

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Biología Celular



## TESIS DOCTORAL

**Expresión de los genes Pax en el SNC y análisis de la genoarquitectura embrionaria de la región talámica en "Xenopus laevis"**

**Expression of Pax genes in the CNS and genoarchitecture of the embryonic thalamus in "Xenopus laevis"**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Sandra Bandín Carazo**

Directores

Ruth Morona Arribas  
Agustín González Gallegos

**Madrid, 2016**

**Universidad Complutense de Madrid**

Facultad de Ciencias Biológicas



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**Expresión de los genes Pax en el SNC y análisis  
de la genoarquitectura embrionaria de la región  
talámica en *Xenopus laevis***

**Expression of Pax genes in the CNS and  
genoarchitecture of the embryonic thalamus in  
*Xenopus laevis***

Directores:

Ruth Morona Arribas  
Agustín González Gallegos

**Sandra Bandín Carazo**  
**2015**



**Universidad Complutense de Madrid**  
Facultad de Ciencias Biológicas

**Expresión de los genes Pax en el SNC y análisis  
de la genoarquitectura embrionaria de la región  
talámica en *Xenopus laevis***

Trabajo de investigación que presenta

**Sandra Bandín Carazo**

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas en la  
Universidad Complutense de Madrid

Fdo. Dña. Sandra Bandín Carazo.

Dirigido por los Doctores

**Ruth Morona Arribas**, Profesor Titular Interino y **Agustín  
González Gallegos**, Catedrático del Departamento de Biología  
Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad  
Complutense de Madrid

Fdo. Dra. Ruth Morona Arribas

Fdo. Dr. Agustín González Gallegos



La Dra. Ruth Morona Arribas y el Dr. Agustín González Gallegos, Profesores Titular y Catedrático del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid,

HACEN CONSTAR: Que Doña Sandra Bandín Carazo ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral “**Expresión de los genes Pax en el SNC y análisis de la genoarquitectura embrionaria de la región talámica en *Xenopus laevis***”, que ha terminado con el mayor aprovechamiento.

Revisado el presente trabajo, quedo conforme con su presentación para ser juzgado.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Madrid a veinte de Octubre de dos mil once.

Fdo. Dra. Ruth Morona Arribas

Fdo. Dr. Agustín González Gallegos



I would on first setting out, inform the reader that there is a much greater number of miracles and natural secrets in the frog than any one hath ever before thought of or discovered.

**Swammerdam**



# AGRADECIMIENTOS

---



Recuerdo que siempre que hablaba con amigos y familia acerca de la tesis me hacían las mismas dos preguntas que eran ya obligadas: “¿Qué es una tesis?” y su consiguiente “hija, pero cuando acabas la Tesis, que llevas ni se el tiempo!!”. Si tuviera que definirla en adjetivos, o en sustantivos, dependiendo de la RAE, la describiría en dos términos: aprendizaje y resistencia. Sin duda ha sido una etapa larga, 5 años, y con muchos momentos difíciles, pero un día te levantas y miras hacia atrás y te das cuenta de que han sido 5 años propios de una gran aventura. No sólo es una etapa de continuo aprendizaje de técnicas, de protocolos, de estudio..., sino también una etapa en la que maduras y te descubres nuevas capacidades y habilidades y las disfrutas rodeada siempre de gente maravillosa.

Hace 7 años que empecé mi andadura en el mundo puramente científico, y aún con sus momentos duros, que han sido muchos, me ha regalado grandes momentos y grandes personas durante toda la travesía. Aún hoy recuerdo el momento de la graduación de la “X” promoción de biólogos. Un momento muy especial para mí, donde estuve rodeada de grandes personas de mi vida que, aún a día de hoy, no me abandonan y me sostienen. Ese momento donde te planteas el siguiente paso a dar en tu vida, donde no sólo conlleva la próxima zancada, sino la dirección que va a marcar el rumbo de los años venideros; y es en ese momento cuando una persona de grandísimo corazón y de mente sublime me abre las puertas de su laboratorio, y no es otro que el Dr. Luis Miguel García-Segura. A él y a todo su grupo de chicas del C-01 del Instituto Cajal les debo y les deberé siempre muchísimo por todo lo que me enseñaron y me cuidaron día tras día durante 8 meses, en los que el cariño que me brindaban era propio de una familia, y hasta el día que me fui, me sentí como un miembro más. Aún conservo un precioso marco con fotos que me recuerda que la familia del C-01 me deseaba suerte para mi siguiente andadura, así que gracias es poco a todas (Yolanda, Jole, Estefi, Ana, Paloma, Olga, Isabel, María, Julia, Daniela..) por todos y cada uno de los momentos compartidos y los posteriores reencuentros.

Mi segundo paso en el camino, que se lo debo en gran parte a la Dra Carmen Rúa, fue llegar a este magnífico grupo, por lo que eternamente estaré agradecida a Agustín González por darme esta oportunidad, que desde el momento inicial confié en mí y espero que no se haya arrepentido nunca de haberlo hecho. Gracias Agus por dejarme formar parte de este grupo, en el que sin duda he aprendido todo lo que sé, tanto a nivel de trabajo diario en el laboratorio como a nivel de aprender a pensar por mí misma, y por aunar nuestras fuerzas en la etapa final a la hora de rematar por escrito tanto años de trabajo, de ilusión y de completa dedicación. Además de animarme y apoyarme a hacer una estancia en el extranjero y a participar en un número grande de Congresos, lo que ayudó a redondear este periodo maravilloso al igual que intenso.

Sin duda, gracias a ti, Ruth Morona, por ser mi maestra, mi compañera y amiga, por enseñarme todo lo que se, literalmente, y permitir saltarnos la barrera directora-estudiante, tratándome como una igual. Gracias por tu paciencia y dedicación durante todo el tiempo trabajando codo con codo, y sobre todo por ser tu principal preocupación, incluso en los momentos más duros. Gracias por apostar por mí y apoyarme en las diferentes actividades que complementan este periodo de tesis, como charlas, congresos, cursos... confiando en mí, más que yo misma. Porque eres una grandísima persona, trabajadora como pocas y tenaz. GRACIAS y espero que algún día la vida sea justa con aquellos que lo merecen y te reporte grandes y nuevas alegrías.

Gracias a Nerea Moreno, por tu disposición continua en todos los puntos y cuestiones que se me han ido planteando, y más durante esta etapa final. Por tus comentarios críticos y por tu visión siempre tranquilizadora a la hora de enfocar las situaciones adversas, por esas palabras de ánimo en momentos de crisis terribles que se nos esconden cuando más las necesitamos y que han sido muchas en estos últimos meses. Gracias por esas palabras de ánimo, de sentarnos para evaluar cada uno de los experimentos que no terminaban de salir, por esa efectividad que te caracteriza, y por hacerme sentir que podía acudir a ti siempre que lo necesitaba. Pocas personas he conocido tan resueltas y tan claras a la hora de trabajar, así que gracias por esa seguridad y pura energía que contagias y por ser un soplo de tranquilidad en los momentos más tensos.

A Jesús López, por esas conversaciones de humanidad, astronomía, política... por esos análisis críticos de actualidad que siempre dan un aire fresco a las tardes de laboratorio. Por interesarte por mi vida y mi trabajo, sobre todo en los malos momentos, gracias por el cariño y las palabras de ánimo, que siempre se agradecen y más cuando las fuerzas flaquean.

Por supuesto a mis compis de doctorado, Laura y Alberto, que me recibieron con los brazos abiertos desde el inicio. A Alberto, por enseñarme y contagiarme su excelente cuidado de los bichines, por tu tenacidad y por tantas y tantas risas en el cuarto de becarios siempre bien acompañados de canciones Alejandro, Alejandro... y por supuesto esos vídeos de la Carrá en esa hora punta de la tarde, donde la cabeza empezaba a desvariar. A Lau, por todas las veces que acudía a ti para mil y una cosas del lab, y sobre todo por esta segunda oportunidad que me ha dado la vida de volverte a tener cerca. Gracias Lau (lola) por ser, lo quieras o no, mi referente a seguir, por tu capacidad inmensa de trabajo, por tu lucha continua, por tu fuerza, superación y coraje. Gracias Lau por ser mi amiga, compañera, confidente..., por todas tus palabras de serenidad y fuerza en los momentos más duros, por saber siempre elegir las palabras exactas que me reconfortaban. Por enseñarme y estar dispuesta a ayudarme siempre, por esas tardes con papel y boli en mano, dibujando y esquematizando mi trabajo, para darme una idea clara cuando yo ya no lo veía y por esos tercios que me daban la vida. Gracias por estar cerca estos últimos años!!!

Dentro de esta gran aventura, tuve una oportunidad maravillosa de irme 6 meses al extranjero, y aunque fueron momentos duros al inicio, bien lo sufrieron mis más cercanos, una vez pasadas, fue un periodo magnífico. Trabajé y aprendí muchísimo y crecí enormemente a nivel personal en todos los sentidos. De modo que es imposible no acordarme y nombrar a toda la gente que conocí en el Roberto Mayor embryology lab, que me cuidó y me hizo sentir literalmente en casa, y con los que aún hoy guardo una tremenda amistad. A todos ellos: Manuela, Elias, Simón, Eric, Maria, Elena, Charlotte, David, Roger, y por supuesto a Roberto, mil millones de gracias, por hacer que guarde un recuerdo muy especial de todo ese tiempo.

Por supuesto que la magia de toda aventura reside en la gente que te cruzas durante el camino, y sin duda no he podido tener más suerte al respecto. Además de todos las personas que he mencionado, durante estos 5 años en la planta 12 de la Facultad de Biología he tenido el placer de compartir cientos de cafés con las chicas VIP!! Desde lo más profundo de mi ser os doy las gracias Rosa, Yasmina, Javier Lezeta, por todo el cariño que me habéis mostrado desde el primer momento, siempre incluyéndome en

comidas, cafés, escapadas..., como si fuera una integrante más de vuestro grupo. Y por supuesto a todas mis chicas: Irene, Mar, Selena e Iria, con las que “airearse” de vez en cuando ha sido un golpe de aire fresco muy importante en muchos de los momentos difíciles de este camino. Gracias por haber sido ese soporte, esas risas, esa complicidad, esa fuerza, esa serenidad, esa perspectiva..., porque habéis sido un bastón muy importante para mí, siempre os estaré muy agradecida por todo!!!

No me hace falta avanzar mucho en el pasillo para encontrar a un grupo de gente humana y maravillosa que son los “chicos y sari”. David, Javi, Sara, creo que cualquier cosa que escriba no será suficiente para agradeceros todo lo que habéis hecho por mi consciente o inconscientemente. Aquí y ahora, hago un brindis por las magníficas comidas, un continuo guiño a la risa, a la terapia, al desahogo, a respirar, a la paciencia, a la serenidad, a la lucha, a la nostalgia, a la fortaleza, al análisis de los individuos, al desparpajo..., en una palabra, a la vida, porque MAE MIA, sois y habéis sido unos compañeros únicos durante estos 5 años, de modo que sólo puedo daros las gracias por todo lo que he aprendido y disfrutado con vosotros!!! Sed buenos!!!!

Sin duda un regalazo que me ha dado la vida en este tiempo es conocer al Profesor Iñigo Azcoita. Una persona inteligente y currante es decir poco, creo que hay muy poca gente como tú, autocrítico, trabajador, con un humor fino y sarcástico insuperable e inmejorable, siempre dispuesto a ayudar... Gracias Iñigo por corregir mis patadas al diccionario, por tratarme de tu a tu siempre, por aconsejarme, por escucharme, porque estoy segura que nunca disfrutaré tanto haciendo fotos en el microscopio acompañada de una buena ópera, por enseñarme tantas curiosidades fuera de lo científico, eres una auténtico baúl de conocimiento con un corazón y una lealtad inmedible. Gracias “messié” por soportar a la pesada que te daba los buenos días mientras te usurpaba la nevera un día sí y otro también. Así que de nuevo una y mil veces más: GRACIAS!!!

Siempre he sentido el enorme cariño de todas las personas de la planta 12, pero sin duda, de una persona muy especialmente y es de Teresa, que te convertiste en mi segunda madre aquí. Gracias por cuidarme, mimarme, interesarte por mí todo este tiempo, por esas palabras de ánimo cuando mi rostro te hablaba por sí solo, por esos abrazos y por empujarme y darme fuerzas siempre y más en la recta final, gracias por todo ese cariño!!! Por supuesto no me olvido de Mar e Isabel, gracias por estar siempre dispuestas a ayudarme siempre que acudía a vosotras a pedir, que fueron unas cuantas!!, gracias por esa sonrisa y ese cariño.

Por supuesto que no me puedo dejar al Prf. Benjamín, cuyas palabras me reforzaban tantísimo a diario, que no creo que fueses consciente de hasta qué punto me aliviaban. Gracias por todo el cariño que me has dado durante todo este tiempo, por esas cañejas fuera de mordor en la mejor de las compañías, por esa sonrisa permanente, por ser responsable de grandes carcajadas. La tesis no hubiese sido lo mismo sin tu continuo interés y cariño. Por ende, tampoco me quiero olvidar de Agustín Zapata, gracias por ser culpable de muchas de las risas en mordor y fuera de mordor, por esas charlas de futuro y por las visitas al cuarto de becarios para comprobar cuanta ciencia se respiraba en el ambiente. Gracias por el cariño y todas las palabras de ánimo.

Ya lo dice mi abuela, que en esta vida hay que ser agradecido, y por eso, me disculpo por la extensión que me está llevando redactar los agradecimientos, pero no me quiero dejar a nadie en el camino. Además de todos los que he ido nombrando me faltan

aquellas personas que las llevo metidas en el corazón y en la cabeza desde que tengo uso de razón y esta es mi pequeña contribución para poder devolverles todo el cariño que me han mostrado durante toda mi vida.

Por eso, mis primeras palabras se las dedico a mis “Biofestejos”, es un auténtico placer haber compartido con vosotros, no sólo estos 5 años de tesis, sino también la carrera. Aunque sin duda, estos cinco años se han convertido en doblemente especiales, gracias a las sesiones postesis que nos servían para desconectar y para valorar los niveles de cortisol de nuestro cerebro!!jajaj por tantas y tantas risas recordando grandes momentos de la carrera que nos oxigenaban y nos daban fuerza para seguir, puesto que todos estábamos y estamos pretésicos!!! Muchísimas gracias por acogerme y cuidarme, Vir, Sara, Selene, Miguel, Félix y Lorena y respectivos. Sin duda esta “fiesta” no hubiese sido igual sin vosotros en mi camino.

He aquí un huequito para mis “Biólogos por el mundo”, mi gente, mi familia en Madrid, mis compis de carrera. Esos 10 años ya desde que nos conocemos, y es imposible resumirlo en unas líneas, tendríamos que hacer alguna película que narre nuestras vidas algún día, tal vez bajo el título “Hunting strawberries”, yo ahí lo dejo por si acaso!! Porque conoceros ha sido y es maravilloso, a mi pequeño saltamontes Noé, que lo quiero con locura, gracias por ser como sólo tú puedes ser, por esas idas de pinza, por esas risas, por ser un gran apoyo en mi vida ahora y siempre, por traer rosas y chocolate en los momentos tristes, a pesar de que estés lejos físicamente, nunca lo estarás de verdad. A Elena, porque no conozco a nadie como tú, una persona con una inteligencia y capacidad de trabajo sublime y encima con un corazón y una honestidad que no parece posible que le quepa en el cuerpecillo. Gracias por hacerme reír siempre y enseñarme con tu ejemplo a vivir la vida como se tiene que vivir. A Lucía, porque hacer viajes contigo es de las mejores cosas de estos años, por tu efectividad y buen corazón, por tu “sintetizar”, por tu tenacidad y que nadie nos toque a la gente que queremos, que nos ponemos las dos con puño en alto!!! A estrella, por tu sonrisa, disposición, y por tus tartas, lo tenía que decir obviamente, por ponerle hasta chocolate acordándote siempre de mí y de mi problema con el chocolate!!! Gracias por esa sonrisa siempre presente y esa serenidad que transmites!! A ti Eugenia, porque eres única, pintoresca, risueña, pura energía que se contagia rápidamente, PUES RESULTA... que lo echo en falta cuando estas lejos!!! Chicos, conoceros ha sido una aventura fascinante y os estaré siempre agradecida por todas las terapias de risas, por consolarme, por cuidarme, por todas y cada una de las escapadas fabulosas que hemos hecho, y todas las batallas que hemos ido venciendo durante todo este tiempo, que ni los fuegos de la chimenea se nos resisten ya eh??!!jajaja GRACIAS!!!

Siendo una chica de pueblo, no me quiero olvidar de mi gente de Aranda, entre las que mantengo buenos amigos (Glo, Raúl, Rolo...) y sobre todo cierta gentecilla que ha estado pendiente de mí durante todo el tiempo, desde mis primeros pasos en la capital, gracias Fer, por ser tan bueno, por esas risas en la época de instituto y posterior, por esos recorridos de vinos extendiendo nuestra comarca a la capital, por ser un apoyo, mi amigo, por tantas Nocheviejas juntos, y que sigamos teniendo muchos más, y por supuesto a Rebe, por transmitirme paz, alegría, serenidad y fortaleza, cuidámela Fer que esta moza vale muchísimo!!

Por supuesto gracias a ti, mi hermana de no-sangre, Carmen, porque desde el cole hemos permanecido unidas pese a vivir en distintas ciudades, por estar cuidándome

siempre, porque me conoces tanto, que con una mirada ya sabes lo que me pasa, a ti nunca te pude ocultar nada. Por estar a mi lado siempre, en las cosas buenas y malas de la vida, porque para mí eres como mi segunda hermana y por ende gracias a Anabel, Antonio y Félix, por ser parte de “mi familia”, por acogerme una y mil veces, por quererme y protegerme siempre. Car te mereces lo mejor, y espero seguir estando a tu lado 3 vidas más por lo menos!!! Gracias por tantas y tantas cosas!!! Por supuesto a Carlitos, gracias por tu fuerza, por tu energía, tu tenacidad, tus manías, tus ansias, por tantas y tantas risas, por hacer el esfuerzo de pasar a vernos siempre que venías a Madrid, por interesarte por mi trabajo, por ser ambos dos una pareja a la querré siempre, por convertir mi tristeza y agobios en fortaleza y sonrisa. Gracias, gracias y gracias!

Mis tios Jose Luis, Andrés y Cristina, por ese cariño incondicional que me habéis brindado durante toda mi vida, y a mi primiamiga Jime y Rafa por todos los “caprichos” de estos últimos años, por esas tardes de cafés de vecinos acompañados de tarta que acababan en copa, por tantas sorpresas y por haber estado siempre pendientes de mi trabajo!! Gracias por ser responsables de muchas risas, por esas reuniones de familia recuperadas que han ayudado a superar muchas adversidades, por hacerme sentir real el dicho de cuando se cierra una puerta, se abre una ventana. Gracias por ser mi familia!!!!

A mis abuelos, por ser los jefes del clan Bandín Carazo, porque pese a que ya no estéis con nosotros, sé de sobra que estaríais felices y orgullosos de todos nosotros, gracias por haberme cuidado durante toda mi infancia, por esos recuerdos mantenidos vivos en fotografías y vídeos que hacen que me quede anclada a ellos viéndolos. Gracias a mi abu Leonor (lela para mí siempre) por seguir demostrándome esa fortaleza y capacidad de superación propia de titanes, por siempre, siempre, estar pendiente de mí, de mi trabajo, de mis viajes, de mis ocios, en resumen, de toda mi vida!!! Gracias por seguir cuidándome y velando por todos nosotros!

A mis padres, por ser mis héroes de nuestro tiempo!! Me resulta imposible escribir todo lo que me gustaría deciros, pero gracias, se queda muy corto. Sois lo mejor de mi vida sin duda, y no podría parar nunca de agradeceros todas las facilidades que me habéis dado, el apoyo constante durante 28, recién 29 años. Gracias por apostar y confiar siempre en mí, por seguirme hasta otro país para ayudarme y guiarme, por luchar por mí, por empujarme cuando las fuerzas me flaqueaban, por aguantar mi angustia y mis lágrimas cuando mis ojos ya no eran capaces de retenerlas. Por ser mi soporte y empujarme cuando se me hacía cuesta arriba, por hacerme reír, por protegerme, por quererme incondicionalmente, porque esta tesis y todo lo que soy es gracias a vosotros, os quiero!!! Gracias!!!!

A mi hermana, porque no quería otra persona en mi vida, con un corazón que no le cabe en el pecho, gracias por ser la mejor hermana mayor que se pudiera desear tener. Por cuidarme siempre, no sólo cuando llegué a Madrid, sino siempre, por enseñarme ya desde el cole las mates y las ciencias, por ser mi hermana, mejor amiga, compañera de piso y mi confidente. Gracias por tu ayuda en la pelea de la maquetación de la tesis. Gracias por ese a diario, “¿qué tal el día?” cuando llegaba a casa, o un “mucho ánimo y que tengas buen día” cada vez que salía por la puerta, por animarme y quererme siempre, GRACIAS!!!

Y por último, y no menos importante a ti, Giacomo, por ser mi principal compañero en esta aventura, por ser mi pepito grillo, mis piernas y brazos, mi cabeza, mi

corazón..., por ser el punto de apoyo para sostener mi mundo, por ser mi luz y mi esperanza. Por esa “ENERGIA, la tuya y la mía juntos” que me decías en los momentos arduos de escritura. Gracias por mantener mi paciencia cuando a mí se me escapaba y por todos y cada uno de esos gestos de apoyo incondicionales, incluso duplicándote los efectos de tu propia tesis. Gracias por todos estos años, porque sin ti nada de esto hubiera sido posible.

Hagamos de nuestro ánimo y nuestra cabeza, nuestra fortaleza

**A mi familia**



# ÍNDICE

---



<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
• Anfibios	3
• Desarrollo y formación del Sistema Nervioso Central	4
• <i>Neurulación</i>	5
• <i>Formación de vesículas</i>	7
• <i>Regionalización anteroposterior, dorsoventral y radial</i>	8
• La familia de genes Pax y su implicación en el desarrollo del SNC	12
• <i>Distribución de Pax6 y Pax7 en el SNC en los vertebrados</i>	14
• Regionalización del diencefalo	17
• <i>Desarrollo del tálamo:</i>	18
1) <i>Especificación molecular temprana (prepatternning)</i>	19
2) <i>Formación y establecimiento de la Zli (MDO)</i>	20
3) <i>Especificación molecular del tálamo (patterning)</i>	21
• Organización diencefálica en anfibios: Tálamo, antecedentes y perspectiva actual	24
• Objetivos y metodología	25
• Bibliografía	27
<b>2. EXPRESIÓN DE PAX7 EN EL ENCÉFALO DE XENOPUS LAEVIS, A LO LARGO DEL DESARROLLO</b>	<b>35</b>
• Regional expression of Pax7 in the brain of <i>Xenopus laevis</i> during embryonic and larval development	37
<b>3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PAX6 Y PAX7 EN EL SNC DE XENOPUS LAEVIS ADULTO</b>	<b>59</b>
• Immunohistochemical analysis of Pax6 and Pax7 expression in the CNS of adult <i>Xenopus laevis</i>	61
<b>4. ESTUDIO GENOARQUITECTÓNICO DEL TÁLAMO DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE XENOPUS LAEVIS</b>	<b>79</b>
• Prepatternning and patterning of the thalamus along embryonic development of <i>Xenopus laevis</i>	81

<b>5. RESUMEN DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>103</b>
• Resumen de los resultados	105
• Discusión general	113
• Regionalización del territorio talámico en la evolución	113
• Expresión dinámica de Pax7 en el desarrollo y de Pax6 y Pax7 en el encéfalo adulto de <i>Xenopus laevis</i>	114
• Implicación de Pax6 y Pax7 en la regionalización del diencefalo en <i>Xenopus laevis</i>	118
• Inducción y regionalización del tálamo	119
• Bibliografía	125
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>133</b>
<b>7. CONCLUSIONS</b>	<b>137</b>
<b>8. RESUMEN</b>	<b>141</b>
<b>9. SUMMARY (RESUMEN EN INGLÉS)</b>	<b>149</b>

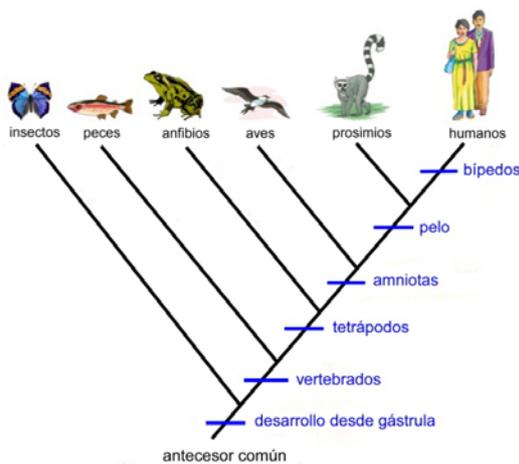
# 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

---



## LOS ANFIBIOS

Según estudios basados en indicadores moleculares (filogenómica), los anfibios constituyen un grupo monofilético respecto al resto de los tetrápodos (Zardoya y Meyer, 2001), que incluyen a anuros y urodelos dentro del grupo Batracia (Duellman y Trueb, 1994), más alejados de las cecilias (Gimnoformes).



**Figura 1.** Cladograma que representa las relaciones filogenéticas entre diversos filos de animales. El grupo de los anfibios es el único representante de los tetrápodos anamniotas, y su ancestro es común al de los amniotas.

Los anfibios son el único grupo de tetrápodos anamniotas y, aunque existen ciertas diferencias en los mecanismos particulares de desarrollo respecto a los vertebrados amniotas, poseen estructuras y mecanismos básicos compartidos, que probablemente ya estuviesen presentes en el ancestro común. De hecho, los anfibios serían los representantes vivos más cercanos a ese ancestro común y pueden presentar, de forma simplificada, la condición primitiva de las características compartidas con los tetrápodos. Por tanto, los anfibios (tetrápodos anamniotas), son un eslabón

fundamental en la transición anamnio-amniota, de especial interés en estudios evolutivos y en concreto en el desarrollo y filogenia del Sistema Nervioso Central (Fig. 1).

La especie *Xenopus laevis*, comúnmente conocida como sapo de uñas, pertenece al orden de los anuros. Fue descubierto en África al sur del Sahara por Daudin (1802), quien la denominó *Bufo laevis* y más tarde fue renombrado como *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1967; Deuchard, 1975).

Como todos los anfibios, el periodo larvario presenta características estructurales y fisiológicas radicalmente diferentes a la del adulto. Las diferencias en el modo de locomoción entre el estado larvario (con movimientos de la musculatura axial para un desplazamiento en el medio acuático) y el adulto (desplazamiento mediante sus cuatro extremidades); en la dieta (las larvas son herbívoros y los adultos carnívoros) y en los comportamientos, conlleva una metamorfosis compleja donde se producen importantes cambios que preparan al organismo para el modo de vida adulto (Gilbert y Frieden, 1981). Entre los cambios en el Sistema Nervioso Central (SNC) que se producen, se encuentra el movimiento de los ojos, desde su original posición lateral a una frontal que le permite generar una visión en tres direcciones que favorece su estilo de vida de depredador, una invasión de las nuevas extremidades y una reestructuración del sistema de control motor (ten Donkelaar, 1998).



**Figura 2.** Fotografías de una serie de especímenes en desarrollo de *Xenopus laevis* desde estadios embrionarios tardíos (st. 45) hasta el estadio 66 de clímax metamórfico, donde se aprecia el cambio en la morfología, la primera aparición de las extremidades posteriores y su reabsorción final de la cola. Abreviaturas: st: est, estadio.

El desarrollo embrionario y larvario en *Xenopus* tiene una duración de aproximadamente 3 meses y se divide en los estadios embrionarios (temprano (21-37) y tardío (38-45)), larvario premetamórfico (46-52), larvario prometamórfico (53-59) y el clímax metamórfico (60-66), caracterizados en tablas estandarizadas en base a características morfológicas externas que se corresponden con cambios a nivel fisiológico (Nieuwkoop y Faber, 1967) (Fig. 2).

En particular, el empleo de *Xenopus laevis* como modelo animal está ampliamente extendido en estudios de desarrollo, por su fácil obtención, manipulación y mantenimiento en cautividad. Además, las tablas de desarrollo permiten el seguimiento y clasificación de estadios (Nieuwkoop y Faber, 1967), que se corresponden con los cambios en el SNC, siendo éste fácilmente accesible para su aislamiento. Todo ello lo convierte en un modelo de estudio ideal en el campo de la neurociencia, entre otros.

## DESARROLLO Y FORMACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los procesos de especificación génica y restricción clonal que se suceden para llevar a cabo el desarrollo embrionario presentan un patrón común en todos los vertebrados. Éste proceso se inicia con la fecundación y continúa con múltiples divisiones celulares durante la gastrulación que conducen a la formación de un embrión trilaminar con un ectodermo, mesodermo y endodermo que darán lugar a las diferentes estructuras corporales. En el desarrollo del SNC, son fundamentales los procesos de señalización e inducción de un grupo de células del ectodermo que constituirán los precursores del sistema nervioso central al completo (Vieira et al., 2010). Esta inducción procede de células no neurales a partir de estructuras derivadas del mesodermo (notocorda y placa precordial) y del ectodermo epidérmico, tras lo cual el ectodermo neural se engrosa para formar la placa neural y el tubo neural por un proceso que se denomina *neurulación*.

- **Neurulación**

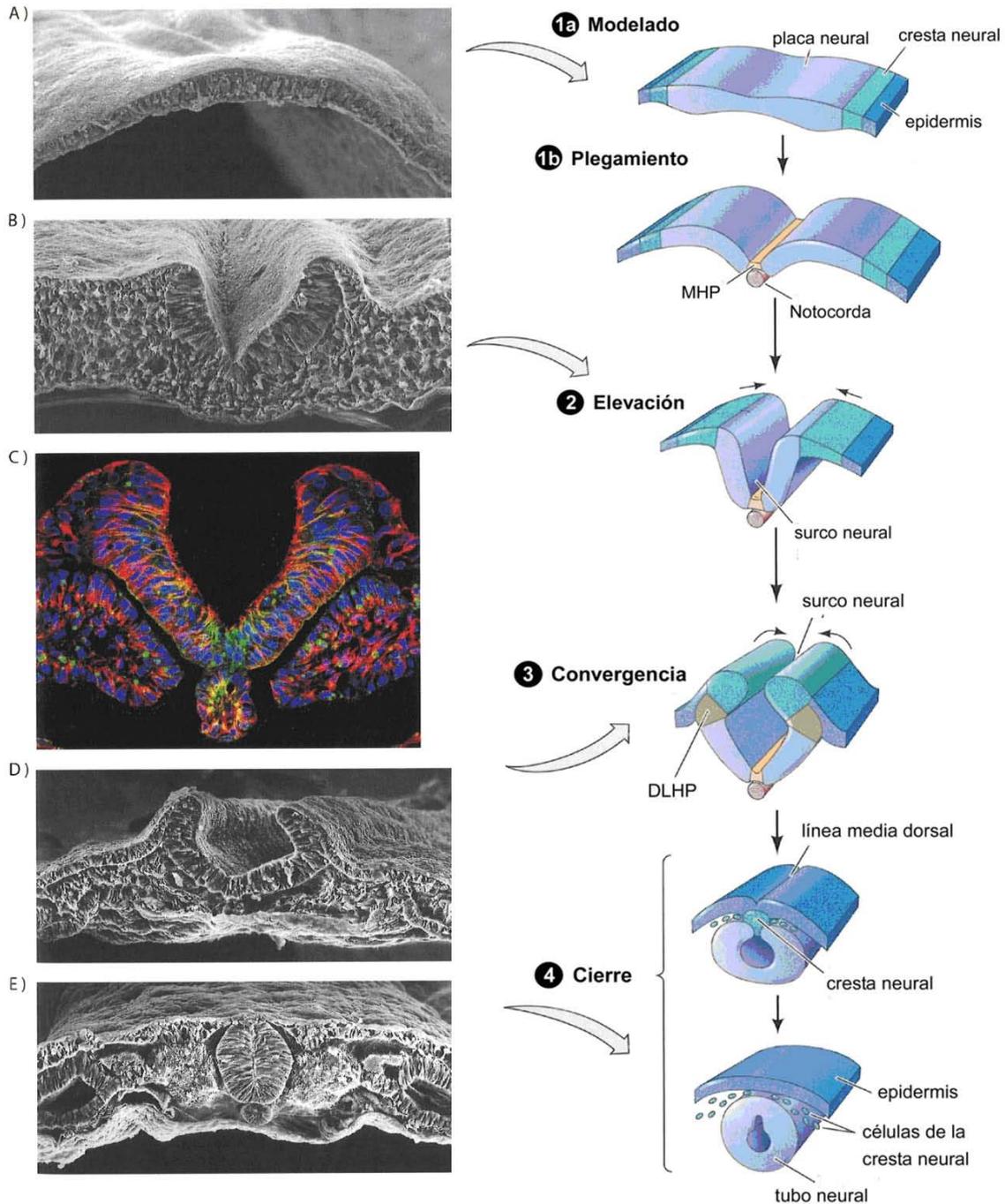
La neurulación incluye la formación del tubo neural. Para ello, se produce una doble inhibición molecular que permite la transformación del ectodermo en tejido neural. La primera inhibición, la ejerce la proteína BMP4 (proteína morfogenética de hueso, del inglés, Bone Morphogenetic Protein) sobre el ectodermo que la produce para evitar su capacidad intrínseca de transformarse en ectodermo neural. La notocorda bloquea esta inhibición a través de las proteínas Nogina y Cordina que se difunden hasta el ectodermo suprayacente para devolverle su capacidad neural (Stern, 2005; Linker et al., 2009). Por tanto, el proceso de neurulación comienza cuando el mesodermo dorsal señala a las células ectodérmicas localizadas encima de éste, produciendo la elongación de las mismas y el engrosamiento del ectodermo (Fig. 3.1a), formando así la placa neural (Smith y Schoenwolf, 1989).

