



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I

Rutas de señalización moduladoras de proliferación y
diferenciación en células madre y precursoras neurales

Gaizka Otaegi García

V^o B^o de los Directores de la Tesis

Flora de Pablo Carlos Vicario

V^o B^o del Tutor

Manuel Guzmán

Memoria presentada por Gaizka Otaegi García para optar al grado de
Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 2006

Índice

A. Introducción

1. Células madre (troncales) y progenitores en el sistema nervioso de los mamíferos.....	1
1.1 Factores que mantienen la capacidad de autorrenovación de las células madre neurales.....	2
1.2 Diferenciación de las células madre y progenitores neurales.....	4
2. Desarrollo embrionario del bulbo olfatorio (BO).....	5
2.1 Formación de las células y capas del BO.....	5
2.2 Factores que regulan la neurogénesis en el BO	7
3. Desarrollo embrionario de la retina.....	8
3.1 Introducción.....	8
3.2 Células madre y progenitores en la retina.....	11
3.3 Regulación del número y la diferenciación de células madre y progenitores de retina.....	12
4. Expresión y acción del IGF-I en el sistema nervioso central.....	15
4.1 Vías de señalización del IGF-I.....	15
4.2 Efectos biológicos del IGF-I.....	19
5. La fosfatasa PTEN durante el desarrollo del SNC.....	21
B. Objetivos.....	28
C. Material y Métodos.....	30
1. Cultivo de células de retina de ratón embrionario E12,5 y E13,5.....	30
1.1 Disección de la retina.....	30
1.2 Cultivo de células progenitoras.....	31
2. Cultivo de células madre de bulbo olfatorio (CMBO).....	32
2.1 Disección y disociación del bulbo olfatorio de ratón embrionario E14,5.....	32
2.2 Condiciones de proliferación.....	33
2.3 Condiciones de diferenciación.....	34

2.4 Cultivos de CMBO de ratones mutantes para el gen <i>igf-I</i>	34
2.4.1 Condiciones de disección y cultivo.....	34
2.4.2 Genotipaje de ratones mutantes para el gen <i>igf-I</i>	35
2.4.2.1 Extracción de DNA genómico.....	35
2.4.2.2 Técnica de la PCR.....	36
3. Inmunocitoquímica de células en cultivo.....	38
4. Inmunohistoquímica en secciones de criostato.....	40
4.1 Obtención de las criosecciones de cerebro.....	40
4.2 Inmunohistoquímica en criosecciones.....	40
5. Análisis de proteínas por inmunoelectrotransferencia (<i>Western blot</i>).....	41
6. Sobreexpresión génica en CMBO mediante construcciones retrovirales.....	44
6.1 Clonaje de los cDNA de PTEN y PTEN-C/S y preparación de las construcciones retrovirales.....	44
6.2 Producción de partículas retrovirales. Determinación del título de infección.....	45
6.3 Infección de CMBO.....	46
7. Detección de la apoptosis celular por la técnica de TUNEL.....	47
8. Tratamientos de las CMBO con los inhibidores LY294002 y U0126.....	48
9. Cuantificación del número de células. Análisis estadístico.....	48
D. Resultados.....	51
I. Desarrollo de la retina embrionaria de ratón y aislamiento de células progenitoras.....	51
1. Estudio <i>in vivo</i> de la proliferación y diferenciación neural durante el periodo embrionario (E12,5-E13,5).....	51
2. Aislamiento y cultivo de células progenitoras de la retina.....	52
3. Estudio comparativo de células progenitoras neurales de retina y BO.....	54

II. Efectos celulares y bioquímicos del IGF-I y PTEN en células madre de bulbo olfatorio (CMBO) y en BO en desarrollo. Análisis de las rutas bioquímicas de señalización de la PI3K/AKT y MAP/ERK1/2 quinasas.....	57
1. Estudio de la apoptosis durante la proliferación y diferenciación de CMBO.....	57
2. Estimulación de las CMBO con IGF-I.....	58
3. Expresión de P-AKT en ratones mutantes nulos para IGF-I.....	60
4. Papel de la fosfatasa PTEN durante las fases de proliferación y diferenciación de CMBO.....	61
4.1 Características de proliferación y diferenciación de las CMBO infectadas con las construcciones retrovirales pRV-GFP y pRV-PTEN-GFP.....	62
4.2 Determinación por inmunoelectrotransferencia (<i>Western blot</i>) de los niveles de expresión de PTEN en células infectadas con pRV-PTEN-GFP y pRV-PTEN-C/S-GFP.....	65
4.3 Sobreexpresión de PTEN en CMBO.	
4.3.1 Efecto de la sobreexpresión de PTEN durante la proliferación de CMBO.....	66
4.3.2 Efecto de la sobreexpresión de PTEN durante la diferenciación de CMBO a neuronas y glía.....	67
4.3.3 Análisis de los niveles de P-AKT en células silvestres y nulas para IGF-I infectadas con pRV-PTEN-GFP y estimuladas con IGF-I.....	70
4.4 Efecto de la sobreexpresión de la forma catalíticamente inactiva de PTEN (PTEN-C/S) en CMBO en fase de diferenciación.....	72
5. Papel de PI3K en la proliferación, diferenciación y muerte celular de las CMBO.....	74
5.1 Valoración de la reducción de los niveles de P-AKT y P-ERK1/2 en CMBO tratadas con LY294002.....	74
5.2 Efectos de la inhibición de PI3K/P-AKT sobre la proliferación de las CMBO.....	75
5.3 Efectos de la inhibición de PI3K/P-AKT sobre la diferenciación de CMBO.....	78
6. Papel de ERK 1/2 en la proliferación, diferenciación y muerte celular de las CMBO.....	81

6.1 Efectos de la inhibición de P-ERK 1/2 durante la proliferación de CMBO.....	82
6.2 Efectos de la inhibición de P-ERK1/2 durante la diferenciación de CMBO.....	83
E. Discusión.....	86
1. Células progenitoras de retina embrionaria.....	86
2. El IGF-I, la PI3K/AKT y PTEN controlan el desarrollo de las CMN.....	90
F. Conclusiones.....	99
G. Bibliografía.....	102

Mirando hacia atrás en el tiempo, me doy cuenta de las muchas experiencias que he tenido la suerte de vivir estos últimos cuatro años. He aquí mi homenaje y mi agradecimiento a todos aquellos que me habéis acompañado durante este tiempo. Y como todos los viajes comienzan con un pequeño paso, mi primer agradecimiento es para la Dra. Flora de Pablo y el Dr. Carlos Vicario, que con vuestra confianza en mí y vuestra eterna paciencia, casi maternal, me habéis permitido dar ese primer paso para poder iniciar el sueño de una carrera científica. Gracias por atreveros a ser mis jefes.

Este sueño no hubiera sido tal, si no hubiera podido compartir con vosotras lo mejor y lo peor de cada momento durante estos años. Gracias por vuestro apoyo, Enrique, el tercer jefe, Cati, mi paloma y profesora Mari Jose, Ana V, Carmen F, Carmen 2, Ana R, Isabel, Eva, Hector, Oscar, Patricia, Mariam y Ana A.

Pero en especial a vosotras, porque cuando comencé este viaje, lo hice cojeando, y lo termino apoyado en quienes habéis sabido formar parte de mi vida, Silvia, Tere y Alicia. Y a ti Jimi, que te debo lo mejor de mí.

Y como no, a todos los precarios del CIB, imposibles de enumerar. Gracias por entender que mas allá de las poyatas, pipetas y reveladores, existen los pasillos y las cañas, que con ellos, he tenido la suerte de conocer, compartir y hacer buenos amigos. **Gracias!**

No quiero tampoco perder la oportunidad de agradecer a todos los servicios comunes del CIB, desde el animalario hasta las chicas de compras, pasando por las niñas de la Vega, que con vuestra profesionalidad y simpatía, me habéis facilitado el trabajo de esta tesis.

Y a vosotros, Mariki, Eider, Ander, Alfonso, Susana, Vero1/2, Olatz, Úrsula, Carmen y Asier, que más allá de ser mis amigos, habéis sido mi familia. Gracias por haber compartido conmigo, en esta increíble ciudad, los mejores ocho años de mi vida. Y en especial a quienes habéis sido mis hermanos aquí, Sonia, Emilio, Gorka y Esti, y allí, Igor y Xabi.

Y a mis dos chicos, a quienes va dedicado este trabajo, aita y Kepa, que sin vosotros esta tesis no tiene sentido para mí, porque sois lo mejor que tengo.

Pero sobre todo esta tesis es para ti, porque a ti te debo todo lo que soy. Te quiero.

Gracias a todos

Eskerrik asko danoi.

Abreviaturas

BDNF	del inglés <i>brain derived neurotrophic factor</i>
BMP	del inglés <i>bone morphogenetic protein</i>
BO	Bulbo olfatorio
BSA	del inglés <i>bovine serum albumin</i>
BrdU	5'-bromo-2-desoxiuridina
cDNA	del inglés <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CMBO	célula madre de bulbo olfatorio
CMN	célula madre neural
CNTF	del inglés <i>ciliary neurotrophic factor</i>
DAB	3-3'diaminobenzidina
DABCO	1,4 diazabicilo (2,2,2) octano
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DMEM	del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	del inglés <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	del inglés <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
DTT	ditiotreitól
E	día del desarrollo embrionario
EDTA	del inglés <i>ethylenedinitril tetraacetic acid</i>
EGF	del inglés <i>epidermal growth factor</i>
FAK	del inglés <i>focal adhesion kinase</i>
FBS	del inglés <i>fetal bovine serum</i>
FGF-2	del inglés <i>fibroblast growth factor</i>
Fig.	Figura
GFAP	del inglés <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	del inglés <i>green flourescent protein</i>
HA	hemaglutinina
HBSS	del inglés <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IGF-I	del inglés <i>insulin-like growth factor I</i>
IGF-II	del inglés <i>insulin-like growth factor II</i>
IRES	del inglés <i>internal ribosome entry site</i>

IRS-1	del inglés <i>insulin receptor substrate 1</i>
NGF	del inglés <i>nerve growth factor</i>
NT-3	del inglés <i>neurotrophin-3</i>
PB	del inglés <i>phosphate buffer</i>
PBS	del inglés <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PKD1/2	del inglés <i>phosphoinositide dependent protein kinase 1,2</i>
PI3K	del inglés <i>phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PKB/AKT	del inglés <i>protein kinase B/AKT</i>
PTEN	del inglés <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
p/v	peso volumen
r.p.m.	revoluciones por minuto
SDS	del inglés <i>sodium dodecylsulphate</i>
SEM	del inglés <i>standard error of the mean</i>
SH2	del inglés <i>Src homology 2</i>
Shh	del inglés <i>Sonic hedgehog</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
Tbr-1	del inglés <i>T-brain-1</i>
TE	Tris-EDTA
TGF α/β	del inglés <i>transforming growth factor α/β</i>

1. Células madre (troncales) y progenitores en el sistema nervioso de los mamíferos.

Durante décadas se ha aceptado, casi como dogma, que con el final del desarrollo embrionario finalizaba la neurogénesis, por lo que todas las neuronas del sistema nervioso central (SNC) adulto estarían irreversiblemente diferenciadas, sin que pudieran ser reemplazadas a su muerte. Actualmente, se conocen y se están estudiando procesos de neurogénesis en mamíferos durante la edad adulta, caracterizados por la presencia de células madre neurales (CMN), células progenitoras y neuronas inmaduras (Temple 2001; Ray y cols. 2006).

En el SNC embrionario, una proporción variable de estas células neuroepiteliales pueden presentar características de células madre neurales o células troncales neurales (del inglés *neural stem cells*). La definición de célula madre neural engloba los conceptos de autorrenovación y multipotencialidad. Es decir, son células capaces de dividirse eficientemente, originando al menos una célula con características de célula madre y presentan el potencial de diferenciarse a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (McKay, 1997; Temple, 2001; Seaberg y Van der Kooy, 2003; Alvarez-Buylla y Lim, 2004).

A medida que avanza el desarrollo, las CMN van perdiendo su potencialidad y generan células específicas de tejido. La pérdida gradual de esta capacidad genera células progenitoras de determinado tipo celular, con capacidad limitada de autorrenovación y frecuentemente unipotentes (Seaberg y Van der Kooy, 2003).

En el sistema nervioso embrionario se han aislado células madre en prácticamente todas las zonas estudiadas, salvo en retina (Tropepe y cols., 2000; Temple, 2001; Vicario-Abejón y cols., 2003); mientras que en el adulto se restringen a regiones como la zona subventricular (Reynolds y Weiss, 1992; Doetsch y cols., 1999; Capela y Temple, 2002; Sanai y cols., 2004), la zona subependimal próxima al giro dentado del hipocampo (Gage, 2000; Seaberg y Van der Kooy, 2003), la extensión rostral, el bulbo olfativo (Pagano y cols., 2000; Gritti y cols., 2002; Liu y Martín, 2003), la retina (Tropepe y cols., 2000) y el cerebelo (Klein y cols., 2005). Además, se han

aislado progenitores gliales que bajo ciertas condiciones pueden comportarse como células madre (Kondo y Raff, 2000; Belachew y cols., 2003; Nunes y cols., 2003).

Las células madre presentes en el neuroepitelio se dividen fundamentalmente de forma simétrica en los primeros estadios, y posteriormente lo hacen de forma asimétrica para generar la progenie diferenciada (Anderson, 2001; Temple, 2001; Cayouette y Raff, 2003). De modo general, en primer lugar se originan las neuronas, y después las células de la glía (Jacobson, 1991; He y cols., 2005). Esta variación en el potencial neurogénico y gliogénico de las CMN, puede deberse a cambios medioambientales durante el desarrollo y a características intrínsecas de las células madre (McKay, 1997; Qian y cols., 2000; Anderson, 2001; Vicario-Abejón y Yusta-Boyo 2004; Shen y cols., 2006).

El estudio de las células madre neurales embrionarias nos permite abordar los mecanismos que controlan la autorrenovación celular, la supervivencia y la diferenciación a un determinado tipo neuronal o glial.

1.1 Factores que mantienen la capacidad de autorrenovación de las células madre neurales.

La especificidad de las células madre y progenitoras viene marcada por un proceso guiado por la activación de rutas bioquímicas mediante factores extrínsecos, que regulan la expresión de factores de transcripción (Gage y McAllister, 2005). Numerosos laboratorios han obtenido células madre neurales de distintos tejidos *in vitro*, gracias al control de las condiciones de cultivo y a la adición de diferentes factores mitogénicos. Los más importantes descritos para el crecimiento de CMN en cultivo son los factores de crecimiento FGF-2 (del inglés *fibroblast growth factor 2*), EGF (del inglés *epidermal growth factor 2*) y TGF α (del inglés *transforming growth factor α*) (Tropepe y cols.; 1999, Gritti y cols., 1999; Vicario-Abejón y cols., 1995; Taupin y cols., 2000; Zheng y cols., 2004a; Vicario-Abejón y cols., 2003; Caldwell y cols., 2004; Sailer y cols., 2005). Bajo estas condiciones, las CMN crecen o bien formando agregados de células, denominados neuroesferas (Reynolds y Weiss, 1992;

Seaberg y Van der Kooy 2003) o bien adheridas a la placa de cultivo (Vicario-Abejón y cols., 1995; Johe y cols., 1996).

FGF-2, EGF y su homólogo TGF α son ligandos polipeptídicos que inician diversas respuestas celulares durante el desarrollo de vertebrados. La familia de los FGFs contiene al menos 25 miembros, que se unen a los receptores de FGF formados por 4 proteínas tirosina quinasa transmembrana. La unión de FGF a heparina o a heparan sulfato previene de su degradación, con lo que aumenta su efectividad sobre la célula (Raman y cols., 2003; Caldwell y cols., 2004; Katoh y cols., 2005). El EGF y TGF α se unen al receptor de EGF, que es una glicoproteína transmembrana de 170 kDa, el cual contiene un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa. La activación de estos receptores con actividad tirosina quinasa provoca la estimulación de la vía de señalización de la MAPK (del inglés *mitogen activated protein kinase*) implicada en proliferación celular.

Por otro lado, factores de crecimiento como el IGF-I (del inglés *insulin-like growth factor I*) cooperan con FGF-2 y EGF durante la proliferación de precursores neurales y, en particular, de CMN. Así, el FGF-2 requiere IGF-I para promover supervivencia y proliferación de células neuroepiteliales *in vitro* (Drago y cols., 1991). El IGF-I también es necesario para la generación de neuroesferas en presencia de EGF y FGF-2 (Arsenijevic y cols., 2001; Vicario-Abejón y cols., 2003).

Además de FGF-2, EGF/TGF α e IGF-I, existen otros factores que promueven la proliferación de células madre y progenitores neurales en distintas regiones del cerebro, como son la forma glicosilada de la cistatina-C (Taupin y cols., 2000), las proteínas Eph/ephrin (Conover y cols., 2000), CNTF (del inglés *ciliary neurotrophic factor*)/LIF (del inglés *leukemia inhibitory factor*) (Tropepe y cols., 2001 y Shimazaki y cols., 2001), Wnt (Dieter-Chinchung y cols., 2005), PEDF (del inglés *pigmented epithelium derived factor*) (Ramirez-Castillejo y cols., 2006), VEGF (del inglés *vascular epithelial growth factor*) (Le Bras y cols., 2006) y Shh (del inglés *Sonic hedgehog*) (Lai y cols., 2003; Ahn y Joyner, 2005). La neurotrofina BDNF (del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) presenta un efecto positivo en supervivencia y proliferación de

neuroblastos de la zona subventricular (Kirschenbaum y Goldman, 1995; Zigova y cols., 1998; Benraiss y cols., 2001; Pencea y cols., 2001).

1.2 Diferenciación de las células madre y progenitores neurales.

La especificación del destino celular depende de la interacción entre señales externas (factores de crecimiento, entre otras), señales internas específicas de cada tipo celular y señalización célula-célula (por ejemplo, Notch) (Edlund y Jessell., 1999; Tropepe y cols., 2001; Lai y cols., 2004). La retirada de los factores mitógenos del cultivo de CMN induce su diferenciación a los tres fenotipos neurales (Gritti y cols.; 1996, Johe y cols.; 1996; Vicario-Abejón y cols., 2003; Yusta-Boyo y cols., 2004). Además, se han estudiado, tanto en cultivo como *in vivo*, muchos factores de diferenciación que condicionan la adquisición de un determinado fenotipo neural.

Los factores neurotróficos, entre ellos los de la familia de las neurotrofinas, presentan un importante papel en la diferenciación, supervivencia y maduración neuronal (Segal y cols., 1992; De la Rosa y cols., 1994; Vicario-Abejón y cols., 2000). El IGF-I, el BDNF y el NT-3 (del inglés *neurotrophin-3*) promueven en cultivos de CMN la diferenciación a diversos tipos neurales (Vicario-Abejón y cols., 2000; Vicario-Abejón y cols., 2003). Los efectos biológicos del IGF-I se describirán, con más detalle, en el siguiente apartado.

Los mecanismos moleculares que controlan la diferenciación a astrocitos incluyen señales extracelulares como, CNTF, BMPs (del inglés *bone morphogenetic protein*) y EGF, entre otros, interacciones célula-célula (Delta/Notch) y factores de transcripción como Hes 1 y Hes5 (Vicario-Abejón y Yusta-Boyo, 2004). El CNTF es un eficiente promotor de la diferenciación a astrocitos incluso en presencia de mitógenos (Johe y cols., 1996; Bonni y cols., 1997; Rajan y McKay, 1998; Sun y cols., 2001). Por su parte, en los ratones nulos para el receptor de EGF existe una disminución en la capacidad de diferenciación a astrocitos (Wagner y cols., 2006). Además, durante la mitosis asimétrica de las células madre, la célula hija que más moléculas del receptor de EGF hereda, es quien da lugar a una mayor progenie de astrocitos (Sun y cols., 2005).

Los estudios realizados con ratones carentes de IGF-I apoyan la implicación de este factor durante el desarrollo de los oligodendrocitos (Cheng y cols., 1998; Ye y cols., 2002). Otros factores, como NT-3, el Shh y la hormona T₃ y los factores de transcripción como los Olig1 y Olig2, también están implicados en los procesos de diferenciación de oligodendrocitos (Johe y cols., 1996; Gao y cols., 1998; Takebayashi y cols., 2002; Ligon y cols., 2006).

2. Desarrollo embrionario del bulbo olfatorio (BO)

2.1 Formación de las células y capas del BO

El origen de las poblaciones de células diferenciadas que forman el bulbo olfatorio está en la migración de células precursoras desde la zona ventricular y subventricular del propio BO, y desde la eminencia ganglionar lateral y la zona subventricular del cerebro anterior, a través de la corriente migratoria rostral. En el ratón, a partir de la edad E12,5, se genera una protuberancia en el extremo rostral de las vesículas telencefálicas, que un día más tarde adquiere el abultamiento típico de bulbo olfatorio, y ya aparecen algunas fibras nerviosas procedentes del epitelio olfatorio (Luskin, 1993; Bailey y cols., 1999; Alvarez-Buylla y Lim, 2004).

En términos generales, el desarrollo de la estructura del bulbo se completa un día después del nacimiento, cuando ya se pueden distinguir todas las capas concéntricas, en una sección coronal, desde la más externa hacia la más interna (Ramón y Cajal, 1894; Bailey y cols., 1999). Después de los terminales del nervio olfatorio, se sitúa la capa glomerular, compuesta por formaciones esféricas u ovaladas denominadas glomérulos, donde tienen lugar las sinapsis entre los axones de neuronas sensoriales y las dendritas de las neuronas mitrales y empenachadas. Mas internamente está la capa plexiforme externa donde se localizan las neuronas empenachadas, que son neuronas excitatorias como las mitrales. Estas células envían sus axones hacia la capa granular más interna. Algunas también proyectan sus axones hacia la corteza a través del tracto lateral olfatorio. La siguiente capa es la mitral que contiene 2-3 filas de neuronas mitrales o de proyección, que son células grandes con forma de mitra (Fig. 1). Estas células reciben la información sensorial de neuronas olfativas y la transmiten hasta la corteza a través de

sus axones, que forman el tracto lateral olfativo. Algunos axones presentan ramificaciones colaterales hacia la capa plexiforme externa. En la capa granular interna se localizan fundamentalmente las células granulares y las fibras nerviosas mielinizadas de neuronas mitrales. Finalmente está la capa de células proliferativas. Hasta el día embrionario E14 esta capa se denomina capa ventricular o neuroepitelial, y contiene un elevado número de células proliferativas que son el origen de neuronas mitrales, empenachadas y algunas interneuronas. Entre los días E14-E18 coexisten las capas ventricular y la subventricular. A partir de E18 sólo existe la capa subventricular, que origina las células gliales y algunas interneuronas. Sin embargo, la mayoría de las interneuronas del bulbo proceden de otras regiones como son la eminencia lateral ganglionar (Marín y Rubenstein, 2001) y la zona subventricular del cerebro anterior (Luskin, 1993; Doetsch y cols., 1999). Es posible que en el propio BO neonatal y adulto se generen interneuronas a partir de precursores locales (Gritti y cols., 2002; Bedard y Parent, 2004).

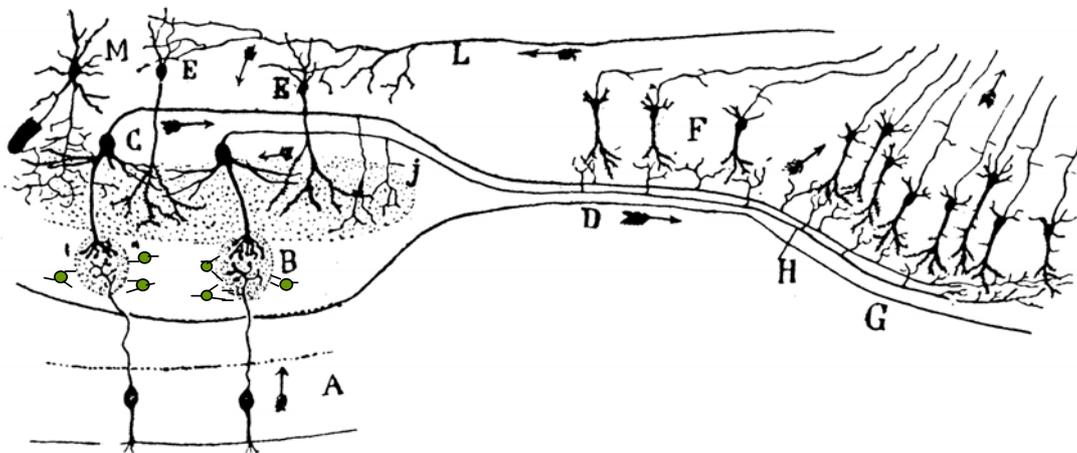


Fig 1. Estructura del bulbo olfatorio de vertebrados. Dibujo de Santiago Ramón y Cajal, 1894 (modificado). A: Epitelio olfatorio; B: glomérulo; C: neurona mitral; D: tracto lateral olfatorio; E: Neurona grano. Las células representadas de color verde son las neuronas periglomerulares (dopaminérgicas). Las neuronas olfativas sensoriales del epitelio olfatorio, recogen el estímulo olfatorio y lo transmiten por sus axones hasta los glomérulos donde hacen sinapsis con las neuronas mitrales, las cuales proyectan sus axones a través del tracto lateral olfatorio hasta la corteza cerebral olfatoria.

2.2 Factores que regulan la neurogénesis en el BO

Los factores que promueven la proliferación y diferenciación en el BO tienen especial interés para el desarrollo de esta tesis. La señalización a través del receptor de tipo 1 de los FGFs (FGFR1) es esencial en la morfogénesis del bulbo olfatorio, ya que animales carentes de dicho receptor no desarrollan el bulbo olfatorio de manera normal (Hebert y cols., 2002).

Como ya hemos mencionado anteriormente, el IGF-I es un factor necesario para el desarrollo de algunas regiones del SNC (De Pablo y de la Rosa, 1995; Varela-Nieto y cols., 2003). Por ello, resulta de especial interés los estudios realizados sobre su expresión y los efectos de su ausencia sobre la estructura del bulbo olfatorio y sus células madre embrionarias (CME) (Fig. 2). Su expresión en este tejido comienza a ser patente a partir del día embrionario E13 de rata y aumenta en la embriogénesis tardía (Bartlett y cols. 1991; Bondy y Cheng, 1991 y 2004), donde se restringe a neuronas de la capa glomerular y mitral (García-Segura y cols., 1991). En los ratones mutantes nulos para IGF-I no se aprecian anomalías antes de E16,5. A partir de esta edad, se observa un descenso del marcador de células mitrales, *Tbr1*, en la capa compuesta por estas células. Además, esta capa presenta una desorganización, sugiriendo que el IGF-I pudiera estar afectando a la organización y migración de las neuronas mitrales (Fig. 2B). En cultivo de células madre de bulbo olfatorio (CMBO) de ratones nulos para IGF-I de E14,5, también se observa un claro fenotipo por la ausencia del factor, puesto que existe un descenso en el número total de células diferenciadas a los tres linajes neurales, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Vicario-Abejón y cols., 2003; Pichel y cols., 2003) (Fig. 2A).

Por lo tanto, los factores de crecimiento FGF e IGF-I intervienen en el desarrollo *in vivo* del BO. En cultivo, las CMBO proliferan hasta formar neuroesferas en presencia de FGF-2 y EGF y su efecto es sinérgico con insulina o IGF-I. En ausencia de los factores mitogénicos, estas células se diferencian a los tres linajes neurales (Fig. 2A) (Vicario-Abejón y cols., 2003).

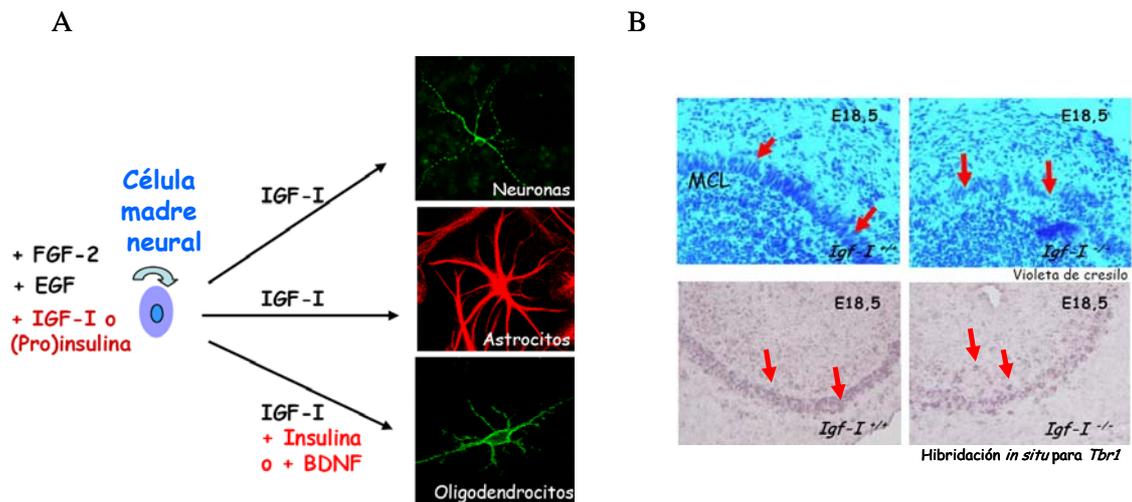


Fig 2. Efectos de IGF-I sobre el desarrollo del bulbo olfatorio embrionario. (A) Las células madre de bulbo olfatorio proliferan en cultivo en presencia de los factores mitogénicos EGF, FGF-2 e IGF-I (o insulina/proinsulina). El IGF-I promueve la diferenciación de CMBO a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Además, la insulina y el BDNF colaboran con el IGF-I en la diferenciación de este último tipo celular. (B) El bulbo olfatorio de ratones E18,5 mutantes nulos para el IGF-I, presenta una menor cantidad de células mitrales, y su capa, MCL, presenta una clara desorganización (indicado con flechas) en la laminación. Las fotos superiores son tinciones de violeta de cresilo, y las inferiores hibridaciones *in situ*, para el factor de transcripción Tbr1. Los datos originales proceden de Vicario-Abejón y cols., (2003) y Pichel y cols., (2003).

Durante el desarrollo postnatal y adulto, las moléculas que regulan la neurogénesis en la zona subventricular y la migración de neuroblastos a través de la corriente migratoria rostral también influyen en la llegada de nuevas neuronas al BO. Entre ellas destacan PSA-NCAM (Cremer y cols., 1994), tenascina (Saghatelian y cols., 2004) y doblecortina (Koizumi y cols., 2006).

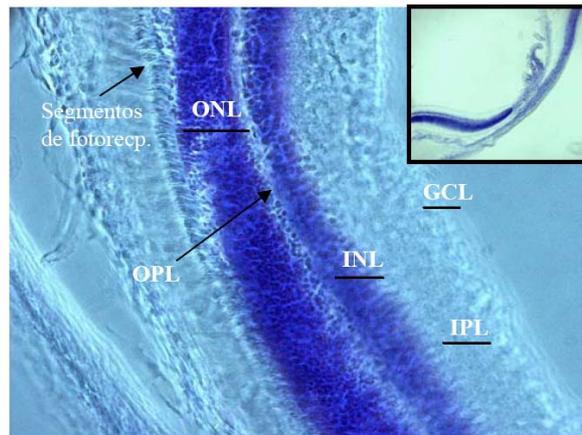
3. Desarrollo embrionario de la retina

3.1 Introducción

El sistema nervioso de vertebrados se induce durante la neurulación, como resultado de la interacción entre el mesodermo axial subyacente y el ectodermo dorsal. Se genera así el neuroectodermo, que inicialmente forma la placa neural y posteriormente, al plegarse sobre sí mismo, el tubo neural. Según avanza su desarrollo, este tubo es capaz de generar las estructuras del telencéfalo y el diencefalo en la zona anterior. A partir del prosómero 6, se generan las vesículas ópticas que al contactar con

el ectodermo, se invaginan y adquieren la forma de una copa óptica de doble capa. Las células de la capa externa formarán el epitelio pigmentario y las de la capa interna formarán la retina neural (Saha y cols., 1992; Gilbert, 2006). Así pues, la retina neural es parte del SNC.

A



B

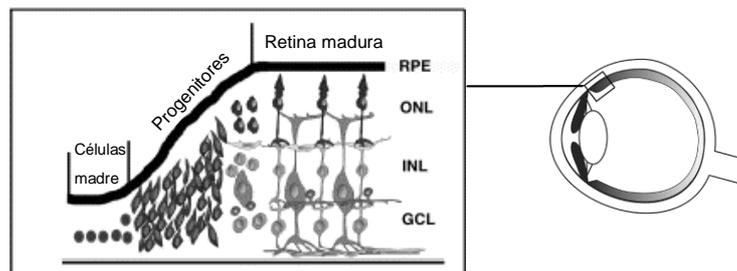


Fig 3. Estructura de la retina de vertebrados. La retina de vertebrados presenta una estructura laminar característica formada por segmentos diferenciados entre sí por su composición celular. En la figura A, se muestran las distintas capas de una retina de ratón adulta teñida con violeta de cresilo. (B) Desde la parte más dorsal de la retina neural, junto al epitelio pigmentario (RPE), se ordenan las capas nuclear externa (ONL), donde se sitúan los núcleos de los fotorreceptores, la capa nuclear interna (INL), donde se ordenan las células amacrinas, bipolares y horizontales y la capa de células ganglionares (GCL) compuesta por neuronas ganglionares y amacrinas invertidas. Intercaladas entre las capas se sitúan las únicas células de origen no neuronal, la glía de Müller. Entre las neuronas se establecen las conexiones sinápticas en las capas plexiformes externa (sinapsis entre células fotorreceptoras y bipolares) e interna (sinapsis entre bipolares y células ganglionares). Figura B, obtenida y modificada de Hitchcock y cols. (2004).

La retina de vertebrados es un modelo bien caracterizado para el estudio de la neurogénesis por su fácil accesibilidad y por poseer una estructura laminar típica (Fig. 3). En la parte más externa, unido al pigmentario, esta la ONL (capa nuclear externa), compuesta por los fotorreceptores: bastones y conos. La siguiente capa nuclear es la INL (capa nuclear interna) que está formada por las neuronas amacrinas, bipolares y

horizontales, responsables de modular y transmitir la señal de fotorreceptores y ganglionares. Y, finalmente, en el lado vitreal de la retina está la capa GCL (capa de células ganglionares), compuesta por neuronas ganglionares y amacrinas invertidas (Masland, 2001). Los axones que emiten las células ganglionares forman el nervio óptico, que conecta las células de la retina con la corteza cerebral (Rager, 1980). Inmersa entre estas tres capas está la única célula de origen no-neuronal de la retina, la glía de Müller. Cada uno de estos segmentos está unido por capas plexiformes, que las componen los axones y dendritas de cada tipo celular. En el extremo de la retina convergen la retina neural y el epitelio pigmentario, formándose el margen ciliar, descrito como neuroepitelio en retina adulta de algunas especies (Ahmad y cols., 2004; Abdouh y Bernier, 2006).

Desde las primeras etapas del desarrollo de la retina, las células neuroepiteliales proliferativas próximas al centro de la retina, abandonan secuencialmente el ciclo celular y generan los distintos tipos neuronales siguiendo un gradiente dorso-ventral y central-periférico (Prada y cols., 1991). En vertebrados, y en concreto en ratón, modelo de neurogénesis de esta tesis, el desarrollo de la retina comienza con la proliferación de células progenitoras el día E10 y finaliza ocho días después del parto, aunque su maduración total no se alcanza hasta el día P20. Durante este periodo, se dan procesos de proliferación de células progenitoras, diferenciación, migración y apoptosis, que conducen a la formación de seis tipos celulares, que se conservan a lo largo de la edad adulta. La generación de células de la retina ocurre en dos oleadas, a partir de progenitores tempranos, que al salir del ciclo celular dan origen a las células ganglionares, horizontales, conos e incluso amacrinas, entre los días E10 y E16, y de progenitores tardíos que producen la glía de Müller, bastones y células bipolares durante los días E18 y P6. Por tanto, la salida del ciclo celular parece estar ligada a la especificación del destino celular (Masland, 2001; Maquardt y cols., 2002; James y cols., 2003). Los precursores multipotentes van restringiendo su potencialidad progresivamente a lo largo de la neurogénesis y se genera así heterogeneidad entre la población de precursores, lo que constituye un primer paso para la complejidad que presentará el tejido adulto (Ahmad y cols., 2004).

