



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA HUMANA Y
PSICOBIOLOGÍA

Estudio de Migración de Neuronas *Pax6* +
en el Tálamo del Pollo y del Ratón

D. José Manuel Domenech Hita

2015

Tesis doctoral

Doctorado en Neurociencias

Facultad de Medicina

Universidad de Murcia

Estudio de migración de neuronas
Pax6+ en el tálamo del pollo y del
ratón.

D. José Manuel Domenech Hita

Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología

Director de la tesis doctoral:

D. Luis Puelles López

2015

Agradecimientos.

Agradezco en primer lugar a mi director de tesis, Luis Puelles por haberme permitido conocer de primera mano el mundo de la investigación, desarrollando el presente trabajo en el laboratorio del departamento de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina. Por su paciencia, por transmitirme el entusiasmo por la ciencia con una gran cercanía y por esos viajes a través del cerebro que compartiste desde el microscopio.

A Margaret, por su generosidad como docente en el laboratorio y en las prácticas de neuroanatomía, y sobre todo como persona.

A Chelo, por estar siempre disponible, incluso desde el extranjero o en el laboratorio los fines de semana, sin los cuales esta tesis no habría podido llevarse a cabo. Por transmitirme tu profesionalidad y tu saber hacer en el laboratorio.

Agradezco también al resto de profesores del departamento que tanto me han enseñado y animado a no abandonar en los momentos de flaqueza, en especial a María, Miroljub, Faustino y Pilar.

A los compañeros y compañeras del laboratorio, Antonia, Luisa, Juanu, Paloma, Laura, Rubén, Abdú, Nica, Tania, M^a Cármenes e Isabel. En especial a Antonia, por su paciencia y por hacer mi estancia en el laboratorio más fácil y agradable.

Agradezco también a mis padres su apoyo desinteresado, fueron ellos los que me inculcaron la pasión por el trabajo bien hecho y a terminar todo lo que empiezo. A mi hermana, por estar siempre ahí, últimamente desde la distancia.

A mis hijos, Miguel y Ana, que en los últimos años han llenado mi vida de ilusión y ganas de ser mejor persona.

Y finalmente, a Ana, mi mujer. Tu soporte ha sido imprescindible para poder terminar esta tesis. Por darme fuerza, ánimo y tu amor.

Índice

ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	7
Epitálamo y capa dorsal del tálamo del pollo.....	8
El modelo prosomérico en anatomía comparada	16
Epitálamo y capa dorsal del tálamo según el modelo prosomérico	20
Región habenular en mamíferos	22
El factor de transcripción Pax6	26
Migración neuronal	29
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Animales de experimentación	36
Técnicas histológicas	37
Técnicas de inmunohistoquímica	39
Marcaje con dextranaminas biotiniladas	40
Incubación in vitro y revelado	42
Técnicas de biología molecular	44
RESULTADOS	54
Análisis de la migración en pollo	55
Análisis de la migración en ratón	82
DISCUSIÓN	89
Relevancia de las técnicas utilizadas	90
Destino de la migración en pollo	95
Destino de la migración en ratón	99
Origen de la migración	103
CONCLUSIONES	108
BIBLIOGRAFÍA	111

Abreviaturas

3v	third ventricle
aq	aqueduct
chp	choroid plexus (choroidal tela)
DIA	dorsal intermediate anterior nucleus of the thalamus
DIP	dorsal intermediate posterior nucleus of the thalamus
DLA	dorsolateral anterior nucleus of the thalamus
DLAR	dorsolateral antero-rostral nucleus of the thalamus
DLG	dorsal lateral geniculate nucleus
DLGs	dorsal lateral geniculate, superficial neuropil
DLP	dorsolateral posterior nucleus of the thalamus
DMA	dorsomedial anterior nucleus of the thalamus
DMI	dorsomedial intermediate nucleus of the thalamus
DMo	dorsal motor nucleus of the thalamus
DMP	dorsomedial posterior nucleus of the thalamus
DPe	dorsal tier periventricular nucleus of the thalamus
DSS	dorsal somatosensory nucleus of the thalamus (antiguo DIVA)
fr	fasciculus retroflexus
hbc	habenular commissure
LHb	lateral habenular nucleus
MHb	medial habenular nucleus
MHbD	medial habenular nucleus, dorsal part
MHbV	medial habenular nucleus, ventral part
MSHb	medial subhabenular nucleus
p1	prosomer 1 (pretectum)
p2	prosomer 2 (thalamus)
p3	prosomere 3 (prethalamus)
pc	posterior commissure
Pe	periventricular stratum
Pi	pineal gland
PiSt	pineal stalk
PThE	prethalamus eminence

RHb	retrohabenular area of the thalamus
sm	stria medullaris
SMi	Superficial microcellular nucleus of the thalamus
SPC	superficial parvicellular nucleus of the thalamus

Introducción

Epitálamo y capa dorsal del tálamo del pollo.

El neuroepitelio de los vertebrados crece de manera desigual a lo largo del tubo neural. Diversos autores, (His, 1893, 1904; von Kupffer, 1906; Kingsbury, 1920, 1922, 1930; Palmgren, 1921; Rendahl, 1924; Hochstetter, 1929; Bergquist, 1932, 1952; Källén, 1951a, b, 1952, 1965; Bergquist y Källén, 1953a, 1953b, 1954; Vaage, 1969, 1973; Keyser, 1972a, b, 1979) describen cómo las zonas de mayor proliferación, en contraste con las zonas de proliferación nula, forman unos abombamientos hacia el exterior que se traducen en una serie de anillos transversales al eje longitudinal, los neurómeros. A nivel diencefálico se describen tres neurómeros: sinencéfalo, parencéfalo posterior y parencéfalo anterior (Rendahl, 1924; Coggeshall, 1964; Keyser, 1972a, b, 1979; Martínez-de-la-Torre, 1985).

Herrick (1910) describe cuatro columnas en el diencefalo, a las que atribuye diferente sentido morfofuncional: epitálamo, tálamo dorsal, tálamo ventral e hipotálamo. Kuhlenbeck (1937) observa ya a los neurómeros en sus estudios embriológicos, aunque al no poderlos seguir hasta el animal adulto, los considera tan sólo subdivisiones transitorias, con lo que sigue el modelo de Herrick. (Fig. 1).

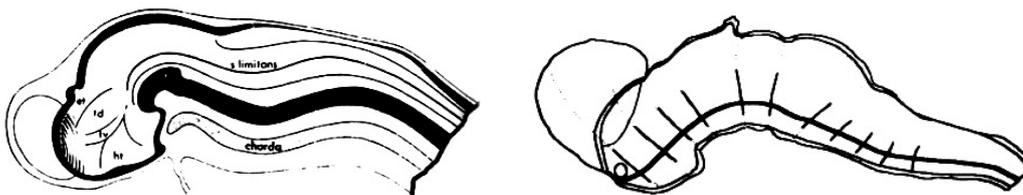


Fig. 1. Modelo columnar (izquierda). Modelo neuromérico (derecha).

Posterioros estudios (Palmgren, 1921; Rendahl, 1924; Bergquist, 1932; Bergquist y Källén, 1953a; Coggeshall, 1964; Keyser, 1972a; Vaage, 1973) observan que las diferentes neuronas nacidas dentro de cada neurómero quedan separadas por hiatos acelulares interneuroméricos,

demostrando que la división neuromérica se conserva a lo largo del desarrollo embriológico y permanece en el adulto.

La morfología del epitálamo y el tálamo dorsal ha sido clásicamente tratada por diversos autores (Rendahl, 1924; Huber y Crosby, 1929; Craigie, 1931; Kuhlenbeck, 1937, 1939; Kappers, Huber y Crosby, 1936; Karten y Hodos, 1967; Jungherr, 1969) que han ajustado sus interpretaciones al modelo de subdivisión diencefálica que previamente hubieran aceptado. Nos encontramos por tanto con tres grandes líneas de interpretación del epitálamo y tálamo dorsal: La de Rendhal (1924) adaptada al modelo neuromérico. La de Kuhlenbeck (1937) adaptada al modelo columnar. Y la de Huber y Crosby basada terminologicamente en Rendhal pero fundamentada en el modelo columnar de Kuhlenbeck.

Bergquist y Källén (1954) interpretan la morfología del epitálamo y tálamo dorsal mediante la existencia de tres capas: superficial (área I), intermedia (área II, aludida también por Senn (1968, 1970)) y periventricular (área III); basándose en observaciones de oleadas migratorias de neuroblastos a lo largo del desarrollo.

Puelles et al. (1987) enmarcan su trabajo dentro del modelo neuromérico. Cada neurómero queda también subdividido dorsoventralmente en regiones de comportamiento histogenético distintivo, quedando delimitadas unas de otras por diferencias citoarquitectónicas u hodológicas.

Clásicamente se han identificado solamente dos poblaciones en el epitálamo, los núcleos habenular medial y habenular lateral (Huber y Crosby, 1929; Craigie, 1931, Tienhoven y Juhász, 1962; Jungherr, 1969; Völker, 1972 y otros). Habitualmente, estos autores interpretaban los núcleos subhabenulares medial y lateral como partes de los núcleos habenulares medial y lateral respectivamente.

Rendahl (1924) describe tres núcleos en el epitálamo: el núcleo superficial epitalámico, el núcleo habenular lateral y el núcleo habenular medial, los cuales se corresponden actualmente con los

núcleos habenular lateral, habenular medial y subhabenular medial respectivamente.

Kuhlenbeck (1937) asienta sus interpretaciones en el modelo columnar, con lo que para él, la stria medullaris y los surcos epitalámico lateral y talámico dorsal conforman la frontera epitálamo/tálamo dorsal. Por lo cual, los núcleos subhabenulares lateral y medial son interpretados como núcleos del tálamo dorsal. Además, sugiere que el núcleo superficial epitalámico de Rendahl está constituido por las células más superficiales del núcleo habenular lateral, que se mezclan con la stria medullaris.

Guillén (1991) estudia la composición nuclear del epitálamo y el complejo superior del tálamo dorsal en aves, los cuales, se ajustan perfectamente al modelo neuromérico de Rendhal. Se sitúan en la parte más alar del parencéfalo posterior (actual p2 de Puelles y Rubenstein (2003)) y se extienden desde el límite interparencefálico hasta el límite sinencéfalo-parencefálico. Inyectando timidina tritiada a embriones de pollo en distintos estadios de desarrollo comprueba que la aparición de los núcleos que componen el epitálamo y el complejo superior del tálamo dorsal ocurre entre los estadios HH21 y HH34 (Hamburger y Hamilton, 1951).

Guillén (1991) localiza los cuatro núcleos habenulares y subhabenulares en el ángulo dorso-caudal del parencéfalo posterior. Inicialmente, entre 8 y 9 días de incubación, el núcleo subhabenular lateral es una reducida población situada superficialmente junto al surco epitalámico lateral, es algo más extenso caudal que rostralmente, ventralmente se sitúa el núcleo superficial caudal. Por encima se sitúan la stria medullaris y los núcleos habenulares. Hacia el ventrículo se halla el núcleo subhabenular medial, mucho más desarrollado que el anterior, sus células están apretadas entre si y son de menor talla nuclear que el núcleo subhabenular lateral, llegando hasta el ventrículo. Rostral a él se encuentran los núcleos anterior y periventricular, dorsalmente el núcleo

habenular medial y caudalmente los núcleos superficial caudal y dorsomedial posterior.

Los esbozos de los núcleos habenulares (medio y lateral) se forman junto a la confluencia del tallo de la epísis con la tela coroidea. Esta región es recorrida rostro-caudalmente por la stria medullaris, algunas de estas fibras atraviesan la comisura habenular y alcanzan el lado contrario. Intersticialmente a la stria medullaris se distingue un grupo de neuronas grandes que constituyen el núcleo habenular lateral.

Mucho más voluminoso es el núcleo habenular medial que sobrepasa dorsal y ventralmente al núcleo habenular lateral y por tanto a la stria medullaris. El núcleo habenular medial está constituido por células pequeñas y redondeadas fuertemente basófilas. Posteriormente, entre 10 y 14 días de incubación, el núcleo habenular lateral crece considerablemente de tamaño manteniéndose en el camino de la stria medullaris. Mientras que el núcleo habenular medial se subdivide en tres subnúcleos: dorsal, intermedio y ventral.

En los mamíferos la región habenular ha sido habitualmente vinculada a los circuitos que regulan las expresiones de la conducta y las emociones (sistema límbico). Krayniak y Siegel (1978) comprobaron, en la paloma, la presencia de vías hipotéticamente homólogas a las de los mamíferos, las cuales, partiendo de la región septal, conectan con el núcleo habenular lateral a través de la stria medullaris.

Una característica, cuanto menos llamativa, del epítalamo es que sus núcleos constituyentes presentan asimetrías en la mayoría de especies animales, habiéndose descrito asimetrías estructurales en todos los casos de vertebrados (Concha y Wilson, 2001). Estas asimetrías son más pronunciadas en peces, anfibios y reptiles, mientras que en aves y mamíferos son más sutiles. Se han descrito asimetrías en tamaño, organización citoarquitectónica, neuroquímica y hodológica.

Desde el décimo día de desarrollo se aprecian en la capa superficial del complejo superior del tálamo dorsal, ventral al epítalamo, tres poblaciones citoarquitectónicamente diferentes: los

núcleos superficial microcelular, superficial parvocelular y superficial caudal. El núcleo superficial microcelular, compuesto por células muy pequeñas y basófilas, que concuerda con la población descrita en el animal adulto como núcleo superficial parvocelular o como parte de ella (Guillén, 1991) se caracteriza embriológicamente por su tardía aparición y sugiere que se trata de un núcleo exclusivo de aves, ya que se conecta contralateralmente con el Wulst (Nixdorf y Bischof, 1982), no conociéndose en mamíferos ninguna estructura con estas características hodológicas.

El núcleo superficial parvocelular aparece en los primeros estadios de desarrollo embrionario como una única masa situada en la capa superficial del complejo dorsal. Sus células son de tamaño medio y no muy basófilas, con conexiones ipsilaterales al Wulst (Nixdorf y Bischof, 1982). Tradicionalmente ha existido confusión entre estos dos núcleos superficial parvocelular y superficial microcelular. Guillén (1991) los distingue desde el punto de vista embriológico (neurogénesis y migración) y por motivos citoarquitectónicos y hodológicos.

Distingue también en la capa superficial del complejo dorsal el núcleo superficial caudal perfectamente definido en embriones de 8 a 10 días que tiende a pasar desapercibido en el adulto (al ser cubierto por el núcleo superficial microcelular) o asimilarse a formaciones cercanas, como el núcleo dorsolateral posterior (estructura del complejo inferior).

En sus estudios autorradiográficos, Guillén (1991) describe las fechas de nacimiento de los núcleos epitálámicos y del complejo superior del tálamo dorsal en pollo, en concordancia con otros estudios anteriores (Angevine, 1970; McAllister y Das, 1977; Altman y Bayer, 1979) se establece un patrón de estratificación neuroblástica de fuera adentro, al igual que en mamíferos. Sin embargo, Guillén (1991) excluye de este patrón al núcleo superficial microcelular, al cual le atribuye el periodo de nacimiento más tardío del parencéfalo posterior, estando

este núcleo aún incompleto en el estadio HH34, en que finaliza sus estudios.

El orden neurogenético en los mamíferos, además del gradiente latero-medial, es simultáneamente ventro-dorsal y caudo-rostral (McAllister y Das, 1977). En aves no existe gradiente ventro-dorsal ni caudo-rostral para el tálamo en su conjunto (Crossland y Uchwat, 1982). Así pues, los núcleos subhabenulares y habenulares nacen antes que núcleos más ventrales como el periventricular y el dorsomedial anterior. Además los núcleos subhabenulares nacen más tarde que el habenular lateral.

También existe una correlación en esta región diencefálica entre tamaño neuronal y fechas de nacimiento, tal como clásicamente se ha pensado, siendo de nacimiento temprano para los núcleos cuyas células tienen cuerpos más voluminosos y tardío para los núcleos de células pequeñas (Jacobson, 1982).

Guillén (1991) sugiere que el peculiar comportamiento y morfología del núcleo superficial microcelular, así como el retraso en su neurogénesis, con relación a las regiones circundantes, (habenular, subhabenular y talámica superior) abogan conjuntamente por la determinación independiente de su actividad histogenética, apuntando a una posible migración tangencial del mismo, desde algún lugar del neuroepitelio dorsocaudal hasta su posición final.

Puelles (observaciones no publicadas) sugiere la expresión selectiva de estas pequeñas células del factor de transcripción *Pax6*, al observar en diferentes estadios de desarrollo embrionario de pollo un rastro de células pequeñas *Pax+* por la región dorsal superficial del tálamo.

Esta tesis toma estas observaciones (Guillén, 1991; Puelles, observaciones no publicadas) como punto de partida para verificar la coincidencia de estas células *Pax6* positivas con las descritas como núcleo superficial microcelular (Redies, et al., 2000). Toma como referencia el modelo prosomérico (Puelles y Rubenstein, 2003) y basa su

nomenclatura y por tanto las abreviaturas utilizadas en el atlas de Puelles et al. (2007).

Los trabajos de Altman y Bayer (1978a,b, 1979a,b,c, 1988a,b, 1989a,b,c) se han centrado en dos técnicas de autoradiografía con timidina tritiada en cerebros de rata. Por un lado, la llamada “autorradiografía de larga supervivencia tras múltiples inyecciones”, para establecer la fecha y el origen de las neuronas en cerebros adultos. Por otro lado, la “autorradiografía de supervivencia corta y secuencial” para determinar las fuentes en el neuroepitelio de varias poblaciones de neuronas y seguir sus rutas de migración así como el orden de llegada a su destino final. A lo largo de la médula espinal, el rombencéfalo, el suelo del mesencéfalo y el diencefalo, según Altman y Bayer, es posible subdividir el neuroepitelio en pequeñas áreas basándose en evaginaciones o invaginaciones, engrosamientos o encogimientos, y en el nivel de marcador absorbido en las dos horas siguientes a una inyección de timidina tritiada (Bayer y Altman, 1995).

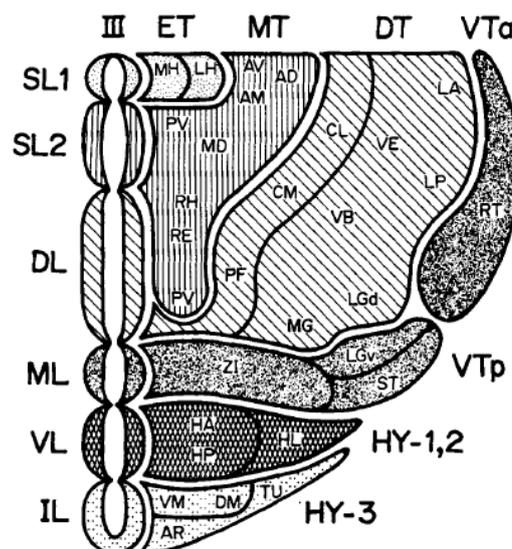


Fig. 2. Diagrama esquemático de las derivaciones de las principales subdivisiones diencefálicas (incluyendo el hipotálamo) desde los lóbulos neuroepiteliales del tercer ventrículo. Tomado de Altman y Bayer, 1979b.

En los primeros estudios del desarrollo del diencefalo (Altman y Bayer 1978a,b, 1979b) llegan a la conclusión de que las mayores subdivisiones nucleares del diencefalo adulto provienen (Fig. 2) de divisiones proliferativas identificables en el neuroepitelio del tercer ventrículo del embrión temprano. En concreto, estas divisiones proliferativas del neuroepitelio se manifiestan en forma de lóbulos dorsoventralmente dispuestos.

En estudios posteriores (Altman y Bayer 1988a,b, 1989a,b,c) sometieron a un análisis detallado la transformación del neuroepitelio talámico, concluyendo que los lóbulos talámicos están divididos en sublóbulos, caracterizados como concavidades y convexidades regionales y que dichos sublóbulos representan fuentes germinales putativas de núcleos talámicos específicos. Sugieren que la lobulación de la superficie ventricular del tálamo en desarrollo es necesaria para acomodar las células particularmente numerosas en esta región (Altman y Bayer, 1988a). El patrón general del desarrollo de las estructuras nucleares en el diencefalo se resume en la figura 3. Inicialmente (Fig. 3 , parte superior), zonas del neuroepitelio segregadas espacialmente (barras sombreadas) dan lugar a poblaciones específicas de neuronas (elipses sombreadas). Posteriormente (Fig. 3, parte inferior), el neuroepitelio diencefálico se transforma de manera que las sucesivas poblaciones neuronales son generadas en los mismos lugares.

Con respecto a la proliferación y formación de núcleos, los datos de Altman y Bayer muestran bastante semejanza con las áreas migratorias descritas por Bergquist y Källén, sin embargo Altman y Bayer (1988b) niegan dicha relación al no aceptar el concepto de organización neuomérica. Concluyendo de sus estudios de autorradiografía con timidina tritiada que el neuroepitelio es un mosaico irregular de sectores histogénéticos destinados a producir los diferentes núcleos del sistema nervioso central.

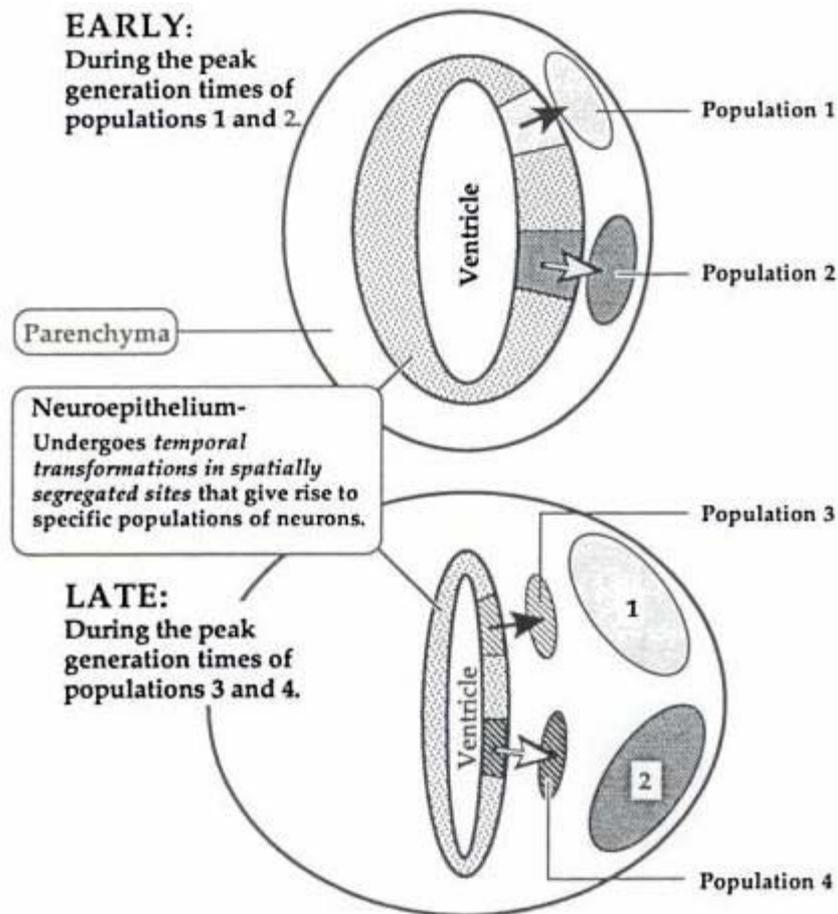


Fig. 3 . El mosaicismo en el neuroepitelio y la generación de estructuras nucleares.
Tomado de Bayer y Altman, 1995.

El modelo prosomérico en anatomía comparada.

Aunque cada especie de vertebrado tiene sus peculiaridades, el modelo prosomérico permite extrapolar un patrón de organización básico común para todas ellas. A la vez que ayuda a la comprensión de los mecanismos moleculares de la especificación cerebral a lo largo de la evolución de los vertebrados. La validez del modelo prosomérico para la comparación de cerebros entre diferentes especies ha quedado patente en diversos estudios llevados a cabo en numerosas especies de vertebrados (*peces*: Kage et al., 2004; Rodríguez-Moldes,

2009; 2011; López et al., 2012; *anfibios*: Bachy et al., 2001; 2002; Brox et al., 2003; 2004; Moreno et al., 2004, 2008; Morona y González, 2008, 2009; *reptiles*: Dávila et al., 2000; Pritz y Ruan, 2009; Moreno et al., 2012; *aves*: Puelles et al., 2000; Abellán y Medina 2008; 2009; *mamíferos*: Puelles et al., 2000; Puelles y Rubenstein, 2003; Remedios et al., 2004). En la comprensión de la evolución del sistema nervioso y la búsqueda de homologías, la genoarquitectura (Puelles y Ferrán, 2012) utiliza la expresión génica de diversos factores de transcripción, neurotransmisores y proteínas conservadas a lo largo de la evolución para caracterizar poblaciones celulares.

En una serie de estudios donde se compara la expresión de genes con dominios anatómicos, Puelles y Rubenstein proponen el modelo prosomérico del desarrollo prosencefálico. En este modelo sugieren que el desarrollo del prosencéfalo se compone de segmentos llamados prosómeros. En su modelo inicial (Puelles y Rubenstein, 1993; Rubenstein et al., 1994), el prosencéfalo está formado por seis prosómeros dispuestos a lo largo del eje anteroposterior. Los tres prosómeros posteriores (p1-p3) subdividen el diencéfalo, mientras que los tres anteriores (p4-p6) subdividen el prosencéfalo secundario, que incluye el hipotálamo y el telencéfalo.

Este modelo (Puelles, Amat et al., 1987; Bulfone, Puelles et al., 1993; Puelles y Rubenstein, 1993, 2002; Puelles, 1995, 2001a) fue un marco referencial importante para numerosos estudios sobre la formación de patrones prosencefálicos, estableciendo un mapa topográfico conservado evolutivamente que se relacionaba con regiones de expresión génica en el tubo neural. Sin embargo, (Puelles y Rubenstein, 2003) el número y la naturaleza como compartimentos neurales de los prosómeros generaron cierta controversia (Figdor y Stern, 1993; Larsen et al. 2001). La dificultad en la delimitación de fronteras prosoméricas tenía su mayor exponente en el telencéfalo secundario y la región adyacente del diencéfalo, debido en gran medida a la complicada morfogénesis que tiene lugar durante el desarrollo telencefálico. Así pues, cada

frontera prosomérica tiene que ser transversal y “completa”, lo cual implica que debe ocupar el tubo neural al completo, esto es, desde la placa del suelo a la del techo. Sin embargo, algunas fronteras, en concreto las postuladas en el hipotálamo y telencéfalo eran ambiguas.

En consecuencia, el modelo prosomérico fue revisado (Fig. 4 A) y se eliminó el prosencéfalo secundario como estructura prosencefálica (Puelles y Rubenstein, 2003). En el diencéfalo, p1-p3 se siguen considerando estructuras prosoméricas con ligeras modificaciones en p2 y p3: p3 incluye el pretálamo (antiguo tálamo ventral) y la eminencia talámica (actual eminencia pretalámica); p2 llamado tálamo incluye el tálamo (antiguo tálamo dorsal) y el epitálamo o habénula; y p1 es la parte más caudal del diencéfalo que contiene al pretecho. Finalmente, el modelo sugiere que cada prosómero no es necesariamente un compartimento de linaje celular restringido y que por tanto la restricción de linaje entre segmentos no es una condición necesaria para la definición de segmentación. Cada segmento queda definido por la expresión de un conjunto específico de genes.

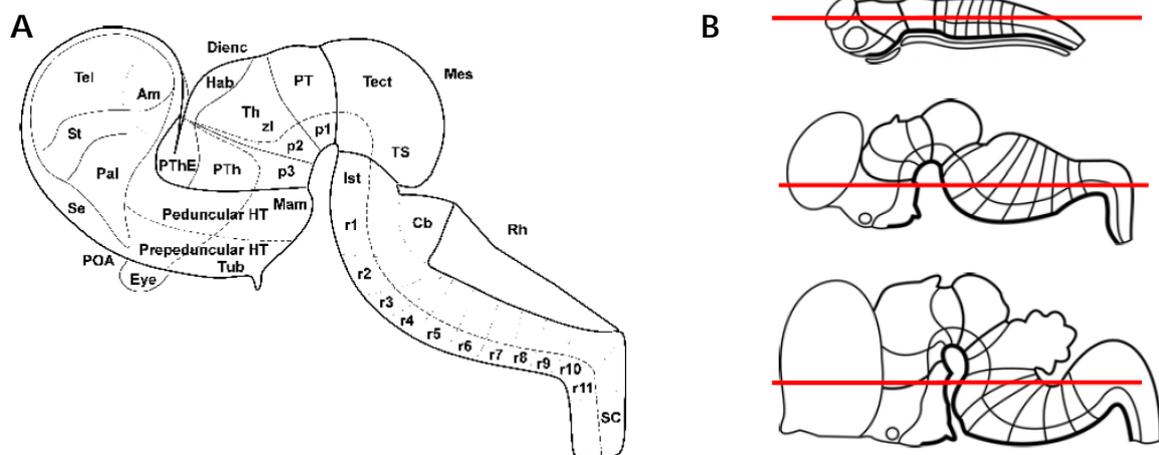


Fig. 4. A. Esquema del modelo prosomérico revisado y simplificado (Puelles y Rubenstein, 2003). B. Eje anteroposterior (Puelles, 2001a). En rojo se muestra el eje anteroposterior que clásicamente se ha tenido en consideración. Teniendo en cuenta las flexuras del tubo neural, el verdadero eje anteroposterior es paralelo al tubo neural, con lo que difiere, especialmente en el diencéfalo, del eje anteroposterior clásico.

Para evitar errores de interpretación derivados de la terminología confusa Puelles y Rubenstein (2003) actualizan algunos términos tales como tálamo ventral que pasa a ser pretálamo y tálamo dorsal que pasa a denominarse tálamo. Así pues, tálamo ventral y dorsal de la nomenclatura antigua no indican dominios dorsoventrales diencefálicos sino anteroposteriores (debido a las flexuras del tubo neural, Fig. 4 B). Por tanto, el verdadero eje dorsoventral del diencefalo debe ser considerado con respecto al eje anteroposterior del tubo neural. Dorsoventralmente el diencefalo queda dividido en cuatro regiones similares a las regiones más caudales del tubo neural. De ventral a dorsal estas regiones son la placa del suelo, placa basal, placa alar y placa del techo. La placa del suelo está formada por células colocadas ventralmente en la línea media que funcionan como centros organizadores embrionarios secretores de señales moleculares. La placa basal y alar se localizan entre la del suelo y la del techo y la mayor parte de los núcleos del diencefalo adulto son derivados de estas dos regiones. La placa del techo reside en la línea media dorsal y es un centro de señalización que afecta a la organización de las regiones adyacentes. En el diencefalo, algunas células de la placa del techo se diferencian formando estructuras como el plexo coroideo o la glándula pineal (epífisis).

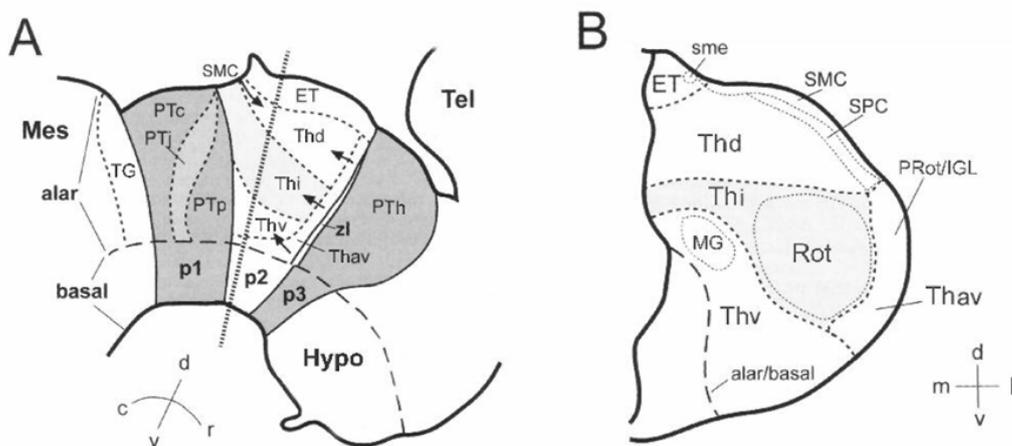


Fig. 5. Posición y límites de las unidades hitogenéticas descritas en el tálamo de aves. Tomado de Puelles et al., 2007. (Modificado de Redies et. al., 2000). A) Vista sagital. B) Vista transversal.

Epitálamo y capa dorsal del tálamo según el modelo prosomérico.

El prosómero 2 es un extenso complejo nuclear que se divide en cinco áreas histogenéticas principales (Redies et al. 2000; Puelles, 2001b; Martínez de la Torre et al., 2002): Epitálamo (complejo habenular/subhabenular), capa dorsal, capa intermedia, capa ventral y capa anteroventral (Fig. 5). Esta subdivisión está basada en consideraciones ontogénicas y es consistente con las características hodológicas de la zona.

Puelles (2007) en su atlas de pollo describe el complejo habenular/subhabenular como el destino de la stria medullaris y del tracto olfatorio habenular, siendo también el origen del fascículo retroflejo. Rostralmente se encuentra el tejido coroideo de la placa del techo de p2 (caudal a la eminencia pretalámica, PthE en p3). Caudalmente termina a lo largo de la placa del techo no coroidea de p2, envolviendo la glándula pineal y su tallo (Pi, PSt) sin alcanzar el pretecho. La comisura habenular (hc), cruce de fibras de la stria medullaris, se localiza entre el techo coroideo y el tallo de la glándula pineal. En este punto, Puelles (2007) enfatiza la mala interpretación generalizada en la literatura sobre la extensión caudal de la región habenular (región retrohabenular), ya que ésta no llega a alcanzar el pretecho (placa alar de p1), quedando separada de éste por un estrecho pasillo por el que la capa dorsal cruza la parte más caudal de la línea media dorsal talámica. Identifica los núcleos convencionales habenular lateral y habenular medial (LHb, MHb), dividiendo el habenular medial en dos partes, dorsal y ventral (MHbD, MHbV). Identifica también los núcleos subhabenulares lateral y medial (LSHb, MSHb) y señala que la tradición anatómica en mamíferos no interpreta los posibles núcleos subhabenulares como partes diferentes de los habenulares propiamente dichos.

En cuanto a la capa dorsal que se encuentra debajo de los núcleos subhabenules indica que es más extensa rostral que caudalmente, donde se restringe al subdominio retrohabenuar. Produce en su capa del manto masas voluminosas de derivados que representan los componentes de mayor tamaño en el tálamo de las aves (Redies et al., 2000; Puelles, 2001b). Este gran grupo incluye el componente lemnotalámico de Butler (1994), desde el que parten fibras al pálido dorsal en el telencéfalo. Sus componentes nucleares se estratifican radialmente quedando definidos a lo largo de la dimensión ventriculopial como 1) núcleo dorsal periventricular (Dpe), 2) núcleos dorsomedial anterior, intermedio y posterior (DMA, DMI, DMP), 3) núcleos dorsointermedio anterior y posterior (DIA, DIP), 4) núcleos dorsolateral anterior y posterior (DLA, DLP) y 5) varios núcleos superficiales, incluyendo el núcleo dorsolateral anterorrostral (DLAR), el núcleo dorsal geniculado lateral y su neuropilo superficial (DLG, DLGs), el núcleo dorsal somatosensor (DSS) y el núcleo dorsal motor (DMo), el núcleo superficial parvocelular (SPC), el núcleo superficial microcelular (SMi) y el núcleo retrohabenuar (RHb, Fig. 6).