A continuación, se inicia la formación del tubo neural siguiendo dos modos principales denominados: *neurulación primaria*, que ocurre en la porción anterior del tubo (de prosencéfalo a rombencéfalo), donde las células que rodean la placa neural

inducen a las células de la placa neural a proliferar, invaginarse y separarse de la superficie para formar un tubo hueco; y *neurulación secundaria* (en la médula espinal), donde el tubo neural se origina a partir de la unión de las células mesenquimáticas que constituyen un cordón sólido que posteriormente se ahueca para crear un tubo hueco.

El proceso de neurulación primaria incluye cuatro estadios espacio-temporalmente solapados (Colas y Schoenwolf, 2001) (Fig. 3):

- 1) Engrosamiento y extensión de la placa neural (dirección rostrocaudal) (Fig. 3.1a)
- 2) Plegamiento de la placa neural, que implica la formación de regiones bisagra donde la placa neural contacta con tejidos adyacentes (Fig. 3.1b y 3.2)
- 3) Convergencia de los pliegues neurales, inducido por el ectodermo no neural (Fig. 3.3)
- 4) Cierre del tubo neural, en el que los pliegues se unen en la línea media dorsal (Fig. 3.4)



**Figura 3.** Neurulación primaria en el embrión de pollo. **A, 1.** Engrosamiento de las células de la región dorsal del ectodermo para formar la placa neural. El plegamiento comienza a medida que las células del punto de bisagra medial (MHP) se anclan a la notocorda y cambian su forma, mientras que las células epidérmicas se mueven hacia la línea media dorsal. **B, 2.** Los pliegues neurales se elevan a medida que la epidermis continúa desplazándose hacia la línea media dorsal. **C, 3.** Se produce la convergencia de los pliegues neurales a medida que las células del punto de bisagra dorsolateral (DLHP) adoptan forma de cuña y las células epidérmicas empujan hacia el centro. **D y E, 4.** Los pliegues neurales convergen y las células de la cresta neural unen el tubo neural con la epidermis. Las células de la cresta neural luego se dispersan, dejando al tubo neural separado de la epidermis. Imagen modificada de Gilbert, 2014.

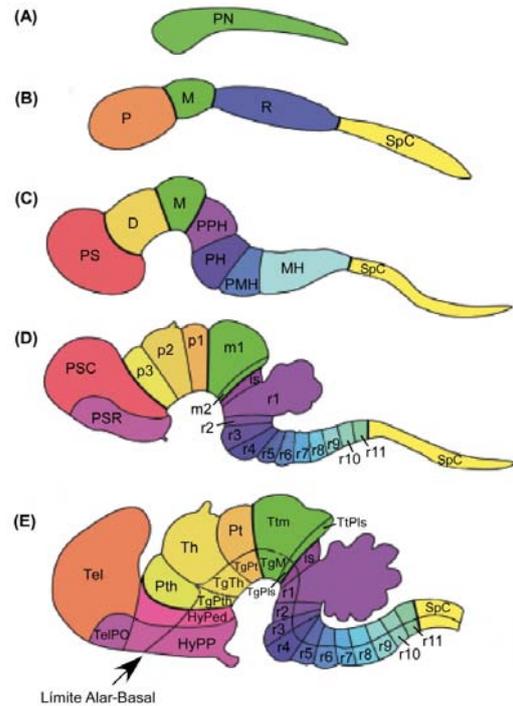
• **Formación de vesículas**

La inducción de los diferentes territorios del tubo neural tiene una especificación génica diferencial. Cada región unitaria muestra tempranamente en el desarrollo un crecimiento independiente que produce el engrosamiento de la pared del tubo neural, tanto en la región alar como en la basal, formando los segmentos neurales o neurómeros (Fig. 4). Inicialmente se distinguen anteroposteriormente tres vesículas principales en el tubo neural: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo.

Del prosencéfalo surgen, en la porción rostral el prosencéfalo secundario y caudalmente el diencefalo. El prosencéfalo secundario dará lugar al telencéfalo, las vesículas ópticas y el territorio hipotalámico en el cerebro adulto (Puelles et al., 2013).

Desde fases tempranas del desarrollo, el tubo neural comienza a plegarse sobre su eje longitudinal marcando inicialmente la flexura cefálica (Fig. 4) en la zona ventral del diencefalo (p2-p3). Más caudalmente, aparece la flexura cervical, en la transición de bulbo a médula espinal y la flexura pontina en la región r3-r4 del rombencéfalo (Fig. 4). Por tanto, el eje rostrocaudal del encéfalo adulto no es homogéneo debido a procesos secundarios de morfogénesis, lo cual determina que la localización topográfica de las estructuras cerebrales no coincida con su localización topológica respecto al eje de simetría y debe tenerse en cuenta en la

interpretación de los resultados experimentales a lo largo del desarrollo.



**Figura 4.** Esquema en vista sagital del encéfalo de ratón en desarrollo. (A) Primordio neural (PN). (B) Vesículas primordiales: el prosencéfalo (P), el mesencéfalo (M), el rombencéfalo (R) y la médula espinal (SpC). (C) La subdivisión del prosencéfalo en prosencéfalo secundario (PS) y el diencefalo (D), y la subdivisión del rombencéfalo en cuatro regiones (PPH: rombencéfalo prepontino, PH: rombencéfalo pontino, PMH: rombencéfalo pontomedular y MH: rombencéfalo medular). En (D), aparecen las divisiones del prosencéfalo secundario en rostral y caudal (PSR y PSC) y en el diencefalo los prosómeros 3-1, rostrocaudalmente. A su vez, se continúan las divisiones en el mesencéfalo (m1 y m2) y rombencéfalo (r1 a r11). (E), en el prosencéfalo se diferencian posteriormente el telencéfalo preóptico (TelPO), el hipotálamo terminal (HypT), el hipotálamo peduncular (HyPed) y los prosómeros 3-1, cuyas regiones alares darán lugar al pretálamo (Pth), el tálamo (Th) y la región preteccal o pretecho (Pt), respectivamente, y en sus regiones basales, las correspondientes áreas tegmentales (tegmento pretalámico (PThTg); tegmento talámico (ThTg); y tegmento preteccal (PtTg)). A su vez, el mesencéfalo se divide en alar: techo mesencefálico (Ttm) y basal: tegmento mesencefálico (TgM). Imagen modificada de Puelles et al., 2013.

- **Regionalización anteroposterior y dorsoventral**

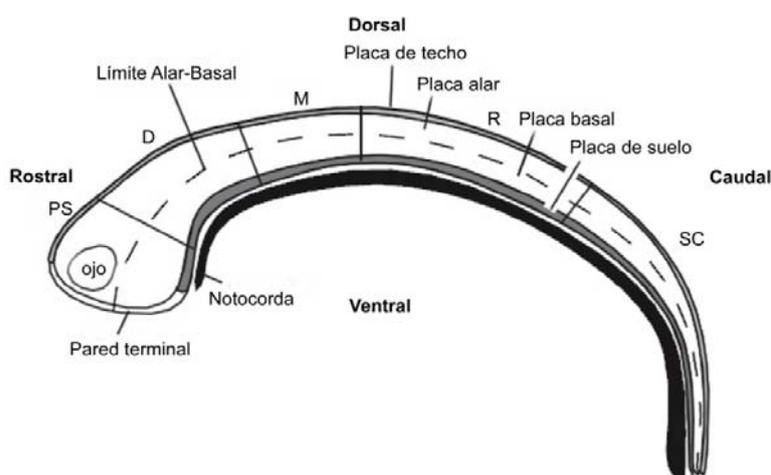
La regionalización del tubo neural y el establecimiento de las estructuras según las dimensiones topológicas y los ejes de simetría, se producen a través de la señalización desde los organizadores primarios durante la gastrulación y en las primeras etapas de la regionalización de la placa neural. De manera que se establecen tres dimensiones en el tubo neural. La dimensión anteroposterior (AP), es el primer fenómeno que acontece, al que seguidamente se añade la dimensión dorsoventral (DV), siendo ambos procesos anteriores a la inducción neural, antes incluso de que exista el primordio neural y se inicie la regionalización (Ruiz i Altaba, 1994) (Fig. 3). La tercera dimensión corresponde a la dimensión radial, que se produce por la proliferación y diferenciación de las células progenitoras desde el neuroepitelio y su migración desde la zona ventricular (vz) a la zona marginal (mz).

1) *Regionalización anteroposterior (AP)*

Tras la aparición de los organizadores

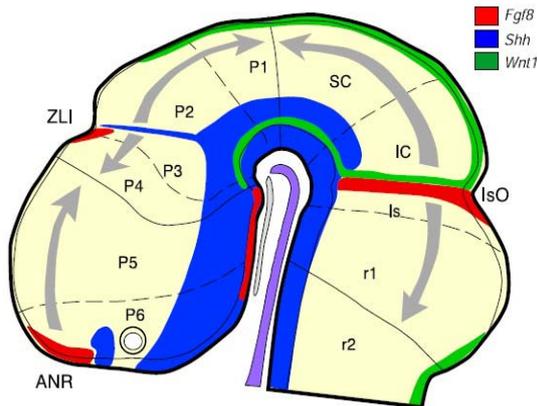
primarios (nodo de Hensen en aves y mamíferos, labio dorsal del blastoporo en anfibios) en las capas del blastodermo, surgen los organizadores secundarios: la cresta neural anterior (ANR), en el borde de la placa neural; la Zona Limitante Intratalámica (Zli), que se encuentra en el límite entre p3/p2 y el organizador ístmico (IsO), localizado en el límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo (Echevarría et al., 2003; Vieira et al., 2010). Cada uno de ellos se encuentra en diferentes regiones del primordio neural, cuyas señales van a definir la histogénesis de los principales dominios anteroposteriores: prosencéfalo secundario, diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Jessell y Sanes, 2000; Colas y Schoenwolf, 2001); así como sus divisiones dorsoventrales.

Los morfógenos (señales inductoras) mejor estudiados son los pertenecientes a las familias Wingless-int (Wnt) (Dickinson y McMahon, 1992), hedgehog (Hh) (Echelard et al., 1993), las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) (Kingsley, 1994) y los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Crossley y Martin, 1995). Todas ellas van a inducir la expresión de



**Figura 5.** Esquema representativo de las subdivisiones principales del tubo neural en las primeras etapas del desarrollo. Las cuatro zonas longitudinales en relación con la notocorda y el ectodermo son la placa del suelo, placa basal, placa alar y placa del techo. El eje anteroposterior queda representado por la línea discontinua. La región rostral se localiza a la izquierda y la ventral en la parte inferior. Abreviaturas: PS, prosencéfalo; D, diencéfalo; M, mesencéfalo; R, rombencéfalo; SC, médula espinal. Imagen modificada de Puelles, 2013.

ciertos genes en las células progenitoras, conforme a un gradiente de actividad que va generar un patrón de expresión génico restringido espaciotemporalmente en cada uno de los territorios del tubo neural, que determinará la morfogénesis y especificación final de cada uno de ellos (Fig. 6).



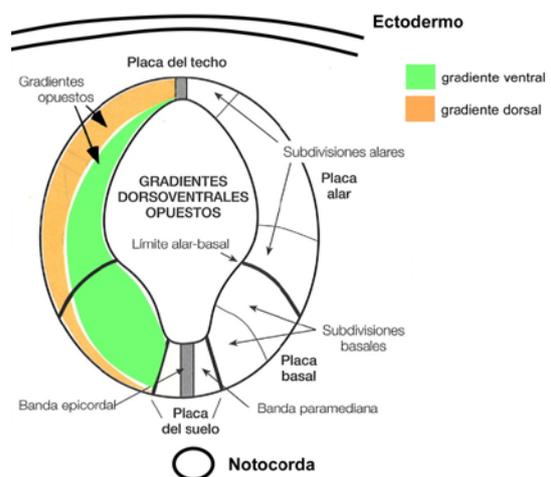
**Figura 6.** Esquema sagital del encéfalo en desarrollo donde se representan los organizadores secundarios: ANR (Anterior Neural Ridge), Zli (Zona limitans intrathalamica), IsO (Isthmic organizer). Éstos contribuyen a la regionalización rostrocaudal del encéfalo y la especificación celular mediante la expresión y liberación de los principales morfógenos (Fgf8, Shh y Wnt1); Abreviaturas: IC, colículo inferior; SC, colículo superior; p1-p6: prosómeros 1 a 6; Is, itsmo; r1-r2, rombómero 1-2. Imagen de Echevarría et al., 2003.

## 2) Regionalización dorsoventral

Durante la inducción primaria, la placa precordial y la notocorda ejercen efectos ventralizantes sobre la parte más próxima del tubo, determinando la especificación de un territorio ventral impar y medio: la placa del suelo, y los territorios adyacentes a derecha e izquierda, que forman la placa basal. Por su parte, el epitelio extraneural ejerce efectos inductores dorsalizantes con un gradiente inverso al de las señales de la notocorda, generando una

banda dorsal, la placa del techo, y unas regiones dorsolaterales más amplias a cada lado: la placa alar (Fig. 7). Las placas del suelo y basal se deben a la acción de factores como Shh; y las placas alar y del techo se deben principalmente a la acción de Wnt y BMPs. El equilibrio entre ambas señales genera una región entre la placa alar y la basal, denominado límite Alar-Basal (cuya identidad aún no es del todo clara) (Fig. 7); y el resultado son las cuatro zonas longitudinales paralelas al eje anteroposterior denominadas: placas del suelo, placa basal, placa alar y placa del techo (Fig. 5 y 7).

Estas subdivisiones se mantienen a lo largo de todo el eje anteroposterior en cada uno de los segmentos transversales, y en función de la curvatura que sigue el eje alar-basal se establecen unas coordenadas de posición determinadas en cada región.



**Figura 7.** Gradientes de señalización que se establecen desde la notocorda (verde) y el ectodermo (naranja). Ambos originan cuatro zonas longitudinales a lo largo de todo el tubo neural: placa del suelo, placa basal, placa alar y placa del techo. Imagen modificada de Puelles et al. 2008.

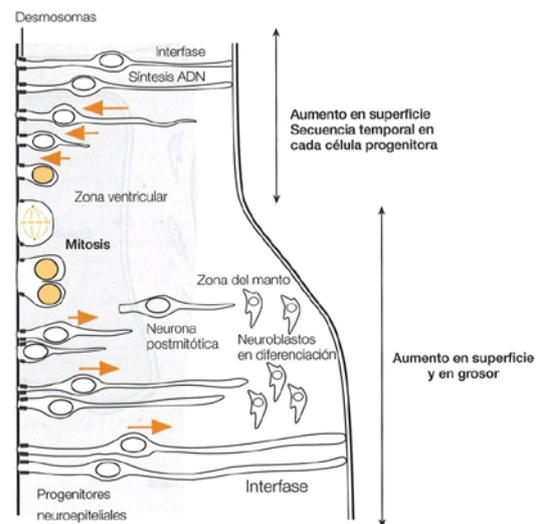
La acción conjunta de los gradientes de señalización dorsoventrales y de los organizadores secundarios en cada dominio histogénético principal, producen la regionalización y subdivisión de cada una de las vesículas principales.

Las características morfológicas y moleculares se continúan a lo largo de los diferentes neurómeros al compartir los mismos mecanismos dorsalizantes versus ventralizantes generando una división rostral, una caudal, una dorsal y una ventral. Sin embargo, el patrón anteroposterior es regulado por los organizadores transversales primarios o secundarios de manera que, a posteriori, cada uno de los neurómeros presentan propiedades moleculares individuales y un código de expresión génica único (Puelles, 2008).

### 3) Dimensión radial (histogénesis)

Tras la neurulación, en el neuroepitelio se instaura una fase de intensa proliferación que es asincrónica en los distintos niveles dorsoventrales y rostrocaudales, dando lugar a los siguientes procesos de vesiculación y segmentación del tubo neural. Las primeras divisiones son simétricas provocando un aumento en el número de células progenitoras y la elongación del tubo neural. En una segunda fase, las divisiones asimétricas generan una célula radial, también llamada glía radial (con potencialidad proliferativa), y otra célula hija que deja el ciclo y se diferencia a neurona o glía (Puelles, 2008).

Estas células hijas migran fuera de la zona ventricular y se diferencian, acumulándose en la capa marginal, generando la zona del manto (Fig. 8). La migración permite que las neuronas postmitóticas inmaduras lleguen a la capa del manto, y también que se desplacen a través del mismo a diferentes dominios histogénéticos, a través de procesos de migración radial y tangencial (Fig. 9). La migración radial es mayoritaria, y mantiene la disposición radial que viene dada por la organización del neuroepitelio en cada dominio histogénético, usando la glía radial como andamiaje a través del cual el neuroblasto se mueve. De esta manera, el código molecular que se establece en el neuroepitelio a lo largo de los ejes rostrocaudal y dorsoventral y determina el fenotipo neuronal, se transporta en el eje mediolateral (Puelles y Medina, 2002).



**Figura 8.** Secuencia del ciclo de una célula del neuroepitelio, desde la zona ventricular, donde se lleva a cabo los procesos de proliferación, para su posterior migración celular hacia la zona del manto, donde se produce la diferenciación. Imagen obtenida de Puelles, 2008.

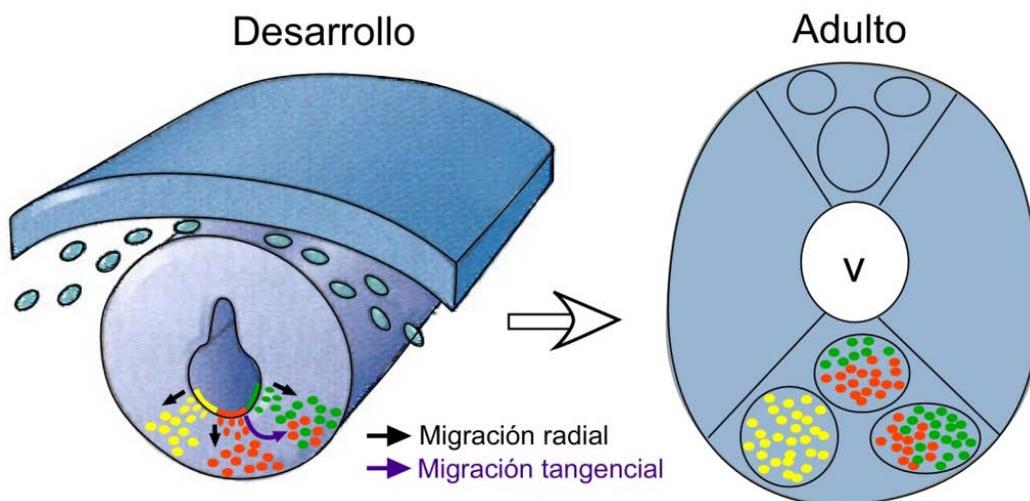
En cada región proliferativa se producen, además, células de linaje neuronal que migran tangencialmente y se mueven de un dominio histogenético radial a otro, como ocurre en el telencéfalo, donde existe una corriente migratoria rostral (RMS) desde el subpalio que proporciona interneuronas al bulbo olfativo. Este tipo de migración proporciona distintos fenotipos neuronales procedentes de dominios neurogénicos diferentes al dominio de destino (Marín et al., 2010).

La diferenciación celular (neurogénesis/gliogénesis), comienza tras la primera mitosis asimétrica y cada una de las células hijas migra siguiendo un destino neuronal o glial. En este proceso se desencadena una cascada de activación que conduce a la expresión de ciertas moléculas (neuropéptidos, neurotransmisores, neuromoduladores) y al establecimiento de contactos sinápticos específicos que darán la identidad a la célula.

Los últimos estudios neuroanatómicos comparados tratan

sobre la ontología del SNC, es decir se estudia la organización jerárquica y relación de unas entidades encefálicas con otras. Estas relaciones pueden verse desde el punto de vista del modelo segmental o neuromérico. Como hemos visto, el destino celular en el tubo neural depende de la expresión de una combinación única de genes reguladores del desarrollo, que suele estar conservada en vertebrados (Puelles y Rubenstein, 1993; Puelles y Rubenstein, 2003; Moreno et al., 2004; Moreno et al., 2008a; Ferran et al., 2009; Moreno et al., 2010; Morona et al., 2011; Puelles y Ferran, 2012). Esta combinatoria define dominios histogenéticos o áreas neuroepiteliales que producen tipos celulares concretos. Sin embargo sus límites no son absolutos y pueden variar en función de la distancia a un determinado organizador (fenómenos epistáticos) o procesos de comunicación célula-célula (Puelles y Ferran, 2012).

Además, existen fenómenos temporales que proporcionan un



**Figura 9.** Esquema del tubo neural en desarrollo, donde se representan distintas regiones progenitoras en la zona ventricular en diferentes colores y las poblaciones derivadas de cada uno de estos nichos en zonas del manto y su localización final en núcleos de origen mixto el individuo adulto tras los procesos de migración radial (flecha negra) y tangencial (flecha morada).

equilibrio parcial o transitorio de diferenciación molecular y morfológica hacia un estado cada vez más diferenciado (Puelles y Ferran, 2012). De modo que la organización final de los tipos celulares y localización de los mismos en núcleos es directamente dependiente de los patrones de expresión espaciotemporales de esos genes (Prakash y Wurst, 2006; Lohr et al., 2009; Chakrabarty et al., 2012; Magno et al., 2012), que determinan el tamaño, posición topológica relativa y conectividad de los diferentes compartimentos durante el desarrollo del encéfalo (Puelles y Ferran, 2012) (Fig. 9). Consecuentemente, los últimos estudios en neuroanatomía se han centrado en el análisis detallado de los patrones de expresión de aquellos genes que codifican para factores de transcripción, o bien para proteínas relacionadas con procesos de diferenciación (enzimas de síntesis o transporte de neurotransmisores, proteínas de adhesión y de comunicación celular). Estos estudios de los patrones espaciotemporales de una combinatoria de genes en una región determinada se ha denominado genoarquitectura (o genoarquitectonía) (Puelles y Ferran, 2012).

El análisis de los patrones de expresión génicos dentro de un modelo neuromérico es el principal marco que ayuda a entender las características comunes y específicas pertenecientes a los cerebros de especies tan diferentes como lampreas, pollos y ratones (Pombal y Puelles, 1999; Ferran et al., 2008; Thompson et al., 2008; Shimogori et al., 2010; Medina et al., 2011; Lorente-Cánovas et al., 2012).

## LA FAMILIA DE GENES PAX Y SU IMPLICACIÓN EN EL DESARROLLO DEL SNC

En las últimas décadas se han estudiado una serie de genes reguladores implicados en la especificación y el establecimiento del eje rostrocaudal, así como en el desarrollo del SNC. Una de las familias de genes fundamentales en estos procesos son las proteínas codificadas por los miembros de la familia Pax, que se caracterizan por un motivo de unión al ADN (el dominio “par”), descrito por primera vez en *Drosophila* (Bopp et al., 1986) y altamente conservado en la evolución (Balczarek et al., 1997; Wang et al., 2010). Además existen otros miembros de esta misma familia que codifican para un segundo homeodominio de unión al ADN (completo o parcial), y una última secuencia conservada, el octapéptido (Maulbecker y Gruss, 1993; Keller et al., 2010) (Fig. 10).

La presencia de estas regiones conservadas ha servido para clasificar la familia génica en cuatro grupos. La primera clase, formada por Pax1 y Pax9, carece de homeodominio y no se expresa en el SNC. Pax3 y Pax7 pertenecen a la segunda clase que codifica para el dominio par, el octapéptido y un homeodominio completo. Este grupo se expresa principalmente en células madre del músculo y en regiones medias y caudales del SNC. La tercera clase está formada por Pax2, Pax5 y Pax8, que codifican para el dominio par, el octapéptido y un dominio parcial, y son importantes en la región ístmica y en la

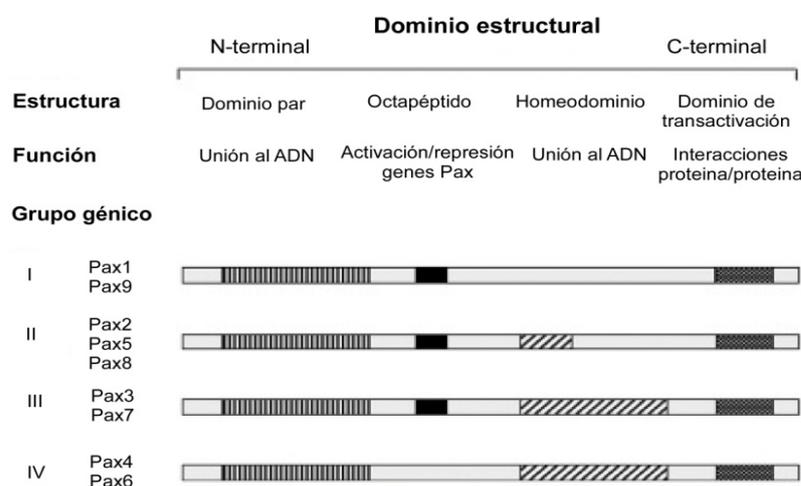
especificación neuronal rombencefálica y espinal. Una cuarta clase incluye a Pax4 y Pax6, que codifica para el dominio par y el homeodominio pero no el octapéptido, y cuya expresión es fundamental en la formación y el mantenimiento de diversas estructuras como los ojos, el páncreas y el telencéfalo (Stuart et al., 1994; Balczarek et al., 1997; Kang y Krauss, 2010). Por otra parte, se han descrito diferentes isoformas en la mayoría de los miembros que explica la gran variedad de funciones que han sido atribuidas a los distintos genes Pax (Epstein et al., 1994; Thompson y Ziman, 2011; Kiselev et al., 2012; Underhill, 2012) (Fig. 10).

Algunos de estos genes como Pax3, Pax6 y Pax7, se expresan ya en las etapas tempranas del desarrollo, durante la gastrulación y la neurulación, ejerciendo de mediadores en la regionalización dorsoventral y anteroposterior del tubo neural (Lumsden y Krumlauf, 1996; Redies y Puelles, 2001), en respuesta a morfógenos tempranos (Ericson et al., 1996; Fogel et al., 2008) y contribuyendo a la especificación de los tipos celulares y a la regionalización del

encéfalo (Kawakami et al., 1997; Soukkarieh et al., 2007).

Pax7, junto con Pax3, se expresan a lo largo del margen dorsal de la placa neural temprana, precediendo al cierre del tubo neural (Basch et al., 2006), contribuyendo a una identidad dorsal de las células de esa región, donde se forman las neuronas sensoriales e interneuronas (Goulding et al., 1991). La expresión temprana de Pax6 se localiza a lo largo de la región intermedioventral del tubo neural, generando motoneuronas e interneuronas (Goulding et al., 1993). A su vez, la expresión diferencial de Pax6 y Pax2 subdivide el tubo neural en los tres dominios anteroposteriores primarios (prosencefalo, mesencefalo y rombencefalo) (Matsunaga et al., 2000). De modo que la relación entre los genes Pax, o entre Pax y otros genes, es fundamental en la determinación de la polaridad del tubo neural, la formación de límites y la especificación de los progenitores celulares desde la zona ventricular.

Tras la regionalización inicial, los genes Pax contribuyen al balance entre la proliferación celular, el



**Figura 10.** Estructura de los genes Pax agrupados en subfamilias. Los genes Pax se caracterizan por la presencia de regiones que codifican para un dominio “par” de unión al ADN y un dominio de transactivación. Los subgrupos se distinguen en base a la presencia o ausencia de otras regiones estructurales que codifican para un octapéptido conservado y un homeodominio completo o parcial de unión al ADN. Imagen modificada de

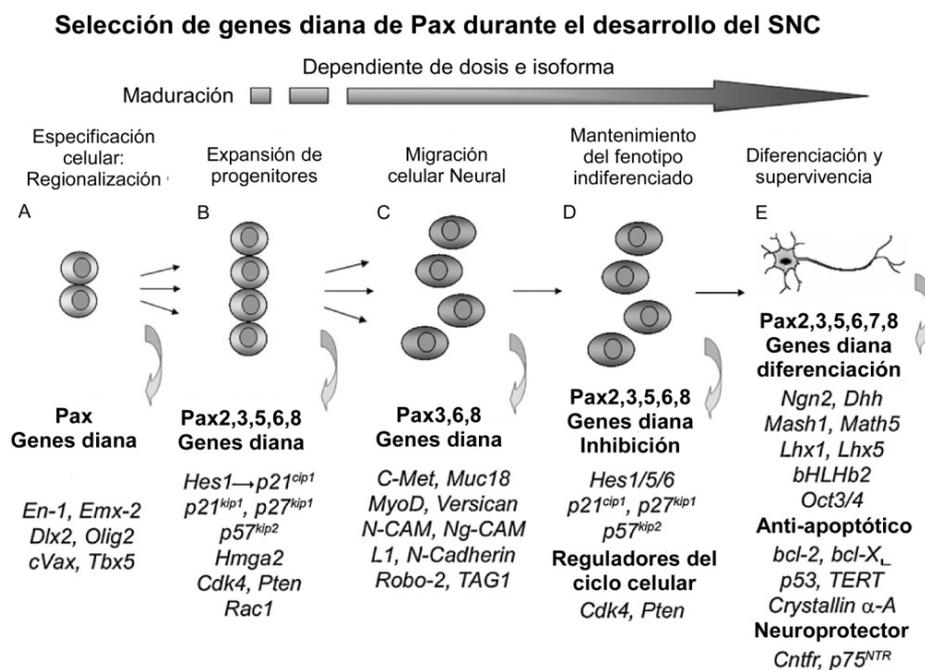
mantenimiento de las células progenitoras y los procesos de diferenciación. En particular, Pax6 controla la expansión de los progenitores de manera dosis-dependiente en las vesículas ópticas (Duparc et al., 2007) y el córtex cerebral (Berger et al., 2007). La reducción de los niveles de Pax6 conlleva una disminución de la proliferación y una temprana diferenciación de los precursores neurales, (Bel-Vialar et al., 2007; Duparc et al., 2007) pero es su sobreexpresión la que tiene este efecto en los progenitores corticales de nacimiento tardío (Tuoc et al., 2009). De manera que las variaciones en los niveles de Pax6 regulan distintas funciones como la capacidad progenitora, mantenimiento celular, progresión del ciclo celular y neurogénesis (Berger et al., 2007). Así

mismo está implicado tardíamente en proliferación celular, diferenciación y procesos de migración (Fig. 11).

Por su parte, Pax7 especifica una subpoblación de células de la cresta neural cefálica, que migran a la región craneofacial (Mansouri et al., 1996), y dan lugar a una amplia variedad de tipos celulares del epitelio olfativo (Murdoch et al., 2010).

• **Distribución de Pax6 y Pax7 en el SNC en los vertebrados**

Además de su implicación durante las fases tempranas del desarrollo, ambos miembros de la familia Pax se han utilizado como marcadores tanto de regiones específicas del encéfalo de vertebrados como en el análisis general del plan de construcción del cerebro como un todo (Fig. 12). Las proteínas que codifican estos genes están



**Figura 11.** Esquema de las distintas funciones de la familia de genes Pax, y sus dianas durante el desarrollo del SNC, incluyendo la especificación celular y la regionalización (A), la expansión de los progenitores (B), migración de las células neurales (C), el mantenimiento del fenotipo indiferenciado (D), diferenciación y mantenimiento de las células diferenciadas mediante mecanismos de supervivencia y antiapoptóticos (E). Las diferentes funciones son dependientes de concentración de Pax. Imagen modificada de Thompson y Ziman, 2011.

altamente conservadas entre los vertebrados y mantienen una distribución comparable (Goulding et al., 1993) (Fig. 12). Dichos factores de transcripción persisten en ciertos grupos celulares en el SNC adulto, por lo que han sido relacionados con el mantenimiento de la homeostasis de este tejido (Stoykova y Gruss, 1994; Duan et al., 2013) y mecanismos de reparación manteniendo la identidad posicional e influyendo en la especificación neuronal y axonogénesis en las zonas apropiadas (Sirko et al., 2009).

Por tanto, los genes Pax participan en casi todas las facetas del desarrollo del SNC, desde etapas tempranas hasta el adulto. Inicialmente, dirigen la correcta organogénesis asegurando suficientes células progenitoras y seguidamente mantienen el estado indiferenciado de las células hasta el momento adecuado de su diferenciación, para producir los distintos tipos celulares dentro de un nicho en desarrollo. En particular, el patrón de distribución de Pax6 y Pax7 en el encéfalo se mantiene conservado entre los principales grupos de vertebrados que han sido estudiados y que incluyen peces, anfibios, aves y mamíferos tanto en el desarrollo como en el individuo adulto (Stoykova y Gruss, 1994; Kawakami et al., 1997; Wullimann y Rink, 2001, 2002; Duan et al., 2013; Joven et al., 2013a, 2013b; Moreno et al., 2014) (Fig. 12).

La expresión de Pax6 se extiende rostralmente en el encéfalo de los vertebrados, tanto en desarrollo como en individuos adultos dentro del bulbo

olfativo, palio, estriado dorsal, amígdala y parte del septo (Stoykova y Gruss, 1994; Moreno et al., 2008a; Moreno et al., 2014), mientras que Pax7 se expresa en la paráfisis (Nomura et al., 2007; Joven et al., 2013a, 2013b) y en regiones más caudales, fuera de los territorios telencefálicos. Ambos están presentes en grupos hipotalámicos (Stoykova y Gruss, 1994; Moreno et al., 2012b; Domínguez et al., 2013), incluyendo la presencia de Pax6 en la adenohipófisis y Pax7 en el lóbulo intermedio de la glándula pituitaria (Hosoyama et al., 2010).