3.2 Células madre y progenitoras en la retina

En la retina embrionaria temprana no se ha hallado ninguna célula con capacidad de autorrenovación o formación de neuroesferas (Tropepe y cols., 2000). En cambio, en la retina embrionaria tardía, entre las edades de E17 y E19, hay células progenitoras con capacidad de proliferación en cultivo y de diferenciación a algunos tipos neurales. A pesar de que estas células sean multipotentes, ya que pueden diferenciarse incluso a oligodendrocitos en cultivo, no se las puede considerar células madre puesto que exhiben una escasa capacidad de autorrenovación (Sinor y Lillien, 1992; Ahmad y cols., 1999; Akagi y cols., 2003; James y cols., 2003).

Los estudios *in vitro* del margen ciliar de la retina adulta han demostrado la existencia de células con capacidad de autorrenovación y diferenciación a los distintos tipos de neuronas de la retina e incluso a oligodendrocitos. Dependiendo de la especie, estas células proliferan en cultivo sin necesidad de ningún factor exógeno, o con la ayuda de insulina, FGF-2 o heparina. Bajo estas condiciones, estos cultivos expresan los marcadores de progenitores de retina Pax6 y Chx10. En el resto del tejido, incluyendo la retina neural, no se han encontrado ninguna de estas células (Tropepe y cols., 2000; Ahmad y cols., 2000; Fischer y cols., 2002a; Hitchcock y cols., 2004).

Las células progenitoras del margen ciliar pueden actuar como células madre reminiscentes, con capacidad de regeneración, puesto que proliferan en respuesta a daño celular de la retina (Moshiri y cols., 2004). Además, en edad adulta y embrionaria su mantenimiento está muy regulado, puesto que la pérdida de células progenitoras de retina en el caso de la ausencia del gen homobox Chx10, provoca el aumento de la población de células madre, como forma de compensación (Coles y cols., 2006)

La glía de Müller es la única célula de origen no neuronal de la retina, con capacidad de reentrar en ciclo y diferenciarse a neuronas de la retina. Esta célula se activa en respuesta al daño celular por toxicidad. Desde el inicio de la proliferación hasta su destino final, la célula de Müller pasa por fases de quiescencia primero, proliferación después y finalmente diferenciación, expresando los marcadores de GFAP, Chx10 y TuJ-1 respectivamente (Dyer y Cepko, 2000; Fischer y Reh, 2001).

A pesar de que, bajo ciertas circunstancias, a partir de la glía de Müller se obtengan los seis tipos neurales de la retina, no se le puede considerar célula madre, puesto que siempre permanece diferenciada, y para activarse requiere de una dediferenciación y una entrada al ciclo celular. A pesar de ello, este tipo de células pueden ser un herramienta muy útil en el estudio de los mecanismos de regeneración de retina adulta (Fischer y Reh, 2003).

En conjunto, en la retina existen células que dependen de la activación de diferentes factores para potenciar su carácter progenitor. Células con características de células madre o troncales se han descrito en tejido adulto, pero hasta ahora no se han encontrado en retina embrionaria temprana. Por esta razón, nuestro interés se ha centrado en buscar la combinación adecuada de factores y proteínas extracelulares, que fuera capaz de estimular la capacidad proliferativa y diferenciadora de células de la retina embrionaria en cultivo, y compararlas con las células madre de BO descritas previamente en el laboratorio.

3.3 Regulación del número y la diferenciación de células madre y progenitores de retina

El mantenimiento del carácter troncal de una célula durante el desarrollo depende de su microambiente, puesto que en él están los factores que regulan su proliferación o su salida de ciclo celular para iniciar la diferenciación a los diferentes tipos neurales. Se han descrito muchos factores solubles y de la matriz extracelular que podrían inhibir o estimular el desarrollo de células progenitoras de retina. Los más destacados son, EGF, FGF-2, NT3, insulina, IGF-I, Shh, Delta-Notch, SF-c-Kit, laminina, Wnt, Int-2, TGF α y β , etc (Ahmad y cols., 2004).

Los factores más comunes son el EGF, su homólogo el TGF α y el FGF, cuyos receptores tirosina quinasa son especialmente numerosos en la región dorsal de retina. *In vitro* e incluso *in vivo* estos factores promueven la proliferación y la autorrenovación de algunas células madre y de las células progenitoras de retina adulta y embrionaria tardía, E18 (Anchan y cols., 1991; Lillien y Cepko, 1992; Ahmad y cols., 1999; Akagi 2003; James y cols., 2003). De nuevo, la insulina y el IGF-I, son básicos también en la

formación de la retina. La retina de pollo embrionario sintetiza la proinsulina e el IGF-I, además de expresar sus receptores, que colaboran durante el desarrollo para favorecer su crecimiento. La presencia de insulina favorece la proliferación y supervivencia de progenitores retinianos. (Hernandez-Sanchez y cols., 1995; Díaz y cols., 2000; Fischer y cols., 2002a y 2002b; Reiter y cols., 2003; Abdouh y Bernier., 2006). También se han definido sinergias con otros factores de crecimiento. Por ejemplo, la insulina junto con FGF promueve el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de la glía de Müller (Fischer y Reh, 2002b). La inyección de estos factores en la retina adulta provoca la activación de la glía de Müller en ausencia de daño tóxico alguno. Además esta respuesta es específica de la glía, puesto que no reacciona ningún otro progenitor, ni siquiera del margen ciliar (Fischer y cols., 2002b; Fischer y cols., 2003).

El NT3 es otro factor de crecimiento que mediante su receptor Trk C favorece el mantenimiento de los neuroblastos de la retina. Su expresión endógena solapa con los periodos de proliferación e inicio de la diferenciación de la retina embrionaria. Además, se ha demostrado que, *in vitro* promueve la supervivencia y diferenciación celular (De la Rosa y cols., 1994; Das y cols., 2000). El TGF β , en cambio, promueve la apoptosis y aumenta la expresión de p27, inhibiendo la reentrada en el ciclo celular propia de la glía de Müller (Dunker y cols., 2001 y 2003; Close y cols., 2005).

Uno de los mecanismos de regulación de la neurogénesis de la retina más conservado entre especies de vertebrados e invertebrados es el de Delta-Notch. Mediante este mecanismo de señalización, basado en la inhibición lateral, el SNC asegura el mantenimiento de un grupo mínimo de células progenitoras. Notch es un receptor de membrana que cuando entra en contacto con su ligando, principalmente la proteína transmembrana Delta, separa la porción intracelular mediante la acción de la proteína presenilina o γ -secretasa. Este fragmento se transloca al núcleo y actúa como cofactor de transcripción, inhibiendo la expresión de genes que favorecen la diferenciación neuronal (bHLH) y la salida del ciclo celular (Marquardt y Gruss, 2002; Ahmad y cols., 2004; Lai y cols., 2004). La sobreexpresión de Notch en células progenitoras provoca una disminución de la diferenciación a neuronas y astrocitos. En cambio, en su ausencia, el ratón es inviable puesto que no se forman células progenitoras neurales (Hitoshi y cols., 2002). Si se generan ratones mutantes

condicionales de retina nulos para Notch, la población afectada es la de los progenitores de fotorreceptores (Jadhav y cols., 2006; Yaron y cols., 2006). Por lo tanto, Notch favorece la proliferación en la célula que lo porta, mientras que la expresión de Delta correlaciona con la salida de ciclo celular y la consecuente diferenciación. De esta forma, durante el desarrollo, el sistema queda equilibrado respecto a la cantidad de neuronas y progenitores (Henrique y cols., 1997).

Shh es importante en los estadios iniciales del desarrollo de la retina, puesto que interviene en la formación de la copa óptica y favorece la identidad del epitelio pigmentario y la retina neural (Stenkamp y cols., 2000). Su acción favorece la proliferación de células progenitoras, mediante la activación de los receptores Patched y Smoothened, que inducen la modulación de ciclinas. Estas proteínas están muy expresadas en el margen ciliar de la retina de *Xenopus*, lo que sugiere que las células madre de retina son sensibles a la actividad de Shh (Ahmad y cols. 2004). La unión entre Wnt-Frizzled es otra de las piezas clave del desarrollo y la neurogénesis, puesto que activa el ciclo celular en G1 regulando c-myc (Baek y cols., 2003).

Las proteínas solubles o de membrana no son las únicas que determinan el destino final de las células del SNC (Alvarez-Buylla y Lim, 2004). La matriz extracelular y sus componentes tienen también influencia sobre el desarrollo de la retina. Se sabe que la eliminación de la matriz mediante colagenasa inhibe la proliferación de células de retina *in vitro*, lo que sugiere que la retina es sensible a su presencia durante el desarrollo (Reh y cols., 1988). Uno de los receptores a los que se unen los componentes de la matriz es la integrina $\beta 1$ (Hynes 2002). El grupo de Blaess generó mutantes condicionales en SNC para este receptor, y vieron que se alteraba el tamaño, la citoarquitectura y disminuía la incorporación de BrdU, mientras que no se apreciaban diferencias en la apoptosis. Uno de los ligandos más comunes de la $\beta 1$ -integrina es la laminina, que al unirse con el Shh es capaz de generar proliferación en células progenitoras de cerebelo (Blaess y cols., 2004). Esta proteína también promueve la supervivencia y la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos y de otras células neuroepiteliales (Drago y cols., 1991; Colognato y cols., 2002).

4. Expresión y acción del IGF-I en el sistema nervioso central

Los factores de crecimiento insulina e IGF-I, así como sus receptores, se expresan en CME de ratón (Shi y cols., 1995), y en muchas regiones del cerebro de mamíferos durante el desarrollo embrionario temprano (García-Segura y cols., 1991; Varela-Nieto y cols., 2003). Estas regiones incluyen retina, bulbo olfatorio, zona subventricular, cerebelo e hipocampo (De Pablo y de la Rosa, 1995). El mRNA de la insulina se expresa en la retina de pollo durante la fase proliferativa, mientras que la expresión de mRNA del IGF-I es más prominente durante la fase de diferenciación (Díaz y cols., 2000). La expresión de la insulina, que se mantiene como su precursora proinsulina, es detectable durante estadios tempranos del desarrollo (Hernández-Sánchez y cols., 1995; Hernández-Sánchez y cols., 2006). Esta expresión sugiere un papel complementario de estos factores durante el desarrollo neural. Así, la insulina y el IGF-I previenen la muerte celular programada de células neuroepiteliales de retina y neuroblastos recién salidos de ciclo (de la Rosa y De Pablo, 2000; Ye y D'Ercole, 2006) y tienen un importante papel en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células madre neurales (Vicario-Abejón y cols., 2003; Aberg y cols., 2003; Ye y D'Ercole, 2006; en esta tesis) (ver apartado 4.2). El IGF-I regula otros procesos implicados en la diferenciación y maduración neuronal y glial, como el crecimiento de las dendritas, la formación de sinapsis y la mielinización (Varela-Nieto y cols., 2003; Bondy y Cheng, 2004).

4.1 Vías de señalización del IGF-I

El IGF-I es un factor de crecimiento de 70 aminoácidos que comparte homología en su secuencia con el resto de los miembros de la familia de la insulina, como el IGF-II, la proinsulina y la insulina. El efecto biológico de estos factores se desencadena por su unión específica a la subunidad extracelular α de dos receptores tirosina-quinasa, el receptor de insulina (INSR) y el receptor de IGF-I (IGF-IR). La especificidad entre este tipo de receptores y sus ligandos varía en función de las concentraciones de estos últimos, puesto que cuando estas son bajas, IGF-I e insulina se unen a sus respectivos receptores. En cambio, cuando son altas pueden unirse a los receptores heterólogos. Estos receptores son glicoproteínas transmembrana heterotetraméricas, compuestos de

dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro. También existen receptores híbridos formados por una hemimolécula del receptor de insulina y otra del receptor de IGF-I, que poseen afinidades variables por los factores de la familia de la insulina (De Pablo y de la Rosa, 1995; García-de Lacoba, 1999).

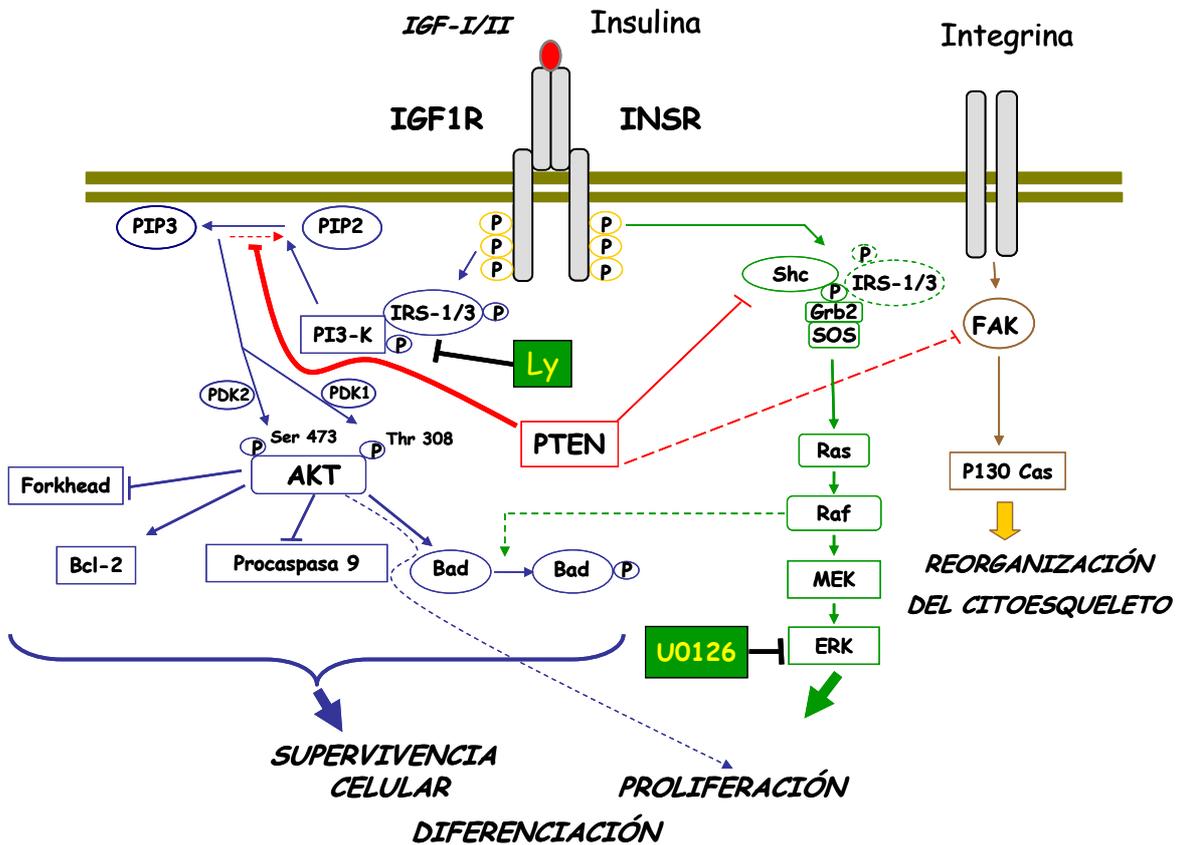


Fig. 4. Rutas bioquímicas de señalización activadas por IGF-I. La activación de los receptores tirosina-quinasa provoca la fosforilación de distintos sustratos como los IRSs y Shc en los residuos de tirosina, que reclutan proteínas con dominios SH2 como PI3-K o Grb2. Así, se activan distintas enzimas que transmiten la señalización de IGF-I e insulina. Las principales vías de señalización son la de MAPK que interviene principalmente en proliferación y diferenciación celular y la de AKT (PKB) implicada tradicionalmente en supervivencia. Estas vías no son independientes y pueden interactuar a distintos niveles. Además, están muy reguladas en distintos puntos. La fosfatasa PTEN, inhibe la actividad de PI3K desfosforilando PIP3 *in vivo* y la actividad de Shc, modulando la ruta de MAPK y la actividad de FAK, alterando la migración celular, *in vitro*. Los inhibidores químicos LY294002 y U0126 inhiben PI3K y MAPK respectivamente.

La unión entre el IGF-I y su receptor desencadena la autofosforilación de los residuos tirosina de la subunidad intracelular beta del receptor (Fig. 4). A partir de esa fosforilación, pueden estimularse, según el tipo celular, la ruta de PI3K (fosfatidilinositol-3 quinasa)/AKT o la de MAPK. La autofosforilación del receptor provoca la activación de los sustratos intracelulares IRSs y Shc. Estas pueden activar a

su vez una u otra ruta mediante la unión a los dominios SH2 de PI3K o Grb-2. Se han descrito hasta 6 tipos de IRSs capaces de transmitir las señales de diferentes factores de crecimiento. Los más ligados a la señalización por IGF-I e insulina en el sistema nervioso son los IRS1 y 2 (Zheng y Quirion, 2004b; Schubert y cols., 2003). Estos se pueden unir al complejo generado por Grb2 y, mediante la proteína Ras, activar la fosforilación de las MAPK. En algunos tipos celulares, es la proteína Shc quien traslada la fosforilación del receptor de IGF-I a la ruta de las MAPK, sin que medie ningún IRS (Wu y cols., 2004). Frecuentemente, los efectos biológicos de la activación de las MAPK son estimulantes de la proliferación y de la diferenciación, aunque esto depende del sistema celular.

Los IRSs también tienen la capacidad de unirse y activar a PI3K. Esta unión se da siempre a través del dominio SH2 de la subunidad reguladora de PI3K. Esta subunidad puede presentar siete isoformas, p85 α , p85 β , p50 α , p55 γ , p55 α , p101 y p84. Para asegurar la plena actividad de esta quinasa, las regiones reguladoras se han de unir a la catalítica, que también presentan diferentes isoformas, p110 α , p110 β y p110 γ . Estas combinaciones entre las dos subunidades permiten inducir múltiples tipos de respuestas a partir de una sola señal. Una de las peculiaridades de PI3K es que, gracias a su región de unión a fosfolípidos, puede donar un grupo fosfato a PIP2 [fosfatidil (4,5) 2 fosfato] transformándolo en PIP3 [fosfatidil (3,4,5) 3 fosfato]. Este proceso está controlado por las lipofosofatasas PTEN y SHIP, que pueden revertir la fosforilación, anulándose la activación de esta ruta (Fig. 4) (García y cols., 2006; Taniguchi y cols., 2006).

Tras la actividad de PI3K, PIP3 se convierte en el donante de los grupos fosfato de AKT. Esta proteína es la piedra angular de muchos procesos celulares que ocurren en diferentes tejidos en condiciones fisiológicas. Además, su regulación es vital para evitar trastornos como el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas. AKT (o PKB) es una serin-treonin quinasa compuesta por tres regiones: el dominio plectrina (PH) de unión a fosfolípidos, la región catalítica y la región reguladora en el extremo C-terminal. Al igual que ocurre en IRS o en PI3K, AKT presenta tres isoformas, AKT1, AKT2 y AKT3, con una homología entre ellas del 80%. Las tres se regulan de la misma forma y se diferencian, sobre todo, en su distribución. AKT1 es la más ubicua, puesto que se expresa en todos los tejidos. AKT2, en cambio, parece ser más común en aquellos

órganos que regulan la homeostasis de la glucosa. Y AKT3 se expresa muy poco, salvo en testículos, hígado, músculo y cerebro adulto, y en corazón fetal (Peng y cols., 2003; Tschopp y cols., 2005). Todos ellos se regulan a través de la fosforilación del residuo Serina 473, 474 ó 472 en la región reguladora y del residuo de treonina 308, 309 ó 372 en la catalítica, para AKT1, 2 y 3 respectivamente (Brodbeck y cols., 1999). Estas fosforilaciones se hacen a través de dos diferentes serin-treonin quinasas con capacidad de unión a fosfolípidos a través del dominio PH. La primera que se describió fue la PDK1, que fosforila los residuos de treonina de las tres AKT. Esta quinasa de la familia AGC se une a PIP3 y facilita su unión a AKT mediante el dominio PH. Esto provoca un cambio conformacional de la proteína, de forma que el residuo de treonina queda accesible para ser fosforilado por PDK1 (Song y cols., 2005).

Los estudios sobre la segunda quinasa (denominada en la figura 4 PDK2) que fosforila el residuo regulador Serina, siguen sin ser concluyentes, puesto que no determinan con claridad cual de las muchas descritas es la realmente determinante. Las candidatas mas citadas han sido ILK, cuya inhibición disminuye los niveles de serina fosforilada, la propia AKT mediante autofosforilación, ya que su sobreexpresión aumenta la probabilidad de fosforilación de serina, y mTOR (Hill y cols., 2001). Esta última presenta cierta complejidad puesto que su activación depende de AKT y a su vez la activación de AKT serina podría depender de la formación del complejo mTOR:RICTOR (Sarbasov y cols., 2005; Hresko y Mueckler, 2005); de esta forma, la señal iniciada por IGF-I se podría amplificar en un solo paso. Existe también una regulación negativa de AKT, que conlleva defosforilación de treonina y serina, mediadas por diferentes proteínas de forma directa o indirecta: PTEN, PHLPP, MAPK, p38, p21, etc. (Alessi y cols., 2005).

En algunas especies se ha descrito un procesamiento alternativo para AKT1 y 3 que genera una proteína truncada sin la región reguladora. Estas proteínas son funcionales y sólo requieren de la actividad de PDK1 para fosforilar treonina. Esto significa que la fosforilación en el residuo regulador de serina es importante, aunque no vital para la actividad de AKT (Brodbeck y cols., 2001; Song y cols., 2005). En cambio, cuando se generan proteínas mutantes para treonina, AKT pierde toda su actividad, a pesar de la fosforilación de serina (Brodbeck y cols., 1999 y 2001).

A pesar de ser PI3K la enzima que dona el grupo fosfato para fosforilar AKT en la mayoría de los casos, se han descrito otros efectores como AMP cíclico, forskolina y prostaglandina, capaces de activar esta ruta de forma independiente a PI3K. Además, AKT también puede ser fosforilada en sus residuos de tirosina, lo que en algunos sistemas es vital para su actividad quinasa (Song y cols., 2005).

Una vez activada, AKT regula diferentes proteínas que conllevan en su mayoría el aumento de la supervivencia, la proliferación y la diferenciación. Una de ellas es Bad, que al ser fosforilada se separa del complejo proapoptótico compuesto por Bad:Bcl2. También activa mTOR, que mediante Sek1 y 4EBP1 facilita la traducción de proteínas y la translocación de mRNA al citoplasma respectivamente (Peng y cols., 2003). Otros sustratos son la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), los factores de transcripción FOXO, la caspasa 9, NF- κ B, etc. (Brazil y cols., 2004; Song y cols., 2005; Taniguchi y cols., 2006).

En conjunto, las rutas de señalización inducidas por IGF-I presentan varias combinaciones que permiten diversificar diferentes respuestas celulares, incluso empleando la misma ruta (Taniguchi y cols., 2006).

4.2 Efectos biológicos del IGF-I

La forma más efectiva de conocer la función de cada una de las proteínas intermediarias de la ruta de señales inducidas por el IGF-I, es crear mutantes nulos o mutantes condicionales. La generación del primer ratón nulo para el IGF-I demostró la importancia de este factor para el crecimiento embrionario, puesto que los ratones nacen con un tamaño 40% inferior al normal y, además, la viabilidad postnatal de estos individuos varía entre el 5 y el 20%. La mortalidad es alta al nacer por dificultades respiratorias, puesto que desarrollan una deficiencia muscular y pulmonar. Los que sobreviven tienen disminuido el crecimiento del cerebro (Liu y cols., 1993; D'Ercole y cols., 2002; Pichel y cols., 2003; Bondy y Cheng, 2004; Russo y cols., 2005). Además, tal y como hemos comentado en el apartado 2, se ve afectada la migración y la diferenciación neuronal, puesto que en el bulbo olfatorio la capa de células mitrales está

seriamente distorsionada (Vicario-Abejón y cols., 2003). El efecto del IGF-I en el SNC es también llamativo en ratones que lo sobreexpresan, ya que tienen un cerebro 25-40% mayor de lo normal. Este aumento se debe a una reducción de la muerte celular y a una mayor proliferación (D'Ercole y cols., 2002; Popken y cols., 2004). Los cambios en la proliferación producidos por IGF-I se deben a su control sobre el ciclo celular, puesto que favorece la reentrada en el ciclo celular de neuroblastos, cuando estos aumentan de tamaño, y su transición a través de la fase G1 (Hodge y cols., 2004; Ye y D'Ercole, 2006). *In vitro*, el efecto del IGF-I presenta diferentes fenotipos dependiendo del origen celular. En general, estimula la proliferación e inhibe la apoptosis (Arsenijevic y cols., 2001; Digicaylioglu y cols., 2004), aunque se ha descrito su importante función durante la diferenciación de CMBO (Vicario-Abejón y cols., 2003). A diferencia de lo que ocurre con las CMBO, en células madre de hipocampo adulto este factor inhibe la diferenciación a neuronas y favorece únicamente la diferenciación a oligodendrocitos a través de la inhibición de BMP2. Sin embargo, al igual que en CMBO, en células embrionarias de hipocampo y en los neuroblastos de la zona subventricular adulta, el IGF-I estimula la diferenciación a neuronas y glía (Brooker y cols., 2000; Aberg y cols., 2003; Hsieh y cols., 2004). Además, existe una alteración en la diferenciación a neuronas en el cerebro de individuos mutantes nulos para IGF-I (Pichel y cols., 2003; Vicario-Abejón y cols., 2003). Por otro lado, los ratones nulos para el receptor de insulina son viables al nacimiento, aunque por deficiencias en el metabolismo mueren poco después por cetoacidosis diabética. Estos individuos no tienen aparente retraso en el desarrollo del crecimiento cerebral y presentan una reducción leve (10-15%) del tamaño corporal (Kitamura y cols., 2003).

Los sustratos del receptor de insulina, IRSs, también son fundamentales en el desarrollo del SNC. Los ratones que carecen de IRS2 tienen un cerebro reducido a la mitad, aunque no hay cambios ni en la citoarquitectura ni en la morfología celular. Además, desarrollan ceguera a las pocas semanas del parto puesto que acaban muriendo todos los fotorreceptores (Schubert y cols., 2003; Yi y cols. 2005).

Otros ratones mutantes nulos, como el de PDK1 y el de PI3K, son letales embrionarios; mueren antes del día diez de gestación con graves deficiencias en la formación del cerebro. Por esta razón, y para poder estudiar el efecto de PI3K en el

desarrollo del SNC, se han estudiado ratones transgénicos que sobreexpresan diferentes subunidades reguladoras o catalíticas. En todos ellos se vio que PI3K regula principalmente la supervivencia y la proliferación a través del control del paso de G1 a S, mediante la regulación de la ciclina D (Bi y cols., 1999; Lawlor y cols., 2002; Pimentel y cols., 2002; Zheng y Quirion 2004b; García y cols., 2006).

Al igual que otros componentes de esta ruta, AKT es fundamental en el desarrollo del cerebro y de los neuroblastos en particular. La sobreexpresión de AKT1 en las células madre de corteza embrionaria provoca un aumento en la autorrenovación, la supervivencia y la proliferación. En cambio, no se ve afectada la diferenciación a neuronas ni a astrocitos, mientras que el número de precursores de oligodendrocitos aumenta significativamente (Sinor y Lillien, 2004). Otros estudios han relacionado AKT con la maduración neuronal, puesto que regula la arborización y la morfología dendrítica (Jaworski y cols., 2005; Kumar y cols., 2005). *In vivo*, hasta el momento no se ha publicado ningún estudio con un fenotipo neural llamativo en ratones nulos para AKT1 o AKT2, o incluso para el doble nulo AKT1/2. En cambio, sí que desarrollan cambios en su tamaño corporal, en el desarrollo muscular y óseo, y en la homeostasis de la glucosa (Cho y cols., 2001; Peng y cols., 2003). El único fenotipo neural publicado hasta el momento relacionado con AKT es el descrito en los ratones nulos para AKT3. Estos tienen un tamaño cerebral reducido, debido a un ligero aumento de la apoptosis, sin que se alteren las capas celulares. Estas células de cerebro se diferencian normalmente en cultivo (Tschopp y cols., 2005; Easton y cols., 2005).

Nuestro interés en este trabajo, es estudiar las rutas bioquímicas de señalización activadas por IGF-I durante las fases de proliferación y diferenciación de CMN. Además, se analiza el efecto de IGF-I sobre la ruta de PI3K/AKT en el BO *in vivo*.

5. La fosfatasa PTEN durante el desarrollo del SNC

En las últimas décadas, la mutación del gen supresor de tumores PTEN, también conocido como MMAC1 y TEP1, ha adquirido cierta relevancia debido a que es la responsable del inicio de decenas de tumores y de la aparición de los síndromes de Cowden, Lhermitte-Duclos y Bannayan-Zonana, enfermedades autosómicas cuya

característica común es el desarrollo de tumores tiroideos y mamarios en la edad adulta (Stiles y cols, 2004).

PTEN es una proteína lipofosfatasa de la familia tirosin fosfatasa (PTP). El gen está situado en el cromosoma 10 (10q23) y comparte homología en la secuencia catalítica con las proteínas tensina y auxilina. Los 403 aminoácidos de esta proteína están estructurados fundamentalmente en tres dominios: el dominio fosfatasa en el extremo N-terminal, que en su región activa (CxR5) comparte homología con la familia PTP, el dominio regulador C2 y el dominio de unión a proteína PDZ en el extremo C-terminal. Mientras que la región fosfatasa está muy conservada en diferentes especies, lo que implica su importancia funcional, el dominio regulador C2 es tan variable en su secuencia que incluso está ausente en algunas especies (Maehama y cols., 2001).

PTEN es la principal lipofosfatasa que actúa *in vivo* defosforilando el PIP3, inhibiendo así la ruta de PI3K (Fig. 4) (Maehama y cols., 2001; Li y cols., 2003b). Además, *in vitro*, presenta actividad proteinfosfatasa, con capacidad de defosforilar residuos de serina, treonina y tirosina de proteínas como FAK (del inglés *Kinasa de Adhesión Focal*), implicada en migración celular, y Shc/IRSs o Ras, presentes en la vía de señalización de MAPK (Gu y cols., 1999; Weng y cols.; 2001 Waite y Eng, 2002). Por lo tanto, PTEN puede asumir diferentes funciones dependiendo del sustrato que defosforile.

Una de las funciones más estudiadas de esta proteína es la inhibición de la supervivencia a través de la defosforilación de PIP3. Esto genera una reducción en la actividad de AKT y, en consecuencia, una desregulación de proteínas moduladoras, como GSK3, BAD/BCL2 y p70, que desencadenan procesos de muerte celular. A través de esta misma vía PTEN inhibe, mediante p27 o Rb, la actividad de diferentes ciclinas, reteniendo las células en la fase G0-G1 del ciclo celular. La mutación en la actividad de esta proteína conlleva una proliferación descontrolada que finalmente provoca la aparición de tumores invasivos (Maehama y cols., 2001; Rossi y Weissman, 2006; Groszer y cols., 2006).

No se conoce mucho acerca de la regulación de la expresión y de la actividad de PTEN, aunque en algunas ocasiones se ha descrito como una fosfatasa constitutivamente activada (Maehama y cols., 2001; Leslie y Downes, 2002). Se sabe también que en queratinocitos y en páncreas, TGF β inhibe la expresión de PTEN (Stiles y cols, 2004) y, a su vez, AKT puede reducir los niveles de TGF β a través de la fosforilación de SMAD3. De esta forma, se autorregula la actividad de la lipofosfatasa. Otra forma de regulación es la basada en la actividad reductora de thioredoxina-1 (Trx-1), puesto que, en células NIH3T3 es capaz de activar PTEN reduciendo el grupo sulfídrico de la cisteína 212 en el dominio C2 (Meuillet y cols, 2004). Esta última región se ha definido en diversas ocasiones como la reguladora, puesto que la fosforilación en algunos de sus residuos provoca un cambio conformacional, dificultando el acceso de los sustratos a la zona catalítica. Se cree que PTEN es quien provoca su propia fosforilación, o bien de forma directa o bien a través de una quinasa intermediaria (Raftopoulou y cols, 2004). El sustrato de PTEN, PIP3, también puede regular la actividad lipofosfatasa, dado que en altas concentraciones activa una quinasa desconocida (que podría ser AKT), que fosforila PTEN y genera su degradación (Birle y cols, 2002). Recientemente se ha descrito que el NGF fosforila PTEN produciendo una reducción de su actividad (Arévalo y Rodríguez-Tebar, 2006).

Actualmente, se está estudiando el papel de PTEN durante el desarrollo neural, sugerido por su patrón de expresión en el SNC embrionario, así como por desórdenes neurológicos asociados con mutaciones de PTEN (Marsh y cols., 1997; Backman y cols., 2001; Kwon y cols., 2001). En ratones adultos, PTEN se expresa en la mayoría de las neuronas, tanto en el citoplasma como en el núcleo. En el bulbo olfatorio de adultos, las células con mayor expresión de PTEN son las neuronas mitrales, mientras que las periglomerulares y granulares presentan niveles de expresión más bajos (Lachyankar y cols., 2000). Por otro lado, no se detecta expresión de PTEN en procesos neuronales y células gliales maduras (Li y cols., 2003b).

Los ratones carentes de PTEN presentan letalidad embrionaria, acompañada de un aumento del crecimiento cefálico (Di Cristofano y cols., 1998, Marino y cols., 2002). Para estudiar el efecto de la ausencia de PTEN sobre precursores neurales se han utilizado ratones heterocigotos para este gen (Li y cols., 2002 y 2003a), y ratones

carentes de PTEN específicos para un determinado tejido o tipo celular (Groszer y cols., 2001 y 2005; Marino y cols., 2002; Li y cols., 2003b; Fraser y cols., 2004; Yue y cols., 2005; Kwon y cols., 2006). La pérdida de una copia del gen *pten* origina una reducción intracelular del 25% de esta proteína. Este descenso es suficiente para generar una desregulación de hasta 91 genes, la mayoría de ellos relacionados con la migración neuronal (por ejemplo, Doblecortina, DCX) (Li y cols., 2003a). Esto justifica que los neuroblastos nulos para PTEN de la zona subventricular tengan una mayor capacidad de migración e invasión. Además, estas células proliferan mucho más y presentan una mayor resistencia a apoptosis, debido a que tienen mayores niveles de P-AKT. En estudios *in vivo*, se observa un aumento en la migración de precursores procedentes de la zona subventricular del ratón heterocigoto para el gen *pten* hacia el bulbo olfatorio, aunque este presenta una estructura y tamaño normales (Li y cols., 2002).

