M., Marin, O. (2009). Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development.* 134, 41-50. doi: 10.1242/dev.025502

Martinez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubenstein, J.L., Martin, G.R. (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development.* 126, 1189-1200.

McCabe, M.J., Gaston-Massuet, C., Tziaferi, V., Gregory, L.C., Alatzoglou, K.S., Signore, M., Puellas, E., Gerrelli, D., Farooqi, I.S., Raza, J., Walker, J., Kavanaugh, S.I., Tsai, P.S., Pitteloud, N., Martinez-Barbera, J.P., Dattani, M.T. (2011). Novel FGF8 mutations associated with recessive holoprosencephaly, craniofacial defects, and hypothalamo-pituitary dysfunction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* doi: 10.1210/jc.2011-0454

Merlino, D.J., Barton, J.R., Charsar, B.A., Byrne, M.D., Rappaport, J.A., Smeyne, R.J., Lepore, A.C., Snook, A.E., Waldman, S.A. (2019). Two distinct GUCY2C circuits with PMV (hypothalamic) and SN/VTA (midbrain) origin. *Brain Struct. Funct.* 224, 2983-2999. doi: 10.1007/s00429-019-01949-y

Meyers, E.N., Lewandoski, M., Martin, G.R. (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* 18, 136-141. doi: 10.1038/ng0298-136

Mickelsen, L.E., Flynn, W.F., Springer, K., Wilson, L., Beltrami, E.J., Bolisetty, M., Robson, P., Jackson, A.C. (2020). Cellular taxonomy and spatial organization of the murine ventral posterior hypothalamus. *Elife.* 22, 642–656. doi: 10.7554/eLife.58901

- Moffat, J.J., Ka, M., Jung, E.M., Kim, W.Y. (2015). Genes and brain malformations associated with abnormal neuron positioning. *Mol. Brain*. doi: 10.1186/s13041-015-0164-4
- Morales-Delgado, N., Merchan, P., Bardet, S.M., Ferrán, J.L., Puellas, L., Díaz, C. (2011). Topography of somatostatin gene expression relative to molecular progenitor domains during ontogeny of the mouse hypothalamus. *Front. Neuroanat*. doi: 10.3389/fnana.2011.00010
- Morales-Delgado, N., Castro-Robles, B., Ferrán, J.L., Martínez-de-la-Torre, M., Puellas, L., Díaz, C. (2014). Regionalized differentiation of CRH, TRH, and GHRH peptidergic neurons in the mouse hypothalamus. *Brain Struct. Funct.* 219, 1083-1111. doi: 10.1007/s00429-013-0554-2
- Moreno-Bravo, J.A., Perez-Balaguer, A., Martínez-Lopez, J.E., Aroca, P., Puellas, L., Martínez, S., Puellas, E. (2014). Role of Shh in the development of molecularly characterized tegmental nuclei in mouse rhombomere 1. *Brain Struct. Funct.* 219, 777-792. doi: 10.1007/s00429-013-0534-6
- Moreno-Bravo, J.A., Roig Puiggros, S., Blockus, H., Dominici, C., Zelina, P., Mehlen, P., Chédotal, A. (2018). Commissural neurons transgress the CNS/PNS boundary in absence of ventricular zone-derived netrin 1. *Development*. doi: 10.1242/dev.159400
- Murcia-Ramón, R., Company, V., Juárez-Leal, I., Andreu-Cervera, A., Almagro-García, F., Martínez, S., Echevarría, D., Puellas, E. (2020). Neuronal tangential migration from Nkx2.1-positive hypothalamus. *Brain Struct. Funct.* 255, 2857-2869. doi: 10.1007/s00429-020-02163-x
- Niethamer, T.K., Bush, J.O. (2019). Getting direction(s): The Eph/ephrin signaling system in cell positioning. *Dev. Biol.* 447, 42-57. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.01.012

- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7, 136-144. doi: 10.1038/nn1172
- Nouri, N., Awatramani, R. (2017). A novel floor plate boundary defined by adjacent *En1* and *Dbx1* microdomains distinguishes midbrain dopamine and hypothalamic neurons. *Development.* 144, 916-927. doi: 10.1242/dev.144949
- Padilla, S.L, Carmody, J.S, Zeltser, L.M. (2010). *Pomc*-expressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. *Nat. Med.* 16:403–405. doi: 10.1038/nm.2126
- Pan, W.X., McNaughton, N. (2004). The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. *Prog. Neurobiol.* 74, 127-166. doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.09.003
- Paxinos, G., Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th edit. San Diego: Academic Press.
- Pedersen, N.P., Ferrari, L., Venner, A., Wang, J.L., Abbott, S.B.G., Vujovic, N., Arrigoni, E., Saper, C.B., Fuller, P.M. (2017). Supramammillary glutamate neurons are a key node of the arousal system. *Nat. Commun.* doi: 10.1038/s41467-017-01004-6
- Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T., Jessell, T., Dodd, J. (1990). Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord. *Science.* 250, 985-988. doi: 10.1126/science.2237443
- Pontecorvi, M., Goding, C.R., Richardson, W.D., Kessar, N. (2008). Expression of *Tbx2* and *Tbx3* in the developing hypothalamic-pituitary axis. *Gene Expr. Patterns.* 8, 411-417. doi: 10.1016/j.gep.2008.04.006
- Puelles, L., Martínez-de-la-Torre, M. (1987). Autoradiographic and Golgi study on the early development of *n. isthmi principalis* and adjacent grisea in the chick

- embryo: a tridimensional viewpoint. *Anat. Embryol. (Berl)*. 176, 19-34. doi: 10.1007/BF00309748
- Puelles, L. (1995). A segmental morphological paradigm for understanding vertebrate forebrains. *Brain Behav. Evol.* 46, 319–337. doi: 10.1159/000113282
- Puelles, L. (2001). Brain segmentation and forebrain development in amniotes. *Brain Res. Bull.* 55, 695–710. doi: 10.1016/s0361-9230(01)00588-3
- Puelles, L., Rubenstein, J.L. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 469-476. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00234-0
- Puelles, L., Martínez-de-la-Torre, M., Bardet, S., Rubenstein, J.L.R. (2012). Hypothalamus, In: *The Mouse Nervous System*, C.Watson, G.Paxinos, L.Puelles (eds) San Diego, CA: Academic Press/Elsevier, pp. 221–312.
- Puelles, L. (2013). A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends Neurosci.* 36, 570-578. doi: 10.1016/j.tins.2013.06.004
- Puelles, L., Rubenstein, J.L. (2015). A new scenario of hypothalamic organization: rationale of new hypotheses introduced in the updated prosomeric model. *Front. Neuroanat.* doi: 10.3389/fnana.2015.00027
- Puelles, L., Morales-Delgado, N., Merchán, P., Castro-Robles, B., Martínez-de-la-Torre, M., Díaz, C., Ferran, J.L. (2016). Radial and tangential migration of telencephalic somatostatin neurons originated from the mouse diagonal area. *Brain Struct. Funct.* 221, 3027-3065. doi: 10.1007/s00429-015-1086-8
- Puelles, L. (2018). Developmental studies of avian brain organization. *Int. J. Dev. Biol.* 62, 207-224. doi: 10.1387/ijdb.170279LP

