

# Estructura Nuclear y Quiescencia en Células Madre Neurales

Arantxa Cebrián Silla

Estructura Nuclear y Quiescencia en Células Madre Neurales

Arantxa Cebrián Silla  
Tesis Doctoral

2017



2017



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA  
Programa de Doctorado en Neurociencias

Tesis Doctoral

Dirigida por el Dr. José Manuel García Verdugo  
y la Dra. Clara Alfaro Cervelló

Valencia, 2017

# UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Neurociencias

Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Biologia Cel·lular, Biologia Funcional  
i Antropologia Física



## “Estructura nuclear y quiescencia en células madre neurales”

Tesis doctoral presentada por D<sup>a</sup> Arantxa Cebrián Silla y dirigida por el Dr. D. José Manuel García Verdugo, Catedrático de la Universitat de València y la Dr. D<sup>a</sup> Clara Alfaro Cervelló

Valencia, Marzo 2017





José Manuel García Verdugo, Catedrático del Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València.

#### CERTIFICO

Que D<sup>a</sup>. Arantxa Cebrián Silla ha realizado en el Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universitat de València, bajo mi dirección, el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada Estructura nuclear y quiescencia en células madre neurales.

Revisado el trabajo, autorizo su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Valencia,

Firmado: José Manuel García Verdugo



Clara Alfaro Cervelló, Dra. en Neurociencias,

## CERTIFICO

Que D<sup>a</sup>. Arantxa Cebrián Silla ha realizado en el Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universitat de València, bajo mi dirección, el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada Estructura nuclear y quiescencia en células madre neurales.

Revisado el trabajo, autorizo su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Valencia,

Firmado: Clara Alfaro Cervelló



Yo, Arantxa Cebrián Silla, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación y que lo he realizado en el Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles, bajo la dirección del Dr. D. José Manuel García Verdugo, Catedrático de Biología Celular de la Universitat de València, y la Dra. D<sup>a</sup>. Alfaro Cervelló.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Valencia,





El presente trabajo ha sido financiado por la ayuda para Formación de Profesorado Universitario (FPU) AP-2010-4264 del Ministerio de Ciencia e Innovación y por el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).



# Agradecimientos

Me gustaría comenzar mis agradecimientos con la persona que siendo una estudiante de segundo me ofreció la oportunidad que andaba buscando, participar en un laboratorio de Neurociencias. A ti Verdugo, gracias por abrirme la puerta de lo que el Dr. Ramón y Cajal llamaba “el infinito mundo de lo pequeño”, gracias por emocionarme con la ciencia (desde el primer día de clase hasta hoy casi 11 años después), gracias por tu paciencia, por tu confianza, por enseñarme a “ver en lugar de mirar” y por todos esos momentos en el electrónico. Espero que podamos seguir discutiendo sobre ciencia y astrocitos toda la vida.

Clara, mi “madre de laboratorio” que te voy a decir...tengo mucho que agradecerte. Me acogiste como estudiante y confiaste en mi potencial aun cuando era una estudiante un poco insegura y nerviosa. Me enseñaste algunas de las cosas más importantes en la carrera científica, el rigor, la importancia del trabajo bien hecho y el esfuerzo. Y a día de hoy me sigues enseñando. No puedo sentirme más afortunada de haberte conocido y de que confiases en mí. Gracias.

Ahora tocáis vosotros chicos! no puedo llamaros sólo compañeros porque para mi sois muchísimo mas, sois como mi familia. Hay mil cosas maravillosas que tengo que agradecer de cada uno de vosotros, pero para no alargarme mucho quería deciros: Susana, Patri, Vicente, Paula, María, Irene, Mario y Vivian, MIL GRACIAS por estar en los momentos alegres, y en los tristes, en los estresantes y desestresantes (jijiji), por vuestra inteligencia y sabiduría, por vuestra paciencia, y por vuestros consejos, por la complicidad, por querer a un astrocito,...pero sobretodo por hacerme cada día más feliz y mejor persona. Sin vosotros no sería la persona ni la científica que soy a día de hoy. Gracias por formar parte de mi vida.

A todos aquellos que han pasado por el lab, a Salo y en especial a Noemi. Y a aquellos a los que he visitado yo y me han abierto las puertas de su laboratorio. A todos los miembros del laboratorio del Dr. Arturo Alvarez-Buylla, Dr. Kazunobu Sawamoto y Dr. Daniel Lim gracias por su ayuda y consejo. Y a las nuevas generaciones, Mariana, Mari, Maria José y Chiara. Gracias por aportar chispa e ilusión a nuestros días (No la perdáis nunca).

Finalmente quiero dar las gracias a mi familia, y amigos: a los carxofes y mis amigos de la carrera y máster. Siempre habéis confiado ciegamente en mí, en mi capacidad de hacer lo que quisiera, en que podía llegar a este momento. Gracias.

Y a ti Adri gracias por cada día, gracias por respetar mi ilusión en la ciencia, por apoyarme aunque llegue muy tarde a casa, por entender mis domingos en el lab y simplemente gracias por ser mi compañero durante este camino.

***“Mientras el cerebro sea un misterio, el universo continuará siendo un misterio”***

*-Santiago Ramón y Cajal-*



# Índice

Índice.....	xv
Índice de figuras .....	xvii
Índice de tablas .....	xix
Abreviaturas .....	xxi
Resumen .....	xxiii
Summary.....	xxv
<b>1 Introducción .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Neurogénesis Adulta .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Principales regiones neurogénicas en mamíferos adultos.....	3
1.1.2 Modelos <i>in vitro</i> para el estudio de la neurogénesis adulta .....	10
1.1.3 Origen de las células madre neurales adultas de la ZSV-V.....	12
1.1.4 Generación de las células B1 .....	14
1.1.5 ¿Las células B1 constituyen una población uniforme? .....	15
1.1.6 Neurogénesis adulta en la ZSV-V de primates .....	18
<b>1.2 Células madre neurales: El núcleo.....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Epigenética y neurogénesis .....	22
1.2.2 Posicionamiento de la cromatina y envoltura nuclear .....	24
1.2.3 Las células B presentan una envoltura nuclear característica .....	26
<b>2 Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Hipótesis .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Objetivos.....</b>	<b>33</b>
<b>3 Material y métodos.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Animales .....</b>	<b>37</b>
3.1.1 Ratones .....	37
3.1.2 Primates no-humanos .....	38
3.1.3 Muestras humanas.....	38
<b>3.2 Diseño experimental .....</b>	<b>38</b>
3.2.1 Inyección de <sup>3</sup> H-Timidina .....	38
<b>3.3 Bombas Ara-C .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4 Microscopía electrónica de transmisión (MET).....</b>	<b>39</b>
3.4.1 Autorradiografía .....	40
3.4.2 Reconstrucciones tridimensionales.....	40
<b>3.5 Inmunohistoquímica .....</b>	<b>41</b>
3.5.1 Inmunofluorescencia .....	41
3.5.2 Inmunohistoquímica “pre-inclusión” .....	41
3.5.3 Inmunohistoquímica “post-inclusión” .....	42
<b>3.6 Cultivos celulares .....</b>	<b>44</b>
3.6.1 Cultivos adherentes en monocapa.....	44
3.6.2 Cultivos de neuroesferas .....	44
<b>3.7 Electroporación postnatal.....</b>	<b>46</b>
<b>3.8 Time-lapse .....</b>	<b>47</b>
<b>4 Resultados.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Un subconjunto de células tipo B presentan ELCS nucleares.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2 Células B durmientes presentan ELCS nucleares.....</b>	<b>54</b>
<b>4.3 Las ELCS nucleares no se preservan <i>in vitro</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4 Origen embrionario de las ELCS nucleares .....</b>	<b>58</b>
<b>4.5 La formación de las ELCS forma parte de un proceso dinámico.....</b>	<b>61</b>



4.6	ELCS, un compartimento nuclear en células madre neurales .....	65
4.7	ELCS nucleares en astrocitos de la ZSG.....	67
4.8	La población de células B con ELCS está preservada evolutivamente. ....	69
5	Discusión.....	73
5.1	ELCS nucleares en la ZSV-V.....	73
5.2	Una subpoblación de células B presenta ELCS .....	74
5.3	Las ELCS nucleares en células B, un rasgo de quiescencia .....	75
5.4	Las células tipo B no presentan ELCS <i>in vitro</i> .....	76
5.5	Origen embrionario de las ELCS nucleares en la ZSV-V .....	77
5.6	Pérdida de células B con ELCS con la edad .....	78
5.7	Composición molecular de las ELCS .....	78
5.8	A los telómeros les gustan las ELCS.....	80
5.9	ELCS en la otra región neurogénica, la ZSG.....	81
5.10	Las ELCS se conservan en la ZSV-V evolutivamente .....	81
6	Conclusiones .....	85
7	Bibliografía .....	89

# Índice de figuras

## Introducción

Figura 1. Organización y tipos celulares de la ZSV-V.....	4
Figura 2. Organización esquemática de los <i>pinwheels</i> de la ZSV-V.....	6
Figura 3. Organización y tipos celulares de la ZSG del giro dentado del hipocampo.....	9
Figura 4. Organización del neuroepitelio.....	12
Figura 5. Naturaleza glial de las células madre neurales embrionarias y adultas.....	13
Figure 6. Propiedades <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de las células madre de la ZSV-V.....	16
Figura 7. Heterogeneidad de las células madre neurales de la ZSV-V.....	17
Figura 8. Origen embrionario de las células B1 postnatales.....	18
Figura 9. Regiones neurogénicas y organización de la ZSV-V en roedores, primates no-humanos y humanos.....	21
Figura 10. Principales mecanismos epigenéticos.....	23
Figura 11. Organización y clasificación de las ELCS.....	27

## Material y métodos

Figura 12. Protocolos inyección timidina.....	39
Figura 13. Ensayos <i>in vitro</i> utilizados para el estudio de las ELCS nucleares en células madre de la ZSV-V.....	45
Figura 14. Inyección estereotáxica y electroporación.....	46

## Resultados

Figura 15. Las células B de la ZSV-V muestran ELCS.....	52
Figura 16. Expresión de marcadores moleculares en las células B con ELCS.....	52
Figura 17. Las células B1 localizadas en el centro del <i>pinwheel</i> presentan ELCS.....	53
Figura 19. Las células activadas presentan marcaje con <sup>3</sup> H-timidina.....	55
Figura 20. Las células B con ELCS sobreviven al tratamiento con Ara-C.....	56
Figura 21. Las células madre de la ZSV-V cultivadas <i>in vitro</i> no presentan ELCS.....	57
Figura 22. Células con ELCS a lo largo del desarrollo y la vida adulta.....	58
Figura 23. Las células quiescentes formadas en E14.5 presentan ELCS.....	59
Figura 24. Expresión de p57 en células con ELCS.....	60
Figura 25. Anillos de envoltura nuclear.....	61
Figura 26. Link entre los anillos de envoltura nuclear y las ELCS en la glía radial.....	62
Figura 27. Marcadores moleculares presentes en los anillos de envoltura nuclear de la glía radial en E18.5.....	63
Figura 28. Las células de glía radial transfectadas con el plásmido Td-tomato-Lamin B1 presentan ELCS.....	64
Figura 29. Time-lapse del núcleo de una célula de glía radial postnatal electroporada.....	64
Figura 30. Expresión de marcadores epigenéticos en las ELCS.....	65
Figura 31. Expresión preferencial de TRF2 en las ELCS y zonas próximas.....	66
Figura 32. Ultraestructura de los astrocitos de la ZSG.....	67
Figura 33. ELCS nucleares en los astrocitos radiales de la ZSG del giro dentado del hipocampo.....	68
Figura 34. La glía de la ZSV-V de los primates no humanos y humanos presenta ELCS nucleares.....	70

## Discusión

Figura 35. Modelo de invaginación de las ELCS.....	77
--	----



## Índice de tablas

Tabla 1. Características ultraestructurales de las células que componen la ZSV-V. ....	5
Tabla 2. ELCS en tejidos normales. ....	28
Tabla 3. ELCS en tejidos patológicos. ....	29
Tabla 4. Edad y procedimiento de fijación de los ratones utilizados para los diferentes estudios. ....	37
Tabla 5. Listado de anticuerpos primarios. ....	43



## Abreviaturas

<b>Ara-C</b>	Arabinosido de citosina
<b>BrdU</b>	Bromodesoxiuridina
<b>BLBP</b>	Proteína de unión a lípidos
<b>CDK</b>	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas
<b>DCX</b>	Doblecortina
<b>DNMT</b>	Metiltransferasa de ADN
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidermal
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>ELCS</b>	Laminas de cromatina limitadas por envoltura nuclear ( <i>envelope-limited chromatin sheets</i> )
<b>FACS</b>	Separación de células por activación de fluorescencia
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico
<b>GLAST</b>	Transportador de glutamato de astrocitos
<b>GFAP</b>	Proteína gliofibrilar ácida
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>LAP2</b>	Polipéptido 2 asociado a lámina
<b>LBR</b>	Receptor de la lámina B
<b>MET</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>RC2</b>	Marcador glía radial 2
<b>Shh</b>	Sonic hedgehog
<b>TRF2</b>	Factor de unión a repeticiones teloméricas
<b>ZSG</b>	Zona subgranular
<b>ZSV-V</b>	Zona subventricular-Ventricular
<b>ZV</b>	Zona ventricular
<b>5-mC</b>	5-metilcitosina
<b><sup>3</sup>H-Timidina</b>	Timidina tritiada