En el diencefalo, la expresión de Pax6 ocupa inicialmente toda la parte alar, quedando restringida a la eminencia pretalámica, pretálamo, habénula, epífisis y pretecho, conforme avanza el desarrollo (Stoykova y Gruss, 1994) y ocupa ciertos grupos en la placa basal de p3 y p1. Por otro lado, la expresión de Pax7 se localiza en la placa basal de p3 (Moreno et al., 2012b; Domínguez et al., 2013), en el pretecho (Wullimann y Rink, 2001; Ferreiro-Galve et al., 2008; Ferran et al., 2009; Morona et al., 2011), y en el epitálamo dentro de la porción dorsal de p2, quedando el tálamo ausente de ambos marcadores.

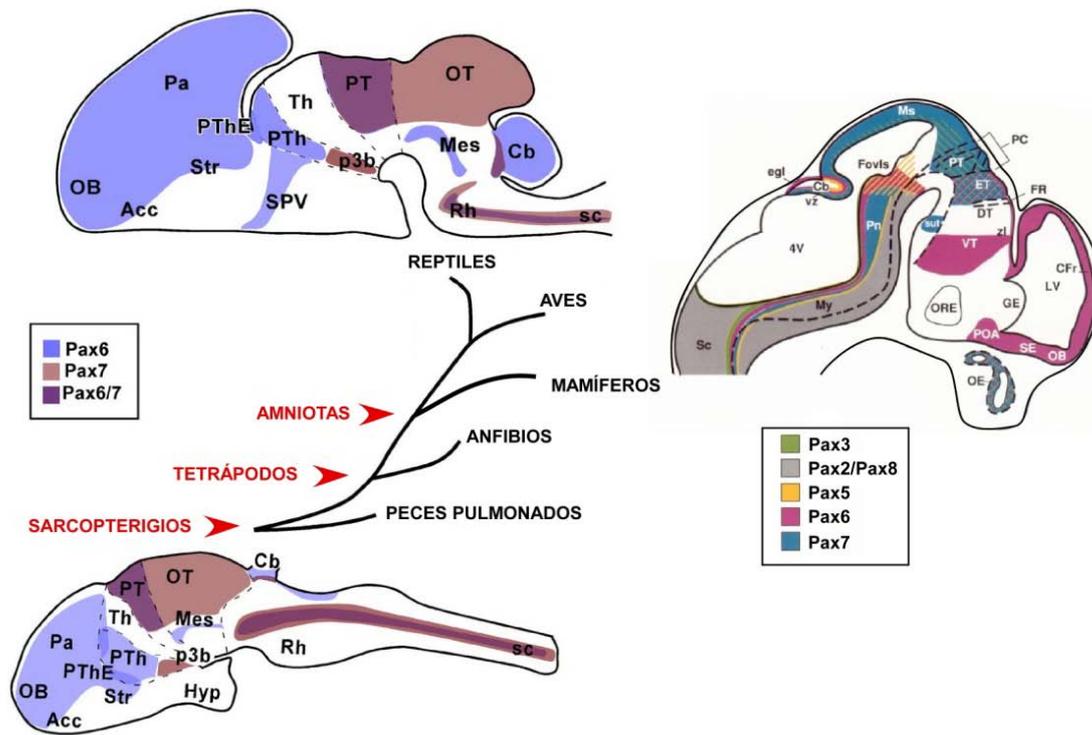
El límite entre el diencefalo y el mesencefalo viene marcado por la expresión de Pax7 y ausencia de Pax6 en el techo óptico (Thompson et al., 2007; Moreno et al., 2008a; Morona et al., 2011). Sin embargo, Pax6 se localiza en el tegmento mesencefálico en la mayoría de vertebrados (Stoykova y Gruss, 1994; Wullimann y Rink, 2001; Duan et al., 2013).

Caudalmente el rombencéfalo comprende el istmo, definido como r0 y las rombómeros 1-8. En este contexto, sólo ciertas células expresan Pax7 en la placa alar del istmo, mientras que Pax6 se encuentra ausente (Joven et al., 2013a) y en el cerebelo, región que deriva de la porción alar de r1 (Aroca y Puelles, 2005), se detecta la expresión de Pax6 en las células granulares (Wullimann y Rink, 2001; Rodríguez-Moldes et al., 2008).

En el núcleo interpeduncular, localizado en r1, se encuentran células Pax7 provenientes de r1 que se extienden desde la placa alar a la

porción ventral de r0, (Lorente-Cánovas et al., 2012). En cuanto a la médula espinal, se ha descrito la expresión ventricular y subventricular de Pax7 (dorsal) y Pax6 (ventral) durante el desarrollo, en relación con la especificación de los diferentes progenitores celulares de la médula espinal en todos los vertebrados (Ericson et al., 1997; Maczkowiak et al., 2010; Kuscha et al., 2012), manteniendo la expresión incluso en el *Pleurodeles* adulto (Joven et al., 2013a).

Por tanto, Pax6 y Pax7 mantienen un patrón de expresión restringido en el desarrollo del encéfalo, controlando su



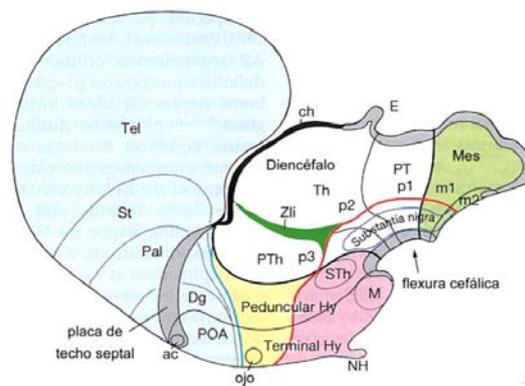
**Figura 12.** Representación esquemática de la distribución de Pax6 y Pax7 en el encéfalo de distintos modelos animales durante la transición anamnio-amniota y el grado de conservación que presentan los patrones de expresión de Pax6 y Pax7 desde los sarcopterigios hasta los mamíferos. Imágenes modificadas de Moreno et al., 2014 (izquierda) y Stoykova y Gruss, 1994 (derecha). Abreviaturas: Acc, núcleo accumbens; Cb, cerebelo; CFr, corteza frontal; DT, tálamo dorsal; egl, capa granular externa del cerebelo; ET, epitálamo; Fovls, fóvea ístmica; GE, eminencia ganglionar; Hyp, hipotálamo; LV, ventrículo lateral; Mes, MS, mesencéfalo; My, mielencéfalo; OB, bulbo olfativo; OE, neuroepitelio olfativo; ORE, receso óptico; OT, techo óptico; p3b, placa basal de p3; Pa, palio; PC, comisura posterior; Pn, puente; POA, área preóptica; PT, pretecho; PTh, pretálamo; PThE, eminencia pretalámica; Rh, rombencéfalo; sc, médula espinal; SE, septo; SPV, región hipotalámica supraoptoparaventricular; Str, estriado; sut, subtálamo; Th, tálamo; VT, tálamo ventral; vz, zona ventricular; 4V, cuarto ventrículo.

regionalización, la proliferación neuronal, la diferenciación celular y la supervivencia neuronal (Wehr y Gruss, 1996; Osumi et al., 2008). Aparentemente están relacionados con el mantenimiento de nichos de células madre pluripotentes en la madurez, ya que en vertebrados adultos han sido descritos tanto en grupos celulares de diversos tejidos caracterizadas como células progenitoras (Thompson et al., 2007; Blake et al., 2008).

En concreto, Pax6 y Pax7 son de especial interés en el desarrollo y regionalización del diencefalo, donde Pax6 está activamente implicado en el establecimiento y progresión del organizador secundario diencefálico, la zona limitans intrathalamica (Zli) junto con Shh (Caballero et al., 2014) así como, en el establecimiento del límite diencefalomesencefálico (Kerwin et al., 2004); y posteriormente se identifica en células postmitóticas pretalámicas y progenitores talámicos (Robertshaw et al., 2013; Caballero et al., 2014). A su vez, Pax7 es regulado por Shh en ciertas regiones como el tegmento mesencefálico (Watanabe y Nakamura, 2000) y ha sido descrito en relación a la regionalización de la región diencefálica de los principales grupos de vertebrados donde su patrón está altamente conservado (Jostes et al., 1990; Ferran et al., 2007; Morona et al., 2011; Joven et al., 2013a, 2013b) por lo que su estudio resulta relevante para dilucidar los mecanismos de desarrollo dentro de esta región.

## REGIONALIZACIÓN DEL DIENCÉFALO

El diencefalo es el dominio más caudal del prosencéfalo y limita a su vez con el mesencéfalo. Se divide en tres neurómeros transversales o prosómeros (p3, p2 y p1), en cada uno de los cuales pueden distinguirse las cuatro zonas longitudinales que se continúan en todo el encéfalo: placa del suelo, placa basal, placa alar y placa del techo.



**Figura 13.** Representación esquemática de las principales subdivisiones longitudinales (DV) y transversales (AP) a lo largo del prosencéfalo y el mesencéfalo, según la última interpretación del modelo prosomérico (Puelles et al., 2012b). El diencefalo (blanco) intercalado entre el mesencéfalo (verde claro) y el prosencéfalo secundario (pallio en azul, hipotálamo alar amarillo, hipotálamo basal rosa) queda subdividido en tres dominios transversales: p3, p2 y p1, cuyas principales porciones alares se denominan: pretálamo (PTh), tálamo (Th) y pretecho (PT), respectivamente. Las zonas longitudinales del techo y del suelo se representan en color gris o negro y el límite alar-basal con una línea roja. La Zli se representa en verde entre las porciones alares de los prosómeros 2 y 3. Abreviaturas: ac, comisura anterior; ch, coroides; Dg, banda diagonal; E, techo epifisario; M, región mamilr; Mes, mesencéfalo; NH, neurohipófisis; p1-p3, prosómeros 1-3; Pal, pallio; Peduncular Hy, hipotálamo peduncular; POA, área preóptica; PT, pretecho; PTh, pretálamo; STh, núcleo subtalámico; St, estriado; Tel, telencéfalo; Terminal Hy, hipotálamo terminal; Th, tálamo. Imagen modificada de Puelles y Martínez., 2013.

Las porciones alares principales de cada uno de estos neurómeros se denominan pretálamo (p3), tálamo (p2) y región pretecal (p1) (Fig. 13) (Puelles y Rubenstein, 2003) y sus regiones basales constituyen el tegmento diencefálico (García-Lopez et al., 2004; Puelles et al., 2012a).

La regionalización morfológica del diencefalo en ratón comienza en torno a E9.5 y 2-3 días después ya pueden ser identificables los tres prosómeros con la aparición de la Zli en E10-11. La Zli, es una barrera transversal neuroepitelial en el límite entre el tálamo (p2) y el pretálamo (p3) que se caracteriza por la expresión de Shh (y otras proteínas secretadas reguladoras), que influyen sobre la expresión génica de las regiones adyacentes. Las células que forman la Zli cumplen todas las características de un organizador local secundario y también se le conoce como *organizador mediodiencefálico (MDO*, del inglés, *middiencephalic organizer*) (Scholpp y Lumsden, 2010; Martínez-Ferre y Martínez, 2012).

Tras la aparición de la Zli se produce una reorganización adicional en cada prosómero y pueden observarse los territorios progenitores fundamentales que darán lugar a las poblaciones neuronales específicas definitivas. En concreto de la porción alar de p2, se desarrolla el tálamo y el epitálamo (habénula y complejo pineal), así como, de p3 deriva la eminencia pretalámica y el pretálamo, y de p1 la región pretecal.

- **Desarrollo del tálamo**

Inicialmente existe un equilibrio entre los factores dorsalizantes (Bmp4,

Bmp7 y familia Wnt), y los factores ventralizantes procedentes de la notocorda, que inducen la expresión y liberación de Shh en la placa basal (Echelard et al., 1993). La identidad de cada dominio progenitor va a depender de los gradientes de estas señales y el equilibrio de sus acciones antagónicas. De este modo, surge el concepto de límite alar-basal, que se refiere al punto de inflexión donde esas señales tienen efectos cualitativos en la identidad molecular y en el consecuente destino histogenético. Por tanto, la regionalización anteroposterior en la placa neural y en el tubo neural temprano, se regula por la competencia mutua entre la señalización por Wnt y los represores de dicha familia. Esta especificación génica temprana se modifica durante las etapas tardías del tubo neural con la aparición de la Zli, como organizador secundario intradiencefálico de la regionalización anteroposterior (Echevarría et al., 2003). Las señales provenientes de la Zli y de la placa basal y del techo, influyen en la regionalización de la porción alar de p2, donde se desarrollará dorsalmente la habénula y un territorio mayoritario que es el tálamo (Fig 16).

El tálamo limita caudalmente con el pretecho y rostralmente con la Zli, que precede al pretálamo. Es una estructura fundamental que sirve como centro de integración y relevo de la información sensorial (a excepción de la olfativa) hacia centros superiores (la corteza en los mamíferos) (Jones, 2007; Nieuwenhuys, 2007), o a las regiones subcorticales en vertebrados no



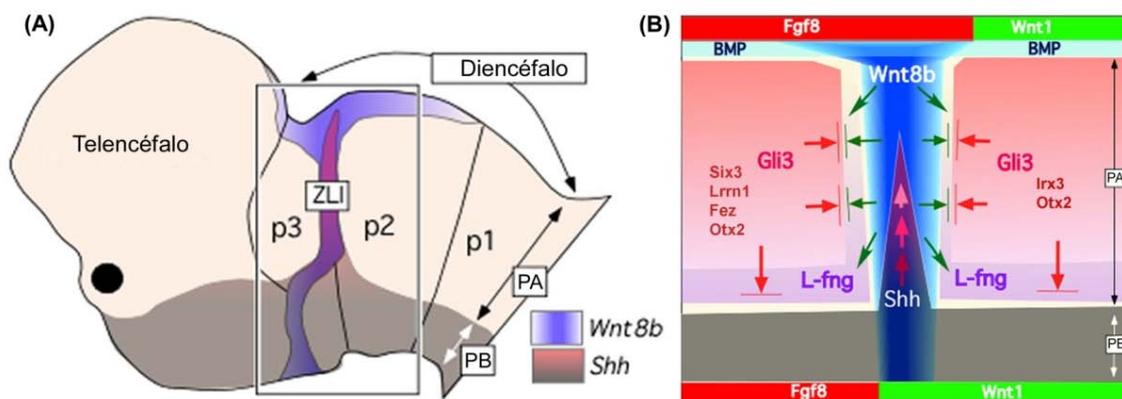
caracterizada por ser Otx-positiva (Scholpp y Lumsden, 2010), define un espacio entre Fez y Irx1 donde se va a inducir la formación de la Zli (Hirata et al., 2006; Scholpp et al., 2007).

2) *Formación y establecimiento de la Zli (MDO) (Organizador secundario)*

Tras este periodo inicial de inducción primaria, el patrón resultante es drásticamente modificado por la aparición de la Zli, el principal centro de señalización en la regionalización del diencefalo.

La aparición y posicionamiento de la Zli es un fenómeno de naturaleza inductiva, ejercido por el tejido alar (Zeltser et al., 2001; García-Lopez et al., 2004; Scholpp y Lumsden, 2010), asociado a Wnt8b, cuya expresión se localiza en el mediodiencefalo y precede a la formación de la Zli (García-Lopez et al., 2004). Inicialmente, aparece un dominio de expresión en forma de cuña en la región

alar del diencefalo medio, que progresivamente se reduce caudalmente, convirtiéndose en un pasillo estrecho limitado anteriormente por Fezf2 y Lrrn1 (futuro pretálamo); y posteriormente por Lfng, Irx1, Tcf7L2 y Wnt3 (futuro tálamo). Al mismo tiempo, existen otros factores que contribuyen a la progresión de la Zli, como Gli3, que es un represor transcripcional de Shh (Abbasi et al., 2010), y es regulado por Wnt. De manera que, Gli3 se expresa en la porción alar del diencefalo, y a medida que se induce el posicionamiento de la Zli, Wnt inhibe la expresión de Gli3 en dicha región, lo que favorece la progresión de Shh en ese pasillo formado por células Gli3-/Otx2+/Wnt8b+ (Vieira y Martínez, 2006; Vieira et al., 2010; Martínez-Ferre et al., 2013) (Fig. 15). Estos genes contribuyen a la formación de la Zli emergente junto con Pax6. Pax6 se expresa a lo largo de la placa alar, pero a medida que la Zli se extiende dorsalmente a lo largo del espacio entre



**Figura 15.** (A) Representación esquemática del prosencefalo de pollo ilustrando la idea de que la expresión de Wnt8b en forma de cuña en la porción alar del diencefalo precede a la formación de la Zli, (B) donde la interacción (activación o inhibición) entre señales diencefálicas mediadas por Wnt8b: inducción de L-fng (flechas verdes) junto con la inhibición de Gli3 (flechas rojas con líneas), definen los bordes de la prospectiva Zli y forman un pasillo donde se induce la expresión de Shh desde la preexistente placa basal (flechas rojas). A su vez, la presencia de otros factores de transcripción van a limitar anteriormente (Six3, Lrrn1, Fez, Otx2) y posteriormente (Irx3, Otx2) la formación de la Zli. Abreviaturas: PA, placa alar; PB, placa basal. Imagen modificada de Martínez-Ferre et al., 2013.

Fez e Irx, las células que conforman el núcleo central de la Zli comienzan a liberar Shh. Esto provoca que las células que expresan Pax6 ocupen posiciones más dorsales por la mutua inhibición entre Shh y Pax6 (Caballero et al., 2014), donde Shh parece actuar tras la influencia Pax6 (Chatterjee et al., 2014).

Sin embargo, aunque la inducción de la Zli parece un fenómeno estrictamente alar, existen potenciadores de la placa basal de Shh (SBE2 y SBE4), que se vuelven selectivamente activos en el tegmento de p2 o p3, distinguiéndose la parte ventral del borde interprosomérico (Jeong et al., 2006; Jeong et al., 2011). A su vez, la progresión ascendente de Shh en la Zli es inhibida por el ácido retinoico (RA) (Guinazu et al., 2007; Scholpp y Lumsden, 2010), cuya expresión se localiza en la placa del techo, pero se reduce a medida que progresa el desarrollo debido a la acción limitante de su enzima de síntesis la CYP1B1, contribuyendo a unas condiciones permisivas para la inducción de la Zli (Chambers et al., 2007) (Fig. 14B).

### *3) Especificación molecular del tálamo (patterning)*

Los límites rostral y caudal de p2 están definidos tempranamente por la expresión de Otx2 (Puelles y Martínez, 2013), pero la especificación de las principales áreas progenitoras y sus derivados está estrechamente relacionado con la señalización en gradiente por Shh que, a su vez, regula otros factores de transcripción (incluido

él mismo), implicados en la regionalización diencefálica y el destino celular talámico (Vieira et al., 2005). Una vez formada la Zli, se genera un gradiente de expresión de Shh desde las zonas próximas al organizador, junto con la placa basal, disminuyendo su concentración a medida que nos alejamos de éstos. El gradiente de concentración establecido para Shh regula la expresión de otros factores de transcripción de manera dosis-dependiente, de modo que, en cada punto, a una determinada distancia de la Zli y en cada una de las regiones adyacentes se establece una combinación única de genes, siendo Shh el principal regulador de la regionalización y la especificación molecular del tálamo (Kiecker y Lumsden, 2004; Vieira et al., 2005; Scholpp et al., 2006; Jeong et al., 2011), así como, el responsable de la especificación de las distintas clases de progenitores talámicos (Hashimoto-Torii et al., 2003; Scholpp et al., 2009; Szabó et al., 2009; Vue et al., 2009; Epstein, 2012; Hagemann y Scholpp, 2012). En la zona próxima a la Zli, las altas concentraciones de Shh inducen la formación de los progenitores talámicos rostrales (r-Th); y progresivamente en las regiones más alejadas, las bajas concentraciones inducen a los progenitores talámicos caudales (c-Th), que darán lugar a los distintos núcleos talámicos en el adulto (Fig. 16).

Las altas concentraciones de Shh inducen la expresión de genes como Nkx2.2 homólogo al gen NK2 de *Drosophila* (Price et al., 1992). Este gen, además, está implicado en mecanismos de diferenciación,

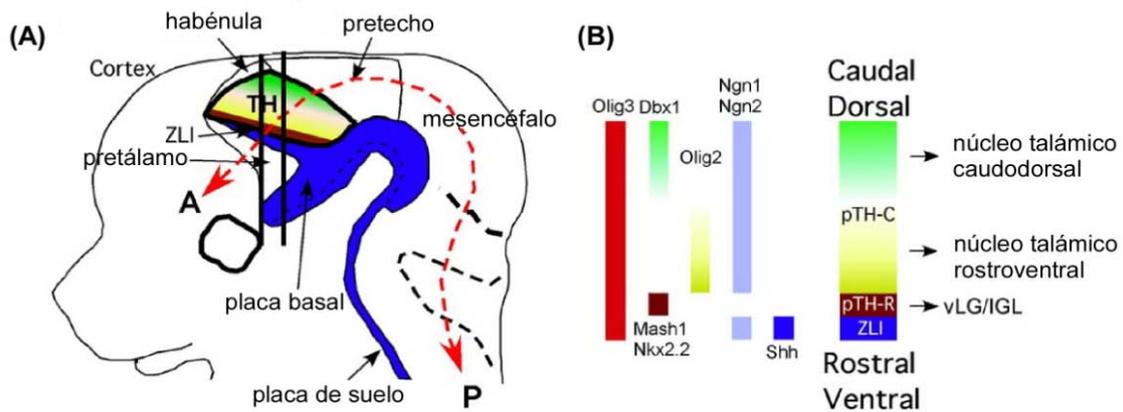


Martínez, 2013). Se ha considerado parte de la placa alar, aunque ciertos autores la incluyen dentro de la placa basal (Jeong et al., 2011), o como un territorio a medio camino del límite alar-basal. También podría representar una tercera zona longitudinal en sí misma no perteneciendo al componente alar ni basal (banda parabasal), Puelles (2001a); García-Calero et al. (2006a).

La expresión de *Ngn2* y *Gbx2* definen un territorio histogénético de mayor tamaño que se ha denominado c-Th, a partir del cual se va a constituir la población talámica glutamatérgica (Hashimoto-Torii et al., 2003; Kiecker y Lumsden, 2004; Vue et al., 2007; Kataoka y Shimogori, 2008; Vue et al., 2009). De esta región emergen derivados que constituyen los núcleos encargados de recibir la información sensorial proveniente de la periferia (con excepción de la olfativa) desde la periferia y conducirla hacia las regiones de la neocorteza a través de las

conexiones tálamo-corticales (Vue et al., 2007).

En base a la expresión diferencial de otros factores de transcripción como *Dbx1* y *Olig2*, además, se han identificado dos subregiones denominadas c-Th1 y c-Th2, situadas en la zona caudodorsal y porción rostroventral, respectivamente (Rodríguez-Seguel et al., 2009; Vue et al., 2009) (Fig. 17). Sin embargo, en otros estudios esta región se ha subdividido en lo que se han denominado pisos o *tiers*, que constituyen tres complejos pronucleares (Davila et al., 2000; Martínez-de-la-Torre et al., 2002). Estas regiones a su vez generan microzonas anteroposteriores y dorsoventrales, donde se disponen radialmente en pequeños conjuntos de neuronas formando así, los núcleos talámico profundo, intermedio y superficial de mamíferos. (Nakagawa y O'Leary, 2001; Puelles, 2001a; Vue et al., 2007).

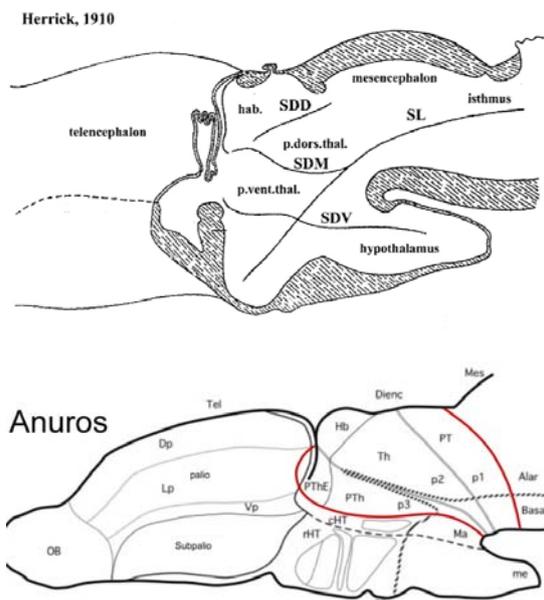


**Figura 17.** (A) Representación esquemática en una vista sagital, de embrión de ratón, de la formación de las distintas regiones talámicas influenciadas por la expresión de *Shh* desde la *Zli* y la placa basal (azul oscuro). (B) En base a la concentración de *Shh* se induce la expresión de determinados genes que van a marcar diferencialmente los distintos dominios progenitores rostral (núcleo talámico rostroventral) y caudal (núcleo talámico caudodorsal) del tálamo en base a una combinación génica única. La línea roja punteada representa el eje anteroposterior del cerebro. Abreviaturas: A-P, regionalización anteroposterior; IGL, banda intergeniculada; pTH-C, dominio progenitor talámico caudal; pTH-R, dominio progenitor talámico rostral; vLG, núcleo geniculado ventrolateral; *Zli*, Zona Limitante Intratalámica. Imagen modificada de Vue et al., 2009.

• **Organización diencefálica en anfibios: Tálamo, antecedentes y perspectiva actual**

El diencefalo de los anfibios presenta ciertas dificultades para su análisis anatómico, debido a la escasa migración radial fuera del estrato periventricular y la imposibilidad de definir límites precisos entre los núcleos. Así, en estudios previos se llegó a resultados inconsistentes. Algunos de ellos plantearon diferentes modelos anatómicos como herramientas para llevar a cabo la interpretación del diencefalo. Según el modelo columnar de Herrick (1910), el diencefalo se subdividía en columnas que incluían dorsoventralmente el epitálamo, el tálamo dorsal (*pars dorsalis thalami*), el tálamo ventral y el hipotálamo (Fig.18A). Caudalmente el epitálamo quedaba incluido en la *pars intercalaris thalami* o pretecho, interpretándolo como secciones transversales al eje longitudinal del prosencefalo (Fig. 18). Sin embargo, la postulación del modelo prosomérico (Puelles y Rubenstein, 1993; Puelles y Rubenstein, 2003), que

reconoce la existencia de un eje longitudinal prosencefálico curvado, permite una reestructuración del concepto del tálamo. El modelo prosomérico, aunque modificado, fue inicialmente conocido como modelo segmental (Röthig, 1923) o neuromérico (Bergquist, 1932), siendo el más aceptado en base al análisis de los patrones de expresión génicos. De esta forma, en anfibios se definieron los tres neurómeros diencefálicos denominados en origen como parencéfalo anterior, posterior y synencefalo (Puelles et al., 1996), donde se incluían en sus porciones alares el clásico tálamo ventral, tálamo dorsal y la región pretectal (pretectum), respectivamente. Posteriormente, la protovesícula diencefálica quedaría subdividida en tres segmentos o prosómeros 1-3. De atrás a delante, éstos contienen respectivamente en sus partes dorsales los territorios prospectivos del pretectum o región pretectal (p1 alar), tálamo más epitálamo y glándula pineal (p2 alar) y pretálamo (p3 alar), describiendo al



**Figura 18.** Representaciones esquemáticas del prosencefalo de los anfibios siguiendo el modelo columnar de Herrick (A), y el modelo prosomérico (B). Herrick utiliza en esta figura el posterior eje estándar del prosencefalo, el surco limitante de His (SL) y representa la porción dorsal (SDD), media (SDM) y ventral (SDV) relativa al surco diencefálico. Considerando al tálamo como parte de la *pars dorsalis thalami* (p.dors.thal), que incluye la mayoría de estructuras pretectales. Sin embargo, según el modelo prosomérico, el tálamo se describe como una región neuromérica distinta en la porción alar de p2. Abreviaturas: Dienc, diencefalo; Dp, palio dorsal; Hb, hab, habénula; cHT, hipotálamo caudal; Lp, palio lateral; Ma, región mamilar; me, eminencia media; Mes, mesencefalo; OB, bulbo olfativo; oc, quiasma óptico; p3-p1, prosómeros 1-3; PTh, pretálamo; PThE, eminencia pretalámica; PT, pretecho; p.vent.thal, pars ventralis thalami; rHT, hipotálamo rostral; Tel, telencefalo; Th, tálamo; Vp, palio ventral. Imágenes modificadas de (A) Puelles y Rubenstein, 2015 y (B) Morona y González, 2008.

tálamo (anteriormente denominado tálamo dorsal) como una región neuromérica distinta en la porción alar de p2 (Fig. 18B) (Puelles y Rubenstein, 1993).

En anamniotas, el tálamo contiene los núcleos encargados de recibir la información sensorial y dirigirla al telencéfalo y se subdivide en 3 núcleos periventriculares, que son el Anterior (A), central (C), y posterior (P); y un grupo lateral migrado (Neary y Northcutt, 1983). Esta parcelación del tálamo dorsal en periventricular y grupos migrados coincide con lo previamente descrito por Röthig en 1923, como regiones talámicas internas y externas en los anuros (Röthig, 1923). Sin embargo, Puelles y colaboradores concluyeron que el núcleo posterior talámico pertenece, en realidad, a la región pretectal (Puelles et al., 1996).

Por lo tanto, numerosos estudios en amniotas han centrado sus esfuerzos en estudiar y conocer la compleja organización de la región talámica a lo largo de la historia, considerando diversos aspectos de su neuroquímica, morfogenética y hodología.

La nueva visión que se adquiere con la genoarquitectura ayuda, no sólo a conocer la configuración nuclear del tálamo en el individuo adulto, sino también a definir los distintos dominios progenitores talámicos que se establecen durante el desarrollo en base a patrones de expresión génicos. En el caso de los anfibios anuros, se han obtenido, en estudios previos, datos parciales que sugieren un patrón de organización común de este territorio en los tetrápodos. Sin embargo, se requiere

un análisis exhaustivo de la organización temprana del tálamo en anfibios anuros para comprender mejor la historia evolutiva de esta región diencefálica.

## **OBJETIVOS Y METODOLOGÍA**

Como se ha descrito en el **capítulo 1**, los anfibios constituyen un modelo animal de gran interés debido a su posición filogenética estratégica como únicos representantes de los vertebrados tetrápodos anamniotas. Así, este grupo de vertebrados posee características primitivas compartidas con otros anamniotas, así como características derivadas que en muchos casos son más próximas a las que presentan los vertebrados amniotas (reptiles aves y mamíferos).

Los estudios en anfibios han constituido una de las bases primordiales en el campo de la Neurobiología Evolutiva. Desde momentos muy tempranos en la historia de la Neuroanatomía, las observaciones en anfibios fueron en gran medida la base para poder entender mejor la organización presente en sistemas nerviosos más complejos. Esto se acentuó con estudios neuroanatómicos durante las diversas etapas del desarrollo que sirvieron como modelo para comprender aspectos comunes en la evolución y desarrollo (evo-devo) de los vertebrados.

En nuestro grupo, la investigación se ha centrado en estudios neuroanatómicos en anfibios (y otros modelos de vertebrados) en individuos adultos y durante el desarrollo ontogénico. Con la puesta a punto de

metodologías actuales se pretenden aclarar aspectos básicos de cómo se organizan distintas zonas encefálicas desde el embrión hasta su disposición final madura.

En este marco de la biología evolutiva del desarrollo (evo-devo), en particular basada en estudios neuroanatómicos, el presente trabajo de Tesis Doctoral que utiliza como modelo el anfibio anuro *Xenopus laevis*, se ha planteado los siguientes objetivos:

**Objetivo 1:** Dada la relevancia de los factores de transcripción codificados por la familia de genes Pax en el desarrollo y en la regionalización del Sistema Nervioso Central (SNC), en el primer conjunto de experimentos se seleccionó el caso de Pax7 para analizar su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario y larvario que nos permitiera evaluar su implicación en la formación de determinadas regiones del encéfalo. Para ello, nos propusimos realizar estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos altamente específicos de los que se dispone para la proteína Pax7, la cual está muy conservada en los vertebrados. El hecho de poder realizar inmunodetecciones dobles y triples combinando las tinciones de Pax7 con otros marcadores que sirven para entender la organización del SNC nos permite poder analizar de manera detallada la regionalización progresiva de las distintas regiones en el caso de *Xenopus*, utilizando el modelo neuromérico actual. Estos marcadores incluyen el ácido -amino butírico (GABA), la proteína calretinina (CR), la sintasa del óxido nítrico (NOS), la

tirosina hidroxilasa (TH), y los factores de transcripción Nkx2.1 y Otp. **(Capítulo 2).**

**Objetivo 2:** Estudios previos en aves y mamíferos, demostraron la expresión de Pax6 y Pax7 en un número reducido de grupos neuronales en el SNC adulto donde podrían ser requeridos para mantener un grado de multipotencia en células progenitoras, así como mantener determinadas identidades neuronales. Sin embargo, en un estudio previo realizado en nuestro grupo se observó que en el caso de los anfibios urodelos la expresión de Pax6 y Pax7 en el encéfalo de los adultos era mucho más extensa que en los amniotas y se relacionó con el mayor grado de regeneración presentado por este grupo de anfibios en el adulto. En el presente estudio nos propusimos comprobar si esto era cierto sólo en urodelos o si se da el caso de que en *Xenopus* adulto, que pierde gran parte de su capacidad regenerativa tras la metamorfosis, también perdura una gran expresión de estos genes. Así, nos propusimos llevar a cabo un análisis inmunohistoquímico combinado en el SNC adulto de *Xenopus* para observar la expresión de estos dos genes, localizando las proteínas que codifican. El uso de tinciones dobles y triples con anticuerpos frente a marcadores de regiones particulares en el encéfalo de *Xenopus* (básicamente similares a los mencionados para el Objetivo 1) sirve para una mejor identificación topológica de las zonas marcadas, interpretadas según el modelo neuromérico que facilita realizar comparaciones con otros grupos de vertebrados. **(Capítulo 3).**

**Objetivo 3:** La última parte de nuestro estudio se dirigió al análisis de la organización genoarquitectónica del tálamo durante el desarrollo embrionario en *Xenopus laevis*. Diversos estudios han demostrado en mamíferos y aves una secuencia espacio temporal precisa de expresión de diversos genes que contribuyen a la adquisición de una capacitación zonal para la formación talámica (*preparttening*), la aparición de un organizador secundario (*Zli*) y la posterior regioinalización temprana (*patterning*). Nuestro objetivo se centra en comprobar la similitud o diferencia en la formación del tálamo en nuestro modelo de los anfibios para evaluar la conservación evolutiva de los procesos fundamentales durante el desarrollo de esta importante región diencefálica. Para ello se trabaja con hasta 22 marcadores diferentes, utilizando técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación in situ combinadas, analizando sus patrones de expresión durante el desarrollo embrionario de *Xenopus*. (**Capítulo 4**).