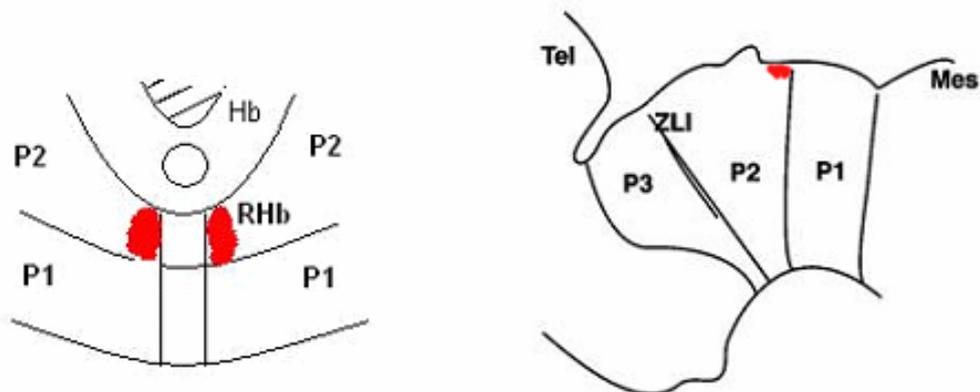


Fig. 6. Situación del núcleo retrohabenuar (RHb), en rojo.

Región Habenular en mamíferos.

Los precursores neuronales de las neuronas de la habénula se asocian al dominio neuroepitelial que expresa el factor de transcripción *Dbx1* en la parte dorsal de p2 (Vue et al., 2007; Quina et al., 2009). Esta región comienza generando precursores de las neuronas del núcleo habenular lateral (E13 en rata, E11.5 en ratón) y seguidamente precursores de las neuronas del núcleo habenular medial (E15 en rata, E13.5 en ratón) mostrando un gradiente lateromedial en la neurogénesis (Angevine, 1970; Altman y Bayer, 1979).

Habenula medial

La circuitería de la habénula medial está altamente conservada (Sutherland, 1982). Recibe entradas principalmente desde el septum y proyecta al núcleo interpeduncular (rombómeros 1 y 2). Estas conexiones eferentes forman el alma o parte central del fascículo retroflejo que se ha conservado en todas las especies de vertebrados (Fig. 7).

Aferencias del núcleo habenular medial

La mayor fuente de inervación aferente de la habénula medial se origina en el septum supracomisural, cuyos axones forman parte de la stria medullaris (Herkenham y Nauta, 1977). Los axones de dos de los núcleos septales principales terminan en diferentes subdominios del núcleo habenular medial, el núcleo septofimbrial inerva la parte rostral del núcleo habenular medial, mientras que el núcleo triangularis inerva la parte caudal del habenular medial. Algunas pocas aferencias más derivan del núcleo de la banda diagonal.

El núcleo habenular medial también recibe entradas ascendentes, principalmente derivadas de núcleos monoaminérgicos,

núcleo habenular medial contiene tanto neuronas colinérgicas, en sus dos tercios ventrales, como neuronas con sustancia P en la parte dorsal, (Contestabile et al., 1987). Ambos tipos de neuronas son contactadas por axones aferentes desde los núcleos septofimbrial y triangularis, proyectando caudalmente hacia el núcleo interpeduncular a través del alma del fascículo retroflejo. Los axones de las neuronas del núcleo habenular medial terminan de forma topográfica, de tal forma que las neuronas de la parte dorsal del núcleo habenular medial inervan la parte lateral del núcleo interpeduncular, las de la parte medial del núcleo habenular medial inervan la parte ventral del núcleo interpeduncular y las de la parte lateral del núcleo habenular medial proyectan a la parte dorsal del núcleo interpeduncular (Herkenham y Nauta, 1979; Contestabile y Flumerfelt, 1981).

Lesiones en el núcleo habenular medial provocan la degeneración de terminales en la glándula pineal (Ronnekleiv y Moller, 1979), lo que sugiere que esta es otra eferencia del núcleo habenular medial. También existen evidencias (Sutherland, 1982; Kim y Chang, 2005) de comunicación entre los dos núcleos habenulares, al menos de medial a lateral.

Habenula Lateral

El núcleo habenular lateral presenta una conectividad más amplia y menos conservada evolutivamente que el núcleo habenular medial. Está relacionado con la interfaz motórico-límbica, ya que, recibe numerosas entradas palidales y del sistema límbico. Proyecta a un gran número de sitios, especialmente en el tegmento ventral mesencefálico. (Fig. 7).

Aferencias del núcleo habenular lateral

El núcleo habenular lateral es un punto de convergencia de información desde los ganglios basales y el prosencéfalo límbico. La mayor fuente de inervación del núcleo habenular lateral en la rata

deriva del núcleo entopeduncular (equivalente al segmento interno del globo pálido en los primates). En la rata, la mayor parte de las neuronas del núcleo entopeduncular proyectan al núcleo habenular lateral (Herkenham y Nauta, 1977).

Una banda continua de células que se extiende desde la parte anterior lateral del área preóptica, a través del hipotálamo lateral, hasta el hipotálamo medial, proyecta al núcleo habenular lateral (Herkenham y Nauta, 1977). Una entrada más pequeña deriva de la región septal, incluyendo el núcleo de la banda diagonal y el núcleo septal lateral. Adicionalmente, el núcleo habenular lateral recibe entradas desde el núcleo accumbens y el cortex medial frontal (Greatrex y Phillipson, 1982).

El núcleo supraquiasmático, relacionado con la generación de ritmos circadianos en mamíferos, proyecta axones con vasopresina al núcleo habenular lateral (Buijs, 1978; Sofroniew y Windl, 1978). Una segunda fuente de información circadiana al núcleo habenular lateral proviene de células ganglionares retinianas que expresan melanopsina (Hattar et al., 2006).

El núcleo habenular lateral recibe inervación ascendente desde los núcleos monoaminérgicos, solapándose con las fuentes que inervan al núcleo habenular medial. Así pues, axones del raphe y el locus coeruleus proporcionan entradas serotonérgicas y noradrenérgicas (Herkenham y Nauta 1977; Gottesfeld, 1983; Vertes et al., 1999). Neuronas en la línea media del área tegmental ventral (núcleos interfascicular y paranigral) proporcionan entradas dopaminérgicas a la parte medial del núcleo habenular lateral, a través del fascículo retroflejo (Phillipson y Pycocock, 1982; Gruber et al., 2007). Las conexiones aferentes del núcleo habenular lateral permiten que los estados motivacionales o emocionales modulen los comportamientos motóricos (representados por eferencias palidales).

Eferencias del núcleo habenular lateral

El núcleo habenular lateral contiene predominantemente neuronas glutamatérgicas, gabaérgicas y colinérgicas que establecen eferencias con multitud de destinos, muchos de los cuales son a la vez fuentes de entradas al propio núcleo habenular lateral (Herkenham y Nauta, 1979; Lecourtier y Kelly, 2007), tales como el área lateral hipotalámica, el área preóptica lateral, la sustancia innominata y el septum ventrolateral.

El núcleo habenular lateral establece conexiones descendentes con numerosos núcleos monoaminérgicos en el mesencéfalo y el rombencéfalo. Una proyección principal, especialmente desde la parte medial del núcleo habenular lateral, inerva el raphe medio y dorsal. La actividad del núcleo habenular lateral inhibe al raphe (Wang y Aghajanian, 1977), como resultado de la activación de interneuronas gabaérgicas (Varga et al. 2003). El núcleo habenular lateral también inerva e inhibe el área tegmental ventral (Araki et al. 1988) y la substantia nigra pars compacta. Otros destinos eferentes del núcleo habenular lateral incluyen algunos núcleos talámicos (centromedial, mediodorsal, ventromedial y parafascicular), el colículo superior, la región tegmental dorsal y el locus coeruleus (Herkenham y Nauta, 1979).

El factor de transcripción Pax6.

El factor de transcripción Pax6, es una proteína homeótica perteneciente a la familia Pax. Los genes que codifican esta familia evolucionaron desde muy temprano y sus funciones se fueron diversificando hasta llegar a la variedad de miembros e isoformas conocidos hoy en día en el reino animal (Aburomia et al., 2003; Short y Holland, 2008; Hill et al., 2010; Suga et al., 2010; Holland y Short, 2010; Keller et al., 2010; Wang et al., 2010; Underhill, 2012). Estos genes

homeóticos producen proteínas que se caracterizan por tener un dominio de unión al ADN (dominio par) altamente conservado en la evolución (Bopp et al., 1986; Balczarek et al., 1997; Czerny et al., 1997; Wang et al., 2010). En concreto, Pax 6 codifica un segundo homeodominio de unión al ADN y no codifica un octapéptido, lo cual lo diferencia del resto de miembros de la familia Pax (Maulbecker y Gruss 1993; Keller et al., 2010).

La expresión de Pax6 es fundamental para la formación y mantenimiento de diversas estructuras como los ojos, el páncreas y el telencéfalo (Stuart et al., 1994; Baczarek et al., 1997; Blake et al., 2008; Kang y Krauss, 2010). La existencia de varias isoformas de la familia Pax, diferenciadas por la especificidad de unión del dominio par al ADN, explica la amplia diversidad de funciones que se atribuyen a los genes Pax (Jun y Desplan, 1996; Kozmik et al., 1997; Seo et al., 1998; Vorobyov y Horst, 2004; Kleinjan et al., 2008; Shimizu et al., 2009; Yan et al., 2010; Charytonowicz et al., 2011; Kiselev et al., 2012; Underhill, 2012). De acuerdo a un patrón espaciotemporal definido, algunos miembros de la familia Pax son expresados en el sistema nervioso central en desarrollo de vertebrados (Stuart et al., 1994; Wehr y Gruss, 1996; Kawakami et al., 1997), desembocando en la producción de diferentes tipos celulares en regiones delimitadas. (Chalepakis, 1993; Stoykova y Gruss, 1994; Tanabe y Jessell, 1996; Osumi et al. 1997; Blake et al., 2008). Esta expresión génica se mantiene en algunos grupos celulares en el SNC de vertebrados adultos, y está relacionada con la homeostasis del tejido nervioso (Stoykova y Gruss, 1994; Kukekov et al., 1999; Shin et al., 2003; Duan et al., 2012; Rath et al., 2012) e incluso con mecanismos de reparación del mismo, concretamente manteniendo la identidad posicional y dirigiendo la especificación neuronal y la axogénesis. (Mchedlishvili et al., 2007; Sirko et al., 2009; Winner et al., 2009; Thummel et al., 2010).

Pax6 se ha utilizado en anatomía comparada como marcador de regiones concretas. En el cerebro ha sido utilizado para establecer las partes del pretecho, precomisural, yuxtacomisural y comisural (Ferran et

al., 2008, 2009; Morona et al., 2011; Merchán et al., 2011), junto con otros genes. Así como para entender la organización dorsoventral y anteroposterior del tubo neural en formación de varias especies (Stoykova y Gruss, 1994; Puellas et al., 2000; Murakami et al., 2002; Rodríguez-Moldes et al., 2011).

Pax6 se expresa en el telencéfalo en el bulbo olfativo, palio, estriado dorsal, amígdala y parte del septum (Stoykova y Gruss, 1994; Hauptmann y Gerster, 2000; Puellas et al., 2000; Murakami et al., 2001; Derobert et al., 2002; Moreno et al., 2008; 2010; Duan et al., 2012; Ferreiro-Galve et al., 2012; Quintana-Urzainqui et al., 2012a,b). También en el hipotálamo (Stoykova y Gruss, 1994; Medina, 2008; Ohyama et al., 2008; Duan et al., 2012; Moreno et al., 2012; Domínguez et al., 2013). En el diencéfalo, inicialmente Pax6 se expresa en toda la parte alar, reduciéndose su expresión a medida que avanza el desarrollo, aunque se mantiene en la eminencia pretalámica, epitálamo (incluyendo la glándula pineal) y pretecho comisural a nivel ventricular y periventricular (Walther y Gruss, 1991; Stoykova y Gruss, 1994; Ferrán et al., 2008, 2009; Pritz y Ruan, 2009; Duan et al., 2012; Moreno et al., 2012; Domínguez et al., 2013). También se expresa en el tegmento de p1 y p3 (Agarwala et al., 2001; Murakami et al., 2001; Wullimann y Rink, 2001; Pritz y Ruan, 2009; Merchán et al., 2011; Morona et al., 2011; Moreno et al., 2012; Duan et al., 2012). En todos los vertebrados estudiados, el límite entre diencéfalo y mesencéfalo queda definido molecularmente por la expresión más caudal de Pax6 en el pretecho comisural (Matsunaga et al., 2000, Ferrán et al., 2007, 2008, 2009; Morona et al., 2011; Merchán et al., 2011; Lauter et al., 2013). La expresión de Pax6 en el mesencéfalo se encuentra en el tegmento (Stoykova y Gruss, 1994; Vitalis et al., 2000; Wullimann y Rink, 2001; Ahsan et al., 2007; Bayly et al., 2007; Pritz y Ruan, 2009; Duan et al., 2012). Más caudalmente, en el rombencéfalo, Pax6 se expresa en los núcleos cocleares, vestibulares, núcleo de la columna dorsal y del tracto solitario (Stoykova y Gruss, 1994; Duan et al., 2012) en mamíferos, en las células granulares del cerebelo y núcleos precerebelosos de

vertebrados mandibulados (Engelkamp et al., 1999; Wullimann y Rink, 2001; Gilthorpe et al., 2002; Fink et al., 2006; Rodríguez-Moldes et al., 2008).

Migración Neuronal

La posición de las neuronas juega un papel fundamental a la hora de determinar la fisiología de las mismas. Este posicionamiento adecuado se lleva a cabo a través de procesos de migración celular desde el lugar de nacimiento hasta el destino final. La mayor parte de las neuronas llevan a cabo su proceso de generación y diferenciación en distintos lugares. Siguiendo rutas migratorias con distintas orientaciones y patrones, a lo largo de distancias variables, llegan a posicionarse en regiones particulares del cerebro. Tanto las neuronas como las células gliales derivan predominantemente de células progenitoras localizadas en la pared interior del tubo neural. Estas regiones, conocidas como zona ventricular y zona subventricular, se componen de células proliferativas. Las dos células resultantes de la división celular puede que vuelvan a entrar al ciclo celular, puede que una vuelva a entrar al ciclo celular y que la otra salga del ciclo o puede que ambas células salgan del ciclo. Aquellas células que salen del ciclo celular comienzan su diferenciación. A medida que se diferencian, también migran desde su lugar de nacimiento hacia el lugar en el que residirán en el sistema nervioso adulto.

En el desarrollo temprano se han identificado dos formas principales de migración neural: radial, desde la zona ventricular hacia la superficie pial del tubo neural, y no radial o tangencial, la cual es paralela a la superficie del tubo neural. La migración radial fue la que primero se identificó y por lo tanto es la que mejor caracterizada está. La migración radial también es conocida como migración glial, ya que

los neuroblastos migran a lo largo de células gliales especializadas conocidas como glía radial (Rakic, 1990), que unen la superficie del lumen con la superficie pial del tubo neural.

El andamiaje de la guía radial proporciona el sistema de guiado principal para las neuronas en migración del sistema nervioso central. Sin embargo, desde hace tiempo se han observado células que se dispersan siguiendo patrones que no coinciden con el plano de las fibras gliales (Stensaas, 1967; Altman, 1969; Rakic y Sidman, 1969; Morest, 1970; Shoukimas y Hinds, 1978; Price y Thurlow, 1988; Austin y Cepko, 1990; O'Rourke et al., 1992; Walsh y Cepko, 1992). La migración tangencial conlleva diferentes tipos de movimientos celulares que difieren de manera principal en el tipo de sustrato utilizado por las células migratorias. En ciertos casos, grupos de neuronas migran apoyándose unas en otras para promover su migración, como en el caso de las interneuronas del bulbo olfatorio (corriente migratoria rostral). En otros casos, las neuronas en migración tangencial siguen axones en crecimiento para alcanzar su destino (neuronas secretoras de la hormona gonadotropina, Wray, 2001). Y existen casos, en los que en las neuronas en migración tangencial no utilizan sustratos celulares y en su lugar se dispersan de forma más o menos individualizada, como por ejemplo las células (interneuronas y oligodendrocitos) que migran del subpallio al pallio. (Fig. 8).

Independientemente del patrón de migración que sigan, las células migratorias tangenciales no respetan las fronteras del prosencéfalo, moviéndose a través de las diferentes subdivisiones del mismo (Heffron y Golden, 2000; Letinic y Rakic, 2001) o incluso cruzando a través de paquetes de axones (Wray, 2001; Spassky et al., 2002). También es conocido que las células en migración tangencial responden a algunas de las mismas moléculas que controlan el proceso de guiado axonal (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

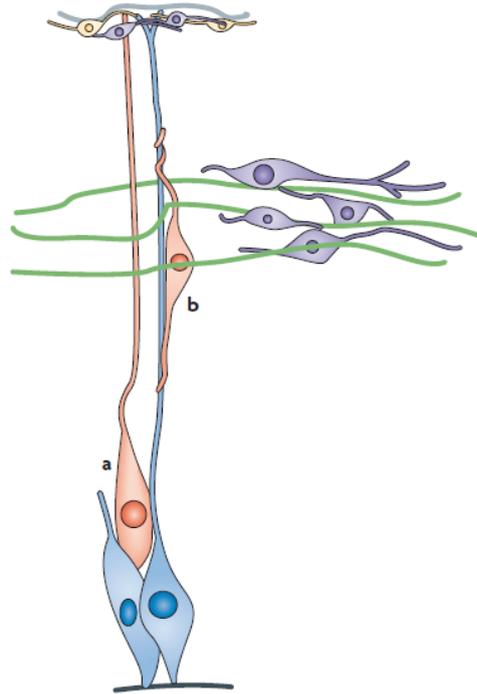


Fig. 8. Migración radial y tangencial de neuronas en el desarrollo de la corteza cerebral. Tomado de Ghashghaei et al., 2007. Las neuronas que migran de forma radial o bien realizan una translocación del soma (a) o migran apoyándose en los procesos (b) de la glía radial (azul). Las neuronas en migración tangencial (violeta) alcanzan la corteza a través de la zona marginal o la pared cerebral de forma supuestamente independiente de la glía radial. Se cree que estas neuronas utilizan fibras corticofugales (verde), neuronas de la zona marginal (amarillo) o la membrana pial (gris) como guía de la migración.

Pax6 ha sido relacionado con procesos de migración radial de neuroblastos a la corteza cerebral de mamíferos (Talamillo et al., 2003), y de células precursoras de oligodendrocitos en el tubo neural de embriones de pollo (di Lullo et al., 2011).

Se ha demostrado que la migración de neuronas talámicas sigue rutas tanto gliales como sustratos axonales (Ortino et al., 2003), habiéndose propuesto que la expresión de Pax6 en neuronas postmitóticas podría estar mediando en el crecimiento axonal. En el diencéfalo del pollo se ha puesto de manifiesto, mediante análisis clonal, cómo las células migran tangencialmente fuera de la zona ventricular siguiendo caminos axónicos (Golden et al, 1997).

La presente tesis tiene como fin realizar el estudio de una migración neural que transcurre en el diencefalo del pollo, más concretamente en la zona del epitálamo y capa dorsal superficial del tálamo. Si bien esta migración ya había sido sugerida en cierta manera (Guillén, 1991) en base a datos no demasiado fidedignos, actualmente disponemos de marcadores selectivos a nivel molecular que nos proporcionan datos fehacientes sobre qué genes se están expresando en un instante determinado en la población de células estudiadas. Esta migración neural se identifica porque las células en migración expresan el factor de transcripción Pax6 a lo largo de su recorrido.

Estos nuevos datos, basados en la expresión de un gen homeótico altamente conservado a lo largo de la evolución, nos permitirán realizar análisis comparativos de tipo homológico entre diferentes especies de vertebrados, lo que contribuirá a mejorar nuestro entendimiento sobre las causas que dirigen la morfología del sistema nervioso.

Objetivos

Dadas las evidencias parciales obtenidas previamente en el grupo de investigación sobre la existencia y la migración tardía en la región alar alta posterior del prosómero 2 diencefálico (región retrohabenular; Guillén 1991; Puelles, observaciones no publicadas), se pretende analizar en más detalle esta migración centrandó las observaciones en un análisis por hibridación in situ de la expresión del gen *Pax6* que aparentemente marca las células que hipotéticamente migran. Tal estudio pretende abordar muestras tanto de pollo como de ratón a efectos de hacer un análisis comparado dentro de estas especies de dicho fenómeno.

El análisis más completo de la migración sugiere la conveniencia de hacer análisis de marcajes in vitro del fenómeno migratorio mediante la técnica de dextranaminas biotiniladas (BDA).

Este conjunto de datos será analizado en coherencia con los datos autorradiográficos e inmunohistoquímicos previos de Guillén (1991) a efectos de llegar a las conclusiones oportunas.

Materiales y métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron embriones de pollo (*gallus gallus domesticus*) que fueron obtenidos a partir de huevos comprados en una granja local. Los huevos fertilizados se almacenaron a 14 °C para detener su desarrollo hasta el momento de inicio de la incubación. Para obtener los embriones en el estado deseado se colocaron en una incubadora a 37 °C, con ventilación forzada, rotación automática y condiciones de humedad relativa superiores al 50%, para que se reiniciara el desarrollo embrionario. Una vez en la incubadora, los embriones se desarrollaron hasta alcanzar la etapa o estadio de interés. Los embriones fueron estatificados de acuerdo a la tabla de estadios de Hamburger y Hamilton (1951).

Para el procedimiento de extracción de los embriones las pinzas y tijeras utilizadas, así como otros elementos accesorios fueron previamente lavados con abundante agua de grifo, luego con agua filtrada y finalmente con alcohol al 70%. Estas fueron las mínimas condiciones para garantizar las condiciones experimentales del material obtenido. Los embriones obtenidos fueron colocados en una placa de petri con una solución salina al 0,8% o bien en paraformaldehído al 4% (dependiendo del diseño experimental, ver más adelante). A continuación, utilizando una lupa se procedió a realizar la estadificación de acuerdo a la tabla de Hamburger y Hamilton (1951). Una vez definido el estadio de desarrollo alcanzado se procedió a diseccionar el cerebro eliminando el mesénquima y las meninges.

Todos los procedimientos experimentales con los embriones utilizados se han llevado a cabo de acuerdo al Real Decreto 1201/2005 y a la directiva de la Unión Europea 2003/65/CE. Los estadios de desarrollos utilizados comprenden desde HH28 hasta HH38.



Figura 9. Aspecto externo de los embriones utilizados en este trabajo según la tabla de estadios de desarrollo de embriones de pollo, trabajo de Hamburger y Hamilton.

Las imágenes utilizadas de ratón se han obtenido de la base de datos de patrones de expresión genéticos del Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org>). En concreto corresponden al atlas de desarrollo de ratón y se han utilizado imágenes de secciones de cerebros procesadas mediante hibridación in situ para el gen *Pax6* de estadios embrionarios y postnatales.

Técnicas histológicas.

Fijación.

La fijación se llevó a cabo con paraformaldehído al 4% (PF4%) en PBS pH 7,4. Para estadios de desarrollo temprano (entre HH28 y HH37), la

fijación se realizó mediante la inmersión del cerebro diseccionado en una solución de PF4% a 4°C durante una noche (entre 12 y 24 horas). Para los estadios a partir de HH38 la fijación se llevó a cabo mediante perfusión cardiaca de PF4% frío, para luego extraer el cerebro y dejarlo en una solución de PF4% durante 12-24 horas a 4°C.

Secciones con vibratomo.

Las secciones de vibratomo se realizaron con la finalidad de posteriormente ser utilizadas en los procedimientos de hibridación in situ e inmunohistoquímica. Para este fin se realizaron bloques con agarosa (D-1, low EEO, Pronadisa, Cat. No. 8008) al 4% en tampón fosfato pH 7,4 al 0,5M. Es importante que al hacer la inclusión la agarosa se adhiera bien al tejido, lo cual, se consigue evitando cambios bruscos de temperatura entre el tejido y la agarosa sumergiendo el tejido en agarosa a 60°C durante 20 minutos. Los cortes obtenidos, de un grosor de 90µm, se han ido recogiendo en pocillos con tampón fosfato para aplicar posteriormente la técnica de inmunohistoquímica o de hibridación in situ, según corresponda al procedimiento experimental.



Figura 10. Vibratomo, bloque de agarosa y placa de 6 pocillos.

Montaje en portaobjetos y observación con microscopio.

Los cortes flotantes se adhieren sobre los portaobjetos, lavados previamente en etanol al 70%, con una mezcla de etanol y gelatina (gelatina al 0,5% en etanol al 40%) con la ayuda de un pincel. Una vez que se secan lo suficiente como para no deteriorarse durante la deshidratación, los portaobjetos con los cortes se pasan por baños de 5 minutos de concentraciones crecientes de etanol (70%, 96%, 96%, 100% y 100%) y finalmente de xilol (Panreac, Cat. No.141769). Por último, los cubrimos con eukitt (EMS, Cat. No. 12673-22) y tras secarse bien en la estufa podemos pasar a analizarlos en el microscopio.

Técnicas de inmunohistoquímica.

Se han realizado reacciones de inmunohistoquímica indirecta para la detección de la proteína PAX6 en embriones de pollo, en los estadios comprendidos entre HH28 (5,5 – 6 días de incubación) y HH38 (12 días de incubación). Partiendo de cortes flotantes en buffer fosfato (PB) pH 7.4 (bloques de agarosa, vibratomo a 90 µm).

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Lavado en solución PB + Peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 20 ó 30 minutos para inhibir la peroxidasa endógena, este proceso se realiza en la oscuridad. (Tampón Fosfato 0.1M pH 7,3),
2. Lavado en PBS+T durante 10 minutos. (Triton 0,1%, Sigma, Cat. No. X100).
3. Incubar en PBS+Triton+Gelatina+Azide+Lisina de 30 a 60 minutos. (Solución bloqueante. Lisina, *Sigma*, Cat. No. L5626.), (Sodium azide Sigma, Cat. No. S2002) , (Gelatina, Panreac, Cat. No. 142060)
4. Lavado en PBS+T+G+A durante 10 minutos.

5. Anticuerpo primario (PAX6, 1:20 monoclonal, *DSHB, Iowa City, IA, USA*) disuelto en PBS+T+G+A+L durante 1 ó 2 días.
6. Lavado en PBS+T+G (10 minutos , 3 veces).
7. Anticuerpo Secundario (GAM biotinilado, 1:200, *Sigma, Cat. No. GEPA43009*) disuelto en PBS+T+G de 1 a 2 horas.
8. Lavado en PBS+T (10 minutos, 3 veces).
9. Complejo Avidina-Biotina (ABC Vector Laboratories Cat. No. PK-4000) disuelto en PBS+T durante 1 hora. (Preparado 20 minutos antes de la incubación).
10. Lavado en PBS (10 minutos, 2 veces).
11. Lavado 10 minutos en TRIS-HCl 0,05M pH7,6.
12. Revelado con DAB (3,3'- diaminobenzidin tetrahydrochlorid. DAB, AppliChem, A0596) en TRIS y peróxido de hidrógeno observando con la lupa para detener la reacción con TRIS (entre 2 y 5 minutos).
13. Lavado en TRIS (2 veces, 5 minutos).
14. Montar en portaobjetos (gelatina al 0,5% en alcohol 40%), deshidratar (baños de alcohol de concentración creciente y xilol), cubrir con cubreobjetos y medio de montaje (eukitt) y dejar secar. Finalmente se procedió al análisis microscópico.

Marcaje con dextranaminas biotiniladas (BDA).

Los dextranos son un complejo de polisacáridos hidrofílicos sintetizados con la bacteria *Leuconostoc*, se caracterizan por su alto peso molecular, buena solubilidad en agua, baja toxicidad y por ser relativamente inertes. Estas propiedades los hacen ser buenos portadores solubles en agua de tintes, indicadores y grupos reactivos en una amplia variedad de aplicaciones. Sus enlaces, poco comunes biológicamente, α -1,6 poli-glucosa son resistentes a la mayoría de

glucosidasas celulares endógenas, lo que los hace ideales como trazadores de células vivas a largo plazo.

Las dextranaminas con pesos moleculares de hasta 70.000 daltons se utilizan para marcar proyecciones neuronales y pueden funcionar como marcadores tanto anterógrados como retrógrados. Las utilizadas en este experimento son de 3.000 MW, conjugados con biotina (BDA, Molecular Probes, Cat. No. D7135). Con este peso molecular funcionan principalmente como marcadores retrógrados penetrando en los procesos neuronales periféricos y difundiéndose más rápido que otras dextranaminas con pesos moleculares mayores. En cualquier caso las células a marcar en este experimento son neuroblastos en migración que aún no poseen axón y por tanto es irrelevante que el marcador tenga un carácter retrógrado o anterógrado.

Para llevar a cabo la inyección del trazador se prepararon agujas de tungsteno sujetas a pipetas Pasteur, tras fundir las puntas de vidrio con un mechero de gas. Se llevó a cabo la cristalización del BDA sobre las puntas de tungsteno y estas puntas se guardaron para aislarlas del polvo.

Tras diseccionar el cerebro, se lo colocó en una placa de sylgard y fue sujetado con alfileres de disección de tal manera que la placa del techo del cerebro quedara hacia arriba, ya que la zona a marcar era la región retrohabenuar. Es muy importante notar, que el cerebro debe estar siempre sumergido en el medio de incubación para evitar que la tensión superficial dañe la morfología del mismo. Una vez sujeto el cerebro, se da un único y rápido pinchazo, con decisión, en la zona de interés.

Finalmente, el cerebro marcado se pasó al medio final de incubación oxigenado y se le permitió continuar su desarrollo.



Figura 11. Aguja de tungsteno, placa de sylgard y bola metálica “para infusiones” utilizada para sumergir los cerebros en el medio de incubación.

Incubación in Vitro y revelado.

Se han incubado, durante 24 horas, cerebros de pollo HH31 recién disecados y marcados para el seguimiento de la migración. Los experimentos realizados se han llevado a cabo tanto con cerebros enteros, como con secciones de los mismos que incluyen el diencéfalo en su totalidad.

Los cerebros fueron sumergidos en el medio de incubación que a continuación se describe:

Solución 1:

NaCl 3M	91,3 ml/l
KCl 1M	10 ml/l
Ca Cl ₂ 2 H ₂ O 0,2 M	20 ml/l
Mg Cl ₂ 6H ₂ O 0,2 M	10 ml/l

Solución 2:

Tampón fosfato 0,2 M, pH7,4	10 ml/l
HEPES	2,38g/l
Glucosa	4 g/l

(La glucosa se agrega en el momento en el se va a hacer la incubación).

Se mezclan ambas soluciones a partes iguales y se conservan a 4 °C.

Soluciones stock:

NaCl 3M; PM. 58,44	175,3 g/l
KCl 1M; PM. 74,55.....	74,55 g/l
Ca Cl ₂ 2 H ₂ O 0,2 M; PM. 147,2.....	29,4 g/l
Mg Cl ₂ 6H ₂ O 0,2 M; PM. 203,31...	40,66g/l

El diseño del experimento fue el siguiente:

Se utilizó una jarra alta con dos litros de medio de incubación. La jarra se colocó sobre un agitador magnético girando muy lento para evitar dañar el tejido. La agitación del medio de incubación oxigenaba el tejido, debido a que en el fondo del recipiente se había introducido un microdifusor (similar al utilizado en las peceras) conectado a una botella de carbógeno. Además los cerebros se colocaron en el interior de bolas metálicas "de infusión" para evitar que se dañaran al circular por la jarra. En condiciones de temperatura ambiente los tejidos se mantuvieron durante 24 horas en un buen estado de conservación, ya que no se observó necrosis celular.

Después de 24 horas, los cerebros se quitaron del medio oxigenado y fueron incluidos en bloques de agarosa para pasar a ser cortados en el vibratomo en secciones de 90 µm de espesor, en

diferentes planos de corte. Los cortes se recogieron en tampón fosfato, fueron fijados durante 6 horas en paraformaldehído al 4% en PB y luego se procedió a aplicar el siguiente protocolo:

1. Lavado en solución PB + Peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 30 minutos para inhibir la peroxidasa endógena.
2. Lavado en PBS+T durante 10 minutos.
3. Incubar en PBS+T+G+A+L durante 60 minutos.
4. Lavado en PBS+T (10 minutos, 2 veces).
5. Complejo AB disuelto en PBS+T durante 1 hora. (Preparado 20 minutos antes de la incubación).
6. Lavado en PBS (10 minutos, 2 veces).
7. Lavado 10 minutos en TRIS 0,05M pH7,6.
8. Revelado con DAB en TRIS y peróxido de hidrógeno observando con la lupa para detener la reacción con TRIS (entre 2 y 5 minutos).
9. Lavado en TRIS (2 veces, 5 minutos).
10. Montar en portaobjetos, deshidratar, cubrir y secar.

Técnicas de biología molecular.

La detección en el tejido nervioso de la expresión génica se ha realizado mediante la técnica de hibridación in situ. El procedimiento globalmente se puede dividir en dos aspectos claves, en primer lugar se ha hibridado una sonda, marcada con digoxigenina (sonda antisentido), que es complementaria al ARNm a detectar (ARNm sentido), y posteriormente se ha detectado la marca inmunohistoquímicamente. Esta ribosonda antisentido se ha sintetizado en el laboratorio, partiendo de un inserto de ADN del gen *Pax6*

localizado en un plásmido, mediante una reacción de transcripción in vitro.

El ADN plasmídico con el inserto de *Pax6* utilizado en este estudio ha sido cedido por Yasuda K.

Extracción del plásmido.

Se llevó a cabo el cultivo y la extracción de ADN plasmídico para poder disponer de una cantidad suficiente como para llevar a cabo la síntesis de la ribosonda. Partiendo de bacterias previamente transformadas, se llevó a cabo un cultivo en LB (Lysogeny Broth) con ampicilina (100µg/mL; Sigma, Cat. No. A9518) durante la noche y se centrifugo a la mañana siguiente a 6000g durante 15 minutos a 4°C. Para realizar la extracción de ADN plasmídico del cultivo bacteriano se utilizó el kit comercial para realizar una Midiprep (Qiafilter Plasmid Midi Kit, Qiagen, Cat. No. 12243), que permite la extracción del ADN mediante lisado alcalino y posterior unión del ADN a la resina de intercambio de aniones QIAGEN, en condiciones de baja concentración salina y pH adecuadas.

Linealización del ADN.

El plásmido es una molécula de ADN circular de doble cadena que debe ser linealizada para la posterior síntesis de la ribosonda. Esta linealización se ha conseguido mediante endonucleasas de restricción. En este caso se utilizó la enzima *Cla* I, ya que, corta en el flanco que nos permite posteriormente sintetizar la sonda antisentido mediante la ARN

polimerasa T7. Como control se sintetizó también la sonda sentido linealizando con la enzima HindIII y posteriormente la ARN polimerasa SP6.

La solución de linealización consiste en 2µl de enzima Cla I para obtener lineal para sintetizar la sonda antisentido y HindIII para linealizar para obtener la sonda sentido, 5µl de tampón Tango (Fermentas, Cat. No. BY5), que es el recomendado para esta enzima, y el resto del volumen (hasta completar 50 µL) se reparten entre ADN circular y H₂O pura (Sigma). Se han utilizado 5µg de ADN (calculando el volumen tras medir la concentración con el espectrofotómetro). Esta digestión enzimática se prolonga durante 2 horas a 37 °C. Finalmente se inactiva la enzima de restricción poniendo la disolución a 65 °C durante 10 minutos. Después se corre un gel de agarosa para asegurarnos de que la linealización ha sido efectiva.