## Resumen

La zona subventricular-ventricular (ZSV-V) es un extenso nicho neurogénico que contiene células madre neurales (astrocitos B) en las paredes de los ventrículos laterales del cerebro adulto de mamíferos. Las células del subtipo B1 han sido identificadas clásicamente como las verdaderas células madre, tienen un origen embrionario y se mantienen quiescentes hasta que se reactivan post-natalmente. En el presente estudio, mostramos que una subpoblación de células B de la ZSV-V presenta una estructura nuclear denominada “lámina de cromatina de la envoltura nuclear” (ELCS, del inglés *envelope-limited chromatin sheets*), previamente descrita en células normales y cancerosas. Esta estructura se caracteriza por presentar una lámina de heterocromatina de 30 nm limitada en ambos lados por las membranas nucleares interna y externa. A través de marcadores moleculares, estudios de proliferación con <sup>3</sup>H-Timidina y la administración de la droga antimitótica Ara-C, encontramos que las células B1 con ELCS corresponden a células madre neurales quiescentes GFAP+, BLBP+, GLAST+, Nestina- y EGFR-. Además, los estudios de microscopía electrónica revelaron que las ELCS empiezan a formarse en las células de glía radial en los estadios embrionarios y se mantienen presentes durante las etapas postnatales tempranas en una subpoblación de células tipo B que disminuye drásticamente con la edad. Adicionalmente, las ELCS representan un compartimento nuclear que contiene modificaciones epigenéticas específicas y telómeros. Estas estructuras también se encuentran presentes en la zona subgranular del giro dentado de roedores y en la ZSV-V de primates no humanos y humanos. Estos resultados muestran que las células madre neurales quiescentes presentan un compartimento muy bien definido estructuralmente y molecularmente en su núcleo, característica que contribuirá a identificar estos progenitores primarios y estudiar como funciona su regulación génica





## Summary

The ventricular-subventricular zone (V-SVZ) is an extensive germinal niche containing neural stem cells (B1 astrocytes) in the walls of the lateral ventricles of the adult brain. B1 cells have an embryonic origin and remain largely quiescent until they become reactivated postnatally. In this study, we show that a subset of adult V-SVZ B1 cells has nuclear envelope limited chromatin sheets or ELCS, previously described in other normal and cancer cells. Using molecular markers, <sup>3</sup>H-thymidine birthdating and the antimetabolic drug Ara-C, we found that type B1 cells with ELCS correspond to GFAP+, BLBP+, GLAST+, Nestin- and EGFR- quiescent neural stem cells. TEM reveals that nuclear ELCS begin forming in the embryo radial glia cells and remain during early postnatal stages in a subpopulation of type B cells that drastically decreases with age. Additionally, ELCS represent a specific nuclear compartment that contains specific epigenetic modifications and telomeres. Notably, we found that ELCS are a preserved nuclear structure in the subgranular zone of the rodent dentate gyrus and in the ZSV-V of non-human and human primate neural stem cells. These results reveal that quiescent neural stem cells have a unique structurally and molecularly defined compartment in their nuclei, a feature that may help to identify these primary progenitors and study their gene regulation.



# Introducción



# 1 Introducción

## 1.1 Neurogénesis Adulta

El proceso de crecimiento y desarrollo de los tejidos está orquestado por células madre que contribuyen al posterior mantenimiento y reparación de los tejidos en el organismo adulto. Estas células madre neurales se caracterizan por presentar la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en distintos tipos celulares tales como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Llorens-Bobadilla y Martín-Villalba, 2016). Durante mucho tiempo, el cerebro fue una excepción, ya que se pensaba que las células madre neurales tan solo estaban presentes durante los estadios embrionarios, y como mucho, en etapas tempranas post-natales. Sin embargo, estudios realizados en la década de los 60 comenzaron a cambiar esta noción. El Dr. Joseph Altman y sus colaboradores sugirieron por primera vez que algunas regiones del cerebro de mamíferos adultos podían producir nuevas neuronas (Altman, 1962). Estudios posteriores en aves cantoras (Alvarez-Buylla et al., 1990), así como estudios de aislamiento de células madre *in vitro* (Reynolds y Weiss, 1992), apoyaron la existencia del fenómeno de neurogénesis adulta. Posteriormente este fenómeno también fue mostrado en reptiles (García-Verdugo et al., 2002), anfibios (Kaslin et al., 2008) y peces (Zupanc, 2002). El descubrimiento de la neurogénesis adulta ha planteado nuevas cuestiones acerca de la identidad de los precursores neuronales primarios, la regulación de la producción de nuevas neuronas y la función del reemplazamiento neuronal. Elucidar las características de los progenitores neurales puede ser de gran ayuda para su uso en tratamientos de lesiones cerebrales y desórdenes neurológicos.

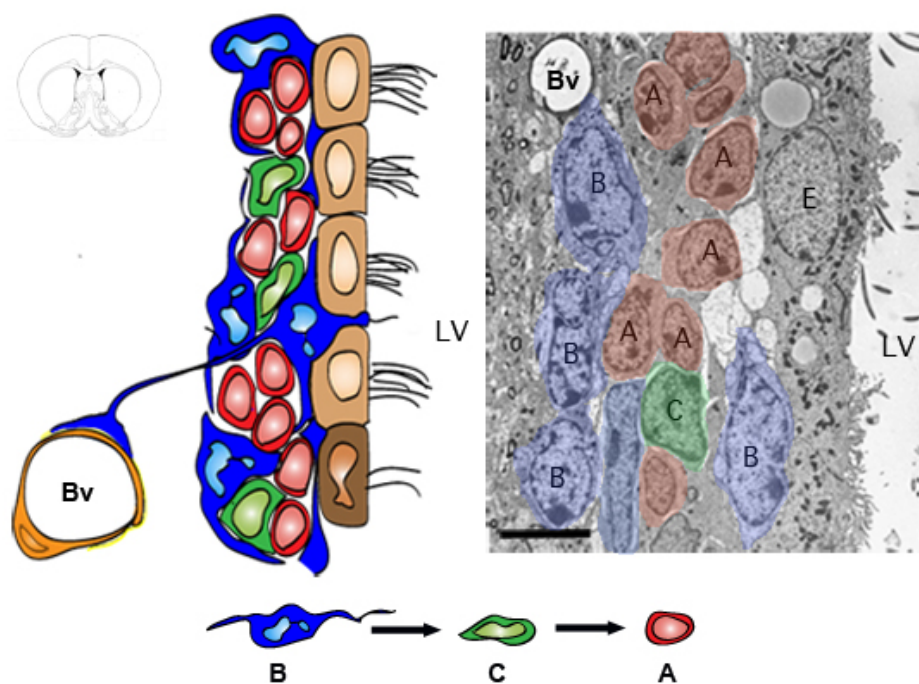
### 1.1.1 Principales regiones neurogénicas en mamíferos adultos

En el cerebro embrionario y adulto, las células madre neurales representan un tipo especializado de célula glial que se localiza en los denominados nichos neurogénicos. En el cerebro adulto, a diferencia del embrionario, donde la potencialidad y localización de los precursores neurales cambia continuamente con el desarrollo, estos nichos neurogénicos se encuentran muy bien definidos. Las dos principales regiones neurogénicas ampliamente aceptadas en el cerebro postnatal son la zona subventricular-ventricular (ZSV-V) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo.

### 1.1.1.1 Zona Subventricular-Ventricular

Dado que el nicho germinal periventricular, previamente denominado zona subventricular, también incluye un compartimento reminiscente de la zona ventricular del embrión, que contacta directamente con el ventrículo, nos referiremos a este nicho como ZSV-Ventricular (ZSV-V) (Ihrie y Alvarez-Buylla, 2011). La ZSV-V adulta se encuentra localizada en las paredes de los ventrículos laterales, donde las células madre neurales, así como otros tipos celulares que explicaremos a continuación, contribuyen al control y regulación del nicho.

La ZSV-V está constituida por las células madre neurales (células tipo B) y células de amplificación transitoria (células tipo C), que dan lugar a los neuroblastos (células tipo A) que migran largas distancias hasta alcanzar el bulbo olfatorio (BO) (Doetsch et al., 1997). Además, revistiendo las paredes ventriculares en contacto con el líquido cefalorraquídeo encontramos a las células ependimarias (células tipo E) no proliferativas (Figura 1). La caracterización ultraestructural detallada de los tipos celulares se resume en la tabla 1.



**Figura 1. Organización y tipos celulares de la ZSV-V.** Esquema de una sección coronal de los ventrículos laterales mostrando la organización de la ZSV-V. Las células ependimarias (marrón) tapizan la superficie ventricular. Las células B1 contactan con la luz ventricular, mientras que las células B2 han perdido el contacto y se localizan más próximas al estriado (ambas en azul). Las células B envuelven las cadenas de neuroblastos migradores o células A (rojo) y los progenitores intermedios o células C (verde). Bv, vaso sanguíneo; LV, ventrículo lateral.

	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
<b>Contacto luz ventricular</b>	Sí	No	No	No	Sí	Sí
<b>Cilios</b>	Cilio primario corto (9+0) y centriolo (Hacia la luz ventricular)	Cilio primario (9+0) y centriolo (Hacia el parénquima)	Pareja de centriolos	Cilio único	20-30 cilios móviles (9+2)	2 cilios móviles (9+2) Corpúsculos basales electrodensos
<b>Contorno</b>	Irregular	Irregular	Liso	Liso	Interdigitado	Muy interdigitado
<b>Citoplasma</b>	Claro	Claro	Oscuro	Oscuro	Claro	Claro
<b>Ribosomas libres</b>	+	++	+++	++++	++	++
<b>Filamentos intermedios</b>	Sí (aumentan con el envejecimiento)	Sí (aumentan con el envejecimiento)	No	No	Sí (aumentan con el envejecimiento)	Sí
<b>Microtúbulos</b>	+	+	++	++++	+	+
<b>Mitocondrias</b>	++	++	++++	+++	+++	+++
<b>Golgi</b>	Grande (asociado al cilio)	Pequeño (asociado al cilio)	Pequeño	Grande	Pequeño	Varios pequeños
<b>RER</b>	++	++	+++	+	+	+
<b>Gotas lipídicas</b>	No	No	No	No	Sí	Sí
<b>Cuerpos densos</b>	Sí (aumentan con el envejecimiento)	Sí (aumentan con el envejecimiento)	No	No	Sí (aumentan con el envejecimiento)	Sí
<b>Núcleo</b>	Irregular, Frecuentemente invaginado	Irregular, Frecuentemente invaginado	Grande, esférico y ocasionalmente con invaginaciones	Fusiforme	Esférico	Esférico
<b>Cromatina</b>	Laxa con grumos de heterocromatina asociados a la lámina nuclear	Laxa con grumos de heterocromatina asociados a la lámina nuclear	En grumos. Nucleolo reticulado.	Nucleoplasma oscuro. 2-4 nucleolos	Nucleoplasma claro. 1-2 nucleolos	Nucleoplasma claro. 1-2 nucleolos

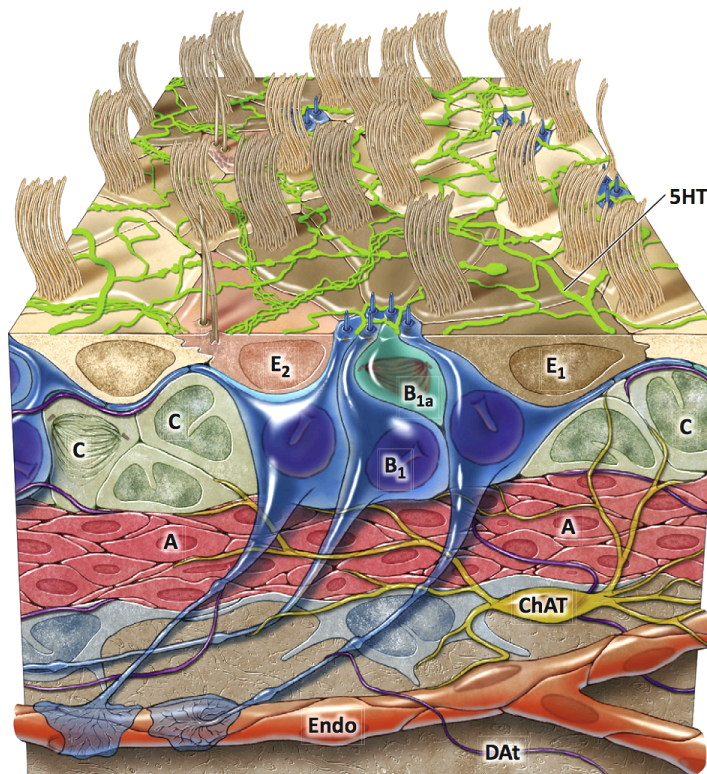
Tabla 1. Características ultraestructurales de las células que componen la ZSV-V.

Las células B presentan características astrogliales y han sido subdivididas en dos poblaciones (células tipo B1 y B2) teniendo en cuenta sus diferencias en localización y morfología (Doetsch et al., 1997). Las células tipo B1 son células con morfología radial que presentan propiedades reminiscentes de la glía radial, extendiendo su proceso apical hacia la cavidad ventricular y presentando un largo proceso basal que finaliza en la red vascular presente en la ZSV-V (Doetsch et al., 1997; Mirzadeh et al., 2008). En una visión *en face* de las paredes ventriculares de roedores, los pequeños contactos apicales de las células B1 se encuentran rodeados por una roseta de células E, dando lugar a una organización en molinillo o *pinwheel* (Mirzadeh et al., 2008) (Figura 2). El proceso apical de las células B1 contiene un cilio primario inmóvil con estructura 9+0 (nueve dobletes de microtúbulos sin doblete central) (Doetsch et al., 2002). Este cilio primario tiene función mecano-sensorial, funcionando como una antena para las rutas de señalización específicas activadas por factores solubles presentes en el líquido cefalorraquídeo (Lehtinen et al., 2011). Algunos de los factores y morfógenos más importantes en la regulación del comportamiento de las células B1 son el factor de crecimiento insulínico 2 (IGF2), el factor de crecimiento transformante (TGF- $\alpha$ ), las efrinas, la proteína morfogénica del hueso (BMP), Wnts,



## Introducción

Sonic hedgehog (Shh) y el ácido retinoico (Alvarez-Buylla y Ihrie, 2014; Eggenschwiler y Anderson, 2007; Fuentealba et al., 2012; Lehtinen et al., 2011; Tong y Alvarez-Buylla, 2014). A diferencia de las células B1, las B2 no contactan con la cavidad ventricular y presentan una morfología estrellada. Sin embargo, ambas poblaciones expresan la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) y tienen capacidad proliferativa (Doetsch et al., 1997; Ponti et al., 2013). Hasta el momento, tan solo las células B1 han sido caracterizadas como las auténticas células madre habiéndose demostrado su capacidad neurogénica.