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, A.A., Pappas, Z., Malik, S., Bangs, F., Schmidt, A., Koch, S., Lopez-Rios, J., Grzeschik, K.H., 2010. Human intronic enhancers control distinct sub-domains of Gli3 expression during mouse CNS and limb development. *BMC Dev Biol* 10:44. doi: 10.1186/1471-213X-10-44.
- Aroca, P., Puellas, L., 2005. Postulated boundaries and differential fate in the developing rostral hindbrain. *Brain Res Brain Res Rev* 49:179-190.
- Balczarek, K.A., Lai, Z.C., Kumar, S., 1997. Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Mol Biol Evol* 14:829-842.
- Basch, M.L., Bronner-Fraser, M., Garcia-Castro, M.I., 2006. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature* 441:218-222.
- Bel-Vialar, S., Medevielle, F., Pituello, F., 2007. The on/off of Pax6 controls the tempo of neuronal differentiation in the developing spinal cord. *Dev Biol* 305:659-673.
- Berger, J., Berger, S., Tuoc, T.C., D'Amelio, M., Cecconi, F., Gorski, J.A., Jones, K.R., Gruss, P., Stoykova, A., 2007. Conditional activation of Pax6 in the developing cortex of transgenic mice causes progenitor apoptosis. *Development* 134:1311-1322.
- Bergquist, H., 1932. Zur Morphologie des Zwischenhirns bei niederen Wirbeltieren. *Acta Zool (Stockh)* 13:57-303.
- Blake, J.A., Thomas, M., Thompson, J.A., White, R., Ziman, M., 2008. Perplexing Pax: from puzzle to paradigm. *Dev Dyn* 237:2791-2803.
- Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G., Noll, M., 1986. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47:1033-1040.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M., Ericson, J., 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101:435-445.
- Caballero, I.M., Manuel, M.N., Molinek, M., Quintana-Urzaínqui, I., Mi, D., Shimogori, T., Price, D.J., 2014. Cell-autonomous repression of Shh by transcription factor Pax6 regulates diencephalic patterning by controlling the central diencephalic organizer. *Cell Rep* 8:1405-1418.
- Colas, J.F., Schoenwolf, G.C., 2001. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* 221:117-145.
- Crossley, P.H., Martin, G.R., 1995. The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121:439-451.

- Chakrabarty, K., Von Oerthel, L., Hellemons, A., Clotman, F., Espana, A., Groot Koerkamp, M., Holstege, F.C., Pasterkamp, R.J., Smidt, M.P., 2012. Genome wide expression profiling of the mesodiencephalic region identifies novel factors involved in early and late dopaminergic development. *Biol Open* 1:693-704.
- Chambers, D., Wilson, L., Maden, M., Lumsden, A., 2007. RALDH-independent generation of retinoic acid during vertebrate embryogenesis by CYP1B1. *Development* 134:1369-1383.
- Chatterjee, M., Guo, Q., Weber, S., Scholpp, S., Li, J.Y., 2014. Pax6 regulates the formation of the habenular nuclei by controlling the temporospatial expression of Shh in the diencephalon in vertebrates. *BMC Biol* 12:13. doi: 10.1186/1741-7007-12-13.
- Chatterjee, M., Li, J.Y., 2012. Patterning and compartment formation in the diencephalon. *Front Neurosci* 6:66. doi: 10.3389/fnins.2012.00066.
- Daudin, E., 1802. *Histoire Naturelle des Rainettes, des Grenouilles et des Crapauds*. Bertrandt, Libraire Levrault, Paris.
- Davila, J.C., Guirado, S., Puelles, L., 2000. Expression of calcium-binding proteins in the diencephalon of the lizard *Psammmodromus algirus*. *J Comp Neurol* 427:67-92.
- Deuchard, E., 1975. *Xenopus: the South African clawed frog*. Wiley, New York.
- Dickinson, M.E., McMahon, A.P., 1992. The role of Wnt genes in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 2:562-566.
- Domínguez, L., Morona, R., González, A., Moreno, N., 2013. Characterization of the hypothalamus of *Xenopus laevis* during development. I. The alar regions. *J Comp Neurol* 521:725-759.
- Duan, D., Fu, Y., Paxinos, G., Watson, C., 2013. Spatiotemporal expression patterns of Pax6 in the brain of embryonic, newborn, and adult mice. *Brain Struct Funct* 218:353-372.
- Duellman, W.E., Trueb, L., 1994. *Biology of Amphibians*. Johns Hopkins Univ. Press. Baltimore.
- Duparc, R.H., Abdouh, M., David, J., Lepine, M., Tetreault, N., Bernier, G., 2007. Pax6 controls the proliferation rate of neuroepithelial progenitors from the mouse optic vesicle. *Dev Biol* 301:374-387.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., McMahon, A.P., 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417-1430.
- Echevarría, D., Vieira, C., Gimeno, L., Martínez, S., 2003. Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Research Reviews* 43:179-191.
- Epstein, D.J., 2012. Regulation of thalamic development by sonic hedgehog. *Front Neurosci* 6:57. doi: 10.3389/fnins.2012.00057.
- Epstein, J., Cai, J., Glaser, T., Jepeal, L., Maas, R., 1994. Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *J Biol Chem* 269:8355-8361.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., Jessell, T.M., 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87:661-673.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T.M., Briscoe, J., 1997. Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90:169-180.
- Ferran, J.L., de Oliveira, E.D., Merchán, P., Sandoval, J.E., Sánchez-Arrones, L., Martínez-De-La-Torre, M., Puelles, L., 2009. Genoarchitectonic profile of developing nuclear groups in the chicken pretectum. *J Comp Neurol* 517:405-451.
- Ferran, J.L., Sánchez-Arrones, L., Bardet, S.M., Sandoval, J.E., Martínez-de-la-Torre, M., Puelles, L., 2008. Early pretectal gene expression pattern shows a conserved anteroposterior tripartition in mouse and chicken. *Brain Res Bull* 75:295-298.
- Ferran, J.L., Sánchez-Arrones, L., Sandoval, J.E., Puelles, L., 2007. A model of early

- molecular regionalization in the chicken embryonic pretectum. *J Comp Neurol* 505:379-403.
- Ferreiro-Galve, S., Carrera, I., Candal, E., Villar-Cheda, B., Anadón, R., Mazan, S., Rodríguez-Moldes, I., 2008. The segmental organization of the developing shark brain based on neurochemical markers, with special attention to the prosencephalon. *Brain Res Bull* 75:236-240.
- Fogel, J.L., Chiang, C., Huang, X., Agarwala, S., 2008. Ventral specification and perturbed boundary formation in the mouse midbrain in the absence of Hedgehog signaling. *Dev Dyn* 237:1359-1372.
- García-Calero, E., de Puelles, E., Puelles, L., 2006a. EphA7 receptor is expressed differentially at chicken prosomeric boundaries. *Neuroscience* 141:1887-1897.
- García-Lopez, R., Vieira, C., Echevarría, D., Martínez, S., 2004. Fate map of the diencephalon and the zona limitans at the 10-somites stage in chick embryos. *Dev Biol* 268:514-530.
- Gilbert, L., Frieden, E., 1981. *Metamorphosis. A problem in developmental biology.* 2nd edn. Plenum, New York.
- Goulding, M.D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J.R., Gruss, P., 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J* 10:1135-1147.
- Goulding, M.D., Lumsden, A., Gruss, P., 1993. Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development* 117:1001-1016.
- Guinazu, M.F., Chambers, D., Lumsden, A., Kiecker, C., 2007. Tissue interactions in the developing chick diencephalon. *Neural Dev* 2:25. doi: 10.1186/1749-8104-2-25.
- Hagemann, A.I., Scholpp, S., 2012. The Tale of the Three Brothers - Shh, Wnt, and Fgf during Development of the Thalamus. *Front Neurosci* 6:76. doi: 10.3389/fnins.2012.00076.
- Hashimoto-Torii, K., Motoyama, J., Hui, C.-C., Kuroiwa, A., Nakafuku, M., Shimamura, K., 2003. Differential activities of Sonic hedgehog mediated by Gli transcription factors define distinct neuronal subtypes in the dorsal thalamus. *Mechanisms of Development* 120:1097-1111.
- Hashimoto, H., Yabe, T., Hirata, T., Shimizu, T., Bae, Y., Yamanaka, Y., Hirano, T., Hibi, M., 2000. Expression of the zinc finger gene *fez*-like in zebrafish forebrain. *Mech Dev* 97:191-195.
- Herrick, C.J., 1910. The morphology of the forebrain in Amphibian and Reptilia. *J Comp Neurol* 20:413-547.
- Hirata, T., Nakazawa, M., Muraoka, O., Nakayama, R., Suda, Y., Hibi, M., 2006. Zinc-finger genes *Fez* and *Fez*-like function in the establishment of diencephalon subdivisions. *Development* 133:3993-4004.
- Hosoyama, T., Nishijo, K., Garcia, M.M., Schaffer, B.S., Ohshima-Hosoyama, S., Prajapati, S.I., Davis, M.D., Grant, W.F., Scheithauer, B.W., Marks, D.L., Rubin, B.P., Keller, C., 2010. A Postnatal Pax7 Progenitor Gives Rise to Pituitary Adenomas. *Genes Cancer* 1:388-402.
- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M., Wilson, S., 2002. Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* 35:255-265.
- Jeong, J.Y., Einhorn, Z., Mathur, P., Chen, L., Lee, S., Kawakami, K., Guo, S., 2007. Patterning the zebrafish diencephalon by the conserved zinc-finger protein *Fezl*. *Development* 134:127-136.
- Jeong, Y., Dolson, D.K., Waclaw, R.R., Matise, M.P., Sussel, L., Campbell, K., Kaestner, K.H., Epstein, D.J., 2011. Spatial and temporal requirements for sonic hedgehog in the regulation of thalamic interneuron identity. *Development* 138:531-541.
- Jeong, Y., El-Jaick, K., Roessler, E., Muenke, M., Epstein, D.J., 2006. A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers. *Development* 133:761-772.
- Jessell, T.M., Sanes, J.R., 2000. Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol* 10:599-611.

- Jones, E.G., 2007. *The Thalamus*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Jostes, B., Walther, C., Gruss, P., 1990. The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev* 33:27-37.
- Joven, A., Morona, R., González, A., Moreno, N., 2013a. Expression patterns of Pax6 and Pax7 in the adult brain of a urodele amphibian, *Pleurodeles waltl*. *J Comp Neurol* 521:2088-2124.
- Joven, A., Morona, R., González, A., Moreno, N., 2013b. Spatiotemporal patterns of Pax3, Pax6, and Pax7 expression in the developing brain of a urodele amphibian, *Pleurodeles waltl*. *J Comp Neurol* 521:3913-3953.
- Kang, J.S., Krauss, R.S., 2010. Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:243-248.
- Kataoka, A., Shimogori, T., 2008. Fgf8 controls regional identity in the developing thalamus. *Development* 135:2873-2881.
- Kawakami, A., Kimura-Kawakami, M., Nomura, T., Fujisawa, H., 1997. Distributions of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development. *Mech Dev* 66:119-130.
- Keller, R.G., Desplan, C., Rosenberg, M.I., 2010. Identification and characterization of *Nasonia* Pax genes. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 1:109-120.
- Kerwin, J., Scott, M., Sharpe, J., Puelles, L., Robson, S.C., Martinez-de-la-Torre, M., Ferran, J.L., Feng, G., Baldock, R., Strachan, T., Davidson, D., Lindsay, S., 2004. 3 dimensional modelling of early human brain development using optical projection tomography. *BMC Neurosci* 5:27. doi: 10.1186/1471-2202-5-27.
- Kiecker, C., Lumsden, A., 2004. Hedgehog signaling from the ZLI regulates diencephalic regional identity. *Nat Neurosci* 7:1242-1249.
- Kingsley, D.M., 1994. What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet* 10:16-21.
- Kiselev, Y., Eriksen, T.E., Forsdahl, S., Nguyen, L.H., Mikkola, I., 2012. 3T3 cell lines stably expressing Pax6 or Pax6(5a)--a new tool used for identification of common and isoform specific target genes. *PLoS One* 7:e31915.
- Kuscha, V., Frazer, S.L., Dias, T.B., Hibi, M., Becker, T., Becker, C.G., 2012. Lesion-induced generation of interneuron cell types in specific dorsoventral domains in the spinal cord of adult zebrafish. *J Comp Neurol* 520:3604-3616.
- Laberge, F., Muhlenbrock-Lenter, S., Dicke, U., Roth, G., 2008. Thalamo-telencephalic pathways in the fire-bellied toad *Bombina orientalis*. *J Comp Neurol* 508:806-823.
- Linker, C., De Almeida, I., Papanayotou, C., Stower, M., Sabado, V., Ghorani, E., Streit, A., Mayor, R., Stern, C.D., 2009. Cell communication with the neural plate is required for induction of neural markers by BMP inhibition: evidence for homeogenetic induction and implications for *Xenopus* animal cap and chick explant assays. *Dev Biol* 327:478-486.
- Lohr, H., Ryu, S., Driever, W., 2009. Zebrafish diencephalic A11-related dopaminergic neurons share a conserved transcriptional network with neuroendocrine cell lineages. *Development* 136:1007-1017.
- Lorente-Cánovas, B., Marín, F., Corral-San-Miguel, R., Hidalgo-Sánchez, M., Ferran, J.L., Puelles, L., Aroca, P., 2012. Multiple origins, migratory paths and molecular profiles of cells populating the avian interpeduncular nucleus. *Dev Biol* 361:12-26.
- Lumsden, A., Krumlauf, R., 1996. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274:1109-1115.
- Maczkowiak, F., Mateos, S., Wang, E., Roche, D., Harland, R., Monsoro-Burq, A.H., 2010. The Pax3 and Pax7 paralogs cooperate in neural and neural crest patterning using distinct molecular mechanisms, in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* 340:381-396.
- Magno, L., Oliveira, M.G., Mucha, M., Rubin, A.N., Kessaris, N., 2012. Multiple embryonic origins of nitric oxide synthase-expressing GABAergic neurons of the neocortex. *Front Neural Circuits* 6:65. doi: 10.3389/fncir.2012.00065.

- Mansouri, A., Stoykova, A., Torres, M., Gruss, P., 1996. Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7<sup>-/-</sup> mutant mice. *Development* 122:831-838.
- Manuel, M., Price, D.J., 2005. Role of Pax6 in forebrain regionalization. *Brain Res Bull* 66:387-393.
- Marín, O., Valiente, M., Ge, X., Tsai, L.H., 2010. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001834.
- Martínez-de-la-Torre, M., Garda, A.L., Puelles, E., Puelles, L., 2002. Gbx2 expression in the late embryonic chick dorsal thalamus. *Brain Res Bull* 57:435-438.
- Martínez-Ferre, A., Martínez, S., 2012. Molecular regionalization of the diencephalon. *Front Neurosci* 6:73. doi: 10.3389/fnins.2012.00073.
- Martínez-Ferre, A., Navarro-Garberí, M., Bueno, C., Martínez, S., 2013. Wnt signal specifies the intrathalamic limit and its organizer properties by regulating Shh induction in the alar plate. *J Neurosci* 33:3967-3980.
- Matsunaga, E., Araki, I., Nakamura, H., 2000. Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development* 127:2357-2365.
- Maulbecker, C.C., Gruss, P., 1993. The oncogenic potential of Pax genes. *EMBO J* 12:2361-2367.
- Medina, L., Bupesh, M., Abellán, A., 2011. Contribution of genoarchitecture to understanding forebrain evolution and development, with particular emphasis on the amygdala. *Brain Behav Evol* 78:216-236.
- Moreno, N., Bachy, I., Rétaux, S., González, A., 2004. LIM-homeodomain genes as developmental and adult genetic markers of *Xenopus* forebrain functional subdivisions. *J Comp Neurol* 472:52-72.
- Moreno, N., Domínguez, L., Morona, R., González, A., 2012b. Subdivisions of the turtle *Pseudemys scripta* hypothalamus based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. *J Comp Neurol* 520:453-478.
- Moreno, N., Joven, A., Morona, R., Bandín, S., López, J.M., González, A., 2014. Conserved localization of Pax6 and Pax7 transcripts in the brain of representatives of sarcopterygian vertebrates during development supports homologous brain regionalization. *Front Neuroanat* 8:75. doi: 10.3389/fnana.2014.00075.
- Moreno, N., Morona, R., López, J.M., González, A., 2010. Subdivisions of the turtle *Pseudemys scripta* subpallium based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. *J Comp Neurol* 518:4877-4902.
- Moreno, N., Rétaux, S., González, A., 2008a. Spatio-temporal expression of Pax6 in *Xenopus* forebrain. *Brain Res* 1239:92-99.
- Morona, R., Ferran, J.L., Puelles, L., González, A., 2011. Embryonic genoarchitecture of the pretectum in *Xenopus laevis*: a conserved pattern in tetrapods. *J Comp Neurol* 519:1024-1050.
- Mueller, T., 2012. What is the Thalamus in Zebrafish? *Front Neurosci* 6:64. doi: 10.3389/fnins.2012.00064.
- Murdoch, B., DelConte, C., Garcia-Castro, M.I., 2010. Embryonic Pax7-expressing progenitors contribute multiple cell types to the postnatal olfactory epithelium. *J Neurosci* 30:9523-9532.
- Nakagawa, Y., O'Leary, D.D., 2001. Combinatorial expression patterns of LIM-homeodomain and other regulatory genes parcellate developing thalamus. *J Neurosci* 21:2711-2725.
- Neary, T.J., Northcutt, R.G., 1983. Nuclear organization of the bullfrog diencephalon. *J Comp Neurol* 213:262-278.
- Nieuwenhuys, R., Voogd, J., and Van Huijzen, C., 2007. *The Human Central Nervous System*, Berlin: Springer.
- Nieuwkoop, P., Faber, J., 1967. *Normal table of Xenopus laevis* (Daudin). 2nd edn. Noth Holland, Amsterdam.
- Nomura, T., Haba, H., Osumi, N., 2007. Role of a transcription factor Pax6 in the developing vertebrate olfactory system. *Dev Growth Differ* 49:683-690.
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., Maekawa, M., 2008. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* 26:1663-1672.

- Pabst, O., Herbrand, H., Takuma, N., Arnold, H.H., 2000. NKX2 gene expression in neuroectoderm but not in mesendodermally derived structures depends on sonic hedgehog in mouse embryos. *Dev Genes Evol* 210:47-50.
- Pombal, M.A., Puelles, L., 1999. Prosomeric map of the lamprey forebrain based on calretinin immunocytochemistry, Nissl stain, and ancillary markers. *J Comp Neurol* 414:391-422.
- Prakash, N., Wurst, W., 2006. Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons. *J Physiol* 575:403-410.
- Pratt, T., Vitalis, T., Warren, N., Edgar, J.M., Mason, J.O., Price, D.J., 2000. A role for Pax6 in the normal development of dorsal thalamus and its cortical connections. *Development* 127:5167-5178.
- Price, M., Lazzaro, D., Pohl, T., Mattei, M.G., Ruther, U., Olivo, J.C., Duboule, D., Di Lauro, R., 1992. Regional expression of the homeobox gene Nkx-2.2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 8:241-255.
- Puelles, L., 2001a. Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:1583-1598.
- Puelles, L., Ferran, J.L., 2012. Concept of neural genoarchitecture and its genomic fundament. *Front Neuroanat* 6:47. doi: 10.3389/fnana.2012.00047.
- Puelles, L., Harrison, M., Paxinos, G., Watson, C., 2013. A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends Neurosci* 36:570-578.
- Puelles, L., Milán, F.J., Martínez-de-la-Torre, M., 1996. A segmental map of architectonic subdivisions in the diencephalon of the frog *Rana perezi*: acetylcholinesterase-histochemical observations. *Brain Behav Evol* 47:279-310.
- Puelles, L., Martínez, S. y Martínez-de-la-Torre, M., 2008. *Neuroanatomía*. Ed. Panamericana. Secciones III y IV.
- Puelles, L., Martínez-de-la-Torre, M., Bardet, S., Rubenstein, J.L.R., 2012a. Diencephalon. In: *The Mouse Nervous System*. Watson, C., Paxinos, G., Puelles, L., (Eds). Academic Press (Elsevier), London. pag: 313-336.
- Puelles, L., Martínez-de-la-Torre, M., Bardet, S., Rubenstein, J.L.R., 2012b. Hypothalamus. In: *The Mouse Nervous System*. Watson, C., Paxinos, G., Puelles, L., (Eds). Academic Press (Elsevier), London. pag: 221-312.
- Puelles, L., Martínez, S., 2013. Patterning of the Diencephalon. In: *Comprehensive Developmental Neuroscience: Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS*. Rubenstein J. R., Rakic P., (Eds). Academic Press (Elsevier), London. pag: 151-172.
- Puelles, L., Martínez, S., Martínez-de-la-Torre, M., Rubenstein, J.L.R., 2004. Gene maps and related histogenetic domains in the forebrain and midbrain. In: *The Rat Nervous System*, 3rd Edn. Paxinos, G. (Ed). Academic Press (Elsevier), San Diego. pag: 3-25.
- Puelles, L., Medina, L., 2002. Field homology as a way to reconcile genetic and developmental variability with adult homology. *Brain Res Bull* 57:243-255.
- Puelles, L., Rubenstein, J.L., 1993. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16:472-479.
- Puelles, L., Rubenstein, J.L., 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26:469-476.
- Redies, C., Puelles, L., 2001. Modularity in vertebrate brain development and evolution. *Bioessays* 23:1100-1111.
- Robertshaw, E., Matsumoto, K., Lumsden, A., Kiecker, C., 2013. Irx3 and Pax6 establish differential competence for Shh-mediated induction of GABAergic and glutamatergic neurons of the thalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E3919-3926.
- Rodríguez-Moldes, I., Ferreiro-Galve, S., Carrera, I., Sueiro, C., Candal, E., Mazan, S., Anadón, R., 2008. Development of the cerebellar body in sharks: spatiotemporal relations of Pax6

- expression, cell proliferation and differentiation. *Neurosci Lett* 432:105-110.
- Rodríguez-Seguel, E., Alarcón, P., Gómez-Skarmeta, J.L., 2009. The *Xenopus Irx* genes are essential for neural patterning and define the border between prethalamus and thalamus through mutual antagonism with the anterior repressors *Fezf* and *Arx*. *Dev Biol* 329:258-268.
- Röthig, P., 1923. Ueber das Zwischenhirn der Amphibien. *Arch Mikr Anat* 98:616-45.
- Ruiz i Altaba, A., 1994. Pattern formation in the vertebrate neural plate. *Trends Neurosci* 17:233-243.
- Scholpp, S., Delogu, A., Gilthorpe, J., Peukert, D., Schindler, S., Lumsden, A., 2009. *Her6* regulates the neurogenetic gradient and neuronal identity in the thalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19895-19900.
- Scholpp, S., Foucher, I., Staudt, N., Peukert, D., Lumsden, A., Houart, C., 2007. *Otx11*, *Otx2* and *Irx1b* establish and position the ZLI in the diencephalon. *Development* 134:3167-3176.
- Scholpp, S., Lumsden, A., 2010. Building a bridal chamber: development of the thalamus. *Trends Neurosci* 33:373-380.
- Scholpp, S., Wolf, O., Brand, M., Lumsden, A., 2006. Hedgehog signalling from the zona limitans intrathalamica orchestrates patterning of the zebrafish diencephalon. *Development* 133:855-864.
- Shimogori, T., Lee, D.A., Miranda-Angulo, A., Yang, Y., Wang, H., Jiang, L., Yoshida, A.C., Kataoka, A., Mashiko, H., Avetisyan, M., Qi, L., Qian, J., Blackshaw, S., 2010. A genomic atlas of mouse hypothalamic development. *Nat Neurosci* 13:767-775.
- Sirko, S., Neitz, A., Mittmann, T., Horvat-Brocker, A., von Holst, A., Eysel, U.T., Faissner, A., 2009. Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex. *Brain* 132:2252-2264.
- Smith, J.L., Schoenwolf, G.C., 1989. Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation. *J Exp Zool* 250:49-62.
- Soukkarieh, C., Agius, E., Soula, C., Cochard, P., 2007. *Pax2* regulates neuronal-glia cell fate choice in the embryonic optic nerve. *Dev Biol* 303:800-813.
- Stern, C.D., 2005. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development* 132:2007-2021.
- Stoykova, A., Gruss, P., 1994. Roles of *Pax*-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 14:1395-1412.
- Stuart, E.T., Kioussi, C., Gruss, P., 1994. Mammalian *Pax* genes. *Annu Rev Genet* 28:219-236.
- Szabó, N.E., Zhao, T., Zhou, X., Álvarez-Bolado, G., 2009. The role of Sonic hedgehog of neural origin in thalamic differentiation in the mouse. *J Neurosci* 29:2453-2466.
- ten Donkelaar, H.J., 1998. Anurans. The Central Nervous System of Vertebrates. Nieuwhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C, editors. London: Springer.
- Thompson, J.A., Lovicu, F.J., Ziman, M., 2007. *Pax7* and superior collicular polarity: insights from *Pax6* (*Sey*) mutant mice. *Exp Brain Res* 178:316-325.
- Thompson, J.A., Zembrzycki, A., Mansouri, A., Ziman, M., 2008. *Pax7* is requisite for maintenance of a subpopulation of superior collicular neurons and shows a diverging expression pattern to *Pax3* during superior collicular development. *BMC Dev Biol* 8:62. doi: 10.1186/1471-213X-8-62.
- Thompson, J.A., Ziman, M., 2011. *Pax* genes during neural development and their potential role in neuroregeneration. *Prog Neurobiol* 95:334-351.
- Tuoc, T.C., Radyushkin, K., Tonchev, A.B., Pinon, M.C., Ashery-Padan, R., Molnar, Z., Davidoff, M.S., Stoykova, A., 2009. Selective cortical layering abnormalities and behavioral deficits in cortex-specific *Pax6* knock-out mice. *J Neurosci* 29:8335-8349.
- Underhill, D.A., 2012. *PAX* proteins and fables of their reconstruction. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 22:161-177.
- Vieira, C., Garda, A.L., Shimamura, K., Martínez, S., 2005. Thalamic development induced by *Shh* in the chick embryo. *Dev Biol* 284:351-363.

- Vieira, C., Martínez, S., 2006. Sonic hedgehog from the basal plate and the zona limitans intrathalamica exhibits differential activity on diencephalic molecular regionalization and nuclear structure. *Neuroscience* 143:129-140.
- Vieira, C., Pombero, A., García-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarría, D., Martínez, S., 2010. Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int J Dev Biol* 54:7-20.
- Vue, T.Y., Aaker, J., Taniguchi, A., Kazemzadeh, C., Skidmore, J.M., Martin, D.M., Martin, J.F., Treier, M., Nakagawa, Y., 2007. Characterization of progenitor domains in the developing mouse thalamus. *J Comp Neurol* 505:73-91.
- Vue, T.Y., Bluske, K., Alishahi, A., Yang, L.L., Koyano-Nakagawa, N., Novitch, B., Nakagawa, Y., 2009. Sonic hedgehog signaling controls thalamic progenitor identity and nuclei specification in mice. *J Neurosci* 29:4484-4497.
- Wang, W., Zhong, J., Wang, Y.Q., 2010. Comparative genomic analysis reveals the evolutionary conservation of Pax gene family. *Genes Genet Syst* 85:193-206.
- Watanabe, Y., Nakamura, H., 2000. Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by Sonic hedgehog. *Development* 127:1131-1140.
- Wehr, R., Gruss, P., 1996. Pax and vertebrate development. *Int J Dev Biol* 40:369-377.
- Wullmann, M.F., Rink, E., 2001. Detailed immunohistology of Pax6 protein and tyrosine hydroxylase in the early zebrafish brain suggests role of Pax6 gene in development of dopaminergic diencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 131:173-191.
- Wullmann, M.F., Rink, E., 2002. The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. *Brain Res Bull* 57:363-370.
- Zardoya, R., Meyer, A., 2001. On the origin of and phylogenetic relationships among living amphibians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7380-7383.
- Zeltser, L.M., Larsen, C.W., Lumsden, A., 2001. A new developmental compartment in the forebrain regulated by Lunatic fringe. *Nat Neurosci* 4:683-684.

**2. EXPRESIÓN DE PAX7 EN EL  
ENCÉFALO DE *XENOPUS LAEVIS*,  
A LO LARGO DEL DESARROLLO**

---





# Regional expression of Pax7 in the brain of *Xenopus laevis* during embryonic and larval development

Sandra Bandín, Ruth Morona, Nerea Moreno and Agustín González\*

Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University Complutense, Madrid, Spain

## Edited by:

Javier DeFelipe, Cajal Institute, Spain

## Reviewed by:

Manuel A. Pombal, University of Vigo, Spain

Loreta Medina, Universidad de Lleida, Spain

## \*Correspondence:

Agustín González, Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Universidad Complutense, Calle José Antonio Novais 2, 28040 Madrid, Spain  
e-mail: agustin@bio.ucm.es

Pax7 is a member of the highly conserved Pax gene family that is expressed in restricted zones of the central nervous system (CNS) during development, being involved in early brain regionalization and the maintenance of the regional identity. Using sensitive immunohistochemical techniques we have analyzed the spatiotemporal pattern of Pax7 expression in the brain of the anuran amphibian *Xenopus laevis*, during development. Pax7 expression was first detected in early embryos in the basal plate of prosomere 3, roof and alar plates of prosomere 1 and mesencephalon, and the alar plate of rhombomere 1. As development proceeded, Pax7 cells were observed in the hypothalamus close to the catecholaminergic population of the mammillary region. In the diencephalon, Pax7 was intensely expressed in a portion of the basal plate of prosomere 3, in the roof plate and in scattered cells of the thalamus in prosomere 2, throughout the roof of prosomere 1, and in the commissural and juxtacommissural domains of the pretectum. In the mesencephalon, Pax7 cells were localized in the optic tectum and, to a lesser extent, in the torus semicircularis. The rostral portion of the alar part of rhombomere 1, including the ventricular layer of the cerebellum, expressed Pax7 and, gradually, some of these dorsal cells were observed to populate ventrally the interpeduncular nucleus and the isthmus (rhombomere 0). Additionally, Pax7 positive cells were found in the ventricular zone of the ventral part of the alar plate along the rhombencephalon and the spinal cord. The findings show that the strongly conserved features of Pax7 expression through development shared by amniote vertebrates are also present in the anamniote amphibians as a common characteristic of the brain organization of tetrapods.

**Keywords:** Pax genes, immunohistochemistry, segmental organization, diencephalon, mesencephalon, brain evolution

## INTRODUCTION

The development of the central nervous system (CNS) depends on a number of multileveled interactions of products of several large gene families, which act as transcriptional regulators and signaling molecules that guide molecular events in the regional

specification, cellular determination and, ultimately, morphogenesis. Thus, morphological similarities or differences during vertebrate evolution are determined by the expression of pivotal genes, and related species frequently show common patterns of expression of developmental genes in specific regions of the CNS, supporting their homology (Davidson, 2006; Davidson and Erwin, 2006; Carroll, 2008).

Pax genes encode a family of highly conserved transcription factors characterized by the presence of a paired domain that confers sequence-specific binding to DNA; in addition, Pax transcription factors may also have an octapeptide motif and part or all of a homeobox DNA-binding domain (Balczarek et al., 1997; Chi and Epstein, 2002; Vorobyov and Horst, 2006; Lang et al., 2007; Wang et al., 2010). Among the Pax genes, Pax7 has the paired domain, the octapeptide motif, and the homeobox domain and is expressed in specific regions of the developing brain. It is involved in neuronal proliferation, brain regionalization, cell differentiation and neuronal survival (Wehr and Gruss, 1996; Lang et al., 2007; Thompson et al., 2008; Wang et al., 2008; Thompson and Ziman, 2011).