Debido a la imposibilidad de estudiar el desarrollo neural de individuos embrionarios o adultos mutantes nulos para PTEN, el grupo de Groszner desarrolló ratones mutantes condicionales para esta proteína en progenitores neurales bajo el control del promotor de nestina (Groszner y cols., 2001). Gracias a estos estudios sabemos que en cultivo, las neuroesferas generadas por estos progenitores mutantes son más grandes y presentan una mayor tasa de autorrenovación, probablemente por una reducción de la duración del ciclo celular. Por estudios de expresión génica, se sabe que estas células tienen una mayor expresión de ciclinas. Por esa razón los progenitores mutantes permanecen menos tiempo en estadio quiescente, acelerándose el paso a G1. Se propone que este paso ocurra también debido a un aumento en el tamaño celular, que fuerce una mitosis para reducirlo (Groszner y cols., 2006). En otros estudios *in vivo* llevados a cabo en mutantes nulos condicionales para PTEN, se encontró un cerebelo de mayor tamaño, con claros problemas en la migración, adhesión y orientación celular. Esto provoca en ocasiones alteraciones en la laminación de algunas capas neurales (Backman y cols., 2001; Kwon y cols., 2001; Marino y cols., 2002; Li y cols., 2003b; Yue y cols., 2005; Kwon y cols., 2006). En algunos estudios los resultados encontrados han sido paradójicos puesto que, en el cerebelo de estos individuos, las neuronas de Purkinje, al contrario de lo que cabría esperar, presentan niveles bajos en la fosforilación de AKT, alteraciones en la formación de neuritas y, además, una gran vacuolización en el citoplasma, lo que sugiere una neurodegeneración de este tipo

celular. *In vitro* las células cerebelares nulas para PTEN proliferan menos que las silvestres. Por tanto, el comportamiento frente a la carencia de PTEN varía en función del tipo celular (Marino y cols., 2002).

La ausencia de PTEN no originó alteraciones en la diferenciación de progenitores a neuronas y astrocitos (Groszer y cols., 2001; Marino y cols., 2002). Varios grupos generaron individuos mutantes condicionales mediante el promotor GFAP específico de astrocitos (Backman y cols., 2001; Kwon y cols., 2001; Fraser y cols., 2004). De esta forma, se observaron fenotipos variables, aunque en la mayoría de ellos las neuronas presentaron un aumento del tamaño celular sin que se afectase la proliferación celular. Por lo general, el cerebro de estos individuos también desarrolla macrocefalia, alteraciones en la migración y laminación debido al aumento del número de astrocitos, que proliferan más y mueren menos (Fraser y cols., 2004).

Otras investigaciones, sin embargo, revelan que PTEN interfiere en la diferenciación celular. Por ejemplo, se ha descrito que durante el desarrollo el inicio de la diferenciación en el cerebro coincide con un aumento de la expresión de PTEN. Además, la supresión de PTEN con oligonucleótidos antisentido bloquea el inicio de la diferenciación neuronal, cuando estas son tratadas con NGF, mientras que la diferenciación de los astrocitos no se ve afectada (Lachyankar y cols., 2000). En células PC12, PTEN inhibe la fosforilación de AKT y MAPK cuando estas se estimulan también con NGF y, en consecuencia, se reduce el desarrollo fenotípico de neuronas (Musatov y cols., 2004).

Durante el desarrollo del cerebelo, la glía de Bergmann es la responsable de guiar la migración de las neuronas granulares de la capa externa a la interna mediante sus prolongaciones. Cuando se muta la expresión de PTEN en esta glía, se pierde su morfología y, además, se altera su diferenciación a neuronas en respuesta a daño celular. Esto provoca una desorganización en la laminación de la corteza cerebelar (Yue y cols., 2005).

Finalmente, varios estudios clínicos observan que la expresión de P-PTEN (forma inactiva de la proteína) y P-AKT aumentan durante el daño producido por

isquemia en cerebros adultos, junto al desarrollo de resistencia a muerte celular (Ning y cols., 2004; Choi y cols., 2005).

Con el objeto de conocer su función en CMN, en esta Tesis se estudia el efecto de la sobreexpresión y la inhibición de PTEN, mediante construcciones retrovirales, sobre la proliferación y diferenciación de células madre de bulbo olfatorio, y sobre la ruta de señalización bioquímica de PI3K/AKT. Este estudio se ha completado realizando inhibiciones de las rutas bioquímicas PI3K/AKT y MAPK/ERK en CMBO con drogas específicas.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis se ha centrado en estudiar las rutas bioquímicas de señalización que contribuyen a la proliferación y diferenciación de las células madre y progenitoras neurales y su respuesta a diferentes factores extracelulares. Nuestros objetivos específicos son:

1. Posible aislamiento de células madre/progenitoras de retina embrionaria de ratón.

1.1 Caracterización de células progenitoras neurales de retina embrionaria *in vivo* e *in vitro*.

1.2 Comparación del comportamiento de células progenitoras de dos tejidos neurales embrionarios, retina y bulbo olfatorio, cultivadas bajo las mismas condiciones.

2. Determinación de los efectos bioquímicos y celulares de IGF-I y PTEN sobre las células madre de bulbo olfatorio (CMBO).

2.1 Caracterización de la ruta bioquímica activada por el IGF-I, y los efectos biológicos de su inactivación.

2.2 Análisis de los efectos bioquímicos y celulares de la sobreexpresión de PTEN y de su versión inactivada, sobre la fisiología de las CMBO.

1. Cultivo de células de retina de ratón embrionario E12,5 y E13,5

1.1 Disección de la retina.

Los ratones silvestres que se han utilizado en este estudio pertenecen a la estirpe CD1, y han sido mantenidos y utilizados según la normativa del animalario del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, de acuerdo con las normativas españolas y de la Unión Europea.

El material de disección fue previamente esterilizado por calor seco, para evitar contaminaciones de los cultivos.

Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical, y los embriones fueron obtenidos por cesárea. Para la determinación del estadio embrionario, se consideró la mañana en la que se encuentra el tapón vaginal como día embrionario E0,5. Los embriones se observaron con una lupa para determinar su estado real de desarrollo según parámetros descritos (Theiler, 1989).

La disección de los cerebros se realizó en solución estéril HBSS o Hank's (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Escocia), con los siguientes componentes añadidos:

	<u>Concentración final</u>
HEPES (Sigma, St. Louis, MO)	15 mM
Bicarbonato sódico (Sigma)	10 mM
D-Glucosa (Sigma)	10 mM
Penicilina-Estreptomicina (GibcoBRL)	0,5 % (v/v)

El pH de la solución se ajustó a 7,10.

Se decapitaron los embriones y se colocaron las cabezas en una placa con solución Hank's. Posteriormente, bajo la lupa, se extrajo el ojo entero y en el caso de los embriones de E13,5, se retiraron el epitelio pigmentario y el cristalino con la ayuda de

las pinzas. En cambio, en embriones de E12,5 los ojos se trataron previamente con hialuronidasa (0,5 mg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente, para facilitar la separación de los dos tejidos (neuroretina y epitelio pigmentario) y evitar así contaminaciones.

Las retinas se disgregaron de forma mecánica y enzimática. Para ello, los fragmentos de este tejido se incubaron con tripsina 5 minutos a 37°C, en movimiento, y se inhibió la reacción enzimática con DMEM F12 N2 + 10% FBS. A continuación, con la ayuda de pipetas P-1000 y P-200 se disgregaron mecánicamente las retinas, previamente sumergidas en una solución de trituración (1% DNAsa en Hank's).

Una vez dissociadas las células, se determinó su viabilidad mediante el método de exclusión de azul tripano (Sigma) en cámara de Neubauer. Posteriormente, se resuspendieron las células en medio DMEM F12 N2 y se sembraron en placas de cultivo a una densidad inicial de 60.000 células/cm² y en presencia de los factores de crecimiento adecuados.

1.2 Cultivo de células progenitoras.

Para favorecer el crecimiento celular se emplearon diferentes factores que se añadieron diariamente o a días alternos: FGF-2, IGF-I, EGF, CNTF y TGF- α de Peptotech (Rocky Hill, NJ) y NT-3 de R&D Systems (Minneapolis, MN). La insulina la obtuvimos o bien por cortesía de Eli Lilly (Indianápolis, IN) o bien de Sigma. La heparina y el Matrigel[®] se obtuvieron de Serva (Heidelberg, Alemania).

Para disgregar los pequeños agregados formados tras 3-4 días de cultivo, las células se pasaron de forma mecánica únicamente con la ayuda de pipetas automáticas, debido a su fragilidad, y se sembraron de nuevo en medio fresco DMEM F12 N2 pH 7,10 cuyos componentes son:

	<u>Concentración final</u>
DMEM F12 (1:1) (GibcoBRL) suplementado con:	
Piruvato sódico (Sigma)	1 mM
Glutamina (GibcoBRL)	2 mM
Bicarbonato sódico (Sigma)	22 mM
Componentes N2:	
Apotransferrina (Sigma)	103,2 mg/l
Putrescina (Sigma)	100 µM
Progesterona (Sigma)	20 nM
Selenito sódico (Sigma)	30 nM
Penicilina-estreptomicina (GibcoBRL)	0,5% (v/v)
Insulina (Eli Lilly y Sigma)	10 µg/ml

Los cultivos se mantuvieron en el incubador a 37°C en 5% de CO₂ y ambiente saturado de humedad.

Para los experimentos de estudio de la proliferación se empleó como marcador la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU; Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), añadido al medio a una concentración de 5 µM, 22 horas antes de fijar las células. El BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora al DNA que se está sintetizando.

2. Cultivo de células madre de bulbo olfatorio (CMBO).

2.1 Disección y disociación del bulbo olfatorio de ratón embrionario E14,5.

La estirpe de ratones, así como las soluciones y medios utilizados, tales como la solución de HBSS o Hank's, son los mismos que los empleados en la disección de retina, descrito en el apartado anterior.

Los embriones se decapitaron y se colocaron las cabezas en una placa con solución Hank's. Posteriormente, bajo la lupa, se retiró la piel y el cráneo dejando visibles los hemisferios y los bulbos olfatorios. Con ayuda de unas pinzas finas se

cortaron los bulbos por la zona de unión con el resto del cerebro, se limpiaron de meninges y otros restos y se colocaron en otra placa limpia con Hank's.

La disociación celular de bulbos olfatorios se realizó mecánicamente, con la ayuda de la solución de Hank's suplementada con 0,02% de EDTA (Sigma), con el fin de favorecer la posterior disgregación del tejido.

Una vez disociadas las células, se determinó la viabilidad mediante exclusión de azul tripano en cámara de Neubauer. Posteriormente, se resuspendieron las células en medio y se sembraron en placas de cultivo con el mismo medio DMEM F12 N2 descrito en el apartado anterior, a una densidad inicial de 30.000-40.000 células/cm² y en presencia de 20 ng/ml FGF-2 y 20 ng/ml EGF.

2.2 Condiciones de proliferación.

Las células madre neurales de bulbo olfatorio se cultivaron siguiendo los métodos desarrollados en nuestro laboratorio (Vicario-Abejón y cols 2003; Yusta-Boyo y cols., 2004). Estas células se sembraron a una densidad inicial de 30.000-40.000 células/cm² y de 5.000-6.000 células/cm² en los pases sucesivos.

Durante el mantenimiento y expansión de los cultivos se utilizaron placas de plástico sin recubrir, mientras que para las determinaciones de proliferación se emplearon placas recubiertas con poliornitina (15 µg/ml; Sigma). Las células procedentes de bulbo olfatorio embrionario crecieron formando neuroesferas; por ello, para realizar estudios de proliferación, fue necesario recubrir las placas con poliornitina. De esta manera, se facilitó que las células crecieran pegadas a la placa sin que se modificasen significativamente sus características proliferativas.

Los factores de crecimiento empleados en fase de proliferación han sido el EGF y el FGF-2. Estos factores se añadieron diariamente a cada cultivo.

Para las determinaciones del número de células proliferativas, se utilizó como marcador BrdU, añadida al medio a una concentración de 5 μ M, 20-22 horas antes de la fijación.

Para expandir los cultivos fue necesario pasar las células cada 3-5, días ya que éstas formaron neuroesferas relativamente grandes que impiden el acceso de nutrientes a las células del interior. Se disociaron, por tanto, las neuroesferas y se volvieron a sembrar como células aisladas. Esta disociación se realizó mecánicamente, previa incubación de las células a 37 °C en presencia de Hank's + 0,02% EDTA durante 25 minutos. Posteriormente, se determinó la viabilidad celular mediante exclusión de azul tripano, en cámara de Neubauer, y se sembraron las células a la densidad de 5.000-6.000 células/cm².

2.3 Condiciones de diferenciación.

Las condiciones de cultivo establecidas para los experimentos de diferenciación fueron: retirada de los factores mitogénicos, recubrimiento de las placas con poliornitina a 15 μ g/ml y fibronectina a 1 μ g/ml (GibcoBRL), aumento de la densidad celular a 100.000 células/cm² y adición o no de factores neurotróficos. En general, las células se fijaron con paraformaldehído (descrito en el apartado 3) 2-4 días después de iniciarse la diferenciación.

2.4 Cultivos de CMBO de ratones mutantes para el gen *igf-1*.

2.4.1 Condiciones de disección y cultivo.

Con el objeto de eliminar una posible interferencia del IGF-I endógeno, en experimentos bioquímicos y celulares, se emplearon ratones mutantes nulos para *igf-1*. Estos ratones mutantes tienen un fondo genético mixto 129/Sv x CD1, y fueron amablemente cedidos por el Dr. Argiris Efstratiadis (Columbia University, Nueva York). La colonia se mantuvo en el animalario del CIB (CSIC, Madrid). La disección de los bulbos olfatorios se realizó siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para ratones CD1, en presencia de solución de Hank's + EDTA, con la salvedad de que se

prepararon suspensiones distintas con los bulbos de cada embrión. La disociación celular se realizó, por lo tanto, de forma mecánica e individual. Las células de cada embrión se sembraron en portas de 4 pocillos (Lab Clinics). Las condiciones de cultivo en cuanto a densidad y factores de crecimiento fueron las mismas que las que se emplearon para cultivar células de ratones CD1.

2.4.2 Genotipaje de ratones mutantes para el gen *igf-I*.

El genotipaje de estos ratones mutantes se realizó mediante la técnica de PCR. Para ello se utilizó DNA genómico obtenido a partir de colas de ratones de embriones de E14,5, E16,5 y E18,5.

2.4.2.1 Extracción de DNA genómico.

Digestión de los tejidos.

El DNA genómico se obtuvo de los tejidos según la técnica descrita por Miller y cols. (1988). Las colas de ratones embrionarios o destetados se digirieron en 0,5 ml de tampón de lisis (Tris-ClH 40 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, SDS 0,5% y NaCl 200 mM) con 0,3 mg de Proteinasa K (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

La digestión se dejó actuar durante toda la noche a 55 °C, con agitación suave. Si la digestión era incompleta, se añadía más Proteinasa K y se continuaba la digestión más tiempo.

Precipitación del DNA.

Al lisado se le añadieron 0,25 ml de solución saturada de NaCl 6 M, se agitaron los tubos vivamente por inversión y se dejaron 10 minutos en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos en una microcentrífuga, y se pasaron 0,5 ml del sobrenadante a un nuevo tubo. A este volumen se le añadió 1 ml de etanol al 95% y se agitaron los tubos vivamente, hasta que se apreció claramente el precipitado

de DNA flotando, como hebras blanquecinas compactas. A continuación, el DNA se lavó con etanol al 70% para eliminar las sales.

El DNA se secó manteniendo el tubo abierto y finalmente se resuspendió en tampón TE (Tris-ClH pH 7,5 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) mediante la adición de 100-150 µl de tampón a muestras de DNA embrionario y 100 µl a DNA de ratones destetados. Se incubó a 55 °C durante toda la noche.

2.4.2.2 Técnica de la PCR.

Para la amplificación del fragmento del gen de *igf-I* y del fragmento del cassette *neo* se utilizaron los siguientes cebadores (*primers*):

igf-1 antisentido: 5'GACTCGATTTCACCCACTCGATCG 3'
igf-1 sentido: 5'GTCTAACACCAGCCCATTCTGATT 3'
Neo antisentido : 5'CAAGGTGAGATGACAGGAGATC 3'
Neo sentido : 5'GCTTGGGTGGAGAGGCTATTC 3'

El tamaño de la banda esperada con los cebadores para *igf-I* fue de 250 pares de bases, mientras que la esperada para *neo* fue de 284 pares de bases. Una vez diseñados los cebadores, se determinó la concentración óptima del resto de los componentes de la mezcla de reacción. El volumen final fue de 50 µl.

	<u>Volumen (µl)</u>	<u>Concentración</u>
-Agua estéril	37,2	
-Tampón 10X	5	1X
-MgCl ₂ 25mM	3	1,5 mM
-dNTP 10 mM	1	0,2 mM
-Cebador sentido 10 µM	1	0,2 µM
-Cebador antisentido 10 µM	1	0,2 µM
-Taq-Polimerasa 5 U/µl	0,5	2,5 U
-Muestra de DNA	1,3	≈750 ng

El control de PCR contiene los componentes de la mezcla de reacción a excepción del DNA.

Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial: 94 °C durante 2 minutos.
- 35 ciclos:
 - Desnaturalización: 94 °C durante 30 segundos.
 - Acoplamiento de cebadores: 58 °C durante 45 segundos.
 - Elongación: 72 °C durante 45 segundos.
- Elongación final: 72 °C durante 5 minutos.
- Mantenimiento a 4 °C.

Para comprobar por electroforesis los productos de PCR correspondientes a los genotipos de cada animal, a 10 µl del producto se le añadieron 1,8 µl de tampón de carga 6X con la composición descrita en Sambrook y cols. (1989) como sigue:

	<u>Para 25 ml</u>
Azul de Bromofenol 0,25% (p/v) (Bio-Rad, Richmond, CA, EE.UU.)	0,0625 g
Cianol Xileno 0,25% (p/v) (Bio-Rad)	0,0625 g
Glicerol 30% (Sigma) (v/v)	7,5 ml
Completar con agua destilada hasta 25 ml	

En un gel de agarosa 1,2% (p/v) en tampón de electroforesis TBE 1X (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8) con bromuro de etidio a 1 µg/ml, se cargaron los 10 µl del producto de PCR con el tampón de carga. Se dejó correr a 100 Voltios durante aproximadamente 30 minutos, en una cubeta de electroforesis de la casa comercial Owl Scientific (Portsmouth, NH, EE.UU.). En un carril lateral se cargó 1 µg de marcador de peso molecular, del tipo 1 Kb (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA).

Transcurridos 30 minutos, se obtuvo una fotografía con cámara Polaroid sobre el transiluminador con luz ultravioleta. Como cabría esperar, la amplificación con

cebadores para *igf-1* y *neo* fue positiva para ambos en los ratones heterocigotos. Mientras que en los ratones homocigotos silvestres y mutantes nulos, sólo fueron positivas las amplificaciones con cebadores para *igf-1* o *neo*, respectivamente.

3. Inmunocitoquímica de células en cultivo.

Las células cultivadas fueron fijadas con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PB) sódico 0,1 M, pH 7,4, durante 25 minutos, a temperatura ambiente. Los cultivos incubados con BrdU fueron fijados con PFA al 4% en tampón borato sódico 0,1 M, pH 9,5, durante 25 minutos, tratados posteriormente con HCl 2 N durante 10 minutos, y neutralizados con tampón borato 0,1 M durante 10 minutos.

Una vez fijadas, las células fueron incubadas con una solución de permeabilización y bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Esta solución contenía Tritón X-100 (Fluka) 0,1% suero 10%/ PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, y KH₂PO₄ 1,7 mM). El suero bloqueante utilizado fue, generalmente, homoespecie del anticuerpo secundario. Para detectar algunos antígenos de membrana, como O4, no fue necesario utilizar Tritón. Posteriormente, se añadió el anticuerpo primario en una solución de la misma composición que la anterior y se dejó incubando a 4 °C durante 18-20 horas. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

Anticuerpos primarios utilizados en los cultivos en fase de proliferación

Anti-nestina (policlonal de conejo, 1:1000, amablemente cedido por el Dr. R. McKay, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Anti-BrdU (monoclonal de ratón 1:20, Becton Dickinson, San Jose, CA; o G3G4, 1:1000-1:2000, monoclonal, Developmental Studies Hybridoma Bank).

Anticuerpos primarios utilizados en los cultivos en fase de diferenciación

Anti- β -III-tubulina (TuJ1, policlonal de conejo 1:2000-1:4000 de Babco, Richmond, CA).

Anti-GFAP (Proteína Ácida Fibrilar de la Glía, policlonal de conejo, 1:1000, Dako, Glostrup, Dinamarca o monoclonal de ratón, 1:300, Sigma).

Anti-O₄ (monoclonal de ratón, IgM, 1:8, producido por células de hibridoma amablemente cedido por la Dra. A. Rodríguez Peña, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), CSIC, Madrid).

Anticuerpos primarios utilizados para la comprobación de la infección

Anti-GFP (Proteína Verde Fluorescente, monoclonal de conejo 1:500, Molecular Probes, Eugene, OR).

Anti-GFP (policlonal de conejo 1:1000, Molecular Probes).

Transcurrida la incubación, se retiró la solución con el anticuerpo primario y las células fueron lavadas tres veces con PBS. Después, se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en la misma solución que el primario, durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario puede estar conjugado con una molécula fluorescente como fluoresceína, rodamina, Texas Red, Alexa-Fluor 350 (1:100 Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; Cappel, Durham, NC; Molecular Probes); o bien biotinilado (1:200), seguido del complejo avidina-biotina peroxidasa (Vectastain ABC Kit, Vector, Burlingame, CA) y revelado con 3-3'diaminobenzidina a 0,5 mg/ml (DAB, Sigma) y de H₂O₂ al 0,01%.

Finalmente, los cubres y portas se montaron con una solución de 1,4 diazabicilo (2,2,2) octano (DABCO) (Sigma) al 2% en glicerol al 70%. Algunos cultivos fueron teñidos también con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a 2 μ g/ml con el fin de teñir los núcleos y mejorar así los contajes celulares.

Para dobles inmuno-marcajes con anti-O₄ y anti-GFP, se realizó primero la tinción completa para el primer anticuerpo, se refijaron las células 5 minutos y se tiñeron con el segundo anticuerpo primario seguido del secundario.

4. Inmunohistoquímica en secciones de criostato.

4.1 Obtención de las criosecciones de cerebro.

Las cabezas de los embriones de E13,5 fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en PB durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, se mantuvieron en sacarosa al 30% en PB durante 24-48 horas a 4 °C. Las cabezas fueron lavadas en PBS y colocadas en cajitas de congelación. Posteriormente, se embebieron totalmente con Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe B.U. Países Bajos), se congelaron en nieve carbónica 20-30 minutos, y se conservaron a –80°C.

Los bloques de tejido congelado fueron cortados en un criostato Leica (Heerbrugg, Suiza) en secciones coronales de 14 µm y se guardaron a –80°C.

4.2 Inmunohistoquímica en criosecciones.

En primer lugar, las secciones de criostato se atemperaron a temperatura ambiente durante 50 minutos.

Se realizaron tinciones con anticuerpos específicos con el fin de estudiar la expresión de diferentes proteínas en distintas secciones de retina embrionaria. El protocolo utilizado en estas determinaciones es el mismo que el descrito en el apartado 3, excepto la solución de permeabilización y bloqueo. Para las tinciones en secciones esta solución fue de Tritón al 0,2%/ suero al 10%/ PBS.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-β-III-tubulina (TuJ1, Policlonal de conejo 1:2000 de Babco, Richmond, CA), anti-Nestina (policlonal de conejo, 1:1000) y anti-P-Histona H3 (Policlonal de conejo 5-10 µg/ml, 1:500, Upstate, Lake

Placid, NY) y el revelado se realizó con anticuerpos secundarios conjugados con la molécula fluorescente Texas Red. Una vez finalizada la tinción, se lavaron las secciones con PBS, y se montaron con el medio DABCO/glicerol.

5. Análisis de proteínas por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*).

Lisis celular y extracción de proteínas.

En primer lugar, se resuspendió el sedimento celular en el tampón de lisis, 30-60 μ l del tampón en función del peso del tejido o del cultivo. La composición de este tampón fue la siguiente:

	<u>Concentración final</u>
Tris HCl pH 7,4 (1 M)	50 mM
NaCl	300 mM
Tritón X-100	1%
Inhibidor de proteasas completo (Roche) (Extracto de páncreas, quimotripsina, termolisina, tripsina y papaina)	1 pastilla/10 ml
Ortovanadato sódico	1 mM
NaF (1 M)	25 mM
Pirofosfato sódico	4 mM
EDTA	1 mM
H ₂ O destilada	hasta volumen final

Se incubó la suspensión celular a 4 °C durante 20 minutos en movimiento. Posteriormente, y tras una centrifugación a 14.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteína por espectrofotometría (Eppendorf Biophotometer).

Preparación de los geles y de las muestras.

Los geles de separación y empaquetamiento utilizados fueron del 7,5% y 4% de acrilamida, respectivamente. Se cargaron de 30 a 50 μg de proteína mezclada con tampón de carga (Tris-ClH 100 mM, pH 7.4, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, β -mercaptoetanol 5% y glicerol 20%), previamente calentados a 90°C durante 10 minutos. En uno de los carriles se cargó un estándar de peso molecular. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100 voltios durante una hora.

Transferencia a una membrana de nitrocelulosa y tinción.

Una vez separadas las proteínas en el gel, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de una corriente de voltaje constante de 100 voltios durante 1-2 horas, a 4 °C y con agitación.

A continuación, se tiñeron las membranas con solución de Ponceau (Ponceau 0,1%, Sigma, acético glacial 5%, Merck) durante unos segundos y después se lavaron con PBST (Tween 20 0,05% en PBS). Posteriormente se tiñeron con anticuerpos específicos.

Primeramente, se realizó el bloqueo en una solución de PBST/BSA (BSA a 2 mg/ml en PBST) durante una hora a temperatura ambiente, y luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en la misma solución de bloqueo, o bien durante 60 minutos a temperatura ambiente o bien durante 18 horas a 4°C, en función del anticuerpo. Después, se lavaron 3 veces con PBST durante 15 minutos, y se añadió el anticuerpo secundario disuelto en la misma solución que el primario durante una hora. Tras lavar 3 veces con PBST durante 15 minutos, se incubaron con la solución reveladora ECL (Pierce, Rockford, U.S.A.) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las membranas húmedas se recubrieron con plástico tipo GLAD y se expusieron a una película Kodak Biomax MS durante un tiempo variable. Posteriormente, se lavó la

membrana con PBST y se trató con una solución Ponceau:Acético, durante 20 minutos, para bloquear la actividad peroxidasa del anticuerpo secundario y se expuso a un nuevo anticuerpo primario.

Anticuerpos primarios:

Anti-P-AKT Serina 473 (policlonal de conejo, 1:2.000, Cell Signalling, Danvers, MA)

Anti-P-AKT Treonina 308 (policlonal de conejo, 1:2.000, Cell Signalling)

Anti-AKT (policlonal de cabra, 1:2.000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)

Anti-P-p44/42 MAP kinasa (policlonal de conejo, 1:2.000, Biolabs, Beverly, MA)

Anti-MAP kinase (ERK1+ERK2) (monoclonal de ratón, 1:2.000, Zymed, San Francisco, CA)

Anti-PTEN (policlonal de conejo generado en cabra, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology)

Anti-HA (monoclonal, 1:200, Santa Cruz Biotechnology)

Anti-Actina (policlonal de conejo, 1:2.000, Sigma)

Anti- β -Tubulina (monoclonal de ratón, 1:10.000, Sigma)

Anticuerpos secundarios:

Anti-IgG de cabra (IgG-HRP, 1:5.000, Santa Cruz Biotechnology)

Anti-IgG de ratón (IgG-HRP, 1:20.000, Jackson)

Anti-IgG de conejo (IgG-HRP, 1:200, Sigma)

La cuantificación relativa de las proteínas, mediante la lectura densitométrica de las bandas de las películas, se realizó a través del programa *Geldoc* (BioRad).

6. Sobreexpresión génica en CMBO mediante construcciones retrovirales.

6.1 Clonaje de los cDNA de PTEN y PTEN-C/S y preparación de las construcciones retrovirales.

El vector retroviral deriva del virus Moloney de la leucemia murina (Mo-MLV). En el presente estudio la construcción retroviral utilizada como control (pRV-IRES/GFP, Fig. 5) codifica una variante mejorada de la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (Cormack y cols., 1996). Se obtuvo clonando el fragmento SacII-NotI del vector pLZR-IRES/GFP (Abad y cols., 2002) en el plásmido pRV (Dr. Manuel A. González, Genetrix S.L., datos no publicados). La construcción retroviral que codifica el cDNA del gen *pten* de 1,2 kb (generado en el laboratorio de la Dra. Ana Carrera, DIO, CNB, CSIC) fusionado en el extremo N-terminal al cDNA de la hemaglutinina, fue generada a partir del vector pRV-IRES/GFP en el laboratorio del Dr. Antonio Bernad por los doctores Manuel González y Jose Luis Abad (DIO, CNB, CSIC, y Genetrix, S.L., Madrid). Dicha construcción se denominó pRV-HA-PTEN-IRES/GFP, y en ella la expresión de PTEN se halla bajo el control del LTR viral. Exactamente de la misma forma se generó la construcción retroviral codificando el cDNA de *pten* inactivo catalíticamente (cedido amablemente por el Dr. Santos Mañes, DIO, CNB, CSIC) a la que se denominó pRV-PTEN-C/S-GFP.

Para la clonación de los vectores retrovirales con el cDNA del PTEN y de PTEN inactivo catalíticamente (Lacalle y cols., 2004), se emplearon las bacterias *Topo* (Invitrogen). Para transformarlas e insertar el vector, se mezcló 1 µl de DNA con 50 µl de la solución de bacterias. Después de cinco minutos en hielo, se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 30 segundos. Luego se sembraron en medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y se cultivaron durante toda la noche a 37°C. Bajo estas condiciones sólo proliferaron aquellas bacterias que habían insertado el plásmido, que porta el gen de resistencia al antibiótico. Por ello, se picó una colonia al azar y se cultivó y expandió nuevamente en medio LB con ampicilina durante 16 horas.

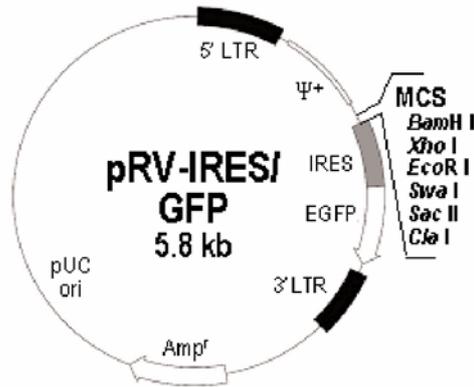


Fig 5. Construcción retroviral control utilizada en infección de células madre neurales de bulbo olfatorio de E14,5. Codifica para la GFP, bajo el control de un IRES y se obtuvo clonando el fragmento SacII-NotI del vector pLZR-IRES/GFP en el plásmido pRV. Contiene el gen de resistencia a ampicilina, las secuencias de empaquetamiento viral (Ψ^+), y las secuencias 5' y 3' LTR virales. En esta construcción se insertó el cDNA de PTEN fusionado a la hemaglutinina (pRV-HA-PTEN-IRES/GFP) y el cDNA de PTEN catalíticamente inactivo (pRV-PTEN-C/S-IRES/GFP).

Una vez clonado el plásmido, lo extrajimos de las bacterias y lo purificamos del resto del DNA mediante el *Kit* de extracción de plásmidos (*midiprep*) de Qiagen (Barcelona), según el procedimiento recomendado.

6.2 Producción de partículas retrovirales. Determinación del título de infección.

Para empaquetar las construcciones retrovirales se empleó la línea celular 293T. Estas células se transfectaron durante 7 horas con las construcciones pRV-PTEN y PTEN C/S, mediante la adición del plásmido correspondiente, CaCl_2 (a una concentración final de 0,22 M) y cloroquina (25 μM), diluidos en HBS (Hepes, NaCl y fosfato sódico, pH = 7,5). Después de este tiempo, se cambió el medio y se añadió DMEMF12N2 más 10% suero, y se incubaron nuevamente las células durante 24 horas a 37°C y 5% CO_2 . Tras este periodo, se cambió el medio por medio fresco sin suero (DMEMF12N2 más 20 ng/ml EGF y 20 ng/ml FGF-2) y se incubaron otras 24 horas. De esta forma, las construcciones retrovirales empaquetadas se recogieron en el medio empleado para crecer las CMBO. Inmediatamente tras su recogida, el sobrenadante retroviral se filtró con un minifiltro de 0,45 micras, obteniéndose así la solución con las construcciones preparadas para infectar.

Para determinar la eficiencia de infección de las partículas retrovirales obtenidas, se infectaron células 3T3 con diferentes volúmenes del sobrenadante viral. Mediante citometría de flujo, se obtuvieron los porcentajes correspondientes de células verdes GFP⁺, o infectadas, que permitieron calcular el título de infección mediante la fórmula = % células infectadas x número total de células 3T3/ 100 x factor de dilución). Se emplearon suspensiones con un título de aproximadamente 2-5 x 10⁶ UI/ml.

6.3 Infección de CMBO.

Los experimentos realizados con retrovirus con capacidad de infección a células de mamíferos, se realizaron bajo condiciones de seguridad, en campana Bio-II del servicio P-2. Los residuos generados se trataron de acuerdo con la normativa establecida.

Para realizar las infecciones, se utilizaron células de bulbo olfatorio de E14,5 en proliferación, de los pases 3-10, obtenidas siguiendo el protocolo descrito en los apartados 2.1 y 2.2. El número de células utilizadas para cada infección fue de 3,5 x10⁶. Cada sedimento celular se resuspendió con la siguiente solución:

- 500 µl de sobrenadante viral.
- 500 µl DMEMF12N2
- Polibreno 6 µg/ml
- EGF 20 ng/ml y FGF-2 20 ng/ml

Una vez resuspendidas las células, se sembraron en un pocillo de una placa de 6, y se centrifugaron a 1.000 r.p.m. a 37 °C durante una hora. A continuación se recogieron las células, que se habían pegado al fondo de la placa durante la centrifugación, mediante el raspado cuidadoso con una punta de pipeta P-1000.

Posteriormente, se contaron las células por exclusión de azul tripano, y se sembraron a una densidad de 20.000 células/cm². Las células se mantuvieron 3-4 días

en incubador a 37 °C y 5% de CO₂, en presencia de 20 ng/ml EGF y 20 ng/ml FGF-2. Al cabo de este tiempo se pasaron y se sembraron en condiciones de proliferación y diferenciación, con el fin de estudiar el efecto de la sobreexpresión de las construcciones PTEN y PTEN C/S sobre estas células (Fig. 6).

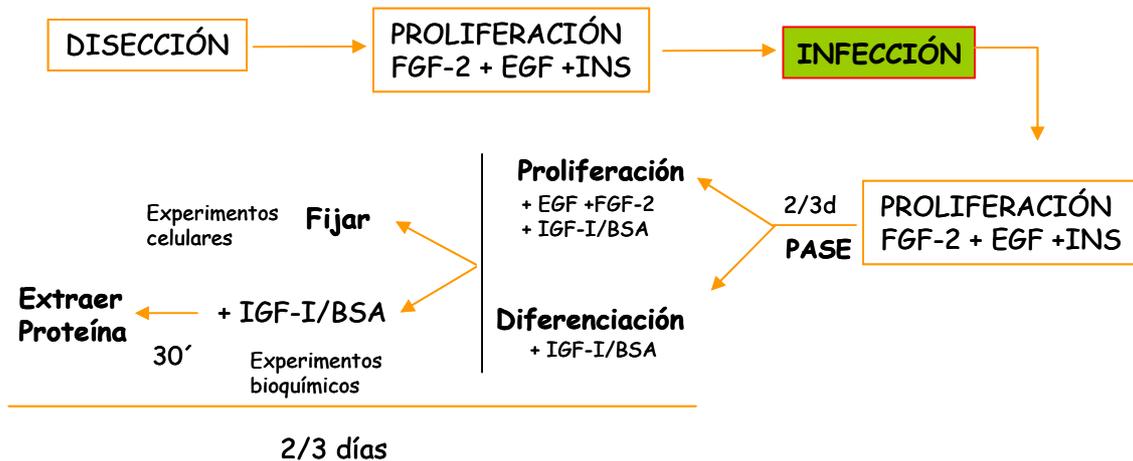


Fig. 6. Infección retroviral de las CMBO. La infección retroviral de las CMBO se hizo en condiciones de proliferación y en presencia de insulina. Después de aplicar el protocolo de infección, se sometió a las células a condiciones de proliferación o diferenciación durante 2 ó 3 días. Después de este periodo los cultivos se fijaron para los experimentos celulares. Para los análisis bioquímicos, las células infectadas se estimularon durante 30 minutos con IGF-I, y tras ello, se extrajeron las proteínas.