**Figura 2. Organización esquemática de los pinwheels de la ZSV-V.** Las células B1 (azul oscuro) dan lugar a células B1 activadas (B1a, azul claro) que se dividen activamente. Las B1 activadas generan células C (verde) que tras 3 rondas de división dan lugar a células tipo A (rojo). Cabe destacar que las células B1 presentan una expansión apical con la que contactan con el líquido cefalorraquídeo. Además esta zona ventricular está compuesta por células endimarias multiciliadas (E1) (marrón) y biciliadas (E2) (rosa) que junto a las expansiones apicales de las células B1 forman los pinwheels. Adherida a la superficie ventricular también encontramos una extensa red de axones serotoninérgicos (5-HT, verde). Las células B1 contactan basalmente con los vasos sanguíneos. En la ZSV también se observan expansiones de neuronas positivas para colina acetiltransferasa (ChAT) (amarillo). (Lim y Alvarez-Buylla, 2014).

Las células B1 de la ZSV-V producen un gran número de nuevas neuronas destinadas al bulbo olfatorio a través de la generación de células tipo C. Las células tipo C se dividen entre 3 y 4 veces (Ponti et al., 2013) antes de dar lugar a las nuevas neuronas migradoras o células A (Doetsch et al., 1997). Estas células migran largas distancias desde la ZSV-V a través de una red glial de rutas interconectadas que

convergen en la región anterior de los ventrículos laterales, formando el camino migrador rostral, hasta alcanzar el bulbo olfatorio (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996). Allí se diferencian en hasta 10 tipos de interneuronas granulares y periglomerulares integrándose en los circuitos existentes (Merkle et al., 2007). Curiosamente, cada subtipo de estas nuevas neuronas juega un papel diferente en la circuitería del bulbo olfatorio (Lepousez et al., 2013).

Como hemos comentado, la ZSV-V es un “nicho” con un microambiente muy definido por las interacciones entre los distintos tipos celulares y los factores reguladores. Entre estas interacciones cabe destacar el papel de las células endimarias y endoteliales. Las células endimarias constituyen una importante población dentro de este nicho. Tapizan las paredes de los ventrículos laterales y mueven el líquido cefalorraquídeo formando gradientes de concentración de factores que determinan la direccionalidad de migración de los neuroblastos (Sawamoto et al., 2006; Spassky, 2005). Estas células pueden clasificarse en dos tipos teniendo en cuenta el número cilios: las células endimarias multiciliadas (E1) y las biciliadas (E2). Ambos tipos celulares forman parte de los *pinwheels*, sin embargo todavía se desconoce la función específica de las E2 (Mirzadeh et al., 2008) (Figura 2). Además, en contacto con la superficie de las células endimarias, se han encontrado axones serotoninérgicos supraendimarios que forman una extensa red y regulan la tasa proliferativa y neurogénica de las células B1 (Tong et al., 2014a; 2014b). Por otro lado, el extenso plexo vascular presente en la ZSV-V también representa una importante fuente de señales extrínsecas para la regulación de las células B1 (Tavazoie et al., 2008). Algunos de estos factores son secretados directamente por las células epiteliales que componen los vasos sanguíneos. En concreto la betacelulina, factor de crecimiento semejante al factor de crecimiento epidérmico (EGF), cumple un papel fundamental en la proliferación y producción de neuroblastos (Gómez-Gavira et al., 2012). Los tipos celulares que complementan el nicho neurogénico son la microglía y oligodendrocitos.

Aunque las células madre neurales de la ZSV-V generan nuevas neuronas de forma continua durante la vida adulta, defectos en la capacidad proliferativa contribuyen a una drástica reducción de la producción de nuevas neuronas durante el envejecimiento (Capilla-Gonzalez et al., 2014; Luo et al., 2006). El pool de células B1 se mantiene estable hasta los 12 meses de edad, pero disminuye progresivamente con el envejecimiento (Bouab et al., 2011; Shook et al., 2012). Además, la reducción de la capacidad proliferativa se relaciona con una disminución de la población de células tipo C y A, observándose una reducción del camino migrador rostral, mientras que la

generación de células oligodendrogiales no se encuentra comprometida (Bergmann et al., 2012; Capilla-Gonzalez et al., 2013).

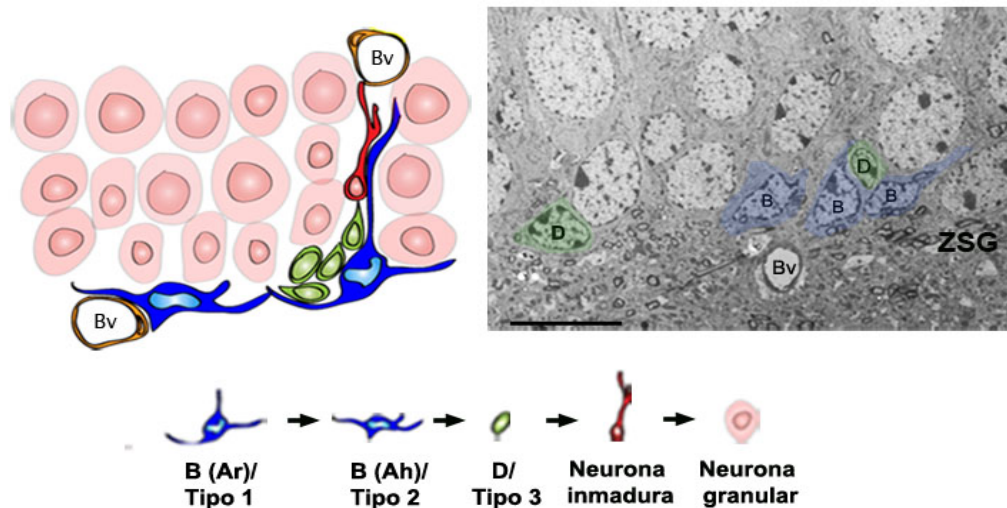
### *1.1.1.2 Zona Subgranular del giro dentado del hipocampo*

La ZSG es una región localizada en la interfase entre el hilus y el giro dentado del hipocampo. Sin embargo, a diferencia de la ZSV-V, se trata de un nicho separado de las paredes ventriculares. Esta región neurogénica continuamente genera nuevas neuronas durante la edad adulta, las cuales se diferencian en neuronas granulares y sobre las que se ha sugerido que contribuyen a los procesos de aprendizaje y memoria (Gonçalves et al., 2016; Kempermann, 2004).

Al igual que la ZSV-V, las células madre neurales de la ZSG han sido identificadas como células de tipo astrogliar (Seri et al., 2001). En esta región estas células han recibido diversos nombres: astrocitos radiales (Seri et al., 2004), progenitores tipo 1 (Filippov et al., 2003) o células de tipo glía radial. Estas células poseen un largo proceso radial que atraviesa la capa granular y presentan finas expansiones laterales a lo largo de la ZSG (Kempermann, 2004; Seri et al., 2001; 2004). Además, esta glía radial presenta pies chupadores sobre los vasos de la ZSG (Filippov et al., 2003), cuyas células endoteliales secretan factores reguladores de la neurogénesis adulta como el factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF) (Licht et al., 2011), el factor de crecimiento de la insulina 1 (IGF1) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Trejo et al., 2007). Las células del tipo glía radial se caracterizan por expresar nestina, GFAP, la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP), Sox2 y presentar un cilio primario, esencial para las vías de señalización relacionadas de Shh, relacionadas con la proliferación en el giro dentado (Han et al., 2008).

Los astrocitos radiales dan lugar a células progenitoras, intermediarios proliferativos o células tipo 2, que presentan características de células de amplificación y que muestran una morfología horizontal (Kempermann et al., 2004; Seri et al., 2001; 2004). Estos progenitores intermediarios se generan por divisiones asimétricas de los astrocitos radiales en el plano mitótico horizontal paralelo a la ZSG (Encinas et al., 2011; Seri et al., 2004). Una subpoblación de células tipo 2 mantiene la expresión de marcadores gliales (células tipo 2a), mientras que la otra comienza a expresar factores relacionados con la determinación neuronal como Prox1, NeuroD y doblecortina (DCX) (Kempermann et al., 2004; Seri et al., 2001; 2004; Steiner et al., 2006). Por lo tanto, las

células tipo 2 marcan la transición entre el fenotipo glial y las características de un linaje neuronal. Las células tipo 2 dan lugar a células tipo 3 o D que se diferenciarán en neuronas inmaduras que migran cortas distancias hasta la capa granular (Figura 3). Una vez en esta capa, las neuronas inmaduras extienden sus proyecciones axonales hacia las rutas de fibras musgosas de la capa piramidal de la CA3 y sus dendritas en dirección opuesta hacia la capa molecular (Ming and Song, 2011).



**Figura 3. Organización y tipos celulares de la ZSG del giro dentado del hipocampo.** Las células de glía radial o tipo 1 extienden su expansión radial hacia la capa granular, mientras que las células tipo 2 extienden expansiones laterales (ambas en azul). Las células tipo 3 o D forman grupos y se localizan preferencialmente en la ZSG (verde). Las neuronas inmaduras comienzan a extender sus dendritas hacia la capa granular (rojo). Bv, vaso sanguíneo.

### 1.1.1.3 Regiones neurogénicas no canónicas

Aunque en numerosas clases de vertebrados, incluyendo peces, anfibios y reptiles, el proceso de neurogénesis adulta tiene lugar en distintas regiones del sistema nervioso central, en mamíferos la mayoría de las regiones cerebrales y medulares se han determinado como parénquima no neurogénico. Sin embargo, desde hace una década algunos autores sugieren que otras regiones cerebrales localizadas a lo largo del sistema ventricular también pueden dar lugar a nuevas neuronas y glía, principalmente tras una lesión (Feliciano et al., 2015; Lin y Iacovitti, 2015). Estas zonas han sido denominadas “regiones neurogénicas no canónicas”.

Una de estas regiones se encuentra localizada en las paredes del tercer ventrículo (Lee y Blackshaw, 2012). Donde las células que tapizan el suelo y las paredes laterales del tercer ventrículo se denominan tanicitos y presentan una larga

## Introducción

expansión radial, considerándose células de tipo glía radial (Flament-Durand y Brion, 1985). Estas células han sido clasificadas en cuatro tipos según su ubicación y la localización del proceso basal (Rodríguez et al., 1979). En condiciones fisiológicas, presentan una tasa de proliferación baja (Kokoeva et al., 2007). Sin embargo, estudios en los que se alteran las condiciones fisiológicas en el cerebro postnatal, como dietas ricas en grasa, fotoperiodo, ejercicio o administración de factores de crecimiento, han mostrado que los tanicitos tienen la capacidad de generar neuronas y glía (Goodman and Hajihosseini, 2015; Xu et al., 2005). A pesar de ello, la identidad exacta y localización de esta población celular es controvertida (Kusne et al., 2016).

Otra región en la que se ha observado capacidad proliferativa es el canal central de la medula espinal (Alfaro-Cervelló et al., 2012; Horner et al., 2000; Martens et al., 2002). El epitelio que tapiza las paredes del canal central está principalmente constituido por células endimarias y algunos astrocitos localizados en las regiones dorsal y ventral (Alfaro-Cervelló et al., 2012; Fiorelli et al., 2013; Hamilton et al., 2009). Numerosos trabajos realizados en ratones y humanos han confirmado que estas células presentan propiedades de célula madre *in vitro*, dando lugar a neuroesferas multipotentes (Bauchet et al., 2013; Dromard et al., 2008). En condiciones fisiológicas, estas células se dividen simétricamente para expandir la población local de células endimarias y contribuir al crecimiento de la médula espinal (Alfaro-Cervelló et al., 2012). Tras una lesión medular, las células endimarias se activan rápidamente, proliferando y dando lugar no solo a astrocitos formadores de la cicatriz glial, si no también a oligodendrocitos (Meletis et al., 2008). Sin embargo, cabe destacar que estas células endimarias presentan características morfológicas y moleculares distintas a las células E1 y E2 de la ZSV-V.

### **1.1.2 Modelos *in vitro* para el estudio de la neurogénesis adulta**

La caracterización de las células madre neurales adultas de la ZSV-V *in vivo* ha ido acompañada del estudio de sus características *in vitro*. Los primeros trabajos llevados a cabo por Reynolds y Weiss, donde por primera vez se consiguieron aislar células del sistema nervioso central, demostraron que las células derivadas de las regiones periventriculares eran capaces de generar una progenie multipotencial (Reynolds y Weiss, 1996), lo que contribuyó a demostrar la existencia de las células madre neurales adultas. Estos cultivos celulares se basaban en el aislamiento y

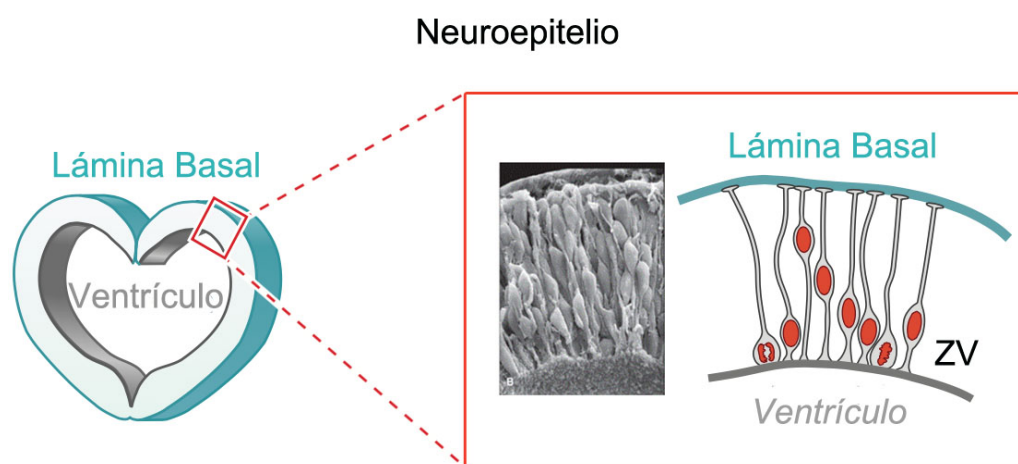
disgregación enzimática de estas células, las cuales crecían como esferas no adherentes, denominadas neuroesferas, en presencia de EGF y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF). Tras la eliminación de los factores de crecimiento, las células se adherían al sustrato y comenzaban a diferenciarse en neuronas, astrocitos, y oligodendrocitos. Además, también se propuso que las neuroesferas derivaban tan solo de células relativamente quiescentes, basándose en experimentos en los que las neuroesferas se cultivaban tras la eliminación *in vivo* de las células de división rápida (Morshead et al., 1994). Sin embargo, en ese momento los tipos celulares de la ZSV-V todavía no estaban bien caracterizados y se desconocían las características de las células de las que se partía en el cultivo. Recientes estudios realizados con combinaciones de marcadores aíslan las poblaciones de células madre neurales quiescentes y activas mostrando que las células quiescentes raramente forman colonias *in vitro* (Mich et al., 2014).