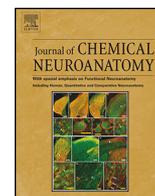
Previous research has established that the gene Pax7 is expressed during early brain development in regionally restricted patterns (highly overlapping with Pax3) within the diencephalon, mesencephalon, hindbrain and spinal cord in all species studied

**Abbreviations:** ABB, alar basal boundary; al, anterior lobe of the hypophysis; aol, area octavolateralis; ap, alar plate; APT, anterior pretectal nucleus; bp, basal plate; C, central thalamic nucleus; Cb, cerebellum; cc, central canal; CoP, commissural pretectum; dh, dorsal horn of the spinal cord; Gc, griseum central; GT, griseum tectale; H, hypothalamus; il, intermediate lobe of the hypophysis; Ip, interpeduncular nucleus; ISc, inner nucleus of the subcommissural organ; JcP, juxtacommissural pretectum; LDT, laterodorsal tegmental nucleus; LPD, lateral posterodorsal nucleus; Ma, mammillary region; Mes, mesencephalon; mz, mantle zone; nl, neural lobe of the hypophysis; OPT, olivary pretectal nucleus; OSc, outer nucleus of the subcommissural organ; OT, optic tectum; p1–p3, prosomeres 1–3; PcP, precommissural pretectum; PcPC, parvocellular nucleus of the posterior commissure; Pdi, posterodorsal tegmental nucleus, isthmus part; PO, preoptic area; PrPt, principal pretectal nucleus; r0, isthmus (rhombomere r0); r1–r8, rhombomeres 1–8; r1c, caudal part of rhombomeres 1; r1r, rostral part of rhombomeres 1; Rh, rhombencephalon; RM, retromammillary nucleus; Rm, nucleus reticularis medius; Rs, nucleus reticularis superior; sc, spinal cord; SC, suprachiasmatic nucleus; ScO, subcommissural organ; SM, superficial mammillary nucleus; SpL, spiriformis lateralis; svz, subventricular zone; Teg, mesencephalic tegmentum; Tel, telencephalon; Tmg, magnocellular nucleus of the torus semicircularis; Ts, torus semicircularis; Tub, tuberal hypothalamic region; v, ventricle; vh, ventral horn of the spinal cord; VJc, ventral juxtacommissural nucleus; vz, ventricular zone.

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE  
PAX6 Y PAX7 EN EL SNC DE  
*XENOPUS LAEVIS* ADULTO**

---





## Immunohistochemical analysis of Pax6 and Pax7 expression in the CNS of adult *Xenopus laevis*



Sandra Bandín, Ruth Morona, Jesús M. López, Nerea Moreno, Agustín González\*

Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University Complutense, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 January 2014

Received in revised form 26 March 2014

Accepted 27 March 2014

Available online 6 April 2014

#### Keywords:

Pax genes

Immunohistochemistry

Segmental organization

Telencephalon

Diencephalon

Brain evolution

### ABSTRACT

Pax6 and Pax7 are transcription factors essential for the development of the CNS. In addition, increasing data, mainly obtained in amniotes, support that they are expressed in subsets of neurons in the adult, likely playing a role in maintaining neuron type identity. In the present study we analyzed the detailed distribution of Pax6 and Pax7 cells in the adult CNS of *Xenopus laevis*. Immunohistochemistry with antibodies that are required for high-resolution analysis of Pax-expressing cells was conducted. A wide distribution of Pax6 and Pax7 cells throughout the CNS was detected, with distinct patterns that showed only slight overlapping. Only Pax6 was expressed in the telencephalon, including the olfactory bulbs, septum, striatum and amygdaloid complex. In the diencephalon, Pax6 and Pax7 were distinct in the alar and basal parts, respectively, of prosomere 3. Large numbers of Pax6 and Pax7 cells were distributed in the pretectal region (alar plate of prosomere 1) but only Pax6 cells extended into basal plate. Pax7 specifically labeled cells in the optic tectum, including the ventricular zone, and Pax6 cells were the only cells found in the tegmentum. Pax6 was found in most granule cells of the cerebellum and Pax7 expression was found only in the ventricular zone. In the rostral rhombomere 1, Pax7 labeling was detected in cells of the ventricular zone of the alar plate, but numerous migrated cells were located in the basal plate, including the griseum centrale and the interpeduncular nucleus. Pax6 cells also formed a column of scattered neurons in the reticular formation and were found in the octavolateral area. The rhombencephalic ventricular zone of the alar plate expressed Pax7. Dorsal Pax7 cells and ventral Pax6 cells were found along the spinal cord separated from the ventricle, which did not show immunoreactivity. Our results show that the expression of Pax6 and Pax7 is widely maintained in the adult brain of *Xenopus*, like in urodele amphibians and in contrast to the situation described in amniotes. Therefore, in amphibians these transcription factors seem to be needed to maintain specific entities of subpopulations of neurons in the adult CNS.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** A, anterior nucleus of the thalamus; ABB, alar-basal boundary; Acc, accumbens nucleus; al, anterior lobe of the hypophysis; aol, area octavolateralis; ap, alar plate; APt, anterior pretectal nucleus; Av, anteroventral tegmental nucleus; b, basal band of the mesencephalon; bp, basal plate; BSM, bed nucleus of the stria medullaris; BST, bed nucleus of the stria terminalis; CB, calbindin D-28k; Cb, cerebellum; cc, central canal; CeA, central amygdala; ChAT, choline acetyltransferase; chp, choroid plexus; CoP, commissural pretectum; d, dorsal band of the mesencephalon; dh, dorsal horn of the spinal cord; DMB, diencephalo-mesencephalic boundary; DMN, dorsal medullary nucleus; Dp, dorsal pallium; fr, fasciculus retroflexus; Gc, griseum centrale; gl, glomerular layer of the olfactory bulb; GT, griseum tectale; H, hypothalamus; Hd, dorsal habenular nucleus; igl, internal granular layer of the olfactory bulb; III, oculomotor nucleus; il, intermediate lobe of the hypophysis; Ip, interpeduncular nucleus; Ipn, interpeduncular neuropil; Is, isthmus nucleus; ISc, inner nucleus of the subcommissural organ; Is1, islet 1; IV, trochlear nucleus; JcP, juxtacommissural pretectum; l, lateral band of the mesencephalon; LA, lateral amygdala; Lc, locus coeruleus; LDT, laterodorsal tegmental nucleus; Lp, lateral pallium; LR, laterorostral mesencephalic nucleus; m, medial band of the mesencephalon; Ma, mammillary region; MeA, medial amygdala; Mes, mesencephalon; MOB, main olfactory bulb; Mp, medial pallium; nl, neural lobe of the hypophysis; NOS, nitric oxide synthase; NPv, nucleus of the periventricular hypothalamic organ; Nsol, nucleus of the solitary tract; nIII, oculomotor nerve; nV, trigeminal nerve; nVI, abducens nerve; on, olfactory nerve; OPT, olivary pretectal nucleus; OSC, outer nucleus of the subcommissural organ; OT, optic tectum; Otp, orthopedia; p1–p3, prosomeres 1–3; pc, posterior commissure; Pcp, precommissural pretectum; PcPC, parvocellular nucleus of the posterior commissure; Pdi, posterodorsal tegmental nucleus, isthmus part; pe, postolfactory eminence; PO, preoptic area; po, pineal organ; PPN, pedunculopontine tegmental nucleus; PrPt, principal pretectal nucleus; PTh, prethalamus; PThE, prethalamus eminence; r0, isthmus (rhombomere r0); r1–r8, rhombomeres 1–8; Ras, superior raphe nucleus; Rh, rhombencephalon; Ri, nucleus reticularis inferior; Rm, nucleus reticularis medius; Rs, nucleus reticularis superior; SC, suprachiasmatic nucleus; ScO, subcommissural organ; Sd, septum dorsalis; sgr, stratum granulare of the cerebellum; Sl, septum lateralis; Sm, septum medialis; sm, stria medullaris; smn, spinal motor neurons; smol, stratum moleculare of the cerebellum; sol, solitary tract; sP, stratum of Purkinje cells; SpL, nucleus spiriformis lateralis; Str, striatum; tc, tectal commissure; Teg, mesencephalic tegmentum; Tel, telencephalon; TH, tyrosine hydroxylase; Th, thalamus; TP, nucleus of the tuberculum posterior; Ts, torus semicircularis; Tub, tuberal hypothalamic region; v, ventricle; vh, ventral horn of the spinal cord; VIa, accessory abducens nucleus; VIm, main abducens nucleus; VIIm, facial motor nucleus; VL, ventrolateral nucleus of the prethalamus; VJc, ventral juxtacommissural nucleus; VM, ventromedial nucleus of the prethalamus; Vm, trigeminal motor nucleus; vz, ventricular zone.

\* Corresponding author at: Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Calle Jose Antonio Novais, 2, 28040 Madrid, Spain.

Tel.: +34 913944972; fax: +34 913944981.

E-mail address: [agustin@bio.ucm.es](mailto:agustin@bio.ucm.es) (A. González).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.03.006>

0891-0618/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

ESTUDIO GENOARQUITECTÓNICO  
DEL TÁLAMO DURANTE EL  
DESARROLLO EMBRIONARIO DE  
*XENOPUS LAEVIS*

---



# Prepatterning and patterning of the thalamus along embryonic development of *Xenopus laevis*

Sandra Bandín, Ruth Morona and Agustín González\*

Faculty of Biology, Department of Cell Biology, University Complutense, Madrid, Spain

Previous developmental studies of the thalamus (alar part of the diencephalic prosomere p2) have defined the molecular basis for the acquisition of the thalamic competence (prepartening), the subsequent formation of the secondary organizer in the zona limitans intrathalamica, and the early specification of two anteroposterior domains (rostral and caudal progenitor domains) in response to inducing activities and that are shared in birds and mammals. In the present study we have analyzed the embryonic development of the thalamus in the anuran *Xenopus laevis* to determine conserved or specific features in the amphibian diencephalon. From early embryonic stages to the beginning of the larval period, the expression patterns of 22 markers were analyzed by means of combined *In situ* hybridization (ISH) and immunohistochemical techniques. The early genoarchitecture observed in the diencephalon allowed us to discern the boundaries of the thalamus with the prethalamus, pretectum, and epithalamus. Common molecular features were observed in the thalamic prepatterning among vertebrates in which Wnt3a, Fez, Pax6 and Xiro1 expression were of particular importance in *Xenopus*. The formation of the zona limitans intrathalamica was observed, as in other vertebrates, by the progressive expression of Shh. The largely conserved expressions of Nkx2.2 in the rostral thalamic domain vs. Gbx2 and Ngn2 (among others) in the caudal domain strongly suggest the role of Shh as morphogen in the amphibian thalamus. All these data showed that the molecular characteristics observed during prepatterning and patterning in the thalamus of the anuran *Xenopus* (anamniote) share many features with those described during thalamic development in amniotes (common patterns in tetrapods) but also with zebrafish, strengthening the idea of a basic organization of this diencephalic region across vertebrates.

**Keywords:** forebrain, diencephalon, zona limitans intrathalamica, Gbx2, Shh, Nkx2.2, evolution

## Introduction

The thalamus is a pivotal forebrain structure that serves as relay station for sensory information (except olfaction) to the overlaying cortex in mammals (Jones, 2007; Nieuwenhuys et al., 2007). Thus, it was described as the “gateway to consciousness” (Crick and Koch, 2003). Also in non-mammalian vertebrates, and particularly in anamniotes, the thalamus

**Abbreviations:** ABB, alar basal boundary; c-Th, caudal thalamus (caudal progenitor domain); c-Th1, caudal thalamus 1 (caudal progenitor domain 1); c-Th2, caudal thalamus 2 (caudal progenitor domain 2); H, hypothalamus; Hb, habenula; mes, mesencephalon; mz, mantle zone; p1-p3, prosomeres 1–3; p2b, p2 basal plate; r-Th, rostral (rostral progenitor domain); st, stages; tel, telencephalon; Th, thalamus; Tub, tuberal hypothalamus; v, ventricle; vz, ventricular zone; Zli, zona limitans intrathalamica.

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Jose L. Lanciego,  
University of Navarra, Spain

### Reviewed by:

Loreta Medina,  
Universidad de Lleida, Spain  
Diego Echevarría,  
University of Miguel Hernandez  
(UMH-CSIC), Spain

### \*Correspondence:

Agustín González,  
Faculty of Biology, Department of Cell  
Biology, Universidad Complutense,  
Calle Jose Antonio Novais 2,  
28040 Madrid, Spain  
agustin@bio.ucm.es

**Received:** 28 May 2015

**Accepted:** 24 July 2015

**Published:** 10 August 2015

### Citation:

Bandín S, Morona R and González A  
(2015) Prepatterning and patterning  
of the thalamus along embryonic  
development of *Xenopus laevis*.  
*Front. Neuroanat.* 9:107.  
doi: 10.3389/fnana.2015.00107

## **5. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



## RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Como hemos mencionado anteriormente en el **capítulo 1**, dada su condición de únicos tetrápodos anamniotas, los estudios en anfibios son especialmente relevantes en los análisis evolutivos, ya que presentan de forma simplificada las características básicas del encéfalo de vertebrados y probablemente las características compartidas con un ancestro común en la transición anamnio-amniota. Además, estas características comunes parecen recapitularse a lo largo de la ontogenia, por lo que los estudios de desarrollo en este grupo de vertebrados también suponen una valiosísima aportación a la hora de establecer posibles homologías entre anamniotas y amniotas.

Estudios previos han puesto de manifiesto diversos aspectos hodológicos, neuroquímicos y funcionales del SNC de los anfibios anuros, aunque aún existen gran cantidad de interrogantes en cuanto a su desarrollo, organización y grado de homología entre diversas estructuras comparadas con las de otros vertebrados. A lo largo de los trabajos presentados en los diferentes capítulos de esta tesis se ha tratado de contribuir al conocimiento del grado de conservación del cerebro de los tetrápodos, así como, de los patrones de organización que dieron origen a la región talámica en el encéfalo de anuros y los mecanismos conservados en este proceso respecto a los amniotas. En este sentido, los resultados descritos suponen una valiosa aportación desde el punto de vista de la evo-devo.

Los datos obtenidos se han discutido desde un punto de vista comparativo, dentro del paradigma prosomérico. Éste modelo nos proporciona un marco fiable dentro del cual se han interpretado muchos otros estudios neuroanatómicos en diferentes clases de vertebrados que avalan un patrón de organización neuromérica común del SNC.

Nuestros resultados proporcionan evidencias adicionales al patrón de organización neuromérica común del SNC de vertebrados. En primer lugar, se estudiaron detalladamente aspectos de la distribución de expresión del gen Pax7 en el desarrollo embrionario y larvario de *Xenopus laevis*, así como la distribución de Pax6 y Pax7 en el individuo adulto, demostrando un patrón conservado en los vertebrados. En segundo lugar, se ha estudiado detalladamente el desarrollo y la regionalización temprana del tálamo (región alar de p2) en *Xenopus*, empleando los mismos marcadores que se han utilizado previamente en otras especies junto con Pax6 y Pax7.

En el **capítulo 2** se describe la secuencia espaciotemporal de aparición de células con inmunorreactividad para Pax7 en el encéfalo en desarrollo de *Xenopus laevis*, en combinación con otros factores de transcripción (Nkx2.1, Otp) y varios marcadores neuronales (GABA, CR, NOS, TH, NPY), que sirven como referencia para la localización exacta de las poblaciones Pax7+ en las diferentes regiones del encéfalo. Nuestro estudio se ha realizado desde estadios embrionarios tempranos incluyendo el periodo

larvario que se subdivide en estadios premetamórficos, estadios prometamórficos, y finalmente el climax metamórfico.

Las primeras células Pax7 se detectan en estadios embrionarios tempranos (est. 34). La expresión más rostral se encuentra en la paráfisis, dentro del hemisferio telencefálico. En el diencéfalo hay células Pax7 positivas en la placa basal del prospectivo p3 y caudalmente en p1, en el órgano subcomisural (ScO), así como en la zona ventricular de la porción alar y algunas hacia la zona del manto. En la vesícula mesencefálica dorsal y en la placa alar del rombencéfalo rostral aparece un marcaje ventricular tenue. En los estadios embrionarios tardíos (est. 37-38, Fig. 1A) Pax7 aparece por primera vez en la placa de techo de p2 y en la hipófisis en desarrollo. En p1, Pax7 se distingue en las subdivisiones ya establecidas, juxtacomisural (JcP) y comisural (CoP), pero no en la precomisural (PcP). A lo largo del mesencéfalo, la mayor intensidad de células Pax7+ se halla en las distintas capas del tercio caudal del techo óptico y se detectaron algunas células aisladas en el torus semicircularis alejadas de la vz. En la parte rostral de r1, Pax7 se localiza en la zona ventricular extendiéndose hacia el esbozo del cerebelo y ventralmente aumenta en intensidad en las células más alejadas de la zona ventricular (vz) y se desprenden hacia la placa basal. Algunas de estas células resultaron ser GABAérgicas en la porción rostral, pero caudalmente forman poblaciones separadas. Las células Pax7, situadas ventralmente en el límite r0-r1, se localizan lateralmente

a las células que expresan Otp, mientras que más caudalmente, las células Pax7 se encuentran mediales al grupo de células Otp-positivas, y algunas de estas células que ocupan la placa basal presentan doble marcaje en la porción rostral de r1.

La expresión de Pax7 en la región caudal de r1 se halla en la zona ventricular y subventricular (vz y svz, respectivamente) de la placa alar con mayor intensidad en la parte más próxima a la placa basal y este patrón se continúa caudalmente a lo largo del rombencéfalo y médula espinal (Fig. 1B). A medida que el desarrollo progresa, en estadios premetamórficos, se reconocen las principales subdivisiones de las principales regiones encefálicas y las poblaciones celulares se van segregando gradualmente. Aumenta la intensidad de marcaje en la mayoría de grupos y se identifican nuevas poblaciones Pax7 positivas (Fig. 1C). En estos estadios, la expresión más rostral se observa en la región mamilar hipotalámica y aumenta en el lóbulo intermedio de la hipófisis. En el mesencéfalo se distribuye a lo largo de la vz de todas las capas del techo óptico.

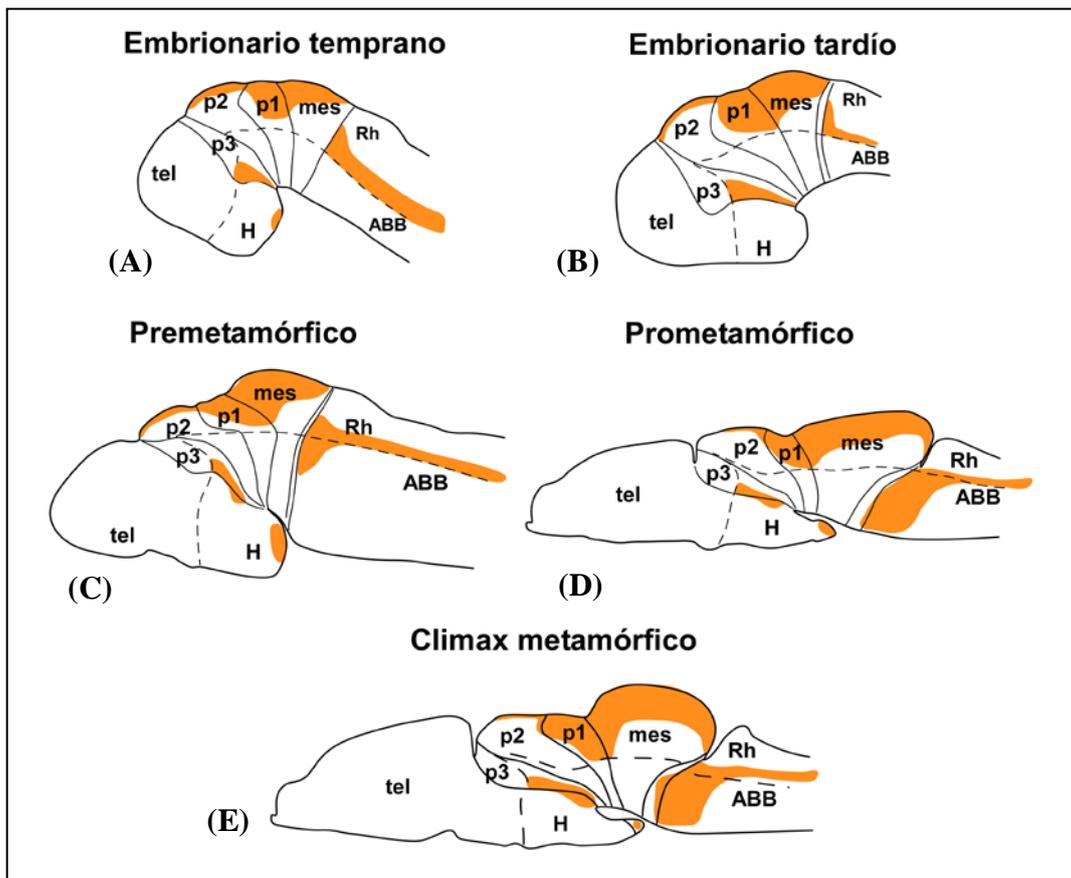
En estadios prometamórficos (Fig. 1D), se observa una segregación progresiva de células Pax7 en la región mamilar desde la placa basal de p3. Las células localizadas en dicha banda mamilar no expresan Nkx2.1, a diferencia de las células de la placa basal de p3 que coexpresan Nkx2.1 y Pax7 formando una población separada de las células catecolaminérgicas que las rodean. En el pretecho, los diferentes

núcleos se distinguen por el distinto empaquetamiento de las células, por la distinta intensidad de marcaje para Pax7 y por la relación con otras poblaciones (como las células TH+), de manera que se distinguen los núcleos Pax7+ derivados principalmente de CoP y PcP (el núcleo parvocelular de la comisura posterior (PcPc), el núcleo del órgano subcomisural (SCo) y las divisiones ventral y lateral del núcleo juxtacomisural (VJc, LJc). Además se observan algunas células dispersas en el núcleo lateral posterodorsal (LPD)).

En el mesencéfalo, el techo óptico crece y abundantes células Pax7 se localizan en esta zona, así como, en el griseum tectale. En el rombencéfalo rostral, se observa un patrón de distribución más

segregado en los núcleos Ip y la sustancia gris central, ventral al LDT (NOS+), así como, en los núcleos reticulares.

En el climax metamórfico (Fig. 1E), se observan pocas diferencias respecto a estadios previos. Se identifica mejor la región mamilar del hipotálamo y las células Pax7 dentro de esta región. En p2, Pax7 está prácticamente ausente en la placa de techo pero se detectan algunas células aisladas en el tálamo, lateralmente al núcleo central. En este periodo, se observa por primera vez la expresión de Pax7 en células de la placa basal de p1. Dentro del techo óptico, se intensifica la expresión ventricular y se mantiene la disposición de células marcadas. En el rombencéfalo rostral,



**Figura 1.** Esquemas sagitales del encéfalo de *Xenopus laevis* en estadios representativos del desarrollo (estadios 37/38 (A), 42 (B), 52 (C), 56 (D) y 65 (E)) donde se ilustra la expresión de Pax7 y su correspondencia con el modelo prosomérico.

las numerosas células Pax7 procedentes de r1 se extienden hacia el segmento ístmico formando parte del núcleo posterodorsal tegmental ístmico (Pdi). En r1, el número de células marcadas aumenta en todas las poblaciones celulares descritas en estadios previos; y en la médula espinal va disminuyendo la expresión de Pax7 en la zona ventricular tan pronto como la metamorfosis se completa.

En el **capítulo 3**, se describe la distribución de Pax6 y Pax7 de las principales regiones del encéfalo de *Xenopus* adulto (Fig. 2) en combinación con otros marcadores (ChAT, GABA, CB, NOS, 5-HT, TH) y factores de transcripción (Nkx2.1, Nkx2.2., Isl1, Otp), cuya distribución es conocida. La inmunoreactividad para Pax6 y Pax7 se localiza en el núcleo de las células positivas, que se encuentran tanto en la zona ventricular como del manto en el encéfalo adulto de *Xenopus laevis*. Las poblaciones positivas para Pax6 y Pax7 se hallan principalmente en grupos separados, pero también existen subpoblaciones inmunoreactivas para ambas proteínas. De rostral a caudal, en el prosencéfalo rostral se encuentran células positivas para Pax6 en la región periglomerular del bulbo olfativo y todas ellas colocalizan con el marcaje para TH (supuestamente células dopaminérgicas). Se continúan con una intensa población en la eminencia postolfatoria y núcleo accumbens. En la región telencefálica, Pax6 ocupa la región ventromedial del septo rostralmente, y caudalmente parte del núcleo septal dorsal, así como, toda la región estriatal Isl1-positiva extendiéndose hacia el palio ventral en

la amígdala lateral (positiva para NOS); y los núcleos amigdalinos central y medial. No se detectan células Pax6 se en el área preóptica ni en el hipotálamo. Por otro lado, Pax7 se encuentra ausente en regiones telencefálicas, incluida la región preóptica. Su expresión más rostral se halla en la paráfisis y en la región mamilar del hipotálamo, en íntima relación con la población localizada en la placa basal de p3. Además, forma una población densa en el lóbulo intermedio de la hipófisis mientras que Pax6 aparece débilmente en el lóbulo anterior.

En el diencéfalo, se detectan abundantes células Pax6+ en la porción dorsal de p3, en la “eminencia pretalámica” y ventralmente en los, núcleos ventromedial, y ventrolateral, con algunas células que se extienden lateralmente al núcleo geniculado lateral y de Bellonci. En la placa basal de p3 se observa cierto grado de codistribución (no colocalización) de ambas poblaciones de manera que, las células Pax6 se localizan lateralmente a las células Pax7. Pax7 forma una banda en la parte rostral de p3 basal, cercano al límite con el hipotálamo, que se extiende hacia la región mamilar hipotalámica. Dichas poblaciones Pax7 positivas difieren en la expresión de Nkx2.1. Las células exclusivamente de la placa basal de p3 son Nkx2.1+/Pax7+, mientras que, las de la región mamilar sólo son Pax7+.

En p2 no se detecta marcaje para Pax6 ni para Pax7, excepto en la placa de techo donde se observa un intenso marcaje para Pax7 que se extiende hacia la habénula. También se encuentra un

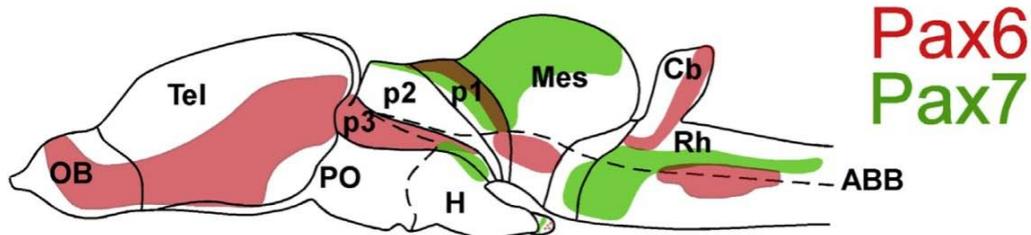
intenso marcaje para ambos factores de transcripción en el órgano pineal. La ausencia de Pax6 y Pax7 en p2, sirve para identificar los límites rostral y caudal de este prosómero en contraste con el intenso marcaje en p3 y p1.

En p1, Pax6 y Pax7 se expresan en el órgano subcomisural (ScO), a lo largo de toda la dimensión rostrocaudal. La región pretectal se ha subdividido en tres regiones genoarquitectónicas rostrocaudales: la región precomisural pretectal (PcP), la región yuxtacomisural (JcP) y la región comisural (CoP). Ambos factores de transcripción se expresan principalmente en las regiones JcP y CoP, dejando libre el PcP. Algunas células Pax7 se localizan rostralmente en PcP, en el núcleo pretectal anterior, y de forma más abundante en los núcleos yuxtacomisural ventral y espiriforme lateral (junto con algunas células Pax6) dentro del dominio JcP. La expresión de Pax6 se restringe a la región CoP, donde se codistribuye con Pax7. En estadios más avanzados, la expresión de Pax6 persiste en las porciones caudales y se detectan células en la placa basal, mientras que Pax7 se extiende hacia regiones de PcP.

La intensa expresión de Pax6 en el dominio CoP y la ausencia en el

mesencéfalo dorsal destaca el límite diencéfalo-mesencefálico. Por otro lado, Pax7 se expresa intensamente en la vz y en células de todas las capas del techo óptico, donde se incluyen subpoblaciones de neuronas GABA+ y otras de células CB+, mientras que las células NOS+ son Pax7-negativas. Pax6 y Pax7 están ausentes en la banda lateral del mesencéfalo mientras que, Pax6 se extiende a lo largo de la banda basal del tegmento mesencefálico, que representa la continuación caudal de la población de células Pax6 en p1 basal y que finaliza en el límite con el istmo (r0).

En el rombencéfalo, Pax7 marca una numerosa población en la placa alar de r1 a lo largo de la zona ventricular y más intensamente en la zona del manto. Dentro de esta región se ha caracterizado las poblaciones del núcleo interpeduncular mediante el doble marcaje con Otp y Pax7. Pax7 define el dominio ventricular alar y Otp el dominio basal, demostrando un origen mixto del núcleo interpeduncular (Ip), así como en la porción rostral de la sustancia gris central. Por otro lado, Pax6 se localiza en la zona ventricular medialmente a la población Pax7 de la sustancia gris central en r1 y en toda la placa basal. El segmento ístmico (r0),



**Figura 2.** Representación esquemática de la expresión de Pax6 y Pax7 en las diferentes regiones del encéfalo adulto de *Xenopus laevis* y su correspondencia con el modelo prosomérico.

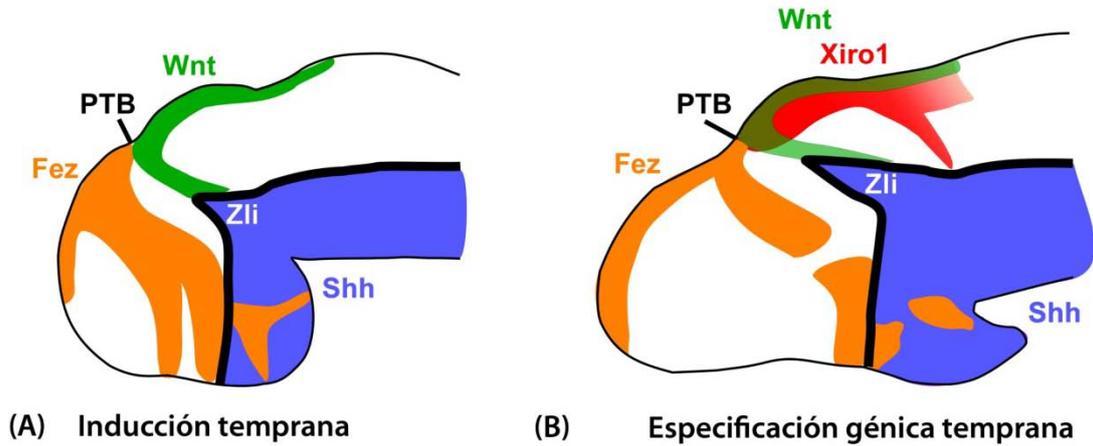
como entidad individual situada entre el mesencéfalo y el rombencéfalo, carece de Pax6 y Pax7 excepto en algunas células del núcleo tegmental posterodorsal ístmico y en la porción rostral del núcleo interpeduncular que parecen corresponder a una población migrada rostralmente desde la población Pax7+ de r1 detectada en desarrollo.

En el cerebelo, Pax7 aparece en toda la zona ventricular de la placa alar en continuación con la población rostral de r1, mientras que Pax6 es más abundante en la región medial de la zona ventricular cerebelar y en las células granulares. A lo largo de todo el rombencéfalo, Pax7 se encuentra en la zona ventricular de la placa alar, excepto en la región dorsal. Desde la región ventricular aparecen células migradas en el área octavolateral. Pax6, se encuentra en la vz de la placa basal y es más abundante que Pax7, en particular, en la región del núcleo reticular medio, en el núcleo medular dorsal del área octavolateral y en el núcleo reticular inferior. En la médula espinal, Pax7 marca las células dorsales y Pax6 las células ventrales de la zona ventricular en torno al óbex, distribución que se mantiene en niveles más caudales de la médula espinal, excepto en la región cervical, donde no se ha encontrado expresión.

En el **capítulo 4**, se analiza detalladamente el desarrollo y la regionalización de la región talámica durante el desarrollo embrionario, que abarca estadios embrionarios tempranos y tardíos (est. 29/30 al est. 45), de la ontogenia de *Xenopus laevis* en base a un análisis genoarquitectónico de los

patrones de expresión de una combinatoria de genes relacionados con la especificación de esta región (Gbx2, Xiro1, Tcf4, Shh, Lhx1, Lhx2, Lhx9, Ngn2, Dbx1, Dll4, Gli1, Gli3, Gli4, Vglut2, Wnt3, Emx1, Fez, Pax6) entre otros marcadores. Inicialmente, el territorio talámico queda preespecificado por la expresión de los genes tempranos Shh, Wnt, Fez1, Xiro1 y Nkx2.2. La expresión de Shh se localiza ventralmente a lo largo de toda la placa basal del tubo neural, desde estadios embrionarios tempranos y a medida que progresa el desarrollo Shh asciende en una banda en la vz a largo del límite entre p2 y p3 hacia posiciones más dorsales en el diencéfalo, penetrando en territorio alar en un proceso de inducción, en la región denominada Zona Limitante Intratalámica (Zli). La Zli, queda definida rostralmente por la expresión de Fez dorsalmente en p3, y caudalmente por la expresión de Wnt3 y Xiro1, que limitan con la expresión de Fez, definiendo los límites del tálamo con p3 y la habénula (Fig. 3). Otro de los marcadores talámicos tempranos es Tcf4, cuya expresión se extiende desde el límite p3/p2 (marcado por la Zli) hasta el mesencéfalo. Adicionalmente, Pax6 se expresa inicialmente a lo largo de p2 y p1 alar, marcando caudalmente el límite entre el diencéfalo y el mesencéfalo. A medida que la expresión de Shh progresa dorsalmente, la expresión de Pax6 disminuye caudalmente, quedando restringida al epitálamo y dominios caudales de p1.

De manera que, el tálamo queda delimitado rostralmente por la expresión de Shh, Tcf4, Fez1 y Wnt3a,



**Figura 3.** Representación esquemática del prosencéfalo de *Xenopus laevis* en estadios embrionarios tempranos y tardíos, representando los principales marcadores implicados en la inducción de la región talámica y en la inducción y posicionamiento de la Zli. (A), y su posterior especificación génica temprana del tálamo y la formación de la Zli (B). El límite talamo-pretálamo (PTB), delimitado a su vez por la Zli, queda marcado por la expresión colindante entre Fez, Wnt y Xiro1.

dorsalmente con la habénula por Xiro y Pax6; y caudalmente por Xiro1. Adicionalmente, Pax7 ayuda a delimitar la región alar de p2, por su expresión en la placa basal de p3 y en la placa alar de p1 (Fig. 3).