Al cabo de 2-3 días en cultivo, las células se fijaron y se tiñeron utilizando los protocolos descritos en el apartado 3. Para mejorar la visualización de la GFP en las células fijadas, se realizó inmunotinción con anticuerpos frente a GFP. Previamente a su fijación, algunas células se incubaron durante 20-22 horas con 5 μM BrdU.

7. Detección de la apoptosis celular por la técnica de TUNEL.

La detección de apoptosis en células en cultivo se realizó por la técnica de TUNEL (de inglés *TdT-mediated dUTP nick end labelling*). La transferasa Terminal TdT añade nucleótidos (dUTPs) marcados con fluoresceína a los extremos 3' libres del DNA, lo que permite detectar la fragmentación del DNA producida en la muerte por apoptosis.

Las células previamente fijadas, según protocolo descrito en el apartado 3, se permeabilizaron durante 30 minutos con una solución de BGT [Glicina 100 mM, 0,3 mg/ml BSA, Triton X-100, 0,25% (p/v)]. Después de lavarlas tres veces con PBS, las células se trataron con la solución de equilibrio del *Kit DeadEndTM Fluorimetric TUNEL system* (Promega, Madison, WI). Una vez equilibradas, se incubaron con el tampón de reacción que contiene nucleótidos marcados con FITC y la enzima TdT, durante una hora a 37°C. La reacción se inhibió mediante lavados con 2x SSC. Las células se montaron con *Vectashield* y se analizaron en un microscopio de fluorescencia.

8. Tratamientos de las CMBO con los inhibidores LY294002 y U0126.

Después de la disgregación o pase, las células se sometieron a condiciones de proliferación o diferenciación durante 48 horas. Durante este periodo se añadieron dos dosis de IGF-I 100 ng/ml o BSA 0,001% como control a tiempo cero y 24 horas. Durante las últimas 24 horas, y 30 minutos antes de la última dosis de IGF-I o BSA, se añadieron diferentes dosis de los inhibidores farmacológicos LY2904002 (5-30 μ M) (Calbiochem, Barcelona) o U0126 (1,5-50 μ M) (Calbiochem) y DMSO 1-1,5% como control. Finalmente las células se fijaron según el protocolo del apartado 3.

9. Cuantificación del número de células. Análisis estadístico.

Para determinar el número de células que expresaban un antígeno específico o eran positivas para el marcaje de detección de muerte (TUNEL), se contaron 10 campos aleatorios por cámara o cubre, utilizando un objetivo 40x bajo filtros de fluorescencia o luz brillante (microscopio Zeiss Axioplan). Los resultados han sido expresados como el número de células teñidas para cada antígeno en 10 campos. Además se contaron las células totales, teñidas y no teñidas, con el fin de calcular los porcentajes de un determinado tipo celular en el cultivo.

En los experimentos de la sobreexpresión de PTEN y PTEN-C/S, se contabilizaron las células doblemente marcadas para GFP y para el marcador correspondiente, salvo en el caso de TUNEL, puesto que en el proceso de apoptosis se pierde la proteína GFP. En ese caso se contabilizaron las células TUNEL positivas totales. Estos resultados se presentan como valores relativos, normalizados respecto al valor obtenido en células infectadas con GFP, al que se asignó un valor del 100%.

Salvo indicarse lo contrario, los resultados se representan como la media \pm SEM de los datos de los cultivos y experimentos indicados. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo aplicando el test *t* Student.

I. Desarrollo de la retina embrionaria de ratón y aislamiento de células progenitoras.

Aunque previamente se conocía la existencia de células madre/troncales en la retina del ratón adulto (Tropepe y cols. 2000; Bhattacharya y cols., 2003; Coles y cols., 2006), hasta ahora no se ha podido demostrar la existencia de estas células en la retina embrionaria. Por ello, nos propusimos estudiar algunos aspectos del desarrollo embrionario de la retina *in vivo* y tratar de aislar y cultivar células progenitoras neuroepiteliales, utilizando diferentes condiciones de cultivo.

1. Estudio *in vivo* de la proliferación y diferenciación neural durante el periodo embrionario (E12,5-E13,5).

Para determinar el grado de proliferación y diferenciación celular en la retina embrionaria se hicieron criosecciones de edades E12,5 y E13,5. Estas secciones se inmunotñeron para detectar marcadores de división celular, diferenciación neuronal y de precursores neurales. Para ello se emplearon anticuerpos anti-P-histona H3 (Fig. 7 B,D), anti- β -III-tubulina (TuJ-1) (Fig. 7. A,C,E) y anti-nestina (Fig. 7F) respectivamente. A la edad de E12,5, las células diferenciadas a neuronas ocuparon un área muy pequeña de la retina, próxima a la zona de la salida del nervio óptico (Fig. 7A*). A esta edad se encontró un alto número de células en división, marcadas por P-histona H3, típico de un tejido en crecimiento (Fig. 7B). Esta distribución de células marcadas se invirtió un día mas tarde, E13,5, puesto que las neuronas (TUJ-1 positivas) se distribuyeron a lo largo de toda la retina salvo en los extremos (Fig. 7C,E), que más adelante formarán el margen ciliar (Fig. 7C▼). En paralelo, la proliferación disminuyó ligeramente (Fig. 7D). En ambas edades las células mitóticas se concentraron en la parte externo de la retina, junto al epitelio pigmentario (marcado con líneas discontinuas, EP). Finalmente, vimos que en E13,5 un alto número de células aún eran positivas para nestina (Fig. 7F).

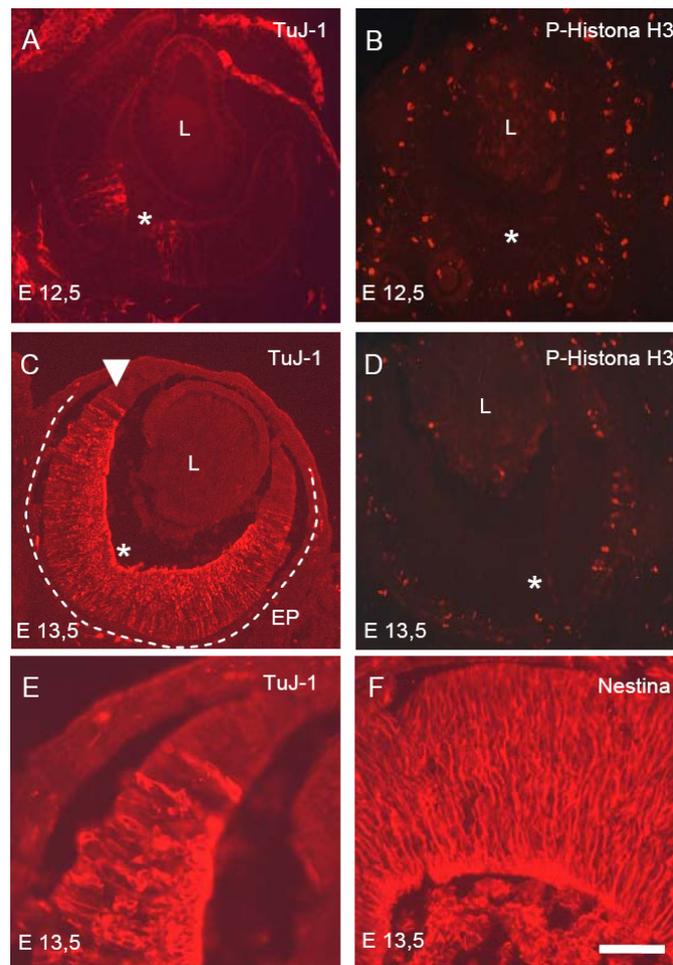


Fig. 7. Expresión de diferentes marcadores durante el desarrollo de la retina embrionaria. Las secciones coronales de retina embrionaria de E12,5 y E13,5 se inmunotñeron para detectar β -III-tubulina (TuJ1; A, C, E) para P-histona H3 (B, D) y nestina (F). La imagen E corresponde a la zona ampliada e indicada mediante una flecha en el panel C. *, Salida del nervio óptico; L, cristalino; EP, Epitelio pigmentario. Escala: A-D 80 μ m, E-F 40 μ m .

2. Aislamiento y cultivo de células progenitoras de la retina.

Debido a su pequeño tamaño, la disección de retinas embrionarias de E12,5 implicó algunos riesgos de contaminación por epitelio pigmentario. Por ello, y basándonos en los resultados obtenidos *in vivo*, elegimos la edad de E13,5 como candidata para diseccionar la retina y tratar de obtener células progenitoras. En E13,5 el número de células nestina-positivas es muy elevado, lo que podría facilitar el crecimiento en cultivo de estas células progenitoras.

Una vez elegida la edad embrionaria más adecuada, se disecaron las retinas y las células se cultivaron en presencia de diferentes moléculas que, según los antecedentes bibliográficos (Akagi y cols., 2003; Lillien y Cepko, 1992; Das y cols., 2000; Hernandez-Sanchez y cols., 1995; Klagsbrun y cols., 1991; Shimazaki y cols., 2001), podrían promover la proliferación de estas células. Estos factores fueron CNTF, TGF- α , NT-3, EGF, FGF-2, heparina e IGF-I. De todos ellos, solo la combinación FGF-2 (50 ng/ml) con heparina (2 μ g/ml) promovió la formación de agregados del tipo “neuroesferas”, aunque tuvieron poca viabilidad. Por otro lado, sabiendo que la señal de FGF-2 puede ser estimulada por componentes de la matriz extracelular (Colognato y cols., 2002), añadimos al cultivo Matrigel $\text{\textcircled{R}}$ (0,4-1%), laminina (1-2 μ g/ml) y fibronectina (1-2 μ g/ml). Finalmente, de todas las combinaciones posibles, la compuesta por FGF-2 (50 ng/ml), heparina (2 μ g/ml) y laminina (2 μ g/ml) fue la más adecuada para la proliferación celular y la formación de agregados (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto de diversas moléculas sobre el crecimiento de precursores de retina.

Tratamiento	Crecimiento*
FGF-2 20-50 ng/ml	-
FGF-2 20 ng/ml + EGF 20 ng/ml	-
FGF-2 50 ng/ml + heparina 2 μ g/ml + poliornitina	+/-
FGF-2 50 ng/ml + heparina 2 μ g/ml + Matrigel 0.4-1%	+
FGF-2 50 ng/ml + heparina 2 μ g/ml + fibronectina 1-2 μ g/ml	-
FGF-2 50 ng/ml + heparina 2 μ g/ml + laminina 1 μ g/ml	++
FGF-2 50 ng/ml + heparina 2 μ g/ml + laminina 2 μ g/ml	+++

Los precursores de retina de ratón de E13,5 se cultivaron con los factores de crecimiento indicados y con moléculas de la matriz extracelular. Cuatro días después de la siembra, se evaluó la supervivencia y la formación de agregados celulares. Como se aprecia, la combinación de 50 ng/ml FGF-2, 2 μ g/ml heparina y 2 μ g/ml es la que produce mejor crecimiento respecto al resto de combinaciones. * Definimos crecimiento por la formación de esferas.

Al igual que en otros sistemas celulares, la densidad celular resultó ser un factor crítico en la evolución de los cultivos. Por ello, se probaron diferentes densidades

comprendidas entre 10.000 y 100.000 células/cm² y, finalmente, se estableció 60.000 células/cm² como la densidad más adecuada.

Bajo las condiciones mencionadas y después de un día de cultivo, la mayoría de las células de retina sobrevivieron y presentaban una morfología redonda y un aspecto brillante (Fig. 8A). Sin embargo, sólo una minoría de las células fue capaz de generar pequeños agregados a día dos (Fig. 8B). Unos pocos agregados sobrevivieron y alcanzaron un tamaño mayor en los días posteriores (Fig. 8C). En general, ningún cultivo superó las dos semanas de supervivencia. La fase de crecimiento máximo ocurrió durante los primeros días (Fig. 8D).

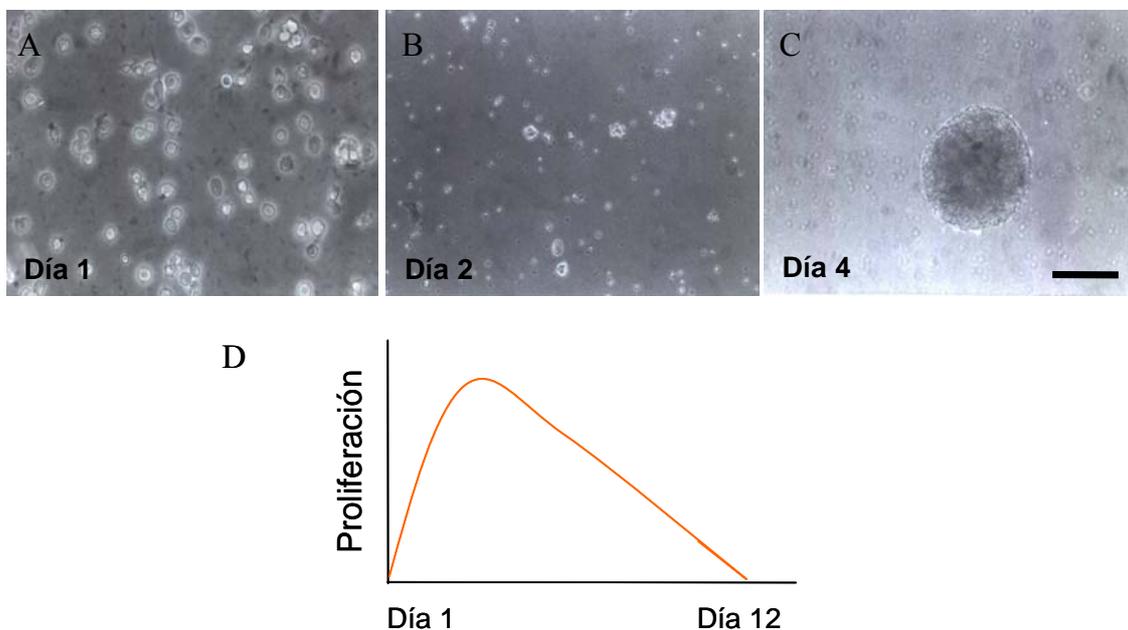


Fig. 8. Cultivo de células progenitoras de retina embrionaria E13,5. Las células recién disgregadas se cultivaron en presencia de 50 ng/ml de FGF-2, 2 µg/ml de heparina y 2 µg/ml de laminina. La mayoría de estas células sobrevivieron las primeras 24 horas (A) aunque a día dos solo una minoría fue capaz de proliferar y formar pequeños agregados (B) de los cuales muy pocos alcanzaron un tamaño mayor a los cuatro días (C). Por lo general, ninguno de los cultivos superó las dos semanas de supervivencia, alcanzándose un máximo de proliferación los primeros días, representado esquemáticamente en la figura D. Escala: 90 µm.

3. Estudio comparativo de células progenitoras neurales de retina y BO.

Una vez que se definieron las condiciones óptimas, aunque limitadas, de cultivo para las células progenitoras de retina, se caracterizó su proliferación y diferenciación *in vitro* mediante la utilización de diferentes marcadores: TuJ-1 para neuronas (Fig. 9 A,B), BrdU para la células proliferativas (Fig. 9 C,D) y nestina para las células

precursoras (Fig. 9 E,F). Para analizar si la respuesta de estas células frente a FGF-2, heparina y laminina fue específica se comparó el crecimiento de las células de retina con el de las células de bulbo olfatorio (BO) de E14,5 (Vicario-Abejón y cols., 2003). Para ello, estas últimas también se tiñeron con anticuerpos anti-BrdU (Fig. 9G), nestina (Fig. 9H) y TuJ-1 (no se muestra imagen) después de crecerlas en presencia de FGF-2, heparina y laminina.

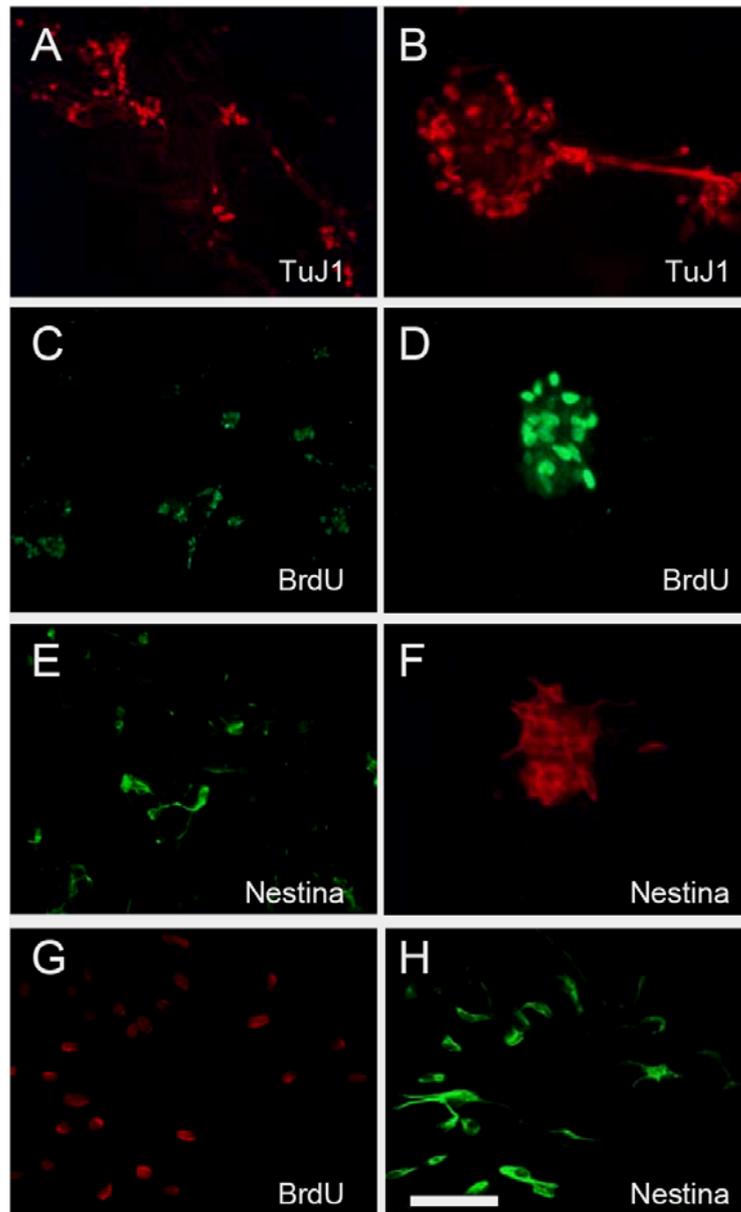


Fig. 9. Expresión de marcadores de proliferación y diferenciación en células progenitoras de retina y bulbo olfatorio embrionarios. Las células de retina E13,5 (A-F) y las de bulbo olfatorio E14,5 (G,H) se cultivaron en presencia de 50 ng/ml de FGF-2, 2 µg/ml de heparina y 2 µg/ml de laminina. Se añadió BrdU (5 µM). Los cultivos se fijaron a distintos días y se tiñeron para marcar neuronas (TUJ-1, A,B), células proliferativas (BrdU; C,D,G) y precursores neurales (Nestina, E,F,H). Escala: A,C 200 µm, B,E: 100 µm; D,F,H,G: 50 µm.

Las células de retina y bulbo olfatorio se fijaron y tiñeron a los dos, seis, ocho y once días después de la disección (Fig. 10). A día dos las proporciones de células de retina positivas para TuJ-1, BrdU y nestina fueron de 44,9%, 45,2% y 95,2% respectivamente (Fig. 10). Como puede observarse, las células BrdU y nestina positivas disminuyeron a lo largo del tiempo de cultivo, mientras que las células TuJ-1 positivas aumentaron. Estos resultados demuestran que las células de retina no poseen capacidad de autorrenovación bajo nuestras condiciones de cultivo. Estos datos también indican que la laminina potencia el efecto proliferativo y de supervivencia del FGF-2 sobre las células retinianas.

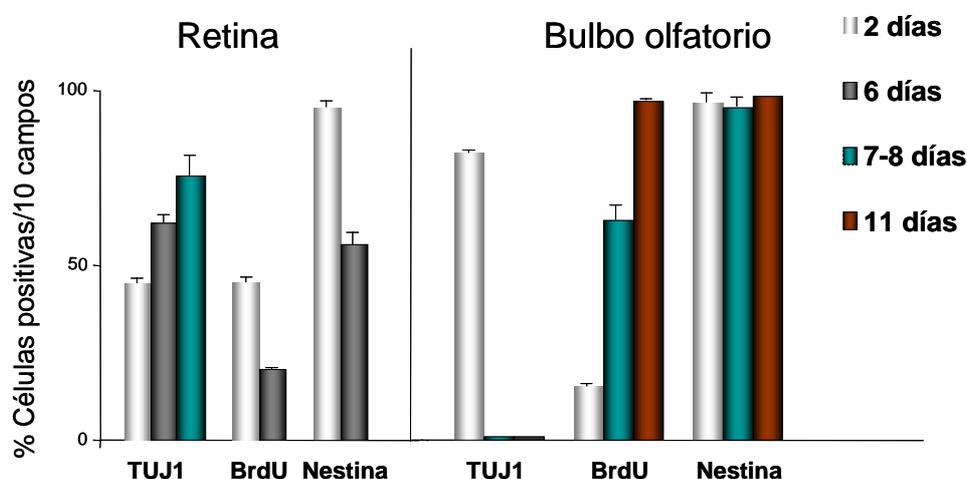


Fig. 10. Evolución de los cultivos de retina y bulbo olfatorio en función del tiempo. El gráfico muestra las proporciones a lo largo del tiempo de células positivas BrdU, TuJ-1 y nestina de retina y de bulbo olfatorio (BO) (derecha). Mientras que las células BrdU⁺ de BO aumentan con el tiempo, las células de la retina se diferencian y pierden la capacidad proliferativa y la expresión de nestina. Los resultados son la media \pm SEM de cuatro cultivos de dos experimentos.

Dado que la laminina puede fomentar la diferenciación (Hynes, 2002; Wu y cols., 2002), y de que ello podría ser la causa del aumento de la expresión de marcadores neuronales a lo largo del tiempo en cultivo, sembramos precursores neurales del BO bajo las mismas condiciones. Después de dos días, las proporciones de células TuJ-1, BrdU y nestina-positivas fueron 83,2%, 15,7%, 93,3% respectivamente (Fig. 10). Al contrario de lo que ocurría con las células de retina, según avanzó el cultivo las células de bulbo olfatorio proliferaron eficientemente en forma de monocapa. A los once días las proporciones de células nestina y BrdU-positivas fueron 99,5 y 98% respectivamente, mientras que el porcentaje de células TuJ-1 disminuyó hasta el 0,06%.

II. Efectos celulares y bioquímicos del IGF-I y PTEN en células madre de bulbo olfatorio (CMBO) y en BO en desarrollo. Análisis de las rutas bioquímicas de señalización de la PI3K/AKT y MAP/ERK1/2 quinasas.

El control de la neurogénesis en el SNC implica regular múltiples procesos como la proliferación de los precursores y las células madre neurales, la diferenciación y la apoptosis. Estos fenómenos están controlados por señales extracelulares que activan rutas bioquímicas capaces de modificar el destino celular. Basándonos en este principio, estudiamos el efecto del IGF-I y la insulina, así como sus mecanismos de acción en el desarrollo de células neuroepiteliales. Para ello empleamos como modelo cultivos de CMBO así como extractos de tejido y CMBO de ratones nulos para *igf-1* previamente descritos en nuestro laboratorio (Vicario-Abejón y cols., 2003; Yusta-Boyo y cols., 2004).

En estos estudios anteriores del laboratorio se determinó que, en presencia de insulina y de los mitógenos FGF-2 y EGF, las CMBO pueden mantenerse proliferando por lo menos hasta el pase 40. Asimismo, se demostró que la diferenciación de estos precursores neurales hacia neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, puede ser inducida mediante la deprivación de FGF-2 y EGF.

1. Estudio de la apoptosis durante la proliferación y diferenciación de CMBO.

Para completar estos estudios de caracterización de las CMBO, realizamos un análisis de la evolución de la supervivencia celular en las fases de proliferación y diferenciación. Se utilizó la técnica de TUNEL para detectar la muerte celular por apoptosis. Para ello se analizaron cultivos mantenidos en proliferación durante uno y tres días, observándose que la muerte se mantenía constante, afectando a un 1,3% de las células (n=2-3). Por lo tanto, durante la proliferación celular de las CMBO apenas se iniciaban los procesos de muerte.

En contraste, cuando se crecieron las CMBO en condiciones de diferenciación, el porcentaje de células TUNEL positivas aumentó a medida que progresaba la diferenciación. Los resultados fueron 4,11%, 4,7%, 12,2%, 13,53% y 20% del total de

células (n=1-3) correspondientes a 4 h, 12 h, 28 h, 36 h y cinco días de diferenciación, respectivamente. Durante estos mismos periodos, tal y como esperábamos, la proporción de células BrdU positivas disminuyó progresivamente desde un 19,62% a las cuatro horas, hasta 3,94%, 3,8%, 5% y 0% a las 12 h, 28 h, 36 h y cinco días.

Estos datos indican que la inducción de la diferenciación de CMBO en cultivo, se ve acompañada por un aumento del número de células que experimentan apoptosis. Estos resultados y los ya publicados, hacen de las CMBO un buen modelo para estudiar el efecto del IGF-I sobre la proliferación, la diferenciación y la apoptosis durante el desarrollo neural.

2. Estimulación de las CMBO con IGF-I.

Según nuestros estudios previos (Vicario-Abejón y cols., 2003) el IGF-I es capaz de promover la proliferación y diferenciación en las CMBO. Este factor de crecimiento puede activar diferentes rutas bioquímicas, preferentemente las mediadas por PI3K/AKT y por ERK1/2. Sin embargo, no se conocen los mecanismos de acción de IGF-I durante la proliferación y diferenciación de células madre neurales embrionarias.

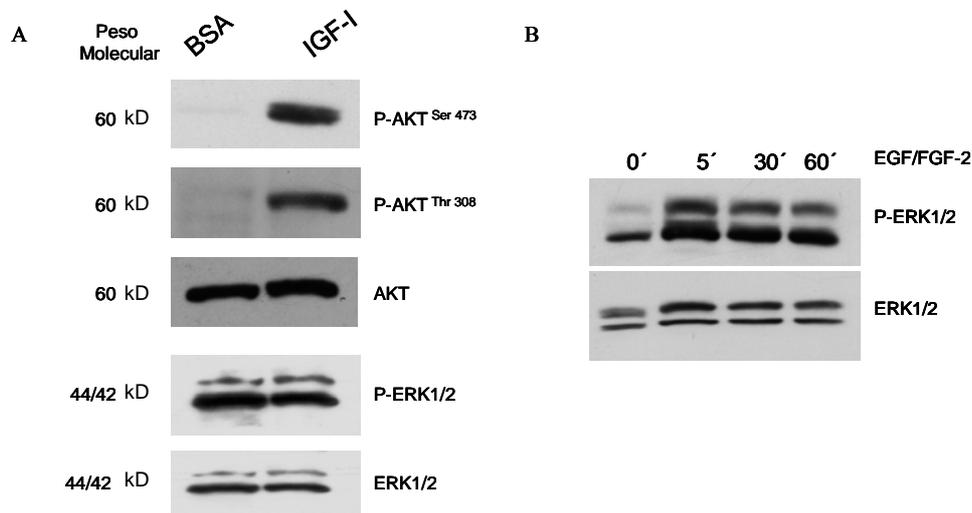


Fig. 11. El IGF-I estimula la fosforilación de AKT en células madre de bulbo olfatorio (CMBO) en condiciones de proliferación. (A) CMBO se mantuvieron en condiciones de proliferación hasta el pase 3 y 8 y se estimularon durante 30 minutos con IGF-I 100 ng/ml, y su control, BSA 0,001%. El IGF-I produjo un notable aumento en la fosforilación de AKT, en los residuos de serina 473 y treonina 308. Este mismo resultado se observó tanto en tratamientos de 5 minutos como de 48 horas. La presencia de IGF-I no moduló los niveles de P-ERK 1/2, que básicamente son muy elevados. Resultados representativos de 4 experimentos. (B) En presencia de los mitógenos EGF y FGF-2, aumentó su fosforilación ERK1 y ERK2, 1,6 y 2,5 veces, respectivamente, tras cinco minutos de tratamiento. Esta tendencia se mantiene al menos hasta una hora.

Para comprobar a través de cual de estas dos vías bioquímicas ejerce el IGF-I sus acciones en las CMBO, se estimularon células proliferativas y diferenciadas, durante 30 minutos, con 100 ng/ml de este factor, y con su control BSA 0,001%. Después de este tiempo, se obtuvo el extracto proteico y mediante *Western blot* se observó que, en células proliferativas, la fosforilación de AKT en los residuos de serina 473 y de treonina 308 era muy superior en células estimuladas con IGF-I que con BSA (Fig. 11A). En cambio, no se apreciaron diferencias en la fosforilación de ERK 1/2, cuyos niveles basales eran muy elevados. Para comprobar si estos niveles eran debidos a la presencia de mitógenos, se estimularon las CMBO con EGF y FGF-2 20 ng/ml o con BSA durante 5, 30 y 60 minutos. En condiciones basales la fosforilación de ERK1/2 fue relativamente elevada, aunque en presencia de los mitógenos la activación de ERK1 y ERK2 incrementó 1,6 y 2,5 veces, respectivamente, los primeros cinco minutos. Esta tendencia se mantuvo en los tiempos posteriores hasta los 60 minutos (Fig. 11B).

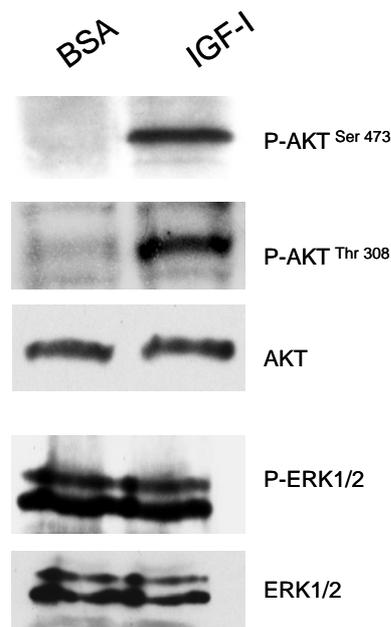


Fig. 12. Estimulación de células madre de bulbo olfatorio en condiciones de diferenciación. CMBO se mantuvieron en condiciones de diferenciación hasta el pase 3 y 8 y se estimularon durante 30 minutos con IGF-I 100 ng/ml y su control BSA 0,001%. El IGF-I produjo un notable aumento en la fosforilación de AKT, en los residuos de serina 473 y treonina 308. No se apreciaron cambios notables en la fosforilación de ERK 1/2. Este mismo resultado se observó tanto en tratamientos de 5 minutos como de 48 horas. Resultados representativos de 4 experimentos.

Al igual que en las células proliferativas, en las diferenciadas, el IGF-I estimuló la fosforilación de AKT en los dos residuos mencionados, mientras que no modificó los niveles de ERK 1/2 (Fig. 12). Este mismo comportamiento se apreció tanto en tratamientos cortos, de cinco minutos, como en los de 48 horas.

3. Expresión de P-AKT en ratones mutantes nulos para IGF-I.

Los bulbos olfatorios procedentes de animales mutantes nulos para IGF-I sufren una clara desorganización en la capa de neuronas mitrales entre los días E16,5-E18,5, lo que indica que el IGF-I pudiera estar regulando la neurogénesis de esta región cerebral (Vicario-Abejón y cols., 2003; Pichel y cols., 2003).

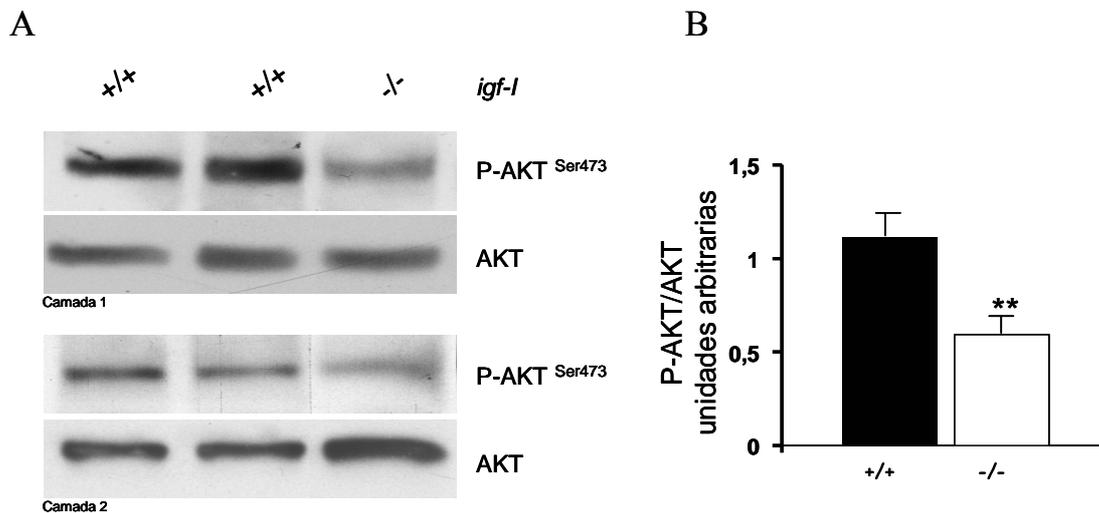


Fig. 13. La ausencia de IGF-I endógeno reduce los niveles de P-AKT en BO *in vivo*. Se extrajeron las proteínas de BO de individuos mutantes nulos de IGF-I de E16,5 y E18,5 (A). La expresión de AKT y P-AKT se midió mediante inmunoelectrotransferencia y se analizó la densidad óptica de cada banda con el programa informático *Quantity One*. Se observó una diferencia significativa del 50% en la fosforilación de AKT en individuos nulos para IGF-I (B). (* $p < 0,05$; ratones $n=8$ *igf-I*^{-/-}, 9 *igf-I*^{+/+}).

Para analizar si los niveles de P-AKT se encontraban alterados por la falta de IGF-I, preparamos varios extractos proteicos de bulbos olfatorios de individuos nulos para IGF-I y silvestres, de edades E16,5 y E18,5. Mediante *Western blot* observamos una reducción aparente de los niveles de P-AKT serina 473 en los individuos *igf-I*^{-/-} (Fig. 13A). Se midió la densidad óptica de las bandas específicas para cada proteína en las autorradiografías correspondientes, y observamos que esta reducción alcanzaba unos

niveles medios del 50% ($p < 0,01$) (Fig. 13B). De esta forma, se comprobó que existe una relación *in vivo* entre el IGF-I y el mantenimiento de los niveles de P-AKT.

4. Papel de la fosfatasa PTEN durante las fases de proliferación y diferenciación de CMBO.

Una vez comprobado que el IGF-I estimula la fosforilación de AKT de las CMBO en cultivo y que su ausencia provoca una reducción de los niveles de P-AKT^{Ser473} *in vivo*, quisimos saber de qué forma afectan los cambios en la ruta bioquímica de PI3K/AKT a la fisiología de la célula. Para ello, se interfirió la actividad de esta ruta y se analizó el fenotipo celular y bioquímico resultante. El método elegido fue la sobreexpresión mediante infección retroviral de la fosfatasa PTEN y de su versión mutada catalíticamente inactiva. Esta proteína es una lipofosfatasa antagonista de la actividad de PI3K, que defosforila el fosfolípido fosfoinositol-tri-fosfato (PIP3), donador de los grupos fosfatos necesarios para activar AKT (Fig. 4) (Brazil y cols., 2004). De esta forma, PTEN interrumpiría la señal de IGF-I, mediada por PI3K, alterando los niveles de P-AKT^{Ser473} y P-AKT^{Thr308}.