Progresivamente se han desarrollado otros métodos de expansión y cultivo celular *in vitro*. Entre estos, uno de los más usados actualmente es el cultivo adherente en monocapa. Este tipo de cultivo se ha descrito como un modelo de cultivo alternativo que recapitula *in vitro* el proceso de neurogénesis postnatal de la ZSV-V, permitiendo monitorizar la secuencia de eventos desde un estadio de tipo célula madre glial a neuronas maduras (Scheffler et al., 2005). Estos cultivos adherentes eliminan algunos de los problemas asociados a la heterogeneidad celular de las neuroesferas, ya que representan una población de precursores celulares mucho más homogénea. Las células cultivadas son expuestas uniformemente a los factores EGF y FGF, lo que permite la expansión a través de divisiones simétricas e inhibe la diferenciación espontánea (fenómeno también descrito en células madre neurales derivadas de células madre embrionarias) (Conti y Cattaneo, 2005). Además estudios recientes muestran que las células cultivadas en monocapa retienen la expresión génica y potencial neurogénico regionales de las células madre de las regiones dorsal y ventral de la ZSV-V (Delgado et al., 2016).

El aislamiento de estas células y su amplificación en cultivos han permitido tener una mayor comprensión de la regulación de los mecanismos de proliferación, diferenciación y dinamismo en las células madre neurales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos ensayos *in vitro* no son el modelo ideal para estudiar determinados aspectos de las células madre *in vivo*.

### 1.1.3 Origen de las células madre neurales adultas de la ZSV-V

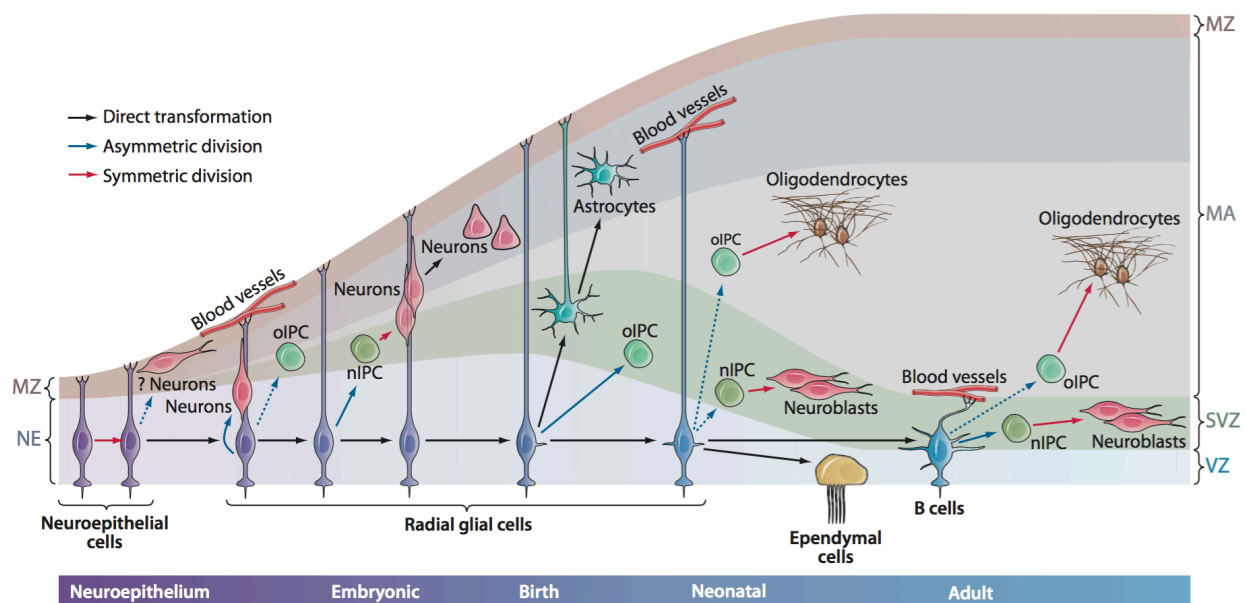
Una de las cuestiones que más ha interesado a los científicos es la determinación del momento en el que se originan las células madre adultas de la ZSV-V. Es bien sabido que durante los primeros estadios del desarrollo embrionario, el cerebro comienza a formarse a partir del tubo neural, inicialmente constituido por un epitelio columnar pseudoestratificado denominado neuroepitelio. Las células neuroepiteliales se caracterizan por ser una población homogénea que contacta con la cavidad ventricular en su extremo apical y con la lámina basal en su extremo basal o subpial (Figura 4). Además, estas células presentan un característico proceso mitótico denominado “migración nuclear intercinética”, caracterizado por movimientos nucleares asociados a la progresión de las distintas fases del ciclo celular (Fujita, 2014; Sauer, 1935). Durante la fase G1, el núcleo de estas células se dirige hacia el extremo basal de la célula, donde permanece para completar la fase S del ciclo celular. En la fase G2, el núcleo se aproxima a la superficie apical, donde se produce la mitosis.



**Figura 4. Organización del neuroepitelio.** Las células neuroepiteliales son un epitelio pseudoestratificado que constituye la zona ventricular (ZV). Estas células son responsables de la expansión del tubo neural en los estadios más tempranos del proceso de neurogénesis. Adaptado de (Taverna et al., 2014).

Poco después del inicio del proceso de neurogénesis cortical (en roedores alrededor del estadio embrionario (E) E10-11), las células neuroepiteliales son reemplazadas por un nuevo tipo de célula progenitora denominada glía radial (Caviness y Takahashi, 1995; Noctor et al., 2002). Estas células, al igual que las células neuroepiteliales, conservan la polaridad apical-basal y presentan migraciones nucleares intercinéticas. Sin embargo, como consecuencia del progresivo engrosamiento del

córtex, la glía radial presenta un alargamiento de la expansión radial en contacto con la superficie pial y sus núcleos quedan retenidos en la región próxima a los ventrículos o zona ventricular (ZV) (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Merkle et al., 2004). Además estas células comienzan a expresar la BLBP (Feng y Heintz, 1995), el transportador de glutamato específico de glía (GLAST) (Shibata et al., 1997), proteínas de filamentos intermedios como vimentina (Pixley y de Vellis, 1984) y RC2 (Merkle et al., 2004), y contienen gránulos de glucógeno (Gadissex y Evrard, 1985). Tras el nacimiento, la glía radial localizada en las paredes de los ventrículos laterales retrae su proceso basal y pierde la expresión del marcador RC2, transformándose en una población de astrocitos (células tipo B) que continúan funcionando como progenitores neurales primarios durante la vida adulta. Estas células además dan lugar a células ependimarias multiciliadas, astrocitos estriatales y oligodendrocitos (Merkle et al., 2004; Spassky, 2005) (Figura 5).



**Figura 5. Naturaleza glial de las células madre neurales embrionarias y adultas.** Las células neuroepiteliales se dividen simétricamente, hasta su transformación en células de glía radial durante el desarrollo embrionario. La glía radial se divide asimétricamente dando lugar a neuronas y nuevas células de glía radial. En los últimos días del desarrollo embrionario la glía radial da lugar a astrocitos, y tras el nacimiento esta glía radial se transforma en astrocitos tipo B1 de la ZSV-V y en células ependimarias multiciliadas. Las flechas continuas indican evidencias experimentales. Las flechas discontinuas indican hipótesis; IPC, célula progenitora intermediaria; MA, capa del manto; MZ, zona marginal; NE, neuroepitelio; nIPC, célula progenitora neural; oIPC, célula progenitora oligodendrocítica. Adaptado de (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009).



### **1.1.4 Generación de las células B1**

Hasta la actualidad se desconocía en qué momento concreto se generaban las células B1 a partir de los precursores neurales responsables de la neurogénesis embrionaria. Recientes estudios han utilizado líneas de ratones transgénicos combinadas con marcaje con bromodesoxiuridina (BrdU) y marcaje retroviral de las células en división para determinar el momento en el que se generan las células B1. Fuentealba y cols. llevaron a cabo un elegante experimento en el que determinaron el linaje celular marcando células en división con la proteína verde fluorescente (GFP) y un retrovirus con un “código de barras genético” presentado por un oligonucleótido de 24 pares de bases (Fuentealba et al., 2015). Con este experimento, todas las células derivadas de un solo progenitor marcado durante el periodo embrionario deberían heredar el mismo código de barras. Los resultados de este trabajo demuestran que las células madre neurales generadas en los estadios iniciales del desarrollo embrionario también dan lugar a células madre adultas, que a su vez generan neuronas del bulbo olfatorio en el adulto. Mediante este estudio se confirman hallazgos previos que asociaban la localización de las células madre en distintas regiones de la ZSV-V con los diferentes tipos de neuronas generadas en el bulbo olfatorio (Merkle et al., 2013).

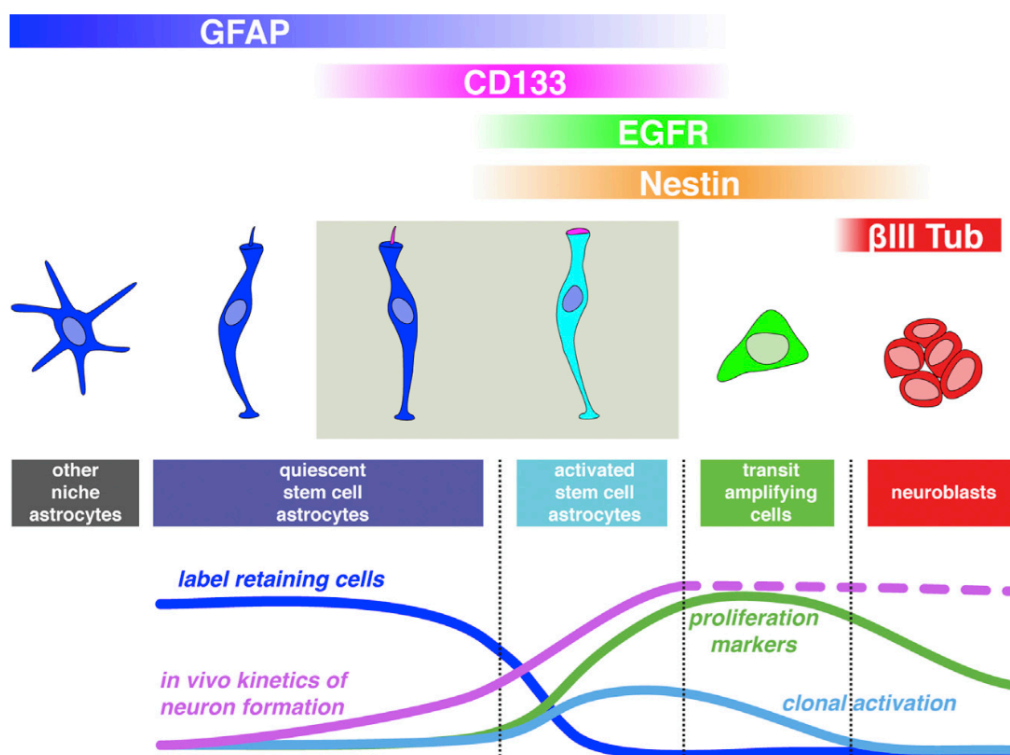
Otro reciente trabajo ha elucidado uno de los componentes clave en el proceso de regulación y determinación de los progenitores embrionarios, el inhibidor dependiente de ciclina  $p57^{kip2}$  (Furutachi et al., 2015). Esta proteína pertenece a la familia de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y ha sido relacionada con la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal (Ye et al., 2009). En este estudio se demuestra que los niveles de expresión de  $p57^{kip2}$  son variables en las células progenitoras embrionarias de la eminencia ganglionar, siendo las células marcadas las que retardan la progresión de su ciclo celular. Adicionalmente, los autores suprimieron el gen  $p57$  observando una disminución de células con baja tasa proliferativa durante la embriogénesis, así como una disminución de células madre neurales en la ZSV-V adulta (Furutachi et al., 2015). Por lo tanto,  $p57^{kip2}$  parece estar implicado en la especificación o mantenimiento de un subgrupo de células madre quiescentes de la ZSV-V.

Estos dos estudios de los grupos de Fuentealba y Furutachi demuestran que la subpoblación de glía radial progenitora se genera durante el desarrollo medio-fetal (en roedores E13.5-E15.5), manteniéndose relativamente quiescente hasta ser reactivada postnatalmente (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015). Todas estas

observaciones confirman que las células madre neurales adultas derivan de una población de glia radial embrionaria.