Paralelamente a la expresión de Shh, Nkx2.2, se expresa en la vz en una banda adyacente (banda liminal) a lo largo del tubo neural y flanqueando la Zli en desarrollo. El ascenso progresivo de Shh en la Zli discurre acompañado por Nkx2.2, definiendo el dominio rostral del tálamo adyacente a la Zli (Fig. 4). Diferenciándose, por tanto, dos subdominios histogénéticos principales: rTh y cTh.

Caudalmente al r-Th, se desarrolla el subdominio c-Th dentro de la porción alar de p2. A medida que progresa el desarrollo, el cTh, que se identifica por la expresión de Gbx2 en células postmitóticas de la mz, se expande y se distingue de la región habenular por su diferente composición molecular. Además, el dominio progenitor caudal del tálamo se identifica por la expresión

de Wnt3a y Lhx9 en la mz, y Ngn2 en la vz. El análisis combinado de los genes de la familia LIM (Lhx1, Lhx2, Lhx9) ayuda a definir la región talámica, ya que, Lhx1 se expresa en p3, en la región r-Th correspondiendo con las células Nkx2.2 positivas, y en la región pretectal. Por otro lado, Lhx2 y Lhx9 se expresan en la porción alar de p2, habénula y tálamo, y mantienen cierta expresión en p1.

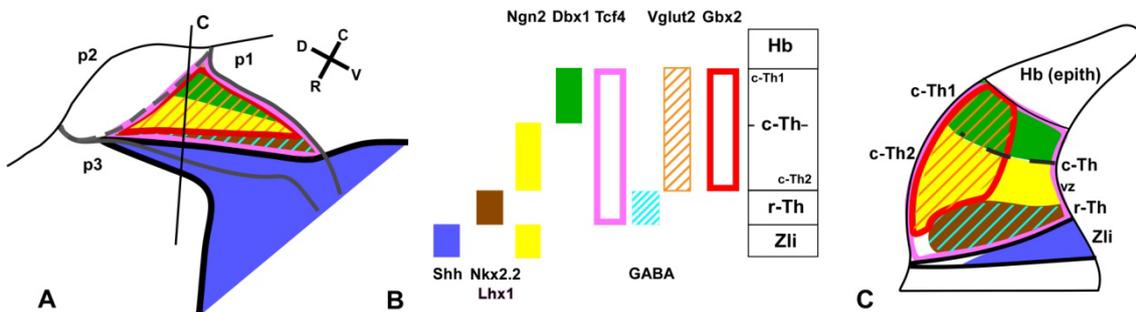
A su vez, el c-Th se divide molecularmente en dos subregiones en base a la expresión diferencial de Ngn2 y Dbx1. Ngn2 se expresa en todo el c-Th, mientras que Dbx1 ocupa solo una parte caudodorsal que se le ha denominado c-Th1. A la región que expresa únicamente Ngn2, en la porción rostroventral, se ha denominado c-Th2.

Los factores de transcripción Gli (Gli1, Gli3 y Gli4) mantienen, una distribución diferencial y corroboran los dominios y subdominios histogénéticos hallados. Gli1 se encuentra principalmente en la región Nkx2.2+ en r-Th en vz y mz y en c-Th2, mientras

que Gli3 y Gli4 se expresan en c-Th1 y la habénula.

Por tanto, en el periodo final del desarrollo embrionario, se distinguen marcadores postmitóticos. La región definida por Nkx2.2 (r-Th) queda especificada hacia un destino GABAérgico y expresa GABA conjuntamente con Nkx2.2. Esta subpoblación GABAérgica es molecularmente distinta de la población de p3, que viene definida por la expresión de Isl1 y Dll4. Por otro lado, el dominio c-Th que expresa Ngn2 y Gbx2 queda especificado hacia un destino glutamatérgico, expresando Vglut2, en las células de mz.

En resumen, primero se establece una subdivisión rostrocaudal constituyéndose los límites externos de p2 con las regiones diencefálicas adyacentes de p3 y p1 por la acción de Fez, Wnt3, Xiro1, Tcf4. Posteriormente, se identifican dos regiones, en la porción alar de p2 que corresponden a la habénula y al tálamo atendiendo a la expresión de Gbx2, Xiro1, Lhx9 y Lhx2. Finalmente, se establece la división del tálamo, donde el tálamo rostral (r-Th), próximo a la Zli, expresa Nkx2.2, Lhx1, Tcf4, Gli1 GABA y una porción caudal (c-Th) caracterizada por la expresión de Gbx2, Vglut2, Lhx9, Gli4, a su vez subdividida en c-Th2 y c-Th1 en base a la expresión diferencial de Ngn2 y Dbx1 (Fig. 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de la regionalización del tálamo durante el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis* (A), en base a una combinatoria única de patrones de expresión génica en cada uno de los territorios (B). El prosómero 2, queda subdividido en tálamo y habénula (epitálamo), y a su vez, en el tálamo se distinguen dos dominios progenitores: r-Th (tálamo rostral) y c-Th (tálamo caudal). Al mismo tiempo el c-Th se divide en c-Th2 y c-Th1 de rostral a caudal, respectivamente (C).

## DISCUSIÓN

El estudio de las diferentes regiones del encéfalo de los anfibios y sus correspondientes homólogos en amniotas, se ha llevado a cabo en base a datos principalmente relacionados con la identidad neuroquímica y la homología de esas regiones (González et al., 1996; Marín et al., 1998; González et al., 2002). Sin embargo, en los últimos años, dentro de los diferentes niveles de homología (Puelles y Medina, 2002) se ha prestado especial atención al concepto “homología de campo” que se relaciona directamente con la existencia de dominios histogénéticos en el tubo neural en desarrollo, definidos por una combinación específica de genes y factores de transcripción que determinarán en último término la identidad neuroglial de los progenitores que expresan dicho código genético. Este concepto postula que las regiones del encéfalo adulto derivan en diferentes especies de precursores embrionarios homólogos, considerando a todo el conjunto de los derivados, como “campo” (Davidson y Erwin, 2006; Puelles y Ferran, 2012). De modo que, los estudios de expresión génica, ya sea a través de técnicas de inmunodetección o mediante hibridación in situ (análisis genoarquitectónicos) son fundamentales en el establecimiento de homologías, tanto a nivel ontológico, como ontogénico y topológico, que en último término determinan la topografía final del cerebro adulto (Puelles et al., 2013).

Por tanto, los estudios genoarquitectónicos comparados

durante el desarrollo y en individuos adultos, proporcionan indicios fundamentales dentro de la perspectiva evolutiva para la identificación de homologías, analogías y posibles nuevas regiones asociadas a funciones emergentes.

### Regionalización del territorio talámico en la evolución

Desde los primeros estudios neuroanatómicos han surgido diferentes interpretaciones en cuanto a la regionalización anatómica del diencefalo respecto al eje rostrocaudal y sus divisiones dorsoventrales respecto al límite alar-basal. Sin embargo hoy en día, el paradigma prosomérico es el modelo más ampliamente aceptado. Esta herramienta morfológica establece compartimentos morfogenéticos comparables en los distintos grupos de vertebrados y permite la comparación de las diferentes estructuras encefálicas, así como, la búsqueda de estructuras homólogas a lo largo de la filogenia (Puelles y Rubenstein, 2003).

La mayoría de los datos acerca de la regionalización y especificación molecular del tálamo durante el desarrollo, proceden de los principales grupos de amniotas como aves y mamíferos (Scholpp y Lumsden, 2010; Martínez-Ferre y Martínez, 2012; Puelles y Martínez, 2013; Robertshaw et al., 2013); y de anamniotas como el pez cebra (Scholpp y Lumsden, 2010; Hagemann y Scholpp, 2012). Por lo tanto, el estudio de la especificación génica del tálamo en desarrollo en el anfibio anuro *Xenopus laevis* se hace fundamental debido al importante eslabón que supone como modelo de

estudio de la transición anamnio-amniota, ya que los anfibios son los únicos tetrápodos anamniotas.

### **Expresión dinámica de Pax7 en el desarrollo y de Pax6 y Pax7 en el encéfalo adulto de *Xenopus laevis***

A partir del neuroepitelio del tubo neural y a medida que progresa el desarrollo, se produce una estratificación radial progresiva hacia la zona del manto (zm), que se establece topográficamente en base a la posición relativa de las células de origen en la zona ventricular (zv). Progresivamente, la zm inicial se subdivide en subcapas: profunda, intermedia y externa, que darán lugar a la compleja configuración nuclear del adulto. Durante el desarrollo, las células Pax7 se localizan en los diferentes estratos, tanto en zonas ventriculares, subventriculares y del manto, así como en la zona de fibras superficiales del encéfalo. Además, en *Xenopus laevis* adulto, se observa la presencia de Pax6 y Pax7 en la región ventricular en diferentes localizaciones del encéfalo y en las regiones periventriculares adyacentes, lo que podría relacionarse con el hecho de que existe proliferación celular en la zona ventricular del adulto (D'Amico et al., 2011, 2013). De modo que, se establecen dominios de expresión de Pax7 que se encuentran muy conservados en otros vertebrados, tanto durante el desarrollo como en el adulto. Además Pax7 y Pax6 mantienen una amplia distribución en el encéfalo desde el final de la metamorfosis.

Los patrones de expresión de Pax7, durante el desarrollo de *Xenopus laevis* y junto con Pax6 en el adulto,

corroboran los estudios previos en amniotas (Stoykova y Gruss, 1994; Nacher et al., 2005; Thompson et al., 2007; Thompson et al., 2008; Duan et al., 2013) y están de acuerdo con el papel de proliferación, migración y diferenciación celular asignado para estos factores de transcripción (Thompson et al., 2007; Osumi et al., 2008; Wang et al., 2008).

Pax6 y Pax7 se expresan desde el desarrollo temprano principalmente en regiones alares de zonas precursoras específicas en distintos segmentos, respetando los límites postulados en el modelo prosomérico (Moreno et al., 2008a; Morona et al., 2011). Sin embargo, en estadios avanzados del desarrollo, la aparición progresiva de células que expresan Pax en regiones como el hipotálamo y el rombencéfalo basal sugieren una posible migración celular que transgrede esos límites, tal como se propuso en la ontogenia del cerebro de urodelos (Joven et al., 2013a).

En el telencéfalo de los anfibios adultos, la expresión de Pax6 se asocia a subconjuntos de células localizadas en el bulbo olfativo, la región septal, los ganglios basales y el complejo amigdalino. En *Xenopus* se observa que las células dopaminérgicas del bulbo (TH positivas) expresan específicamente Pax6 como en urodelos (Joven et al., 2013a) y conforme a lo descrito previamente en ratas, donde todas las células periglomerulares reactivas para TH, contenían Pax6 (Baltanás et al., 2009). Esta distribución apoya la implicación de Pax6, junto con otros cofactores, en la neurogénesis y en

la especificación dopaminérgica periglomerular en el bulbo olfativo en anfibios, como en amniotas (Agoston et al., 2014). A lo largo del desarrollo, se detecta la expresión de Pax6 en las células de la zona ventricular en el palio en todas las especies estudiadas (Walther y Gruss, 1991; Puelles et al., 2000; Murakami et al., 2001; Wullimann y Rink, 2001; Moreno et al., 2008a; Moreno et al., 2010). Sin embargo, no se mantiene la expresión en el palio adulto en roedores (Stoykova y Gruss, 1994), con la excepción del giro dentado y en la zona subventricular a lo largo de la corriente migratoria rostral (RMS), donde se encuentran los precursores neuronales durante la etapa adulta (Nacher et al., 2005). Comparativamente, en *Xenopus*, la única expresión palial de Pax6 se encuentra en la región del límite palio-subpalio en el septo dorsal, medialmente; y en la parte ventral del palio ventral, lateralmente, como en otros vertebrados (Wullimann y Rink, 2002; Ferreiro-Galve et al., 2008; Moreno et al., 2008a; Joven et al., 2013a, 2013b). Dentro de la región septal, Pax6 se encuentra en los territorios septales dorsal y medial, pero no en el lateral, conforme a lo observado en el encéfalo del urodelo adulto (Joven et al., 2013a); y sin embargo, se encuentra dentro de las tres regiones septales durante el desarrollo en aves y mamíferos (Stoykova y Gruss, 1994; Puelles et al., 2000; Duan et al., 2013).

La mayoría de las células Pax6 de la región subpalial, aparecen en la porción estriatal (incluyendo el núcleo acumbens) y se encuentran ausentes en

los territorios palidales tanto en anfibios anuros como urodeles (Moreno et al., 2008a; Joven et al., 2013a, 2013b), a diferencia de los datos en mamíferos, donde se detecta la expresión de Pax6 en el pálido ventral y en el núcleo entopeduncular (Duan et al., 2013) en adulto. La amígdala central y medial muestran abundantes células Pax6 en el adulto, a diferencia de la situación encontrada en amniotas, donde sólo aparece un pequeño número de células Pax6 principalmente relacionadas con el complejo basolateral y la amígdala medial (Bupesh et al., 2011; Abellán et al., 2013; Duan et al., 2013). Por otro lado, en el telencéfalo de mamíferos, Pax7 actúa temprano en el desarrollo estabilizando la polaridad dorsal (Jostes et al., 1990), pero pronto queda restringido a la placa del techo del telencéfalo (Thompson et al., 2004). En *Xenopus* no se halla expresión telencefálica de Pax7 durante el desarrollo ni en fases posteriores, pero destaca la fuerte expresión de Pax7 en la paráfisis, formación membranosa de la placa del techo telencefálica, que parece corresponderse con el patrón observado en urodelos, aves y mamíferos (Bandín et al., 2013; Joven et al., 2013a, 2013b; Bandín et al., 2014). Además, se ha descrito la expresión de Pax7 en la paráfisis en el pollo sólo durante el desarrollo (Nomura et al., 1998).

Caudalmente, en el diencefalo de *Xenopus* durante los estadios tempranos, aparece una población Pax7 definida en la placa basal de p3. A medida que avanza el desarrollo, se detecta la expresión de Pax7 en la región mamilar dentro del territorio

hipotalámico y se mantiene dicha expresión en el adulto. Esto parece indicar un proceso de migración en el que las células de la placa basal de p3 que expresan Pax7 y Nkx2.1 (marcador basal) (Domínguez et al., 2014), invaden la región mamilar del hipotálamo basal donde apagan la expresión de Nkx2.1, como fue propuesto previamente en anfibios anuros y quelonios (Moreno et al., 2012; Domínguez et al., 2014). De forma similar, se detecta un dominio de expresión Pax7 equivalente al descrito en el hipotálamo ventrolateral en embriones de pollo (Ohyama et al., 2008). Al mismo tiempo, las células Pax6 ocupan la porción alar del segmento p3, que incluye la eminencia pretalámica y el pretálamo. En mamíferos, esto representa el mayor territorio de expresión de Pax6 durante el desarrollo del prosencéfalo (Stoykova y Gruss, 1994; Puelles et al., 2000) y queda restringido a la zona incerta en el adulto (Duan et al., 2013), dando lugar a neuronas dopaminérgicas, en línea con lo observado en teleosteos, anuros y urodelos (Wullimann y Rink, 2001; Joven et al., 2013a). En *Xenopus*, las células de p3 alar se extienden ventralmente alcanzando la placa basal, como también ocurre en pez cebra (Wullimann y Rink, 2001), donde presenta un patrón complementario con Pax6. Pax7 se localiza en la banda ventricular y más rostralmente, mientras que, Pax6 se localiza en la banda más superficial y caudal. A su vez, se ha sugerido que las células Pax6 observadas en la amígdala medial, podrían provenir de la eminencia pretalámica (Bupesh et al., 2011;

Abellán et al., 2013), dada la proximidad de ambos territorios.

En las primeras etapas de morfogénesis, Pax6 se expresa en todo el tálamo (Pratt et al., 2000), pero a medida que avanza el desarrollo se va perdiendo rostrocaudalmente, con la excepción del órgano pineal (Walther y Gruss, 1991; Estivill-Torrús et al., 2001), como se ha observado en *Xenopus*. Caudalmente, en el diencéfalo se observa la expresión de ambos factores en la región pretecal (porción alar de p1) de todos los vertebrados estudiados (Ferran et al., 2007; Ferran et al., 2008; Ferreira-Galve et al., 2008; Merchán et al., 2011; Morona et al., 2011). A diferencia de los anfibios, la expresión de ambos factores durante el desarrollo en mamíferos es menor (Bandín et al., 2013; Duan et al., 2013; Joven et al., 2013a, 2013b; Bandín et al., 2014). En particular, en base a la expresión de Pax6 en el pretecho (p1) y su ausencia en la placa alar mesencefálica (techo óptico), se define el límite diencéfalo-mesencefálico (Kerwin et al., 2004). La expresión de Pax6 observada en la placa basal de p1 en *Xenopus*, forma una banda que se continúa con el tegmento mesencefálico, de acuerdo con lo descrito en aves (Ferran et al., 2007) y reptiles (Pritz y Ruan, 2009).

Por otro lado, la presencia de Pax7 en el lóbulo intermedio de la hipófisis y de Pax6 en el lóbulo anterior, es una característica compartida con urodelos (Joven et al., 2013a, 2013b) y pez cebra (Guner et al., 2008). El Pax7 hipofisario se han relacionado con la activación de melanóforos epiteliales en procesos de

mimetización con el entorno (Tuinhof et al., 1993); y Pax6 con el establecimiento de los límites dorsoventrales del lóbulo anterior (Ericson et al., 1997).

Durante el desarrollo mesencefálico embrionario, Pax7 mantiene un gradiente de expresión caudorostral en la zona ventricular que también se ha observado en ratón y pollo (Thompson et al., 2004; Thompson et al., 2007), y ha sido implicado en el establecimiento de la polaridad tectal (Thompson et al., 2008). En *Xenopus laevis*, la aparición de Pax7 en el techo óptico se ha relacionado también con la llegada de los axones retinales (CR positivos) que mantienen una polaridad caudo-rostral y topográfica (Morona y González, 2013). En *Xenopus* adulto, se mantiene la expresión de Pax7 en todo el techo, particularmente en la zona ventricular, como se ha descrito en urodelos (Joven et al., 2013a), a diferencia de la expresión en pollo, donde se restringe a las capas superficiales (Thompson et al., 2004). Sin embargo, no se encuentran células Pax7 en el tegmento mesencefálico en *Xenopus* adulto ni durante el desarrollo. Dicha ausencia de marcaje podría deberse a la acción inhibitoria de Shh sobre Pax7 descrita previamente en los embriones de pollo, donde expresión ectópica de Shh en el techo inhibía la cascada molecular de formación del techo, cambiando el destino de los derivados del mesencéfalo alar por basales (Nomura et al., 1998; Watanabe y Nakamura, 2000). Por el contrario, esa acción inhibitoria no parece ocurrir en la placa basal de p3 donde la expresión de Nkx2.1 podría estar contrarrestando

dicho efecto, siguiendo el patrón de regulación descrito en mamíferos donde Nkx2.1 se encuentra bajo el control de señalización de Shh (Pabst et al., 2000) y viceversa (Nery et al., 2001). A su vez en anuros, Pax6 se encuentra ausente en la placa alar mesencefálica y se localiza en una banda basal a lo largo del tegmento mesencefálico, comparable a las células Pax6 presentes en la sustancia negra reticular en ratones (Duan et al., 2013) y las poblaciones descritas en teleosteos (Wullimann y Rink, 2001) y urodelos (Joven et al., 2013a). Ésta banda de células Pax6 positivas en el *Xenopus* adulto forman una población distinta de las células tegmentales dopaminérgicas y colinérgicas.

En el cerebelo, Pax6 presenta una intensa inmunorreactividad en las células granulares, como se ha visto en otros vertebrados (Rodríguez-Moldes et al., 2008; Wullimann et al., 2011; Duan et al., 2013), mientras que, Pax7 aparece, únicamente, en la zona ventricular. Sin embargo, durante el desarrollo del cerebelo, la comparación de expresión de Pax6 y Pax7 sugiere una cierta coexpresión, como se observó previamente en urodelos (Joven et al., 2013b). A su vez, se ha descrito la implicación de Pax6 en la regulación de la migración y especificación de los progenitores celulares en el labio rómbico que se originan desde la porción alar de r1 y darán lugar al cerebelo en todos los vertebrados (Rodríguez-Moldes et al., 2008; Wullimann et al., 2011; Martínez et al., 2013).

En el rombencéfalo también se hallan poblaciones con un patrón dinámico durante el desarrollo. En estadios tempranos, Pax7 se distribuye en la placa alar de la zona rostral de r1 y se extiende caudalmente pero se encuentra ausente en r0, como en urodelos, aves y mamíferos (Aroca y Puelles, 2005; Joven et al., 2013a,b) . En *Xenopus*, a partir de estadios larvarios tardíos, se encuentran algunas células Pax7 en el núcleo posterodorsal ístmico, y posteriormente, se observan poblaciones Pax7 en territorios progresivamente más basales. En amniotas también se ha descrito una contribución diferencial desde distintos dominios ventriculares para formar las distintas subdivisiones del núcleo interpeduncular, de modo que las células Pax7 y Otp de r1 de las regiones ventriculares alares, alcanzan tangencialmente regiones basales adyacentes (Aroca et al., 2006), lo que apoya un origen histogenético y una organización del núcleo interpeduncular muy conservada en tetrápodos. También está altamente conservada la expresión de Pax6 en la zona ventricular de la placa basal del rombencéfalo y aparece luego en el manto dando lugar a diferentes subtipos de neuronas motoras (Rodríguez-Moldes et al., 2011; Joven et al., 2013a, 2013b), como se ha demostrado en mamíferos (Osumi et al., 1997).

En la médula espinal embrionaria de *Xenopus*, Pax7 se expresa en zona ventricular de la placa alar, quedando gradualmente reducida y desapareciendo en el adulto, donde Pax7 (dorsal) y Pax6 (ventral) se localizan en la zona del manto a lo largo

de toda la médula. Este patrón se mantiene conservado en todos los vertebrados estudiados y se ha relacionado con la especificación de la identidad celular de los diferentes progenitores de la médula espinal (Ericson et al., 1997; Maczkowiak et al., 2010; Kuscha et al., 2012). A diferencia de los mamíferos, los anfibios urodelos adultos y los anuros larvarios (*Xenopus laevis*), pueden regenerar su médula espinal tras una lesión (Tanaka y Ferretti, 2009). Esta capacidad se pierde al final de la metamorfosis (Gibbs et al., 2011), cuando la expresión de Pax6 y Pax7 en vz de la médula espinal desaparece.

#### **Implicación de Pax6 y Pax7 en la regionalización del diencefalo en *Xenopus laevis***

La implicación de ambos factores de transcripción, Pax6 y Pax7, en la regionalización del diencefalo, en particular del tálamo, viene determinada desde las etapas tempranas del desarrollo. En *Xenopus laevis*, Pax7 se expresa en p2 a lo largo de la vz de la placa del techo, así como en pollo y ratón (Ferran et al., 2007; Ferran et al., 2008; Ferran et al., 2009). Esto demuestra la implicación de Pax7 en las funciones tempranas de polarización dorsal del tubo neural, antes de que su expresión quede restringida a la placa del techo. Sin embargo, la expresión de Pax7 es abundante en las regiones diencefálicas adyacentes como la placa basal de p3 y la porción alar de p1.

Por otro lado, Pax6 se expresa en el tálamo embrionario, pero desaparece durante el desarrollo, con la excepción del órgano pineal (Estivill-Torrús et al.,

2001), a medida que se posiciona la Zli (Caballero et al., 2014). Además, se detecta la expresión de Pax6 en las futuras regiones del pretálamo y del pretecho, donde en éste último junto con Pax7 sirve para identificar los principales dominios pretectales (Morona et al., 2011), característica compartida con el resto de vertebrados estudiados (Ferran et al., 2007; Ferran et al., 2008; Ferreiro-Galve et al., 2008; Merchán et al., 2011). Sin embargo, en mamíferos, la expresión de ambos factores disminuye severamente durante el desarrollo (Duan et al., 2013).

Por tanto, Pax6 y Pax7 son herramientas anatómicas fundamentales para la comprensión de la regionalización del diencefalo, marcando los límites externos del futuro tálamo, rostralmente con el pretálamo y caudalmente con la región pretectal. Podemos concluir que el tálamo y la porción basal de p2 pueden definirse a lo largo del desarrollo por la ausencia de expresión de Pax6 y Pax7, como ocurre en los mamíferos (Ferran et al., 2008). Además, su presencia en la placa del techo y en el epitálamo, permiten diferenciarlo de los otros componentes principales de la porción alar de p2 y en base a esos límites se ha analizado, su regionalización y las relaciones moleculares con los territorios adyacentes y la Zli.

### **Inducción y regionalización del tálamo**

La formación de las distintas identidades neuronales en el cerebro en desarrollo es el resultado de la

combinación de la expresión de diferentes factores de transcripción que se inicia desde la fase de especificación génica temprana (prepatternning) y que proporciona la referencia topológica que sirve para definir la identidad molecular de regiones progenitoras en las futuras divisiones del SNC (patterning).

La regionalización dorsoventral en el diencefalo en *Xenopus*, incluido el tálamo, se produce por efectos dorsalizantes como Wnt frente a los ventralizantes de Shh, cuyos patrones de expresión en la placa del techo; basal y del suelo están altamente conservados en los tetrápodos (Vue et al., 2009; Domínguez et al., 2010; Scholpp y Lumsden, 2010; Hagemann y Scholpp, 2012; Martínez-Ferre et al., 2013). A su vez, la regionalización anteroposterior diencefálica, se produce por la interacción entre diversos genes que conducen al posicionamiento y formación del organizador secundario, denominado Zli, descrito previamente en vertebrados (Echevarría et al., 2003; Vue et al., 2007; Jeong et al., 2011; Epstein, 2012; Martínez-Ferre y Martínez, 2012), y que también es conocido como MDO (mid diencephalic organizer) (Scholpp y Lumsden, 2010; Hagemann y Scholpp, 2012). Una vez formada, la Zli va a regular la expresión de determinados genes en las regiones adyacentes como el tálamo entre otras.

Según diferentes estudios, en *Xenopus* existen una serie de genes ortólogos a los descritos en los análisis previos sobre los perfiles moleculares determinantes del desarrollo talámico en pollo y ratón. Esto sugiere una posible conservación de los mecanismos y

secuencia de especificación de las diferentes regiones talámicas en amnion y anamnion.

En *Xenopus*, durante los primeros estadios del desarrollo se produce la especificación génica temprana del primordio talámico (prepatternning). La presencia de Fez en el telencéfalo y diencefalo rostral, cuya expresión dorsal en p3 limita con la expresión en p2 de Wnt3 y Xiro1 (ortólogo de Irx en ratón, Irx3 en pollo e Irx1b/7 en pez cebra) (Gómez-Skarmeta et al., 1998), es una característica compartida con el resto de vertebrados (Hashimoto et al., 2000; Hirata et al., 2006; Jeong et al., 2007). Dicha interacción anteroposterior establece el límite rostral del tálamo (límite p3/p2) y forma un pasillo permisivo por el que se induce y se extiende la Zli. A su vez, se producen otras interacciones que se manifiestan por la expresión diferencial de Pax6, Tcf4 (equivalente a Tcf7L2) y Gli3 junto con Fez, Xiro1 y Wnt3a, y que generan las distintas identidades moleculares de las porciones anterior, intermedia y caudal del diencefalo (p3, p2 y p1) (Abbasi et al., 2010; Koenig et al., 2010; Morona et al., 2011). El proceso de especificación temprana incluye la inducción de un dominio de expresión Gli3 positivo en la región central del diencefalo (similar al dominio de Wnt8b en pollo), cuya inhibición posterior determina la localización de la Zli entre la región diencefálica rostral Fez-positiva y la región intermedia y caudal Xiro1-positiva (Fig. 5).

Tras la inducción de la Zli, se produce el establecimiento del

organizador, que se observa, por la progresión de la expresión de Shh desde la placa basal penetrando en el territorio alar a lo largo del pasillo constituido previamente. Este hecho, detectado en *Xenopus*, fue previamente observado en otros vertebrados, donde se comprobó que la progresión de Shh en la Zli no corresponde con movimientos celulares, sino que se produce por un efecto inductivo desde la placa del techo mediada por la acción de Wnt8b sobre Gli3 y la presencia de ácido retinoico (RA) (García-López et al., 2004; Scholpp y Lumsden, 2010; Hagemann y Scholpp, 2012; Martínez-Ferre et al., 2013).

Durante la maduración de la Zli, se produce la liberación del morfógeno Shh desde el organizador y se establece un gradiente de concentración que contribuye a regular la expresión de determinados genes en el tálamo de manera dosis-dependiente. De este modo, se forman dos dominios progenitores talámicos en función de la concentración de Shh (Hashimoto-Torii et al., 2003; Szabó et al., 2009; Vue et al., 2009; Epstein, 2012), que en *Xenopus laevis*, se han denominado como r-Th y c-Th, atendiendo a su localización topológica rostral y caudal, respectivamente (Fig. 5). Dichos dominios parecen conservados en los vertebrados, según estudios similares en pez cebra (Scholpp et al., 2006), pollo (Kiecker y Lumsden, 2004; Vieira et al., 2005) y ratón (Jeong et al., 2011).

El dominio progenitor talámico rostral, r-Th, en amnion se induce por altos niveles de Shh desde la Zli y la placa basal (Kiecker y Lumsden, 2004;

Jeong et al., 2011), lo que induce la expresión de Nkx2.2, como se observa en *Xenopus*. Sin embargo, en el pez cebra la inducción del territorio histogenético rostral (r-Th) se produce incluso en ausencia de la expresión de Shh en la línea media ventral, siendo únicamente necesaria la expresión proveniente de la Zli (Scholpp et al., 2006). Esta diferencia sugiere que, mientras que en el pez cebra se requiere una única fuente de expresión de Shh para el desarrollo del tálamo, en el resto de amniotas, debido a la alta complejidad del encéfalo y a un desarrollo más lento, se requieren dos fuentes que produzcan y liberen Shh para la formación de toda la diversidad neuronal que conforman el tálamo. Comparativamente, en *Xenopus*, el desarrollo del tálamo es algo más lento que en el pez cebra y los genes que están bajo el control de la señalización gradual de Shh muestran patrones de expresión similares a los detectados en amniotas, lo que sugiere mecanismos comunes en los tetrápodos.

La combinación de Nkx2.2 con Gli1, Tcf4 y Lhx1 sirve para identificar el dominio r-Th (Fig. 5). La familia de genes Gli media los efectos de Shh y presentan una distribución diferencial en las células progenitoras talámicas (Hashimoto-Torii et al., 2003). Gli1 se expresa en el r-Th y actúa como un activador transcripcional (Ruiz i Altaba et al., 2003). Por otro lado, Tcf4, se expresa a lo largo del tálamo y de la habénula, ocupando también el dominio r-Th, como en mamíferos (Nagalski et al., 2013). Su expresión parece estar mediada por la ruta de señalización de Wnt a través de la vía canónica

(activada por  $\beta$ -catenina) (Bluske et al., 2012) y su presencia es fundamental no sólo en el desarrollo, sino también, en la correcta función y maduración del tálamo.

A medida que avanza el desarrollo en *Xenopus*, se relaciona la expresión de Nkx2.2 en r-Th con la presencia de células GABAérgicas (GABA-positivas) (Fig. 5). Estas células son Dll4-negativas, homólogas a las Dlx-negativas que se detectaron en otros vertebrados (Puelles y Rubenstein, 1993; Martínez-de-la-Torre et al., 2002), y constituyen una población de células GABAérgicas diferentes de las que se originan en territorios histogenéticos pretalámicos (Bulfone et al., 1993), donde derivan de células que expresan Dlx. Por tanto, existen otros genes reguladores, además de los Dlx, que juegan un papel importante en la adquisición de dicho fenotipo en r-Th. Se considera que estas células GABAérgicas van a formar parte de la banda intergeniculada (IGL) y regiones próximas (Martínez-de-la-Torre et al., 2002; Vue et al., 2007; Robertshaw et al., 2013). De igual modo, en *Xenopus*, esta región supone una fuente de neuronas GABAérgicas talámicas que se mantiene en el tálamo adulto (Brox et al., 2003).

Como se ha visto en *Xenopus*, la expresión de Pax6 en estadios tempranos (est. 32) se localiza a lo largo de los territorios alares diencefálicos (p3, p2, p1), cuando la expresión de Shh en la Zli aún no se encuentra bien establecida (Domínguez et al., 2010). Según avanza el desarrollo, el gradiente de expresión de Shh avanza desde la Zli

y la expresión de Pax6 se restringe, desapareciendo primero en el dominio r-Th y posteriormente, el c-Th, limitando su presencia a la habénula y a la región comisural del pretecho, como en otros vertebrados (Ferran et al., 2007; Ferran et al., 2008). Esto se debe principalmente a la inhibición recíproca entre Shh y Pax6 (Caballero et al., 2014) (Fig. 5). La especificación génica del dominio c-Th, marcada por la expresión de Gbx2, requiere niveles bajos de Shh (Scholpp y Lumsden, 2010) (Fig. 5), y sus derivados se extienden de forma gradual, dorsal y caudalmente en la zona del manto, contribuyendo a una mayor extensión del dominio histogénico caudal respecto al rostral, quedando establecidos los límites con el epitálamo (primordio de la habénula) y la región pretectal como ocurre en amniontas (Bulfone et al., 1993; Martínez-de-la-Torre et al., 2002; Chen et al., 2009). El comienzo de la expresión de Gbx2 en las neuronas talámicas se ha relacionado con la salida del ciclo celular (Nakagawa y O'Leary, 2001; Chen et al., 2009), por lo que la expresión de Gbx2 es necesaria para el desarrollo del tálamo, la formación de las proyecciones tálamocorticales y para la supervivencia celular en las neuronas talámicas maduras (Hevner et al., 2002; Chen et al., 2009; Szabó et al., 2009; Chatterjee y Li, 2012).