Fenolización y precipitación del ADN.

El objetivo de esta técnica es limpiar el plásmido de las enzimas utilizadas durante la digestión y debe hacerse después de la linealización. En primer lugar se duplica con agua sigma el volumen del producto linealizado. Se añade, el doble de volumen conseguido con el producto linealizado + agua sigma, fenol:cloroformo:alcohol-isomílico (25:24:1, Sigma, Cat. No. P2069). Se agita en vórtex y se centrifuga 10 minutos, 14000rpm. a 4°C. A continuación se aspira con una micropipeta el sobrenadante evitando la interfase blanquecina y la fase inferior. Se añade cloroformo (en relación 1:1 con el volumen recuperado). Se vuelve a mezclar en el vórtex y se centrifuga 10 minutos a 14000rpm a 4°C. Se toma la fase superior y se procede a la precipitación.

Se añade acetato de sodio 3M a pH 5,2 (Sigma, Cat. No. S-7899), 1/10 del volumen que tenemos. Se mezcla y a continuación se añade el 80% del volumen que tenemos de isopropanol. Se centrifuga a 14000rpm. a 4°C durante 30 minutos y se elimina el sobrenadante. Se lava con 1ml de etanol 70% congelado a -20 °C y se centrifuga 10 minutos a 14000rpm. Se elimina el etanol y se deja secar el pellet. Se añaden 50ml de agua sigma para resuspender. Finalmente se lleva a cabo una corrida electroforética para verificar el estado del ADN.

Síntesis y purificación de la ribosonda.

La sonda (ARN de cadena simple complementario al ARNm que queremos detectar) se sintetiza a partir del ADN linealizado, por medio de una reacción de transcripción in vitro, para lo que hemos utilizado la ARN polimerasa T7 para producir la sonda antisentido y la polimerasa SP6 para producir la sonda sentido. En concreto, la reacción se ha llevado a cabo incubando durante 3 horas a 37 °C la siguiente mezcla:

- o 1 µg de plásmido linealizado.
- o Agua libre de RNASAS (hasta completar 20 µl).
- o 2 µl de buffer de transcripción 10X.
- o 2 µl de dNTP (Roche, DIG RNA Labeling Mix, Cat. No. 11 277 073 910), mezcla de nucleótidos que contiene UTP-Digoxigenina.
- o 2 µl de polimerasa T7 (o SP6).
- o 0,5 µl de RNASA inhibidora. (Roche, Cat. No. 03 335 399 001).

A continuación se ha procedido a correr un gel de agarosa para comprobar la integridad de la sonda. Para eliminar el ADN lineal que pudiera quedar presente se ha incubado, a 37 °C durante 20 minutos, la

mezcla anterior junto con 3 µl de DNASA (Roche, Cat. No. 04 716 728 001) y 0,5 µl de RNASA inhibidora. La reacción se ha detenido con EDTA añadiendo 40 µl de agua libre de RNASAS, 4 µl de EDTA, 5 µl de LiCl, 8M (Sigma, Cat. No. L7026), y 125 de etanol absoluto. Tras agitar se ha guardado hasta el día siguiente a -20 °C, para que precipite.

Al día siguiente, se ha centrifugado a 4°C, a velocidad máxima durante 15 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, se ha resuspendido el pellet con 300 µl de etanol 70% y se ha centrifugado durante otros 15 minutos a 4°C, a velocidad máxima. Tras eliminar el sobrenadante se ha dejado secar el pellet a 37 °C durante 20 minutos. Finalmente se ha resuspendido con 25 µl de agua libre de RNASAS y 25 de formamida desionizada (Ambion, Cat. No. AM9342), desnaturalizando la sonda 3 minutos a 80 °C, 5 minutos en hielo y por último ha sido almacenada a -20°C.

Hibridación in situ.

Se ha seguido el protocolo descrito por Shimamura et al. (1994) con modificaciones para cortes de agarosa. El material de partida ha sido cortes flotantes de 90 µm en PBS, por lo general el protocolo de hibridación in situ se ha iniciado el mismo día o día siguiente a realizar el corte mediante vibratomo. Los cerebros habían sido fijados justo antes de ser cortados por lo que no fue necesario congelarlos. El protocolo se ha llevado a cabo en tres días consecutivos, a continuación se especifican los pasos del mismo:

Día 1.

- o 3 lavados en PBT de 10 minutos cada uno. PBT = PBS-Tween 0.1% (Sigma, Cat. No. P7949).

- Proteinasa K en PBT (10µg/ml) a temperatura ambiente, durante 5 minutos sin agitar. (Roche, Cat. No. 03 115 836 001)
- 2 lavados en PBT rápidos y sin movimiento.
- Fijar en 0,25% glutaraldehído/4%paraformaldehído en PBT a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- 3 lavados en PTB de 10 minutos cada uno.
- Buffer de hibridación. Incubando dos horas a 58°C.

Componentes para 50ml de buffer de hibridación.

50% formamida desionizada	25ml.
NaCl 5M	7,5ml.
PE 10x	5ml.
tRNA (20mg/ml)	1,5ml.
Heparina (50mg/ml)	0,5ml.
CHAPS 10%	0,250g.
Tween-20 10%	0,5ml.
Agua libre RNASAS	enrasar a 50ml.

- Buffer de hibridación con sonda a razón de 2µl por cada ml de buffer de hibridación (precalentado a 58°C por 5 minutos) hasta el día siguiente. O bien, 1µl si la sonda ya había sido usada previamente.

Día 2.

- Recuperar el buffer de hibridación y guardarlo a -20°C para reutilizarlo.
- 2 lavados con Buffer 1 a 58°C durante 30 minutos cada uno.
- 2 lavados con Buffer 1.5 a 50°C durante 30 minutos cada uno.
- Lavado con buffer de RNASA. Lavado rápido.
- Buffer de RNASA + 100µg/ml RNase A (Roche, Cat. No. 10 109 142 001) durante una hora a 37°C.

- Lavado rápido con buffer de RNASA.
- Lavado con Buffer 3 a 50°C durante 30 minutos.
- 2 lavados con buffer 4, a 65°C durante 20 minutos.
- Lavado con 1X MABT a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Solución de bloqueo: MABT con 10% SS (heat-inactivated Sheep SERUM, Sigma, Cat. No. S2263) y 2% BBR (Boehringer Blocking Reagent, Roche, Cat. No. 11 096 176 001), durante una hora a temperatura ambiente.
- Solución de bloqueo + anti-Dig Fab fragment (AP) (Roche, Cat. No. 11 333 062 910) a una concentración 1/3500 toda la noche a 4°C.

Día 3.

- Recuperar el anticuerpo y guardarlo a -20°C para su reutilización.
- 7 lavados con MABT de 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado con NTMT conteniendo 2mM levamisole (0,5mg/ml) durante 20 minutos a temperatura ambiente. (Sigma, Cat. No. L9756, inhibidor de las alcalino fosfatasa endógenas).
- Reacción con los reactivos
 - 0,45µl/ml NBT (Roche, Cat. No. 11 383 213 001, a 75mg/ml)
 - 3,5µl/ml BCIP (Roche, Cat. No. 11 383 221 001, a 50mg/ml)
 - 2mM levamisole en NTMT.en la oscuridad. El tiempo de este revelado ha estado en torno a las 3 – 4 horas.
- Detener la reacción con PBT conteniendo 1mM EDTA.
- Postfijar con paraformaldehído 4%.
- Montaje en portaobjetos.

A continuación se muestra la hoja de cálculo realizada para optimizar la cantidad de material utilizado en la preparación de las diferentes disoluciones, dependiendo de la cantidad de tejido a procesar, medida en número de pocillos.

Hibridación in situ - Día 1. MATERIALES

PBT	1000	ml
PBS 0.1M	990	ml
Tween 20 10%	10	ml

PBS 0.1M	990	ml
PBS 10x	99	ml
H ₂ O	891	ml
Tween 20 10%	50	ml
Tween 20	5	ml
H ₂ O	45	ml

Proteínasa K (en PBT)	30	ml
Concentración Final	10	ug/ml
ml/pocillo	1,5	
Nº. de pocillos	18	
Cantidad exacta PK	27	ml
PK (alícuotada 20mg/ml)	15	ul
PBT	29,985	ml
Pipetear a	1,67	ml/pocillo

Glutaraldehído 0.25%-Paraformaldehído 4%	30	ml
ml/pocillo	1,5	
Nº. de pocillos	18	
Cantidad exacta	27	ml
Glutaraldehído 25%	0,3	ml
Paraformaldehído 4% en PBS	29,7	ml

BUFFER DE PREHIBRIDACIÓN	50	ml
50% formamida desionizada	25	ml
NaCl 5M	7,5	ml
PE 10x	5	ml
tRNA	1,35	ml
Heparina	0,5	ml
CHAPS	0,25	g
Tween 20 10%	0,5	ml
Enrasar con H ₂ O libre RNAsas hasta	50	ml

Hibridación in situ - Días 2 y 3. MATERIALES

Buffer 1	15	ml
NaCl 5M (300mM)	0,9	ml
PE 10x (0.1%)	1,5	ml
Tween 20 10% (0.1%)	0,15	ml

Buffer 1.5	50	ml
NaCl 5M (50mM)	0,5	ml
PE 10x (0.1%)	5	ml
Tween 20 10% (0.1%)	0,5	ml

Buffer Rnasa (pH 7.2)	50	ml
PIPES 10mM	0,120	g
NaCl 5M (500mM)	5	ml
Tween 20 10% (0.1%)	0,5	ml

Buffer Rnasa (pH 7.2)	50	ml
RNasa A	500	ul

Buffer 2	50	ml
50% formamida desionizada	25	ml
NaCl 5M (300mM)	3	ml
PE 10x (0.1%)	5	ml
Tween 20 10% (0.1%)	0,5	ml

Buffer 3	50	ml
50% formamida desionizada	25	ml
NaCl 5M (150mM)	1,5	ml
PE 10x (0.1%)	5	ml
Tween 20 10% (0.1%)	0,5	ml

Buffer 4	50	ml
NaCl 5M (500mM)	5	ml
PE 10x (0.1%)	5	ml
Tween 20 10% (0.1%)	0,5	ml

MABT 1x	1000	ml
MAB 5X	200	ml
Tween 20 10% (0.1%)	10	ml
Enrasar H ₂ O	790	ml

Solución BLOQUEO	60	ml
Sheep Serum	6	ml
BBR	12	ml
MABT 1x	42	ml
ml/pocillo	1,5	ml/pocillo
Nº. de pocillos	18	
Volumen exacto	27	ml
Doble volumen exacto	54	ml
Pipetear a	1,67	ml

NTMT + NBT + BCIP	105	ml
NTMT	104,59	ml
NBT	47,25	ul
BCIP	367,50	ul
ml/pocillo	2,5	
Nº. de pocillos	42	
Volumen exacto	105	ml
Pipetear a	2,5	ml

Solución Anticuerpo	65	ml
anti-Dig Fab Fragment-AP	18,57	ul
Concentración	1/3500	

NTMT	500	ml
Tris-Cl 1M (pH 9.5)	50	ml
NaCl 5M (100mM)	10	ml
Tween 20 10% (0.1%)	5	ml
MgCl ₂ 1M (50mM)	25	ml
Levamisole	0,25	g

PBT + EDTA	72	ml
PBT	71,86	ml
EDTA	144,00	ul
ml/pocillo	4	
Nº. de pocillos	18	
Volumen exacto	72	ml

Resultados

Análisis de la migración en pollo.

En HH28 (entre 5,5 y 6 días de incubación) ya se observa una pequeña acumulación de células *Pax6* positivas a cada lado de la línea media (Fig. 12 E), en la región retrohabenular o dorsocaudal del tálamo, que está intercalada, junto a la placa del techo, entre los territorios habenular y pretectal. En este estadio se está produciendo el nacimiento de estos neuroblastos pero todavía no se observa migración de los mismos. La expresión de *Pax6* se hace evidente no solamente en la región retrohabenular, donde cobra su máxima intensidad (Fig. 12 B), sino también en zonas adyacentes tanto rostrales como caudales tales como el núcleo habenular medial y la zona más dorsal del pretecho. También el neuroepitelio que recubre el tercer ventrículo se encuentra activo en su mayor parte (Fig. 12 C, D y E).

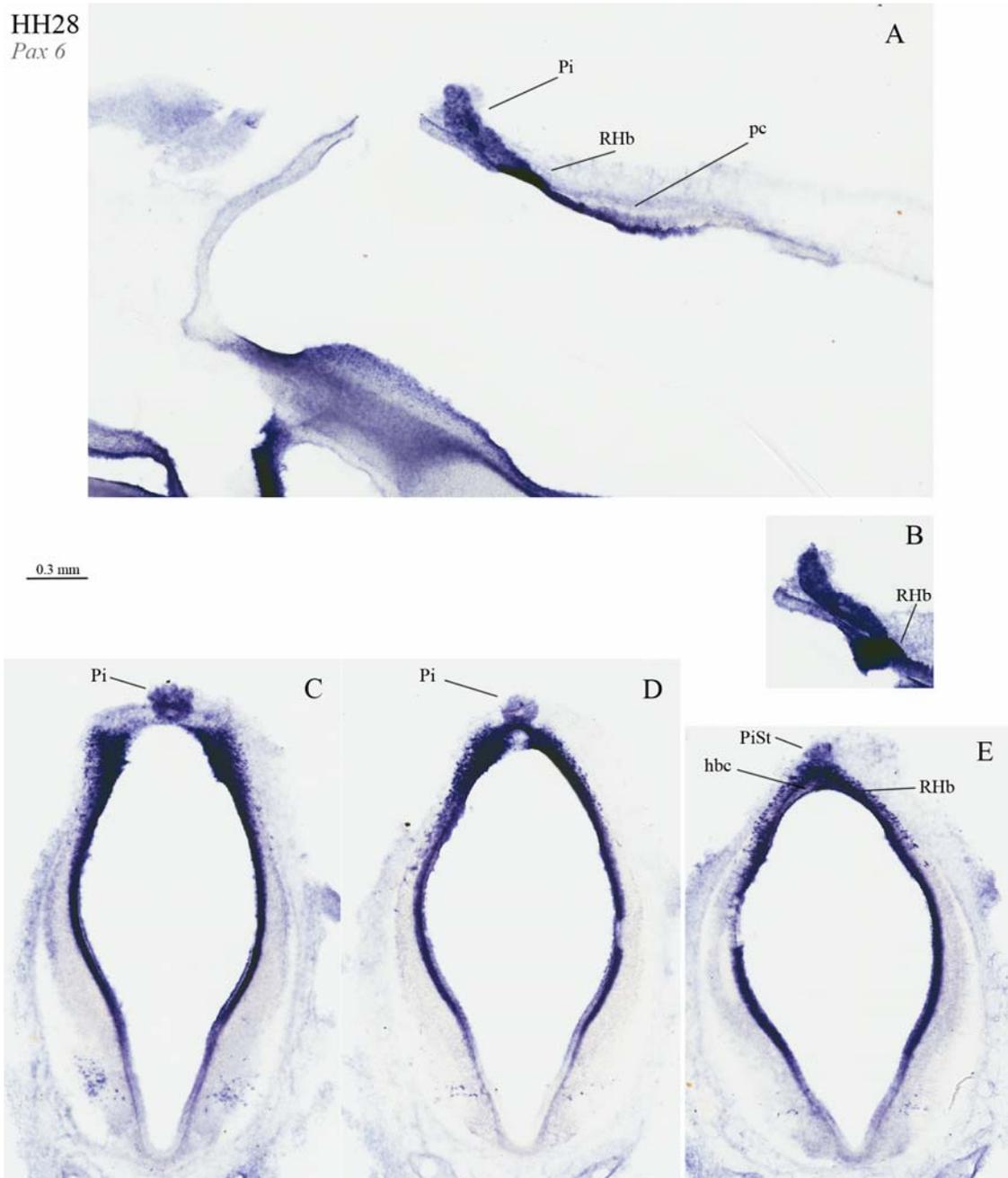


Fig. 12. Secciones sagitales (A y B) y coronales en sentido caudal (C, D y E). Estadio HH28. ISH *Pax6*.

En HH32 (7,5 días de incubación) se observa algo más de movimiento, aunque no se puede hablar todavía de migración, puesto que básicamente se produce un aumento del número de células *Pax6* positivas en la región progenitora retrohabenular (Fig. 14) que no llegan a avanzar en ninguna dirección determinada. Junto a este núcleo de la región retrohabenular, se observa otro núcleo (Fig. 13 E* y F*) también

Pax6 positivo pero en p1. Lateralmente, ambos núcleos se van separando, pareciendo este núcleo del pretecho una fuente de neuronas que migran caudalmente. Ya en HH28 se intuía este núcleo (Fig. 12 B), en este caso totalmente en contacto con el de la región retrohabenuar, lo que le daba un aspecto más alargado caudalmente y los hacía prácticamente indistinguibles, en este estadio HH28, al uno del otro.

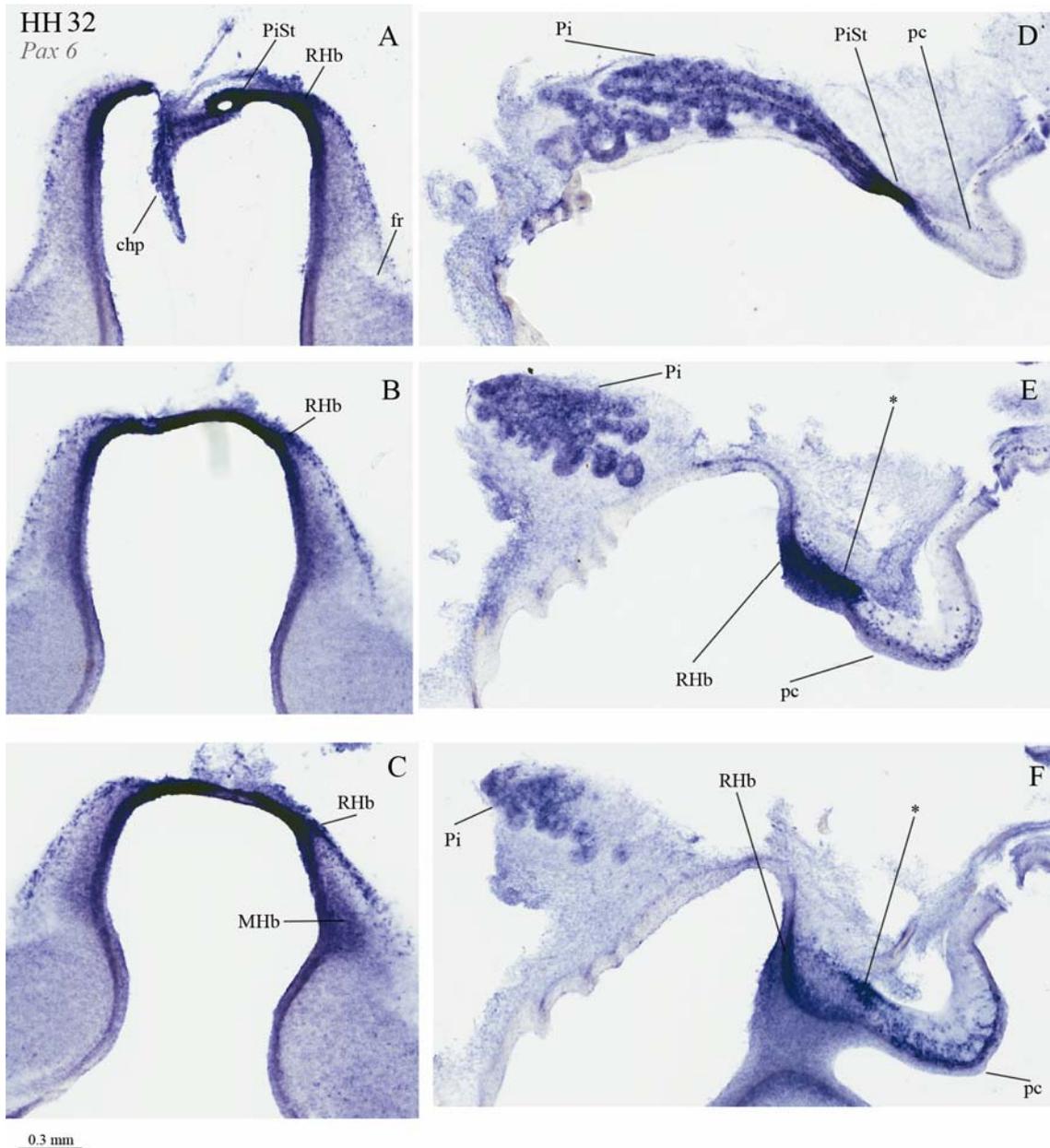


Fig.13. Secciones coronales en sentido caudal (A, B y C) y sagitales (D, E y F). Estadio HH32. ISH *Pax6*.

Podemos establecer la frontera entre los prosómeros talámico y prefrontal a este nivel dorsal justo en la intersección de estos dos núcleos (Fig. 13 E, RHb y *).

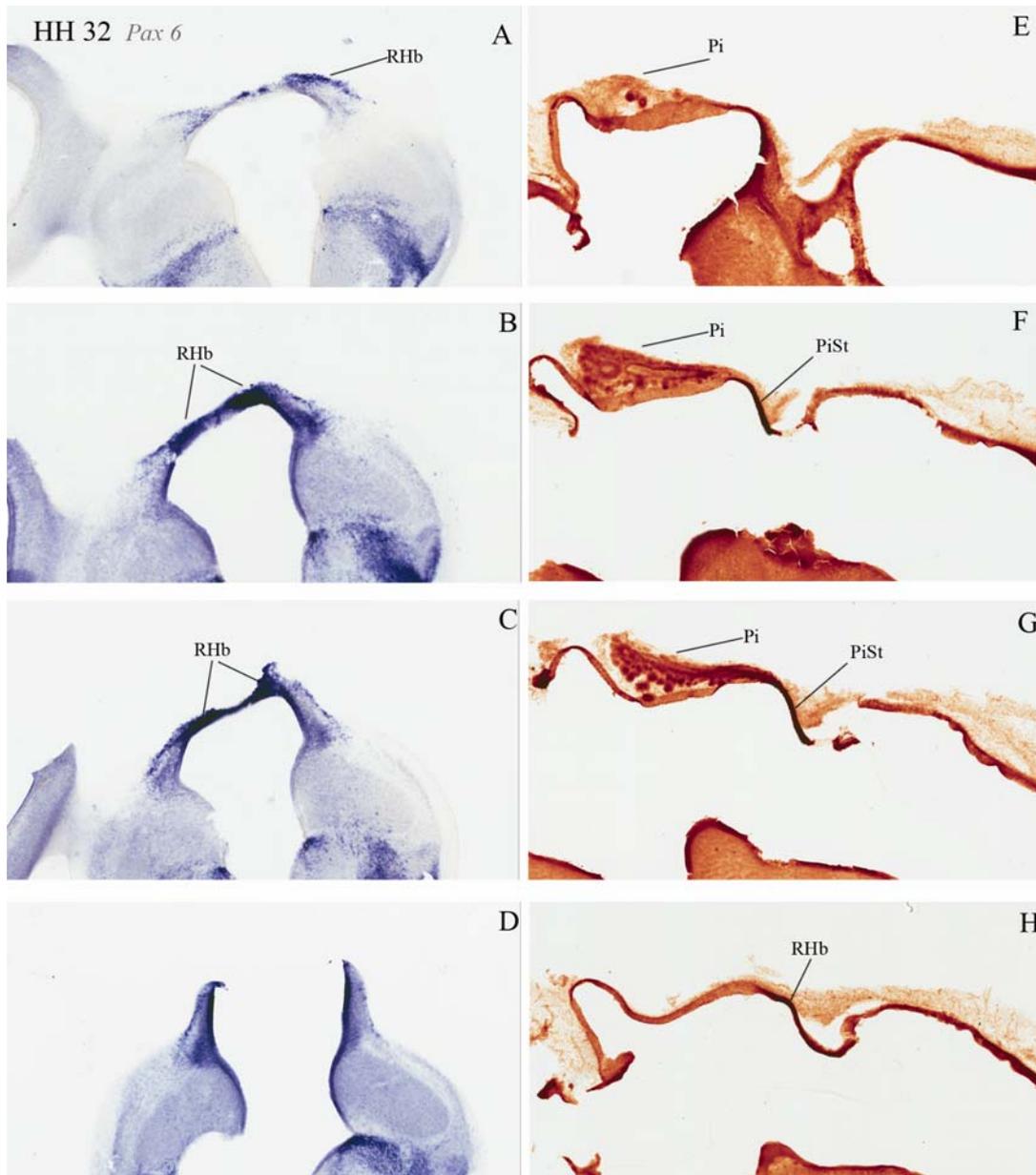


Fig.14. Secciones coronales en sentido rostral (A, B, C y D) ISH *Pax 6* y sagitales (E, F, G y H) IHC PAX6. Estadio HH32.

En HH32, la expresión de *Pax6* en el ventrículo ya es más débil que en HH28 y se mantiene en niveles semejantes en los núcleos habenuar

medial y lateral (Fig. 12 C-E, Fig. 13 B y C) aunque con bastante menor intensidad, en HH32, que en la región retrohabenuar.

En HH34 (8 días de incubación) el número de células Pax6 positivas ha aumentado considerablemente en la región retrohabenuar (Fig.15 A. Fig.16 D, E) y se empieza a vislumbrar un pequeño avance rostral tangencial, bastante más significativo que en estadios anteriores (Fig.15 #, Fig.16 #, Fig. 18 C, D y Fig.19), por la superficie dorsal que parece detenerse a la altura del fascículo retroflejo (Fig.15 B, E, F).

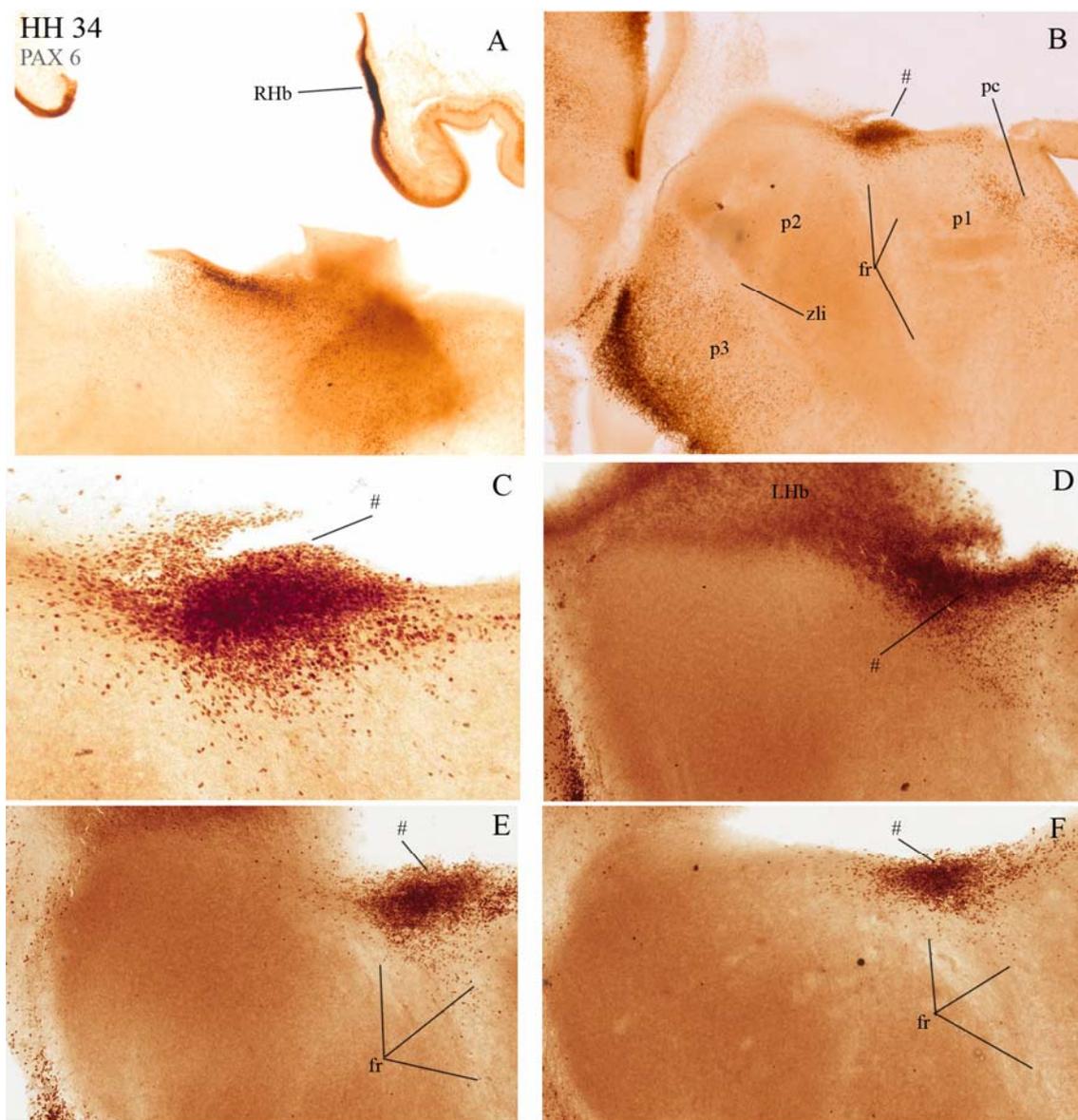


Fig.15. Secciones sagitales de pollo. Estadio HH34. IHC PAX6.

La expresión de *Pax6* en la pared ventricular se va haciendo cada vez más débil, aunque se mantiene el nivel de expresión en HH34 en los núcleos habenulares y subhabenulares semejante al estadio HH32 (Fig. 16). Las células (#) avanzan rostralmente adentrándose, algunas de ellas, en la región del núcleo habenular lateral y subhabenular lateral.

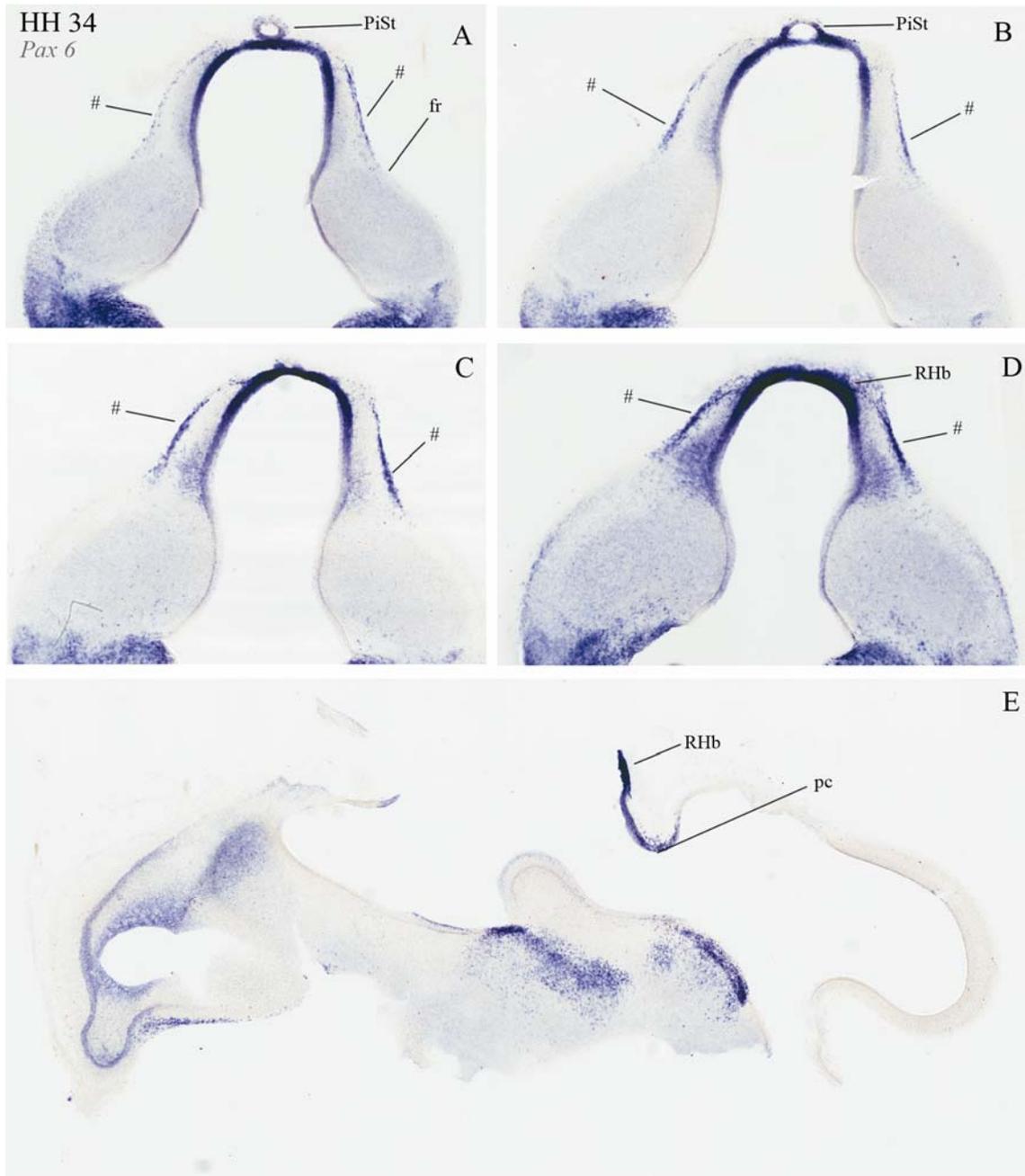


Fig.16. Secciones coronales (A, B, C y D) de rostral a caudal y medio sagital (E) de pollo. Estadio HH34. ISH *Pax6*.

Esta migración, a nivel superficial produce una protuberancia dorsal bastante visible (Fig. 15 B#, C#), lo que da una idea del considerable aumento del número de células que se produce a los 8 días de incubación. Al mismo tiempo, se constata que la migración alcanza la parte dorsal del tálamo propiamente dicho, fuera de la región habenular (Fig.15 D, E, F; Fig. 22 D, Fig. 23 E, F).