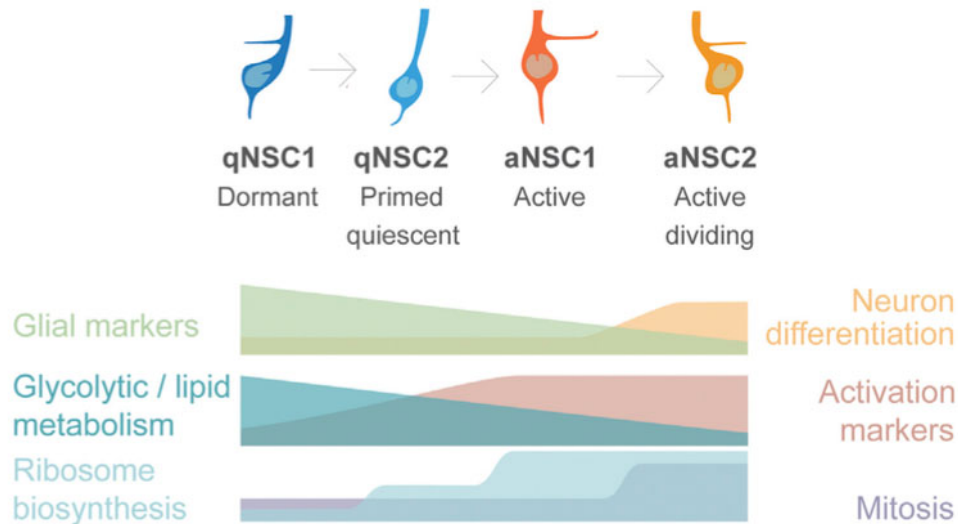
### **1.1.5 ¿Las células B1 constituyen una población uniforme?**

Desde la identificación de la naturaleza astrogial de las células madre neurales adultas, gran número de investigadores han centrado sus esfuerzos en determinar la identidad precisa de estas células para poder conocer su comportamiento y función *in vivo*. Durante algún tiempo se asumió que las células B1 debían corresponder a una población celular homogénea que se dividía infrecuentemente pero que presentaba una gran plasticidad para generar múltiples tipos de neuronas y glía. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías como la separación de células activadas por fluorescencia (FACS), la secuenciación de célula única o los estudios de trazado celular *in vivo* han mostrado que las células madre neurales constituyen una población heterogénea (Alvarez-Buylla et al., 2008; Chaker et al., 2016; Codega et al., 2014; Merkle et al., 2007; 2013). Dentro de esta heterogeneidad, encontramos poblaciones de células madre neurales que difieren en su estado proliferativo y propiedades moleculares, formando un mosaico de células madre quiescentes y activas (Codega et al., 2014; Mich et al., 2014; Morshead et al., 1994). Las células madre neurales quiescentes son células de división lenta que sobreviven al tratamiento con drogas antimetabólicas, como la citosina de arabinósido (Ara-C), y son capaces de regenerar la ZSV-V tras la eliminación del tratamiento. Además dan lugar a nuevas neuronas y expresan GFAP, Glast y BLBP en condiciones fisiológicas (Codega et al., 2014; Doetsch et al., 1999; Giachino y Taylor, 2009). En contraste, las células madre neurales activas son eliminadas con tratamientos antimetabólicos y expresan el receptor de EGF (EGFR) y nestina (Codega et al., 2014; Pastrana et al., 2009) (Figura 6).



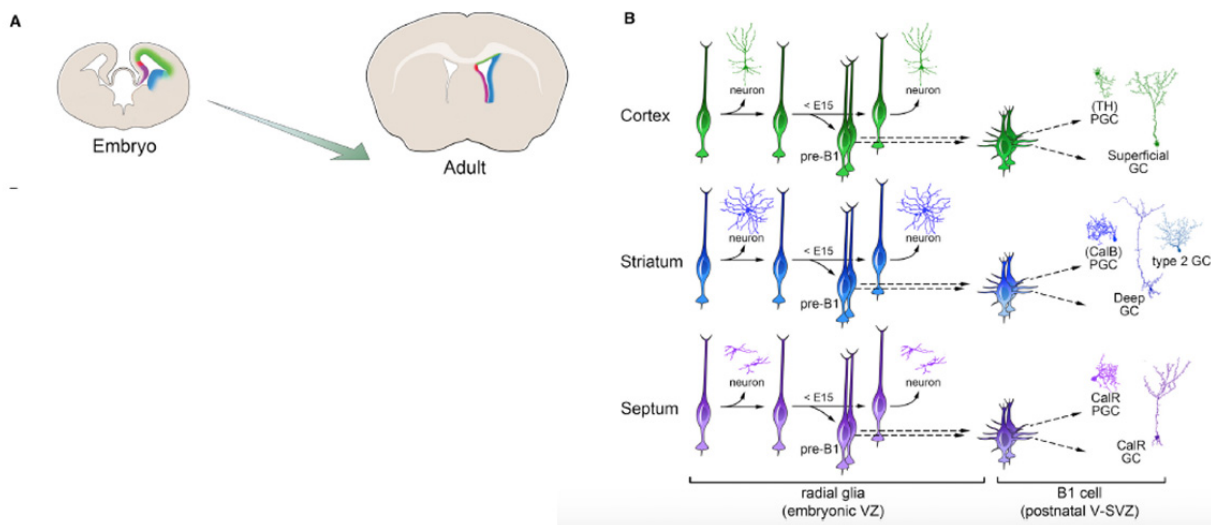
**Figura 6. Propiedades *in vivo* e *in vitro* de las células madre de la ZSV-V.** Las células madre quiescentes son nestina negativas, retienen marcaje (línea azul), son neurogénicas *in vivo* (línea magenta) y raras veces dan lugar a neuroesferas o cultivos adherentes *in vitro* (línea azul clara). Las células madre activas son altamente proliferativas (línea verde) y generan rápidamente neuronas *in vivo* estando enriquecidas en las neuroesferas y colonias *in vitro*. Trabajos previos han mostrado que las células EGFR+ también son muy proliferativas *in vivo* y dan lugar a neuroesferas (Codega et al., 2014).

Recientemente, múltiples combinaciones de marcadores han sido usadas para purificar estas dos poblaciones de células madre y elucidar sus propiedades funcionales así como sus patrones de expresión génica. Estos trabajos han mostrado que las células madre quiescentes presentan una mayor expresión de genes relacionados con adhesión celular, respuestas a la matriz extracelular, comunicación celular, receptores de señalización, transportadores y canales de iones. Además, estas células presentan mayor número de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos y la glicólisis (Codega et al., 2014; Llorens-Bobadilla y Martin-Villalba, 2016). Curiosamente, el estudio de estos patrones de expresión génicos ha revelado que las células madre neurales quiescentes entran en un estado de quiescencia pre-activada o *primed-quiescent* antes de activarse, el cual va acompañado de la regulación a la baja del metabolismo glicólico (Llorens-Bobadilla et al., 2015). En el caso de las células madre activas, los genes de mayor expresión son los relacionados con el ciclo celular, síntesis de ribosomas y fosforilación oxidativa (Figura 7).



**Figura 7 Heterogeneidad de las células madre neurales de la ZSV-V.** Estudios de secuenciación de célula única muestran una población de células madre durmientes que presentan marcadores gliales y un metabolismo glicolítico y lipídico durante la homeostasis. Las células madre durmientes entran en un estado de quiescencia pre-activada antes de la activación, hecho acompañado de la disminución del metabolismo glicolítico y la activación de factores de transcripción relacionados con el linaje neuronal y la síntesis proteica. Adaptado de (Llorens-Bobadilla et al., 2015).

Por otra parte, estudios de linaje y mapeo celular han puesto de manifiesto una heterogeneidad regional de las células madre de la ZSV-V. El trazado con líneas de ratones CreERT2-loxP, virus dirigidos o mutantes con pérdida de función (en diferentes regiones rostro-caudales o dorso-ventrales de la ZSV-V) han mostrado que distintas células madre residen en distintos territorios o micro-dominios, dando lugar a varios subtipos de interneuronas en el bulbo olfatorio (Merkle et al., 2013; 2015). Esta heterogeneidad regional se correlaciona con la expresión regional de factores de transcripción específicos (Lopez-Juarez et al., 2013; Merkle et al., 2013), determinados en el estadio embrionario E15.5 (Fuentealba et al., 2015). Curiosamente, estas células madre continúan generando subtipos específicos de neuronas, incluso tras el trasplante en otras regiones cerebrales, sugiriendo que el programa de diferenciación para dar lugar a la progenie neuronal debe estar determinado, en parte, por factores intrínsecos (Merkle et al., 2007) (Figura 8). Además, también se ha descrito que las células madre neurales dan lugar a oligodendrocitos y astrocitos preferentemente en las regiones dorsal y dorso-lateral de la ZSV-V (Menn, 2006; Tong et al., 2015). Sin embargo, todavía se desconoce la identidad precisa de estas células madre.



**Figura 8. Origen embrionario de las células B1 postnatales.** (A) Izquierda: Sección coronal del cerebro embrionario de ratón (E12.5) ilustrando la organización regional de las células progenitoras de la zona ventricular en la corteza (verde), estriado/ eminencia ganglionar lateral (azul) y septal (morado). Derecha: Los dominios de estos progenitores se encuentran retenidos en el cerebro postnatal dorsal (verde), ventral (azul) y medial (morado) y contienen células madre neurales que generan diferentes subtipos de interneuronas que migran hacia el bulbo olfatorio. (B) Linajes individuales ilustrando la progresión de las células madre desde el estado embrionario al adulto. Las células madre postnatales derivan de regiones específicas de células pre-b1 que progresivamente divergen de otros progenitores embrionarios y producen grupos de neuronas en el córtex (verde), estriado (azul) y septum (morado). Posteriormente, las mismas regiones presentan células B1 de la ZSV-V dorsal (verde), ventral (azul) y medial (morado) que producen células granulares superficiales, intermedias y profundas respectivamente en el bulbo olfatorio. Adaptado de (Fuentealba et al., 2015).

## 1.1.6 Neurogénesis adulta en la ZSV-V de primates

### 1.1.6.1 Primates no-humanos

Se ha hipotetizado que el incremento de la complejidad en tamaño y topografía del cerebro de primates puede limitar la contribución a largo plazo del nacimiento de nuevas neuronas en la pared ventricular (Paredes et al., 2015). Sin embargo existen ciertas evidencias de la generación de nuevas neuronas en la ZSV-V de primates no-humanos que migran hacia el bulbo olfatorio (Kornack y Rakic, 1999). En el cerebro de monos neonatales de la especie *Callithrix jacchus* existe un camino migrador rostral con cadenas de neuroblastos migradores semejante al observado en roedores, sin embargo este camino desaparece en el adulto (Sawamoto et al., 2011). En monos Rhesus adultos, se ha observado un gran número de células en la región ventral anterior de la ZSV-V, que podrían corresponderse con el camino rostral migrador de roedores (Pencea et al., 2001; Rakic, 2002b). No obstante, no solo existen diferencias en las

rutas de migración en primates en comparación con roedores, sino que la ZSV-V también presenta una organización con características únicas. A diferencia de los roedores, la ZSV-V de primates no-humanos adultos presenta una organización en tres capas (Gil-Perotín et al., 2009; Sawamoto et al., 2011). La capa I está constituida principalmente por un epitelio cuboidal de células endoteliales que tapizan la cavidad ventricular. En *Callithrix jacchus*, esta capa presenta algunos astrocitos en contacto con la luz ventricular exhibiendo un cilio primario, citoplasma claro, filamentos intermedios y un núcleo irregular (Sawamoto et al., 2011). Estas células son semejantes a los astrocitos B1 madre observados en la ZSV-V de ratones. Adyacente a la capa I se encuentra la capa II o capa GAP. Esta capa está formada por las expansiones citoplasmáticas de células endoteliales y astrocitos, ricas en filamentos intermedios. En esta capa también se pueden encontrar los somas celulares de oligodendrocitos, microglía, y en ocasiones de neuroblastos. En la capa 3 o astrocítica, encontramos un gran número de astrocitos ricos en filamentos intermedios (Figura 9). Sin embargo, en marmosets neonatales estas capas no se encuentran tan bien definidas debido a la gran cantidad de células migratorias que se encuentran en esta región. Además, presentan un mayor número de grupos de astrocitos B1 contactando la cavidad ventricular (Sawamoto et al., 2011).