Las infecciones virales presentan ciertas ventajas sobre otras técnicas: en primer lugar, permiten sobreexpresar la forma silvestre o la mutada de un gen concreto en un tiempo determinado, evitando así la letalidad y las compensaciones funcionales que se pueden originar en animales carentes del gen desde el inicio de su desarrollo. En segundo lugar, se pueden introducir varias modificaciones genéticas a la vez de una manera relativamente sencilla. Y, por último, pueden ir dirigidas frente a una población celular concreta utilizando un promotor específico, lo que no es posible con la utilización de oligonucleótidos antisentido o anticuerpos. Las nuevas técnicas de generación de animales mutantes condicionales han permitido la obtención de ratones con transgenes activados en una determinada población celular y a un tiempo concreto. Sin embargo, una de las principales ventajas que siguen manteniendo las infecciones con construcciones virales es la alta eficiencia de infección en un punto del desarrollo de una población celular determinada (Simonato y cols., 2000). La capacidad de clonaje o tamaño del cDNA que puede introducirse en un vector viral depende del tipo de virus. En algunos lentivirus se pueden insertar fragmentos de cDNA de hasta 9 Kb.

Las construcciones virales que se han utilizado en el presente trabajo fueron generadas por los Dres. Manuel González y José Luis Abad (Genetrix, S.L.) con la colaboración del Dr. Antonio Bernad (DIO, CNB, CSIC, Madrid), y por los Dres. Ana Clara Carrera y Santos Mañes (DIO, CNB). Estas construcciones derivan del retrovirus Molony, capaz de producir infecciones en células de mamíferos, no son replicativas y presentan muy baja citotoxicidad e inmunogenicidad.

4.1 Características de proliferación y diferenciación de las CMBO infectadas con las construcciones retrovirales pRV-GFP y pRV-PTEN-GFP.

Las células madre de bulbo olfatorio en proliferación se resuspendieron en una solución que contenía medio de cultivo y sobrenadante viral, en presencia de polibreno que es un adyuvante para la infección retroviral. Una vez realizada la infección, según el protocolo del apartado 6.3 de material y métodos, se lavaron las células y se sembraron.

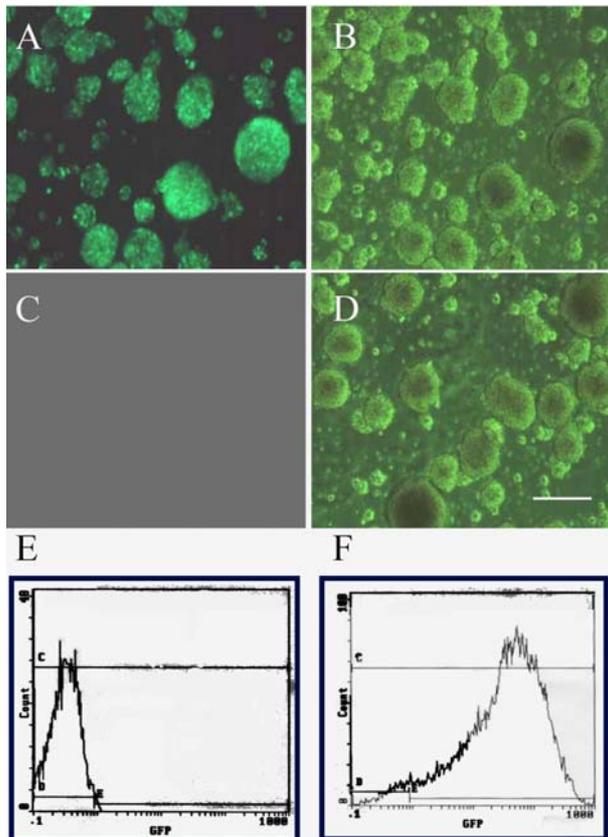


Fig. 14. Infección de células madre de bulbo olfatorio de E14,5 en fase de proliferación. Cuantificación por citometría de flujo. Observación de las células al microscopio de fluorescencia 3-4 días después de la infección con una construcción retroviral que contenía la EGFP (A y B), y de células sin infectar aunque sometidas al mismo protocolo de centrifugación e incubación en presencia de polibreno (C y D). Las células infectadas emitieron fluorescencia verde (A) mientras que las no infectadas no lo hicieron (C). Al microscopio de contraste de fases se apreciaron tanto las células infectadas (B) como las no infectadas (D). La infección no originó cambios en la formación de neuroesferas (B y D). Una vez observadas, las neuroesferas fueron disociadas y se pasaron las células por el citómetro de flujo. El aumento de fluorescencia se observó en el 80-95% de las células (F) comparado con las células no infectadas (E). Escala: 40 μ m (Figura cortesía de la Dra. M^a José Yusta, colaboradora de nuestro laboratorio).

Previamente, la Dra. Maria José Yusta, para comprobar que el proceso de infección no afectaba a las propiedades de proliferación y diferenciación de las CMBO de E14,5, realizó infecciones con una construcción retroviral que expresaba la EGFP (Fig. 14 A,B). En paralelo, se procesaron células sin infectar pero que fueron sometidas al mismo tratamiento de centrifugación e incubación en presencia de prolibreno (Fig. 14 C,D). Al cabo de 3-4 días se generaron neuroesferas, que presentaban fluorescencia verde prácticamente en la totalidad de las células infectadas (Fig. 14 A). Con el fin de determinar el porcentaje de células infectadas, se disociaron las neuroesferas y se pasaron por el citómetro de flujo, obteniéndose unos valores del 94% de células positivas para GFP (Fig. 14 F) comparadas con el control de células sin infectar (Fig. 14 E). La infección no originó cambios en la formación de neuroesferas (Fig. 14 B,D).

En los cultivos de células infectadas en fase de proliferación, se realizaron tinciones para los marcadores BrdU y nestina, observándose que la mayoría de las células que expresaban GFP eran positivas para ambos marcadores (Fig. 15). Por lo tanto, las células de bulbo olfatorio de E14,5 infectadas fueron altamente proliferativas.

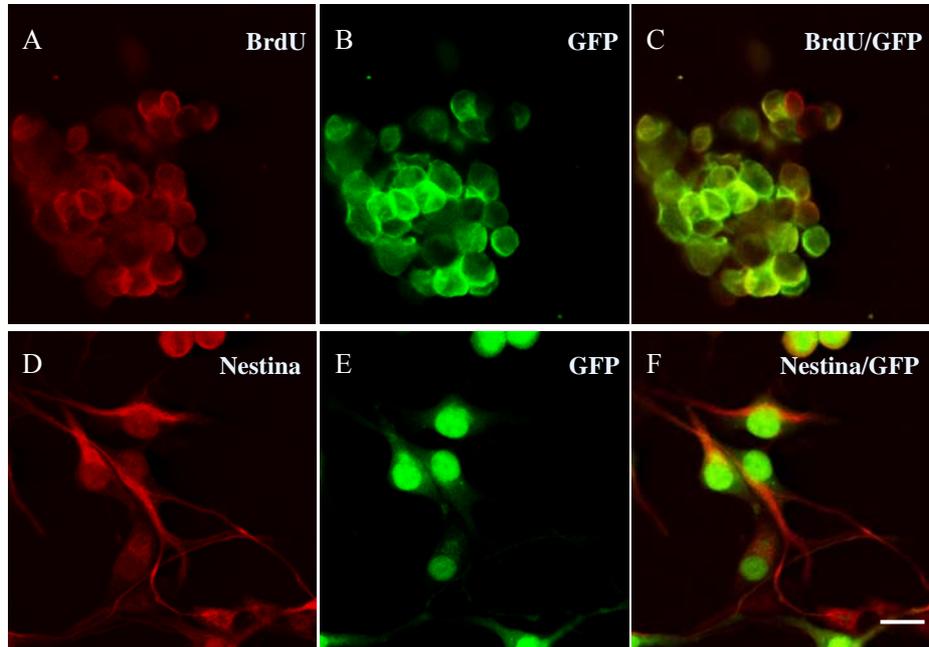


Fig. 15. Marcadores de proliferación en células madre de bulbo olfatorio infectadas con construcciones retrovirales. Las células madre neurales proliferativas fueron infectadas con una construcción que contenía el cDNA de GFP o el quimérico PTEN-IRES-GFP. Dos o tres días después de la infección se generaron neuroesferas en presencia de insulina, EGF y FGF-2. Estas neuroesferas se disociaron y sembraron en las mismas condiciones de proliferación. Al cabo de 3 días, se fijaron las células y se tiñeron con anticuerpos frente a BrdU (A y C), nestina (D y F) y GFP (B, C, E y F). Las figuras son representativas de 4 experimentos de células infectadas con EGFP y PTEN-IRES-GFP. Escala: 30 μ m (Figura cortesía de la Dra. M^a José Yusta, colaboradora de nuestro laboratorio).

Para determinar si también se mantenía la capacidad de diferenciación a los tres linajes neurales, se realizaron cultivos en condiciones de diferenciación y se analizó la presencia de marcadores para neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Fig. 16). Después de 3-4 días en cultivo, se encontraron células positivas para TuJ-1, GFAP y O4 que expresaron la GFP. Por tanto, las células de bulbo olfatorio de E14,5 infectadas originaron neuronas, astrocitos y oligodendrocitos en cultivo (Fig. 16).

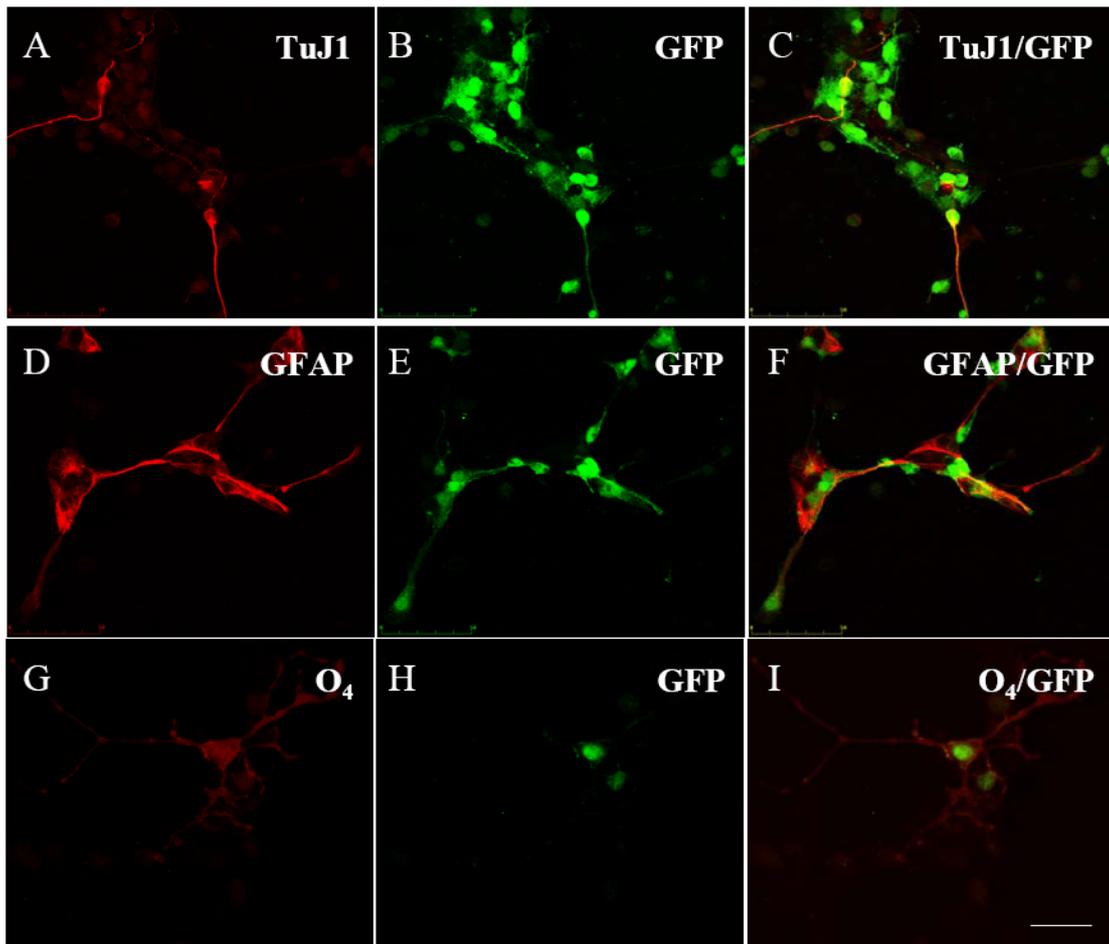


Fig. 16. Marcadores de diferenciación en células madre de bulbo olfatorio infectadas con construcciones retrovirales. Las células madre neurales proliferativas fueron infectadas con una construcción que contenía el cDNA de GFP o el quimérico PTEN-IRES-GFP. Dos-tres días después de la infección se generaron neuroesferas en presencia de insulina, EGF y FGF-2. Estas neuroesferas se disociaron y sembraron en ausencia de EGF y FGF-2 y en presencia de insulina. Al cabo de 3-4 días se fijaron las células y se tiñeron con anticuerpos frente a β -III-tubulina (TuJ1, A y C), GFAP (D y F), O4 (G, I), y GFP (B, C, E, F, H, I). Las imágenes son representativas de 3 experimentos de células infectadas con GFP y PTEN-IRES-GFP. Escala: 50 μ m (A-F) 10 μ m (G-I). (Figura cortesía de la Dra. M^a José Yusta, colaboradora de nuestro laboratorio)

4.2 Determinación por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) de los niveles de expresión de PTEN en células infectadas con pRV-PTEN-GFP y pRV-PTEN-C/S-GFP.

A continuación se comprobó que, además de la GFP, también se expresaba el gen de interés, PTEN o PTEN-C/S. Para ello se extrajeron las proteínas de células diferenciadas e infectadas durante 3-4 días, y mediante los inmunotinción sobre membranas de *western blot*, se estudiaron los niveles de PTEN. Se observó que tanto en la infección mediante pRV-HA-PTEN-IRES/GFP (Fig. 17A) como con pRV-PTEN-C/S-GFP (Fig. 17B) había una mayor cantidad de PTEN en la forma salvaje y mutada, respectivamente, que en la infección control GFP. Medidos por densitometría estos aumentos fueron de 2,2 y 3,1 veces, respectivamente. Ambas formas, tanto la truncada como la silvestre, son reconocidas por el mismo anticuerpo.

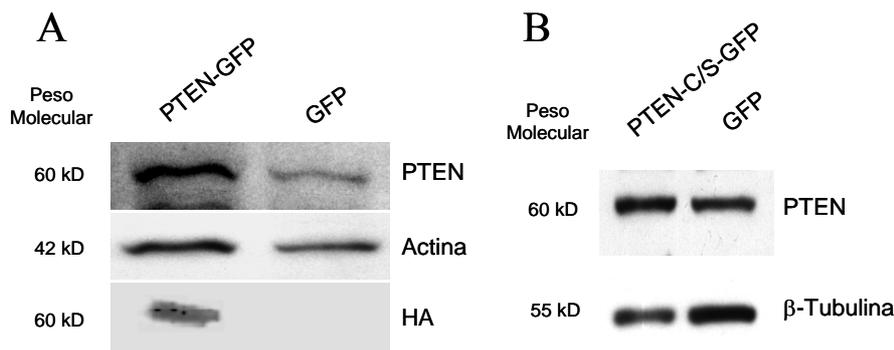


Fig. 17. Expresión de PTEN, hemaglutinina y β -tubulina en células madre de bulbo olfatorio infectadas con GFP, pRV-HA-PTEN-IRES/GFP y pRV-PTEN-C/S-IRES/GFP. Tres días después de ser infectadas con las construcciones retrovirales pRV-IRES/GFP (GFP) y pRV-HA-PTEN-IRES/GFP (cDNA PTEN) (A) o con pRV-IRES/GFP (GFP) y pRV-PTEN-C/S-GFP (PTEN dominante negativo) (B), las células madre de bulbo fueron pasadas y sembradas en condiciones de diferenciación durante tres días, en ausencia de insulina. Transcurrido este tiempo, se analizó la expresión de las proteínas indicadas mediante *Western blot*. Los anticuerpos empleados fueron, anti-hemaglutinina, anti-PTEN y anti β -tubulina. En las células infectadas con PTEN-IRES/GFP y con PTEN-C/S-GFP hubo 2,2 (n=3) y 3,1 veces más (n=2) de PTEN, respectivamente, que en los cultivos control GFP.

En consonancia con la sobreexpresión de PTEN mediante la infección con pRV-HA-PTEN-IRES/EGFP, encontramos también que sólo las células infectadas con la fosfatasa expresaban el epítipo HA (Fig. 17A).

4.3 Sobreexpresión de PTEN en CMBO.

4.3.1 Efecto de la sobreexpresión de PTEN durante la proliferación de CMBO.

Primero estudiamos de qué forma afectaba la sobreexpresión de PTEN a la proliferación de células madre neurales (Fig.18). Para ello, cultivamos las células infectadas en condiciones proliferativas y en presencia o ausencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina durante tres días. Estudios previos han demostrado que los efectos sobre la proliferación y la diferenciación celular de esta concentración de insulina son muy similares a los producidos por 100 ng/ml de IGF-I; por ello, empleamos estas concentraciones de los factores indistintamente (Vicario-Abejón y cols., 2003). Se añadió BrdU al cultivo 20-22 horas antes de la fijación. Después de este tiempo, fijamos y contamos las células positivas para BrdU y para GFP, de forma que sólo se cuantificaron las células proliferativas que sobreexpresaban PTEN. Estos resultados se presentan como valores relativos, normalizados respecto al valor obtenido en cultivos de células infectadas con GFP que son BrdU positivas. Dicho valor representó el 100% (Fig. 18).

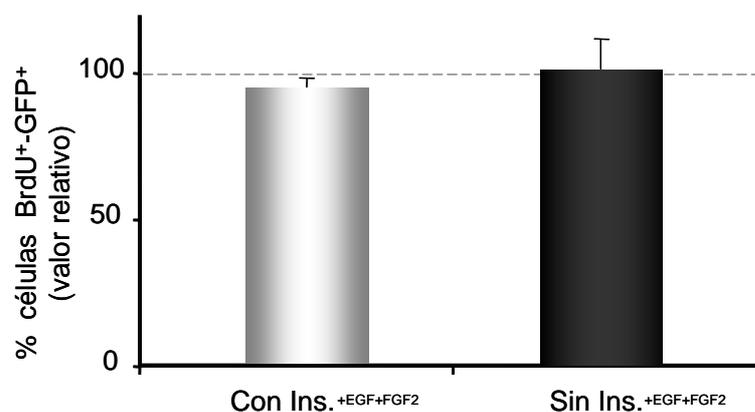


Fig. 18. Efecto de la sobreexpresión de PTEN sobre la proliferación de CMBO. Las células madre neurales fueron infectadas con las construcciones que contenían el cDNA de GFP (IRES-GFP), como control, y el cDNA quimérico de PTEN-HA (PTEN-IRES-GFP). Dos o tres días después de la infección se generaron neuroesferas en presencia de insulina, EGF y FGF-2. Estos agregados se disociaron y se sembraron manteniendo los factores mitogénicos en presencia (Con Ins.) o en ausencia de insulina (Sin Ins.). Se añadió BrdU (5 μM) durante 18 horas. Tras dos días de cultivo, se fijaron y se tiñeron con anticuerpos anti-BrdU y anti-GFP. Los datos de los contajes de células infectadas con PTEN y positivas para BrdU se presentan en barras como valores relativos normalizados respecto al valor (100%) obtenido en las células control, infectadas con GFP y positivas también para BrdU. Los resultados son la media \pm SEM de 4 cultivos de dos experimentos.

De esta forma, observamos la ausencia de diferencias significativas en la proliferación de células que sobreexpresaban PTEN con respecto a las células control, tanto en presencia como en ausencia de insulina en los cultivos.

4.3.2 Efecto de la sobreexpresión de PTEN durante la diferenciación de CMBO a neuronas y glía.

El siguiente paso fue estudiar si, al contrario de lo ocurrido en la proliferación, la sobreexpresión de PTEN tenía algún efecto sobre la diferenciación a los tres linajes neurales (Fig. 19). Para ello, cultivamos las células infectadas en condiciones de diferenciación y en presencia o ausencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina o 100 ng/ml de IGF-I durante tres días. Después de fijadas, se realizó una inmunotinción con los anticuerpos que reconocen neuronas (TuJ1), astrocitos (GFAP) y oligodendrocitos (O4). Se contaron las células doblemente positivas para estos marcadores y para GFP, de forma que solo se cuantificaron las células diferenciadas que sobreexpresaban PTEN. Estos resultados se presentan como valores relativos, normalizados respecto a los valores obtenidos en las células infectadas positivas para GFP y TuJ-1 o GFAP o O4, que representan el 100%. Se observó que en presencia de insulina, apenas había diferencias significativas en la cantidad de neuronas generadas a partir de células que sobreexpresaban PTEN respecto a las que no lo hacían (Fig. 19 A). En cambio, en ausencia de este factor de crecimiento, las diferencias fueron notables, puesto que en los cultivos que sobreexpresaban la fosfatasa existía una reducción de hasta 46% ($p < 0,05$) en el número de neuronas. Además, como cabía esperar, en ausencia de insulina hay menor diferenciación que en presencia del factor, lo que indica que en las células infectadas con PTEN la alta concentración de insulina puede contrarrestar la actividad de esta fosfatasa (datos no mostrados).

Este mismo efecto fue observado en la diferenciación a astrocitos puesto que, en ausencia de insulina, había una reducción del 35% ($p < 0,05$) del número de astrocitos en los cultivos infectados con el cDNA de PTEN. Al igual que ocurría en la diferenciación a neuronas, la alta concentración de insulina puede contrarrestar la actividad de esta fosfatasa (Fig. 13B) y, por lo tanto, esta no altera la diferenciación a astrocitos en esta última situación.

Finalmente, determinamos el efecto de la infección sobre el tercer linaje neural, el de los oligodendrocitos. En este ensayo las células se cultivaron en presencia o ausencia de 100 ng/ml de IGF-I (Fig. 19C). Al igual que en los casos anteriores, no se observó efecto en los cultivos tratados con IGF-I. En cambio, se observó una tendencia al alza en el número de oligodendrocitos en aquellas células que sobreexpresaban PTEN, respecto a las células control, cuando estas se cultivaron en ausencia de IGF-I o insulina (Fig. 19C). Por tanto, PTEN fue capaz de alterar la diferenciación de las CMBO a los tres linajes celulares, en ausencia de activación de la ruta bioquímica de PI3K/AKT por IGF-I o por insulina.

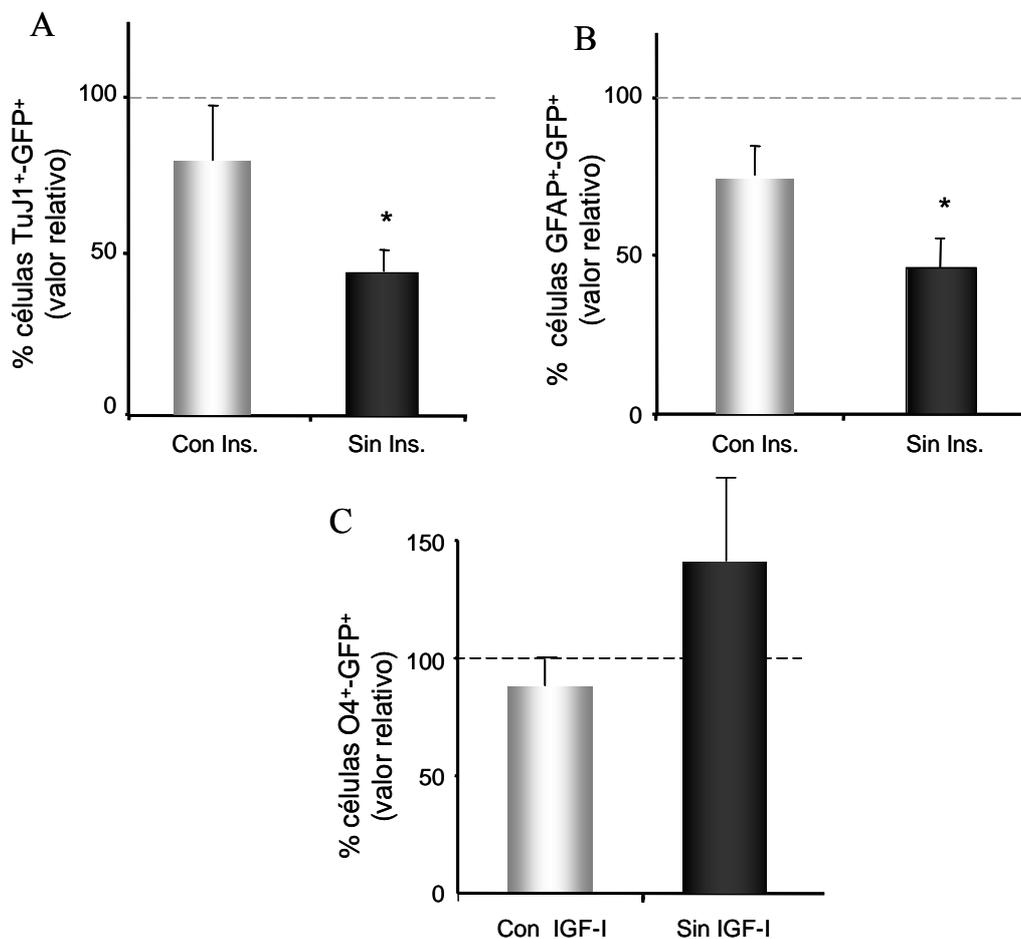


Fig. 19. Efecto de la sobreexpresión de PTEN sobre la diferenciación de CMBO a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Las células madre neurales fueron infectadas con las construcciones que contenían el cDNA de GFP (IRES-GFP), como control, y el cDNA quimérico de PTEN-HA (PTEM-IRES-GFP). Dos o tres días después de la infección, se generaron neuroesferas en presencia de insulina, EGF y FGF-2. Estos agregados se disociaron y se sembraron en condiciones de diferenciación, sin factores mitogénicos, en presencia o en ausencia de insulina o IGF-I. Tras tres días de cultivo, se fijaron y se tiñeron frente a los anticuerpos TuJ-1 (neuronas) (A), GFAP (astrocitos) (B) y O4 (oligodendrocitos) (C). Los datos de los contajes de células infectadas con PTEN y positivas para los diferentes marcadores se presentan en barras como valores relativos, normalizados respecto al valor (100%) obtenido en las células control, infectadas con GFP y positivas también para los marcadores de diferenciación. Los resultados son la media \pm SEM de 4-6 cultivos de tres experimentos. Los análisis estadísticos comparando los valores obtenidos con insulina y sin insulina se realizaron con el test *t* de Student. (* $p < 0,05$)

Para determinar si la reducción en la diferenciación era debida a un aumento de la apoptosis, se cuantificó el número de células muertas entre las células que sobreexpresaban PTEN y controles, en ausencia o en presencia de insulina e IGF-I, mediante la técnica de TUNEL. Como puede verse, la sobreexpresión de PTEN no aumentó el porcentaje de células TUNEL en ninguna condición experimental (Fig. 20B). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión moderada de PTEN inhibe la diferenciación de CMBO a neuronas y astrocitos sin afectar significativamente a la supervivencia celular.

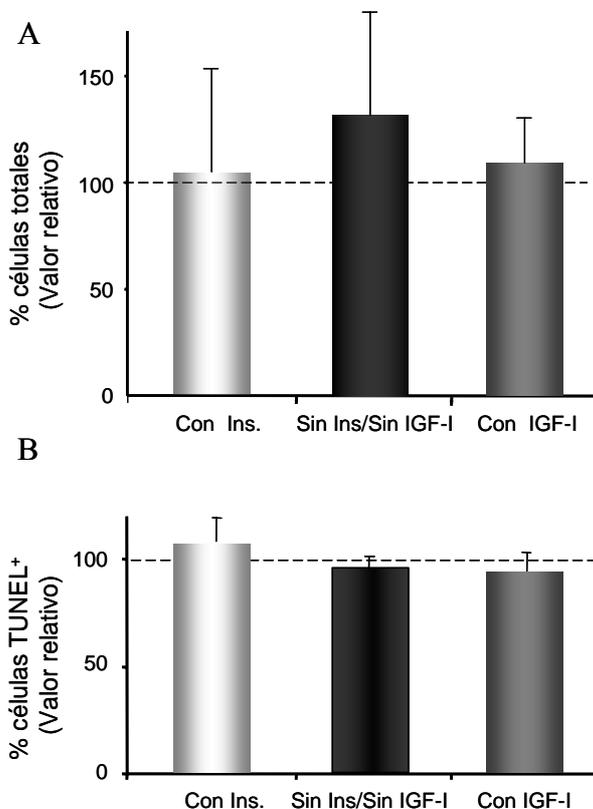


Fig. 20. Efecto de la sobreexpresión de PTEN sobre el número total de células y sobre la muerte celular durante la diferenciación de las CMBO. Las células madre neurales fueron infectadas con las construcciones que contenían el cDNA de GFP, como control, y el cDNA quimérico de PTEN-HA. Dos o tres días después de la infección se generaron neuroesferas en presencia de insulina, EGF y FGF-2. Estos agregados se disociaron y se sembraron en condiciones de diferenciación, sin factores mitogénicos, en presencia o en ausencia de insulina o IGF-I. Tras tres días de cultivo se fijaron y se procesaron para TUNEL. Los datos de los contejes de las células totales (A) y las células apoptóticas infectadas con PTEN y positivas para TUNEL (B) se presentan en barras como valores relativos respecto al valor (100%) obtenido en las células control, infectadas con GFP. Los resultados son la media \pm SEM de 6 cultivos de tres experimentos.

Respecto al número total de células, observamos que en los cultivos crecidos con IGF-I e insulina, no había diferencias significativas entre células que sobreexpresaban PTEN y las control GFP (Fig. 20 A).

Para abordar la posibilidad de que en cultivos que sobreexpresan PTEN, las células permanecieran en estado proliferativo, se sembraron células mutantes nulas para IGF-I en condiciones de diferenciación durante diez horas, en presencia o ausencia de IGF-I. Se observó que no había diferencias significativas entre los porcentajes de

células proliferativas (BrdU⁺) infectadas con PTEN (IGF-I: 15,6%, BSA: 8,6%) e infectadas con GFP (IGF-I: 17,49%, BSA: 7,79%) (n=4).

Otra forma de analizar la posible situación de indiferenciación de las células PTEN fue estudiar la evolución del marcador para precursores, nestina, en células también mutantes nulas para IGF-I. Estas se infectaron y se sometieron a condiciones de diferenciación durante dos días, y nuevamente se cultivaron en presencia o ausencia de IGF-I. Los resultados en cultivos que sobreexpresaban PTEN sembrados con IGF-I (71,4%) o con BSA (97,11%) y en los controles GFP, sembrados también con IGF-I (73,21%) o con BSA (96,63%) (n=4), mostraron que no había diferencias significativas en la expresión de nestina.

Ante la posibilidad de que dos días de diferenciación no fueran suficientes para observar los cambios en los niveles de nestina, se sembraron células madre nulas para IGF-I, infectadas y diferenciadas durante cinco días con IGF-I. Este factor se añadió para garantizar la supervivencia celular durante ese periodo, puesto que en su ausencia la tasa de mortalidad es muy elevada al quinto día de cultivo. Bajo estas condiciones, tampoco se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en la infección con PTEN-GFP (88,44%) o GFP (88,41%) (n=4).

4.3.3 Análisis de los niveles de P-AKT en células silvestres y nulas para IGF-I infectadas con pRV-PTEN-GFP y estimuladas con IGF-I.

Puesto que PTEN regula negativamente la actividad de PI3K, quisimos determinar el efecto de la sobreexpresión de PTEN sobre la fosforilación de AKT. Por esa razón sometimos a las células infectadas nuevamente a condiciones de diferenciación durante 24 horas, y mediante inmunoelectrotransferencia, analizamos los efectos de la sobreexpresión de PTEN sobre la ruta de PI3K/AKT (Fig. 21). Para ello estimulamos las células infectadas con PTEN/GFP con IGF-I (100 ng/ml) y con su control (BSA 0,001%) durante 30 minutos (similar a lo realizado en el apartado 2 de resultados). Al igual que ocurría en células no infectadas (Fig. 11 y 12), el IGF-I, estimula la fosforilación de AKT en los residuos de Serina 473 y Treonina 308 en células infectadas con las construcciones PTEN-GFP y GFP. En cambio no se observaron diferencias en los niveles de P-AKT estimuladas por IGF-I en los cultivos

que sobreexpresaron PTEN respecto a los que sobreexpresaron GFP. Las diferencias solo fueron significativas en los niveles basales de P-AKT, puesto que en células infectadas con PTEN, existió una reducción del 58,4% en la fosforilación basal de AKT en los dos residuos de Serina 473 y Treonina 308 en comparación con células infectadas con GFP (Fig. 21).

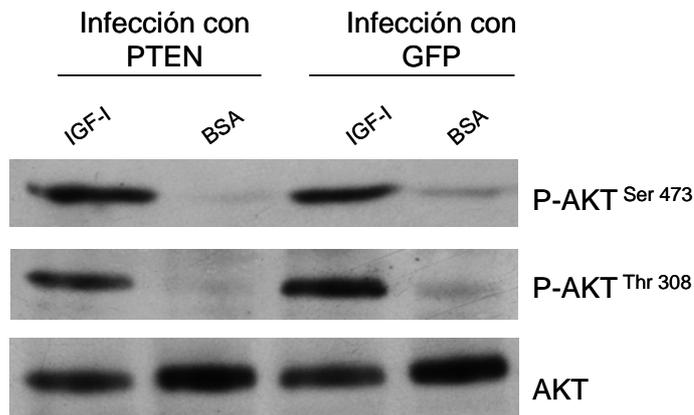


Fig. 21. Disminución de la expresión basal de P-AKT en células infectadas con PTEN. Las células madre neurales fueron infectadas con las construcciones que contenían el cDNA de GFP, como control, y el cDNA quimérico de PTEN-HA. Dos o tres días después de la infección se generaron neuroesferas en presencia de insulina, EGF y FGF-2. Estos agregados se disociaron y se sembraron 24 horas en condiciones de diferenciación en ausencia de insulina. Después se estimularon durante 30 minutos con IGF-I 100 ng/ml, o su control BSA 0,001%. Transcurrido ese tiempo, se analizó la expresión de la fosforilación de AKT en los residuos de serina y de treonina, mediante *Western blot*. Como puede observarse, la sobreexpresión de PTEN redujo los niveles basales de P-AKT. Los resultados son representativos de tres experimentos.

La ausencia de un fenotipo en los niveles de P-AKT tras la estimulación con IGF-I, podría deberse a que PTEN es incapaz de frenar la activación de la ruta bioquímica de PI3K/AKT debido a la alta concentración de este factor. Por eso, y para eliminar también el efecto del IGF-I endógeno, estimulamos células madre neurales mutantes nulas para IGF-I, y diferenciadas durante 24 horas, con distintas concentraciones de IGF-I. Diez ng/ml de este factor, aumentaron los niveles de P-AKT^{Ser 473}. Este efecto fue parcialmente suprimido (un 46%) por la sobreexpresión de PTEN. En cambio a concentración mas altas de IGF-I, la sobreexpresión de PTEN no disminuyó la activación de esta ruta (Fig. 22).