- Puelles, L. Survey of midbrain, diencephalon, and hypothalamus neuroanatomic terms whose prosomeric definition conflicts with columnar tradition. (2019). *Front. Neuroanat.* doi: 10.3389/fnana.2019.00020
- Rakic, P. (1988). Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations. *Prog. Brain Res.* 73, 15-37. doi: 10.1016/s0079-6123(08)60494-x
- Robichaux, M.A., Chenux, G., Ho, H.Y., Soskis, M.J., Greenberg, M.E., Henkemeyer, M., Cowan, C.W. (2016). EphB1 and EphB2 intracellular domains regulate the formation of the corpus callosum and anterior commissure. *Dev. Neurobiol.* 76, 405-420. doi: 10.1002/dneu.22323.
- Rodriguez, K.M., Stevenson, E.L., Stewart, C.E., Linscott, M.L., Chung, W.C. (2015). Fibroblast growth factor 8 regulates postnatal development of paraventricular nucleus neuroendocrine cells. *Behav. Brain Funct.* doi: 10.1186/s12993-015-0081-9
- Romanov, R.A., Tretiakov, E.O., Kastriti, M.E., Zupancic, M., Häring, M., Korchynska, S., Popadin, K., Benevento, M., Rebernik, P., Lallemand, F., Nishimori, K., Clotman, F., Andrews, W.D., Parnavelas, J.G., Farlik, M., Bock, C., Adameyko, I., Hökfelt, T., Keimpema, E., Harkany, T. (2020). Molecular design of hypothalamus development. *Nature.* 582, 246-252. doi: 10.1038/s41586-020-2266-0
- Ross, R.A., Leon, S., Madara, J.C., Schafer, D., Fergani, C., Maguire, C.A., Verstegen, A.M., Brengle, E., Kong, D., Herbison, A.E., Kaiser, U.B., Lowell, B.B., Navarro, V.M. (2018). PACAP neurons in the ventral premammillary nucleus regulate reproductive function in the female mouse. *Elife.* doi: 10.7554/eLife.35960
- Rudolph, J., Zimmer, G., Steinecke, A., Barchmann, S., Bolz, J. (2010). Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon. *Cell Adh. Migr.* 4, 400-408. doi: 10.4161/cam.4.3.11640

- Ruiz-Reig, N., Rakotobe, M., Bethus, I., Le Menn, G., Huditz, H.I., Marie, H., Lamonerie, T., D'Autréaux, F. (2019). Developmental Requirement of Homeoprotein Otx2 for Specific Habenulo-Interpeduncular Subcircuits. *J. Neurosci.* 39, 1005-1019. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1818-18.2018
- Sato, T., Kikkawa, T., Saito, T., Itoi, K., Osumi, N. (2017). Organizing activity of Fgf8 on the anterior telencephalon. *Dev. Growth. Differ.* 59, 701-712. doi: 10.1111/dgd.12411
- Schredelseker, T., Veit, F., Dorsky, R.I., Driever, W. (2020). Bsx Is Essential for Differentiation of Multiple Neuromodulatory Cell Populations in the Secondary Prosencephalon. *Front. Neurosci.* doi: 10.3389/fnins.2020.00525
- Sentürk, A., Pfennig, S., Weiss, A., Burk, K., Acker-Palmer, A. (2011). Ephrin Bs are essential components of the Reelin pathway to regulate neuronal migration. *Nature.* 472, 356-360. doi: 10.1038/nature09874
- Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., Tessier-Lavigne, M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *87*, 1001-1014. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81795-x
- Shimada, M., Nakamura, T. (1973). Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei. *Exp. Neurol.* 41, 163-173. doi: 10.1016/0014-4886(73)90187-8
- Shimamura, K., Hirano, S., McMahon, A.P., Takeichi, M. (1994). Wnt-1-dependent regulation of local E-cadherin and alpha N-catenin expression in the embryonic mouse brain. *Development* 120, 2225–2234.
- Shimamura, K., Rubenstein, J.L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development.* 124, 2709-2718.
- Shimogori, T., Lee, D.A., Miranda-Angulo, A., Yang, Y., Wang, H., Jiang, L., Yoshida, A.C., Kataoka, A., Mashiko, H., Avetisyan, M., Qi, L., Qian, J., Blackshaw, S. (2010).