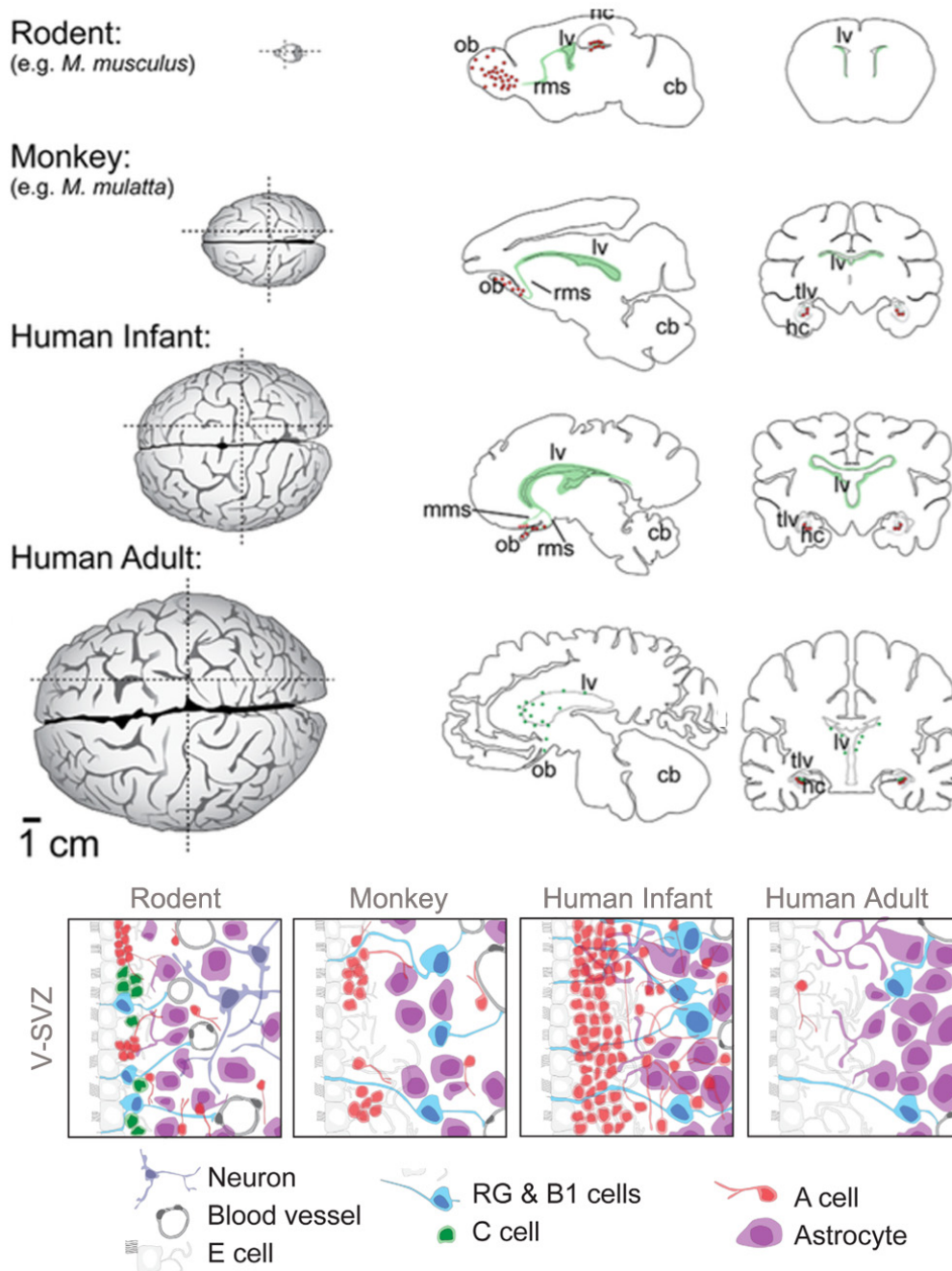
#### 1.1.6.2 Humanos

El estudio de la neurogénesis adulta en el cerebro humano comenzó con los estudios de Eriksson y cols., en los que los autores estudiaron muestras de pacientes tratados con BrdU, e identificaron células marcadas en la ZSV-V y el giro dentado del hipocampo adultos (Eriksson et al., 1998). Trabajos posteriores han mostrado grandes diferencias entre la ZSV-V infantil y adulta. En recién nacidos, la ZSV-V presenta actividad proliferativa y contiene numerosas células DCX+, algunas de las cuales migran hacia el bulbo olfatorio por el camino migratorio rostral (Sanai et al., 2007). Además, a diferencia de los roedores, una subpoblación de estos neuroblastos migra hacia la corteza prefrontal a través del denominado camino migratorio medial (Paredes et al., 2016; Sanai et al., 2011). Sin embargo, tras 18 meses de edad el número de neuroblastos DCX+ disminuye drásticamente (Sanai et al., 2011). Estudios de la concentración de carbono 14 en el ADN genómico de cerebros humanos, correspondiente a los niveles de <sup>14</sup>C ambiental, no observaron generación de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio (Bergmann et al., 2015). No obstante, se han obtenido neuronas *in vitro* a partir de biopsias intra-operatorias de la ZSV-V adulta (Chaichana et

## *Introducción*

al., 2009). Por otra parte, la ZSV-V humana adulta presenta una organización en capas, similar a los primates no-humanos, donde se observa una capa GAP próxima a capa ependimaria, rica en expansiones astrocíticas y ependimarias (Quiñones-Hinojosa et al., 2005). La aparición de esta capa GAP parece relacionarse con la desaparición de las células migradoras. Adyacente a esta capa, existe una capa ribbon o capa III que contiene los somas celulares de numerosos astrocitos con morfología variable. Esta capa además se continúa con una capa de transición (capa IV) con pocas células, semejante al parénquima cerebral (Figura 9).

Numerosos estudios han investigado las características morfológicas y ultraestructurales de las células madre, así como los mecanismos de regulación génica. Sin embargo, la morfología nuclear de estas células ha sido poco estudiada. En el siguiente apartado de la presente tesis introduciremos algunos los principales aspectos de la regulación y morfología del núcleo de las células madre neurales de la ZSV-V.



**Figura 9. Regiones neurogénicas y organización de la ZSV-V en roedores, primates no-humanos y humanos.** Columna izquierda: Visión dorsal de los cerebros de distintas especies. Columna media: Visión sagital de cada uno de los cerebros en el plano parasagital del camino migrador rostral y el bulbo olfatorio. Las regiones verdes indican zonas germinales. Los puntos rojos indican los destinos de los neuroblastos migradores. Columna derecha: Visión coronal del cada cerebro. Esquema de los diferentes precursores neuronales en la ZSV-V a través de las distintas especies. La ZSV-V adulta está constituida mayoritariamente por los mismos tipos celulares a lo largo de las diferentes especies. Las células endimarias multiciliadas (blanco) tapizan las paredes de los ventrículos laterales y en primates se encuentran separadas de los astrocitos (morado) y los progenitores neuronales (azul) por células tipo A (rojo). En el humano adulto, la ZSV-V contiene una capa GAP entre las células endimarias, astrocitos y las pocas células progenitoras (azul). Adaptado de (Paredes et al., 2015).

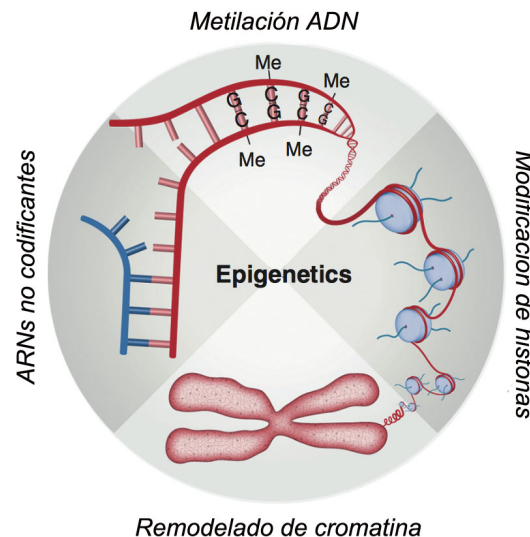


## 1.2 Células madre neurales: El núcleo

El núcleo celular es la estructura física del genoma en la célula, en cuyo interior el ADN se encuentra empaquetado como cromatina. En 1920 Emil Heitz describió por primera vez la heterocromatina y eucromatina como regiones del genoma silenciadas y activas respectivamente (Zacharias, 1995). En la actualidad sabemos que la unidad básica de esta cromatina está compuesta por una cadena de ADN de 147 pares de bases enrollada alrededor de un octámero de histonas, el nucleosoma, de 30 nm de diámetro (Zhu y Li, 2016). La función primaria de la cromatina es el empaquetamiento y refuerzo del ADN para permitir los procesos mitóticos, prevenir la rotura cromosómica y controlar la expresión y replicación del ADN. Teniendo en cuenta los distintos niveles de organización de cromatina, podemos definir cuatro niveles de regulación del ADN: la codificación de secuencias nucleotídicas de la molécula de ADN, la organización de la cromatina, la regulación epigenética y la organización espacial del genoma en el interior del núcleo. La regulación transcripcional y epigenética del genoma de las células implicadas en el proceso de neurogénesis adulta ha emergido como uno de los más interesantes paradigmas para el estudio de las modificaciones de cromatina en la especificación de tipo celular.

### 1.2.1 Epigenética y neurogénesis.

La epigenética es el estudio de los mecanismos biológicos que generan cambios heredables en la expresión génica y no conllevan cambios en la propia secuencia de ADN (Bird, 2007; Jaenisch y Bird, 2003). Las células madre neurales mantienen un estado epigenético que permite la autorrenovación y producción de múltiples y diferenciados tipos celulares. Por lo tanto, este estado epigenético debe incluir la expresión de genes específicos, la represión de otros loci, y el mantenimiento de los genes requeridos para la especificación de linaje (Lim, 2013). Estos cambios epigenéticos pueden tener lugar de forma espontánea o estar inducidos por diversos factores tales como la edad, el ambiente, la enfermedad, etc. Los principales mecanismos epigenéticos son la remodelación de la cromatina, la metilación del DNA, las modificaciones covalentes de las histonas y la regulación mediada por RNA no codificante (Hsieh y Zhao, 2016) (Figura 10). Estos mecanismos interactúan y convergen con la cromatina para ejercer un control transcripcional y contribuir a las bases epigenéticas de la identidad celular.



**Figura 10. Principales mecanismos epigenéticos.** Las cuatro principales categorías epigenéticas: modificación de histonas, remodelado de cromatina, metilación de ADN y ARN no codificante. La naturaleza dinámica de los mecanismos epigenéticos ofrece un importante nivel de regulación génica ya que controla múltiples aspectos de la neurogénesis adulta en respuesta a las señales ambientales. Adaptado de (Hsieh and Zhao, 2016).

Uno de los principales mecanismos epigenéticos en vertebrados es la metilación del ADN. Este proceso se basa en la adición de grupos metilo a una de las bases de la cadena de ADN. En mamíferos, la metilación del ADN tiene lugar principalmente en el quinto carbono de la base de citosina, formándose la 5-metilcitosina (5-mC) (Jaenisch y Bird, 2003). Este proceso es conocido por su papel represivo sobre promotores génicos, constituyendo un importante mecanismo para el silenciamiento génico (Bird and Wolffe, 1999). Las proteínas encargadas del proceso de catalización de las metilaciones de ADN son una familia de enzimas denominadas metiltransferasas de ADN o DNMT e incluyen DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. La DNMT3a se encuentra en células madre neurales postnatales y su función represora facilita la transcripción de genes clave para la neurogénesis (Wu et al., 2010). Ratones nulos para DNMT3a presentan una reducción de la neurogénesis adulta en la ZSV-V y por tanto una disminución del tamaño del BO (Gonzales-Roybal y Lim, 2013).

Otro de los principales mecanismos epigenéticos es la modificación post-transcripcional de las histonas. Existe una gran variedad de modificaciones postranscripcionales tales como las acetilaciones, metilaciones, ubiquitinizaciones, fosforilaciones y ribosilaciones (Jenuwein y Allis 2001; Bernstein et al. 2007). Las metilaciones pueden resultar en la represión o activación de la transcripción génica dependiendo del residuo metilado (Juliandi et al., 2010). Algunas de estas modificaciones como la di- o tri-metilación de la lisina 4 (H3K4me) y fosforilación de la

serina 10 en la H3 se han descrito como signos de cromatina activa, a diferencia de otras como la di- o tri-metilación de la lisina 9 (H3K9me3) o la lisina 27 en la H3 (H3K27me3) que se han relacionado con regiones de cromatina inactiva. Además, las regiones de heterocromatina pericentromérica se caracterizan por presentar nucleosomas ricos en H3K9me a los que se unen las proteínas de heterocromatina (Schalch and Steiner, 2016). Por otra parte, en la ZSV-V la H3K27me3 está mediada por la metiltransferasa EZH2, una proteína del complejo represivo policomb y cuya expresión permite distinguir entre las poblaciones de células astrogliales neurogénicas de las no neurogénicas (Hwang et al. 2014).

Otro mecanismo epigenético es el ARN no codificante. Este tipo de ARN representa la mayoría del ADN transcrito en el genoma eucariota y no codifica proteínas (Iyengar et al., 2014). Los diversos tipos de ARN no-codificante como los micro ARN (miARN), los ARN de interferencia (siARN), los ARN largos (lncARN) etc. se encuentran principalmente implicados en la regulación de la expresión génica y cumplen papeles específicos de tipo celular en la función del cerebro en desarrollo y adulto (Gonzales-Roybal and Lim, 2013).

### ***1.2.2 Posicionamiento de la cromatina y envoltura nuclear***

Las regiones genómicas se encuentran compartimentalizadas en dominios espaciales en el interior del núcleo (Pombo and Dillon, 2015). En la mayoría de tipos celulares, la actividad transcripcional presenta una distribución específica: la heterocromatina es una estructura densa localizada cerca de la lámina nuclear y la eucromatina ocupa el centro nuclear y las regiones próximas a los poros nucleares (Gay y Foiani, 2015). Además, en el núcleo en interfase, cada cromosoma ocupa su propio territorio nuclear (Cremer and Cremer, 2001). El descubrimiento de dominios nucleares funcionalmente especializados sugiere que la organización tridimensional del núcleo, o arquitectura nuclear, debe jugar un importante papel en la dirección de la diferenciación celular, el desarrollo de organismos y la patogenia de enfermedades. De hecho, recientes trabajos muestran una relación entre la organización nuclear y el mantenimiento de la pluripotencialidad. Existen regiones enriquecidas en genes asociados a pluripotencia como Oct4, Sox2, y Nanog en células madre embrionarias, lo que pone de manifiesto el papel crítico de las proteínas relacionadas con la arquitectura nuclear en el mantenimiento del estado pluripotente (Gorkin et al., 2014; Sexton and

Cavalli, 2013). En este sentido, también se han caracterizado células madre neurales derivadas de líneas embrionarias y se ha observado que, aunque existe una arquitectura cromosómica común a otros tipos celulares diferenciados, estas células presentan configuraciones de cromatina con topografías específicas en las que se localizan genes relacionados con el ciclo celular y el mantenimiento de la célula madre (Krijger et al., 2016; Peric-Hupkes et al., 2010; Phillips-Cremins et al., 2013).

Otro de los dominios heterocromáticos especializados y con una localización nuclear específica son los telómeros. Estas nucleoproteínas consisten en largas repeticiones de ADN de secuencia TTAGGG (en vertebrados), que adquieren una estructura especial denominada 'T-loop'. La función de estas estructuras es la protección de los extremos de los cromosomas (Gonzalo y Eissenberg, 2016) y, en algunos tipos celulares, presentan una localización preferencial próxima a la envoltura nuclear. El mantenimiento de los telómeros parece ser esencial para la conservación de las células madre neurales en la ZSV-V adulta (Ferrón et al., 2004). Además los telómeros se encuentran protegidos por un complejo proteico denominado shelterin que protege la región terminal de los cromosomas contra los eventos de procesamiento nucleolítico y previene el desencadenamiento del daño al ADN (Lange et al., 2016). Entre estas proteínas se encuentra el factor de unión a las repeticiones teloméricas o TRF2, que sirve como molécula andamio para la remodelación de los telómeros durante los estados replicativos (Benarroch-Popivker et al., 2016). Curiosamente, las células madre neurales y la glía expresan TRF2 y se asocian al represor REST para preservar la integridad telomérica, suprimiendo la represión de numerosos genes específicos neurales y por lo tanto, manteniendo a las células madre neurales en un estado de autorrenovación (Grammatikakis et al., 2016a).