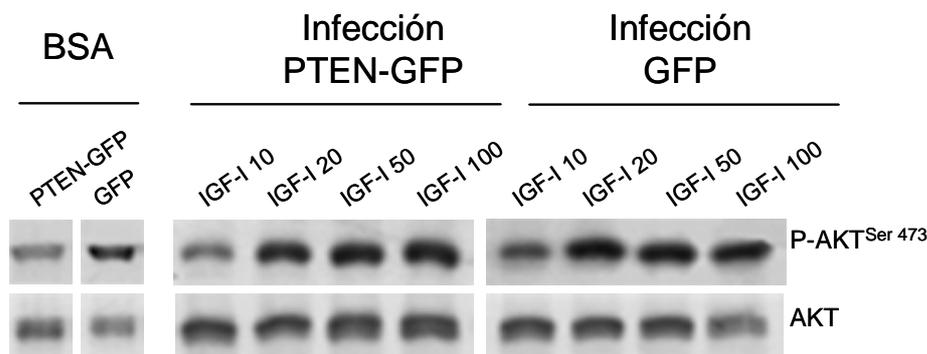


Fig. 22. Expresión de P-AKT^{Ser 473} en células madre neurales de ratón nulo para IGF-I infectadas con PTEN y estimuladas con diferentes dosis de IGF-I. Las células madre de bulbo olfatorio de ratón nulo para IGF-I fueron infectadas con las construcciones que contenían el cDNA de GFP, como control, y el cDNA quimérico de PTEN-HA. Cuatro días después de la infección se generaron neuroesferas en presencia de insulina, EGF y FGF-2. Estos agregados se disociaron y se sembraron en condiciones de diferenciación 24 horas y después se estimularon durante 30 minutos con IGF-I 10, 20, 50 y 100 ng/ml o su control BSA. Transcurrido ese tiempo, se analizó la expresión de la fosforilación de AKT en serina 473 mediante *Western blot*. Para poder observar los niveles basales y estimulados de P-AKT, las películas se revelaron durante distintos periodos y por ello se presentan separadas. Se obtuvieron resultados similares en otros dos experimentos.

4.4 Efecto de la sobreexpresión de la forma catalíticamente inactiva de PTEN (PTEN-C/S) en CMBO en fase de diferenciación.

Existen formas mutadas de proteínas y enzimas que, a través de un sitio de reconocimiento, compiten con las proteínas silvestres por el mismo sustrato, lo que puede generar una disminución de la actividad de este último, y alterar así el desarrollo normal de una ruta bioquímica. Una de estas formas es la dominante negativa de una enzima, una proteína mutada que es incapaz de realizar su actividad catalítica. Basándonos en este principio, estudiamos el efecto celular de la reducción de la actividad de PTEN, inhibiendo su expresión mediante la sobreexpresión de una forma mutada, catalíticamente inactiva. De esta manera, esperábamos obtener un fenotipo contrario al observado en el experimento de sobreexpresión del PTEN silvestre, es decir, corroborar el papel de PTEN en la diferenciación de neuronas y astrocitos.

En primer lugar, como se muestra en la figura 17, determinamos que la sobreexpresión de PTEN-C/S-GFP produjo un aumento de 3,1 veces en los niveles de PTEN. De modo similar al resultado obtenido en las células Jurkat (Lacalle y cols., 2004), la sobreexpresión de PTEN-C/S no produjo cambios en la fosforilación de AKT.

Se infectaron CMBO procedentes del ratón *igf-1*^{-/-} (para evitar las acciones del IGF-I endógeno) y se cultivaron en condiciones de diferenciación durante dos días en ausencia y en presencia de IGF-I 100 ng/ml. Después de este tiempo, se fijaron y, mediante tinción con anticuerpos que reconocen neuronas (TuJ1) y astrocitos (GFAP), y la GFP, se contaron, las células doblemente positivas para estos marcadores y para GFP, de forma que sólo se cuantificaron las células diferenciadas que sobreexpresaban PTEN-C/S. Estos resultados se presentan como valores relativos, normalizados respecto al valor obtenido en células infectadas con GFP, al que se asignó un valor del 100%.

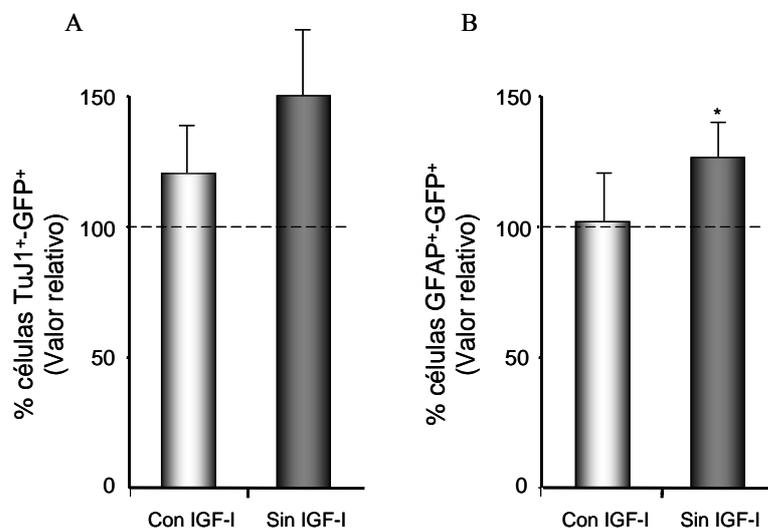


Fig. 23. Sobreexpresión de una forma mutada de PTEN (PTEN-C/S-GFP) en CMBO de ratón *Igf-1*^{-/-}. Las células madre de bulbo olfatorio de ratón nulo para IGF-I fueron infectadas con las construcciones que contenían el cDNA de GFP, como control, y el cDNA de la construcción dominante negativa de PTEN-C/S-GFP. Después de proliferar durante cuatro días estas células se sometieron a diferenciación, durante dos días, en presencia o en ausencia de IGF-I. Bajo estas condiciones, se cuantificó, mediante inmunotinción, el efecto de la sobreexpresión de PTEN-C/S dominante negativo sobre la diferenciación a neuronas (A) y astrocitos (B). Los datos de los conteos de células infectadas con PTEN-C/S-GFP y positivas para los dos marcadores se presentan en barras como valores relativos, normalizados respecto al valor (100%) obtenido en las células control, infectadas con GFP y positivas también para los dos marcadores de diferenciación. Los resultados son la media \pm SEM de 4-8 cultivos de dos experimentos. La sobreexpresión de PTEN-C/S provocó un aumento de las proporciones de células TuJ1 y GFAP del 52% y 42% respectivamente, en ausencia de IGF-I (* $p < 0,05$; test *t* de Student).

Respecto a la diferenciación a neuronas, se observó un aumento del 20% en el número de células TuJ-1 en aquellos cultivos que expresaban la forma mutada de PTEN en presencia de IGF-I. Este aumento llegó hasta el 52% cuando se crecieron las células en ausencia de IGF-I (Fig. 23A).

Un resultado similar se observó en la diferenciación de CMBO hacia astrocitos, donde apenas existieron diferencias en presencia de IGF-I. En cambio, en ausencia del factor, aumentó de forma significativa, un 42% ($p < 0,05$), la cantidad de astrocitos en células que expresaron PTEN-C/S-GFP, respecto a las células control (Fig. 23B).

Estos resultados apoyan el papel de PTEN en la diferenciación de células madre neurales a neuronas y astrocitos.

5. Papel de PI3K en la proliferación, diferenciación y muerte celular de las CMBO.

La inhibición de las rutas bioquímicas basada en los métodos genéticos, como los utilizados hasta el momento, presentan la ventaja de la especificidad. Pero las inhibiciones causadas por la sobreexpresión con vectores retrovirales raramente son totales, por lo que es posible que la importancia de una determinada proteína en la generación de un tipo celular sea mayor de la que se observa. Por esta razón, y de forma complementaria, decidimos recurrir a inhibidores farmacológicos capaces de reducir drásticamente la actividad de una ruta bioquímica. Para conseguir la eliminación casi completa de la actividad de la PI3K, usamos el inhibidor de esta enzima conocido como LY294002 (Vanhaesebroeck y cols., 2005), que disminuye las acciones mediadas por la ruta PI3K/AKT (Fig. 4).

5.1 Valoración de la reducción de los niveles de P-AKT y P-ERK1/2 en CMBO tratadas con LY294002.

Para poder determinar la eficiencia de este fármaco sobre la inhibición de PI3K, sembramos las células en condiciones de proliferación o diferenciación durante 48 horas en presencia de IGF-I. Las últimas 24 horas, tratamos las células con LY294002, ya que el tratamiento a tiempos más largos fue altamente tóxico. Se probaron diferentes dosis, siendo 30 μM la dosis que produjo una fuerte inhibición de PI3K en ausencia de clara toxicidad.

Así pues, se extrajeron las proteínas y mediante inmunoelectrotransferencia, se comprobó que en células proliferativas y diferenciadas, LY294002 era capaz de inhibir casi al 100% la fosforilación de AKT en el residuo regulador de Serina 473, mientras

que la inhibición de la fosforilación en el residuo catalítico de Treonina 308 no fue completa (Fig. 24 A). Para tratar de conocer si estaba alterada alguna otra ruta, debido a una posible inespecificidad de la droga, se determinaron los niveles de P-ERK 1/2. Se confirmó que, mientras en células en proliferación no había cambios en su fosforilación, en células diferenciadas disminuyeron levemente los niveles de P-ERK1 (pero no de P-ERK2) en presencia de LY294002 (Fig. 24 B).

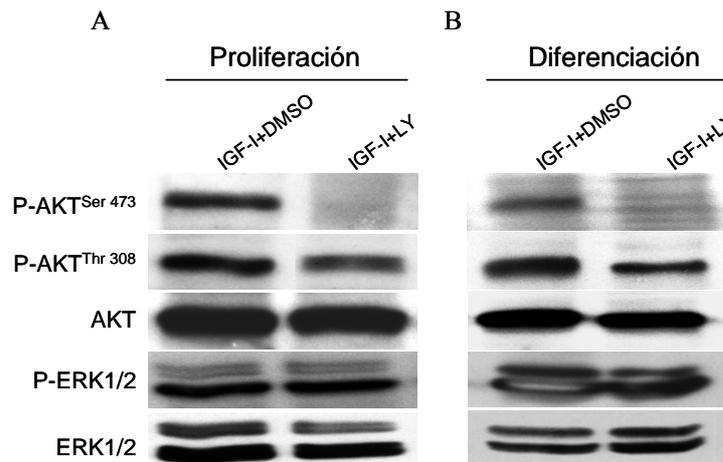


Fig. 24. Inhibición de la actividad de PI3K por LY294002 en células madre neurales. Las células se mantuvieron en condiciones de proliferación o diferenciación en presencia de IGF-I durante 24 horas. Tras ese periodo, se cultivaron con LY294002 (30 μ M) y 24 horas más en presencia de IGF-I. Después se recogieron los extractos proteicos y, mediante *Western blot*, se analizó la expresión de la fosforilación de AKT en los residuos de Serina 473 y de Treonina 308 y de ERK 1/2, en células en condiciones de proliferación (A) y de diferenciación (B). En ambas condiciones, la fosforilación de AKT en Serina 473 se redujo fuertemente mientras que en Treonina 308 la reducción fue más moderada. En las células diferenciadas los niveles de P-ERK1 disminuyeron moderadamente (pero no los de P-ERK2). Resultados representativos de tres experimentos.

5.2 Efectos de la inhibición de PI3K/P-AKT sobre la proliferación de las CMBO.

En algunos sistemas celulares, P-AKT es fundamental no solo para el mantenimiento de la supervivencia, sino también para la proliferación (Sinor y cols., 2004). Por eso quisimos analizar el efecto celular de la ausencia parcial de fosforilación de AKT sobre la proliferación y apoptosis de las CMBO (Fig. 25).

Las células se crecieron en condiciones de proliferación durante dos días en presencia o ausencia de 100 ng/ml de IGF-I y su control (BSA 0,001%), y se trataron con el fármaco LY294002 las últimas 24 horas. Después de este tiempo, las células se

fijaron, y mediante inmunotinción para BrdU (Fig. 25B-E) y la técnica de TUNEL (Fig. 26 C-F), pudimos cuantificar el número de células proliferativas y apoptóticas respectivamente.

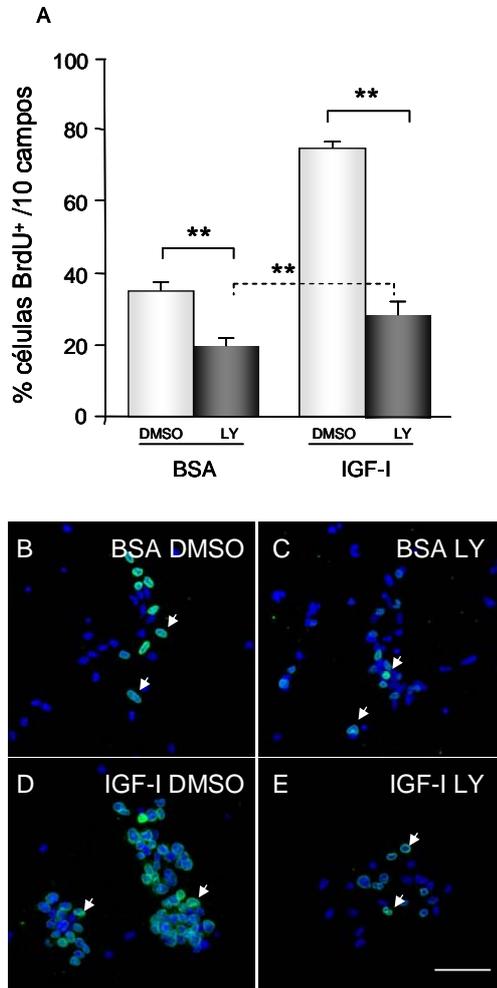


Fig. 25. Proliferación de células madre neurales en presencia de LY294002 y cultivadas con IGF-I/BSA. Las células madre de bulbo olfatorio proliferaron durante 48 horas en presencia de IGF-I (A,D,E) y su control BSA (A-C). Las últimas 24 horas se cultivaron con LY294002 30 μ M (C,E) y su vehículo DMSO (B,D). Se incubaron con BrdU 5 μ M durante 22 horas antes de la fijación. Posteriormente se fijaron y mediante inmunotinción, se cuantificó el número absoluto de células proliferativas en cada uno de los tratamientos (A). La adición de LY294002 produjo una reducción significativa del número de células BrdU⁺ en presencia de BSA o IGF-I. Los resultados son la media \pm SEM de 4-6 cultivos de 2-3 experimentos. Los análisis estadísticos comparando los valores obtenidos con cada tratamiento se realizaron con el test de la *t* de Student. (* p <0,05,** p <0,01). Escala: 38 μ m.

Bajo estas condiciones, la proliferación disminuyó muy significativamente tanto en ausencia (un 46%, p <0,05) como en presencia (un 56%, p <0,05) de IGF-I (Fig. 25). La reducción fue proporcionalmente mayor en el caso de los cultivos tratados con este factor. A pesar de ello, los niveles de BrdU⁺ en células tratadas con LY294002 y cultivadas con IGF-I, no alcanzaron los niveles basales obtenidos en las células tratadas también con el fármaco, pero en ausencia de IGF-I (comparar barras negras). Existió una diferencia del 40% entre ambos valores, que podría estar justificada por la actividad de otras rutas ajenas a AKT o por la P-AKT^{Thr 308}, activada en presencia de IGF-I (Fig. 24A).

Posteriormente, hicimos un conteo del número total de células para comprobar si se reflejaban en este número los cambios producidos por la droga durante la proliferación. Efectivamente, disminuyó la cantidad total de células, cuando a estas se les inhibía PI3K. Sin embargo las reducciones fueron menores que la producida en el porcentaje de células BrdU-positivas (BSA: 21%, no significativa; IGF-I: 27%, $p < 0,05$) (Fig. 26A).

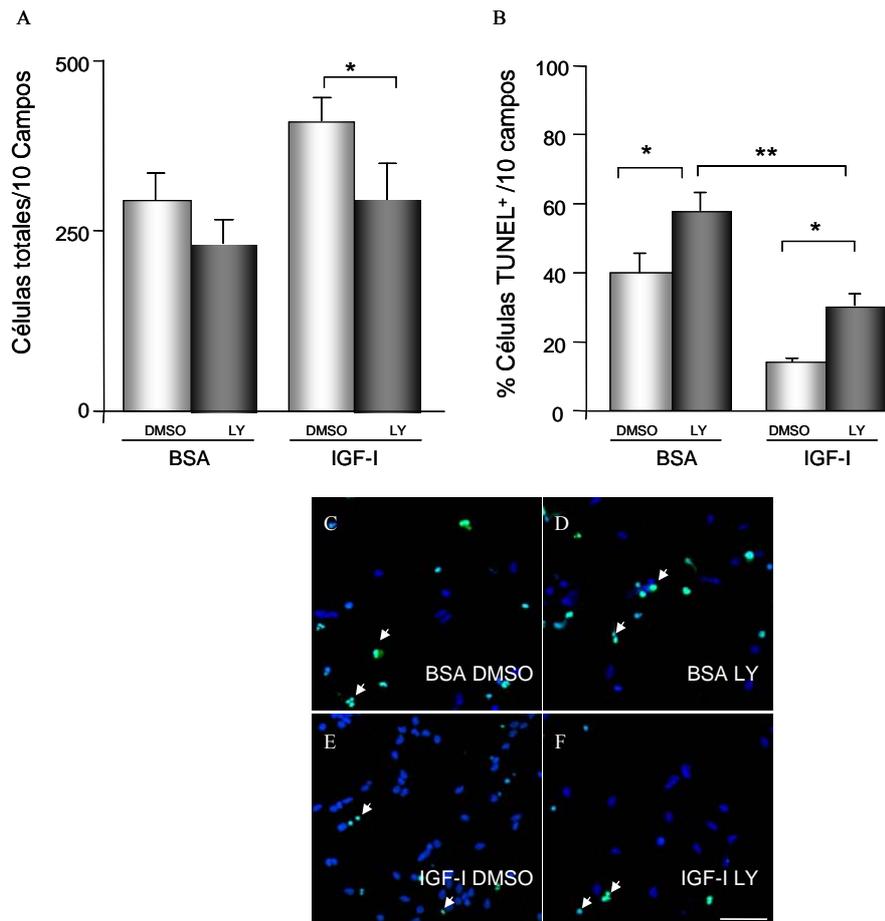


Fig. 26. Efecto de LY294002 sobre el número total de células y células apoptóticas en fase de proliferación, cultivadas con IGF-I o BSA. Las células madre de bulbo olfatorio proliferaron durante 48 horas en presencia de IGF-I (E,F) y su control BSA (C,D). Y las últimas 24 horas se cultivaron con LY294002 30 μ M (D,F) y su control DMSO (C,E). Posteriormente, se fijaron y se cuantificó el número total de células (A) y, mediante TUNEL, el número de células apoptóticas (B). La adición de LY294002 produjo una reducción significativa del número total de células cuando estas se cultivaron con IGF-I y un aumento significativo en el porcentaje de células TUNEL⁺ en presencia de IGF-I y BSA. Los resultados son la media \pm SEM de 4-6 cultivos de 2-3 experimentos. Los análisis estadísticos comparando los valores obtenidos con cada tratamiento se realizaron con el test de la *t* de Student. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Escala: 22 μ m

El último abordaje en los cultivos en fase de proliferación fue el referido al efecto de LY294002 sobre la muerte celular programada, medida por la técnica de

TUNEL (Fig. 26 B). En este caso, los resultados tienen un perfil contrario al obtenido sobre las células proliferativas, ya que cuando se redujo P-AKT, aumentaron de forma significativa en un 32% ($p < 0,05$) el número de células apoptóticas en presencia de BSA, y en un 50% ($p < 0,01$) en cultivos con IGF-I. Como puede observarse, el IGF-I protegió, parcialmente, a las células de la muerte inducida por LY294001 (comparar valores de las barras negras).

5.3 Efectos de la inhibición de PI3K/P-AKT sobre la diferenciación de CMBO.

Una vez comprobado que la sobreexpresión de PTEN reducía los niveles de neuronas y astrocitos, analizamos cual era el efecto de la inhibición de la ruta bioquímica de señalización PI3K/AKT por LY294001 sobre la diferenciación de CMBO (Fig. 27).

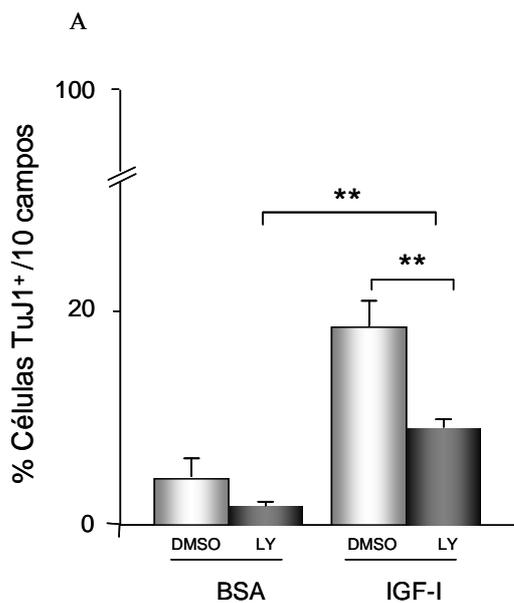
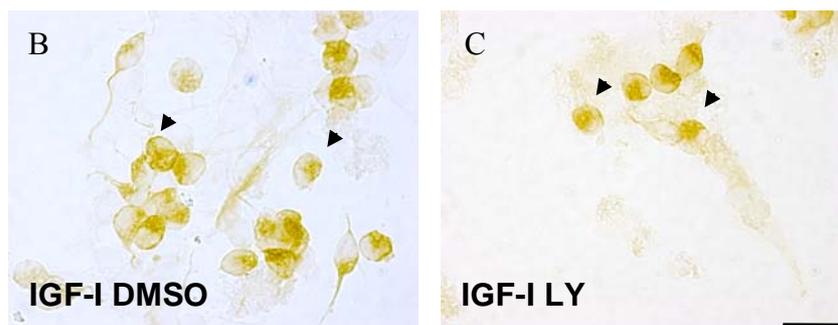


Fig. 27. Efecto de LY294002 sobre la diferenciación a neuronas de CMBO cultivadas con IGF-I o BSA. Las células madre de bulbo olfatorio se diferenciaron durante 48 horas en presencia de IGF-I y su control BSA. Y las últimas 24 horas se cultivaron con LY294002 30 μ M (C) y su control DMSO (B). Posteriormente, se fijaron y, mediante inmunotinción, se cuantificó el número absoluto de neuronas (TuJ-1). La adición de LY294002 produjo una reducción significativa del número de células TuJ1⁺ en presencia de IGF-I y BSA. Los resultados son la media \pm SEM de 4-6 cultivos de 2-3 experimentos. Los análisis estadísticos comparando los valores obtenidos con cada tratamiento se realizaron con el test de la *t* de Student. (** $p < 0,01$). Escala: 25 μ m.



Para ello, las células se crecieron en a condiciones de diferenciación durante dos días en presencia o ausencia de 100 ng/ml de IGF-I y su control BSA 0,001% y se trataron con el fármaco LY294002 y su control DMSO las últimas 24 horas. Posteriormente, las células se fijaron y mediante la inmunotinción con anticuerpos contra β -III-tubulina (TuJ-1) (Fig. 27) y GFAP (Fig. 28) y la aplicación de la técnica de TUNEL (Fig. 29), pudimos cuantificar el número de neuronas, astrocitos y células apoptóticas, respectivamente.

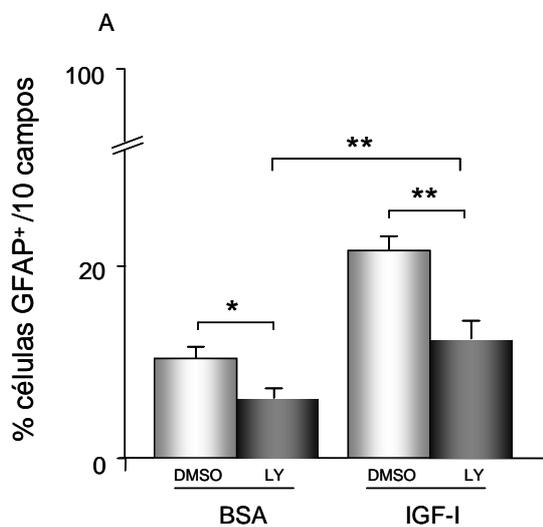
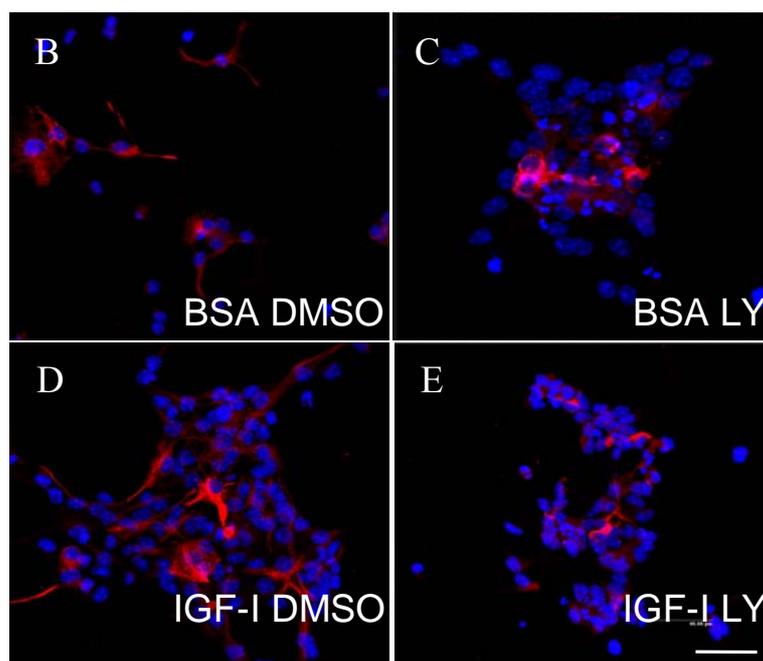


Fig. 28. Efecto de LY294002 sobre la diferenciación a astrocitos de CMBO cultivadas con IGF-I o BSA. Las células madre de bulbo olfatorio se diferenciaron durante 48 horas en presencia de IGF-I (D,E) y su control BSA (B,C). Y las últimas 24 horas se cultivaron con LY294002 30 μ M (C,E) y su control DMSO (B,D). Posteriormente se fijaron, y mediante inmunotinción, se cuantificó el número absoluto de astrocitos (GFAP). La adición de LY294002 produjo una reducción significativa del número de células GFAP⁺ en presencia de IGF-I y BSA. Los resultados son la media \pm SEM de 4-6 cultivos de 2-3 experimentos. Los análisis estadísticos comparando los valores obtenidos con cada tratamiento se realizaron con el test de la *t* de Student. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Escala: 40 μ m.



En lo que respecta a la diferenciación a neuronas, la inhibición de PI3K por LY294002 produjo una reducción significativa del 51% ($p < 0,01$) en el número de células TuJ-1 positivas en los cultivos tratados con IGF-I. Se apreció también una disminución del 58% en cultivos basales o tratados con BSA, aunque en este caso no fue estadísticamente significativo. La presencia de IGF-I protegió parcialmente a las células de los efectos de LY294002 (comparar los valores representados por las barras negras) (Fig. 27 A).

LY 294002 también ejerció un efecto sobre la diferenciación de CMBO a astrocitos, donde se observó una disminución significativa del 40% ($p < 0,001$) y del 43% ($p < 0,001$) del número de astrocitos, en cultivos tratados con BSA e IGF-I respectivamente. Al igual que en el caso de la diferenciación a neuronas, la presencia de IGF-I protegió sólo parcialmente a las células de los efectos de LY294002 (comparar los valores representados por las barras negras) (Fig. 28 A).

La pregunta que surgió después de observar estos resultados, fue similar a la realizada tras los experimentos de sobreexpresión de PTEN. Es decir, la disminución del número de neuronas y astrocitos podría deberse al aumento de la muerte celular causado por LY294002 o a una inhibición específica de la diferenciación en ausencia de muerte. Para distinguir entre las dos posibilidades, aplicamos la técnica de TUNEL a las células diferenciadas durante dos-tres días. Como puede observarse en la Fig. 29, la fuerte disminución de la fosforilación de AKT provocó un aumento del 10% (no significativo) y del 27% ($p < 0,01$) en el número de células apoptóticas en cultivos tratados con BSA e IGF-I, respectivamente (Fig. 29A), incrementos inferiores a las disminuciones en los números de neuronas y astrocitos (Fig. 27,28). Los datos confirman un papel importante de la ruta bioquímica de PI3K/AKT en la regulación de la diferenciación de CMBO.

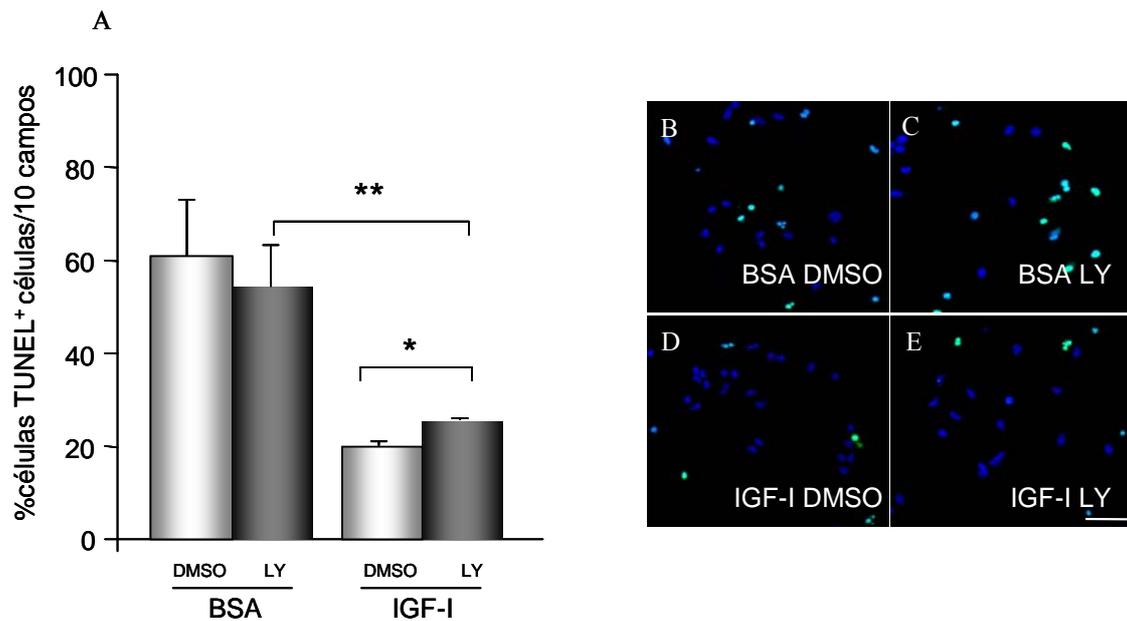


Fig. 29. Efecto de LY294002 sobre la supervivencia celular durante la diferenciación de CMBO cultivadas con IGF-I o BSA. Las células madre de bulbo olfatorio se diferenciaron durante 48 horas en presencia de IGF-I (D,E) y su control BSA (B,C). Las últimas 24 horas se cultivaron con LY294002 30 μ M (C,E) y su control DMSO (B,D). Posteriormente se fijaron y, mediante la técnica de TUNEL, se cuantificó el número de células apoptóticas. La adición de LY294002 produjo un aumento significativo del 27% en el número de células TUNEL⁺ en presencia de IGF-I. Los resultados son la media \pm SEM de 4-6 cultivos de 2-3 experimentos. Los análisis estadísticos comparando los valores obtenidos con cada tratamiento se realizaron con el test de la *t* de Student. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Escala: 20 μ m.

6. Papel de ERK 1/2 en la proliferación, diferenciación y muerte celular de las CMBO.

Determinados procesos como el de la supervivencia celular, debido a su importancia, deben estar controlados por múltiples rutas de señalización interrelacionadas. Hemos observado hasta ahora, en contra de lo esperado, que AKT no parece ejercer una función crítica en la inhibición de la apoptosis durante la diferenciación de CMBO. Por lo tanto, deben existir otras proteínas que controlen este proceso. Una ruta candidata es la ruta ERK 1/2, basándonos en su elevada expresión en nuestro sistema de CMBO, independiente de la presencia de IGF-I (Fig. 11 y 12) y en datos de la bibliografía (Weng y cols., 2001).

Para conocer el alcance de la implicación de esta proteína en la regulación de diferentes procesos biológicos en las células madre de bulbo olfatorio, decidimos inhibir su actividad mediante el fármaco U0126 (Fig. 4).

6.1 Efectos de la inhibición de P-ERK 1/2 durante la proliferación de CMBO.

Para conocer los efectos de la inhibición de ERK1/2 sobre la proliferación de CMBO, crecimos las células durante dos días en presencia de 100 ng/ml de IGF-I y posteriormente se trataron con diferentes dosis (5, 15, 30, 40 y 50 μ M) del fármaco U0126 y su control DMSO 1% las últimas 24 horas. Después de este tiempo las células se fijaron y, mediante la inmunotinción para BrdU y la aplicación de la técnica de TUNEL, pudimos cuantificar el número de células proliferativas y apoptóticas respectivamente (Fig. 30).

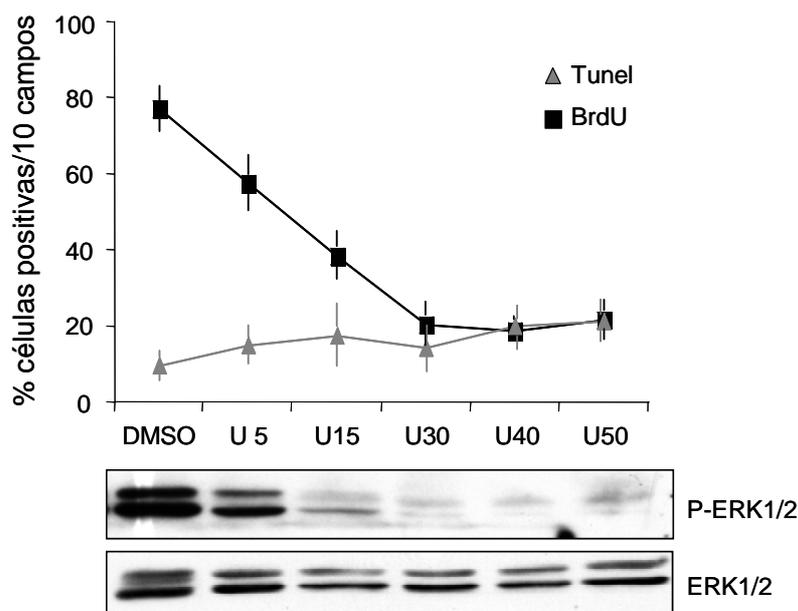


Fig. 30. Efecto de U0126 durante la proliferación de CMBO. Las CMBO proliferaron durante 48 horas en presencia de IGF-I y su control BSA. Las últimas 24 horas se cultivaron con diferentes dosis de U0126 (5,15,30,40 y 50 μ M), y su control DMSO. Se les incubó con BrdU 5 μ M durante 22 horas antes de la fijación. Posteriormente, se fijaron y, mediante inmunotinción para BrdU y la técnica de detección de muerte celular programada (TUNEL), se cuantificó el número absoluto de células proliferativas y apoptóticas en cada uno de los tratamientos. Mediante *Western blot* se comprobó que el cultivo con las diferentes dosis de U0126 produjo una reducción gradual de los niveles de P-ERK1/2. Esta reducción también se observó en los porcentajes de células BrdU⁺. En cambio las células TUNEL⁺ aumentaron ligeramente en paralelo a la desaparición de P-ERK1/2. Los resultados son la media \pm SEM de 4-6 cultivos de dos tres experimentos.

Observamos un efecto dosis-dependiente del fármaco sobre los niveles de la fosforilación de ERK1/2, y a partir de 30 μ M la inhibición fue casi completa. En

paralelo a la disminución de la fosforilación de ERK1/2, se redujeron los porcentajes de células BrdU positivas desde un 80% en DMSO a un 20% en los cultivos incubados con más de 30 μ M de U0126 (Fig. 30).