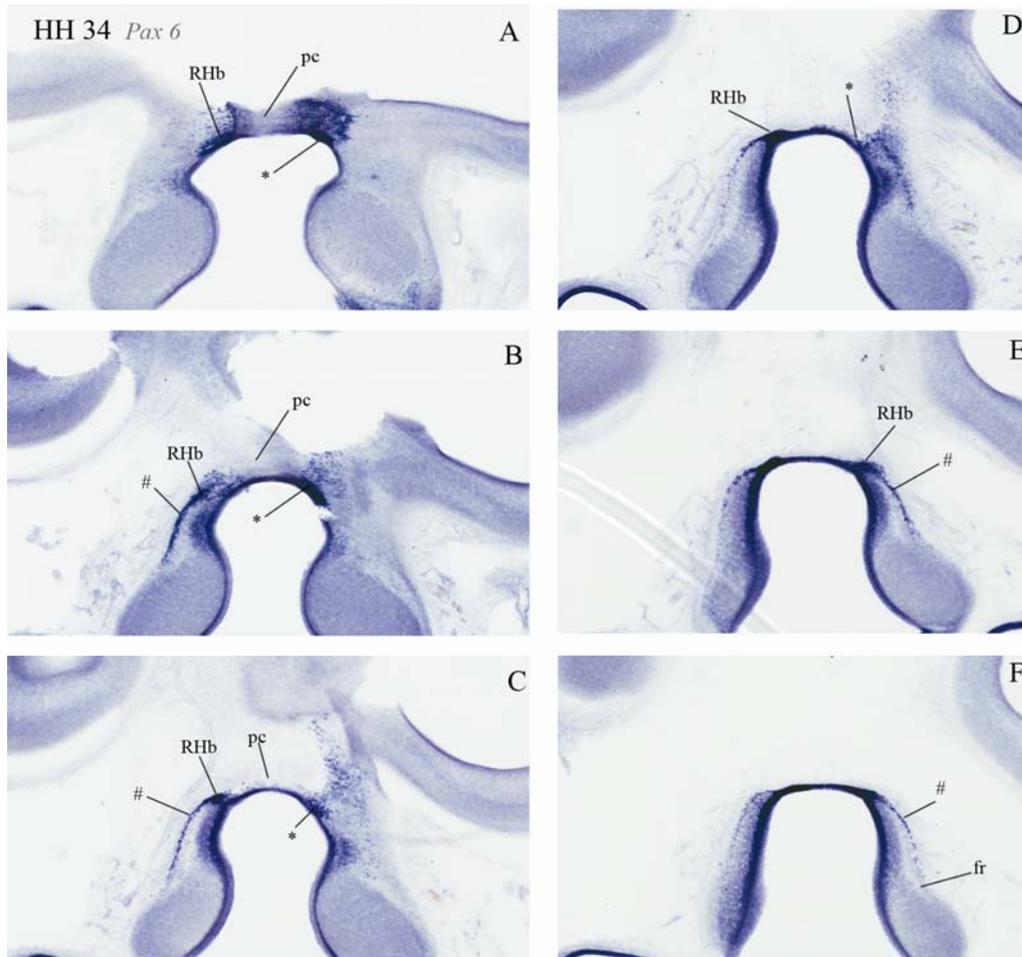


Fig.17. Secciones coronales de caudal a rostral de pollo. Estadio HH34. ISH *Pax6*.

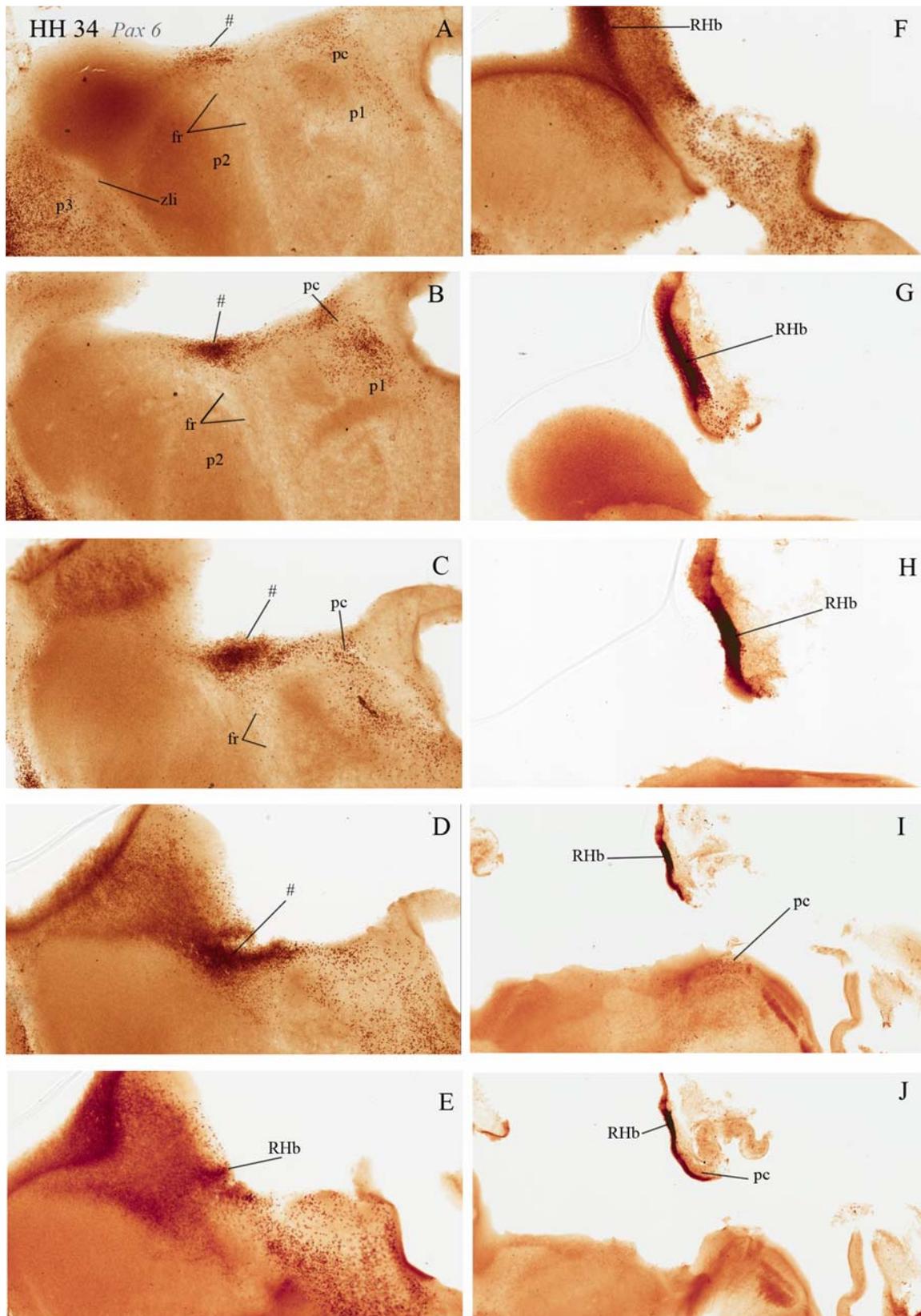


Fig.18. Secciones sagitales de pollo de lateral a medial. Estadio HH34. IHC PAX6.

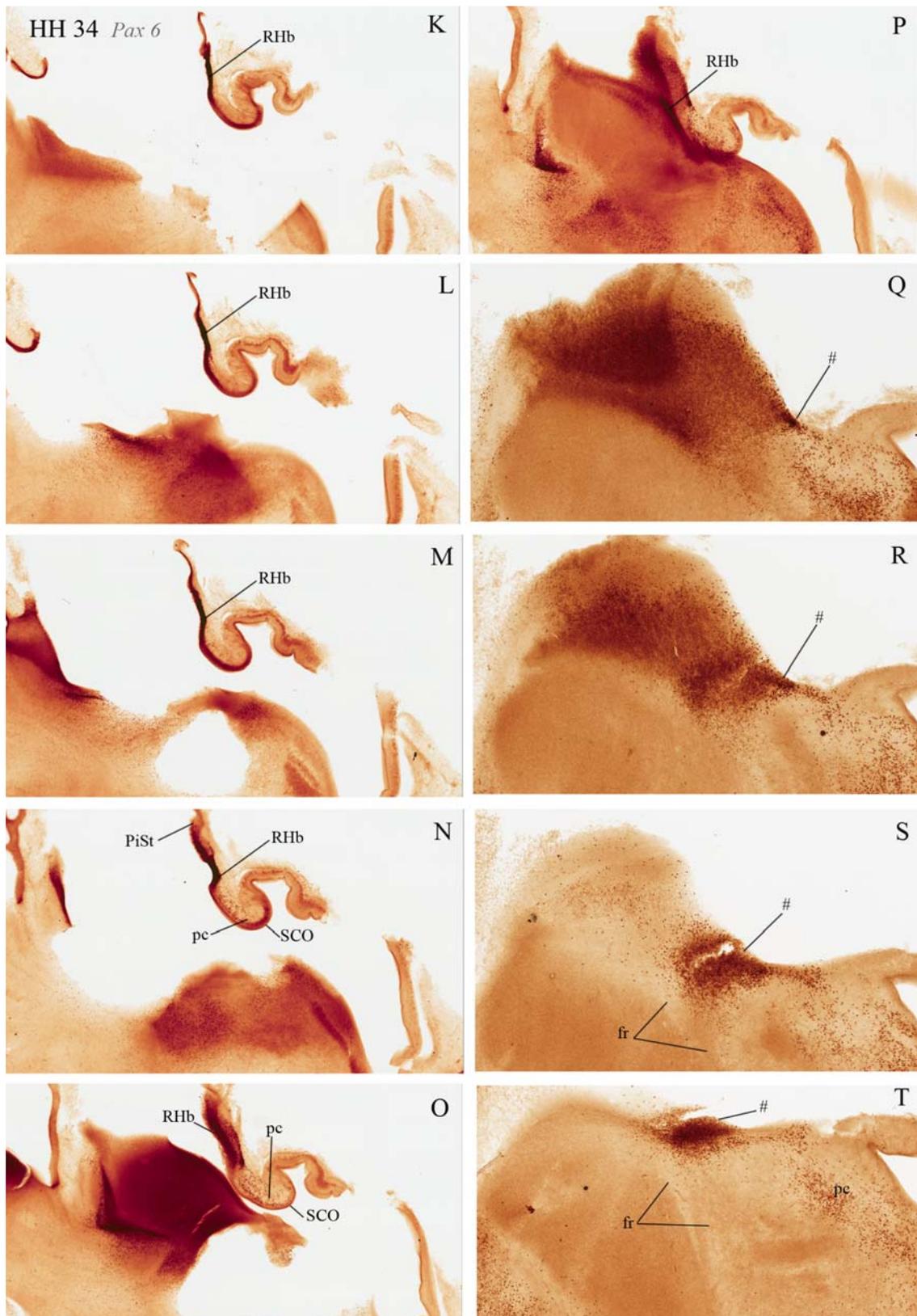


Fig.19. Secciones sagitales de pollo de medial a lateral. Continuación de la Fig. 18. Estadio HH34. IHC PAX6.

En la Fig. 20. (Secciones coronales de pollo en sentido rostral. Estadio HH34. IHC PAX6), nótese que las secciones A y D son la misma, al igual que ocurre con la B y E y con la C y F. En las figuras siguientes (Figs. 21, 22 y 23) se han ampliado las áreas resaltadas. La ligera inclinación transversal de estas tres secciones nos permite visualizar en los dos hemisferios talámicos un mayor recorrido de las células (#) producidas en la región retrohabenular, las cuales llegan a alcanzar ligeramente regiones de la capa talámica más superficial en este estadio HH34, donde se asienta el núcleo superficial microcelular, tras haber atravesado las regiones ocupadas por los núcleos habenular lateral y subhabenular lateral.

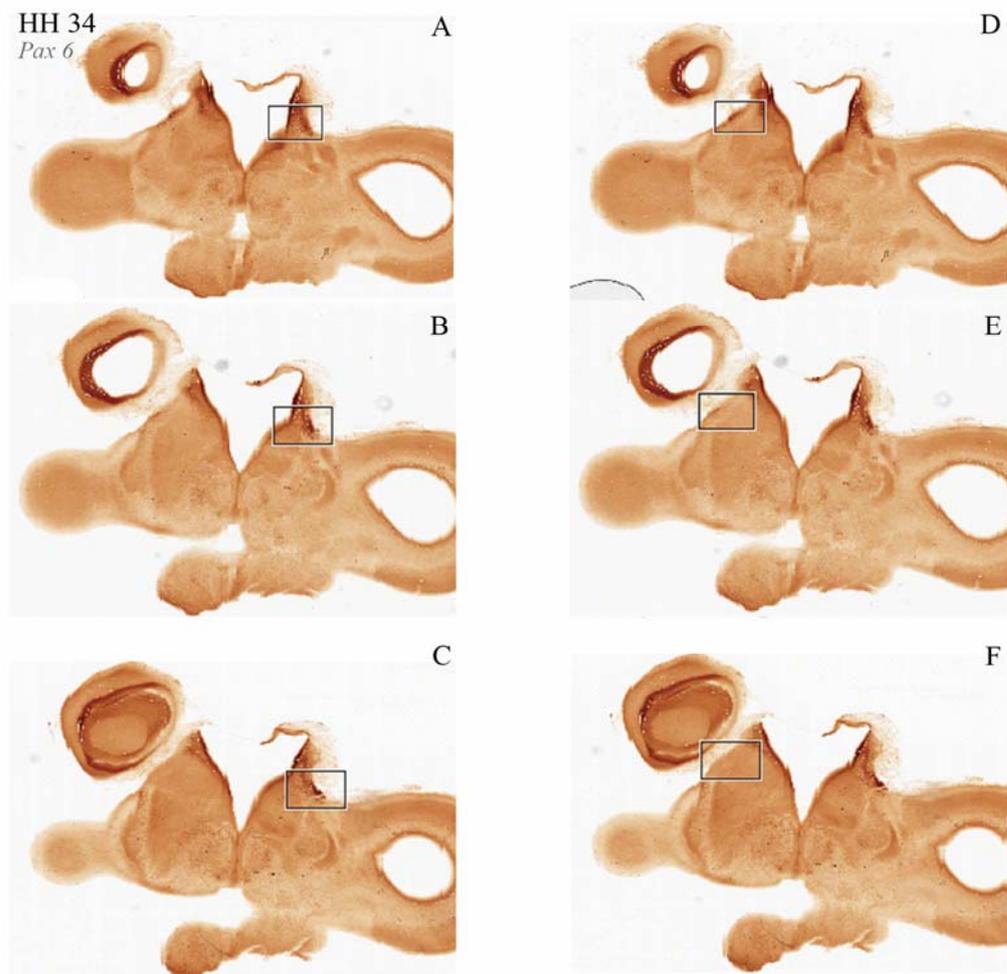


Fig.20. Secciones coronales de pollo. Estadio HH34. IHC PAX6.

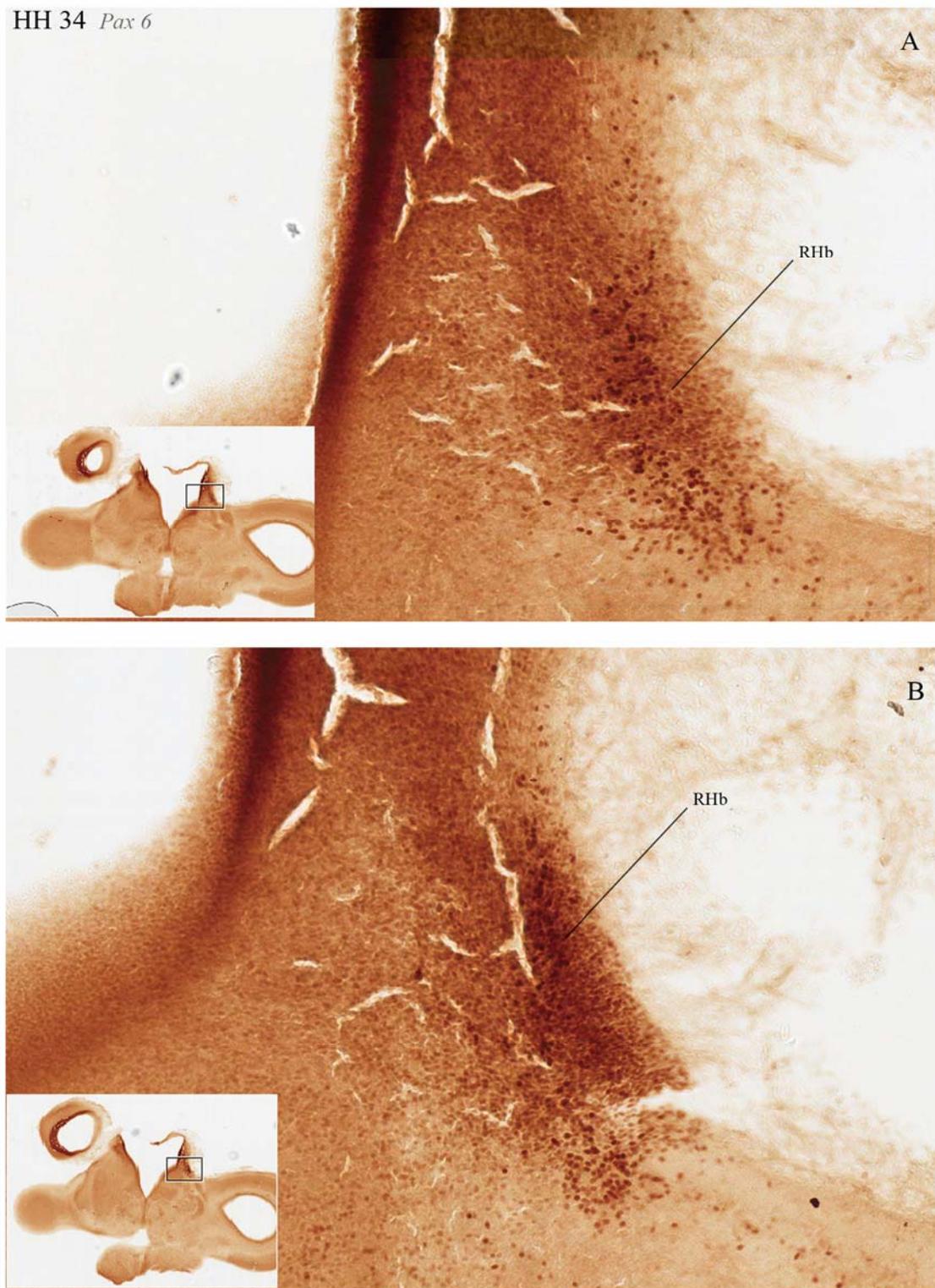


Fig.21. Secciones coronales de pollo. Ampliación de la Fig. 20. Estadio HH34. IHC PAX6.

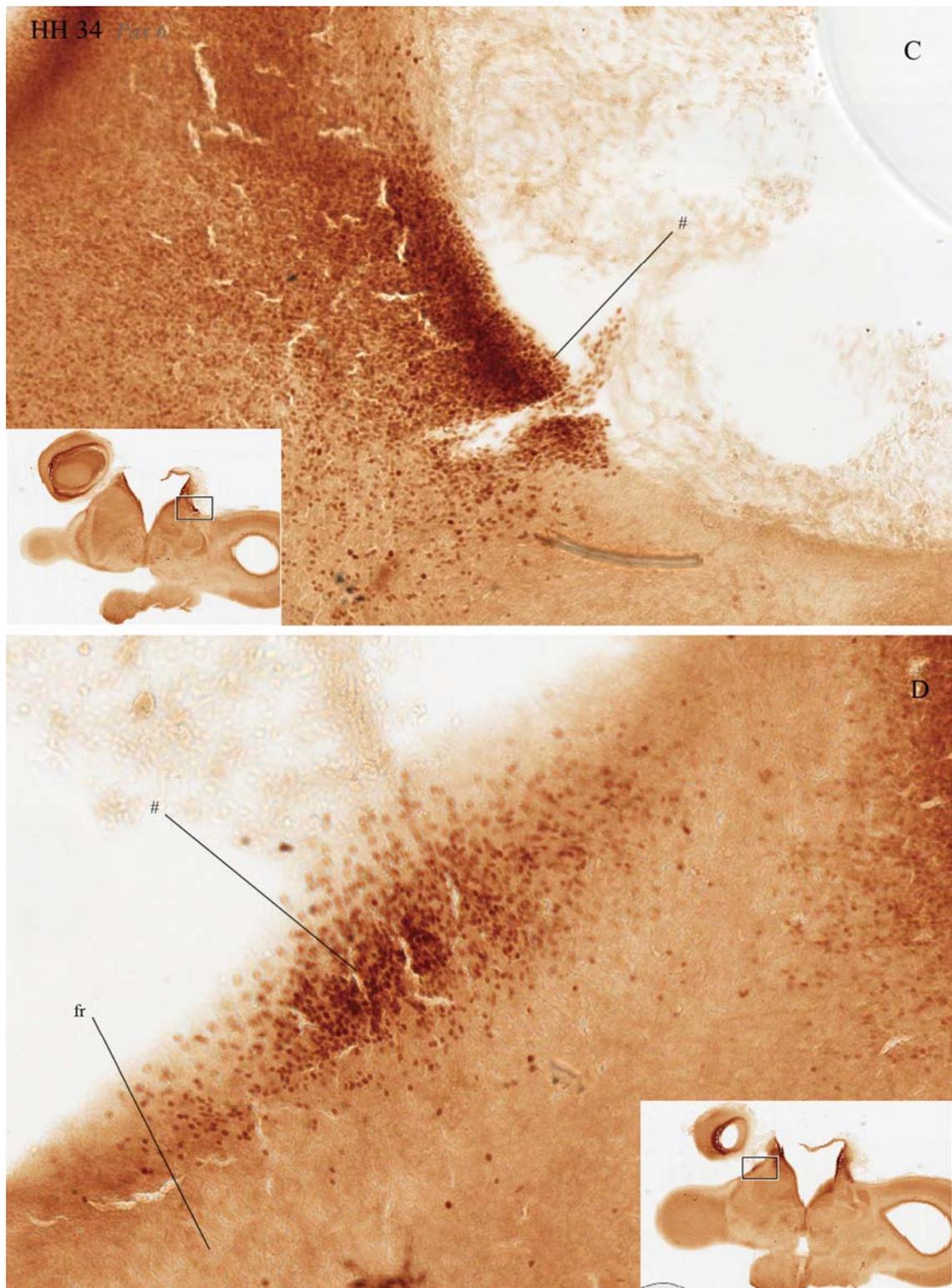


Fig.22. Secciones coronales de pollo. Ampliación de la Fig. 20. Estadio HH34. IHC PAX6.

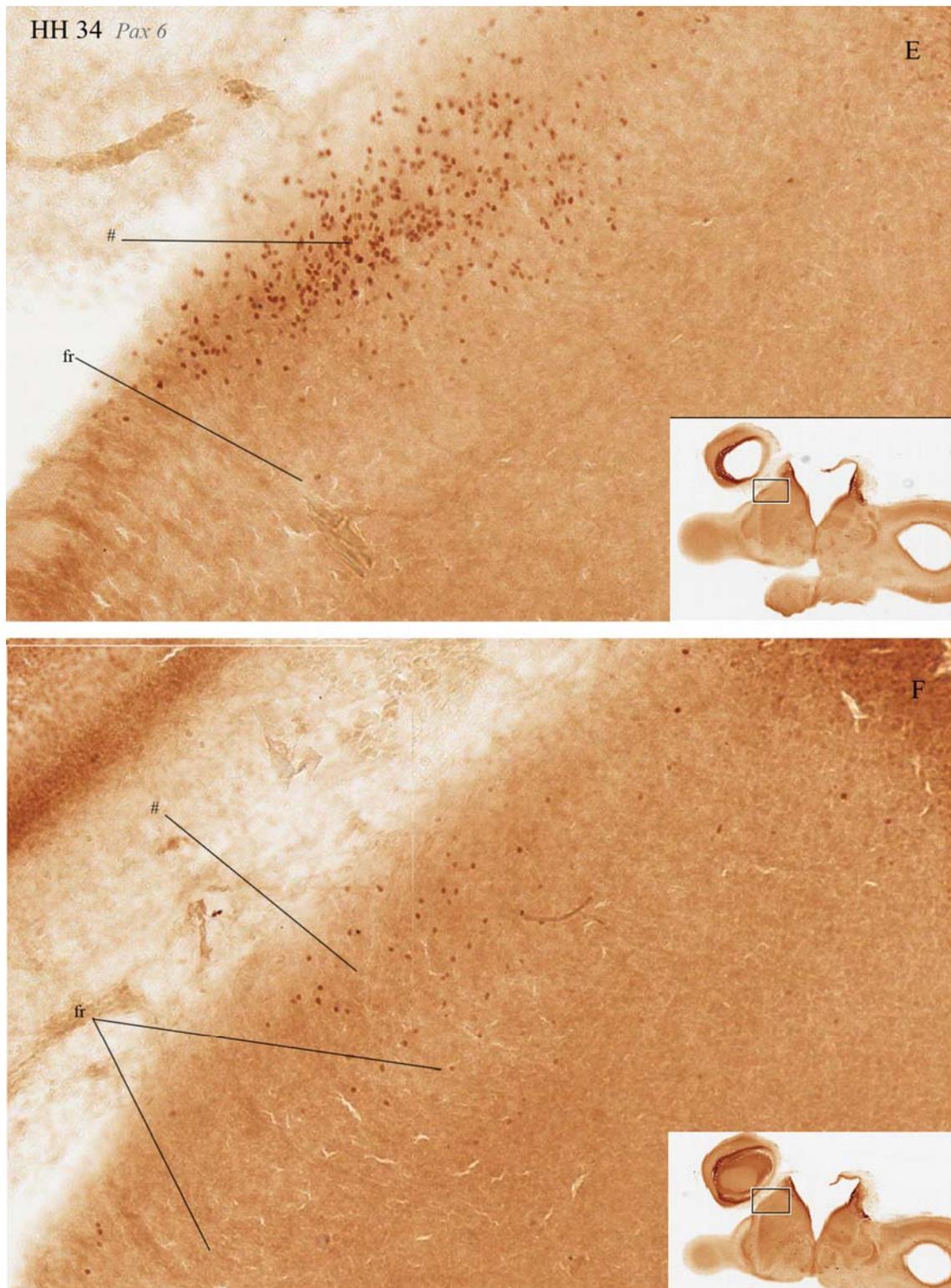


Fig.23. Secciones coronales de pollo. Ampliación de la Fig. 20. Estadio HH34. IHC PAX6.

En HH34, la migración caudal a la que se hizo referencia anteriormente en HH32 se hace más evidente (Fig. 17). Estas células se incorporan a la comisura posterior procedentes de un núcleo del pretecho situado caudalmente a la región retrohabenular.

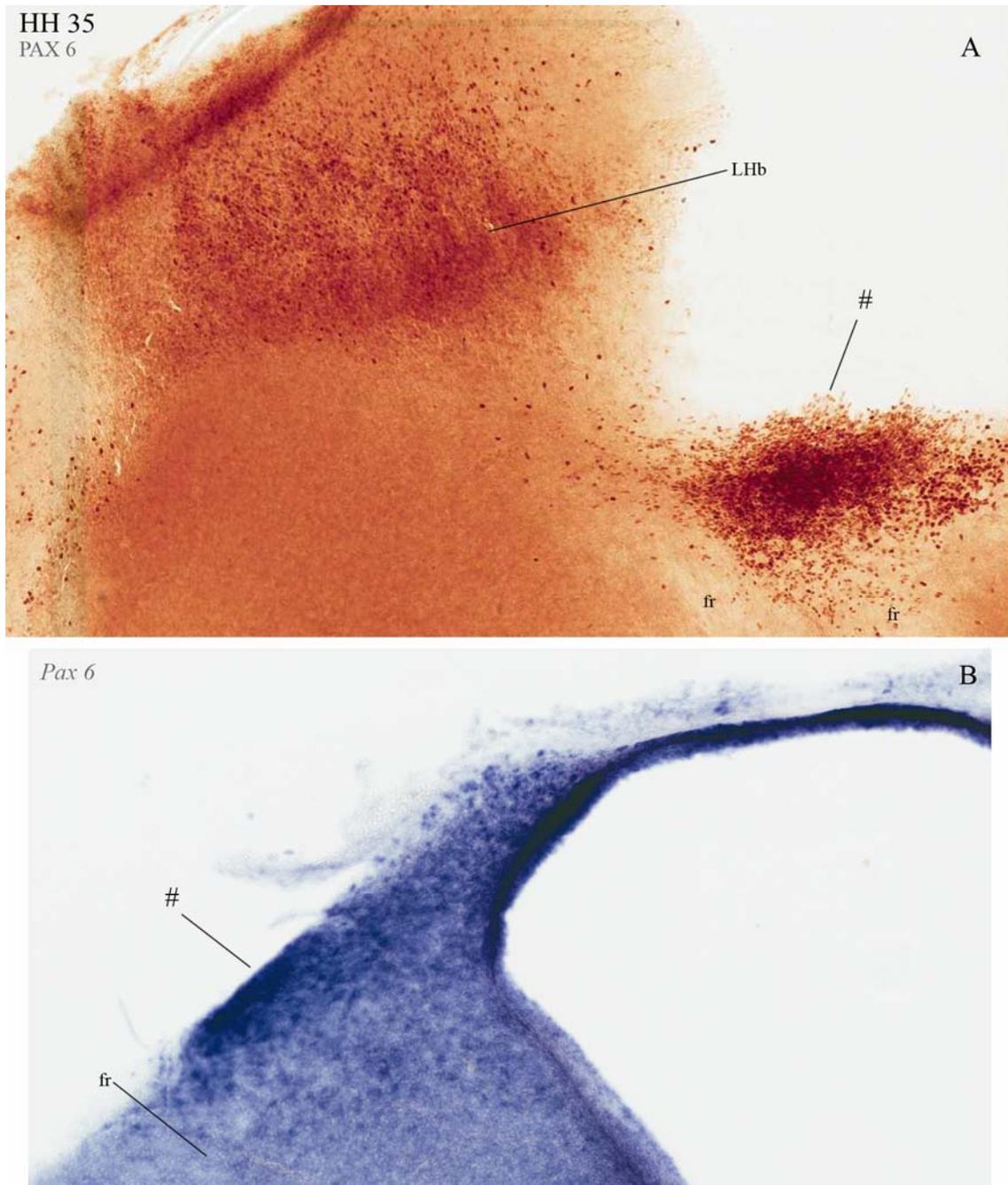


Fig.24. Sección sagital (A) y coronal de pollo (B). Estadio HH35. IHC PAX6 e ISH *Pax6*.

En HH35 (8,5 y 9 días de incubación) se observa (Fig. 24) como el creciente número de neuroblastos fusiformes sigue acumulándose superficialmente a la altura del fascículo retroflejo, sin conseguir avanzar mucho más allá del mismo. En este estadio la zona de producción todavía mantiene una actividad notable.

En HH36 (10 días de incubación) las células más rostrales en migración han avanzado un poco más allá del fascículo retroflejo, continuando la colonización de la superficie pial de la capa dorsal talámica. La región progenitora sigue estando activa en este estadio (Fig. 25 A, 26 A, 26 B, 26 C, 27 A, 27 B).

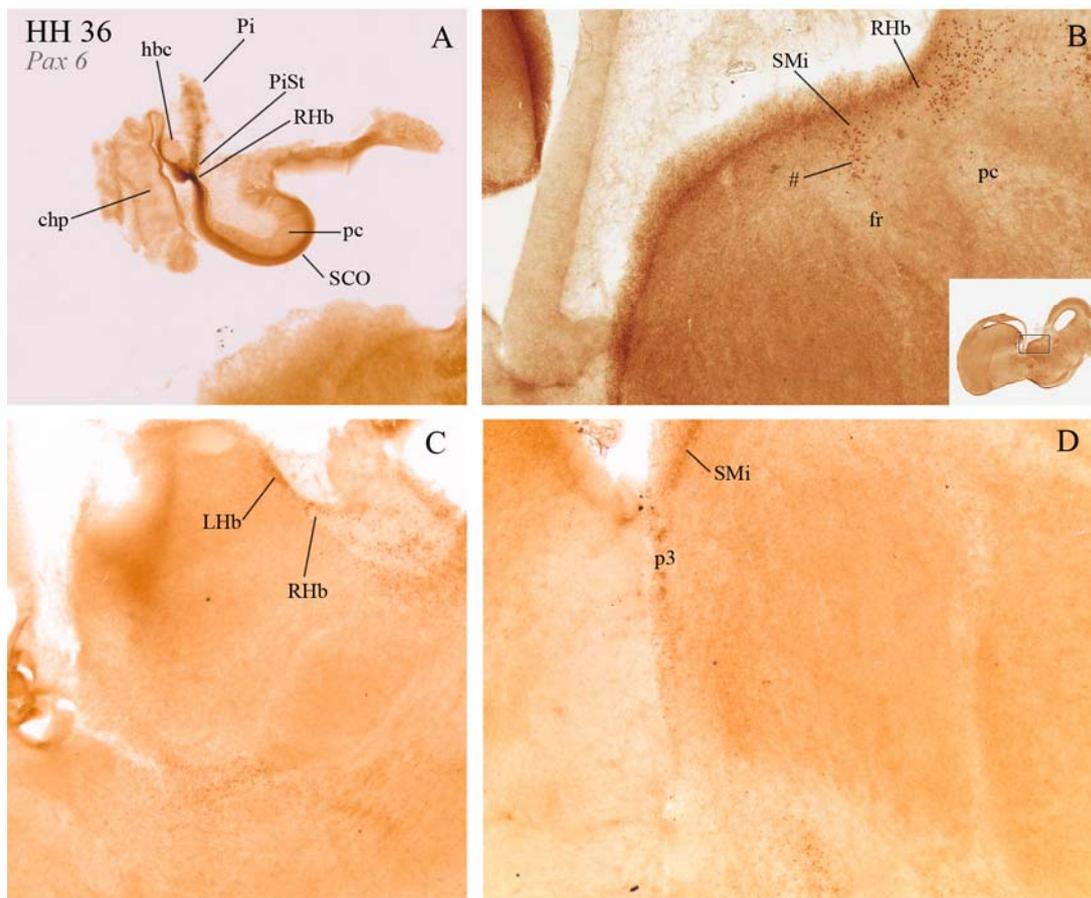


Fig.25. Sección sagital medial (A) y parasagitales (B, C y D) de pollo. Estadio HH36. IHC PAX6.

La ruta que siguen las células que parten de la región retrohabenular bordea dorsalmente el núcleo dorsomedial posterior del tálamo (Fig. 26 D, E, Fig. 28, Fig. 29) adentrándose ligeramente en el complejo habenular inicialmente a través del núcleo subhabenular lateral (Fig. 26 G), seguidamente pasando por el núcleo habenular lateral (Fig. 26 H) y desembocando, en este estadio HH36, en la región caudal del núcleo superficial microcelular, fuera ya del complejo habenular (Fig. 26 I-L, Fig. 27 H-J).

En HH37 (11 días de incubación) se observa un avance subpial mucho más significativo de células *Pax6* positivas hasta su destino final, la región caudal del núcleo superficial microcelular (Fig. 29 F-I, Fig. 30 E-J, Fig. 31 B), a la vez que empieza a reducirse la actividad de la región progenitora retrohabenular (Fig. 31 A).

En HH38 (12 días de incubación) no se observan ya cambios significativos en la migración con respecto al estadio anterior (Fig. 32, Fig. 33) y es el último estadio al que llega el estudio realizado en pollo en el desarrollo de esta tesis doctoral.