La envoltura nuclear, la interfaz entre el núcleo y el citoplasma, es esencial para la determinación global de la organización nuclear. Actúa como andamio para enganchar la cromatina silenciada a la periferia nuclear, y se considera un compartimento de silenciamiento génico (Brachner y Foisner, 2011). La envoltura nuclear presenta una membrana nuclear interna y una externa, separadas por un espacio perinuclear de 30-50 nm (Gay y Foiani, 2015). La MNE presenta múltiples conexiones con el retículo endoplasmático, y la MNI presenta una composición proteica distinta, con más de 60 proteínas integrales de membrana que varían significativamente entre tipos celulares (Schirmer y Gerace, 2005). Entre estas proteínas se encuentra el receptor de la lámina B (LBR), fundamental para el reclutamiento de heterocromatina en la lámina nuclear en células madre (Solovei et al., 2013), y LAP2, implicada en el

silenciamiento génico en la periferia del núcleo de mamíferos (Zullo et al., 2012).

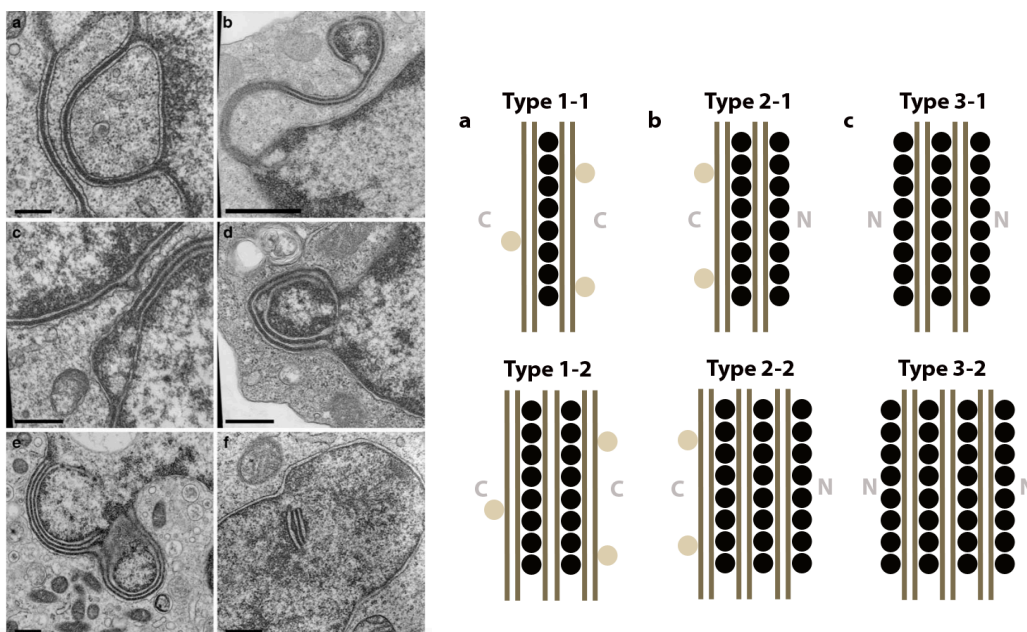
La envoltura nuclear de los metazoos posee una característica adicional, la lámina nuclear, la cual está constituida por una red fibrosa de proteínas asociadas a la membrana nuclear interna (Zuleger y Schirmer, 2011). Esta lámina puede observarse con microscopía electrónica (Belmont et al., 1993). Las láminas, principales componentes de la lámina nuclear junto con una variedad de otras proteínas, interactúan con el ADN, las histonas, los factores de transcripción y las proteínas de la cromatina (Prokocimer et al., 2009 y Taddei et al., 2004). Mutaciones en genes que codifican la lámina nuclear dan lugar a las laminopatías, que van desde las distrofias musculares, a la progeria o envejecimiento acelerado (Gruenbaum y Foisner, 2015; López-Otín et al., 2016). Las láminas son una familia de filamentos intermedios constituida por las laminas tipo A y B (Gruenbaum y Foisner, 2015). Aunque originalmente se pensaba que tan solo eran un componente estructural, nuevas evidencias han mostrado que cumplen roles más complejos y funcionan como un nexo regulatorio en la periferia nuclear (Burke and Stewart, 2012). La lámina B confiere elasticidad al núcleo y mantiene su morfología y se ha sugerido que cumple un papel fundamental en la proliferación y supervivencia (Kim et al., 2011), mientras que la lámina A confiere viscosidad para impedir la deformación nuclear. En el cerebro de roedores, la lámina B aparece desde los primeros estadios embrionarios y se mantiene en células GFAP+ de la ZSV-V postnatal, mientras que la lámina A/C comienza a expresarse en el día postnatal 5 en células GFAP y neuronas maduras (Röber et al., 1989; Takamori et al., 2007),

A pesar todas estas evidencias, la relación entre la organización de la cromatina, la morfología nuclear de las células madre neurales y la expresión génica todavía no ha sido elucidada.

### ***1.2.3 Las células B presentan una envoltura nuclear característica***

En algunas células madre de la ZSV-V se han descrito inusuales invaginaciones nucleares de la envoltura nuclear (Capilla-Gonzalez et al., 2014; Guerrero-Cazares et al., 2011; Wittmann et al., 2009). Sin embargo, estos trabajos no revelan la ultraestructura, frecuencia y posible función de estas invaginaciones nucleares. Aunque los autores de estos trabajos no relacionan estas invaginaciones con ninguna estructura nuclear previamente descrita, estas muestran cierta similitud con las denominadas

“láminas de cromatina de la envoltura nuclear” (ELCS, del inglés *envelope-limited chromatin sheets*) previamente descritas en distintos tipos de células normales y cancerosas (Tabla 2 y 3). Estas estructuras nucleares son láminas de cromatina de 30 nm de diámetro limitadas en ambos lados por la MNI, generando un “sándwich” regular y altamente reproducible de un grosor de unos 40 nm (Olins y Olins, 2009) (Figura 11). Las ELCS fueron inicialmente descritas hacia la mitad de 1960s en leucocitos y timocitos como *bolsillos nucleares*, *nuclear blebs*, *nuclear loops*, o *proyecciones nucleares* (Epstein et al., 1966; Ghadially, 1997). Sin embargo, ya que muchas de estas estructuras presentaban la misma morfología, Davies Haynes y cols. unificaron la terminología y las denominaron “láminas limitadas por la envoltura nuclear” (ELS, del inglés *envelope-limited sheets*) (Davies y Small, 1968). Años después este nombre fue ampliado a nuclear ELCS (Olins et al., 1998). Según su organización y número de láminas de cromatina, las ELCS se han clasificado en tres categorías: ELCS tipo 1 donde la lámina de cromatina está limitada por citoplasma en ambos lados, tipo 2 donde la lámina se encuentra entre el citoplasma y la cromatina nuclear y tipo 3 en los casos en los que la lámina de cromatina se encuentra rodeada por cromatina nuclear (Figura 11) (Olins y Olins, 2009).



**Figura 11. Organización y clasificación de las ELCS.** Imágenes de MET mostrando los distintos tipos de ELCS y sus correspondientes diagramas. (A-B) ELCS tipo 1-1 (A) y 1-2 (B) mostrando una lámina de heterocromatina limitada en ambos lados por las membranas nuclear interna y externa. Diagrama a. (C-D) ELCS tipo 2-1 y 2-2 donde se observan dos o tres láminas de cromatina, en las que una siempre se encuentra delimitada por las membranas nucleares y próxima ala citoplasma. Diagrama b. (E-F) ELCS Tipos 3-1 y 3-2. Las imágenes a, b, c y d proceden de muestras de células HL-60 tratadas durante 4 días con ácido retinoico. Las muestras c y e proceden de células HL-60 sobreexpresando BCL2 durante 14 días con ácido retinoico. C: citoplasma, N: núcleoplasma, círculos marrones: ribosomas, círculos negros:

## Introducción

fibras de 30 nm de heterocromatina, líneas marrones: membranas nucleares interna y externa. Adaptado de (Olins and Olins, 2009).

Aunque no se ha identificado ningún componente exclusivo de las ELCS nucleares, estudios inmunohistoquímicos en células HL-60 han mostrado que esta región expresa lámina B, LBR, y Lap2 (Olins y Olins, 2009). Cuando se produce la diferenciación de los neutrófilos *in vivo* e *in vitro* se forman las ELCS (Olins et al., 2008), lo que requiere de niveles suficientes de LBR. De hecho, en ausencia de LBR, el núcleo de los neutrófilos es ovoide, presenta una menor superficie de envoltura nuclear y la heterocromatina se distribuye centralmente (Hoffmann et al., 2007). Curiosamente, las ELCS nucleares no presentan expresión de DAPI, lamina A/C, nesprina ni SUN1, así como tampoco se han observado poros nucleares (Olins et al., 2008; 1998; 2001). Aunque se ha hipotetizado que las ELCS nucleares podrían facilitar los procesos de extravasación o participar en el silenciamiento de genes necesarios para la diferenciación celular (Olins y Olins, 2004; Sanchez y Wangh, 1999), el papel de estas estructuras sigue siendo desconocido.

		<i>Tipo celular</i>	<i>Especie</i>	<i>Referencias</i>
Tejidos Normales	Sistema Hematopoyético	Eritrocitos	Hyperoartia, Peces, <i>tritius cristatus</i> , <i>rana esculenta</i> , <i>Xenopus laevis</i> , y <i>Gallus gallus</i>	(Davies and Haynes, 1975; Davies and Small, 1968)
		Leucocitos	Mamíferos: Linfocitos, monocitos, neutrófilos y timocitos en desarrollo (cobaya y humano)	(Davies and Small, 1968; Huhn, 1967; Mikami et al., 2002; Olins et al., 1998)
	Sistema Nervioso Central	Astrocitos	Mamíferos ( <i>mus musculus</i> ); Zona Subcallosa en desarrollo y ZSV-V adulta fetal humana.	(Capilla-Gonzalez et al., 2014; Guerrero-Cazares et al., 2011; Wittmann et al., 2009)
		No especificado	Mamíferos (Humanos): retina en desarrollo	(Popoff and Ellsworth, 1969)

Tabla 2. ELCS en tejidos normales.

	<b>Patología</b>	<b>Tipo</b>	<b>Referencias</b>	
Tejidos Patológicos	Leucemia mieloide	Leucemia mieloide aguda	(Ahearn et al., 1967; Anderson, 1966; Olins et al., 1998)	
		Eosinofilos	(Djaldetti et al., 2009)	
		Leucemia mieloide crónica	(Thiele et al., 1990)	
		Leucemia crónica megacariocitos-granulocítica	(Thiele et al., 1977)	
	Leucemia linfoide	Leucemia linfoide aguda	(Eguchi et al., 1977; Ghadially, 1985; Mollo and Stramignoni, 1967)	
		Leucemia linfoide crónica	(1967)	
	Sistema Hematolinfoide	Linfoma	Linfoma de Burkitt y linfosarcoma infantil	(Epstein et al., 1966)
			Linfoma de Hodgkin	(Mollo and Stramignoni, 1967)
			Linfoma nodular	(Levine and Dorfman, 1975)
		Linfosarcoma	(Katayama and Schneider, 1977)	
	Anemia y pre-leucemia	Anemia de Fanconi granulocítica	(Barton et al., 1987)	
		Anemia sideroblástica granulocítica adquirida	(Djaldetti et al., 2004)	
		Anemia megaloblástica granulocítica	(Bunting and Selig, 2002)	
	Aneuploidia cromosomal	Trisomía D1 (13-15) (granulocitos)	(Lutzner and Hecht, 1966)	
		Trisomía 14 (granulocitos)	(Dallapiccola et al., 1984)	
		Síndrome de Down (granulocitos)	(Djaldetti et al., 2004)	
	Sistema nervioso	Meduloblastoma	(Tani et al., 1971)	
	Sistema respiratorio	Carcinoma	Carcinoma pulmonar	(Mollo et al., 1969)
			Carcinoma broncogénico (granulocitos)	(Clausen and Haam, 1969)
	Piel	Dermatofibrosarcoma	(Mollo et al., 1969)	
Sistema endocrino	Carcinoma papilar de tiroides	(Beaumont et al., 1981)		
Mama	Fibroadenoma	(Ghadially, 1985)		

Tabla 3. ELCS en tejidos patológicos.





# **Hipótesis y Objetivos**



## **2 Hipótesis y objetivos**

### **2.1 Hipótesis**

**H<sub>0</sub>:** Las células madre neurales quiescentes de la ZSV-V presentan una morfología nuclear distintiva caracterizada por la presencia de láminas de cromatina limitadas por la envoltura nuclear o ELCS.

**H<sub>A</sub>:** Las células madre neurales quiescentes no presentan diferencias morfológicas nucleares distintivas.

### **2.2 Objetivos**

1. Determinar la relación entre las invaginaciones nucleares previamente descritas en las células B y las ELCS nucleares.
2. Estudiar la organización nuclear de las células B de la ZSV-V y determinar si existen diferencias nucleares entre los estados quiescentes y activos.
2. Estudiar el momento y el proceso de formación de las invaginaciones nucleares en los precursores gliales de las células B1 durante desarrollo embrionario.
3. Estudiar los posibles factores epigenéticos implicados en los cambios de la arquitectura nuclear en células madre neurales.
4. Estudio comparado de la morfología nuclear de las células madre de la ZSV-V y la ZSG del giro dentado del hipocampo.
5. Estudio comparado de la morfología nuclear de las células madre neurales de la ZSV-V en primates no-humanos y humanos.



# **Material y Métodos**



### 3 Material y métodos

#### 3.1 Animales

##### 3.1.1 Ratones

Los estudios realizados en el presente proyecto de tesis se llevaron a cabo en ratones CD1 (Charles River) con edades comprendidas entre el estadio embrionario E10 y los P630 (21 meses edad).

Para los estudios de time-lapse se utilizaron ratones transgénicos GFP:GFAP (FVB/N-TgGFAPGFP14Mes/J) (Laboratorios Jackson).