De forma menos dramática, el porcentaje de células TUNEL positivas aumentó ligeramente en los cultivos con las dosis mas bajas del inhibidor, alcanzando valores de 19,86% a partir de los 40 μ M, debido probablemente a los efectos tóxicos de esas concentraciones (Fig. 30).

6.2 Efectos de la inhibición de P-ERK1/2 durante la diferenciación de CMBO.

El siguiente paso fue conocer los efectos de la inhibición de ERK 1/2 sobre la diferenciación de las CMBO y, para ello, se cultivaron células diferenciadas durante dos días en presencia de 100 ng/ml de IGF-I y se trataron con diferentes dosis (1,5, 5, 15 y 30 μ M) del fármaco U0126 o su control DMSO 1%, las últimas 24 horas. Después de este tiempo, las células se fijaron y, mediante inmunotinción para TuJ-1 y GFAP y la técnica de TUNEL, pudimos cuantificar el número de neuronas, astrocitos y células apoptóticas, respectivamente.

Como puede observarse en la Fig. 31, al aumentar la dosis de fármaco se fueron reduciendo los niveles de fosforilación de las ERK, y a partir de 15 μ M, la reducción fue prácticamente completa.

Bajo estas condiciones, los niveles de células TUNEL positivas fueron aumentando hasta alcanzar un máximo del 50% con la dosis de U0126 30 μ M. En cambio, el número de neuronas y astrocitos, se redujo de forma drástica desde la dosis de 1,5 μ M. Las neuronas presentaron una mayor sensibilidad que los astrocitos a la inhibición de ERK 1/2. Esta tendencia fue similar a la de la inhibición de la supervivencia, lo que sugería que la reducción en el número de neuronas o astrocitos era debida al aumento de la muerte de estas células y no a la inhibición de su diferenciación (Fig. 31).

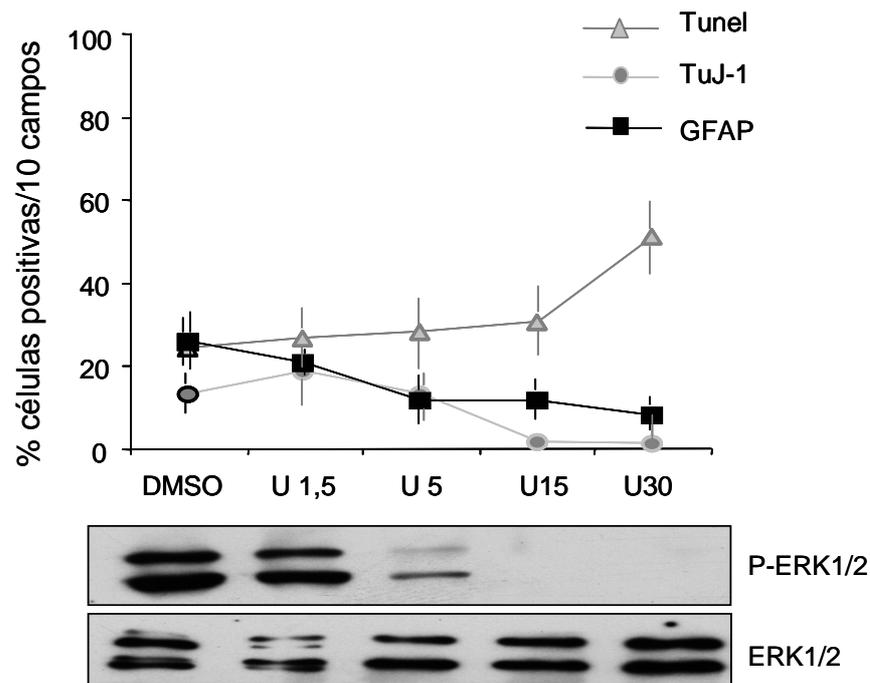


Fig. 31. Efecto de U0126 durante la diferenciación de CMBO. Las CMBO se diferenciaron durante 48 horas en presencia de IGF-I y su control BSA. Y las últimas 24 horas se cultivaron con diferentes dosis de U0126 (1,5 ,5,15 y 30 μ M) y su control DMSO. Posteriormente, se fijaron y, mediante inmunotinción para neuronas (TuJ-1) y astrocitos (GFAP) y la técnica de detección de muerte celular programada (TUNEL), se cuantificó el número absoluto de células diferenciadas y apoptóticas en cada uno de los tratamientos. Mediante *western blot* se comprobó que el cultivo con las diferentes dosis de U0126 produjo una reducción gradual de los niveles de P-ERK1/2. Esta reducción también se observó en los niveles de neuronas y astrocitos, siendo las primeras más sensibles al tratamiento. En cambio las células TUNEL⁺ aumentaron de forma proporcional a la desaparición de P-ERK1/2. Los resultados son la media \pm SEM de 4-6 cultivos de 2-3 experimentos.

1. Células progenitoras de retina embrionaria

La red de señalización que se establece durante el desarrollo del SNC parece garantizar el mantenimiento de la cantidad necesaria de células madre y progenitoras. En los tejidos maduros, la utilidad de estas células reside en su potencial capacidad de regeneración de tejidos dañados. Por ello, aprender a modificar la potencialidad de las células madre neurales, nos acerca cada día más a la posibilidad de aplicar terapias celulares que permitan restaurar tejidos dañados por traumatismos o enfermedades neurodegenerativas, tales como la *retinosis pigmentaria*, donde mueren los fotorreceptores, o el glaucoma, donde mueren las células ganglionares. En los últimos años, bastantes grupos se han especializado en el aislamiento y análisis de la plasticidad de las células madre y progenitoras. Para llegar a conocer el control del desarrollo *in vivo*, las células madre neurales de bulbo olfatorio y precursores de retina son un buen modelo experimental que permite estudiar los efectos biológicos y mecanismos de acción de factores extracelulares y los componentes de rutas bioquímicas de señalización.

Las células madre neurales se han aislado de diferentes regiones del sistema nervioso central, como en la zona subventricular, el bulbo olfatorio, el giro dentado y el cerebelo, entre otros (Temple 2001; Vicario-Abejón 2003). También se han aislado células madre neurales a partir de la retina de ratón adulto (Tropepe y cols., 2000. Ahmad y cols., 2000). En cambio, hasta el momento no se ha encontrado ninguna célula que presente las características de autorrenovación y multipotencialidad para diferenciarse en neuronas y glía, que definen las CMN, en retina de ratón embrionario temprano. Con estos datos como referencia, un objetivo de esta tesis ha sido tratar de obtener y expandir en cultivo células madre neurales de la retina de ratón embrionario.

La diferenciación a neuronas en la retina embrionaria temprana se da de forma gradual y con una distribución central a periférica, tal y como está descrito en vertebrados (Prada y cols., 1991). En la retina de ratón de E12,5, las neuronas solo ocupan la región correspondiente a la salida del nervio óptico, mientras que en la de E13,5 llegan casi hasta la periferia. En ambas edades, la tasa proliferativa en la parte dorsal de la retina es muy elevada y, además, a E13,5 el marcador de precursores neurales, nestina, se expresa en casi toda la retina. Todas estas características favorecen

la posibilidad de hallar células madre en la retina a estas edades, motivo por el que se eligió la edad de E13,5 para intentar aislar estas células.

Hasta el momento sólo se han encontrado células precursoras multipotentes en la retina embrionaria, capaces incluso de generar oligodendrocitos, pero con una escasa o nula capacidad de autorrenovación, por lo que no se las puede considerar células madre (Lillien y Cepko, 1992; Ahmad y cols., 1999; Ahmad 2004). Conociendo los efectos de varios factores de crecimiento mitogénicos para células neuroepiteliales, sembramos células embrionarias de retina de E13,5 y las tratamos con FGF-2, EGF, NT-3, CNTF y TGF- α , en un medio que contiene insulina (10 μ g/ml), sin lograr un efecto proliferativo sostenido. Nuestros cultivos están compuestos de células aisladas de la retina neural, por lo que se pierde el contacto con el epitelio pigmentario, que es un tejido que difunde factores de proliferación y suministra componentes de la matriz extracelular (ME). Por tanto, ante la posibilidad de que al disociar las células éstas pierdan la interacción con moléculas de la ME necesarias para la proliferación y la supervivencia (Reh y cols., 1988), estudiamos también los efectos de los componentes de ME, laminina, fibronectina y el compuesto Matrigel[®], en nuestro cultivo. De todos ellos, la combinación de la laminina, el FGF-2 y la heparina promovieron la formación de agregados celulares, aunque de forma aislada la laminina sola no tuvo efecto. Esto significa que esta última es necesaria para que el FGF-2 favorezca la supervivencia, proliferación y agregación de los precursores de retina. Sin embargo, aún en estas condiciones, las células son incapaces de autorrenovarse, pierden progresivamente la expresión de nestina y la capacidad de incorporación BrdU, y aumentan su tendencia a diferenciarse a neuronas. Por tanto, estos resultados no nos permiten considerar aisladas células madre en la retina de ratón embrionario E13,5, pero sí precursores, con una capacidad de proliferación limitada. Estos precursores son menos efectivos para dividirse que los descritos en edades más avanzadas, E17-18. Según datos anteriores, los precursores tardíos de retina embrionaria tienen mayor potencialidad para proliferar y generar más tipos celulares (Ahmad y cols., 1999). Además, lo que diferencia esta capacidad a lo largo del tiempo, es la sensibilidad de los precursores a diferentes factores autocrinos y paracrinos (Lillien y Cepko, 1992; Tropepe y cols., 2000, James y cols., 2003).

También se ha descrito la laminina como un factor que estimula la diferenciación celular (Drago y cols. 1991; Wu y cols., 2002), lo que podría explicar el aumento de la expresión de TuJ1 en los cultivos de retina de E13,5. No obstante, las CMBO proliferan de forma considerable en presencia de laminina. Estos resultados sugieren que, además de FGF-2 y laminina las células neuroepiteliales de retina embrionaria precisan la activación de señales adicionales, promovidas por factores de crecimiento o transcripción, que las permitan proliferar y autorrenovarse, procesos necesarios durante el desarrollo. Una de las moléculas clave que actúa como mitógeno en células neuroepiteliales es el EGF. Mientras que en presencia de este factor nuestras células no proliferan, las células progenitoras de retina de E17-18,5 lo hacen hasta formar esferas, aunque sin capacidad de autorrenovación (Ahmad y cols., 1999; Akagi y cols., 2003). Según las investigaciones del grupo de Takahashi, las células de retina adultas pueden crecer en presencia de EGF, FGF-2 y heparina (Akagi y cols., 2003). Todos estos hallazgos sugieren que, a distintas edades, la sensibilidad de estas células a EGF y a FGF-2 va variando probablemente por cambios en la expresión de los correspondientes receptores.

La combinación de FGF-2, laminina y heparina genera un efecto totalmente contrario en las CMBO, cuya proliferación aumenta con los días de cultivo. La respuesta de las células de BO, en contraste con la de las de retina, indica que la acción de la combinación de factores es diferente en distintas partes del SNC.

Los precursores neuroepiteliales de la mayoría de las regiones del sistema nervioso central tienden a diferenciarse en cultivo (Reh y cols., 1988; Vicario-Abejón y cols., 1995). Salvo los de retina embrionaria, especialmente la temprana, los precursores responden a FGF-2, EGF y a los miembros de la familia de la insulina autorrenovándose (Vicario-Abejón y cols., 2003; Anderson, 2001). Por el contrario, los datos mostrados en esta tesis, avalados por otros grupos (Ahmad y cols., 2004), sugieren que la proliferación de los precursores de retina está finamente regulada durante el desarrollo y la edad adulta por la activación de determinados componentes, que incluyen FGF-2, heparina y laminina, además de otros no caracterizados.

Un problema que plantean los estudios *in vitro* es la pérdida del contacto de célula a célula que, quizás, permite el mantenimiento del carácter celular multipotente *in vivo*. Esto podría estar mediado por señales de origen autocrino y los mecanismos de inhibición lateral. Uno de los sistemas más comunes de inhibición por contacto es el formado por Delta-Notch, que en el neuroepitelio de ratón y pollo regula el número de progenitores y su supervivencia (Henriques y cols., 1997; Vicario-Abejón y Yusta-Boyo 2004). En el margen ciliar de la retina de rata adulta y embrionaria entre E14 y E18, se expresa el receptor Notch, y su ligando Delta aumenta su expresión desde la edad embrionaria a la adulta. Además, la ausencia de Notch en el ratón provoca una disminución en el número de progenitores de retina (Jadhav y cols., 2006). Al igual que esta señalización, otros sistemas moleculares se podrían estar perdiendo en células aisladas, como Wnt-Frizzled o c-kit/SCF, que promueven la formación de neuroesferas en células obtenidas del margen ciliar de la retina adulta. Alguno de estos factores podría influir sobre nuestro sistema de cultivos de células de retina. De echo en E13,5 la alta densidad juega un papel crucial en la supervivencia, sugiriendo que la cercanía entre las células podría activar diversas rutas (Ahmad y cols., 2004).

En varios estudios llevados a cabo fundamentalmente por el grupo de T. Reh, determinan que dentro de la retina de pollo embrionario y adulto, la glía de Müller podría actuar como célula progenitora multipotente en respuesta al daño celular. Al igual que el resto de las células de retina, el comportamiento de la glía de Müller depende también de su microambiente. *In vivo* responden a la presencia de FGF-2 e insulina (Fischer y cols., 2002a). Por eso podría ser interesante analizar si estas células son activas como células madre neurales en cultivo.

Otra posible fuente de células madre en aves y anfibios es la transdiferenciación del epitelio pigmentario. Este segmento de la retina aporta soporte trófico esencial a los fotorreceptores. Y aunque tenga funciones muy diferentes a las de la retina neural, su origen embrionario es el mismo; por lo tanto, no es sorprendente que algunas de sus células tengan la misma potencialidad (Hitchcock y cols., 2004). Cuando se genera un daño en la retina, algunas células del epitelio pigmentario comienzan a proliferar hasta generar un neuroepitelio germinal, capaz de diferenciarse a cualquier tipo celular de la retina (Del Rio-Tsonis y cols., 2003).

En base a estos resultados y otros publicados, podemos decir que lo que posiblemente limita la potencialidad de las células neuroepiteliales de retina embrionaria no es su carácter intrínseco celular, si no las señales de su microambiente. Así, el balance entre factores mitogénicos e inhibidores de la proliferación determina el nivel final de progenitores en la retina embrionaria y postnatal. Cuando se conozca la combinación de estos factores, se podrá reproducir *in vitro* este microambiente y obtener y expandir células madre de retina embrionaria temprana.

2. El IGF-I, la PI3K/AKT y PTEN controlan el desarrollo de las CMN

El IGF-I es una proteína clave en el desarrollo del SNC, modulando procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular (Varela-Nieto y cols., 2003; Vicario-Abejón y cols., 2004; Russo y cols., 2005). En su ausencia, el bulbo olfatorio presenta deficiencias en la formación de la capa de células mitrales y, en conjunto, alteraciones en la organización laminar. Además, en cultivo este factor garantiza una mayor proliferación de CMBO y su diferenciación a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Vicario-Abejón y cols., 2003; Pichel y cols., 2003). Estos efectos podrían realizarse a través de la activación de vías bioquímicas de señalización, mediadas por AKT y ERK, entre otras moléculas. El objetivo de nuestro trabajo es definir las proteínas efectoras de la acción del IGF-I en el bulbo olfatorio durante su desarrollo embrionario y, más específicamente, en células madre neurales.

Los niveles de P-ERK1/2 se mantienen elevados en las CMBO en condiciones de proliferación y diferenciación y, además, su fosforilación es independiente de la acción del IGF-I. En cambio, los niveles basales de la fosforilación en los residuos de Serina y Treonina de AKT1, la más abundante de las tres AKTs en BO (Tschoop y cols., 2005), son bajos, aunque sensibles a IGF-I, puesto que en su presencia aumenta notablemente la fosforilación en los dos residuos. En concordancia con estos datos, los niveles endógenos de P-AKT en BO se ven reducidos de forma significativa en ausencia de IGF-I, lo que demuestra la importancia del factor durante el desarrollo.

PTEN contribuye al equilibrio en la actividad de IGF-I, desfosforilando el producto de la reacción catalizada por la PI3K. En CMBO la sobreexpresión moderada de esta fosfatasa reduce los niveles basales de P-AKT en las CMBO (Fig. 32); o cuando están estimuladas con bajas concentraciones de IGF-I (10 ng/ml). Esta reducción no altera la supervivencia y la proliferación de las CMBO, en cambio, su diferenciación a neuronas y astrocitos está significativamente inhibida. Este efecto solo ocurre en ausencia de insulina, puesto que la sobreexpresión de PTEN es incapaz de frenar la actividad de 10 µg/ml de insulina a 100 ng/ml de IGF-I, concentraciones con efectos biológicos similares en CMBO (Vicario-Abejón y cols., 2003). Estos datos correlacionan con los obtenidos en los experimentos de sobreexpresión de una forma mutada de PTEN, puesto que con esta hay una mayor diferenciación de CMBO a neuronas y astrocitos (ver a continuación).

Para disminuir al mínimo posible los niveles de P-AKT, empleamos el inhibidor farmacológico de PI3K, LY294002. Bajo estas condiciones, desaparece la fosforilación de P-AKT^{Ser473} y se reduce considerablemente la de P-AKT^{Thr 308}. Este efecto se traduce en una disminución en la proliferación de CMBO y en la diferenciación a neuronas y astrocitos. El efecto sobre la supervivencia es desigual puesto que, cuando las células proliferan, el bloqueo de PI3K reduce considerablemente la supervivencia, mientras que durante la diferenciación, aquella disminuye de forma muy moderada. Todos estos datos sugieren la importancia de la ruta de PI3K/AKT en el desarrollo de las CMBO, siendo la diferenciación especialmente sensible a bajos niveles basales de P-AKT, mientras que una reducción más drástica afecta al número de CMBO incluso en de la presencia de FGF-2 y EGF (Fig. 32).

A pesar de no responder a la presencia de IGF-I, las ERK1/2 se mantienen constitutivamente activadas en los cultivos de CMBO, lo que implica que su acción es fundamental en estas células. Ante su inhibición progresiva por U0126, las células proliferativas reducen su incorporación de BrdU y su supervivencia desciende de forma moderada. El descenso es mayor en células diferenciadas, lo que sugiere que ERK1/2, inhibe la muerte celular durante la diferenciación, papel que escasamente cumple PI3K/AKT. Todos estos hallazgos sugieren que en la fisiología de las células madre neurales, las rutas bioquímicas de PI3K/AKT y ERK1/2 controlan la proliferación y se

alternan para mantener la supervivencia celular, mientras que la diferenciación está regulada por PI3K/AKT (Fig. 32).

Globalmente, el comportamiento de las CMBO respecto al IGF-I es diferente al que desarrollan otras células. Por ejemplo en células madre del hipocampo adulto, el IGF-I estimula la fosforilación de ERK1/2 quinasa, que es quien media la proliferación (Aberg y cols., 2003) y en el cultivo embrionario de hipocampo, estimula la fosforilación de ambas AKT y ERK1/2, aunque de forma mas significativa de AKT (Zheng y Quirion, 2004b). Estas diferencias en la activación de rutas entre los cultivos embrionarios y adultos, indican que los tejidos embrionarios tienen una tasa de proliferación mayor en paralelo con niveles basales altos de P-ERK1/2 (Gritti y cols, 2002; Aberg y cols, 2003; Vicario-Abejón y cols., 2003).

La actividad de PI3K/AKT controla el desarrollo de las CMN

A pesar de que en numerosos estudios se haya asociado a PI3K/AKT con la supervivencia celular (Brazil y cols., 2004; Song y cols., 2005), nuestros resultados, al igual que otros, demuestran una acción sobre la proliferación y diferenciación de CMBO. Respecto a la proliferación, PI3K/AKT controla el ciclo celular en G1 (García y cols., 2006). Por ejemplo, la sobreexpresión de AKT1 en corteza embrionaria genera un aumento de la proliferación y de la capacidad de autorrenovación de progenitores neurales (Sinor y Lillien., 2004). Las alteraciones en las subunidades de PI3K también provocan cambios en la proliferación. Si se sobreexpresa la forma activa de p110 en el ratón, se forman displasias en la retina embrionaria, especialmente en la capa de fotorreceptores, por el aumento de la proliferación de precursores (Pimentel y cols., 2002). En cambio, si se muta esta subunidad, se da una reducción en la proliferación en células neurales (Bi y cols., 1999). Las alteraciones de la proteína IRS-2, que activa la ruta de PI3K/AKT, también modulan la proliferación, puesto que en ratones nulos para este gen hay un descenso claro en la incorporación de BrdU en precursores neurales (Schubert y cols., 2003; Yi y cols., 2005). En conjunto, esta ruta no sólo previene la muerte celular, si no que, además, promueve la proliferación, aumentando el número global de células progenitoras de un tejido.

El papel de PI3K/AKT durante la diferenciación neuronal ha sido muy discutido debido a los distintos resultados de varios estudios. En los individuos nulos para IGF-I hay una reducción en la cantidad de células diferenciadas, en paralelo a una reducción de los niveles de P-AKT (Pichel y cols., 2003; Vicario-Abejón y cols., 2003 y en esta tesis). Además, en cultivo, nosotros hemos observado un claro efecto de PI3K/AKT sobre la diferenciación de CMBO a neuronas y astrocitos. El grupo de Lillien, obtuvo un mayor número de células NG2+, posiblemente precursores de oligodendrocitos, al sobreexpresar AKT-1; en cambio, no encontraron variaciones en neuronas y astrocitos (Sinor y Lillien, 2004). Nuestros datos, sin embargo, coinciden con trabajos muy recientes que indican que AKT interviene en la diferenciación y maduración axonal y sináptica de neuronas a través de mTOR (Jaworski y cols., 2005; Kumar y cols., 2005). Estos datos no coinciden con los primeros ensayos obtenidos en el ratón nulo para AKT3 (la más abundante de las AKT en el cerebro), donde no se observan cambios en la diferenciación general, aunque el cerebro tiene un tamaño reducido, debido a un descenso del número de células y a una reducción del tamaño celular (Easton y cols., 2005; Tschopp y cols., 2005). Todos estos hallazgos, referidos a la proliferación, diferenciación y tamaño celular, dan una visión general de la importancia de AKT durante el desarrollo del SNC.

La reducción en los niveles de P-AKT, producida por el efecto inhibitorio de LY294002, provoca una disminución en la proliferación, en la supervivencia y en la diferenciación a neuronas y astrocitos. Los niveles de estos tres procesos que se alcanzan tras la inhibición no llegan a los niveles basales (sin IGF-I). Esto podría deberse a una actividad residual de AKT, debido a la fosforilación del residuo de Treonina, cuya inhibición no ha sido completa. Según la bibliografía, esta enzima es activa con una mínima fosforilación en este residuo (Brodbeck y cols., 1999 y 2001; Sarbassov y cols., 2005). Además, nuestros experimentos se han centrado en el estudio de AKT1, que aún siendo la más expresada en BO no es la única; otras AKT podrían intervenir en la proliferación, supervivencia y diferenciación (Song y cols., 2005; Easton y cols., 2005; Tschopp y cols., 2005). Otra explicación a este fenómeno es la posible intervención de otras rutas o proteínas ajenas a PI3K/AKT activados por IGF-I, capaces de modular parcialmente estos procesos. En base a nuestros resultados, una de

las proteínas que pudieran también controlar la supervivencia y la proliferación es ERK1/2 (Fig. 32).

PTEN regula la diferenciación de CMN a través de AKT

La sobreexpresión de PTEN es capaz de reducir los niveles de P-AKT cuando estos son estimulados por bajas concentraciones de IGF-I. Sin embargo, cuando se añaden concentraciones altas, se bloquea por completo la inhibición ejercida por PTEN. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en otros sistemas celulares (Myers y cols., 1998; Lacalle y cols., 2004; Seminario y cols., 2004) y, además, confirman que en las CMBO PTEN regula los niveles basales de AKT fosforilado a través de la desfosforilación de PIP3. Estos efectos bioquímicos, producidos por la sobreexpresión de PTEN, producen una clara reducción en la diferenciación de neuronas y astrocitos. Un resultado similar se observa en las células PC12, donde la sobreexpresión de la fosfatasa inhibe el desarrollo fenotípico de neuronas mediante la reducción de los niveles de P-AKT y P-ERK, activados por NGF (Musatov y cols., 2004). El que se vean afectadas las dos rutas mencionadas por PTEN ha sido descrito también en las células tumorales MCF-7 (Weng y cols., 2001). Sin embargo, al igual que en otros muchos sistemas, la sobreexpresión de PTEN en CMBO sólo afecta a P-AKT, sin que se vea afectado P-ERK (van Golen y cols., 2001).

En relación al papel de PTEN en la diferenciación de CMN, es coherente que la sobreexpresión de la forma catalíticamente mutada de PTEN (PTEN-C/S) haga aumentar la cantidad de neuronas y astrocitos. Pero en este tipo de experimento no observamos cambios sustanciales en la fosforilación de AKT. Esto puede deberse a que el cambio producido por esta sobreexpresión transitorio, de forma que es imposible de detectar por nuestros métodos. El grupo de S. Mañes (CNB, CSIC, Madrid) tampoco es capaz de observar los cambios en P-AKT en células linfoides que sobreexpresan PTEN-C/S (Lacalle y cols., 2004).

En conjunto, nuestros resultados indican que PTEN interfiere en la diferenciación a neuronas y astrocitos (Fig.32). Algo similar ocurre en la corteza

cerebelar, donde la ausencia de PTEN provoca la diferenciación de la glía de Bergman (Yue y cols., 2005). Esta misma ausencia también provoca un aumento en la proliferación de astrocitos (Fraser y cols., 2004), en consonancia con nuestros hallazgos, puesto que la sobreexpresión de PTEN genera una disminución moderada de estas células. Por otra parte, la diferencia en la respuesta a PTEN de los oligodendrocitos respecto a neuronas y astrocitos puede deberse a la necesidad adicional de otros factores, como el BDNF, para completar la diferenciación de los primeros (Vicario-Abejón y cols., 2003).

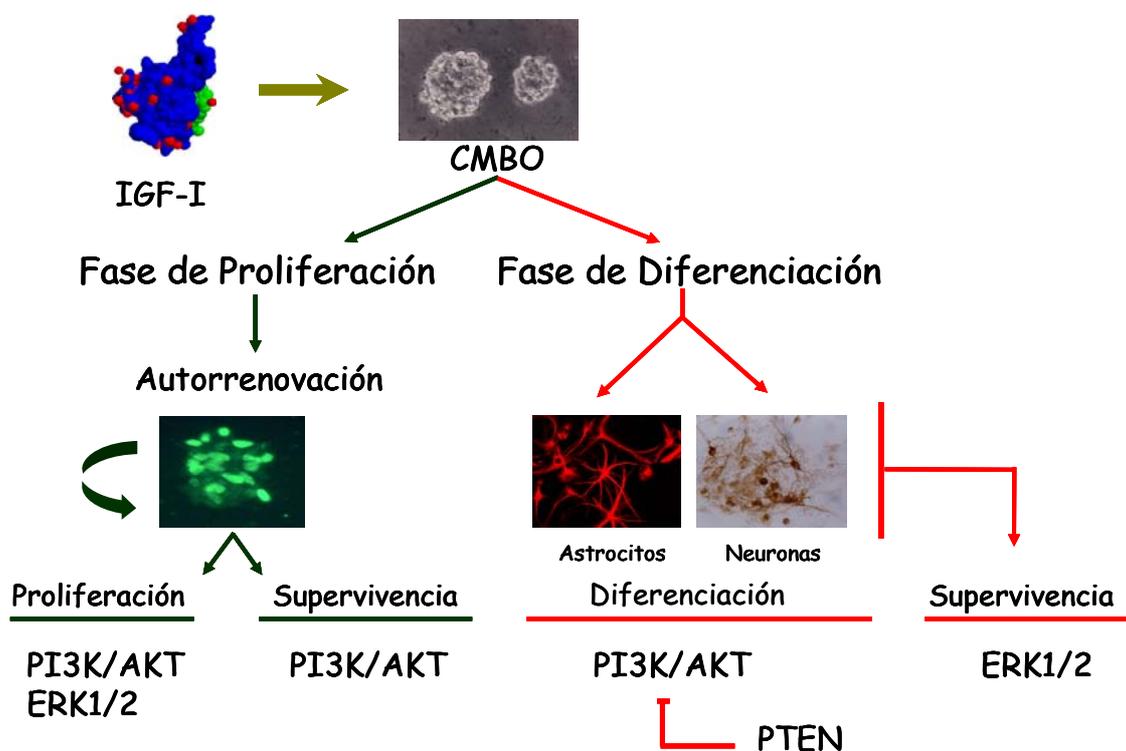


Fig. 32. La ruta bioquímica de PI3K/AKT es clave en la diferenciación de neuronas y astrocitos producidos a partir de CMBO. El GF-I estimula la proliferación de las CMBO y su diferenciación a neuronas y glía. Ambas rutas, la de PI3K/AKT y la de ERK1/2, controlan la proliferación celular. En cambio, nuestros resultados sugieren que, en el resto de los procesos, la importancia de dichas rutas se alterna, de modo que durante la fase de proliferación el control de la supervivencia celular se ejerce por la ruta de PI3K/AKT, principalmente. Durante la fase de diferenciación, la supervivencia depende más de ERK1/2, mientras que la diferenciación propiamente dicha, es decir, la adquisición de las características de neuronas y astrocitos, está sujeta a la regulación por la actividad de PI3K/AKT. Además, durante este proceso la actividad de AKT se inhibe por la acción de la fosfatasa PTEN, convirtiéndola en molécula clave en la diferenciación.

Otros estudios no observan cambios en la diferenciación al modular la expresión de PTEN. Por ejemplo, en ratones heterocigotos para esta proteína no se encuentran cambios en la diferenciación, ni *in vivo* ni *in vitro* (Li y cols., 2002 y 2003a). Quizá una

de las copias de PTEN sea suficiente para generar una correcta formación de los tres tipos neurales. La ausencia de PTEN no produce ningún cambio en el número de neuronas ni de astrocitos, según se ha visto, en cultivos de corteza cerebral de ratones nulos para PTEN (Grozner y cols., 2001). Quizá al igual que en nuestros estudios, la insulina podría enmascarar el efecto real de la ausencia PTEN sobre las células corticales. Por otro lado, PTEN puede regular la dendritogénesis y la arborización sináptica, activada por PI3K/AKT (Jaworski y cols., 2005; Kumar y cols., 2005; Kwon y cols., 2006). En estos estudios, mTOR aparece como la proteína efectora de esta ruta, por eso se ha propuesto como el punto convergente de diferentes señales que modulan el desarrollo neural.

El incremento de la expresión de PTEN no altera los niveles normales de proliferación de las CMBO en presencia de los mitógenos EGF y FGF-2, a pesar de haber sido descrito como un inhibidor del ciclo celular en fase G1 (Grozner y cols., 2006). Estos factores provocan un aumento en los niveles de P-ERK1/2 en CMBO y en otros tipos de células (Kessaris y cols., 2004; en esta tesis), lo que podría enmascarar el efecto real de PTEN sobre la proliferación. En las células neuroepiteliales de la zona ventricular del telencéfalo embrionario (E14,5), la ausencia de PTEN deriva en un aumento desproporcionado de la proliferación (Grozner y cols., 2001 y 2006). Lo mismo ocurre en las células madre de la zona subventricular, donde no sólo aumenta la proliferación, sino también el tamaño celular y la migración (Li y cols., 2002 y 2003b). Esta pérdida de PTEN también provoca un aumento de la división específica de astrocitos (Fraser y cols., 2004). Sin embargo, la falta de PTEN reduce el número de células proliferativas en el cerebelo embrionario (Marino y cols., 2002). Estos resultados, parcialmente contradictorios, podrían responder a la función diferencial que cumple una misma proteína en distintas regiones cerebrales a lo largo del desarrollo.

Un comportamiento similar ocurre con la supervivencia, siendo PTEN habitualmente inhibitoria de este proceso. En los individuos mutantes nulos para PTEN hay una mayor supervivencia, medida por el descenso de la señal de TUNEL, en células neuroepiteliales de la zona ventricular de la corteza (Grozner y cols., 2001) y en el cerebelo (Marino y cols., 2002). Aunque en este último estudio existe la peculiaridad de que, en ausencia de PTEN, las células de Purkinje se vacuolizan y entran en un proceso

de neurodegeneración. En el caso de los ratones heterocigotos, las células madre neurales de la zona subventricular, tienen una mayor supervivencia (Li y cols., 2002). En estudios clínicos en animales, se ha relacionado la inhibición de la actividad de PTEN con la supervivencia celular después de un fenómeno de isquemia (Ning y cols., 2004; Choi y cols., 2005). En relación con estos estudios, las neuronas de ratones PTEN^{+/-} y las de ratones PTEN^{-/-}, tienen mayor resistencia a la muerte celular que las neuronas silvestres (Li y cols., 2002; Yue y cols., 2005).

Otros estudios no hallan relación entre la expresión de PTEN y los cambios en la supervivencia, o incluso hallan efectos contradictorios. El mutante condicional de PTEN en astrocitos, no afecta a la muerte celular, ni en el hipocampo ni en el cerebelo (Backman y cols., 2001). A pesar de que PTEN favorezca la proliferación de astrocitos, ante su ausencia, estos no sufren ningún cambio en su viabilidad; por lo tanto, PTEN no es clave para su supervivencia (Fraser y cols., 2004).

En sintonía con los grupos que describen una falta de relación de PTEN con la supervivencia celular, nosotros no hemos hallado diferencias en la muerte celular en células que sobreexpresan PTEN. Si bien la dificultad del método para detectar células muertas e infectadas pudiera enmascarar la influencia real de esta fosfatasa sobre la supervivencia de las CMBO, los números de células totales no cambian en presencia de la sobreexpresión de PTEN, lo que indica que la muerte celular no se altera en nuestros ensayos.

Otro de los aspectos interesantes en el estudio de PTEN es su influencia en la migración, estrechamente ligada al grado de diferenciación. La delección o mutación de esta proteína provoca alteraciones en la migración (Li y cols., 2002 y 2003b). Nosotros observamos que *in vitro*, las CMBO que sobreexpresan PTEN tienen una mayor adherencia a la placa. Por ello, investigamos si PTEN afectaba a la fosforilación de FAK, hecho que no ocurrió.

En conjunto, todos estos datos revelan la gran importancia de la ruta activada por IGF-I, PI3K/AKT en la determinación del número total de células, y de la diferenciación a neuronas y astrocitos. Esta ruta parece jugar un papel importante en el

desarrollo del bulbo, donde la ausencia de IGF-I provoca el descenso de la fosforilación de AKT y, en paralelo, una alteración en la migración y diferenciación de las neuronas mitrales. Notablemente, *in vitro*, la diferenciación a neuronas y astrocitos es más sensible a la reducción de los niveles de P-AKT que la proliferación y la supervivencia, también controlados por esta ruta. Del mismo modo, en el BO de ratones carentes de IGF-I, no hay diferencias significativas en la proliferación ni en la muerte celular. Por tanto, mediante la modulación de los niveles de P-AKT, y en colaboración con otras rutas bioquímicas, el IGF-I y PTEN regulan el desarrollo celular del bulbo olfatorio.