- A genomic atlas of mouse hypothalamic development. *Nat. Neurosci.* 13, 767-775. doi: 10.1038/nn.2545
- Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L.W. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294, 76-95. doi: 10.1002/cne.902940107
- Sjöqvist, M., Andersson, E.R. (2019). Do as I say, Not(ch) as I do: Lateral control of cell fate. *Dev. Biol.* 447, 58-70. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.09.032
- Skidmore, J.M., Cramer, J.D., Martin, J.F., Martin, D.M. (2008). Cre fate mapping reveals lineage specific defects in neuronal migration with loss of Pitx2 function in the developing mouse hypothalamus and subthalamic nucleus. *Mol. Cell Neurosci.* 37, 696-707. doi: 10.1016/j.mcn.2007.12.015
- Stagkourakis, S., Spigolon, G., Williams, P., Protzmann, J., Fisone, G., Broberger, C. (2018). A neural network for intermale aggression to establish social hierarchy. *Nat. Neurosci.* doi: 10.1038/s41593-018-0153-x
- Storm, E.E., Rubenstein, J.L., Martin, G.R. (2003). Dosage of Fgf8 determines whether cell survival is positively or negatively regulated in the developing forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100, 1757-1762. doi: 10.1073/pnas.0337736100
- Storm, E.E., Garel, S., Borello, U., Hebert, J.M., Martinez, S., McConnell, S.K., Martin, G.R., Rubenstein, J.L. (2006). Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development.* 133, 1831-1844. doi: 10.1242/dev.02324
- Swanson, L.W. (2003). *Brain Architecture*. Oxford/New York: Oxford Univ. Press;
- Swanson, L.W. (2012). *Brain Architecture*, 2nd Ed. Oxford; New York: Oxford Univ. Press.

- Tsai, P.S., Brooks, L.R., Rochester, J.R., Kavanaugh, S.I., Chung, W.C. (2011). Fibroblast growth factor signaling in the developing neuroendocrine hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 95-107. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.11.002
- Tsuchiya, R., Takahashi, K., Liu, F.C., Takahashi, H. (2009). Aberrant axonal projections from mammillary bodies in Pax6 mutant mice: possible roles of Netrin-1 and Slit 2 in mammillary projections. *J. Neurosci. Res.* 87, 1620-1633. doi: 10.1002/jnr.21966
- Valiente, M., Marín, O. (2010). Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 68-78. doi: 10.1016/j.conb.2009.12.003
- Villar-Cerviño, V., Molano-Mazón, M., Catchpole, T., Valdeolmillos, M., Henkemeyer, M., Martínez, L.M., Borrell, V., Marín, O. (2013). Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron.* 77, 457-471. doi: 10.1016/j.neuron.2012.11.023
- Villar-Cerviño, V., Kappeler, C., Nóbrega-Pereira, S., Henkemeyer, M., Rago, L., Nieto, M.A., Marín, O. (2015). Molecular mechanisms controlling the migration of striatal interneurons. *J. Neurosci.* 35, 8718-8729. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4317-14.2015
- Xu, C., Fan, C.M. (2007). Allocation of paraventricular and supraoptic neurons requires Sim1 function: a role for a Sim1 downstream gene PlexinC1. *Mol. Endocrinol.* 21,1234-1245. doi: 10.1210/me.2007-0034
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., Jessell, T.M. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell.* 64, 635-47. doi: 10.1016/0092-8674(91)90247-v
- Yamagishi, S., Bando, Y., Sato, K. (2021). Involvement of Netrins and Their Receptors in Neuronal Migration in the Cerebral Cortex. *Front. Cell. Dev. Biol.* doi: 10.3389/fcell.2020.590009

- Yu, Z., Sun, Y., She, X., Wang, Z., Chen, S., Deng, Z., et al. (2017). SIX3, a tumor suppressor, inhibits astrocytoma tumorigenesis by transcriptional repression of AURKA/B. *J. Hematol. Onco.* doi: 10.1186/s13045-017-0483-2
- Zhao, T., Szabó, N., Ma, J., Luo, L., Zhou, X., Alvarez-Bolado, G. (2008). Genetic mapping of Foxb1-cell lineage shows migration from caudal diencephalon to telencephalon and lateral hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1941-1955. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06503.x
- Ziegler, D.R., Cullinan, W.E., Herman, J.P. (2002). Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 448, 217-229. doi: 10.1002/cne.10257