En la determinación del dominio histogénico caudal de *Xenopus*, también influyen distintos miembros de la familia Gli. Los niveles bajos de Shh, inducen la expresión de Gli4 (homólogo de Gli2 de mamíferos) en territorios caudales a los Gli1 positivos, donde

actúa como activador o represor de otros genes (Ruiz i Altaba et al., 2003). Por tanto, niveles bajos de Shh y Gli2, permiten la expresión de Gbx2 en c-Th, mientras que, altas concentraciones de Shh junto con Gli1, inducen la expresión de Sox14 (Nkx2.2) en r-Th (Jeong et al., 2011; Suzuki-Hirano et al., 2011). A diferencia de Gbx2, el patrón de expresión de Lhx2/Lhx9 se detecta en la habénula en desarrollo (Fig. 5), además de en el dominio histogénico caudal en *Xenopus*, lo que sugiere una vía común y un papel importante en la transformación de los precursores en neuronas post-mitóticas maduras (Hagemann y Scholpp, 2012). La coexpresión de Lhx2 y Lhx9 se detectó, previamente, en el diencéfalo del pez cebra (Ando et al., 2005), en *Xenopus* (Bachy et al., 2001; Moreno et al., 2004), y en el ratón (Nakagawa y O'Leary, 2001); y se observó en estudios con mutantes de Lhx2 que no se producía alteración en la regionalización talámica neuronal (Lakhina et al., 2007), ya que Lhx9 sería capaz de compensar la ausencia de Lhx2. Por tanto la expresión de Lhx9, sugiere un importante papel en el desarrollo del prosencéfalo pero con posibles acciones redundantes, como se ha descrito, para otras familias génicas (Nakagawa y O'Leary, 2001).

El dominio progenitor talámico caudal, c-Th, queda, a su vez, subdividido en dos regiones. La región rostroventral, positiva únicamente para Ngn2 (Ngnr-1 en *Xenopus*; Nieber et al., 2009), se denomina c-Th2, mientras que, la porción caudodorsal Ngn2/Dbx1, se denomina c-Th1 (Fig. 5), siguiendo la nomenclatura utilizada en ratón

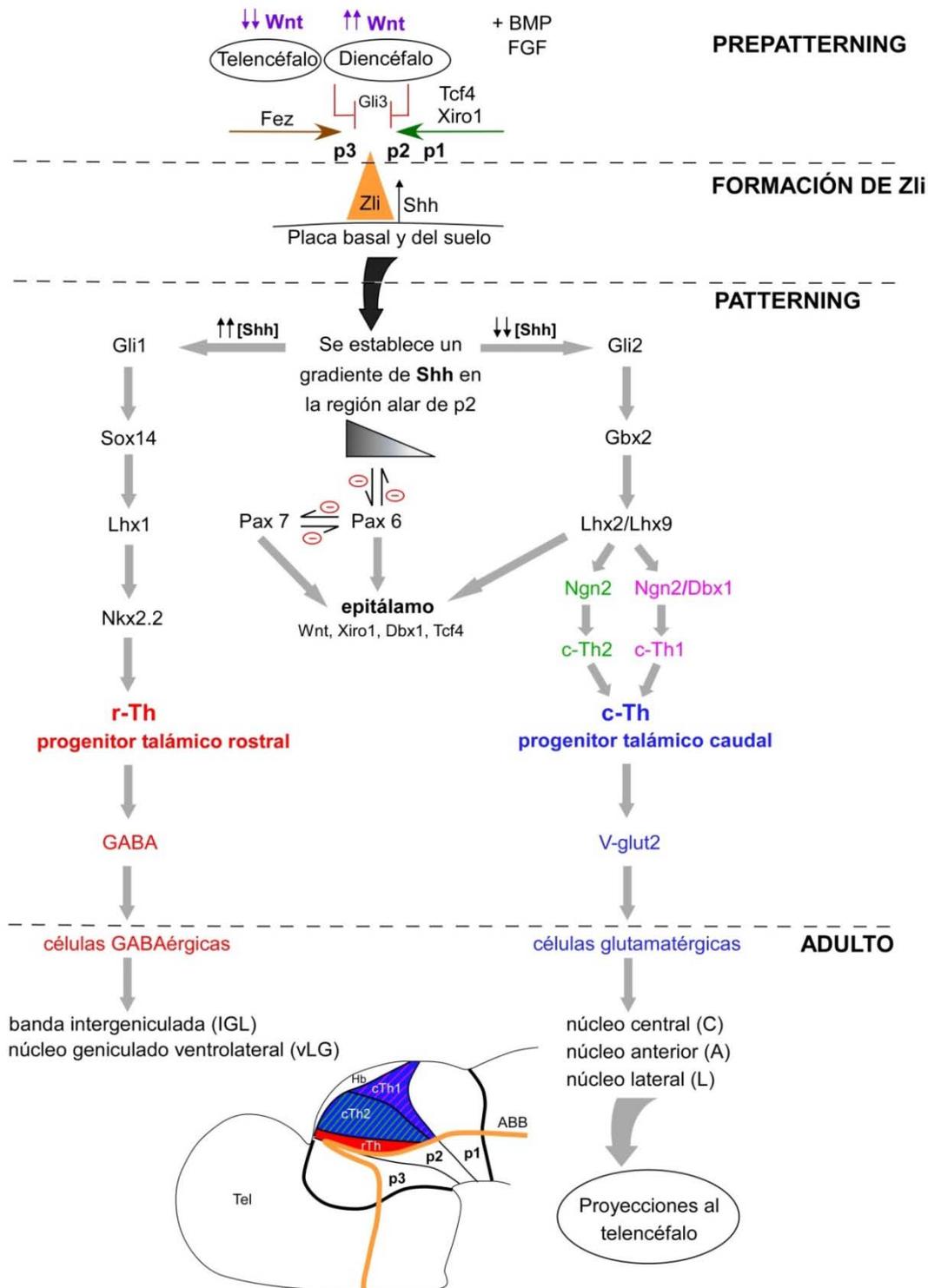
(Hashimoto-Torii et al., 2003; Epstein, 2012). La aparición de este dominio c-Th1 es dependiente de bajas concentraciones de Shh, y su eliminación en la Zli, conduce a la ausencia de Ngn2 y Gbx2 en el tálamo tanto en pollo como en el pez cebra (Kiecker y Lumsden, 2004; Vieira et al., 2005; Scholpp et al., 2006).

Durante las etapas finales del desarrollo embrionario en *Xenopus*, se detecta la expresión de Vglut2, marcador de neuronas glutamatérgicas, en c-Th, de igual modo a lo descrito en mamíferos. La especificación génica del dominio c-Th determina el destino glutamatérgico de las neuronas de los núcleos derivados de c-Th (Fig. 5). Esta región constituye la estación de relevo de la información sensorial multimodal procedente de la periferia (a excepción de la información olfativa), hacia las regiones paliales a través de la proyección talamocortical (Vue et al., 2007; Robertshaw et al., 2013).

Por otro lado, el epitálamo se desarrolla como un derivado dorsal de la placa alar en la porción caudal de p2 y dará lugar a la epífisis (complejo pineal) y la habénula. Aunque esta última, generalmente, ha sido considerada en íntima relación con el tálamo, mantiene diferencias significativas, ontogenéticas y funcionales. Está relacionada principalmente con el sistema límbico y los ganglios basales, en la modulación de las emociones y la motivación, y se ha visto que alteraciones en su estructura conducen a desórdenes psiquiátricos, como esquizofrenia y

depresión (Hikosaka et al., 2008; Hikosaka, 2010).

La habénula temprana se caracteriza por la expresión de Wnt7b, Irx1, Dbx1 y Pax6 en ratones y pez cebra (Chatterjee et al., 2014) y en *Xenopus*, hemos encontrado una combinación similar de marcadores que corroboran esta entidad (Wnt3a, Xiro1, Dbx1, Pax6 y Tcf4) y su límite con el tálamo queda establecido por la expresión de Gbx2, tanto en *Xenopus* como en ratón (Chen et al., 2009). A su vez, Shh también tiene un importante papel en la especificación de la habénula ya que Pax6 regula la expresión de Shh en la Zli y por consiguiente, la subdivisión de p2 alar en tálamo y epitálamo (Caballero et al., 2014; Chatterjee et al., 2014). Por otro lado, Lhx9/Lhx2, se expresan en toda la región habenular, como en peces (Peukert et al., 2011) y mamíferos (Rétaux et al., 1999), pero también en la zona Gbx2 positiva en c-Th. Recientes estudios han demostrado la implicación de Lhx9 en el desarrollo de la glándula pineal y previene la hidrocefalia postnatal (Yamazaki et al., 2015).



**Figura 5.** Representación esquemática de la secuencia de marcadores moleculares que facilitan la identificación de los diferentes territorios derivados de la porción alar de p2 a lo largo del desarrollo. Refleja la interacción entre los genes Fez, Wnt, y Xiro1 durante la fase de especificación génica temprana (prepatterning) y la consiguiente formación de la Zli. Durante la especificación génica, la expresión de Shh proveniente de la Zli y de la placa basal forma un gradiente de concentración, siendo mayor en el área próxima a la Zli, que induce una cascada de genes que dará lugar al territorio progenitor talámico rostral (r-Th). Por otra parte, una concentración menor de Shh determinará una cascada génica diferente, dando lugar al dominio progenitor talámico caudal (c-Th). El r-Th expresa GABA y dará lugar a los núcleos GABAérgicos IGL y vLG, mientras que en el c-Th (formado por c-Th1 y c-Th2) las células expresan Vglut2 y darán lugar a distintos núcleos talámicos glutamatérgicos en el adulto que proyectarán al telencéfalo. El epitálamo se reconoce por la expresión de Pax6 y Pax7 durante el desarrollo, entre otros marcadores. Abreviaturas: c-Th1, dominio progenitor talámico caudal caudodorsal; c-Th2, dominio progenitor talámico caudal rostroventral.

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten concluir que los patrones de distribución de Pax6 y Pax7 y la especificación génica del tálamo basada en los patrones de expresión de: Wnt3, Shh, Xiro1, Fez1, Gbx2, Lhx1, Lhx9, Tcf4, Gli1/3, Nkx2.2, Dbx1, Ngn2, Vglut2, GABA, se mantienen altamente conservados en *Xenopus* respecto a otros vertebrados amniotas y anamniotas estudiados, de modo que, corroboran que las características moleculares se hallan altamente conservadas en el desarrollo talámico y corresponden a un plan general común en todos los vertebrados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, A.A., Pappas, Z., Malik, S., Bangs, F., Schmidt, A., Koch, S., Lopez-Rios, J., Grzeschik, K.H., 2010. Human intronic enhancers control distinct sub-domains of Gli3 expression during mouse CNS and limb development. *BMC Dev Biol* 10:44. doi: 10.1186/1471-213X-10-44.
- Abellán, A., Desfilis, E., Medina, L., 2013. The olfactory amygdala in amniotes: an evo-devo approach. *Anat Rec (Hoboken)* 296:1317-1332.
- Agoston, Z., Heine, P., Brill, M.S., Grebbin, B.M., Hau, A.C., Kallenborn-Gerhardt, W., Schramm, J., Gotz, M., Schulte, D., 2014. Meis2 is a Pax6 co-factor in neurogenesis and dopaminergic periglomerular fate specification in the adult olfactory bulb. *Development* 141:28-38.
- Ando, H., Kobayashi, M., Tsubokawa, T., Uyemura, K., Furuta, T., Okamoto, H., 2005. Lhx2 mediates the activity of Six3 in zebrafish forebrain growth. *Dev Biol* 287:456-468.
- Aroca, P., Lorente-Cánovas, B., Mateos, F.R., Puelles, L., 2006. Locus coeruleus neurons originate in alar rhombomere 1 and migrate into the basal plate: Studies in chick and mouse embryos. *J Comp Neurol* 496:802-818.
- Aroca, P., Puelles, L., 2005. Postulated boundaries and differential fate in the developing rostral hindbrain. *Brain Res Brain Res Rev* 49:179-190.
- Bachy, I., Vernier, P., Retaux, S., 2001. The LIM-homeodomain gene family in the developing *Xenopus* brain: conservation and divergences with the mouse related to the evolution of the forebrain. *J Neurosci* 21:7620-7629.
- Baltanás, F.C., Weruaga, E., Murias, A.R., Gomez, C., Curto, G.G., Alonso, J.R., 2009. Chemical characterization of Pax6-immunoreactive periglomerular neurons in the mouse olfactory bulb. *Cell Mol Neurobiol* 29:1081-1085.
- Bandín, S., Morona, R., Lopez, J.M., Moreno, N., Gonzalez, A., 2014. Immunohistochemical analysis of Pax6 and Pax7 expression in the CNS of adult *Xenopus laevis*. *J Chem Neuroanat* 57-58:24-41.
- Bandín, S., Morona, R., Moreno, N., Gonzalez, A., 2013. Regional expression of Pax7 in the brain of *Xenopus laevis* during embryonic and larval development. *Front Neuroanat* 7:48. doi: 10.3389/fnana.2013.00048.
- Bluske, K.K., Vue, T.Y., Kawakami, Y., Taketo, M.M., Yoshikawa, K., Johnson, J.E., Nakagawa, Y., 2012. beta-Catenin signaling specifies progenitor cell identity in parallel with Shh signaling in the developing mammalian thalamus. *Development* 139:2692-2702.
- Brox, A., Puelles, L., Ferreira, B., Medina, L., 2003. Expression of the genes GAD67 and Distal-less-4 in the forebrain of *Xenopus laevis* confirms a common pattern in tetrapods. *J Comp Neurol* 461:370-393.
- Bulfone, A., Puelles, L., Porteus, M.H., Frohman, M.A., Martin, G.R., Rubenstein, J.L., 1993. Spatially restricted expression of Dlx-1, Dlx-2 (Tes-1), Gbx-2, and Wnt-3 in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and

- longitudinal segmental boundaries. *J Neurosci* 13:3155-3172.
- Bupesh, M., Legaz, I., Abellán, A., Medina, L., 2011. Multiple telencephalic and extratelencephalic embryonic domains contribute neurons to the medial extended amygdala. *J Comp Neurol* 519:1505-1525.
- Caballero, I.M., Manuel, M.N., Molinek, M., Quintana-Urzaínqui, I., Mi, D., Shimogori, T., Price, D.J., 2014. Cell-autonomous repression of Shh by transcription factor Pax6 regulates diencephalic patterning by controlling the central diencephalic organizer. *Cell Rep* 8:1405-1418.
- Chatterjee, M., Guo, Q., Weber, S., Scholpp, S., Li, J.Y., 2014. Pax6 regulates the formation of the habenular nuclei by controlling the temporospatial expression of Shh in the diencephalon in vertebrates. *BMC Biol* 12:13. doi: 10.1186/1741-7007-12-13.
- Chatterjee, M., Li, J.Y., 2012. Patterning and compartment formation in the diencephalon. *Front Neurosci* 6:66. doi: 10.3389/fnins.2012.00066.
- Chen, L., Guo, Q., Li, J.Y., 2009. Transcription factor Gbx2 acts cell-nonautonomously to regulate the formation of lineage-restriction boundaries of the thalamus. *Development* 136:1317-1326.
- D'Amico, L.A., Boujard, D., Coumailleau, P., 2011. Proliferation, migration and differentiation in juvenile and adult *Xenopus laevis* brains. *Brain Res* 1405:31-48.
- D'Amico, L.A., Boujard, D., Coumailleau, P., 2013. The neurogenic factor NeuroD1 is expressed in post-mitotic cells during juvenile and adult *Xenopus* neurogenesis and not in progenitor or radial glial cells. *PLoS One* 8:e66487.
- Davidson, E.H., Erwin, D.H., 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* 311:796-800.
- Domínguez, L., González, A., Moreno, N., 2010. Sonic hedgehog expression during *Xenopus laevis* forebrain development. *Brain Res* 1347:19-32.
- Domínguez, L., González, A., Moreno, N., 2014. Characterization of the hypothalamus of *Xenopus laevis* during development. II. The basal regions. *J Comp Neurol* 522:1102-1131.
- Duan, D., Fu, Y., Paxinos, G., Watson, C., 2013. Spatiotemporal expression patterns of Pax6 in the brain of embryonic, newborn, and adult mice. *Brain Struct Funct* 218:353-3572.
- Echevarría, D., Vieira, C., Gimeno, L., Martínez, S., 2003. Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Research Reviews* 43:179-191.
- Epstein, D.J., 2012. Regulation of thalamic development by sonic hedgehog. *Front Neurosci* 6:57. doi: 10.3389/fnins.2012.00057.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T.M., Briscoe, J., 1997. Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90:169-180.
- Estivill-Torrús, G., Vitalis, T., Fernández-Llebrez, P., Price, D.J., 2001. The transcription factor Pax6 is required for development of the diencephalic dorsal midline secretory radial glia that form the subcommissural organ. *Mech Dev* 109:215-224.
- Ferran, J.L., de Oliveira, E.D., Merchán, P., Sandoval, J.E., Sánchez-Arrones, L., Martínez-De-La-Torre, M., Puelles, L., 2009. Genoarchitectonic profile of developing nuclear groups in the chicken pretectum. *J Comp Neurol* 517:405-451.
- Ferran, J.L., Sánchez-Arrones, L., Bardet, S.M., Sandoval, J.E., Martínez-de-la-Torre, M., Puelles, L., 2008. Early pretectal gene expression pattern shows a conserved anteroposterior tripartition in mouse and chicken. *Brain Res Bull* 75:295-298.
- Ferran, J.L., Sánchez-Arrones, L., Sandoval, J.E., Puelles, L., 2007. A model of early molecular regionalization in the chicken embryonic pretectum. *J Comp Neurol* 505:379-403.
- Ferreiro-Galve, S., Carrera, I., Candal, E., Villar-Cheda, B., Anadón, R., Mazan, S., Rodríguez-Moldes, I., 2008. The segmental organization of the developing shark brain based on neurochemical markers, with special attention to the

- prosencephalon. *Brain Res Bull* 75:236-240.
- García-Lopez, R., Vieira, C., Echevarría, D., Martínez, S., 2004. Fate map of the diencephalon and the zona limitans at the 10-somites stage in chick embryos. *Dev Biol* 268:514-530.
- Gibbs, K.M., Chittur, S.V., Szaro, B.G., 2011. Metamorphosis and the regenerative capacity of spinal cord axons in *Xenopus laevis*. *Eur J Neurosci* 33:9-25.
- Gómez-Skarmeta, J.L., Glavic, A., de la Calle-Mustienes, E., Modolell, J., Mayor, R., 1998. Xiro, a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. *EMBO J* 17:181-190.
- González, A., Muñoz, A., Muñoz, M., Marín, O., Arévalo, R., Porteros, A., Alonso, J.R., 1996. Nitric oxide synthase in the brain of a urodele amphibian (*Pleurodeles waltl*) and its relation to catecholaminergic neuronal structures. *Brain Res* 727:49-64.
- González, G., Puellas, L., Medina, L., 2002. Organization of the mouse dorsal thalamus based on topology, calretinin immunostaining, and gene expression. *Brain Res Bull* 57:439-442.
- Guner, B., Ozacar, A.T., Thomas, J.E., Karlstrom, R.O., 2008. Graded hedgehog and fibroblast growth factor signaling independently regulate pituitary cell fates and help establish the pars distalis and pars intermedia of the zebrafish adenohypophysis. *Endocrinology* 149:4435-4451.
- Hagemann, A.I., Scholpp, S., 2012. The Tale of the Three Brothers - Shh, Wnt, and Fgf during Development of the Thalamus. *Front Neurosci* 6:76. doi: 10.3389/fnins.2012.00076.
- Hashimoto-Torii, K., Motoyama, J., Hui, C.-C., Kuroiwa, A., Nakafuku, M., Shimamura, K., 2003. Differential activities of Sonic hedgehog mediated by Gli transcription factors define distinct neuronal subtypes in the dorsal thalamus. *Mechanisms of Development* 120:1097-1111.
- Hashimoto, H., Yabe, T., Hirata, T., Shimizu, T., Bae, Y., Yamanaka, Y., Hirano, T., Hibi, M., 2000. Expression of the zinc finger gene *fez*-like in zebrafish forebrain. *Mech Dev* 97:191-195.
- Hevner, R.F., Miyashita-Lin, E., Rubenstein, J.L., 2002. Cortical and thalamic axon pathfinding defects in *Tbr1*, *Gbx2*, and *Pax6* mutant mice: evidence that cortical and thalamic axons interact and guide each other. *J Comp Neurol* 447:8-17.
- Hikosaka, O., 2010. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci* 11:503-513.
- Hikosaka, O., Sesack, S.R., Lecourtier, L., Shepard, P.D., 2008. Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J Neurosci* 28:11825-11829.
- Hirata, T., Nakazawa, M., Muraoka, O., Nakayama, R., Suda, Y., Hibi, M., 2006. Zinc-finger genes *Fez* and *Fez*-like function in the establishment of diencephalon subdivisions. *Development* 133:3993-4004.
- Jeong, J.Y., Einhorn, Z., Mathur, P., Chen, L., Lee, S., Kawakami, K., Guo, S., 2007. Patterning the zebrafish diencephalon by the conserved zinc-finger protein *Fez1*. *Development* 134:127-136.
- Jeong, Y., Dolson, D.K., Waclaw, R.R., Matisse, M.P., Sussel, L., Campbell, K., Kaestner, K.H., Epstein, D.J., 2011. Spatial and temporal requirements for sonic hedgehog in the regulation of thalamic interneuron identity. *Development* 138:531-541.
- Jostes, B., Walther, C., Gruss, P., 1990. The murine paired box gene, *Pax7*, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev* 33:27-37.
- Joven, A., Morona, R., González, A., Moreno, N., 2013a. Expression patterns of *Pax6* and *Pax7* in the adult brain of a urodele amphibian, *Pleurodeles waltl*. *J Comp Neurol* 521:2088-2124.
- Joven, A., Morona, R., González, A., Moreno, N., 2013b. Spatiotemporal patterns of *Pax3*, *Pax6*, and *Pax7* expression in the developing brain of a urodele amphibian, *Pleurodeles waltl*. *J Comp Neurol* 521:3913-3953.
- Kerwin, J., Scott, M., Sharpe, J., Puellas, L., Robson, S.C., Martinez-de-la-Torre, M., Ferran, J.L., Feng, G., Baldock, R.,

- Strachan, T., Davidson, D., Lindsay, S., 2004. 3 dimensional modelling of early human brain development using optical projection tomography. *BMC Neurosci* 5:27. doi: 10.1186/1471-2202-5-27.
- Kiecker, C., Lumsden, A., 2004. Hedgehog signaling from the ZLI regulates diencephalic regional identity. *Nat Neurosci* 7:1242-1249.
- Koenig, S.F., Brentle, S., Hamdi, K., Fichtner, D., Wedlich, D., Gradl, D., 2010. En2, Pax2/5 and Tcf-4 transcription factors cooperate in patterning the *Xenopus* brain. *Dev Biol* 340:318-328.
- Kuscha, V., Frazer, S.L., Dias, T.B., Hibi, M., Becker, T., Becker, C.G., 2012. Lesion-induced generation of interneuron cell types in specific dorsoventral domains in the spinal cord of adult zebrafish. *J Comp Neurol* 520:3604-3616.
- Lakhina, V., Fahnkar, A., Bhatnagar, L., Tole, S., 2007. Early thalamocortical tract guidance and topographic sorting of thalamic projections requires LIM-homeodomain gene *Lhx2*. *Dev Biol* 306:703-713.
- Maczkowiak, F., Mateos, S., Wang, E., Roche, D., Harland, R., Monsoro-Burq, A.H., 2010. The Pax3 and Pax7 paralogs cooperate in neural and neural crest patterning using distinct molecular mechanisms, in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* 340:381-396.
- Marín, O., Smeets, W.J., González, A., 1998. Basal ganglia organization in amphibians: chemoarchitecture. *J Comp Neurol* 392:285-312.
- Martínez-de-la-Torre, M., Garda, A.L., Puelles, E., Puelles, L., 2002. Gbx2 expression in the late embryonic chick dorsal thalamus. *Brain Res Bull* 57:435-438.
- Martínez-Ferre, A., Martínez, S., 2012. Molecular regionalization of the diencephalon. *Front Neurosci* 6:73. doi:10.3389/fnins.2012.00073.
- Martínez-Ferre, A., Navarro-Garberí, M., Bueno, C., Martínez, S., 2013. Wnt signal specifies the intrathalamic limit and its organizer properties by regulating Shh induction in the alar plate. *J Neurosci* 33:3967-3980.
- Martínez, S., Andreu, A., Mecklenburg, N., Echevarría, D., 2013. Cellular and molecular basis of cerebellar development. *Front Neuroanat* 7:18. doi:10.3389/fnana.2013.00018.
- Merchán, P., Bardet, S.M., Puelles, L., Ferran, J.L., 2011. Comparison of Pretectal Genoarchitectonic Pattern between Quail and Chicken Embryos. *Front Neuroanat* 5:23. doi:10.3389/fnana.2011.00023.
- Moreno, N., Bachy, I., Rétaux, S., González, A., 2004. LIM-homeodomain genes as developmental and adult genetic markers of *Xenopus* forebrain functional subdivisions. *J Comp Neurol* 472:52-72.
- Moreno, N., Morona, R., López, J.M., Domínguez, L., Joven, A., Bandín, S., González, A., 2012. Characterization of the bed nucleus of the stria terminalis in the forebrain of anuran amphibians. *J Comp Neurol* 520:330-363.
- Moreno, N., Morona, R., López, J.M., González, A., 2010. Subdivisions of the turtle *Pseudemys scripta* subpallium based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. *J Comp Neurol* 518:4877-4902.
- Moreno, N., Rétaux, S., González, A., 2008a. Spatio-temporal expression of Pax6 in *Xenopus* forebrain. *Brain Res* 1239:92-99.
- Morona, R., Ferran, J.L., Puelles, L., González, A., 2011. Embryonic genoarchitecture of the pretectum in *Xenopus laevis*: a conserved pattern in tetrapods. *J Comp Neurol* 519:1024-1050.
- Morona, R., González, A., 2013. Pattern of calbindin-D28k and calretinin immunoreactivity in the brain of *Xenopus laevis* during embryonic and larval development. *J Comp Neurol* 521:79-108.
- Murakami, Y., Ogasawara, M., Sugahara, F., Hirano, S., Satoh, N., Kuratani, S., 2001. Identification and expression of the lamprey Pax6 gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates. *Development* 128:3521-3531.
- Nacher, J., Varea, E., Blasco-Ibanez, J.M., Castillo-Gomez, E., Crespo, C., Martínez-Guijarro, F.J., McEwen, B.S., 2005. Expression of the transcription factor Pax 6 in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci Res* 81:753-761.

- Nagalski, A., Irimia, M., Szewczyk, L., Ferran, J.L., Misztal, K., Kuznicki, J., Wisniewska, M.B., 2013. Postnatal isoform switch and protein localization of LEF1 and TCF7L2 transcription factors in cortical, thalamic, and mesencephalic regions of the adult mouse brain. *Brain Struct Funct* 218:1531-1549.
- Nakagawa, Y., O'Leary, D.D., 2001. Combinatorial expression patterns of LIM-homeodomain and other regulatory genes parcellate developing thalamus. *J Neurosci* 21:2711-2725.
- Nery, S., Wichterle, H., Fishell, G., 2001. Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* 128:527-540.
- Nieber, F., Pieler, T., Henningfeld, K.A., 2009. Comparative expression analysis of the neurogenins in *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* 238:451-458.
- Nomura, T., Kawakami, A., Fujisawa, H., 1998. Correlation between tectum formation and expression of two PAX family genes, PAX7 and PAX6, in avian brains. *Dev. Growth Differ.* 40:485-495.
- Ohyama, K., Das, R., Placzek, M., 2008. Temporal progression of hypothalamic patterning by a dual action of BMP. *Development* 135:3325-3331.
- Osumi, N., Hirota, A., Ohuchi, H., Nakafuku, M., Iimura, T., Kuratani, S., Fujiwara, M., Noji, S., Eto, K., 1997. Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development* 124:2961-2972.
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., Maekawa, M., 2008. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* 26:1663-1672.
- Pabst, O., Herbrand, H., Takuma, N., Arnold, H.H., 2000. NKX2 gene expression in neuroectoderm but not in mesendodermally derived structures depends on sonic hedgehog in mouse embryos. *Dev Genes Evol* 210:47-50.
- Peukert, D., Weber, S., Lumsden, A., Scholpp, S., 2011. Lhx2 and Lhx9 determine neuronal differentiation and compartmentation in the caudal forebrain by regulating Wnt signaling. *PLoS Biol* 9:e1001218.
- Pratt, T., Vitalis, T., Warren, N., Edgar, J.M., Mason, J.O., Price, D.J., 2000. A role for Pax6 in the normal development of dorsal thalamus and its cortical connections. *Development* 127:5167-5178.
- Pritz, M.B., Ruan, Y.W., 2009. PAX6 immunoreactivity in the diencephalon and midbrain of alligator during early development. *Brain Behav Evol* 73:1-15.
- Puelles, L., Ferran, J.L., 2012. Concept of neural genoarchitecture and its genomic fundament. *Front Neuroanat* 6:47. doi: 10.3389/fnana.2012.00047.
- Puelles, L., Harrison, M., Paxinos, G., Watson, C., 2013. A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends Neurosci* 36:570-578.
- Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S., Rubenstein, J.L., 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424:409-438.
- Puelles, L., Martínez, S., 2013. Patterning of the Diencephalon. In: *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS: Comprehensive Developmental Neuroscience*. Rubenstein J. R., Rakic P., (Eds). Academic Press (Elsevier), London, pag: 151-172.
- Puelles, L., Medina, L., 2002. Field homology as a way to reconcile genetic and developmental variability with adult homology. *Brain Res Bull* 57:243-255.
- Puelles, L., Rubenstein, J.L., 1993. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16:472-479.
- Puelles, L., Rubenstein, J.L., 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends in Neurosciences* 26:469-476.
- Rétaux, S., Rogard, M., Bach, I., Failli, V., Besson, M.J., 1999. Lhx9: a novel LIM-

- homeodomain gene expressed in the developing forebrain. *J Neurosci* 19:783-793.
- Robertshaw, E., Matsumoto, K., Lumsden, A., Kiecker, C., 2013. *Irx3* and *Pax6* establish differential competence for Shh-mediated induction of GABAergic and glutamatergic neurons of the thalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E3919-26.
- Rodríguez-Moldes, I., Carrera, I., Pose-Méndez, S., Quintana-Urzainqui, I., Candal, E., Anadón, R., Mazan, S., Ferreiro-Galve, S., 2011. Regionalization of the shark hindbrain: a survey of an ancestral organization. *Front Neuroanat* 5:16.
- Rodríguez-Moldes, I., Ferreiro-Galve, S., Carrera, I., Sueiro, C., Candal, E., Mazan, S., Anadón, R., 2008. Development of the cerebellar body in sharks: spatiotemporal relations of *Pax6* expression, cell proliferation and differentiation. *Neurosci Lett* 432:105-110.
- Ruiz i Altaba, A., Nguyễn, V., Palma, V., 2003. The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code. *Current Opinion in Genetics & Development* 13:513-521.
- Scholpp, S., Lumsden, A., 2010. Building a bridal chamber: development of the thalamus. *Trends Neurosci* 33:373-380.
- Scholpp, S., Wolf, O., Brand, M., Lumsden, A., 2006. Hedgehog signalling from the zona limitans intrathalamica orchestrates patterning of the zebrafish diencephalon. *Development* 133:855-864.
- Stoykova, A., Gruss, P., 1994. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 14:1395-1412.
- Suzuki-Hirano, A., Ogawa, M., Kataoka, A., Yoshida, A.C., Itoh, D., Ueno, M., Blackshaw, S., Shimogori, T., 2011. Dynamic spatiotemporal gene expression in embryonic mouse thalamus. *J Comp Neurol* 519:528-543.
- Szabó, N.E., Zhao, T., Zhou, X., Álvarez-Bolado, G., 2009. The role of Sonic hedgehog of neural origin in thalamic differentiation in the mouse. *J Neurosci* 29:2453-66.
- Tanaka, E.M., Ferretti, P., 2009. Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 10:713-723.
- Thompson, J., Lovicu, F., Ziman, M., 2004. The role of *Pax7* in determining the cytoarchitecture of the superior colliculus. *Dev Growth Differ* 46:213-218.
- Thompson, J.A., Lovicu, F.J., Ziman, M., 2007. *Pax7* and superior collicular polarity: insights from *Pax6* (*Sey*) mutant mice. *Exp Brain Res* 178:316-325.
- Thompson, J.A., Zembrzycki, A., Mansouri, A., Ziman, M., 2008. *Pax7* is requisite for maintenance of a subpopulation of superior collicular neurons and shows a diverging expression pattern to *Pax3* during superior collicular development. *BMC Dev Biol* 8:62.
- Tuinhof, R., de Rijk, E.P., Wismans, R.G., Smeets, W.J., Roubos, E.W., 1993. The role of hypothalamic nuclei in the dopaminergic control of background adaptation in *Xenopus laevis*. *Ann N Y Acad Sci* 680:486-488.
- Vieira, C., Garda, A.L., Shimamura, K., Martínez, S., 2005. Thalamic development induced by Shh in the chick embryo. *Dev Biol* 284:351-363.
- Vue, T.Y., Aaker, J., Taniguchi, A., Kazemzadeh, C., Skidmore, J.M., Martin, D.M., Martin, J.F., Treier, M., Nakagawa, Y., 2007. Characterization of progenitor domains in the developing mouse thalamus. *J Comp Neurol* 505:73-91.
- Vue, T.Y., Bluske, K., Alishahi, A., Yang, L.L., Koyano-Nakagawa, N., Novitch, B., Nakagawa, Y., 2009. Sonic hedgehog signaling controls thalamic progenitor identity and nuclei specification in mice. *J Neurosci* 29:4484-4497.
- Walther, C., Gruss, P., 1991. *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113:1435-1449.
- Wang, Q., Fang, W.H., Krupinski, J., Kumar, S., Slevin, M., Kumar, P., 2008. Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. *J Cell Mol Med* 12:2281-2294.
- Watanabe, Y., Nakamura, H., 2000. Control of chick tectum territory along dorsoventral

- axis by Sonic hedgehog. *Development* 127:1131-1140.
- Wullimann, M.F., Mueller, T., Distel, M., Babaryka, A., Grothe, B., Koster, R.W., 2011. The long adventurous journey of rhombic lip cells in jawed vertebrates: a comparative developmental analysis. *Front Neuroanat* 5:27. doi:10.3389/fnana.2011.00027.
- Wullimann, M.F., Rink, E., 2001. Detailed immunohistology of Pax6 protein and tyrosine hydroxylase in the early zebrafish brain suggests role of Pax6 gene in development of dopaminergic diencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 131:173-191.
- Wullimann, M.F., Rink, E., 2002. The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. *Brain Res Bull* 57:363-370.
- Yamazaki, F., Moller, M., Fu, C., Clokie, S.J., Zykovich, A., Coon, S.L., Klein, D.C., Rath, M.F., 2015. The Lhx9 homeobox gene controls pineal gland development and prevents postnatal hydrocephalus. *Brain Struct Funct* 220:1497-1509.