Conclusiones

1. En la retina en desarrollo entre E12,5 y E13,5, la diferenciación progresa desde el nervio óptico hacia la periferia. Durante el mismo periodo, disminuye la cantidad de células proliferativas, pero aún se mantiene elevada la cantidad de células neuroepiteliales nestina positivas.
2. Las células madre de bulbo olfatorio embrionario requieren FGF-2, EGF e insulina o IGF-I para proliferar. Sin embargo, no se han podido aislar células madre de retina (E13,5) a pesar de que el FGF-2, en combinación con la laminina y la heparina, promueve la supervivencia y la proliferación durante los primeros días de cultivo.
3. El IGF-I estimula en cultivo la diferenciación de CMBO, efecto ligado a un aumento de la expresión de P-AKT, lo que sugiere una importante implicación de esta proteína en la generación de neuronas y astrocitos. *In vivo*, la falta de IGF-I disminuye los niveles de P-AKT en el BO, reducción que causa deficiencias en la diferenciación neuronal.
4. La sobreexpresión de PTEN reduce los niveles basales de P-AKT en las CMBO y también cuando éstos están inducidos por concentraciones bajas de IGF-I. Dicha sobreexpresión provoca, en los cultivos crecidos sin insulina, una disminución en el número de neuronas y astrocitos probablemente por un efecto inhibitor de la diferenciación celular. No tenemos evidencia de que esta disminución se deba a un aumento de la apoptosis.
5. La sobreexpresión de la forma catalíticamente inactiva de PTEN provoca un aumento en el número total de neuronas y astrocitos en ausencia de insulina, hecho que apoya un papel de PTEN en la regulación de la diferenciación de las CMN.
6. La ausencia casi total de AKT fosforilado en Serina 473 y la ausencia parcial en Treonina 308 provocan en las CMBO una reducción de la proliferación y una disminución en la diferenciación. En este último proceso apenas se afecta la supervivencia de las células diferenciadas. AKT, por tanto, podría ser una molécula clave en el control del desarrollo de las CMN.

7. En condiciones basales, la fosforilación de ERK1 y ERK2 es elevada; en ausencia de fosforilación de ambas tras el tratamiento con U0126, se reduce la proliferación de las CMBO. En la fase de diferenciación, la reducción casi completa de P-ERK1/2 produce un notable aumento de la muerte celular.

Bibliografía

Abad, J. L., Serrano, F., San Roman, A. L., Delgado, R., Bernad, A. y Gonzalez, M. A. (2002). Single-step, multiple retroviral transduction of human T cells. *J Gene Med* **4**, 27-37.

Abdouh, M. y Bernier, G. (2006). In vivo reactivation of a quiescent cell population located in the ocular ciliary body of adult mammals. *Exp Eye Res* **83**, 153-64.

Aberg, M. A., Aberg, N. D., Palmer, T. D., Alborn, A. M., Carlsson-Skwirut, C., Bang, P., Rosengren, L. E., Olsson, T., Gage, F. H. y Eriksson, P. S. (2003). IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* **24**, 23-40.

Ahmad, I., Das, A. V., James, J., Bhattacharya, S. y Zhao, X. (2004). Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 53-62.

Ahmad, I., Dooley, C. M., Thoreson, W. B., Rogers, J. A. y Afiat, S. (1999). In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia. *Brain Res* **831**, 1-10.

Ahmad, I., Tang, L. y Pham, H. (2000). Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 517-21.

Ahn, S. y Joyner, A. L. (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* **437**, 894-7.

Akagi, T., Haruta, M., Akita, J., Nishida, A., Honda, Y. y Takahashi, M. (2003). Different characteristics of rat retinal progenitor cells from different culture periods. *Neurosci Lett* **341**, 213-6.

Alvarez-Buylla, A. y Lim, D. A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**, 683-6.

Anchan, R. M., Reh, T. A., Angello, J., Balliet, A. y Walker, M. (1991). EGF and TGF-alpha stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation in vitro. *Neuron* **6**, 923-36.

Anderson, D. J. (2001). Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual. *Neuron* **30**, 19-35.

Arevalo, M.A. y Rodriguez-Tebar. (2006). Activation of casein Kinase II and inhibition of phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10 phosphatase by nerve growth factor/p75^{NTR} inhibit glycogen synthase kinase-2 β and stimulate axonal growth. *Mol Biol Cell*. **17**, 3369-77.

Arsenijevic, Y., Weiss, S., Schneider, B. y Aebischer, P. (2001). Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct

actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. *J Neurosci* **21**, 7194-202.

Backman, S. A., Stambolic, V., Suzuki, A., Haight, J., Elia, A., Pretorius, J., Tsao, M. S., Shannon, P., Bolon, B., Ivy, G. O. y Mak, TW (2001). Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* **29**, 396-403.

Baek, S. H., Kioussi, C., Briata, P., Wang, D., Nguyen, H. D., Ohgi, K. A., Glass, C. K., Wynshaw-Boris, A., Rose, D. W. y Rosenfeld, M. G. (2003). Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3245-50.

Bailey, M. S., Puche, A. C. y Shipley, M. T. (1999). Development of the olfactory bulb: evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation. *J Comp Neurol* **415**, 423-48.

Bartlett, W. P., Li, X. S., Williams, M. y Benkovic, S. (1991). Localization of insulin-like growth factor-1 mRNA in murine central nervous system during postnatal development. *Dev Biol* **147**, 239-50.

Bayascas, J. R. y Alessi, D. R. (2005). Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol Cell* **18**, 143-5.

Bedard, A. y Parent, A. (2004). Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res* **151**, 159-68.

Belachew, S., Chittajallu, R., Aguirre, A. A., Yuan, X., Kirby, M., Anderson, S. y Gallo, V. (2003). Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol* **161**, 169-86.

Benraiss, A., Chmielnicki, E., Lerner, K., Roh, D. y Goldman, S. A. (2001). Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* **21**, 6718-31.

Bhattacharya, S., Jackson, J. D., Das, A. V., Thoreson, W. B., Kuszynski, C., James, J., Joshi, S. y Ahmad, I. (2003). Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 2764-73.

Bi, L., Okabe, I., Bernard, D. J., Wynshaw-Boris, A. y Nussbaum, R. L. (1999). Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **274**, 10963-8.

Birle, D., Bottini, N., Williams, S., Huynh, H., deBelle, I., Adamson, E. y Mustelin, T. (2002). Negative feedback regulation of the tumor suppressor PTEN by phosphoinositide-induced serine phosphorylation. *J Immunol* **169**, 286-91.

Blaess, S., Graus-Porta, D., Belvindrah, R., Radakovits, R., Pons, S., Littlewood-Evans, A., Senften, M., Guo, H., Li, Y., Miner, J. H., Reichardt, L.F. y Muller U. (2004). Beta1-integrins are critical for cerebellar granule cell precursor proliferation. *J Neurosci* **24**, 3402-12.

Bondy, C. A. (1991). Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci* **11**, 3442-55.

Bondy, C. A. y Cheng, C. M. (2004). Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur J Pharmacol* **490**, 25-31.

Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D. A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G. D. y Greenberg, M. E. (1997). Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* **278**, 477-83.

Brazil, D. P., Yang, Z. Z. y Hemmings, B. A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* **29**, 233-42.

Brodbeck, D., Cron, P. y Hemmings, B. A. (1999). A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem* **274**, 9133-6.

Brodbeck, D., Hill, M. M. y Hemmings, B. A. (2001). Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem* **276**, 29550-8.

Brooker, G. J., Kalloniatis, M., Russo, V. C., Murphy, M., Werther, G. A. y Bartlett, P. F. (2000). Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *J Neurosci Res* **59**, 332-41.

Caldwell, M. A., Garcion, E., terBorg, M. G., He, X. y Svendsen, C. N. (2004). Heparin stabilizes FGF-2 and modulates striatal precursor cell behavior in response to EGF. *Exp Neurol* **188**, 408-20.

Capela, A. y Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* **35**, 865-75.

Cayouette, M. y Raff, M. (2003). The orientation of cell division influences cell-fate choice in the developing mammalian retina. *Development* **130**, 2329-39.

Cheng, C. M., Joncas, G., Reinhardt, R. R., Farrer, R., Quarles, R., Janssen, J., McDonald, M. P., Crawley, J. N., Powell-Braxton, L. y Bondy, C. A. (1998). Biochemical and morphometric analyses show that myelination in the insulin-like growth factor 1 null brain is proportionate to its neuronal composition. *J Neurosci* **18**, 5673-81.

Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F. y Birnbaum, M. J. (2001). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* **276**, 38349-52.

Choi, J. S., Park, H. J., Kim, H. Y., Kim, S. Y., Lee, J. E., Choi, Y. S., Chun, M. H., Chung, J. W. y Lee, M. Y. (2005). Phosphorylation of PTEN and Akt in astrocytes of the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Cell Tissue Res* **319**, 359-66.

Close, J. L., Gumuscu, B. y Reh, T. A. (2005). Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Muller glia in the rat retina via TGF beta signaling. *Development* **132**, 3015-26.

Coles, B. L., Horsford, D. J., McInnes, R. R. y van der Kooy, D. (2006). Loss of retinal progenitor cells leads to an increase in the retinal stem cell population in vivo. *Eur J Neurosci* **23**, 75-82.

Colognato, H., Baron, W., Avellana-Adalid, V., Relvas, J. B., Baron-Van Evercooren, A., Georges-Labouesse, E. y ffrench-Constant, C. (2002). CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nat Cell Biol* **4**, 833-41.

Conover, J. C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D. y Alvarez-Buylla, A. (2000). Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* **3**, 1091-7.

Cormack, B. P., Valdivia, R. H. y Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-8.

Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S., Barthels, D., Rajewsky, K., y Wille, W. (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* **367**, 455-9.

Das, I., Sparrow, J. R., Lin, M. I., Shih, E., Mikawa, T. y Hempstead, B. L. (2000). Trk C signaling is required for retinal progenitor cell proliferation. *J Neurosci* **20**, 2887-95.

de la Rosa, E. J., Arribas, A., Frade, J. M. y Rodriguez-Tebar, A. (1994). Role of neurotrophins in the control of neural development: neurotrophin-3 promotes both neuron differentiation and survival of cultured chick retinal cells. *Neuroscience* **58**, 347-52.

de la Rosa, E. J. y De Pablo, F. (2000). Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci* **23**, 454-8.

De Pablo, F. y de la Rosa, E. J. (1995). The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends Neurosci* **18**, 143-50.

Del Rio-Tsonis, K. y Tsonis, P. A. (2003). Eye regeneration at the molecular age. *Dev Dyn* **226**, 211-24.

D'Ercole, A. J., Ye, P. y O'Kusky, J. R. (2002). Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides* **36**, 209-20.

Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. y Pandolfi, P. P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* **19**, 348-55.

Diaz, B., Serna, J., De Pablo, F. y de la Rosa, E. J. (2000). In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development* **127**, 1641-9.

Digicaylioglu, M., Garden, G., Timberlake, S., Fletcher, L. y Lipton, S. A. (2004). Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9855-60.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. y Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-16.

Drago, J., Murphy, M., Carroll, S. M., Harvey, R. P. y Bartlett, P. F. (1991). Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2199-203.

Dunker, N. y Kriegstein, K. (2003). Reduced programmed cell death in the retina and defects in lens and cornea of Tgfbeta2(-/-) Tgfbeta3(-/-) double-deficient mice. *Cell Tissue Res* **313**, 1-10.

Dunker, N., Schuster, N. y Kriegstein, K. (2001). TGF-beta modulates programmed cell death in the retina of the developing chick embryo. *Development* **128**, 1933-42.

Dyer, M. A. y Cepko, C. L. (2000). Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci* **3**, 873-80.

Easton, R. M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D. W., Mizrahi, M., Forman, M. S., Lee, V. M., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., Ludwig, T., Efstratiadis, A. y Birnbaum, M. J. (2005). Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol* **25**, 1869-78.

Edlund, T. y Jessell, T. M. (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* **96**, 211-24.

Fischer, A. J., McGuire, C. R., Dierks, B. D. y Reh, T. A. (2002a). Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Muller glia of the chicken retina. *J Neurosci* **22**, 9387-98.

Fischer, A. J. y Reh, T. A. (2001). Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* **4**, 247-52.

Fischer, A. J. y Reh, T. A. (2002b). Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina. *Dev Biol* **251**, 367-79.

Fischer, A. J. y Reh, T. A. (2003). Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia* **43**, 70-6.

Fraser, M. M., Zhu, X., Kwon, C. H., Uhlmann, E. J., Gutmann, D. H. y Baker, S. J. (2004). Pten loss causes hypertrophy and increased proliferation of astrocytes in vivo. *Cancer Res* **64**, 7773-9.

Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-8.

Gage, F. H. y McAllister, A. K. (2005). Neuronal and glial cell biology. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 497-9.

Gao, F. B., Apperly, J. y Raff, M. (1998). Cell-intrinsic timers and thyroid hormone regulate the probability of cell-cycle withdrawal and differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Dev Biol* **197**, 54-66.

Garcia, Z., Kumar, A., Marques, M., Cortes, I. y Carrera, A. C. (2006). Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J* **25**, 655-61.

Garcia-de Lacoba, M., Alarcón, C., de la Rosa, E. J. y De Pablo, F. (1999). Insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors with high affinity for insulin are developmentally regulated during neurogenesis. *Endocrinology* **140**, 233-43.

Garcia-Segura, L. M., Perez, J., Pons, S., Rejas, M. T. y Torres-Aleman, I. (1991). Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Res* **560**, 167-74.

Gilbert, S.F. (2006). Developmental biology (Eight edition). Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D. A., Galli, R., Verdugo, J. M., Herrera, D. G. y Vescovi, A. L. (2002). Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* **22**, 437-45.

Gritti, A., Frolichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E. A., Cova, L., Pagano, S. F., Bjornson, C. R. y Vescovi, A. L. (1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* **19**, 3287-97.

Gritti, A., Parati, E. A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D. J., Roisen, F., Nickel, D. D. y Vescovi A.L. (1996). Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* **16**, 1091-100.

Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D. D., Dougherty, J. D., Le Belle, J., Zack, J. A., Geschwind, D. H., Liu, X., Kornblum, H. I. y Wu, H. (2006). PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 111-6.

Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D. D., Lesche, R., Trumpp, A., Zack, J. A., Kornblum, H. I., Liu, X. y Wu, H. (2001). Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* **294**, 2186-9.

Gu, J., Tamura, M., Pankov, R., Danen, E. H., Takino, T., Matsumoto, K. y Yamada, K. M. (1999). Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol* **146**, 389-403.

He, F., Ge, W., Martinowich, K., Becker-Catania, S., Coskun, V., Zhu, W., Wu, H., Castro, D., Guillemot, F., Fan, G., de Vellis, J. y Sun, Y.U. (2005). A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat Neurosci* **8**, 616-25.

Hebert, J. M., Lin, M., Partanen, J., Rossant, J. y McConnell, S. K. (2003). FGF signaling through FGFR1 is required for olfactory bulb morphogenesis. *Development* **130**, 1101-11.

Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D. y Lewis, J. (1997). Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* **7**, 661-70.

Hernandez-Sanchez, C., Lopez-Carranza, A., Alarcon, C., de La Rosa, E. J. y De Pablo, F. (1995). Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9834-8.

Hernandez-Sanchez, C., Mansilla, A., de la Rosa, E. J. y De Pablo, F. (2006). Proinsulin in development: new roles for an ancient prohormone. *Diabetologia* **49**, 1142-50.

Hill, M. M., Andjelkovic, M., Brazil, D. P., Ferrari, S., Fabbro, D. y Hemmings, B. A. (2001). Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *J Biol Chem* **276**, 25643-6.

Hitchcock, P., Ochocinska, M., Sieh, A. y Otteson, D. (2004). Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* **23**, 183-94.

Hitoshi, S., Alexson, T., Tropepe, V., Donoviel, D., Elia, A. J., Nye, J. S., Conlon, R. A., Mak, T. W., Bernstein, A. y van der Kooy, D. (2002). Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev* **16**, 846-58.

Hodge, R. D., D'Ercole, A. J. y O'Kusky, J. R. (2004). Insulin-like growth factor-I accelerates the cell cycle by decreasing G1 phase length and increases cell cycle reentry in the embryonic cerebral cortex. *J Neurosci* **24**, 10201-10.

Hresko, R. C. y Mueckler, M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **280**, 40406-16.

Hsieh, J., Aimone, J. B., Kaspar, B. K., Kuwabara, T., Nakashima, K. y Gage, F. H. (2004). IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol* **164**, 111-22.

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.

Jadhav, A. P., Mason, H. A. y Cepko, C. L. (2006). Notch 1 inhibits photoreceptor production in the developing mammalian retina. *Development* **133**, 913-23.

Jacobson, M.J. (1991). *Developmental neurobiology*. Plenum Press. New York.

James, J., Das, A. V., Bhattacharya, S., Chacko, D. M., Zhao, X. y Ahmad, I. (2003). In vitro generation of early-born neurons from late retinal progenitors. *J Neurosci* **23**, 8193-203.

Jaworski, J., Spangler, S., Seeburg, D. P., Hoogenraad, C. C. y Sheng, M. (2005). Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* **25**, 11300-12.

Johe, K. K., Hazel, T. G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M. M. y McKay, R. D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* **10**, 3129-40.

Katoh, Y. y Katoh, M. (2005). Comparative genomics on FGF7, FGF10, FGF22 orthologs, and identification of fgf25. *Int J Mol Med* **16**, 767-70.

Kessaris, N., Jamen, F., Rubin, L. L. y Richardson, W. D. (2004). Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors. *Development* **131**, 1289-98.

Kirschenbaum, B. y Goldman, S. A. (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 210-4.

Kitamura, T., Kahn, C. R. y Accili, D. (2003). Insulin receptor knockout mice. *Annu Rev Physiol* **65**, 313-32.

Klagsbrun, M. y Baird, A. (1991). A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* **67**, 229-31.

Klein, C., Butt, S. J., Machold, R. P., Johnson, J. E. y Fishell, G. (2005). Cerebellum- and forebrain-derived stem cells possess intrinsic regional character. *Development* **132**, 4497-508.

Koizumi, H., Higginbotham, H., Poon, T., Tanaka, T., Brinkman, B. C. y Gleeson, J. G. (2006). Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci* **9**, 779-86.

Kondo, T. y Raff, M. (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* **289**, 1754-7.

Kumar, V., Zhang, M. X., Swank, M. W., Kunz, J. y Wu, G. Y. (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* **25**, 11288-99.

Kwon, C. H., Luikart, B. W., Powell, C. M., Zhou, J., Matheny, S. A., Zhang, W., Li, Y., Baker, S. J. y Parada, L. F. (2006). Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron* **50**, 377-88.

Kwon, C. H., Zhu, X., Zhang, J., Knoop, L. L., Tharp, R., Smeyne, R. J., Eberhart, C. G., Burger, P. C. y Baker, S. J. (2001). Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* **29**, 404-11.

Lacalle, R. A., Gomez-Mouton, C., Barber, D. F., Jimenez-Baranda, S., Mira, E., Martinez, A. C., Carrera, A. C. y Manes, S. (2004). PTEN regulates motility but not directionality during leukocyte chemotaxis. *J Cell Sci* **117**, 6207-15.

Lachyankar, M. B., Sultana, N., Schonhoff, C. M., Mitra, P., Poluha, W., Lambert, S., Quesenberry, P. J., Litofsky, N. S., Recht, L. D., Nabi, Susan, R., Miller, J., Ohta, S., Neel, B.G., y Ross, A.H. (2000). A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *J Neurosci* **20**, 1404-13.

Lai, E. C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-73.

Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H. y Schaffer, D. V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* **6**, 21-7.

Lawlor, M. A., Mora, A., Ashby, P. R., Williams, M. R., Murray-Tait, V., Malone, L., Prescott, A. R., Lucocq, J. M. y Alessi, D. R. (2002). Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J* **21**, 3728-38.

Le Bras, B., Barallobre, M. J., Homman-Ludiye, J., Ny, A., Wyns, S., Tammela, T., Haiko, P., Karkkainen, M. J., Yuan, L., Muriel, M. P., Chatzopoulou, E., Bréant, P., Zalc, B., Carmeliet, P., Alitalo, K., Eichmann, A. y Thomas, J.L. (2006). VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat Neurosci* **9**, 340-8.

Leslie, N. R. y Downes, C. P. (2002). PTEN: The down side of PI3-kinase signalling. *Cell Signal* **14**, 285-95.

Li, L., He, F., Litofsky, N. S., Recht, L. D. y Ross, A. H. (2003a). Profiling of genes expressed by PTEN haploinsufficient neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci* **24**, 1051-61.

Li, L., Liu, F. y Ross, A. H. (2003b). PTEN regulation of neural development and CNS stem cells. *J Cell Biochem* **88**, 24-8.

Li, L., Liu, F., Salmonsén, R. A., Turner, T. K., Litofsky, N. S., Di Cristofano, A., Pandolfi, P. P., Jones, S. N., Recht, L. D. y Ross, A. H. (2002). PTEN in neural precursor cells: regulation of migration, apoptosis, and proliferation. *Mol Cell Neurosci* **20**, 21-9.

Ligon, K. L., Fancy, S. P., Franklin, R. J. y Rowitch, D. H. (2006). Olig gene function in CNS development and disease. *Glia* **54**, 1-10.

Lillien, L. y Cepko, C. (1992). Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF alpha. *Development* **115**, 253-66.

Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J. y Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* **75**, 59-72.

Liu, Z. y Martin, L. J. (2003). Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *J Comp Neurol* **459**, 368-91.

Luskin, M. B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* **11**, 173-89.

Maehama, T., Taylor, G. S. y Dixon, J. E. (2001). PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem* **70**, 247-79.

Marin, O. y Rubenstein, J. L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* **2**, 780-90.

Marino, S., Krimpenfort, P., Leung, C., van der Korput, H. A., Trapman, J., Camenisch, I., Berns, A. y Brandner, S. (2002). PTEN is essential for cell migration but not for fate determination and tumourigenesis in the cerebellum. *Development* **129**, 3513-22.

Marquardt, T. y Gruss, P. (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci* **25**, 32-8.

Marsh, D. J., Dahia, P. L., Zheng, Z., Liaw, D., Parsons, R., Gorlin, R. J. y Eng, C. (1997). Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet* **16**, 333-4.

Masland, R. H. (2001). Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 431-6.

McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* **276**, 66-71.

Meuillet, E. J., Mahadevan, D., Berggren, M., Coon, A. y Powis, G. (2004). Thioredoxin-1 binds to the C2 domain of PTEN inhibiting PTEN's lipid phosphatase activity and membrane binding: a mechanism for the functional loss of PTEN's tumor suppressor activity. *Arch Biochem Biophys* **429**, 123-33.

Miller, S. A., Dykes, D. D. y Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**, 1215.

Moshiri, A., Close, J. y Reh, T. A. (2004). Retinal stem cells and regeneration. *Int J Dev Biol* **48**, 1003-14.

Musatov, S., Roberts, J., Brooks, A. I., Pena, J., Betchen, S., Pfaff, D. W. y Kaplitt, M. G. (2004). Inhibition of neuronal phenotype by PTEN in PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3627-31.

Myers, M. P., Pass, I., Batty, I. H., Van der Kaay, J., Stolarov, J. P., Hemmings, B. A., Wigler, M. H., Downes, C. P. y Tonks, N. K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13513-8.

Ning, K., Pei, L., Liao, M., Liu, B., Zhang, Y., Jiang, W., Mielke, J. G., Li, L., Chen, Y., El-Hayek, Y. H., Fehlings, M. G., Zhang, X., Liu, F., Eubanks, J., y Wan, Q. (2004). Dual neuroprotective signaling mediated by downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN. *J Neurosci* **24**, 4052-60.

Nunes, M. C., Roy, N. S., Keyoung, H. M., Goodman, R. R., McKhann, G., 2nd, Jiang, L., Kang, J., Nedergaard, M. y Goldman, S. A. (2003). Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* **9**, 439-47.

Pagano, S. F., Impagnatiello, F., Girelli, M., Cova, L., Grioni, E., Onofri, M., Cavallaro, M., Etteri, S., Vitello, F., Giombini, S., Solero, C. L. y Parati, E. A. (2000). Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* **18**, 295-300.

Pencea, V., Bingaman, K. D., Wiegand, S. J. y Luskin, M. B. (2001). Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* **21**, 6706-17.

Peng, X. D., Xu, P. Z., Chen, M. L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W. S., Crawford, S. E., Coleman, K. G. y Hay, N. (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed

bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* **17**, 1352-65.

Pichel, J. G., Fernandez-Moreno, C., Vicario-Abejon, C., Testillano, P. S., Patterson, P. H. y De Pablo, F. (2003). Developmental cooperation of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor I in mice is tissue-specific and essential for lung maturation involving the transcription factors Sp3 and TTF-1. *Mech Dev* **120**, 349-61.

Pimentel, B., Rodriguez-Borlado, L., Hernandez, C. y Carrera, A. C. (2002). A Role for phosphoinositide 3-kinase in the control of cell division and survival during retinal development. *Dev Biol* **247**, 295-306.

Popken, G. J., Hodge, R. D., Ye, P., Zhang, J., Ng, W., O'Kusky, J. R. y D'Ercole, A. J. (2004). In vivo effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on prenatal and early postnatal development of the central nervous system. *Eur J Neurosci* **19**, 2056-68.

Prada, C., Puga, J., Perez-Mendez, L., Lopez y Ramirez, G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci* **3**, 1187.

Qian, X., Shen, Q., Goderie, S. K., He, W., Capela, A., Davis, A. A. y Temple, S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* **28**, 69-80.

Raftopoulou, M., Etienne-Manneville, S., Self, A., Nicholls, S. y Hall, A. (2004). Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* **303**, 1179-81.

Rager, G. H. (1980). Development of the retinotectal projection in the chicken. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **63**, 1-90.

Rajan, P. y McKay, R. D. (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* **18**, 3620-9.

Raman, R., Venkataraman, G., Ernst, S., Sasisekharan, V. y Sasisekharan, R. (2003). Structural specificity of heparin binding in the fibroblast growth factor family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2357-62.

Ramirez-Castillejo, C., Sanchez-Sanchez, F., Andreu-Agullo, C., Ferron, S. R., Aroca-Aguilar, J. D., Sanchez, P., Mira, H., Escribano, J. y Farinas, I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* **9**, 331-9.

Ramón y Cajal, S. (1894). New ideas on the structure of the nervous system in man and vertebrates, Republicado en 1990 por MIT Press, Cambridge, MA. Editores: Swannson, N. y Swanson, L.W.

Ray, J. y Gage, F. H. (2006). Differential properties of adult rat and mouse brain-derived neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* **31**, 560-73.

Reh, T. A. y Radke, K. (1988). A role for the extracellular matrix in retinal neurogenesis in vitro. *Dev Biol* **129**, 283-93.

Reiter, C. E., Sandirasegarane, L., Wolpert, E. B., Klinger, M., Simpson, I. A., Barber, A. J., Antonetti, D. A., Kester, M. y Gardner, T. W. (2003). Characterization of insulin signaling in rat retina in vivo and ex vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E763-74.

Reynolds, B. A. y Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-10.

Rossi, D. J. y Weissman, I. L. (2006). Pten, tumorigenesis, and stem cell self-renewal. *Cell* **125**, 229-31.

Russo, V. C., Gluckman, P. D., Feldman, E. L. y Werther, G. A. (2005). The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev* **26**, 916-43.

Saghatelian, A., de Chevigny, A., Schachner, M. y Lledo, P. M. (2004). Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* **7**, 347-56.

Saha, M. S., Servetnick, M. y Grainger, R. M. (1992). Vertebrate eye development. *Curr Opin Genet Dev* **2**, 582-8.

Sailer, M. H., Hazel, T. G., Panchision, D. M., Hoepfner, D. J., Schwab, M. E. y McKay, R. D. (2005). BMP2 and FGF2 cooperate to induce neural-crest-like fates from fetal and adult CNS stem cells. *J Cell Sci* **118**, 5849-60.

Sambrook, S., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) A laboratory manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, ed. New York.

Sanai, N., Tramontin, A. D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N. M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M. T., McDermott, M. W., Parsa, A. T., Manuel-Garcia Verdugo, J., Berger, M. S., y Alvarez-Buylla, A. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* **427**, 740-4.

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. y Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-101.

Schubert, M., Brazil, D. P., Burks, D. J., Kushner, J. A., Ye, J., Flint, C. L., Farhang-Fallah, J., Dikkes, P., Warot, X. M., Rio, C., Corfas, G., y White, M. F. (2003). Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci* **23**, 7084-92.

Seaberg, R. M. y van der Kooy, D. (2003). Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci* **26**, 125-31.

Segal, R. A., Takahashi, H. y McKay, R. D. (1992). Changes in neurotrophin responsiveness during the development of cerebellar granule neurons. *Neuron* **9**, 1041-52.

Seminario, M. C., Precht, P., Bunnell, S. C., Warren, S. E., Morris, C. M., Taub, D. y Wange, R. L. (2004). PTEN permits acute increases in D3-phosphoinositide levels following TCR stimulation but inhibits distal signaling events by reducing the basal activity of Akt. *Eur J Immunol* **34**, 3165-75.

Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J. T., Fasano, C. A., Phoenix, T. N., Lemischka, I. R., Ivanova, N. B., Stifani, S., Morrisey, E. E. y Temple, S. (2006). The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci* **9**, 743-51.

Shi, C. Z., Dhir, R. N., Kesavan, P., Zhang, S. L., Matschinsky, F. M. y Heyner, S. (1995). Mouse embryonic stem cells express receptors of the insulin family of growth factors. *Mol Reprod Dev* **42**, 173-9.

Shimazaki, T., Shingo, T. y Weiss, S. (2001). The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* **21**, 7642-53.

Simonato, M., Manservigi, R., Marconi, P. y Glorioso, J. (2000). Gene transfer into neurones for the molecular analysis of behaviour: focus on herpes simplex vectors. *Trends Neurosci* **23**, 183-90.

Sinor, A. D. y Lillien, L. (2004). Akt-1 expression level regulates CNS precursors. *J Neurosci* **24**, 8531-41.

Song, G., Ouyang, G. y Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* **9**, 59-71.

Stenkamp, D. L., Frey, R. A., Prabhudesai, S. N. y Raymond, P. A. (2000). Function for Hedgehog genes in zebrafish retinal development. *Dev Biol* **220**, 238-52.

Stiles, B., Groszer, M., Wang, S., Jiao, J. y Wu, H. (2004). PTENless means more. *Dev Biol* **273**, 175-84.

Sun, Y., Goderie, S. K. y Temple, S. (2005). Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells. *Neuron* **45**, 873-86.

Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M. Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G. y Greenberg, M. E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* **104**, 365-76.

Takebayashi, H., Nabeshima, Y., Yoshida, S., Chisaka, O. y Ikenaka, K. (2002). The basic helix-loop-helix factor *olig2* is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol* **12**, 1157-63.

Taniguchi, C. M., Emanuelli, B. y Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 85-96.

Taupin, P., Ray, J., Fischer, W. H., Suhr, S. T., Hakansson, K., Grubb, A. y Gage, F. H. (2000). FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron* **28**, 385-97.

Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* **414**, 112-7.

Theiler, K. (1989). The house mouse. Atlas of embryonic development. Springer-Verlag. New York.

Tropepe, V., Coles, B. L., Chiasson, B. J., Horsford, D. J., Elia, A. J., McInnes, R. R. y van der Kooy, D. (2000). Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* **287**, 2032-6.

Tropepe, V., Hitoshi, S., Sirard, C., Mak, T. W., Rossant, J. y van der Kooy, D. (2001). Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* **30**, 65-78.

Tropepe, V., Sibilio, M., Ciruna, B. G., Rossant, J., Wagner, E. F. y van der Kooy, D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* **208**, 166-88.

Tschopp, O., Yang, Z. Z., Brodbeck, D., Dummler, B. A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J. y Hemmings, B. A. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132**, 2943-54.

van Golen, C. M., Schwab, T. S., Ignatoski, K. M., Ethier, S. P. y Feldman, E. L. (2001). PTEN/MMAC1 overexpression decreases insulin-like growth factor-I-mediated protection from apoptosis in neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* **12**, 371-8.

Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B. y Foukas, L. C. (2005). Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* **30**, 194-204.

Varela-Nieto, I., de la Rosa, E. J., Valenciano, A. I. y Leon, Y. (2003). Cell death in the nervous system: lessons from insulin and insulin-like growth factors. *Mol Neurobiol* **28**, 23-50.

Vicario-Abejón, C., Collin, C., Tsoulfas, P. y McKay, R. D. (2000). Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. *Eur J Neurosci* **12**, 677-88.

Vicario-Abejón C., Johe K.K., Hazel T.G., Collazo D. y McKay R.D. (1995). Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. *Neuron*. **15** (1),105-14.

Vicario-Abejón, C., Fernandez-Moreno, C., Pichel, J. G. y De Pablo, F. (2004). Mice lacking IGF-I and LIF have motoneuron deficits in brain stem nuclei. *Neuroreport* **15**, 2769-72.

Vicario-Abejón, C., Yusta-Boyo, M. J., Fernandez-Moreno, C. y De Pablo, F. (2003). Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci* **23**, 895-906.

Vicario-Abejón C. y Yusta-Boyo M.J (2004). Generation and differentiation of astrocytes during central nervous system development and injury. En: Brain Damage and repair: From molecular research to clinical therapy. T. Herdegen, J.M. Delgado-García, Eds (Dordrecht Klüver Academic Publishers), 203-213.

Wagner, B., Natarajan, A., Grunaug, S., Kroismayr, R., Wagner, E. F. y Sibilia, M. (2006). Neuronal survival depends on EGFR signaling in cortical but not midbrain astrocytes. *EMBO J* **25**, 752-62.

Waite, K. A. y Eng, C. (2002). Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet* **70**, 829-44.

Weng, L. P., Smith, W. M., Brown, J. L. y Eng, C. (2001). PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/Grb-2/Sos complex formation in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* **10**, 605-16.

Wu, P., Tarasenko, Y. I., Gu, Y., Huang, L. Y., Coggeshall, R. E. y Yu, Y. (2002). Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. *Nat Neurosci* **5**, 1271-8.

Wu, Y., Karas, M., Dupont, J., Zhao, H., Toyoshima, Y. y Le Roith, D. (2004). Multiple signaling pathways are involved in the regulation of IGF-I receptor inhibition of PTEN-enhanced apoptosis. *Growth Horm IGF Res* **14**, 52-8.

Yamada, K. M. y Araki, M. (2001). Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* **114**, 2375-82.

Yaron, O., Farhy, C., Marquardt, T., Applebury, M. y Ashery-Padan, R. (2006). Notch1 functions to suppress cone-photoreceptor fate specification in the developing mouse retina. *Development* **133**, 1367-78.

Ye, P. y D'Ercole, A. J. (2006). Insulin-like growth factor actions during development of neural stem cells and progenitors in the central nervous system. *J Neurosci Res* **83**, 1-6.

Ye, P., Li, L., Richards, R. G., DiAugustine, R. P. y D'Ercole, A. J. (2002). Myelination is altered in insulin-like growth factor-I null mutant mice. *J Neurosci* **22**, 6041-51.

Yi, X., Schubert, M., Peachey, N. S., Suzuma, K., Burks, D. J., Kushner, J. A., Suzuma, I., Cahill, C., Flint, C. L., Dow, M. A., Leshan, R. L., King, G. L., y White, M. F. (2005). Insulin receptor substrate 2 is essential for maturation and survival of photoreceptor cells. *J Neurosci* **25**, 1240-8.

Yue, Q., Groszer, M., Gil, J. S., Berk, A. J., Messing, A., Wu, H. y Liu, X. (2005). PTEN deletion in Bergmann glia leads to premature differentiation and affects laminar organization. *Development* **132**, 3281-91.

Yusta-Boyo, M. J., Gonzalez, M. A., Pavon, N., Martin, A. B., De La Fuente, R., Garcia-Castro, J., De Pablo, F., Moratalla, R., Bernad, A. y Vicario-Abejón, C. (2004). Absence of hematopoiesis from transplanted olfactory bulb neural stem cells. *Eur J Neurosci* **19**, 505-12.

Zheng, W., Nowakowski, R. S. y Vaccarino, F. M. (2004a). Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev Neurosci* **26**, 181-96.

Zheng, W. H. y Quirion, R. (2004b). Comparative signaling pathways of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons and the role of the PI3 kinase pathway in cell survival. *J Neurochem* **89**, 844-52.

Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S. J. y Luskin, M. B. (1998). Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* **11**, 234-45.