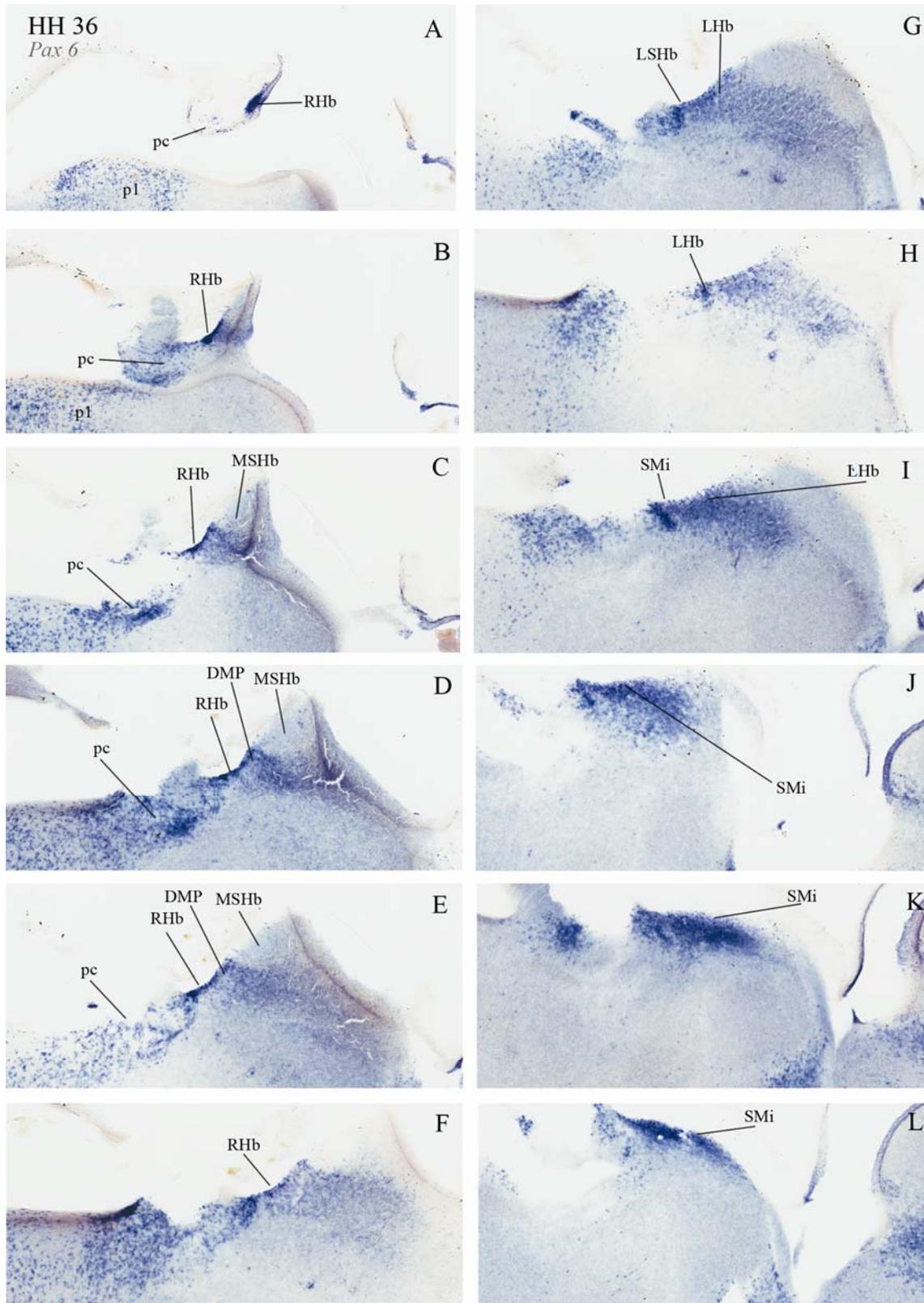


Fig.26. Secciones parasagittales de pollo de medial a lateral (A-F). Estadio HH36. ISH *Pax6*.

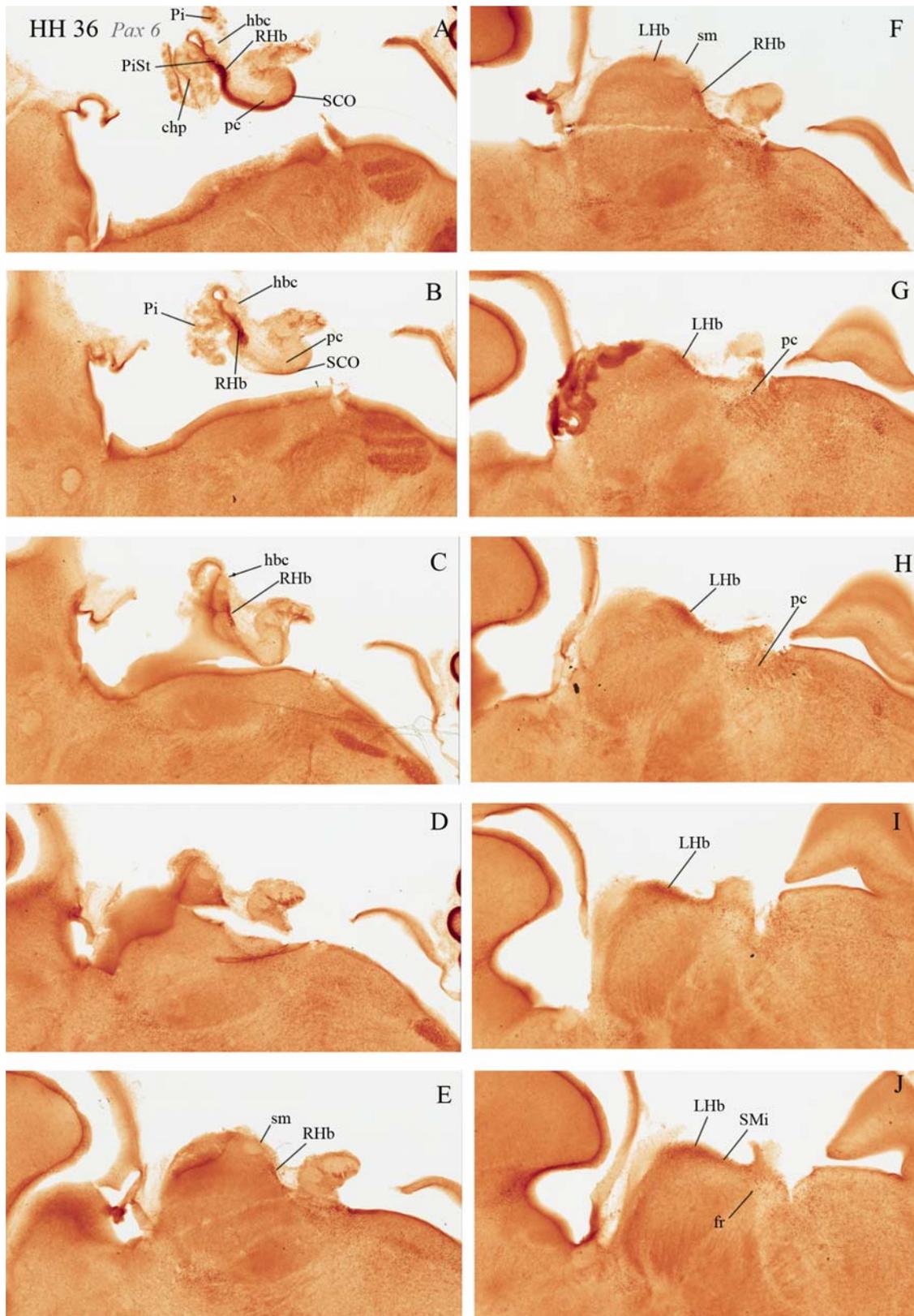


Fig.27. Secciones parasagiales de pollo de medial a lateral (A-F). Estadio HH36. IHC PAX6.

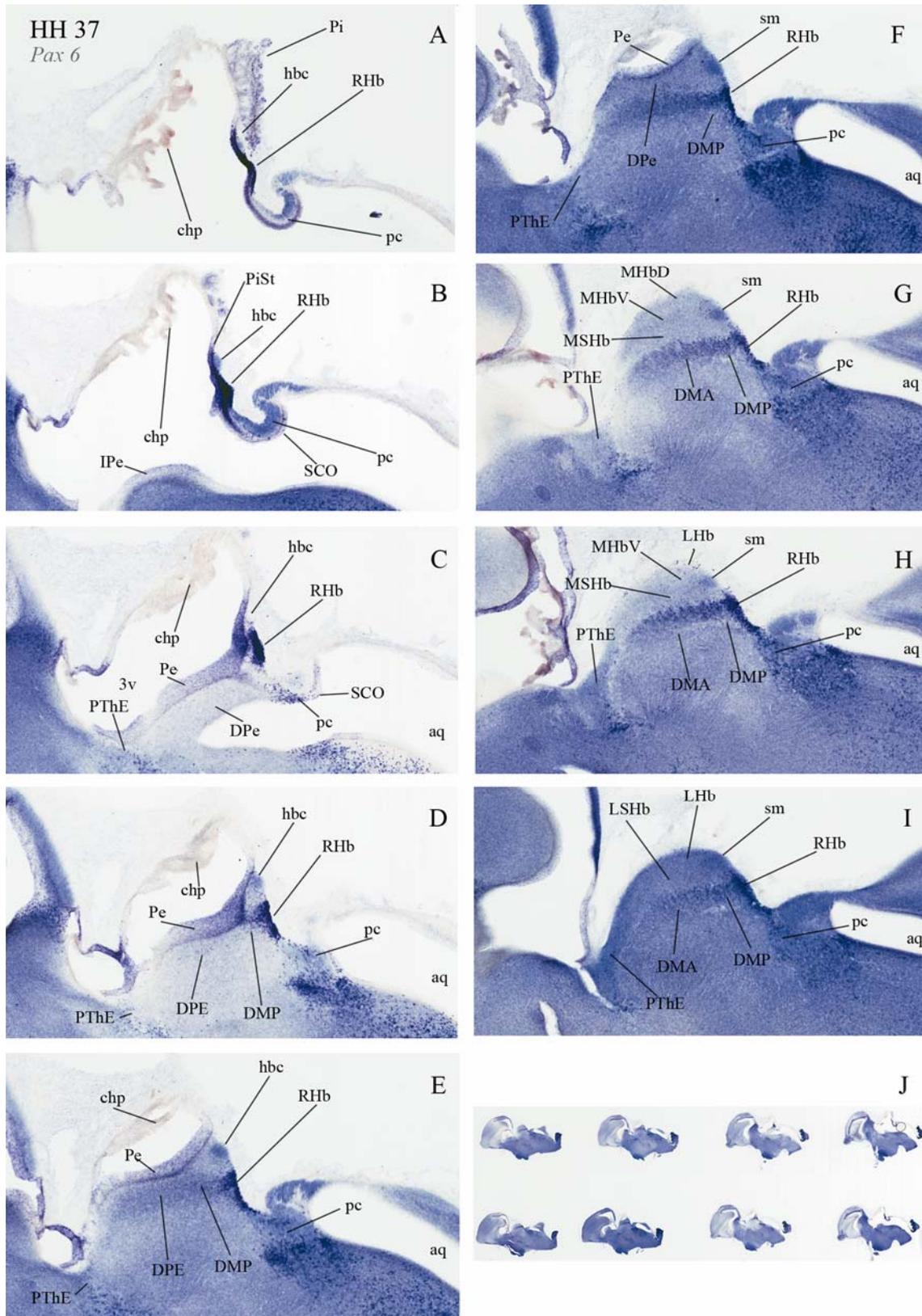


Fig.28. Secciones parasagitales de pollo de medial a lateral. Estadio HH37. ISH *Pax6*

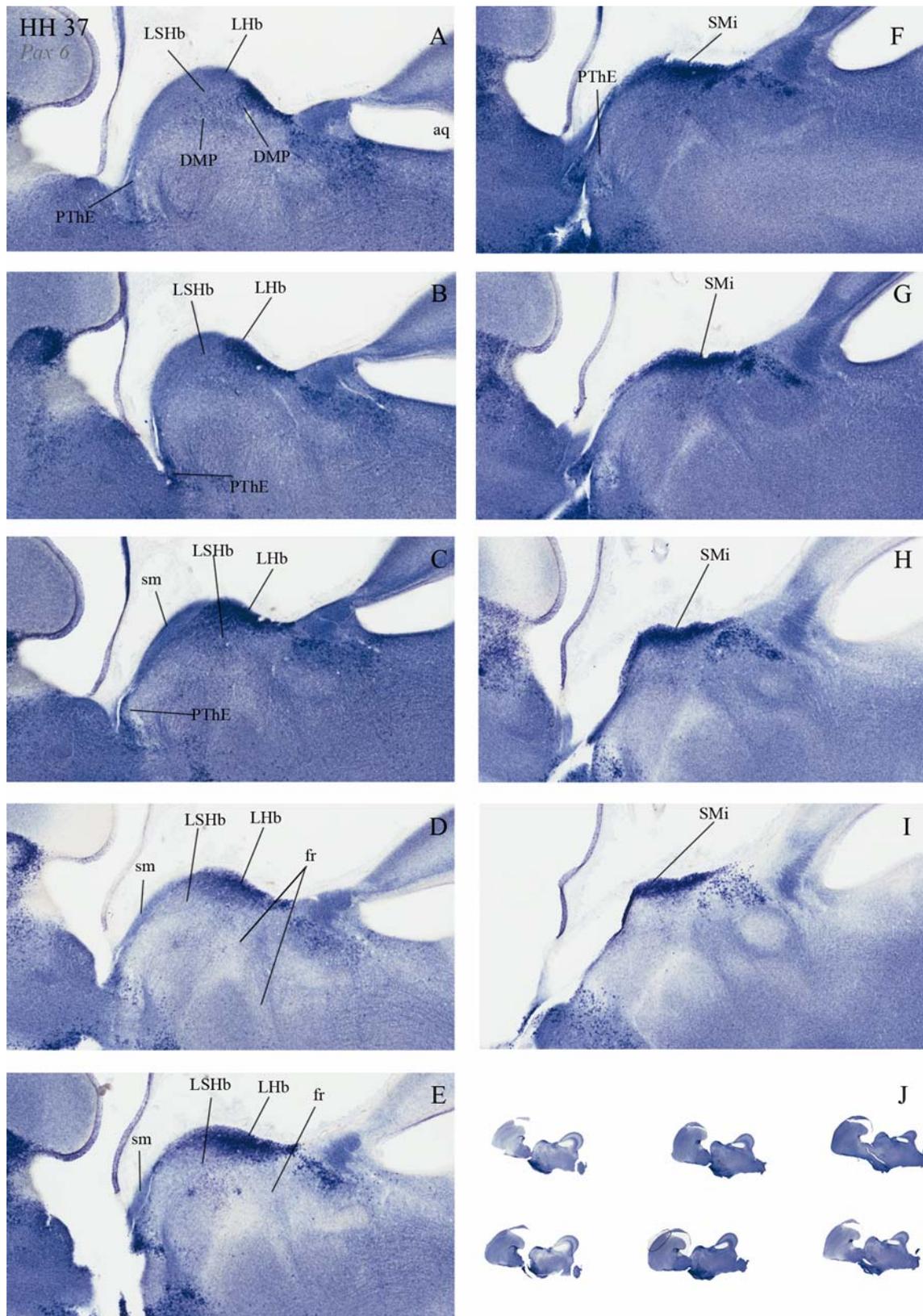


Fig.29. Secciones parasagittales de pollo de medial a lateral. Estadio HH37. ISH *Pax6*
Continuación de la Fig. 28.

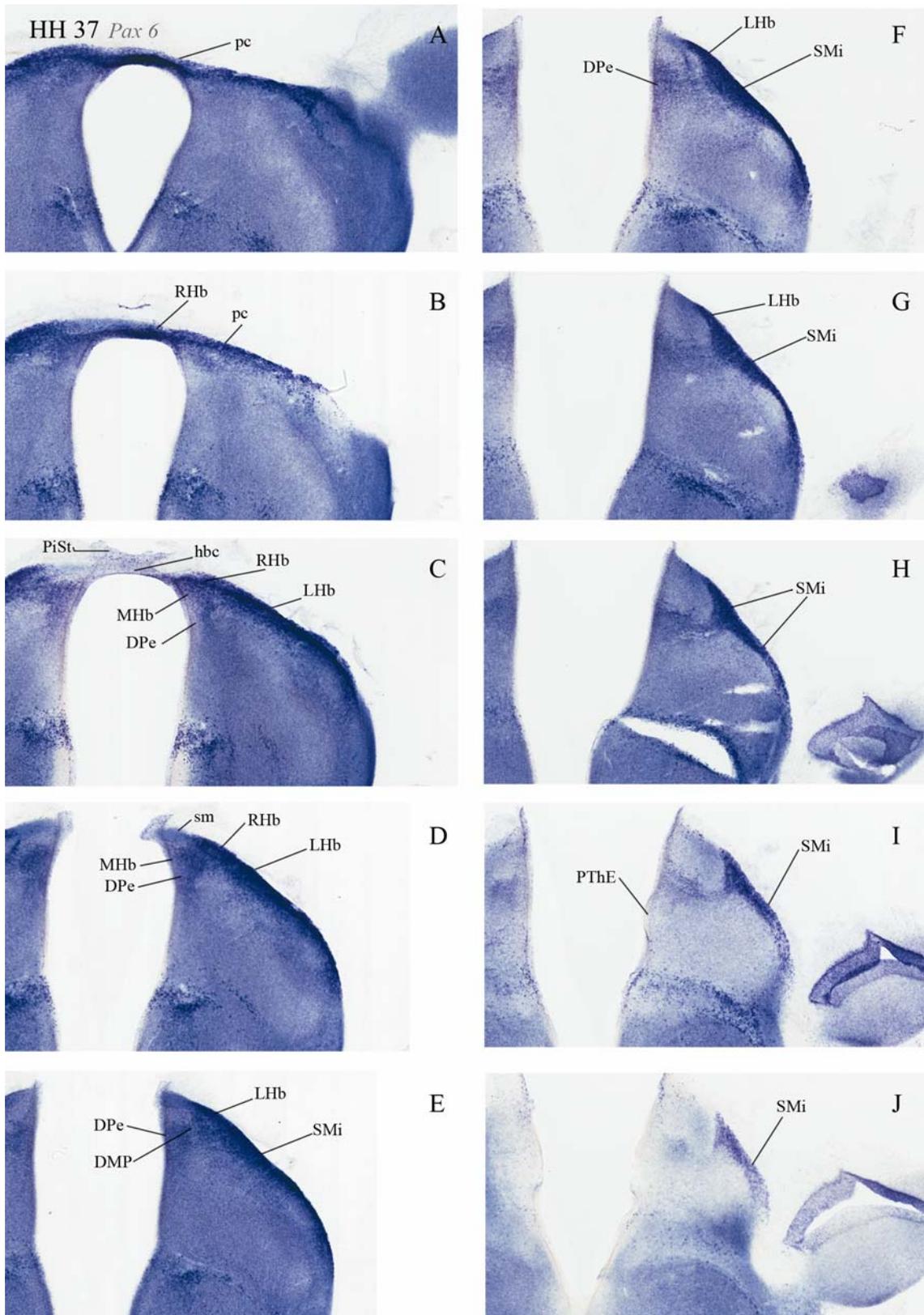


Fig.30. Secciones coronales de pollo en sentido rostral. Estadio HH37. ISH *Pax6*

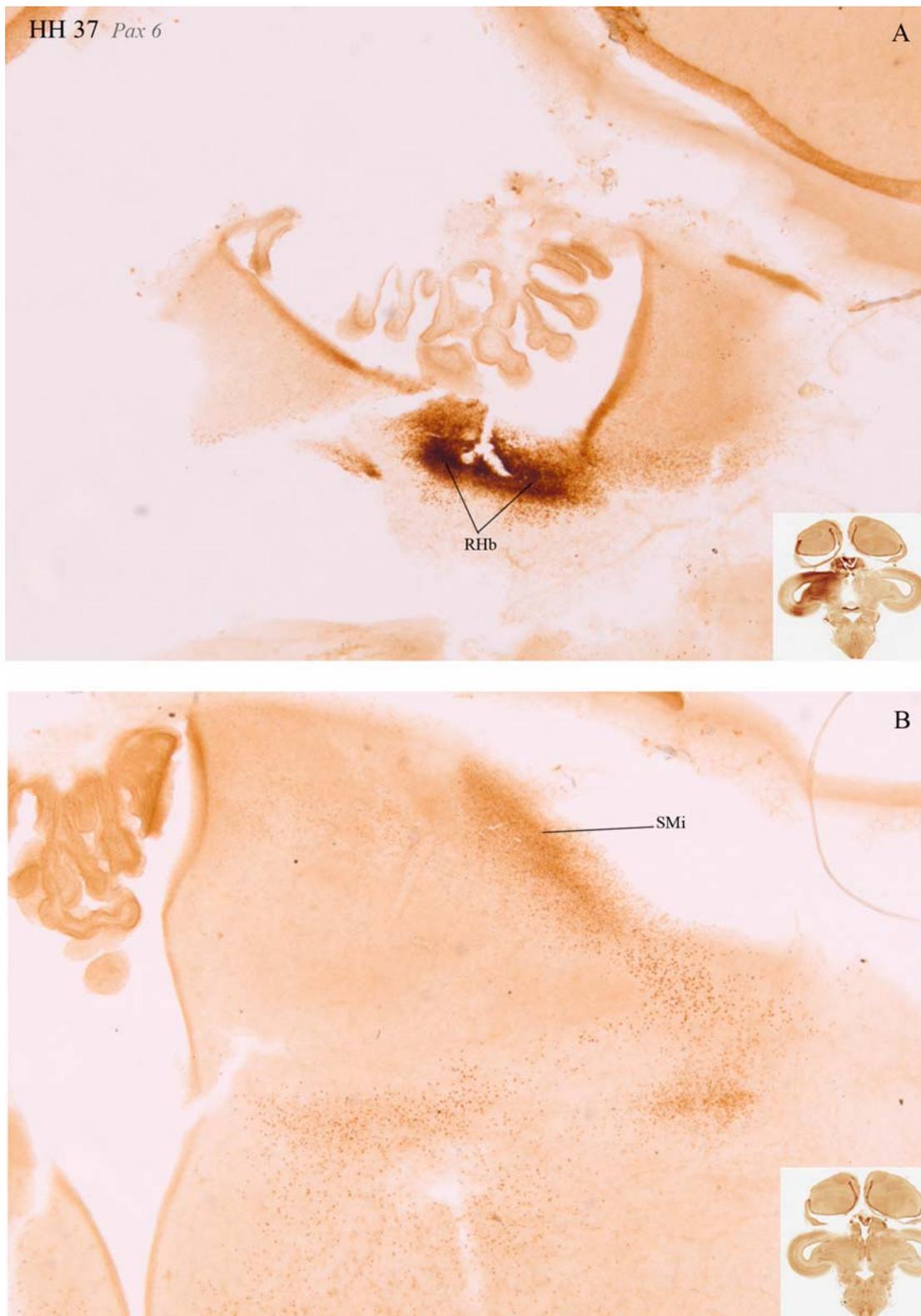


Fig.31. Secciones horizontales de pollo. Estadio HH37. IHC PAX6.

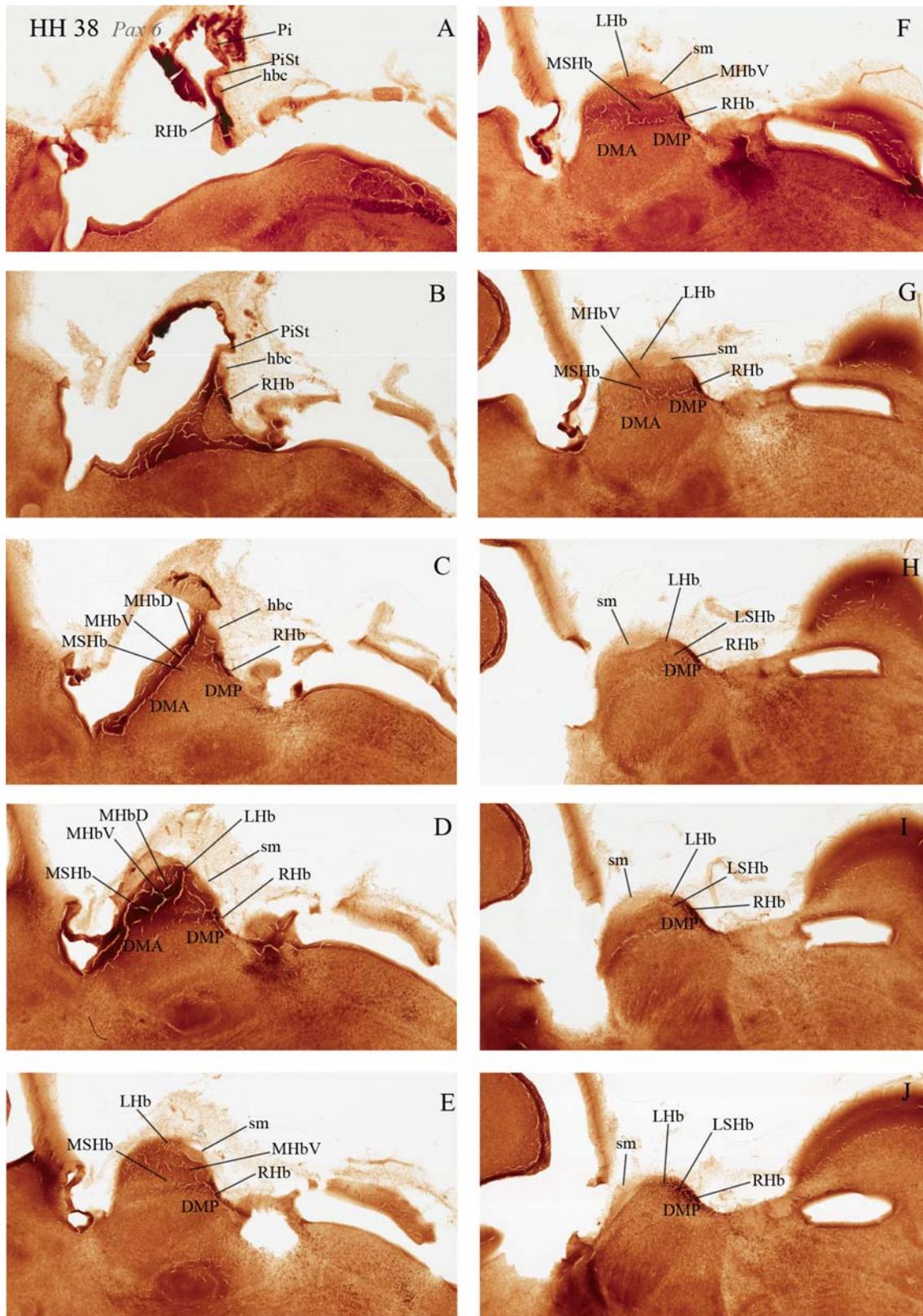


Fig.32. Secciones parasagittales de pollo de medial a lateral. Estadio HH38. IHC PAX6.



Fig.33. Secciones parasagitales de pollo de medial a lateral. Estadio HH38. IHC PAX6.

Cabe destacar que la migración es ipsilateral, de tal forma que los neuroblastos de la región retrohabenuar de cada hemisferio no cruzan la línea media (Fig. 34B) en su migración. Esto se ha comprobado mediante la deposición del trazador BDA directamente sobre la RHb y posterior cultivo organotípico (Fig. 34, 35 y 36).

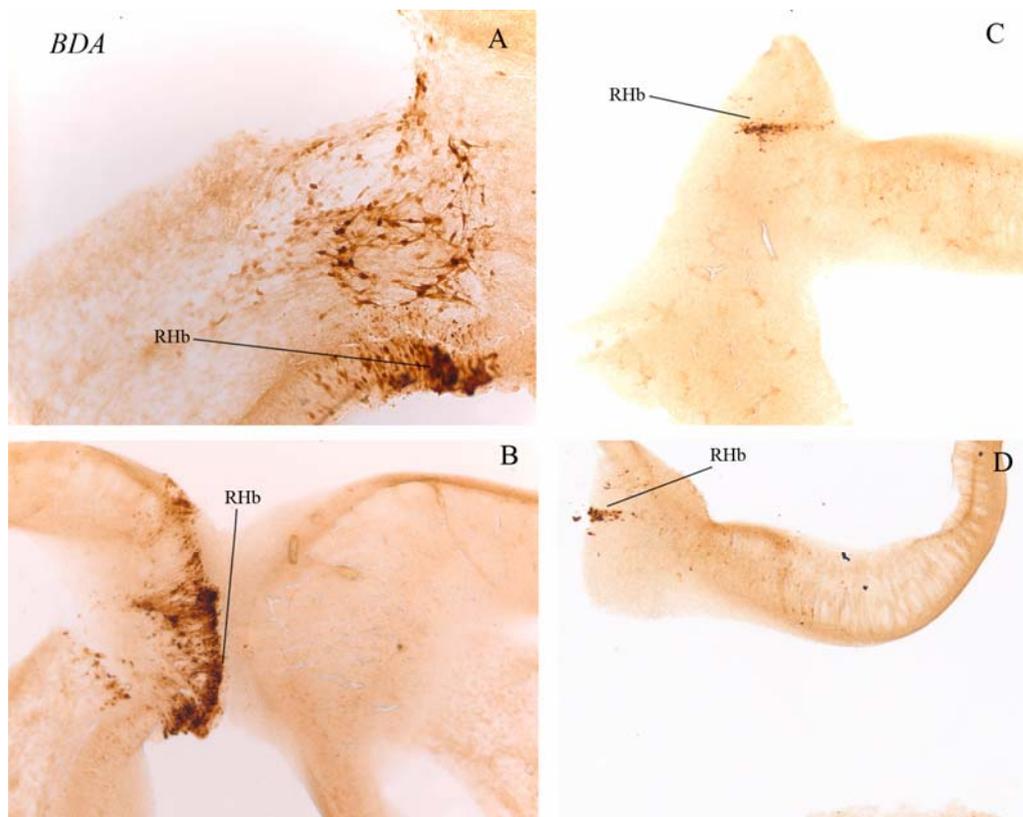


Fig.34. Secciones horizontales (A y B) y sagitales (C y D) de pollo con marcador BDA depositado en la RHb tras 24 horas en cultivo organotípico. Estadio HH34.

Este experimento nos ha permitido asegurar que la migración tangencial se produce en sentido latero-rostral, al poder comprobar en el mismo embrión zonas marcadas diferentes a la zona que recibió el marcaje directamente. Se depositaron cristales de DBA en cerebros de pollo en HH31 y se mantuvieron en incubación in vitro hasta HH34. La zona de deposición de los mismos fue la región retrohabenuar (Fig. 34), origen de la migración bajo estudio. El análisis de las imágenes obtenidas en HH34 corrobora los resultados deducidos de las

preparaciones previas mediante técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación in situ, pudiendo observarse células marcadas con DBA en la región del núcleo habenular lateral (Fig. 36 A) así como en regiones más laterales y rostrales, aunque en número muy reducido (Fig. 36 B) todavía en este estadio HH34.

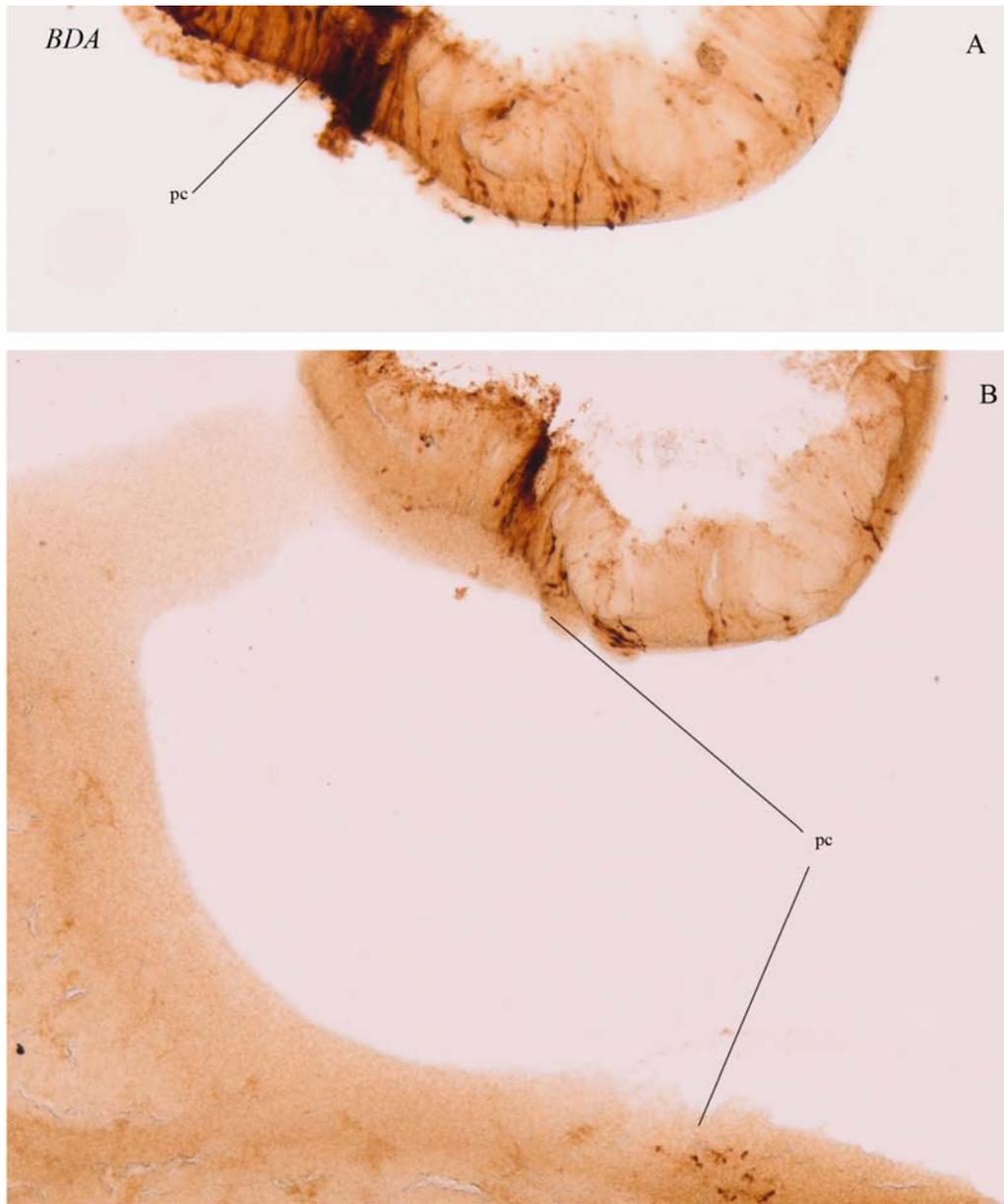


Fig.35. Secciones sagitales de pollo con marcador BDA depositado en la RHb tras 24 horas en cultivo organotípico. Estadio HH34.

Además, también cabe comentar que con esta técnica se confirma la migración previamente observada (*) hacia el pretecho procedente del núcleo inmediatamente caudal al retrohabenular (Fig. 35).