## **6. CONCLUSIONES**

---



- 1- La inmunodetección de los factores de transcripción Pax6 y Pax7 se ha confirmado de gran utilidad para el estudio anatómico del SNC de *Xenopus laevis*, debido a su alta resolución y sensibilidad. Su uso en combinación con otros marcadores es una herramienta muy útil para identificar agrupaciones neuronales y regiones encefálicas específicas que, en el caso de los anfibios, no se pueden analizar sólo en base a la citoarquitectura.
- 2- La expresión de los factores Pax analizados, detectada inicialmente en regiones restringidas de la zona ventricular y posteriormente en células migradas en el manto, sugiere posibles funciones en la especificación temprana de dominios histogenéticos y en la posterior diferenciación celular y formación de determinadas regiones en el SNC.
- 3- En el caso de Pax7, su expresión desde estadios tempranos de desarrollo define y respeta los límites anatómicos propuestos por el paradigma prosomérico, evidenciando la organización segmental del encéfalo en *Xenopus*. La secuencia espacio-temporal de expresión, analizada en combinación con otros marcadores, sugiere posibles rutas de migración tangencial, traspasando en algún caso los límites neuroméricos.
- 4- En *Xenopus*, Pax6 y Pax7 mantienen su expresión en numerosas poblaciones neuronales en adultos, presentando un patrón de distribución básico común con los urodelos. La expresión en adultos se relacionó con la capacidad regenerativa de los urodelos, pero nuestros resultados demuestran que es una característica compartida por distintos anfibios, aunque los anuros pierden la capacidad regenerativa tras la metamorfosis.
- 5- Durante el desarrollo temprano de *Xenopus*, los patrones de expresión de Fez y Dll4 definen una región rostral diencefálica, mientras que Tcf4, Xiro1 y Wnt3 establecen una región caudal. El punto de encuentro de ambas regiones especifica la zona donde se expresa posteriormente Shh en la Zli, que coincide con el límite rostral del tálamo (límite p3/p2).
- 6- Tras la especificación temprana, la expresión de Gbx2 y Xiro 1 definen el límite p1/p2, así como, la especificación del primordio talámico Gbx2+/ Xiro1- y la distinción de la región habenular Gbx2-/Xiro1+/ Pax6+. Posteriormente, en el tálamo se diferencian los dominios histogenéticos rostral (r-Th) y caudal (c-Th), definidos específicamente por

una combinación de genes que se activarían en respuesta a la inducción de Shh según un gradiente de concentración.

- 7- Los marcadores usados permiten proponer que las células derivadas del pequeño dominio progenitor r-Th se diferencian en neuronas GABAérgicas, mientras que, el mayor dominio c-Th, da lugar a las numerosas neuronas glutamatérgicas del tálamo en *Xenopus*.
  
- 8- La combinación única de genes hallados en la prospectiva región talámica de *Xenopus laevis* y sus derivados histogenéticos, están altamente conservados en los vertebrados amniotas, confirmando un patrón común en tetrápodos. Datos recientes en pez cebra sugieren que la especificación del tálamo puede estar, en rasgos generales, conservada en todos los vertebrados, reflejando la importancia de esta región diencefálica desde momentos tempranos de la evolución.

## **7. CONCLUSIONS**

---



- 1- The immunohistochemical detection of the Pax6 and Pax7 transcription factors has been confirmed as a useful method for studying the CNS of *Xenopus laevis*, due to its high resolution and sensitivity. Its use, in combination with other markers, is a suitable strategy to identify specific neuronal groups and brain regions that can not be analyzed on the basis of cytoarchitecture alone, in the case of amphibians.
- 2- The expression of the Pax factors analyzed, detected in restricted regions of the ventricular zone in early development and later in migrated cells of the mantle, suggest possible roles in early specification of histogenetic domains and, subsequently, in cell differentiation and formation of specific CNS regions.
- 3- For the case of Pax7, its expression from early developmental stages define and respects the anatomical boundaries proposed by the prosomeric paradigm, highlighting the segmental organization of the brain in *Xenopus*. The spatiotemporal sequence of Pax7 expression, analyzed in combination with other markers, suggests possible tangential migration routes, in some cases going beyond the neuromeric limits.
- 4- In *Xenopus*, Pax7 and Pax6 expression is maintained in many neuronal populations in the adult brain, showing a common basic distribution pattern with urodeles. The expression in adults was related to the capacity of regeneration present in urodeles, but our results show that it is a characteristic shared by different amphibians, although anurans lose the capacity of regeneration after metamorphosis.
- 5- During the early development of *Xenopus*, Fez and Dll4 expression patterns, define a rostral diencephalic region, while Tcf4, Wnt3 Xiro1, establish a caudal region. The abutting zone of the two regions specifies the area where later Shh is expressed in the Zli, which matches the rostral boundary of the thalamus (p3 / p2 limit).
- 6- After the early specification (prepatternning), Gbx2 and Xiro1 expressions, define the p2/p1 boundary and the specification of the Gbx2+ / Xiro1- thalamic territory, as well as, the distinction of the Gbx2- / Xiro1+ / Pax6+ habenular region. Subsequently, in the thalamus rostral (Th-r) and caudal (c-Th) histogenetic domains appear, specifically defined by a combination of genes likely activated in response to Shh induction through a concentration gradient.

- 7- The markers used allow to propose that the cells derived from the small progenitor domain r-Th differentiate into GABAergic neurons, whereas the larger c-Th domain gives rise to the numerous glutamatergic neurons of the thalamus in *Xenopus*.
  
- 8- The unique combination gene expressions found in the prospective thalamic region of *Xenopus laevis* and its histogenetic derivatives is highly conserved in amniote vertebrates, confirming a common pattern in tetrapods. Recent data reported in zebrafish suggest that the thalamic specification might be, in general terms, conserved in all vertebrates, reflecting the importance of this diencephalica region from early moments of evolution.

## 8. RESUMEN

---



## **Expresión de los genes Pax en el SNC y análisis de la genoarquitectura embrionaria de la región talámica en *Xenopus laevis***

### **Introducción**

Desde el punto de vista evolutivo, el estudio del SNC de los anfibios anuros es de gran interés debido a su interesante posición filogenética como únicos representantes de los tetrápodos anamniotas. Por tanto, poseen características primitivas compartidas tanto con amniotas como con anamniotas, así como, características derivadas más específicas. Debido a su importante posición filogenética, los estudios neuroanatómicos llevados a cabo en *Xenopus laevis*, resultan cruciales para poder clarificar relaciones y establecer homologías entre los principales grupos de vertebrados.

Estudios previos han demostrado que la especificación y regionalización del SNC depende de la interacción de múltiples familias génicas y moléculas de señalización y presenta un patrón común en los vertebrados. De modo que la organización final de los tipos celulares y localización de núcleos específicos es dependiente de los patrones de expresión espaciotemporales de diversos genes de desarrollo, que determinan el tamaño, posición topológica relativa y conectividad de cada región encefálica. La combinación de los patrones de expresión de un conjunto de genes durante el desarrollo de una región específica confiere la genoarquitectura de dicha región. El análisis comparado de los patrones de expresión, interpretados dentro del contexto del modelo neuromérico actual ayuda a comprender las características comunes y específicas del SNC entre las diferentes especies.

Entre los genes reguladores implicados en la especificación y establecimiento del eje rostrocaudal, así como en el desarrollo del SNC, se encuentran los miembros de la familia Pax. Algunos de estos genes, como Pax3, Pax6 y Pax7, se expresan en las etapas más tempranas del desarrollo, actuando como mediadores en la regionalización dorsoventral y anteroposterior del tubo neural, en respuesta a morfógenos tempranos. Pax7 se expresa en zonas específicas del SNC durante el desarrollo y se ha descrito su implicación en la regionalización temprana del encéfalo y en el mantenimiento de la identidad regional. Tras la regionalización inicial, los genes Pax contribuyen al balance entre la proliferación celular, el mantenimiento de las células progenitoras y los procesos de diferenciación. Además de su implicación durante las fases tempranas del desarrollo, Pax6 y Pax7 se han utilizado como marcadores de regiones específicas del encéfalo de vertebrados, así como en el análisis del bauplan general del encéfalo en vertebrados.

En concreto, Pax6 y Pax7 son de especial interés en el desarrollo y regionalización del diencefalo, donde Pax6 está activamente implicado en el establecimiento y posterior formación del organizador secundario Zli (Zona Limitante Intratalámica), junto con Shh; así como, en el establecimiento del límite diencefalo-mesencefálico. A su vez, Pax7 es regulado por Shh en regiones como el tegmento mesencefálico y se ha descrito

en relación a la regionalización de la región diencefálica de los principales grupos de vertebrados donde su patrón está altamente conservado. De modo que, las proteínas que codifican estos genes están altamente conservadas entre los vertebrados y mantienen una distribución comparable.

En los vertebrados, el diencefalo es el dominio más caudal del prosencéfalo y limita a su vez, con el mesencéfalo. Se divide en tres neurómeros transversales o prosómeros (rostrocaudalmente: p3, p2 y p1), en cada uno de los cuales existen las cuatro zonas longitudinales: placa del suelo, placa basal, placa alar y placa del techo. Las porciones alares principales de cada uno de estos neurómeros se denominan pretálamo (p3), tálamo (p2) y región pretectal (p1) y sus regiones basales constituyen el tegmento diencefálico. El tálamo limita caudalmente con el pretecho y rostralmente con la Zli, que precede al tálamo. Es una estructura fundamental que sirve como centro de integración y relevo de la información sensorial (a excepción de la olfativa) hacia centros superiores, corteza en mamíferos y regiones subcorticales en vertebrados no mamíferos. Su desarrollo durante la embriogénesis incluye tres etapas en las que, la *especificación génica temprana (prepatternning)* conduce a la inducción del primordio talámico, *la formación de la Zli*, donde la progresión de la expresión de Shh, que desde la placa basal asciende hacia posiciones más dorsales, está implicada en la formación y establecimiento del organizador y *la especificación génica (patterning)* que dirige a través del morfógeno Shh, liberado desde la Zli y la placa basal, la regionalización y formación de los dominios progenitores talámicos rostral (r-Th) y caudal (c-Th).

## Objetivos

Los estudios en anfibios han constituido una de las bases primordiales en el campo de la Neurobiología Evolutiva. Desde momentos muy tempranos en la historia de la Neuroanatomía, las observaciones en anfibios fueron en gran medida la base para poder entender mejor la organización presente en sistemas nerviosos más complejos. Esto se acentuó con estudios neuroanatómicos durante las diversas etapas del desarrollo que sirvieron como modelo para comprender aspectos comunes en la evolución y desarrollo (evo-devo) de los vertebrados.

En este marco de la biología evolutiva del desarrollo (evo-devo), en particular basada en estudios neuroanatómicos, en el presente trabajo, que utiliza como modelo el anfibio anuro *Xenopus laevis*, se han planteado los siguientes objetivos:

*Objetivo 1:* Dada la relevancia de los factores de transcripción codificados por la familia de genes Pax en el desarrollo y en la regionalización del Sistema Nervioso Central (SNC), se seleccionó el factor de transcripción Pax7, para analizar su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario y larvario; y que nos permitiera evaluar su implicación en la formación de determinadas regiones del encéfalo. Para ello, se llevaron a cabo técnicas inmunohistoquímicas para la detección de la proteína Pax7, simples y dobles, combinando las tinciones de Pax7 con otros marcadores (GABA, CR, TH, NOS, Otp, Nkx2.1), que sirven para entender la organización del SNC y nos

permite un análisis detallado de la regionalización progresiva de las distintas divisiones encefálicas en el caso de *Xenopus*, utilizando el modelo neuromérico actual. (Capítulo 2).

Objetivo 2: En el presente estudio nos propusimos comprobar si la expresión de Pax6 y Pax7 persiste en el *Xenopus laevis* adulto, comparándolo con los patrones descritos en aves y mamíferos, donde su expresión quedaba limitada a un número reducido de grupos neuronales; y con los anfibios urodelos, donde su amplia distribución en el adulto, más extensa que en los amniotas, podría deberse a un mayor grado de regeneración presentado por este grupo de anfibios en el adulto. Así, nos propusimos llevar a cabo un análisis inmunohistoquímico combinado en el SNC adulto de *Xenopus*, para observar la expresión de estos dos genes, localizando las proteínas que codifican. El uso de tinciones dobles y triples con anticuerpos frente a marcadores de regiones particulares en el encéfalo de *Xenopus*, sirve para una mejor identificación topológica de las zonas marcadas, interpretadas según el modelo neuromérico, que facilita realizar comparaciones con otros grupos de vertebrados. (Capítulo 3).

Objetivo 3: La última parte de nuestro estudio se dirigió al análisis de la organización genoarquitectónica del tálamo durante el desarrollo embrionario en *Xenopus laevis*. Diversos estudios en peces, aves y mamíferos han demostrado una secuencia espacio temporal precisa de expresión de diversos genes que contribuyen a la adquisición de una competencia zonal para la formación de la región talámica (*preparttening*), la aparición de un organizador secundario (*Zli*) y la posterior regionalización temprana (*patterning*). Nuestro objetivo se centra en comprobar el grado de similitud o diferencia en la formación del tálamo en nuestro modelo anfibio para evaluar la conservación evolutiva de los procesos fundamentales durante el desarrollo de esta importante región diencefálica. Para ello evaluamos detalladamente 22 marcadores diferentes, utilizando técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación in situ combinadas, analizando sus patrones de expresión durante el desarrollo embrionario de *Xenopus*. (Capítulo 4).

## Resultados

En el capítulo 2, analizando el patrón espaciotemporal de expresión de Pax7 en el SNC de *Xenopus laevis*, se observó que la expresión más rostral de Pax7 aparece en la placa basal de p3, siguiendo caudalmente en las placas del techo y alares de p1 y mesencéfalo y en la placa alar del rombómero 1. Según avanza el desarrollo, se observan células Pax7 en el hipotálamo, próximas a la población de células catecolaminérgicas de la región mamilar. En el diencefalo, Pax7 se expresa intensamente en una porción de la placa basal de p3, en la placa del techo y en células aisladas del tálamo en p2, a lo largo de la placa del techo de p1 y en los dominios comisural y juxtacomisural del pretecho. En el mesencéfalo, las células Pax7 se localizan en el techo óptico y en un menor grado, en el torus semicircularis. La porción rostral de la placa alar del rombómero 1, incluyendo la capa ventricular del cerebelo,

expresa Pax7 y, gradualmente algunas células se observan ventralmente, en el núcleo interpeduncular y en el istmo (rombómero 0). Adicionalmente, Pax7 se observó en la parte ventral de zona ventricular de la placa alar a lo largo del rombocéfalo y médula espinal.

En el capítulo 3, se detectó una amplia distribución de células Pax6 y Pax7 en el SNC de *Xenopus laevis* adulto, con un patrón específico para cada uno de ellos pero con cierto solapamiento en p3 basal y p1 alar. En el telencéfalo, se detectan únicamente células Pax6 incluyendo el bulbo olfativo, septo, estriado y complejo amigdalino. En el diencefalo, Pax6 se encuentra en la porción alar y Pax7 en la zona basal de p3. Ambos factores se distribuyen ampliamente en la región comisural y yuxtacomisural del pretecho, pero sólo se observan células Pax6 a la placa basal. Pax7 marca específicamente, las células en el techo óptico, incluyendo la zona ventricular, mientras que, las células Pax6 sólo se observan en la región tegmental. Caudalmente, en el cerebelo Pax6 se expresa en la mayoría de las células granulares, mientras que, Pax7 se restringe a la zona ventricular. En la porción rostral del rombómero 1, Pax7 se localiza en las células de la zona ventricular de la placa alar y numerosas células migradas se observan en núcleos de la placa basal, como el griseum centrale y el núcleo interpeduncular. Pax6 se observa en células de la formación reticular y el área octavolateral. En toda la placa alar rombencefálica la zona ventricular expresa Pax7 excepto en la zona tectal. A lo largo de la médula espinal, aparecen células Pax7 dorsales y Pax6 ventrales separadas del ventrículo, que no muestra inmunorreactividad para ninguno de ellos.

En el capítulo 4, el estudio genoarquitectónico del desarrollo temprano de diencefalo en *Xenopus*, nos permite identificar los límites prosoméricos externos del tálamo con las regiones vecinas (pretálamo, pretecho y epitálamo). Además, este estudio también reveló la especificación temprana del esbozo talámico basado en la expresión rostral de Fez y Dll y caudalmente de Wnt3a, Pax6 y Xiro1, en el primordio diencefálico caudal talamo-pretecal. La expresión dinámica de Shh revela la formación de la Zli y su progresión ventrodorsal en *Xenopus* como ocurre en otros vertebrados. Del mismo modo, las divisiones interprosoméricas se pusieron de manifiesto basándose en la expresión conservada de Nkx2.2 y GABA en el dominio progenitor talámico rostral gabaérgico (r-Th), frente a la expresión de Gbx2, Ngn2 y VGlut (entre otros) en el dominio progenitor caudal glutamatergico (c-Th). Este último también puede ser subdividido principalmente en base a la expresión diferencial de Dbx1 un subdominio Dbx1+ llamado c-Th1 y otro Dbx1- denominado c-Th2.

## Conclusiones

- 1- La inmunodetección de los factores de transcripción Pax6 y Pax7 se ha confirmado de gran utilidad para el estudio anatómico del SNC de *Xenopus laevis*, debido a su alta resolución y sensibilidad. Su uso en combinación con otros marcadores es una herramienta muy útil para identificar agrupaciones neuronales y regiones encefálicas

- específicas que, en el caso de los anfibios, no se pueden analizar sólo en base a la citoarquitectura.
- 2- La expresión de los factores Pax analizados, detectada inicialmente en regiones restringidas de la zona ventricular y posteriormente en células migradas en el manto, sugiere posibles funciones en la especificación temprana de dominios histogénéticos y en la posterior diferenciación celular y formación de determinadas regiones en el SNC.
  - 3- En el caso de Pax7, su expresión desde estadios tempranos de desarrollo define y respeta los límites anatómicos propuestos por el paradigma prosomérico, evidenciando la organización segmental del encéfalo en *Xenopus*. La secuencia espacio-temporal de expresión, analizada en combinación con otros marcadores, sugiere posibles rutas de migración tangencial, traspasando en algún caso los límites neuroméricos.
  - 4- En *Xenopus*, Pax6 y Pax7 mantienen su expresión en numerosas poblaciones neuronales en adultos, presentando un patrón de distribución básico común con los urodelos. La expresión en adultos se relacionó con la capacidad regenerativa de los urodelos, pero nuestros resultados demuestran que es una característica compartida por distintos anfibios, aunque los anuros pierden la capacidad regenerativa tras la metamorfosis.
  - 5- Durante el desarrollo temprano de *Xenopus*, los patrones de expresión de Fez y Dll4 definen una región rostral diencefálica, mientras que Tcf4, Xiro1 y Wnt3 establecen una región caudal. El punto de encuentro de ambas regiones especifica la zona donde se expresa posteriormente Shh en la Zli, que coincide con el límite rostral del tálamo (límite p3/p2).
  - 6- Tras la especificación temprana, la expresión de Gbx2 y Xiro 1 definen el límite p1/p2, así como, la especificación del primordio talámico Gbx2+/ Xiro1- y la distinción de la región habenular Gbx2-/Xiro1+/ Pax6+. Posteriormente, en el tálamo se diferencian los dominios histogénéticos rostral (r-Th) y caudal (c-Th), definidos específicamente por una combinación de genes que se activarían en respuesta a la inducción de Shh según un gradiente de concentración.
  - 7- Los marcadores usados permiten proponer que las células derivadas del pequeño dominio progenitor r-Th se diferencian en neuronas GABAérgicas, mientras que, el mayor dominio c-Th, da lugar a las numerosas neuronas glutamatérgicas del tálamo en *Xenopus*.
  - 8- La combinación única de genes hallados en la prospectiva región talámica de *Xenopus laevis* y sus derivados histogénéticos, están altamente conservados en los vertebrados amniotas, confirmando un patrón común en tetrápodos. Datos recientes en pez cebra sugieren que la especificación del tálamo puede estar, en rasgos generales, conservada en todos los vertebrados, reflejando la importancia de esta región diencefálica desde momentos tempranos de la evolución.



## **9. SUMMARY**

---



## Expression of Pax genes in the CNS and genoarchitecture of the embryonic thalamus in *Xenopus laevis*

### Introduction

The study of the anuran CNS has been of interest from an evolutive viewpoint because of their interesting phylogenetic position as unique living anamniote tetrapods. Therefore, they possess primitive characteristics likely shared by amniotes and anamniotes and other more specific derived features. Due to their pivotal phylogenetic position, neuroanatomical studies in amphibians are important in order to gain clarity on relationships and establish homologies among the main groups of vertebrates.

Previous studies demonstrated that the patterning and regionalization of the CNS is dependent on the interactive action of multiple gene families and signaling molecules that present common patterns in vertebrates. Thus, the final organization of cell types and their localization in distinct nuclei depends on the spatiotemporal patterns of expression of several developing genes that finally define the size, topologic position and morphology of the derived compartments of the developing encephalic regions. The expression patterns of a distinct combination of genes form a code during the development of a specific region, constituting the genoarchitecture of the region. The comparative analysis of the sets of gene expression patterns, interpreted in the context of the current neuromeric model helps to understand common and derived specific features in the CNS of different species.

The members of the Pax gene family are key molecules implicated in the specification and definition of the rostrocaudal axis and regulation of the CNS development. Some of their members as Pax3, Pax6 and Pax7, are expressed from early stages during development in response to morphogens as mediators in the dorsoventral and rostrocaudal patterning of the neural tube. Pax7 is expressed in specific areas in the developing CNS where it has been involved in the early patterning and the preservation of the regional identity. After this first early patterning, Pax genes contribute to the balance of the cell proliferation, maintenance of the progenitor cells and differentiation events. Besides their functional roles during first steps in the ontogeny, Pax6 and Pax7 have been also very useful as markers of specific brain regions or in the analysis of the general brain bauplan in vertebrates.

Specifically, Pax6 and Pax7 are of special interest in the patterning and development of the diencephalon. Pax6, in coordination with Shh, is actively involved in the establishment and progression of the secondary organizer *Zli* (*Zona limitans intrathalamica*) and the positioning of the diencephalo-mesencephalic boundary. At the same time, Pax7 is also regulated (negatively) by Shh in the mesencephalic tegmentum and has been described as a main controller in the patterning of the diencephalon in various amniotes and anamniotes. Consequently, the proteins coded for these genes are

phylogenetically highly conserved and maintain similar expression patterns among vertebrates

The diencephalon is the caudalmost domain of the prosencephalon and is rostral to the mesencephalon. It contains three transversal neuromeres called prosomeres (p3, p2 y p1), in which four dorsoventral longitudinal subdivisions could be distinguished: the roof plate, the alar plate, the basal plate and the floor plate. The alar region of these prosomeres gives rise to the prethalamus (in p3), thalamus (in p2) and pretectum (in p1) and their respective basal plates constitute altogether the diencephalic tegmentum. Specifically, the central part (the thalamus) is defined between the pretectum (caudally) and the Zli (rostrally). It constitutes an essential structure in the relay and integration of the sensory information (excepting olfactory) from peripheral organs to the cortex (in mammals) or subcortical telencephalic regions (in nonmammalian vertebrates). During embryogenesis the development of the thalamic region comprises three phases: 1) *The prepatterning* that leads to the induction of the thalamic anlage; 2) *The formation of the Zli*, that includes the progression of the Shh expression from the basal plate to the dorsal alar plate and 3) *The patterning* that directs the formation of the rostral and caudal progenitor histogenetic domains (r-Th and c-Th respectively) as well as the later regionalization through the gradient of the morphogen Shh released from the basal plate and Zli

## Objectives

Studies of amphibians contributed importantly to form the basis in the field of Developmental Neurobiology. From very early times in the history of the Neuroanatomy, observations in amphibians were useful for a better understanding of the organization of more complex nervous systems. This was accentuated by neuroanatomical studies during the various stages of development that served as a model for understanding common aspects in the evolution and development (evo-devo) of vertebrates.

In this context of evolutionary developmental biology (evo-devo), in particular based on neuroanatomical studies, our work using as a model the anuran amphibian *Xenopus laevis*, has established the following objectives:

Objective 1: Given the importance of the transcription factors encoded by the family of Pax genes, in the development and regionalization of the Central Nervous System (CNS), the transcription factor Pax7 was selected to analyze its expression pattern during embryonic and larval development; and to allow us to assess its involvement in the formation of certain regions of the brain. For this, immunohistochemical techniques for the detection of the protein Pax7 were conducted, by means of single and double staining for Pax7 in combination with other markers (GABA, CR, TH, NOS, Otp, Nkx2.1), which serve to understand the organization of the SNC and allows a detailed analysis of the progressive brain regionalization of different divisions in *Xenopus*, using the current neuromeric model. (Chapter 2).

**Objective 2:** In this study we aimed to test whether the expression of Pax6 and Pax7 persists in adult *Xenopus laevis*, comparing with the patterns described in birds and mammals, where their expression was limited to a small number of neuronal groups; and with urodele amphibians, where their wide distribution in adults, more extensive than in amniotes, could be due to a higher degree of regeneration presented by this group of amphibians in adults. Thus, we decided to carry out a combined immunohistochemical analysis in the adult *Xenopus* CNS, to observe the expression of these two genes, by locating the proteins they encode. The use of double and triple staining with antibodies to markers of particular regions in the brain of *Xenopus* serves to better identify topologically the stained areas, interpreted in the neuromeric model, which facilitates comparisons with other groups of vertebrates. (Chapter 3).

**Objective 3:** The last part of our study aimed to analyze the genoarchitectonic organization of the thalamus during embryonic development in *Xenopus laevis*. Studies in fish, birds and mammals have demonstrated precise spatiotemporal sequence of expression of various genes contributing to the acquisition of a zonal competence for the formation of the thalamic region (preparttning), the appearance of a secondary organizer (Zli) and the subsequent early regionalization (patterning). Our goal is focused on testing the degree of similarity or difference in the formation of the thalamus in our amphibian model, to evaluate the evolutionary conservation of fundamental processes during the development of this important diencephalic region. We evaluated in detail 22 different markers, using immunohistochemistry and in situ hybridization techniques combined, analyzing their expression patterns during embryonic development of *Xenopus*. (Chapter 4).

## Results

In Chapter 2, the analysis of the spatiotemporal pattern of Pax7 expression in the CNS of *Xenopus laevis* demonstrated that the rostralmost expression was located in the basal plate of p3, and more caudally along the roof and alar plate of p1 and mesencephalon, and caudally in the r1 alar plate. As development proceeds, Pax7 positive cells were observed in the hypothalamus, close to the catecholaminergic cell populations of the mammillary region. In the diencephalon Pax7 is expressed intensely in the basal plate of p3, within the roof plate of p2 and in isolated cells within the thalamus. In p1, it is expressed in the roof plate and intensely in the commissural and juxtacommissural domains. Caudally Pax7 cells were abundantly detected in the optic tectum and much lesser cells were seen in the torus semicircularis. In the rhombencephalon Pax7 was observed ventricularly in the alar plate of r1 and the ventricular zone of the cerebellum. Later, these cells were progressively observed ventrally in the interpeduncular nucleus and isthmus regions (r0). Additionally, Pax7 cells of the vz occupied the ventral portion in alar plate along the rhombencephalic segments and the spinal cord.

Chapter 3: Numerous Pax6 and Pax7 positive cell populations were found in the adult CNS of *Xenopus laevis*, with distinct patterns that showed some overlapping in the diencephalic alar plate in p1 and basal plate in p3. Pax6 cells were detected in telencephalic areas in the olfactory bulb, septum, striatum and amygdaloid complex. Both Pax6 and Pax7 were found in diencephalic portions. Pax6 was intense in the alar p3 and pax7 basally, whereas both were intense in the pretectal region (p1) and the roof of p2. Distinctly Pax6 marked a band along the p1 tegmentum that continued caudally in the mesencephalon, where Pax7 is expressed along the ventricular zone and all layers of the optic tectum. Caudally, Pax6 is expressed in the cerebellar granule cells and Pax7 in the ventricular zone. In the rhombencephalon, Pax7 was found in numerous cells in r1, in the vz and in numerous migrated cells of the griseum centrale and interpeduncular nucleus, as well as in the vz of the caudal segments. Some Pax6 cells were observed along the reticular nuclei and the octavolateral area. Throughout the spinal cord Pax7 and Pax6 cells were expressed dorsally and ventrally, respectively, in the area surrounding the ventricle.

Chapter 4: The genoarchitectonic study of the early developing diencephalon in *Xenopus* revealed the external prosomeric boundaries of the thalamus with the neighboring pretectal, habenular and prethalamic regions. Moreover it also unraveled the early prepatterning of the thalamic primordium based on the expression of Fez and Dll rostrally and Wnt3a, Pax6 and Xiro1 in the caudal thalamo-pretectal primordium. The dynamic Shh expression showed the shape and progression of the Zli in *Xenopus* and the high conservation compared to other vertebrates. In the same way, internal interprosomeric subdivisions were evidenced based on the conserved expression of Nkx2.2 and GABA in the rostral GABAergic thalamic progenitor domain (r-Th) and Gbx2 /Ngn2/ VGlut (among others) within the caudal glutamatergic progenitor domain. The caudal domain was also subdivided mostly based on the expression of Dbx1 in a c-Th1 (Dbx1+) and a c-Th2 (Dbx1-) subdomains.

## Conclusions

- 1- The immunohistochemical detection of the Pax6 and Pax7 transcription factors has been confirmed as a useful method for studying the CNS of *Xenopus laevis*, due to its high resolution and sensitivity. Its use, in combination with other markers, is a suitable strategy to identify specific neuronal groups and brain regions that can not be analyzed on the basis of cytoarchitecture alone, in the case of amphibians.
- 2- The expression of the Pax factors analyzed, detected in restricted regions of the ventricular zone in early development and latter in migrated cells of the mantle, suggest possible roles in early specification of histogenetic domains and, subsequently, in cell differentiation and formation of specific CNS regions.

- 3- For the case of Pax7, its expression from early developmental stages defines and respects the anatomical boundaries proposed by the prosomeric paradigm, highlighting the segmental organization of the brain in *Xenopus*. The spatiotemporal sequence of Pax7 expression, analyzed in combination with other markers, suggests possible tangential migration routes, in some cases going beyond the neuromeric limits.
- 4- In *Xenopus*, Pax7 and Pax6 expression is maintained in many neuronal populations in the adult brain, showing a common basic distribution pattern with urodeles. The expression in adults was related to the capacity of regeneration present in urodeles, but our results show that it is a characteristic shared by different amphibians, although anurans lose the capacity of regeneration after metamorphosis.
- 5- During the early development of *Xenopus*, Fez and Dll4 expression patterns, define a rostral diencephalic region, while Tcf4, Wnt3 Xiro1, establish a caudal region. The abutting zone of the two regions specifies the area where later Shh is expressed in the Zli, which matches the rostral boundary of the thalamus (p3 / p2 limit).
- 6- After the early specification (prepatternning), Gbx2 and Xiro1 expressions, define the p2/p1 boundary and the specification of the Gbx2+ / Xiro1- thalamic territory, as well as, the distinction of the Gbx2- / Xiro1+ / Pax6+ habenular region. Subsequently, in the thalamus rostral (r-Th) and caudal (c-Th) histogenetic domains appear, specifically defined by a combination of genes likely activated in response to Shh induction through a concentration gradient.
- 7- The markers used allow proposing that the cells derived from the small progenitor domain r-Th differentiate into GABAergic neurons, whereas the larger c-Th domain gives rise to the numerous glutamatergic neurons of the thalamus in *Xenopus*.
- 8- The unique combination gene expressions found in the prospective thalamic region of *Xenopus laevis* and its histogenetic derivatives is highly conserved in amniote vertebrates, confirming a common pattern in tetrapods. Recent data reported in zebrafish suggest that the thalamic specification might be, in general terms, conserved in all vertebrates, reflecting the importance of this diencephalic region from early moments of evolution.