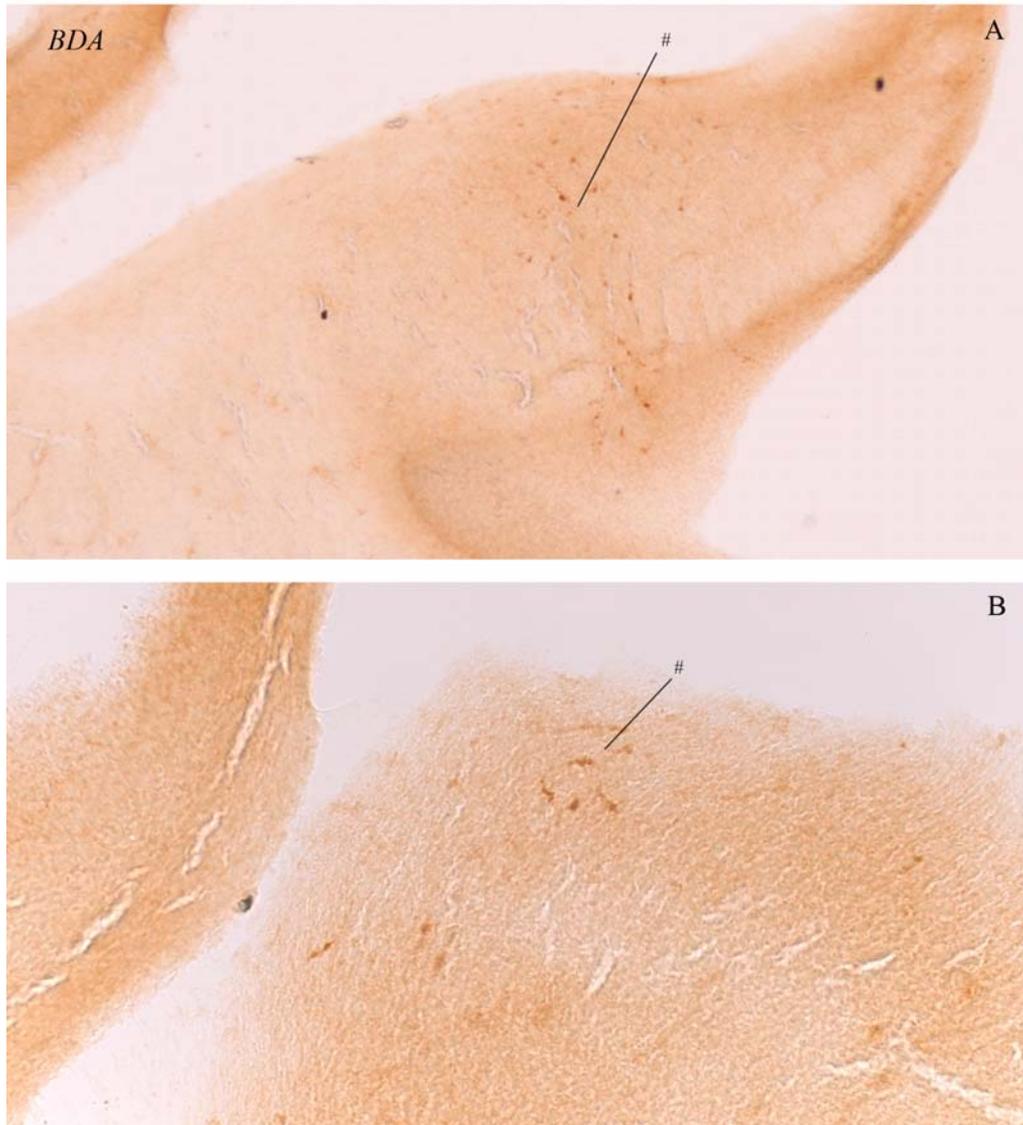


Fig.36. Secciones sagitales de pollo con marcador BDA depositado en la RHb tras 24 horas en cultivo organotípico. Estadio HH34. Las células marcadas # se encuentran en una zona más lateral y rostral que donde se depositó el marcador.

Análisis de la migración en ratón.

Para el análisis de la migración en ratón se han analizado preparaciones histológicas disponibles en el laboratorio del Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología de la Universidad de Murcia. También se han revisado datos de diversas publicaciones así como la base de datos de patrones de expresión genéticos del Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org>).

En el estadio de desarrollo E13.5 se puede ver en la región retrohabenular una cantidad importante de células Pax6 positivas (Fig. 37). En este momento del desarrollo embrionario, todavía no ha comenzado la migración de dichas células, si bien topológicamente la región progenitora en ratón de las citadas células migratorias, coincide con la región progenitora en pollo.

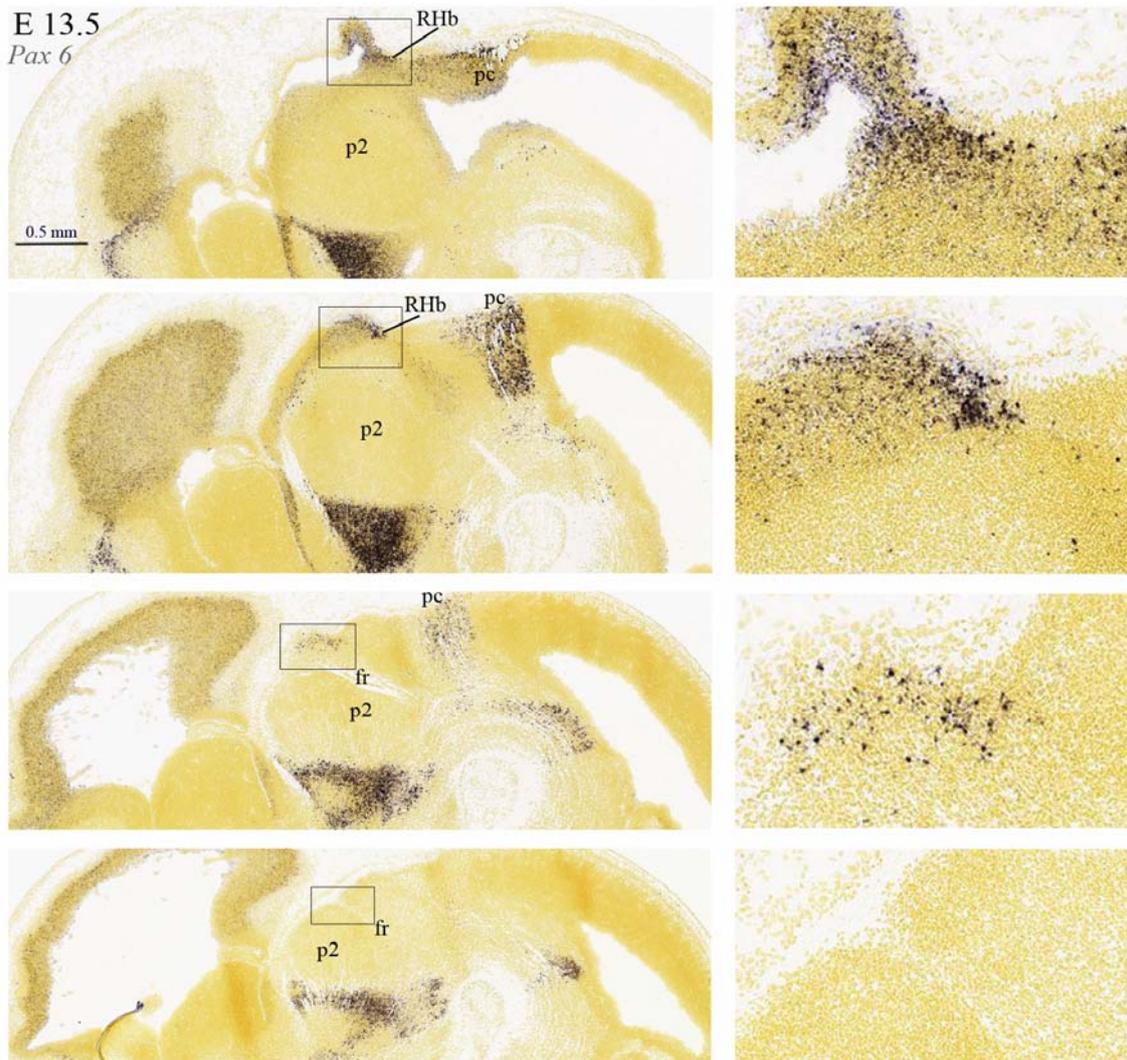


Fig. 37. Secciones sagitales de ratón. Estadio E13.5. ISH *Pax6*.

En el estadio de desarrollo E14.5 se observan células *Pax6* positivas en la región dorsal más rostral de p2 (Fig. 38 D* y E*). Esta región, aunque es el techo de p2 cabe resaltar que no es habenuar, sino talámica. También en el pollo se encuentran células *Pax6* positivas en esa misma región cuando la migración no ha llegado a pasar del fascículo retroflejo, con lo que combinando las observaciones de esta región en ave y mamífero, parece más bien que esas células son autóctonas de la región dorsal más rostral de p2 y que no provienen, por tanto, de la región retrohabenuar..

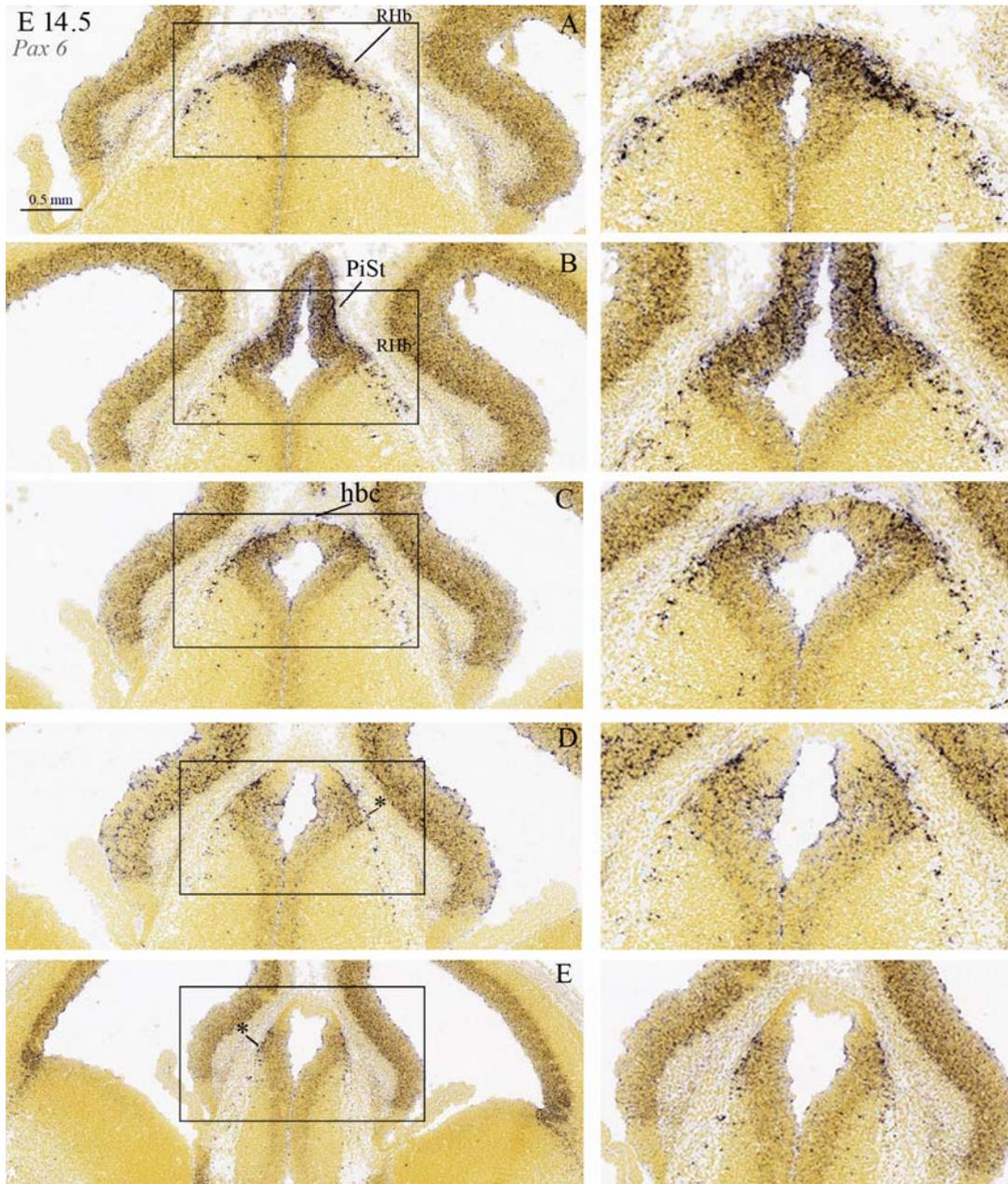


Fig. 38. Secciones coronales de ratón. Estadio E14.5. ISH *Pax6*.

En cualquier caso, en E14.5 las células *Pax6* positivas siguen aumentando en número en la región retrohabenule (Fig. 38 A-C) y tímidamente comienzan a avanzar rostralmente aunque todavía no se constata un avance significativo en este estadio.

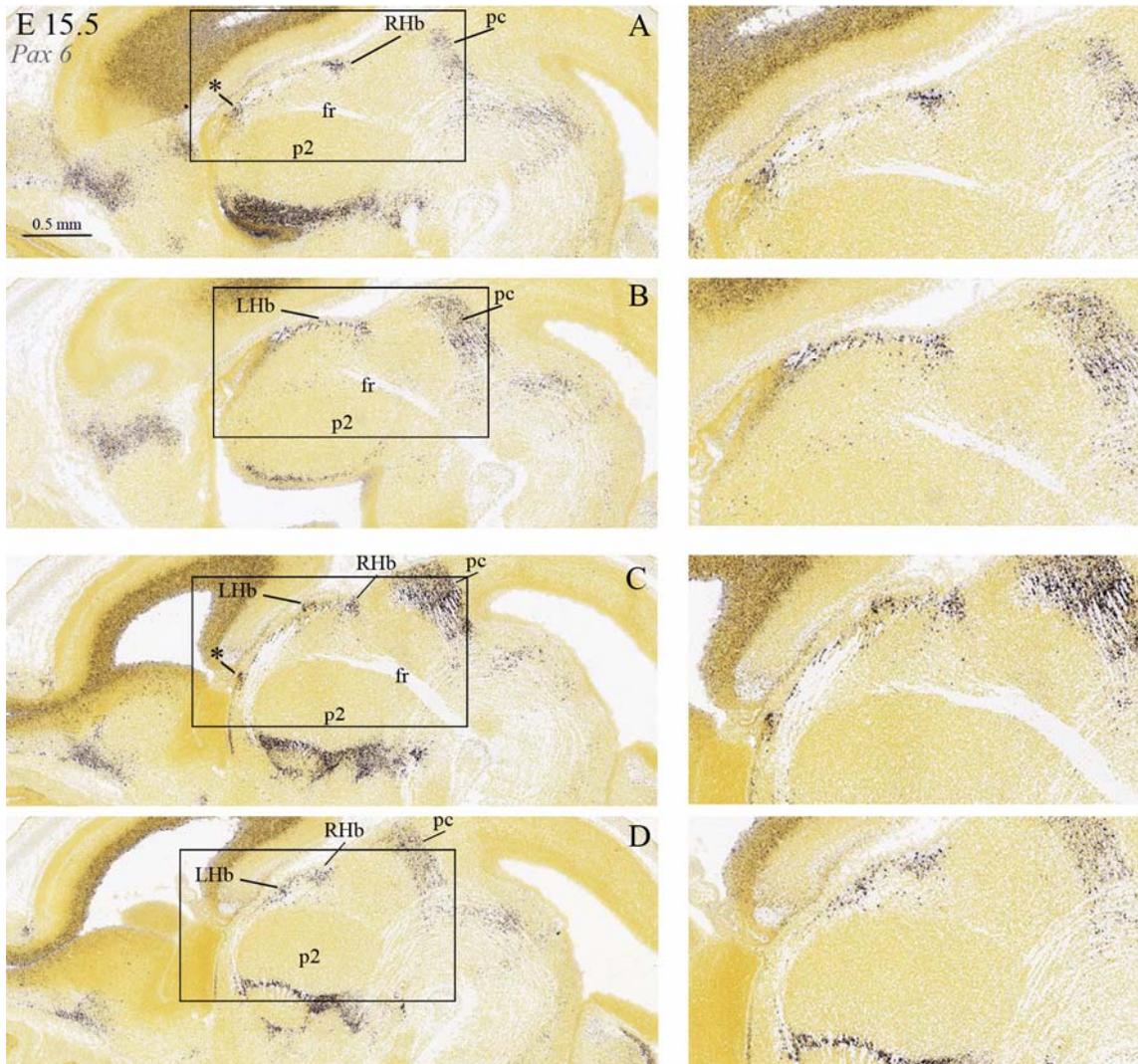


Fig. 39. Secciones sagitales de ratón. Estadio E15.5. ISH *Pax6*.

En el estadio E15.5 las células *Pax6* positivas procedentes de la región retrohabenular comienzan a poblar la región habenular (Fig. 39) entrando caudalmente por el núcleo habenular lateral. Cabe comentar que no se observan células *Pax6* positivas migrando en dirección caudal hacia el pretecho, tal y como ocurre en pollo (Fig. 13 F* y Fig. 29). Al igual que en el estadio anterior se aprecian las células *Pax6* positivas autóctonas de la región dorsal más rostral de p2 (Fig. 39 A* y C*).

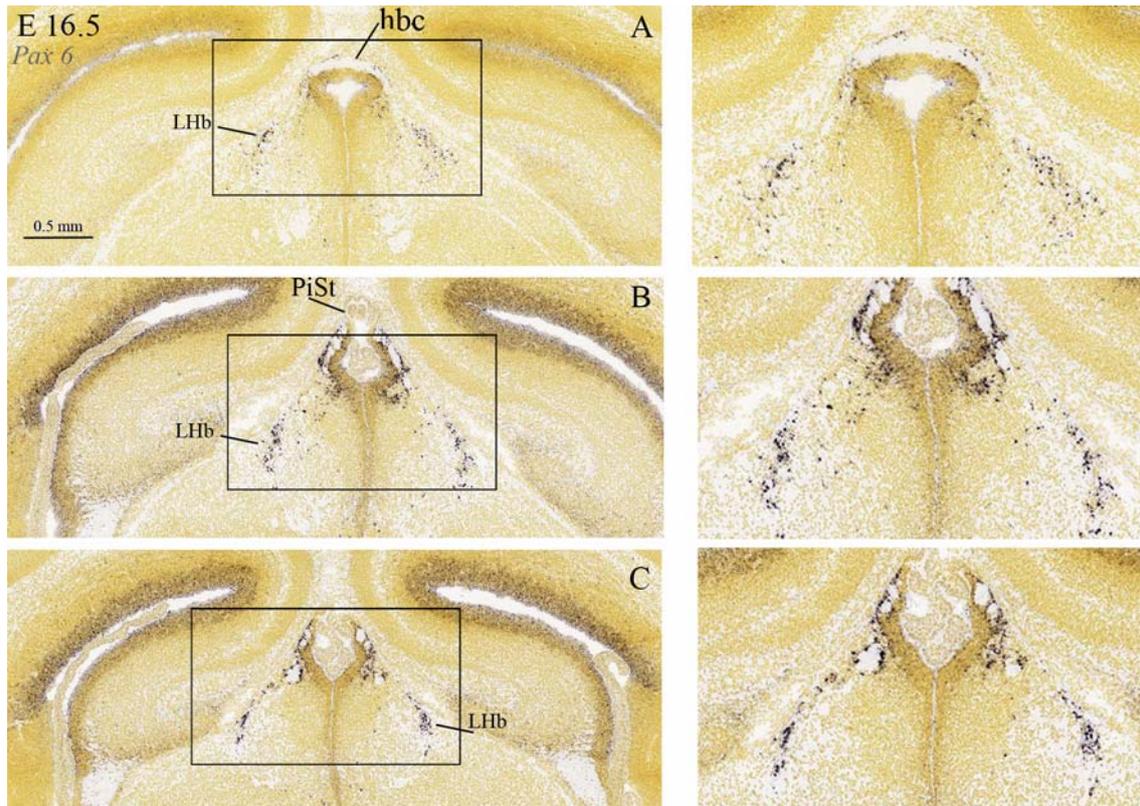


Fig.40. Secciones coronales de ratón. Estadio E16.5. ISH *Pax6*.

En el estadio E16.5 se ve cómo las células *Pax6* positivas en migración rostral tangencial han llegado al núcleo habenular lateral (Fig. 40). Estas células migratorias, aunque son superficiales, están un poco más profundas que sus homólogos en el pollo. En este estadio de desarrollo estas células migratorias han alcanzado su destino final, en el estadio E17.5 puede verse (Fig. 41) que no se ha producido ningún avance en la migración, habiéndose comprobado en los estadios posteriores hasta postnatales.

En resumen, podemos afirmar que la migración bajo estudio comienza en ratón en la región retrohabenular en el estadio E.13.5 y finaliza en E16.5 en el núcleo habenular lateral. En las aves esa misma población, por su origen, avanza más allá del fascículo retroflejo, hasta la zona posterior del núcleo superficial microcelular. Esto podría plantear la posibilidad de establecer una homología entre estos dos núcleos o subpoblaciones de los mismos, habenular lateral y superficial microcelular. En cualquier caso, en la revisión bibliográfica realizada no se vislumbran semejanzas hodológicas entre ambos núcleos.

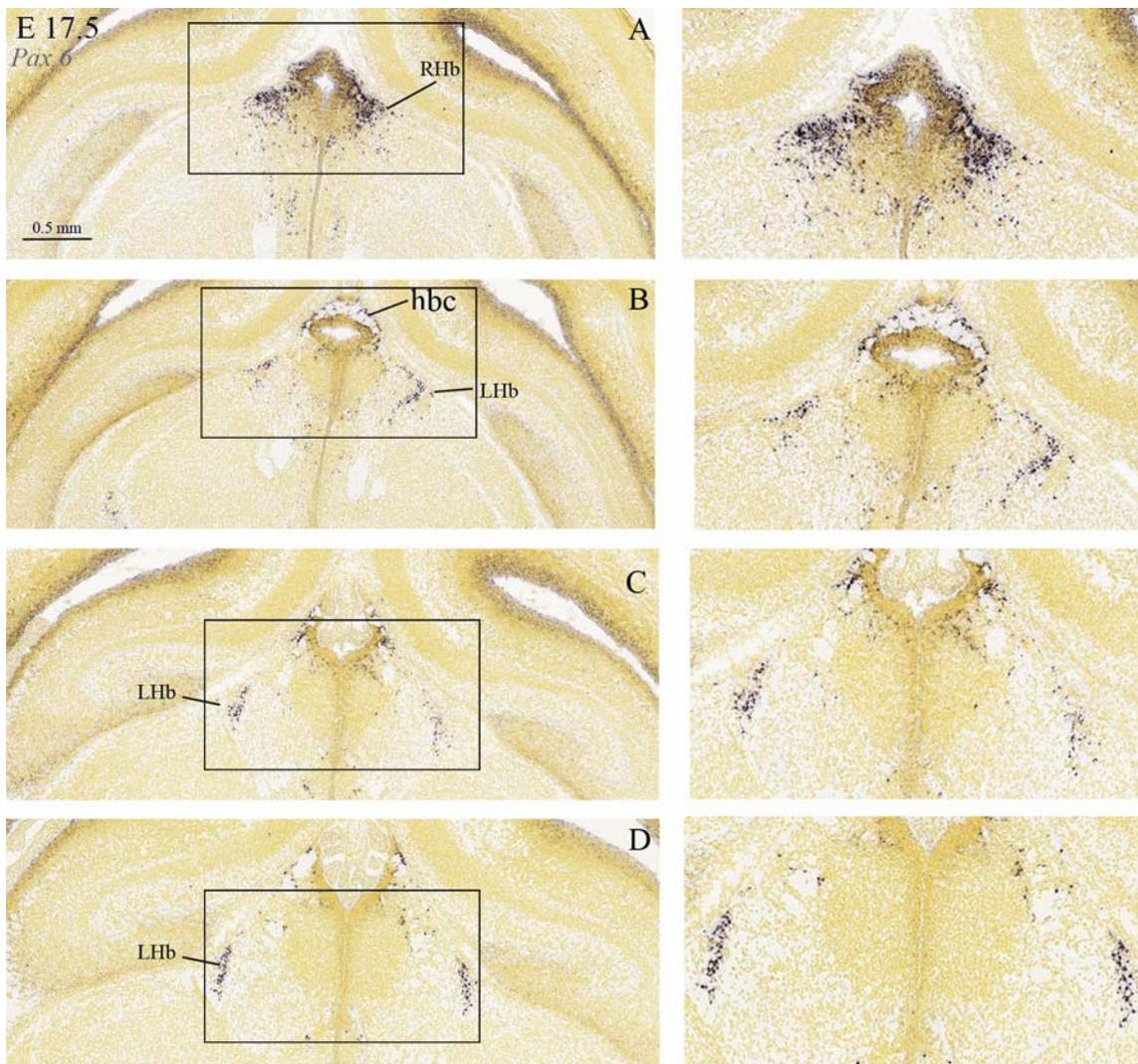


Fig. 41. Secciones coronales de ratón. Estadio E17.5. ISH *Pax6*.

Se observa en el estadio P1 un rastro, también de células Pax6 positivas aunque más superficiales, que tienen un origen en la región retrohabenular y que sugieren una migración que avanza sobrepasando rostralmente a las células migratorias descritas en los párrafos anteriores, aunque manteniéndose siempre en la superficie dorsal del epítalamo y del tálamo (Fig. 42 *). En el estadio P2 este rastro tiene menos intensidad y en P4 prácticamente ha desaparecido la expresión de Pax6 por parte de estas células.

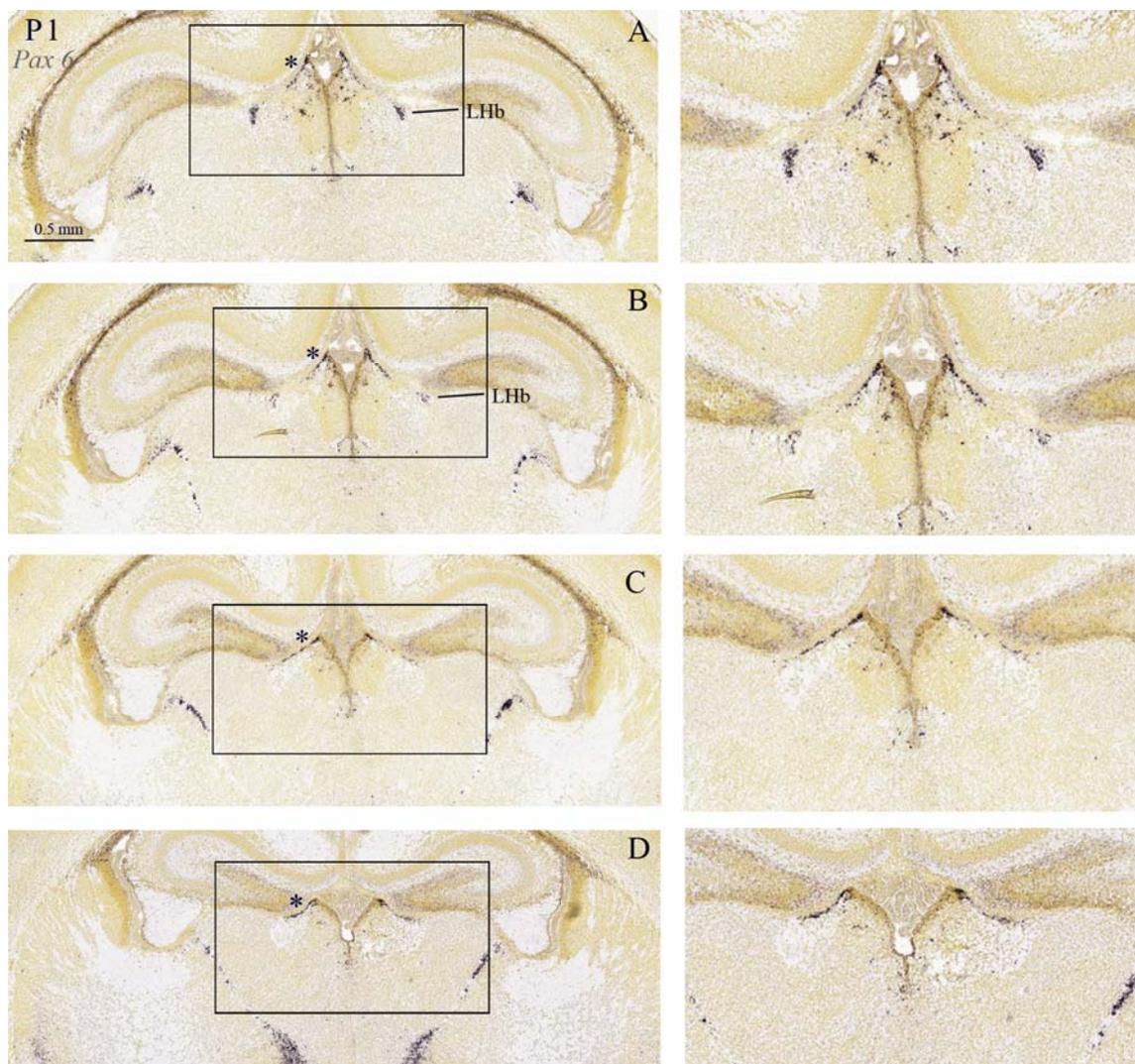


Fig. 42. Secciones coronales de ratón. Estadio P1. ISH *Pax6*.

Discusión

Relevancia de las técnicas utilizadas.

A la hora de interpretar los datos obtenidos en esta investigación conviene establecer el modelo de organización del diencéfalo que hemos adoptado, ya que, tal y como se constató en la introducción, a lo largo de la literatura diferentes autores han propuesto diversos modelos de subdivisiones del sistema nervioso central. Inicialmente el modelo neuromérico de Rendahl (1924) y más recientemente el modelo prosomérico de Puelles y Rubenstein (2003) se ajusta más a las observaciones llevadas a cabo en la realización de esta tesis doctoral.

El estudio de las migraciones neuronales en el epítalamo y en la superficie del tálamo dorsal ha sido objeto de poco estudio a lo largo de los últimos años. Los estudios más significativos hasta la fecha datan ya de bastante tiempo y se remontan a los trabajos de Altman y Bayer (1978b) y Guillén (1991), que utilizaron técnicas de autorradiografía con objeto de desentrañar la neurogénesis de los núcleos neuronales en la región epitalámica y talámica y por ende trataron el tema de migraciones neuronales desde el neuroepitelio ventricular hasta su destino final como parte de algún núcleo neuronal conocido.

Desde entonces, diversas técnicas han permitido aportar datos más significativos al análisis de las migraciones neuronales, en concreto en este trabajo hemos utilizado técnicas de análisis inmunohistoquímico, hibridación *in situ* para detección de expresión génica y técnicas de seguimiento de células marcadas con dextranaminas biotiniladas. Los datos obtenidos a la luz de estas nuevas técnicas serán contrastados en este capítulo con lo que se conocía a través de la literatura anteriormente comentada.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de marcaje de células con BDA nos dan también información sobre la morfología fusiforme de las células, claramente en migración tangencial paralela al ventrículo. Cabe mencionar que el uso de esta técnica se ha facilitado

por el hecho de que la zona a marcar se encuentra en la superficie dorsal, por lo que no ha sido necesaria la utilización de sistemas de inyección a presión o iontoforéticos típicamente utilizados en la aplicación de esta técnica (Reiner et al., 2000), habiéndose realizado una simple deposición del marcador sobre la zona de interés y posterior visualización mediante el procedimiento ABC y DAB. Si bien encontramos en la literatura (Fritsch, 1993; Brand y Apkarian, 1992) numerosos ejemplos de la utilización de esta técnica haciendo mención a las características anterógradas o retrógradas de este marcador, dependiendo del peso molecular utilizado, nuestros resultados son indiferentes a la dirección del transporte del mismo, ya que los neuroblastos en migración todavía no han desarrollado un axón que pueda afectar al sentido del movimiento de las dextranaminas en el citoplasma. Pesos moleculares de 10 k tienen gran sensibilidad y producen marcajes en detalle de los axones y los terminales, mientras que pesos moleculares de 3 k, como el utilizado en nuestro experimento, proporcionan marcajes detallados retrógrados de los cuerpos celulares (Reiner et al., 2000).

El tiempo que se ha mantenido el cultivo organotípico y que por tanto se ha permitido que tuviera lugar la migración de células marcadas con BDA ha sido de 24 horas, por lo que los datos que nos ha proporcionado este método no nos han permitido realizar un trazado completo de la migración en sus dimensiones temporal (tres días) y espacial. A pesar de esto, sí se han obtenido datos que proporcionan información sobre la dirección de la migración, tangencial paralela a la pared ventricular, superficial y en sentido lateral/rostral. También se han obtenido datos precisos relativos al origen de la migración, la región retrohabenular. Finalmente, se ha corroborado que la migración es ipsilateral, no habiéndose detectado células marcadas en los dos hemisferios cerebrales simultáneamente, para lo cual, esta técnica presenta claras ventajas con respecto a los métodos autorradiográficos, inmunohistoquímicos o de hibridación in situ, ya que en el momento de

inicio de la migración, las zonas proliferativas (regiones retrohabenulares de los dos hemisferios) están muy cercanas a la línea media y por tanto muy cercanas entre sí.

Otro resultado que hemos obtenido de este experimento y que corrobora los datos proporcionados por la técnica de hibridación in situ (aunque no se observa de forma tan clara con la técnica inmunohistoquímica) es la existencia en el pollo de una migración de células *Pax6+* en sentido caudal con origen muy cercano a la región retrohabenular, concretamente adyacente a la misma en una posición latero caudal. Al estar ambos orígenes migratorios tan cercanos el uno del otro es prácticamente imposible que las dextraminas depositadas sobre la superficie retrohabenular no se distribuyan sobre ambos y queden por tanto los dos caminos trazados. En cualquier caso, es la técnica de hibridación in situ la que nos permite discernir con total claridad el origen ligeramente diferente de ambas migraciones. Al ser este otro origen ligeramente caudal al núcleo retrohabenular, nos inclinamos por etiquetar dicho origen dentro del pretecho. No se ha encontrado descripción alguna en la literatura sobre esta segunda migración en el pretecho, que progresa caudo ventralmente por la comisura posterior y cuyo destino parece estar en las inmediaciones del núcleo parvocelular de la comisura posterior (pretecho comisural). Tampoco hemos encontrado indicios de esta migración en el ratón. Con el fin de puntualizar estas predicciones, se hace necesaria una investigación más específica que examine los detalles implicados.

Tanto con la técnica de inmunohistoquímica como con la de hibridación in situ hemos obtenido resultados muy similares, que nos han permitido realizar el seguimiento de las células migratorias desde su lugar de nacimiento hasta su destino final. Sin embargo, son los resultados obtenidos mediante la técnica de hibridación in situ de mRNA de *Pax6*, los que dan mayor validez a esta tesis por encima de los datos obtenidos mediante la técnica de detección de la proteína Pax6.

Esta afirmación está fundamentada en las tres características que diferencian la genoarquitectura de la quimioarquitectura general neuronal (Puelles y Ferran, 2012): *“En primer lugar la singularidad de la metodología de hibridación, que específicamente detecta una secuencia particular de nucleótidos; en segundo lugar, el papel causal de los genes expresados y las proteínas que codifican, en la tipología y el estado funcional celular; y en tercer lugar, el papel causal de la red de productos regulados genómicamente, en la conservación y reproducción morfogenética del orden estructural orgánico, tal y como refleja la morfotaxonomía en la filogenia y la ontogenia”*.

En cuanto al papel causal de los genes expresados, en nuestro caso el factor de transcripción *Pax6*, en la tipología y el estado celular, nos permite interpretar que las células *Pax6+* registradas en nuestro estudio pertenecen a la misma población, aún cuando las imágenes obtenidas provengan de diferentes embriones de la misma especie en sucesivos estados de desarrollo. Más aún, podríamos también basarnos en estas causalidades para especular sobre la relación de la expresión de *Pax6* con el estado migratorio neural. Tal y como se comentó anteriormente, *Pax6* ha sido relacionado con procesos de migración radial de neuroblastos a la corteza cerebral de mamíferos (Talamillo et al., 2003), y de células precursoras de oligodendrocitos en el tubo neural de embriones de pollo (di Lullo et al., 2011). Además, se ha demostrado que la migración de neuronas talámicas sigue rutas tanto gliales como sustratos axonales (Ortino et al., 2003), habiéndose propuesto que la expresión de *Pax6* en neuronas postmitóticas podría estar mediando en el crecimiento axonal. En el diencefalo del pollo se ha puesto de manifiesto, mediante análisis clonal, cómo las células migran tangencialmente fuera de la zona ventricular siguiendo caminos axónicos (Golden et al, 1997).

Chatterjee et al. (2014) muestran como *Pax6* provoca una expresión temprana y extendida de *Shh* en la zona limitans intratalámica (zli) en el pez y en el ratón, mientras que la ganancia de función de

Pax6 inhibe la expresión de *Shh* en la zli en el pez. Utilizando patrones de expresión génica y mapas de destino molecular, caracterizan la expresión molecular de marcadores que delimitan a los progenitores (expresión combinada de *Neurog2*, *Irx1*, *Dbx1* y *Wnt7b*) y precursores (*Etv1*) de las neuronas habenules. En su estudio muestran que el dominio talámico se desplaza dorsalmente y el epitalámico desaparece de la placa alar de p2 en el ratón mutante *Pax6^{Sey/Sey}* (Desaparece por completo la expresión de *Dbx1* y *Wnt7b* en p2). Por el contrario, el epitálamo se expande ventralmente a expensas del tálamo en embriones de ratón con actividad reducida de *Shh*. Representativamente, la atenuación de la señalización de *Shh* rescata las particiones de p2 y restaura el epitálamo en el ratón mutante *Pax6^{Sey/Sey}*, sugiriendo que *Shh* actúa aguas abajo de *Pax6* en el control de la formación de la habénula. De manera similar al ratón, muestran que *Pax6* controla la formación del epitálamo sobre todo regulando la expresión de *shh* en la zli en zebrafish.

En concordancia con nuestros resultados, analizando las imágenes de partición de p2, mediante patrones de expresión génica en ratón del estudio de Chatterjee et al. (2014), podemos ver como en la parte más dorsal de p2, la habénula no termina rostralmente alcanzando a la zli, frontera con p3. Es decir, la parte dorsal más rostral de p2 es propiamente talámica y no epitalámica. Este hecho es cuanto menos curioso a tenor de que parece ser algo evidente en el mamífero si analizamos numerosas publicaciones de expresión génica. Si bien, ningún estudio revisado comenta este hecho y por el contrario en la mayoría de los esquemas de partición del diencéfalo revisados vemos como de manera consistente siempre el epitálamo termina rostralmente en la zli, incluyendo los esquemas del propio Chatterjee et al. (2014).

Destino de la migración en pollo.

El núcleo superficial parvocelular (SPC) es uno de los núcleos de la capa superficial de p2 que junto con el núcleo superficial microcelular (SMi) han sido tratados por diversos autores influyentes (Rendhal, 1924; Kuhlenbeck, 1937; Karten y Hodos, 1967) con cierta confusión, debido a sus posiciones tan próximas y entrecruzadas en algunos puntos. Es por ello que la mayoría de autores hacen referencia a ambos en su conjunto, indistintamente como un único núcleo superficial parvocelular, núcleo del tracto septo-mesencefálico o núcleo dorsolateral superficial. En este trabajo hemos tenido que distinguir claramente uno de otro, ya que el destino final de las células migratorias estudiadas en el pollo era precisamente la incorporación a uno de ellos, el núcleo superficial microcelular. Estos dos núcleos se distinguen el uno del otro teniendo en cuenta diferentes aproximaciones.

Citológicamente el núcleo superficial microcelular está compuesto de células muy pequeñas y basófilas, cuya peculiaridad principal es su retrasado nacimiento (HH 34), lo que lo convierte en la población más tardía del tálamo. Hasta el estadio HH36 el núcleo superficial parvocelular aparece como una única masa en la capa superficial de p2. Sus células son de tamaño medio y de no muy intensa basofilia (Guillén, 1991). A partir de este estadio de desarrollo este núcleo pierde su unidad, al ser atravesado por el tracto septo-mesencefálico, quedando dividido en dos partes, superficial parvocelular dorsal y lateral, quedando así hasta su desarrollo adulto. Rendahl (1924) estudió este núcleo embriológicamente únicamente hasta el décimo día de incubación, justo antes de ser dividido en las dos partes mencionadas previamente, con lo que al intentar identificarlo en el animal adulto, lo asimiló al núcleo superficial microcelular, el cual es prácticamente indistinguible antes del décimo día de incubación y

ocupa igualmente una posición dorsal y superficial. Los análisis autorradiográficos de Guillén (1991) muestran como el núcleo superficial parvocelular, en migración tangencial en sentido rostro caudal, se ve invadido y rechazado hacia el manto en su parte dorso caudal por el núcleo superficial microcelular, con el que se entremezclan sus células al paso del tracto septo-mesencefálico. Quedan por tanto ambos núcleos (SPC y SMi) diferenciados también por su origen neuroepitelial en el tercer ventrículo. Siendo más rostral el origen de SPC y más caudal el de SMi.

Por otro lado, ambos núcleos son distinguibles también por sus características histoquímicas. Así pues, en el estudio GABA inmunoreactivo en paloma de Domeneci et al (1988) se puede observar que la actividad gabaérgica es pronunciada en el núcleo superficial parvocelular mientras que es inexistente en el núcleo superficial microcelular. Guillén (1991) los distingue también estudiando los patrones inmunohistoquímicos de acetilcolinesterasa y calbindina. De manera que el núcleo superficial parvocelular lateral y el núcleo superficial microcelular son acetilcolinesterasa positivos intensos y el núcleo superficial parvocelular dorsal presenta menor intensidad. En cuanto a la calbindina, el núcleo superficial parvocelular es positivo y el núcleo superficial microcelular es negativo. Redies et. al. (2000), también diferencia claramente a estos dos núcleos, en un estudio de subdivisión diencefálica mediante mapeo de cadherinas, en concreto N-cad se expresa en el núcleo superficial microcelular y no se expresa en el núcleo superficial parvocelular, y viceversa para cad7.

Desde el punto de vista hodológico, Nixdorf y Bischof (1982), sin hacer distinción entre los núcleos superficial parvocelular y superficial microcelular, describen dos partes del núcleo superficial parvocelular. Una parte superficial, que proyecta contralateralmente y otra profunda que lo hace ipsilateralmente, señalando en sus esquemas ambas poblaciones en relación al tracto septomesencefálico. Estos datos muestran que la parte dorsal del núcleo superficial parvocelular

proyecta ipsilateralmente al Wulst, mientras que el núcleo superficial microcelular lo hace contralateralmente. Los datos de Hunt y Webster (1972) y de Peyrichoux et al. (1983) utilizando marcaje retrógrado concuerdan con las observaciones de Guillén (1991), lo cual nos ha ayudado a identificar estos núcleos superficiales, que no se han tratado con acierto en la literatura previa. A la hora de establecer homologías de las células estudiadas, estos datos hodológicos no lo sugieren con respecto al núcleo superficial microcelular, asiento de las proyecciones contralaterales, que cruzan la línea media en la comisura supraóptica dorsal y no existen en los mamíferos. Si bien, las conexiones ipsilaterales al Wulst del núcleo superficial parvocelular sí podrían sugerir homologías con la vía genículo cortical de los mamíferos.

Una vez aclarado el destino de la migración estudiada en pollo, los datos obtenidos de nuestro estudio de migración en ratón, parecen a priori no encajar en lo que al destino de la migración se refiere, al menos de forma total, ya que tal y como se ha puesto de manifiesto en el capítulo de resultados, las células en migración analizadas en ratón, se detienen en el núcleo habenuar lateral, concretamente en la zona más superficial del mismo, siendo esta una zona epitalámica y no propiamente de la capa dorsal del tálamo. Examinando el trabajo de Redies et al. (2000) vemos como el núcleo superficial microcelular aparentemente contribuye a la parte más superficial del núcleo dorsolateral lateral y a una parte laterorostral del núcleo dorsolateral anterior, además de a la habénula superficial, o núcleo superficial epitalámico de Rendahl (1924). Para reforzar estas afirmaciones Redies et al. (2000) hacen referencia a una figura (Fig. 15D de Redies et al., 2000) que hemos reproducido como Fig. 43. A la vista de estos datos, podemos concluir que el destino de la migración tanto en pollo como en ratón viene determinado por el mismo programa genético/epigenético.

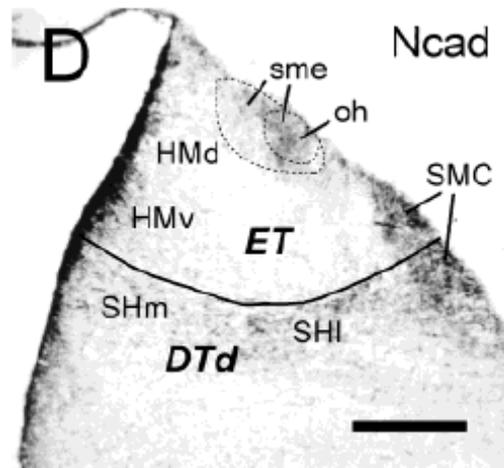


Fig. 43. Expresión de Ncad, tomada de Redies et al., 2000. El núcleo superficial microcelular (SMC) contribuye a la parte superficial de la habénula lateral.

A la vista del análisis de nuestros datos en pollo, se hace evidente que no todas las células migratorias alcanzan el núcleo superficial microcelular, quedándose las más rezagadas en la parte superficial del núcleo habenular lateral.

Otros datos que contribuyen a demostrar que se trata de la misma migración neuronal en ambas especies pollo y ratón, son las fechas de inicio y final de la citada migración. Tal y como hemos expuesto en el capítulo de resultados, en pollo la producción en el ventrículo se inicia en HH28 y observamos a las células migrar claramente a partir de HH34 hasta que alcanzan su destino final en el núcleo superficial microcelular en HH37. Por otro lado, en ratón, se observa el inicio de la etapa proliferativa en E13.5 y la llegada de las células a su destino final, en la zona superficial del núcleo habenular lateral en E16.5. Haciendo un análisis comparativo de estadificación de especies (Butler y Juurlink, 1987), con estos datos comprobamos que el periodo migratorio coincide en ambas especies.

Destino de la migración en ratón.

Nuestros resultados sobre el destino de la migración en ratón, indican que las células *Pax6+* se detienen en la superficie de la habénula lateral, aunque se distinguen ligeramente de las del pollo en que, si bien las del pollo están claramente en la superficie, en el ratón aún siendo superficiales están un poco más profundas. Teniendo en cuenta esta observación y revisando diverso material bibliográfico, hemos localizado exactamente en qué parte del núcleo habenular lateral se establecen las células estudiadas.

La habénula consiste en una población heterogénea de neuronas y ha sido subdividida, en el mamífero, en quince subnúcleos de acuerdo a características morfológicas tales como la densidad celular, morfología celular e inmunohistoquímica del soma y neuropilo. Inicialmente Andrés et al. (1999) utilizando microscopia electrónica y de luz; Geisler et al. (2003) mediante técnicas inmunohistoquímicas; Kowsky et al. (2009) con sus estudios electrofisiológicos y finalmente Aizawa et al. (2012) han refinado el modelo mediante hibridación in situ, para detectar la expresión de genes marcadores de neurotransmisores y sus receptores en cada subnúcleo. Para contrastar nuestros datos hemos elegido este último modelo de Aizawa et al. (2012) porque se basa en localización de mRNA, en vez de expresión de proteínas. Es evidente que la localización de la expresión génica en el soma permite caracterizar la naturaleza molecular de las neuronas en la habénula. Por el contrario, las proteínas (especialmente neurotransmisores) podrían expresarse en los axones aferentes desde otras regiones del cerebro, y por tanto no reflejarían necesariamente la naturaleza molecular de las neuronas habenulares.

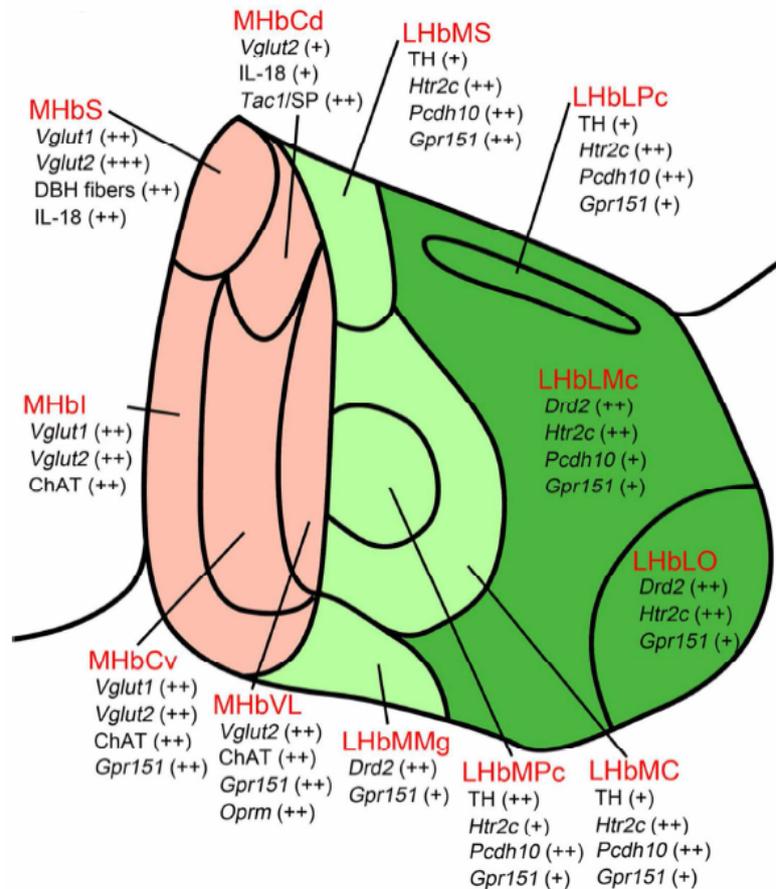


Fig. 44. Perfil de expresión génica de los subnúcleos habenuares. Tomado de Aizawa et al. (2012).

En concreto, (Fig. 44, tomada de Aizawa et al., 2012) el núcleo habenuar medial (en color rosado en la Fig. 44) está compuesto por una parte superior (MHbS), parte inferior (MHbI), parte central (MHbC), parte lateral (MHbL), y parte comisural (MHbS). Por su parte, el núcleo habenuar lateral está compuesto por una división medial (LHbM, en verde claro en la Fig. 44), el cual se subdivide en parte superior (LHbMS), parte parvocelular (LHbMPC), parte central (LHbMC), parte magnocelular (LHbMMg) y parte anterior (LHbMA, no mostrada en la Fig. 44); y una división lateral (LHbL, en verde oscuro en la Fig. 44), el cual se subdivide en parte parvocelular (LHbLPC), parte magnocelular (LHbLMc), parte oval (LHbLO), parte basal (LHbLB, no mostrada en la Fig. 44) y parte marginal (LhbLMg, no mostrada en la Fig. 44).

Como resultado de nuestro estudio y en contexto con estos datos de subdivisión del núcleo habenuar lateral, podemos postular que las neuronas en migración objeto de esta tesis doctoral acaban su recorrido en el subnúcleo parvocelular de la división lateral del núcleo habenuar lateral (LHbLPc), ya que, la posición del mismo coincide exactamente con la que podemos ver en los resultados obtenidos en el ratón. No cabe duda, que esta comparativa con datos a nivel molecular, proporciona una mayor evidencia del destino final de la migración estudiada. En la literatura encontramos autores (Rendahl, 1924 y Kuhlenbeck, 1937) que ya habían descrito en la habénula, además de una parte medial y una parte lateral, una parte superficial (núcleo superficial epitalámico), con lo que deducimos que estas neuronas ya habían sido definidas previamente, si bien no se habían percatado de que eran resultado de una migración.

La heterogeneidad neuronal del núcleo habenuar lateral a lo largo de los límites de sus subnúcleos, contrasta con el núcleo habenuar medial, donde los patrones de expresión génica delimitan los límites subnucleares de una forma más clara. Estos datos, sugieren la presencia de poblaciones neuronales, en concordancia con nuestros resultados, de diversas procedencias ontológicas en el núcleo habenuar lateral. Otro ejemplo de esta heterogeneidad, aparte del propiamente estudiado en esta tesis, lo constituye una población neuronal, descrita por Puelles et al. (2015), que migra ventro dorsalmente por el fascículo retroflejo, desde la zona ventral de la placa alar de p2, junto al límite alar/basal hasta el núcleo habenuar lateral, contribuyendo a la heterogeneidad del LHb y explicando el hecho de que haya neuronas de nacimiento temprano en la habénula lateral, tal y como muestran los datos autorradiográficos.

En las últimas décadas se ha atribuido diversa funcionalidad a la habénula lateral: la regulación del sueño, comportamiento materno, detección electromagnética y navegación (Hikosaka, 2010). Sin embargo, las investigaciones más recientes (Matsumoto y Hikosaka,

2007; 2009) sugieren que el núcleo habenular lateral está implicado en el procesamiento de información de recompensa. Las neuronas del núcleo habenular lateral codifican el error de predicción de recompensa negativo: son excitadas por eventos inesperados de ausencia de recompensa o desagradables e inhibidas por eventos inesperados de recompensa. Además, otros estudios (Wirtshafter et al., 1994) indican que el núcleo habenular lateral se activa ante diferentes condiciones de estrés y que lesiones en la habénula lateral inducen comportamientos alterados en respuesta a tareas realizadas en condiciones de estrés (Wilcox et al., 1986), lo cual insinúa que la habénula lateral, funcionalmente juega un papel fundamental en las respuestas conductuales al estrés o evasión del castigo.

El núcleo habenular lateral recibe entradas de los ganglios basales, que participan en diversas funciones, como la selección de acciones. También recibe entradas del sistema límbico, cuya función entre otras es el control de las emociones (Hikosaka, 2010; Lecourtier et al., 2007). El núcleo habenular lateral envía aferentes a centros dopaminérgicos (Omelchenko et al., 2009), serotoninérgicos (Herkenham y Nauta, 1979) y al núcleo tegmental rostro medial (gabaérgico), que inhiben centros dopaminérgicos (Jhou et al., 2009; Kaufling et al., 2009). Los núcleos aminérgicos también envían proyecciones de vuelta al núcleo habenular lateral (Moore et al., 1978; Reisine et al., 1984), por lo que este núcleo está bien posicionado para integrar las emociones en la selección de acciones. La falta de regulación en los centros aminérgicos se ha relacionado con trastornos depresivos (Russo et al., 2013; Dayan et al., 2008). Dado que el núcleo habenular lateral codifica información relativa a recompensa, respuesta a estímulos aversivos y regula centros aminérgicos, se ha sugerido (Hikosaka, 2010; Sartorius et al., 2010; Lecca et al., 2014) que un mal funcionamiento de la regulación llevada a cabo por el núcleo habenular lateral puede desencadenar diferentes trastornos psiquiátricos tales como esquizofrenia, psicosis inducida por drogas, adicción y depresión.

Tal y como hemos observado, el hecho de que diferentes sistemas neurotransmisores (Aizawa et. al. 2012) actúen en diferentes subnúcleos de los núcleos habenulares, estaría implicando que cada subnúcleo puede actuar de manera distintiva en el comportamiento animal, por lo que lesiones convencionales o tratamientos farmacológicos que afecten a toda la habénula no son los más indicados para descifrar la fisiología de esta región y en particular la del núcleo LHbLPc que hemos identificado como destino de la migración estudiada. Lo más indicado sería el análisis de los cambios conductuales tras la activación o inactivación por manipulación genética del subnúcleo en particular bajo estudio.

Origen de la migración.

Nuestros datos muestran que tanto para pollo como para ratón, el origen de la migración es la región retrohabenular, esto es, la extensión caudal de la región habenular, que no llega a alcanzar el pretecho, quedando separada de éste por un estrecho pasillo por el que la capa dorsal del tálamo cruza la parte más caudal de la línea media dorsal talámica. Existe poca información en la literatura sobre esta zona talámica y la mayoría de autores, en sus esquemas, suelen establecer el límite tálamo pretectal, a nivel dorsal, justo donde termina el epitálamo caudal, sin tener en cuenta que existe, rostral a p1, una zona estrecha del prosómero 2, que no es epitalámica sino talámica propiamente dicha.

Nuestros resultados contribuyen a demostrar que las suposiciones de Guillén (1991) sobre el origen caudal del núcleo superficial microcelular son correctas. Si bien, no lo especificó con total precisión en sus estudios autorradiográficos, otros autores como Altman y Bayer

(1979a,b,c), que realizaron estudios similares en mamífero (rata), no mencionan nada concreto al respecto de esta zona. En cualquier caso, queda demostrado que el punto de origen, peculiar o cuanto menos insospechado es la región retrohabenuar, que sí que aparece descrita en el atlas de pollo de Puelles (2007).

La interpretación mosaicista extrema de la proliferación neuronal propuesta por Altman y Bayer (1988b), implicaría que desde el primer momento postmitótico se debería poder observar en una misma fecha diferentes territorios, uno para cada núcleo. Sin embargo, en un área tan extensa como el diencéfalo, tal y como hemos demuestran nuestros datos, se observan múltiples áreas progenitoras solapadas produciendo neuronas simultáneamente, lo cual hace que la identificación de áreas progenitoras llevada a cabo por Altman y Bayer nos parezca un tanto arbitraria. Por otro lado, a día de hoy se hace poco sostenible la interpretación neuroanatómica basada en un neuroeje columnar (Puelles et al., 2012), por no citar la inconsistencia con los patrones de expresión génica.

En nuestra opinión con los datos analizados, desde un área de migración derivarían las poblaciones neuronales de varios núcleos, y distintos factores epigenéticos actuarían como moduladores contribuyendo a determinar su diferenciación final en diferentes núcleos.

Según Altman y Bayer (1979c), la habénula lateral en rata tiene un periodo de generación comprendido entre E13 y E16, mientras que la habénula medial entre E15 y E19, con estos periodos citogenéticos tan largos explican que estos núcleos se asemejan más a núcleos hipotalámicos que a núcleos talámicos. Constatan un gradiente latero-medial entre los núcleos habenuares así como dentro de cada núcleo, no encontrando gradientes ventrodorsales ni caudorostrales. Concluyen que las neuronas del epítalamo se generan concurrentemente a lo largo de toda la longitud dorsal del tercer ventrículo, y que las neuronas nacidas más temprano son desplazadas lateralmente por las que nacen

más tarde. El gradiente latero-medial estricto epitalámico lleva a Altman y Bayer a interpretar que la fuente de estas neuronas es el lóbulo neuroepitelial superior (SL1, Altman y Bayer, 1979b). De hecho esta región del neuroepitelio permanece activa mitóticamente más tarde que todas las demás regiones del tálamo. Se asemeja, en este sentido, al neuroepitelio del lóbulo inferior que genera neuronas hipotalámicas.

Usando las mismas técnicas autorradiográficas, Altman y Bayer no observan gradientes neurogenéticos claros en el tálamo dorsal. Si bien, hacen una generalización al observar que el epitálamo y una porción del tálamo medial, los cuales de forma común derivan de los lóbulos neuroepiteliales superiores activos durante más tiempo y más tarde en el tiempo, comparten una íntima conexión con el sistema límbico. Por lo que generalizan que las células del "tálamo límbico" se generan más tarde y de un componente neuroepitelial del tercer ventrículo, diferente al que genera las neuronas del "tálamo sensorial".

A tenor de nuestros resultados con ratón, donde claramente se vislumbra una migración desde la región retrohabenular hasta la parte superficial del núcleo habenular lateral, existe una discrepancia con los datos de Altman y Bayer, al sólo encontrar un gradiente neurogenético latero-medial en el epitálamo y ninguno en el tálamo dorsal. De hecho, Guillén (1991) que coincide con Altman y Bayer, y otros autores, en establecer un patrón de estratificación neuroblástica de fuera adentro para el tálamo dorsal del pollo, igual que en mamíferos, excluye de este patrón al núcleo superficial microcelular, estando sus datos en clara concordancia con los nuestros. Atribuimos a que la técnica de autorradiografía utilizada por Altman y Bayer, estando gran parte del ventrículo activo no siempre es la mejor para establecer estas conclusiones. Esto, unido a la hipótesis equivocada de partida de que cada núcleo talámico tiene su propia zona del neuroepitelio donde es producido, nos inclina a pensar en la arbitrariedad de la identificación de alguna de las áreas progenitoras llevadas a cabo por estos autores.

Haciendo un análisis comparativo de estadificación de especies (Butler y Juurlink, 1987), entre nuestros datos en ratón y los de Altman y Bayer (1979c) en rata, por un lado. Por otro lado, teniendo en cuenta que de sus datos, mediante la técnica de autorradiografía, no llegan a detectar la migración neuronal estudiada en esta tesis. Y finalmente, habiendo constatado, como se ha comentado previamente, la coincidencia temporal en la migración en pollo y ratón desde el tiempo en que se inicia la misma hasta el tiempo en que las células llegan a su destino final. Todos estos datos, nos llevan a proponer un periodo neurogenerativo más largo, que el propuesto por Altman y Bayer (1979c), del núcleo habenuar lateral en la rata. En concreto de E16 pasaría a E19, si bien se hace necesaria una investigación más específica que examine los datos implicados en esta especie.

A este respecto, cabe comentar, que los diferentes tamaños relativos entre habénula medial y lateral en diferentes especies (Aizawa et al., 2011) pueden estar reflejando el caudal de entrada cortical a la habénula lateral a través de los ganglios basales (Yanez y Anadon, 1996). Como el número de neuronas en los núcleos habenuares está determinado por procesos tales como proliferación, diferenciación y muerte celular, los cambios evolutivos en la organización interna de los núcleos habenuares pueden poner de manifiesto procesos de modulación neurogenéticos específicos de cada especie (Finlay y Darlington, 1995). Por lo tanto, el aumento de tamaño de la habénula lateral debido al incremento en la duración de su neurogénesis puede resultar en un refinamiento de los sistemas monoaminérgicos para evaluar una mayor cantidad de información sensorial.

Nuestro análisis embriológico descriptivo de la migración de células *Pax6+* con un origen insospechado en la región retrohabenuar y destino en los núcleos habenuar lateral y superficial microcelular (SMi) en pollo, y el subnúcleo parvocelular de la división lateral del núcleo habenuar lateral (LHbLPc) en ratón, contribuye a despejar algunas

dudas sobre el origen heterogéneo de las neuronas del epitálamo y la parte dorsal del tálamo. Asimismo, pone de manifiesto el papel causal de la expresión génica en la tipología y el estado funcional celular así como su conservación entre diferentes especies.

Conclusiones

1. Las observaciones obtenidas confirman la existencia de la migración neuronal tardía que se origina en la región retrohabenular, en el techo posterior del prosómero 2, confirmándose las conclusiones tentativas en ese sentido de Guillén (1991).
2. Las células migratorias *Pax6+* comienzan a visualizarse claramente en la región retrohabenular en el estadio HH31, terminando la migración aparentemente en HH37. Se desplazan desde su origen laterorrostralmente en la zona fronteriza entre la región habenular y el tálamo propiamente dicho. En el caso del pollo, este avance es más marcado y alcanza, a través del núcleo superficial microcelular, regiones cercanas a la frontera intertalámica, incorporándose escasas células de esta migración a la región habenular lateral. En ratón, en cambio, la migración penetra más importantemente en la región habenular lateral donde acaba integrándose en el subnúcleo parvocelular de la división lateral del núcleo habenular lateral y a penas se observan otras células fuera de esa zona habenular.
3. En el pollo se observa un segundo origen celular *Pax6+* a continuación del área retrohabenular, ya en la zona pretectal precomisural. Desde este origen existe una pequeña migración que alcanza aparentemente las inmediaciones del núcleo parvocelular de la comisura posterior.
4. El resultado de los marcajes con BDA in vitro en el estadio HH31, de producción inicial de estas células, corroboró la existencia de un movimiento migratorio desde este origen en la región retrohabenular hacia la zona de destino descrita mediante hibridación in situ de *Pax6*, tanto en el caso de la migración talámica como la pretectal.
5. Desde el punto de vista de la anatomía comparada, se concluye que los fenómenos retrohabenulares migratorios observados en el pollo y en el ratón coinciden en su cronología embriológica, ya que aparecen en estadios comparables y en ambos casos figura como diana la región habenular lateral. Si bien en el pollo aparecen células

que parecen invadir zonas no habenulares cercanas cabe preguntarse si no cabría incluir dichas regiones en la zona habenular. En el caso del ratón las células migradas componen una subpoblación menor del área habenular lateral que forma el subnúcleo parvocelular de la división lateral del núcleo habenular lateral.

Bibliografía

- Abellan, A. and Medina, L.** (2008). Expression of cLhx6 and cLhx7/8 suggests a pallido-pedunculo-preoptic origin for the lateral and medial parts of the avian bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res Bull.* **75**:299-304.
- Abellan, A. and Medina, L.** (2009). Subdivisions and derivatives of the chicken subpallium based on expression of LIM and other regulatory genes and markers of neuron subpopulations during development. *J Comp Neurol.* **515**:465-501.
- Aburomia, R., Khaner, O., and Sidow, A.** (2003). Functional evolution in the ancestral lineage of vertebrates or when genomic complexity was wagging its morphological tail. *J Struct Funct Genomics.* **3**:45-52.
- Agarwala, S., Sanders, T.A., and Ragsdale, C.W.** (2001). Sonic hedgehog control of size and shape in midbrain pattern formation. *Science.* **291**:2147-2150.
- Ahsan, M., Riley, K.L., and Schubert, F.R.** (2007). Molecular mechanisms in the formation of the medial longitudinal fascicle. *J Anat.* **211**:177-187.
- Aizawa, H., Amo, R., and Okamoto, H.** (2011). Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Front Neurosci.* **5**:138.
- Aizawa, H., Kobayashi, M., Tanaka, S., Fukai, T., and Okamoto, H.** (2012). Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *J Comp Neurol.* **520**:4051-4066.
- Altman, J.** (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior

forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* **137**:433-457.

Altman, J. and Bayer, S.A. (1978a). Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J Comp Neurol.* **182**:973-993.

Altman, J. and Bayer, S.A. (1978b). 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.

Altman, J. and Bayer, S.A. (1979a). Development of the diencephalon in the rat. V. Thymidine-radiographic observations on internuclear and intranuclear gradients in the thalamus. *J Comp Neurol.* **188**:473-499.

Altman, J. and Bayer, S.A. (1979b). Development of the diencephalon in the rat. IV. Quantitative study of the time of origin of neurons and the internuclear chronological gradients in the thalamus. *J Comp Neurol.* **188**:455-471.

Altman, J. and Bayer, S.A. (1979c). Development of the diencephalon in the rat. VI. Re-evaluation of the embryonic development of the thalamus on the basis of thymidine-radiographic datings. *J Comp Neurol.* **188**:501-524.

Altman, J. and Bayer, S.A. (1988a). Development of the rat thalamus: II. Time and site of origin and settling pattern of neurons derived from the anterior lobule of the thalamic neuroepithelium. *J Comp Neurol.* **275**:378-405.

- Altman, J. and Bayer, S.A.** (1988b). Development of the rat thalamus: I. Mosaic organization of the thalamic neuroepithelium. *J Comp Neurol.* **275**:346-377.
- Altman, J. and Bayer, S.A.** (1989a). Development of the rat thalamus: VI. The posterior lobule of the thalamic neuroepithelium and the time and site of origin and settling pattern of neurons of the lateral geniculate and lateral posterior nuclei. *J Comp Neurol.* **284**:581-601.
- Altman, J. and Bayer, S.A.** (1989b). Development of the rat thalamus: V. The posterior lobule of the thalamic neuroepithelium and the time and site of origin and settling pattern of neurons of the medial geniculate body. *J Comp Neurol.* **284**:567-580.
- Altman, J. and Bayer, S.A.** (1989c). Development of the rat thalamus: IV. The intermediate lobule of the thalamic neuroepithelium, and the time and site of origin and settling pattern of neurons of the ventral nuclear complex. *J Comp Neurol.* **284**:534-566.
- Andres, K.H., von During, M., and Veh, R.W.** (1999). Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *J Comp Neurol.* **407**:130-150.
- Angevine, J.B., Jr.** (1970). Time of neuron origin in the diencephalon of the mouse. An autoradiographic study. *J Comp Neurol.* **139**:129-187.
- Araki, M., McGeer, P.L., and Kimura, H.** (1988). The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. *Brain Research.* **441**:319-330.
- Austin, C.P. and Cepko, C.L.** (1990). Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex. *Development.* **110**:713-732.

- Bachy, I., Vernier, P., and Retaux, S.** (2001). The LIM-homeodomain gene family in the developing *Xenopus* brain: conservation and divergences with the mouse related to the evolution of the forebrain. *J Neurosci.* **21**:7620-7629.
- Bachy, I., Berthon, J., and Retaux, S.** (2002). Defining pallial and subpallial divisions in the developing *Xenopus* forebrain. *Mech Dev.* **117**:163-172.
- Balczarek, K.A., Lai, Z.C., and Kumar, S.** (1997). Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Mol Biol Evol.* **14**:829-842.
- Bayer S.A. and Altman J.** (1995). Development: Some principles of neurogenesis, neuronal migration and neural circuit formation. In: The Rat Nervous System. 2nd Edition, George Paxinos, Editor. Academic Press, Orlando, Florida.
- Bayly, R.D., Ngo, M., Aglyamova, G.V., and Agarwala, S.** (2007). Regulation of ventral midbrain patterning by Hedgehog signaling. *Development.* **134**:2115-2124.
- Bergquist, H.** (1932). ZUR MORPHOLOGIE DES ZWISCHENHIRNS BEI NIEDEREN WIRBELTIEREN. *Acta Zoologica.* **13**:57-303.
- Bergquist, H.** (1952). Formation of neuromeres in homo. *Acta Soc Med Ups.* **57**:23-32.
- Bergquist, H. and Källén, B.** (1953). On the development of neuromeres to migration areas in the vertebrate cerebral tube. *Acta Anat (Basel).* **18**:65-73.

- Bergquist, H. and Källén, B.** (1953). Studies on the topography of the migration areas in the vertebrate brain. *Acta Anat (Basel)*. **17**:353-369.
- Bergquist, H. and Källén, B.** (1954). Notes on the early histogenesis and morphogenesis of the central nervous system in vertebrates. *J Comp Neurol*. **100**:627-659.
- Bianco, I.H. and Wilson, S.W.** (2009). The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **364**:1005-1020.
- Blake, J.A., Thomas, M., Thompson, J.A., White, R., and Ziman, M.** (2008). Perplexing Pax: from puzzle to paradigm. *Dev Dyn*. **237**:2791-2803.
- Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G., and Noll, M.** (1986). Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell*. **47**:1033-1040.
- Brandt, H.M. and Apkarian, A.V.** (1992). Biotin-dextran: a sensitive anterograde tracer for neuroanatomic studies in rat and monkey. *J Neurosci Methods*. **45**:35-40.
- Brox, A., Puelles, L., Ferreiro, B., and Medina, L.** (2003). Expression of the genes GAD67 and Distal-less-4 in the forebrain of *Xenopus laevis* confirms a common pattern in tetrapods. *J Comp Neurol*. **461**:370-393.
- Brox, A., Puelles, L., Ferreiro, B., and Medina, L.** (2004). Expression of the genes *Emx1*, *Tbr1*, and *Eomes* (*Tbr2*) in the telencephalon of *Xenopus laevis* confirms the existence of a ventral pallial division in all tetrapods. *J Comp Neurol*. **474**:562-577.

- Buijs, R.M.** (1978). Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Res.* **192**:423-435.
- Bulfone, A., Puelles, L., Porteus, M.H., Frohman, M.A., Martin, G.R., and Rubenstein, J.L.** (1993). Spatially restricted expression of Dlx-1, Dlx-2 (Tes-1), Gbx-2, and Wnt-3 in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J Neurosci.* **13**:3155-3172.
- Butler, A.B.** (1994). The evolution of the dorsal thalamus of jawed vertebrates, including mammals: cladistic analysis and a new hypothesis. *Brain Res Brain Res Rev.* **19**:29-65.
- Butler H and Juurlink BHJ.** (1987). An Atlas for Staging Mammalian and chick embryos. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Chalepakis, G., Stoykova, A., Wijnholds, J., Tremblay, P., and Gruss, P.** (1993). Pax: gene regulators in the developing nervous system. *J Neurobiol.* **24**:1367-1384.
- Chatterjee, M., Guo, Q., Weber, S., Scholpp, S., and Li, J.Y.** (2014). Pax6 regulates the formation of the habenular nuclei by controlling the temporospatial expression of Shh in the diencephalon in vertebrates. *BMC Biol.* **12**:13.1741-7007-12-13[PII];24528677[pmid].
- Christoph, G.R., Leonzio, R.J., and Wilcox, K.S.** (1986). Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J Neurosci.* **6**:613-619.
- Coggeshall, R.E.** (1964). A STUDY OF DIENCEPHALIC DEVELOPMENT IN THE ALBINO RAT. *J Comp Neurol.* **122**:241-269.

- Concha, M.L. and Wilson, S.W.** (2001). Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J Anat.* **199**:63-84.
- Contestabile, A., Villani, L., Fasolo, A., Franzoni, M.F., Gribaudo, L., Oktedalen, O., and Fonnum, F.** (1987). Topography of cholinergic and substance P pathways in the habenulo-interpeduncular system of the rat. An immunocytochemical and microchemical approach. *Neuroscience.* **21**:253-270.
- Contestabile, R.A. and Flumerfelt, B.A.** (1981). Afferent connections of the interpeduncular nucleus and the topographic organization of the habenulo-interpeduncular pathway: An HRP study in the rat. *J Comp Neurol.* **196**:253-270.
- Craigie, E.H.** (1931). The cell masses in the diencephalon of the humming bird. *Prop. Koninkl. Med Akad Wetenschap.* **34**:1038-1050.
- Crossland, W.J. and Uchwat, C.J.** (1982). Neurogenesis in the chick ventral lateral geniculate and ectomammillary nuclei: relationship of soma size to birthdate. *Brain Res.* **282**:33-46.
- Czerny, T., Bouchard, M., Kozmik, Z., and Busslinger, M.** (1997). The characterization of novel Pax genes of the sea urchin and *Drosophila* reveal an ancient evolutionary origin of the Pax2/5/8 subfamily. *Mech Dev.* **67**:179-192.
- Davila, J.C., Guirado, S., and Puelles, L.** (2000). Expression of calcium-binding proteins in the diencephalon of the lizard *Psammmodromus algirus*. *J Comp Neurol.* **427**:67-92.
- Dayan, P. and Huys, Q.J.** (2008). Serotonin, inhibition, and negative mood. *PLoS Comput Biol.* **4**:e4.

- Derobert, Y., Baratte, B., Lepage, M., and Mazan, S. (2002). Pax6 expression patterns in *Lampetra fluviatilis* and *Scyliorhinus canicula* embryos suggest highly conserved roles in the early regionalization of the vertebrate brain. *Brain Res Bull.* **57**:277-280.
- Di Lullo, E., Haton, C., Le Poupon, C., Volovitch, M., Joliot, A., Thomas, J.L., and Prochiantz, A. (2011). Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube. *Development.* **138**:4991-5001.
- Domenici, L., Waldvogel, H.J., Matute, C., and Streit, P. (1988). Distribution of GABA-like immunoreactivity in the pigeon brain. *Neuroscience.* **25**:931-950.
- Dominguez, L., Morona, R., Gonzalez, A., and Moreno, N. (2013). Characterization of the hypothalamus of *Xenopus laevis* during development. I. The alar regions. *J Comp Neurol.* **521**:725-759.
- Duan, D., Fu, Y., Paxinos, G., and Watson, C. (2013). Spatiotemporal expression patterns of Pax6 in the brain of embryonic, newborn, and adult mice. *Brain Struct Funct.* **218**:353-372.
- Engelkamp, D., Rashbass, P., Seawright, A., and van, H., V. (1999). Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development.* **126**:3585-3596.
- Ferran, J.L., Sanchez-Arrones, L., Sandoval, J.E., and Puelles, L. (2007). A model of early molecular regionalization in the chicken embryonic pretectum. *J Comp Neurol.* **505**:379-403.
- Ferran, J.L., Sanchez-Arrones, L., Bardet, S.M., Sandoval, J.E., Martinez-de-la-Torre, M., and Puelles, L. (2008). Early pretectal gene

expression pattern shows a conserved anteroposterior tripartition in mouse and chicken. *Brain Res Bull.* **75**:295-298.

Ferran, J.L., de Oliveira, E.D., Merchan, P., Sandoval, J.E., Sanchez-Arrones, L., Martinez-de-la-Torre, M., and Puellas, L. (2009). Genoarchitectonic profile of developing nuclear groups in the chicken pretectum. *J Comp Neurol.* **517**:405-451.

Ferreiro-Galve, S., Candal, E., and Rodriguez-Moldes, I. (2012). Dynamic expression of Pax6 in the shark olfactory system: evidence for the presence of Pax6 cells along the olfactory nerve pathway. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* **318**:79-90.

Figdor, M.C. and Stern, C.D. (1993). Segmental organization of embryonic diencephalon. *Nature.* **363**:630-634.

Fink, A.J., Englund, C., Daza, R.A., Pham, D., Lau, C., Nivison, M., Kowalczyk, T., and Hevner, R.F. (2006). Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J Neurosci.* **26**:3066-3076.

Finlay, B.L. and Darlington, R.B. (1995). Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science.* **268**:1578-1584.

Fritzsch, B. (1993). Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *J Neurosci Methods.* **50**:95-103.

Geisler, S., Andres, K.H., and Veh, R.W. (2003). Morphologic and cytochemical criteria for the identification and delineation of individual subnuclei within the lateral habenular complex of the rat. *J Comp Neurol.* **458**:78-97.

- Ghashghaei, H.T., Lai, C., and Anton, E.S.** (2007). Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat Rev Neurosci.* **8**:141-151.
- Gilthorpe, J.D., Papantoniou, E.K., Chedotal, A., Lumsden, A., and Wingate, R.J.** (2002). The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. *Development.* **129**:4719-4728.
- Golden, J.A., Zitz, J.C., McFadden, K., and Cepko, C.L.** (1997). Cell migration in the developing chick diencephalon. *Development.* **124**:3525-3533.
- Gottesfeld, Z.** (1983). Origin and distribution of noradrenergic innervation in the habenula: A neurochemical study. *Brain Research.* **275**:299-304.
- Greatrex, R.M. and Phillipson, O.T.** (1982). Demonstration of synaptic input from prefrontal cortex to the habenula in the rat. *Brain Research.* **238**:192-197.
- Gruber, C., Kahl, A., Lebenheim, L., Kowski, A., Dittgen, A., and Veh, R.W.** (2007). Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat. *Neuroscience Letters.* **427**:165-170.
- Guillén M.** (1991). Estructura del epítalamo y complejo superior del tálamo dorsal en aves: estudio embriológico. Posibles homologías con mamíferos.[doctoral thesis]. Murcia, Spain. University of Murcia.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* **88**:49-92.

- Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K.W., and Berson, D.M. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol.* **497**:326-349.
- Hauptmann, G. and Gerster, T. (2000). Regulatory gene expression patterns reveal transverse and longitudinal subdivisions of the embryonic zebrafish forebrain. *Mech Dev.* **91**:105-118.
- Heffron, D.S. and Golden, J.A. (2000). DM-GRASP is necessary for nonradial cell migration during chick diencephalic development. *J Neurosci.* **20**:2287-2294.
- Herkenham, M. and Nauta, W.J. (1977). Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *J Comp Neurol.* **173**:123-146.
- Herkenham, M. and Nauta, W.J.H. (1979). Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* **187**:19-47.
- Herrick, C.J. (1910). The morphology of the forebrain in amphibia and reptilia. *Journal of Comparative Neurology and Psychology.* **20**:413-547.
- Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci.* **11**:503-513.
- Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci.* **11**:503-513.
- Hill, A., Boll, W., Ries, C., Warner, L., Osswald, M., Hill, M., and Noll, M. (2010). Origin of Pax and Six gene families in sponges: Single PaxB and Six1/2 orthologs in *Chalinula loosanoffi*. *Dev Biol.* **343**:106-123.

- His, W.** (1893). Über das frontale Ende des Gehirnrohres. *Arch Anat Physiol Anat Abt 3/4*.157-171.
- His, W.** (1904). Die Entwicklung des menschlichen Gehirns während der ersten Monate. *Hirzel:Leipzig*.
- Hochstetter, F.** (1929). Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des menschlichen Gehirns. *Deuticke, Wien*.
- Holland, L.Z. and Short, S.** (2010). Alternative splicing in development and function of chordate endocrine systems: a focus on Pax genes. *Integr Comp Biol*. **50**:22-34.
- Huber, G.C. and Crosby, E.C.** (1929). The nuclei and fiber paths of the avian diencephalon, with consideration of telencephalic and certain mesencephalic centers and connections. *J Comp Neurol*. **48**:1-225.
- Hunt, S.P. and Webster, K.E.** (1972). Thalamo-hyperstriate interrelations in the pigeon. *Brain Res*. **44**:647-651.
- Jacobson, A.G. and Tam, P.P.** (1982). Cephalic neurulation in the mouse embryo analyzed by SEM and morphometry. *Anat Rec*. **203**:375-396.
- Jhou, T.C., Fields, H.L., Baxter, M.G., Saper, C.B., and Holland, P.C.** (2009). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron*. **61**:786-800.
- Jun, S. and Desplan, C.** (1996). Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development*. **122**:2639-2650.

- Jungherr, E.L.** (1969). The neuroanatomy of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Avian Dis.* 1-126.
- Kage, T., Takeda, H., Yasuda, T., Maruyama, K., Yamamoto, N., Yoshimoto, M., Araki, K., Inohaya, K., Okamoto, H., Yasumasu, S., Watanabe, K., Ito, H., and Ishikawa, Y.** (2004). Morphogenesis and regionalization of the medaka embryonic brain. *J Comp Neurol.* 476:219-239.
- Kang, J.S. and Krauss, R.S.** (2010). Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 13:243-248.
- Kappers CUA, Huber GC, and Crosby EC.** (1936). The Comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates, Including Man (2 Volumes). 1st edition. Macmillan.
- Karten HJ and Hodos W.** (1967). A stereotaxis atlas of the brain of the pigeon". The John Hopkins Press, Baltimore.
- Kaufling, J., Veinante, P., Pawlowski, S.A., Freund-Mercier, M.J., and Barrot, M.** (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol.* 513:597-621.
- Kawakami, A., Kimura-Kawakami, M., Nomura, T., and Fujisawa, H.** (1997). Distributions of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development. *Mech Dev.* 66:119-130.
- Källén, B.** (1951). On the ontogeny of the reptilian forebrain; nuclear structures and ventricular sulci. *J Comp Neurol.* 95:307-347.

- Källén, B.** (1951). Some remarks on the ontogeny of the telencephalon in some lower vertebrates. *Acta Anat (Basel)*. **11**:537-548.
- Källén, B.** (1952). Notes on the proliferation processes in the neuromeres in vertebrate embryos. *Acta Soc Med Ups*. **57**:111-118.
- Källén, B.** (1965). Early morphogenesis and pattern formation in the Central Nervous System. *Organogenesis*. Eds R. L. De Hann and H. Ursprung. New York. Holt, Rinehart and Winston. Chapter 4.
- Keller, R.G., Desplan, C., and Rosenberg, M.I.** (2010). Identification and characterization of *Nasonia Pax* genes. *Insect Mol Biol*. **19 Suppl 1**:109-120.
- Keyser, A.** (1972). The development of the diencephalon of the Chinese hamster. *Acta Morphol Neerl Scand*. **9**:379.
- Keyser, A.** (1972). The development of the diencephalon of the Chinese hamster. An investigation of the validity of the criteria of subdivision of the brain. *Acta Anat Suppl (Basel)*. **59**:1-178.
- Keyser A.** (1979). Development of the hypothalamus in mammals. An investigation into its morphological position during ontogenesis. In "Anatomy of the Hypothalamus". (P.J. Morgane and J. Panksepp, eds.), Vol. 1, pp.65-136. Dekker, New York.)
- Kim, U. and Chang, S.Y.** (2005). Dendritic morphology, local circuitry, and intrinsic electrophysiology of neurons in the rat medial and lateral habenular nuclei of the epithalamus. *J Comp Neurol*. **483**:236-250.
- Kingsbury, B.F.** (1920). The extent of the floor-plate of his and its significance. *J Comp Neurol*. **32**:113-135.

- Kingsbury, B.F.** (1922). The fundamental plan of the vertebrate brain. *J Comp Neurol.* **34**:461-491.
- Kingsbury, B.F.** (1930). The developmental significance of the floor-plate of the brain and spinal cord. *J Comp Neurol.* **50**:177-207.
- Kiselev, Y., Eriksen, T.E., Forsdahl, S., Nguyen, L.H., and Mikkola, I.** (2012). 3T3 cell lines stably expressing Pax6 or Pax6(5a)--a new tool used for identification of common and isoform specific target genes. *PLoS One.* **7**:e31915.
- Kleinjan, D.A., Bancewicz, R.M., Gautier, P., Dahm, R., Schonhaler, H.B., Damante, G., Seawright, A., Hever, A.M., Yeyati, P.L., van, H., V, and Coutinho, P.** (2008). Subfunctionalization of duplicated zebrafish pax6 genes by cis-regulatory divergence. *PLoS Genet.* **4**:e29.
- Kowski, A.B., Veh, R.W., and Weiss, T.** (2009). Dopaminergic activation excites rat lateral habenular neurons in vivo. *Neuroscience.* **161**:1154-1165.
- Kozmik, Z., Czerny, T., and Busslinger, M.** (1997). Alternatively spliced insertions in the paired domain restrict the DNA sequence specificity of Pax6 and Pax8. *EMBO J.* **16**:6793-6803.
- Krayniak, P.F. and Siegel, A.** (1978). Efferent connections of the septal area in the pigeon. *Brain Behav Evol.* **15**:389-404.
- Kuhlenbeck, H.** (1937). The ontogenetic development of the diencephalic centers in a bird's brain (chick) and comparison with the reptilian and mammalian diencephalon. *J Comp Neurol.* **66**:23-75.

- Kuhlenbeck, H.** (1939). The development and structure of the pretectal cell masses in the chick. *J Comp Neurol.* **71**:361-387.
- Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L.B., O'Brien, T.F., Kusakabe, M., and Steindler, D.A.** (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol.* **156**:333-344.
- Larsen, C.W., Zeltser, L.M., and Lumsden, A.** (2001). Boundary formation and compartment in the avian diencephalon. *J Neurosci.* **21**:4699-4711.
- Lauter, G., Soll, I., and Hauptmann, G.** (2013). Molecular characterization of prosomeric and intraprosomeric subdivisions of the embryonic zebrafish diencephalon. *J Comp Neurol.* **521**:1093-1118.
- Lecca, S., Meye, F.J., and Mameli, M.** (2014). The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *Eur J Neurosci.* **39**:1170-1178.
- Lecourtier, L. and Kelly, P.H.** (2007). A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci Biobehav Rev.* **31**:658-672.
- Lecourtier, L. and Kelly, P.H.** (2007). A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* **31**:658-672.
- Letinic, K. and Rakic, P.** (2001). Telencephalic origin of human thalamic GABAergic neurons. *Nat Neurosci.* **4**:931-936.

- Lopez, J.M., Dominguez, L., Morona, R., Northcutt, R.G., and Gonzalez, A.** (2012). Organization of the cholinergic systems in the brain of two lungfishes, *Protopterus dolloi* and *Neoceratodus forsteri*. *Brain Struct Funct.* **217**:549-576.
- Martinez-de-la-Torre M.** (1985). Estructura del mesencéfalo y diencefalo en aves y reptiles: aportaciones de una síntesis en la búsqueda de homologías. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Martinez-de-la-Torre, M., Garda, A.L., Puellas, E., and Puellas, L.** (2002). *Gbx2* expression in the late embryonic chick dorsal thalamus. *Brain Res Bull.* **57**:435-438.
- Matsumoto, M. and Hikosaka, O.** (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature.* **447**:1111-1115.
- Matsumoto, M. and Hikosaka, O.** (2009). Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci.* **12**:77-84.
- Matsunaga, E., Araki, I., and Nakamura, H.** (2000). *Pax6* defines the di-mesencephalic boundary by repressing *En1* and *Pax2*. *Development.* **127**:2357-2365.
- Maulbecker, C.C. and Gruss, P.** (1993). The oncogenic potential of *Pax* genes. *EMBO J.* **12**:2361-2367.
- McAllister, J.P., II and Das, G.D.** (1977). Neurogenesis in the epithalamus, dorsal thalamus and ventral thalamus of the rat: an autoradiographic and cytological study. *J Comp Neurol.* **172**:647-686.

- McHedlishvili, L., Epperlein, H.H., Telzerow, A., and Tanaka, E.M.** (2007). A clonal analysis of neural progenitors during axolotl spinal cord regeneration reveals evidence for both spatially restricted and multipotent progenitors. *Development*. **134**:2083-2093.
- Merchan, P., Bardet, S.M., Puellas, L., and Ferran, J.L.** (2011). Comparison of Pretectal Genoarchitectonic Pattern between Quail and Chicken Embryos. *Front Neuroanat*. **5**:23.
- Moore, R.Y., Halaris, A.E., and Jones, B.E.** (1978). Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *J Comp Neurol*. **180**:417-438.
- Moreno, N., Bachy, I., Retaux, S., and Gonzalez, A.** (2004). LIM-homeodomain genes as developmental and adult genetic markers of Xenopus forebrain functional subdivisions. *J Comp Neurol*. **472**:52-72.
- Moreno, N., Retaux, S., and Gonzalez, A.** (2008). Spatio-temporal expression of Pax6 in Xenopus forebrain. *Brain Res*. **1239**:92-99.
- Moreno, N., Morona, R., Lopez, J.M., and Gonzalez, A.** (2010). Subdivisions of the turtle *Pseudemys scripta* subpallium based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. *J Comp Neurol*. **518**:4877-4902.
- Moreno, N., Dominguez, L., Morona, R., and Gonzalez, A.** (2012). Subdivisions of the turtle *Pseudemys scripta* hypothalamus based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. *J Comp Neurol*. **520**:453-478.
- Morest, D.K.** (1970). A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young. *Z Anat Entwicklungsgesch*. **130**:265-305.

- Morona, R. and Gonzalez, A.** (2008). Calbindin-D28k and calretinin expression in the forebrain of anuran and urodele amphibians: further support for newly identified subdivisions. *J Comp Neurol.* **511**:187-220.
- Morona, R. and Gonzalez, A.** (2009). Immunohistochemical localization of calbindin-D28k and calretinin in the brainstem of anuran and urodele amphibians. *J Comp Neurol.* **515**:503-537.
- Morona, R., Ferran, J.L., Puelles, L., and Gonzalez, A.** (2011). Embryonic genoarchitecture of the pretectum in *Xenopus laevis*: a conserved pattern in tetrapods. *J Comp Neurol.* **519**:1024-1050.
- Murakami, Y., Ogasawara, M., Sugahara, F., Hirano, S., Satoh, N., and Kuratani, S.** (2001). Identification and expression of the lamprey Pax6 gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates. *Development.* **128**:3521-3531.
- Murakami, Y., Ogasawara, M., Satoh, N., Sugahara, F., Myojin, M., Hirano, S., and Kuratani, S.** (2002). Compartments in the lamprey embryonic brain as revealed by regulatory gene expression and the distribution of reticulospinal neurons. *Brain Res Bull.* **57**:271-275.
- Nixdorf, B. and Bischof, H.** (1982). Afferent connections of the ectostriatum and visual wulst in the zebra finch (*Taeniopygia guttata castanotis* Gould) GÇö an HRP study. **248**:9-17.
- O'Rourke, N.A., Dailey, M.E., Smith, S.J., and McConnell, S.K.** (1992). Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science.* **258**:299-302.

- Ohyama, K., Das, R., and Placzek, M.** (2008). Temporal progression of hypothalamic patterning by a dual action of BMP. *Development*. **135**:3325-3331.
- Omelchenko, N., Bell, R., and Sesack, S.R.** (2009). Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci*. **30**:1239-1250.
- Ortino, B., Inverardi, F., Morante-Oria, J., Fairen, A., and Frassoni, C.** (2003). Substrates and routes of migration of early generated neurons in the developing rat thalamus. *Eur J Neurosci*. **18**:323-332.
- Osumi, N., Hirota, A., Ohuchi, H., Nakafuku, M., Iimura, T., Kuratani, S., Fujiwara, M., Noji, S., and Eto, K.** (1997). Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development*. **124**:2961-2972.
- Palmgren, A.** (1921). Embryological and morphological studies on the mid-brain and cerebellum of vertebrates. *Acta Zoologica*. **2**:1-94.
- Peyrichoux, J., Weidner, C., Reperant, J., and Rio, J.P.** (1983). Long term regeneration of contralateral and induced ipsilateral retinal projections to the remaining optic tectum of *Rutilus rutilus*. *Brain Res*. **263**:125-131.
- Phillipson, O.T. and Pycocock, C.J.** (1982). Dopamine neurones of the ventral tegmentum project to both medial and lateral habenula. *Exp Brain Res*. **45**:89-94.
- Price, J. and Thurlow, L.** (1988). Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development*. **104**:473-482.

- Pritz, M.B. and Ruan, Y.W.** (2009). PAX6 immunoreactivity in the diencephalon and midbrain of alligator during early development. *Brain Behav Evol.* **73**:1-15.
- Puelles, L., Amat, J.A., and Martinez-de-la-Torre, M.** (1987). Segment-related, mosaic neurogenetic pattern in the forebrain and mesencephalon of early chick embryos: I. Topography of AChE-positive neuroblasts up to stage HH18. *J Comp Neurol.* **266**:247-268.
- Puelles, L. and Martinez-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.
- Puelles, L. and Rubenstein, J.L.** (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* **16**:472-479.
- Puelles, L.** (1995). A segmental morphological paradigm for understanding vertebrate forebrains. *Brain Behav Evol.* **46**:319-337.
- Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S., and Rubenstein, J.L.** (2000). Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes Dlx-2, Emx-1, Nkx-2.1, Pax-6, and Tbr-1. *J Comp Neurol.* **424**:409-438.
- Puelles, L.** (2001). Brain segmentation and forebrain development in amniotes. *Brain Res Bull.* **55** :695-710.

- Puelles, L.** (2001). Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **356**:1583-1598.
- Puelles L and Rubenstein JL.** (2002). Forebrain. In Encyclopedia of the Human Brain.(Rachandran, V.S., ed), Elsevier Science.
- Puelles, L. and Rubenstein, J.L.** (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* **26**:469-476.
- Puelles L.** (2007). The chick brain in stereotaxic coordinates : an atlas featuring neuromeric subdivisions and mammalian homologies.Amsterdam; Boston. Academic Press.
- Puelles L, Martinez S, and Martinez-de-la-Torre M.** (2008). Neuroanatomía.Primer edición. Editorial médica Panamericana, S.A.
- Puelles, L. and Ferran, J.L.** (2012). Concept of neural genoarchitecture and its genomic fundament. *Front Neuroanat.* **6**:47.
- Puelles L, Fernández B., and Martinez-de-la-Torre M.** (2015). Chapter 2 - Neuromeric Landmarks in the Rat Midbrain, Diencephalon and Hypothalamus, Compared with Acetylcholinesterase Histochemistry. In Paxinos G, editor. The Rat Nervous System (Fourth Edition). San Diego: Academic Press. p 25-43.
- Quina, L.A., Wang, S., Ng, L., and Turner, E.E.** (2009). Brn3a and Nurr1 mediate a gene regulatory pathway for habenula development. *J Neurosci.* **29**:14309-14322.
- Quintana-Urzainqui, I., Sueiro, C., Carrera, I., Ferreiro-Galve, S., Santos-Duran, G., Pose-Mendez, S., Mazan, S., Candal, E., and Rodriguez-**

- Moldes, I.** (2012). Contributions of developmental studies in the dogfish *Scyliorhinus canicula* to the brain anatomy of elasmobranchs: insights on the basal ganglia. *Brain Behav Evol.* **80**:127-141.
- Quintana-Urzaínqui, I., Rodríguez-Moldes, I., and Candal, E.** (2012). Developmental, tract-tracing and immunohistochemical study of the peripheral olfactory system in a basal vertebrate: insights on Pax6 neurons migrating along the olfactory nerve. *Brain Struct Funct.* **219**:85-104.
- Rakic, P. and Sidman, R.L.** (1969). Telencephalic origin of pulvinar neurons in the fetal human brain. *Z Anat Entwicklungsgesch.* **129**:53-82.
- Rakic, P.** (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia.* **46**:882-891.
- Rath, M.F., Rohde, K., Klein, D.C., and Moller, M.** (2013). Homeobox genes in the rodent pineal gland: roles in development and phenotype maintenance. *Neurochem Res.* **38**:1100-1112.
- Redies, C., Ast, M., Nakagawa, S., Takeichi, M., Martínez-de-la-Torre, M., and Puelles, L.** (2000). Morphologic fate of diencephalic prosomeres and their subdivisions revealed by mapping cadherin expression. *J Comp Neurol.* **421**:481-514.
- Reiner, A., Veenman, C.L., Medina, L., Jiao, Y., Del Mar, N., and Honig, M.G.** (2000). Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods.* **103**:23-37.
- Reisine, T.D., Soubrie, P., Ferron, A., Blas, C., Romo, R., and Glowinski, J.** (1984). Evidence for a dopaminergic innervation of the cat lateral

habenula: its role in controlling serotonin transmission in the basal ganglia. *Brain Res.* **308**:281-288.

Remedios, R., Subramanian, L., and Tole, S. (2004). LIM genes parcellate the embryonic amygdala and regulate its development. *J Neurosci.* **24**:6986-6990.

Rendahl, H. (1924). EMBRYOLOGISCHE UND MORPHOLOGISCHE STUDIEN ÜBER DAS ZWISCHENHIRN BEIM HUHN. *Acta Zoologica.* **5**:241-344.

Rodriguez-Moldes, I., Ferreiro-Galve, S., Carrera, I., Sueiro, C., Candal, E., Mazan, S., and Anadon, R. (2008). Development of the cerebellar body in sharks: spatiotemporal relations of Pax6 expression, cell proliferation and differentiation. *Neurosci Lett.* **432**:105-110.

Rodriguez-Moldes, I. (2009). A developmental approach to forebrain organization in elasmobranchs: new perspectives on the regionalization of the telencephalon. *Brain Behav Evol.* **74**:20-29.

Rodriguez-Moldes, I., Carrera, I., Pose-Mendez, S., Quintana-Urzaínqui, I., Candal, E., Anadon, R., Mazan, S., and Ferreiro-Galve, S. (2011). Regionalization of the shark hindbrain: a survey of an ancestral organization. *Front Neuroanat.* **5**:16.

Ronnekleiv, O.K. and Moller, M. (1979). Brain-pineal nervous connections in the rat: An ultrastructure study following habenular lesion. *Exp Brain Res.* **37**:551-562.

Rubenstein, J.L., Martinez, S., Shimamura, K., and Puelles, L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science.* **266**:578-580.

- Russo, S.J. and Nestler, E.J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci.* **14**:609-625.
- Sartorius, A., Kiening, K.L., Kirsch, P., von Gall, C.C., Haberkorn, U., Unterberg, A.W., Henn, F.A., and Meyer-Lindenberg, A. (2010). Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. *Biol Psychiatry.* **67**:e9-e11.
- Senn, D.G. (1968). [On the formation of the diencephalon and mesencephalon in *Anniella pulchra* Gray]. *Acta Anat (Basel).* **69**:239-261.
- Senn, D.G. (1968). [Structure and ontogenesis of diencephalon and mesencephalon in *Lacerta sicula* (Rafinesque)]. *Acta Anat Suppl (Basel).* **55**:1-150.
- Senn, D.G. (1970). The stratification in the reptilian central nervous system. *Acta Anat (Basel).* **75**:521-552.
- Shimamura, K., Hirano, S., McMahon, A.P., and 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.
- Shimizu, N., Watanabe, H., Kubota, J., Wu, J., Saito, R., Yokoi, T., Era, T., Iwatsubo, T., Watanabe, T., Nishina, S., Azuma, N., Katada, T., and Nishina, H. (2009). Pax6-5a promotes neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Biol Pharm Bull.* **32**:999-1003.
- Shin, D.H., Lee, K.S., Lee, E., Chang, Y.P., Kim, J.W., Choi, Y.S., Kwon, B.S., Lee, H.W., and Cho, S.S. (2003). Pax-7 immunoreactivity in the post-

natal chicken central nervous system. *Anat Histol Embryol.* **32**:378-383.

Short, S. and Holland, L.Z. (2008). The evolution of alternative splicing in the Pax family: the view from the Basal chordate amphioxus. *J Mol Evol.* **66**:605-620.

Shoukimas, G.M. and Hinds, J.W. (1978). The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: an electron microscopic serial section analysis. *J Comp Neurol.* **179**:795-830.

Sirko, S., Neitz, A., Mittmann, T., Horvat-Brocker, A., von Holst, A., Eysel, U.T., and Faissner, A. (2009). Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex. *Brain.* **132**:2252-2264.

Sofroniew, M.V. and Weindl, A. (1978). Projections from the parvocellular vasopressin- and neurophysin-containing neurons of the suprachiasmatic nucleus. *American Journal of Anatomy.* **153**:391-429.

Spassky, N., de Castro, F., Le Bras, B., Heydon, K., Queraud-LeSaux, F., Bloch-Gallego, E., Chedotal, A., Zalc, B., and Thomas, J.L. (2002). Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J Neurosci.* **22**:5992-6004.

Stensaas, L.J. (1967). The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits IV. Forty-one millimeter stage, intermediate lamina. *J Comp Neurol.* **131**:409-421.

- Stoykova, A. and Gruss, P.** (1994). Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci.* **14**:1395-1412.
- Stuart, E.T., Kioussi, C., and Gruss, P.** (1994). Mammalian Pax genes. *Annu Rev Genet.* **28**:219-236.
- Suga, H., Tschopp, P., Graziussi, D.F., Stierwald, M., Schmid, V., and Gehring, W.J.** (2010). Flexibly deployed Pax genes in eye development at the early evolution of animals demonstrated by studies on a hydrozoan jellyfish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**:14263-14268.
- Sutherland, R.J.** (1982). The dorsal diencephalic conduction system: A review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* **6**:1-13.
- Talamillo, A., Quinn, J.C., Collinson, J.M., Caric, D., Price, D.J., West, J.D., and Hill, R.E.** (2003). Pax6 regulates regional development and neuronal migration in the cerebral cortex. *Dev Biol.* **255**:151-163.
- Tanabe, Y. and Jessell, T.M.** (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science.* **274**:1115-1123.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C.S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science.* **274**:1123-1133.
- Thummel, R., Enright, J.M., Kassen, S.C., Montgomery, J.E., Bailey, T.J., and Hyde, D.R.** (2010). Pax6a and Pax6b are required at different points in neuronal progenitor cell proliferation during zebrafish photoreceptor regeneration. *Exp Eye Res.* **90**:572-582.

- Underhill, D.A.** (2012). PAX proteins and fables of their reconstruction. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **22**:161-177.
- Vaage, S.** (1969). The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). A morphological, histochemical and autoradiographical investigation. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch.* **41**:3-87.
- Vaage, S.** (1973). The histogenesis of the isthmic nuclei in chick embryos (*Gallus domesticus*). I. A morphological study. *Z Anat Entwicklungsgesch.* **142**:283-314.
- van Tienhoven, A. and Juhasz, L.P.** (1962). The chicken telencephalon, diencephalon and mesencephalon in stereotaxic coordinates. *J Comp Neurol.* **118**:185-197.
- Varga, V., Kocsis, B., and Sharp, T.** (2003). Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus. *European Journal of Neuroscience.* **17**:280-286.
- Vertes, R.P., Fortin, W.J., and Crane, A.M.** (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* **407**:555-582.
- Vitalis, T., Cases, O., Engelkamp, D., Verney, C., and Price, D.J.** (2000). Defect of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor Pax6. *J Neurosci.* **20**:6501-6516.
- Volker, H.** (1972). [Cyto- and myeloarchitecture of the chicken thalamus (*Gallus domesticus* L.) and cytology of characteristic nerve nuclei]. *Anat Anz.* **132**:32-52.

- von Kupffer, K.** (1906). Die Morphogenie des Centralnervensystems. In: Handbuch der Vergleichenden und Experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere. *O Hertwig (Ed.)*.
- Vue, T.Y., Aaker, J., Taniguchi, A., Kazemzadeh, C., Skidmore, J.M., Martin, D.M., Martin, J.F., Treier, M., and Nakagawa, Y.** (2007). Characterization of progenitor domains in the developing mouse thalamus. *J Comp Neurol.* **505**:73-91.
- Walsh, C. and Cepko, C.L.** (1992). Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science.* **255**:434-440.
- Walther, C. and Gruss, P.** (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development.* **113**:1435-1449.
- Wang, R.Y. and Aghajanian, G.K.** (1977). Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science.* **197**:89-91.
- Wang, W., Zhong, J., and Wang, Y.Q.** (2010). Comparative genomic analysis reveals the evolutionary conservation of Pax gene family. *Genes Genet Syst.* **85**:193-206.
- Wehr, R. and Gruss, P.** (1996). Pax and vertebrate development. *Int J Dev Biol.* **40**:369-377.
- Winner, B., Desplats, P., Hagl, C., Klucken, J., Aigner, R., Ploetz, S., Laemke, J., Karl, A., Aigner, L., Masliah, E., Buerger, E., and Winkler, J.** (2009). Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Exp Neurol.* **219**:543-552.

- Wirtshafter, D., Asin, K.E., and Pitzer, M.R.** (1994). Dopamine agonists and stress produce different patterns of Fos-like immunoreactivity in the lateral habenula. *Brain Res.* **633**:21-26.
- Wray, S.** (2001). Development of luteinizing hormone releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol.* **13**:3-11.
- Wullmann, M.F. and Rink, E.** (2001). Detailed immunohistology of Pax6 protein and tyrosine hydroxylase in the early zebrafish brain suggests role of Pax6 gene in development of dopaminergic diencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* **131**:173-191.
- Yan, Q., Gong, L., Deng, M., Zhang, L., Sun, S., Liu, J., Ma, H., Yuan, D., Chen, P.C., Hu, X., Liu, J., Qin, J., Xiao, L., Huang, X.Q., Zhang, J., and Li, D.W.-C.** (2010). Sumoylation activates the transcriptional activity of Pax-6, an important transcription factor for eye and brain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **107**:21034-21039.
- Yanez, J. and Anadon, R.** (1996). Afferent and efferent connections of the habenula in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an indocarbocyanine dye (Dil) study. *J Comp Neurol.* **372**:529-543.