Los animales se mantuvieron a 22°C en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso a agua y comida *ad libitum*. El cuidado y la manipulación de los animales se llevó a cabo de acuerdo con las directrices del Comité de Ética y Experimentación de la Universidad de Valencia, y bajo la autorización del Servicio de Sanidad y bienestar animal de la Generalitat Valenciana (2015/VSC/PEA/00068).

<b>Técnica</b>	<b>Edades</b>	<b>Fijación</b>
<b>Estudio morfológico (MET)</b>	E10-18, P0, P15, P30, P60, P120, P240, P360, P630 (N=4 por grupo)	PFA 2%-GA 2,5%
<b>Whole-mount (MET)</b>	P60 (N=2)	PFA 2%-GA 2,5%
<b>Inmuno-oro “pre-“ y “post-“ inclusion.</b>	E18, P0, P60 (N=3 por grupo)	PFA 4%-GA 0,5%
<b>Immunofluorescencia</b>	E18, P60 (N=3 por grupo)	PFA 4%
<b>Whole-mounts</b>	P60 (N=15)	PFA 4%
<b>Inyección AraC</b>	P60 (N=9)	PFA 2%-GA2,5%/ PFA 4%
<b>Proliferación 3H-timidina</b>	P0, P21, P60, P120 (N=3 por grupo)	PFA 2%-GA 2,5%
<b>Cultivos Monocapa</b>	P7-8 (N= 12)	-----
<b>Cultivos Neuroesferas</b>	P60 (N=10)	-----
<b>Electroporación</b>	P1 (N=8)	-----
<b>Life imaging</b>	P5 (N=2)	-----

Tabla 4. Edad y procedimiento de fijación de los ratones utilizados para los diferentes estudios. MET: Microscopía electrónica de transmisión, PFA: paraformaldehído, GA: glutaraldehído.



### **3.1.2 Primates no-humanos**

Los primates no-humanos empleados fueron monos neonatales (Clea, n=3, P0-1) y adultos (Clea, n=3, 2.5 años) de la especie *Callithrix jacchus*.

Los animales se estabularon bajo condiciones estándar de intercambio de aire y humedad relativa (50%) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los protocolos experimentales hasta la eutanasia y perfusión intracardiaca fueron llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Kazunobu Sawamoto en la Universidad de Nagoya, Japón; y fueron aprobados por el Comité ético del Instituto Central de Animales de Experimentación de las Universidades de Keio y Nagoya.

### **3.1.3 Muestras humanas**

La muestra de la ZSV humana fetal (18 semanas gestacionales) se obtuvo durante la autopsia (intervalo post-mortem de menos de 48 horas) por el laboratorio del Dr. Álvarez-Buylla en la Universidad de California en San Francisco (UCSF). El tejido se obtuvo con el previo consentimiento informado de los familiares y las regulaciones éticas institucionales del Comité de experimentación Humana de UCSF.

## **3.2 Diseño experimental**

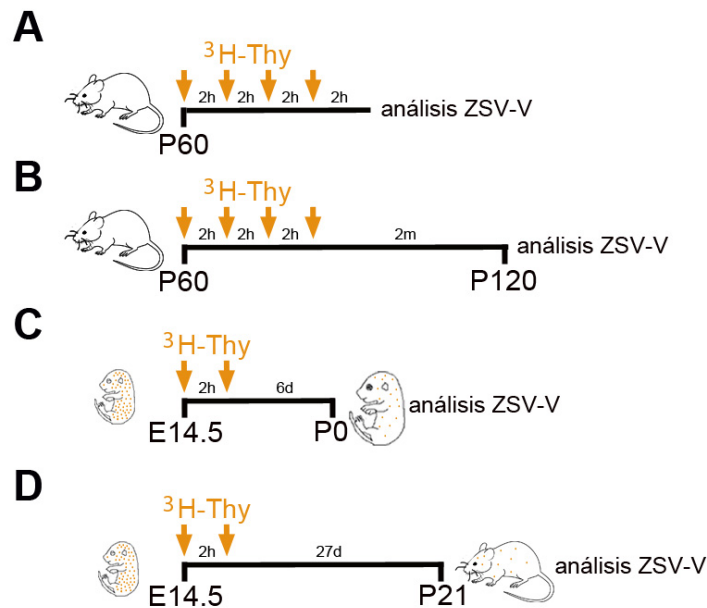
### **3.2.1 Inyección de <sup>3</sup>H-Timidina**

Para la determinación de la morfología nuclear de las células en proliferación y los estudios de pulso y captura, se realizaron inyecciones intra-peritoneales de <sup>3</sup>H-Timidina (1,67ul/g, actividad específica 1mCi/ml. Dosis: 1,67 uCi/g. Perkin Elmer).

El protocolo de inyección para el estudio morfológico de las células en proliferación (n=3), consistió en 4 inyecciones intraperitoneales de <sup>3</sup>H-Timidina (1,67ul/gr) en intervalos de 2 horas, y sacrificio a las 2 horas de la última inyección. Para el estudio de la posible formación de ELCS a tiempo largo, los animales recibieron el mismo protocolo de inyección (n=3), y se sacrificaron 2 meses tras la inyección.

Por otra parte, para los estudios de nacimiento celular y estudio de las células que retienen marcaje en el desarrollo, se realizaron dos inyecciones intraperitoneales de <sup>3</sup>H-

Timidina (3,34ul/gr por inyección) a una hembra preñada en el estadio E14.5. Tras el nacimiento de las crías, estas se eutanizaron en P0 (n=4) y P21 (n=4) .



**Figura 12. Protocolos inyección timidina.** A) Estudio de la morfología nuclear de las células en proliferación en la ZSV-V. B) Estudio de la morfología nuclear de las células que retienen marcaje dos meses tras la inyección. C, D) Estudio de la morfología nuclear de las células marcadas durante el estadio E14.5 en P0 y P21.

### 3.3 Bombas Ara-C

Se llevó a cabo la activación de las bombas osmóticas (Alzet 1007D, flujo 0.5 ul/hr, 6 días) con citósido-D-arabinofuranósido (Ara-C 2%, Sigma) en salino 0.9%. Tras 12 horas de activación, se implantaron las bombas cargadas en la superficie cerebral de los ratones mediante estereotaxia. Las coordenadas con respecto a Bregma usadas fueron: anterior (A=0), lateral (L=1.1) y profundidad (P=0.1). Tras 6 días de infusión de Ara-C las bombas fueron retiradas y los animales fueron eutanizados 0 y 14 días después. Para confirmar la liberación del Ara-C se pesaron las bombas tras ser activadas y después de su retirada.

### 3.4 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Los ratones destinados al estudio de MET (n=30), fueron perfundidos con solución salina 0.9%, seguida de PFA 2%-glutaraldehido 2,5% (EMS). Los cerebros se post-fijaron durante 12 horas en el mismo fijador y posteriormente se lavaron en tampón fosfato (PB) 0.1M. Se obtuvieron secciones coronales de 200 $\mu\text{m}$  de grosor en el

vibrátomo VT1000M (Leica) y se post-fijaron con tetraóxido de osmio 2% (EMS) en PB 0.1M durante hora y media. Se llevo a cabo la deshidratación de los cortes con alcoholes de concentraciones crecientes, se contrastaron con acetato de uranilo 2% (2 horas) y se incluyeron en la resina epoxi, Durcupan (Fluka, Sigma). Una vez polimerizada la resina (2 días), se seleccionaron cortes que contenían la ZSV-V y se realizaron secciones semifinas de 1.5  $\mu\text{m}$  de grosor con cuchilla de diamante. Las secciones obtenidas se tiñeron con azul de toluidina y se analizaron con el microscopio óptico ECLIPSE E800 (NIKON). Para el estudio ultrastructural con MET (Tecnai Spirit G2, Fei), se obtuvieron secciones ultrafinas de 60-70 nm de grosor. Las imágenes se adquirieron con la cámara digital “Morada” (Soft Imaging System, Olympus).

### **3.4.1 Autorradiografía**

A partir de las muestras inyectadas con  $^3\text{H}$ -timidina e incluidas para MET, se realizaron cortes semifinos (1.5  $\mu\text{m}$ ), que se cubrieron con emulsión autorradiográfica tipo NTB (Carestream) y se incubaron durante 29 días a 4°C en cajas opacas con silicagel. Tras realizar el revelado autorradiográfico con revelador (Agfa), agua destilada y fijador (Tiosulfato sódico 30%), se procedió a la tinción de los cortes con azul de toluidina y al análisis con el microscopio óptico (Nikon Eclipse E-800). Se estudiaron las células marcadas en los cortes y se seleccionaron las células que presentaban más de 5 granos de plata localizados en el núcleo y que estaban presentes en, al menos, 3 secciones semifinas seriadas. Los semifinos seleccionados se re-incluyeron y cortaron en cortes ultrafinos consecutivos para estudiar la morfología celular de cada célula marcada con MET.

### **3.4.2 Reconstrucciones tridimensionales**

Para el estudio de la organización tridimensional del núcleo de las células madre neurales y cuantificaciones de células B con ELCS, se realizaron aproximadamente 130 cortes ultrafinos consecutivos de la ZSV-V (recogidos en 6 rejillas) de cada ratón (4 ratones P60 y 2 ratones P630). Se obtuvieron fotografías de toda la longitud de la ZSV-V a 4200 aumentos en el corte 65 aproximadamente y se montaron en tiras de papel. Se asignó un número a cada uno de los astrocitos presentes en las tiras y se siguió cada una de estas células a lo largo de los 130 cortes ultrafinos. Para la estimación del porcentaje de células que presentaba ELCS, tan solo se consideraron las células cuyo núcleo pudo ser reconstruido totalmente.

Para el estudio de la morfología nuclear de las células marcadas con timidina, de cada una de las secciones semifinas en las que la célula se encontraba marcada se

realizaron cortes ultrafinos seriados (aproximadamente 20 cortes por semifino, de entre 3 y 6 semifinos). Se obtuvieron imágenes de todos los cortes y se consideraron células reconstruidas aquellas en las que se estudio el volumen total del núcleo.

## 3.5 Inmunohistoquímica

### 3.5.1 Inmunofluorescencia

Los animales usados para los estudios de inmunofluorescencia en cortes coronales, se perfundieron con solución salina 0.9% seguida de PFA al 4%. Los cerebros se post-fijaron con el mismo fijador durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron en PB 0.1M y se crioprotegieron con sacarosa al 30% en PB-Azida. Una vez crioprotegidos, los cerebros se cortaron coronalmente en secciones de 25  $\mu\text{m}$  de grosor con el criostato (Leica). Para los estudios de inmunofluorescencia en *whole-mount*, los animales fueron profundamente anestesiados y se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se extrajo el cerebro del cráneo y se diseccionaron las paredes de los ventrículos laterales bajo la lupa estereoscópica. Las paredes ventriculares se fijaron por inmersión con PFA al 4% durante 24 horas. En ambos casos, se realizó un paso de desenmascaramiento antigénico con *immunosaver* (EMS) (1:200) a 60°C durante 20 minutos y a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los anticuerpos primarios y secundarios se incubaron con PB 0.1M y triton X-100 al 0.2% con suero normal de cabra (NGS) ó de burro y caseína al 10 % durante 24 horas a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados se muestran en la tabla 5.

### 3.5.2 Inmunohistoquímica “pre-inclusión”

Los animales se perfundieron con solución salina 0.9% seguida de PFA al 4% con glutaraldehído 0.5%. Los cerebros fueron post-fijados con PFA al 4% durante 24 horas y se realizó el protocolo de inmuno-oro como se describe en (Sirerol-Piquer et al., 2012). Se cortaron secciones de 50  $\mu\text{m}$  de grosor con el vibrátomo y se incubaron con una solución de borohidruro sódico al 0.1% para eliminar los enlaces del glutaraldehído. Para las inmunos contra antígenos nucleares se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y Triton X-100 al 0.2%. Para permeabilizar el tejido sin dañar las membranas, los cortes se crioprotegieron con sacarosa al 25% durante 30 minutos y se sometieron a 5 ciclos de congelación-descongelación en metilbutano a -60°C. A continuación los cortes se incubaron con la solución bloqueante con seroalbumina bovina acetilada (BSAc, Aurion) y con el anticuerpo primario adecuado durante 72

## *Material y Métodos*

horas a 4°C. Las secciones se lavaron con PB y se bloquearon con BSAc al 0.5% y gelatina de pescado al 0.15% durante una hora. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal de 0.8 nm adecuado (1:50) durante toda la noche a temperatura ambiente. Para incrementar el tamaño de las partículas de oro coloidal y hacerlas visibles al MET, las muestras se lavaron en PB 0.1M y acetato sódico al 2%, y se incubaron con el kit de intensificación de plata (Aurion) entre 10 y 30 minutos. Para estabilizar las partículas de plata y evitar su pérdida, las secciones se incubaron con cloruro de oro al 0.05% y se fijaron con tiosulfato sódico al 0.3%. Posteriormente, las secciones fueron post-fijadas con glutaraldehído al 2% y se procesaron para MET. En el proceso de inclusión, el osmio se preparó al 1% con glucosa al 7% durante 30 minutos.

### **3.5.3 Inmunohistoquímica “post-inclusión”**

Los animales usados para las técnicas de inmunohistoquímica post-inclusión fueron perfundidos con solución salina 0.9% seguida de PFA al 4% con glutaraldehído 0.5%. Para el estudio inmunohistoquímico post-inclusión en secciones semifinas, se realizaron secciones semifinas seriadas de 1 µm de grosor. Para eliminar la resina epoxi y permitir el acceso de los anticuerpos, las muestras se incubaron con etóxido durante 15 minutos. Las muestras se hidrataron y trataron con metaperyodato al 1% para bloquear las peroxidasas y borohidruro al 1% para eliminar el glutaraldehído. Se bloquearon con NGS al 5% durante 30 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche. Al día siguiente, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado adecuado (Vector 1:200) durante 1 hora. Se reveló con el kit ABC (Vector) con DAB al 0.05% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.01%. Finalmente las secciones se montaron con el montaje permanente Eukitt. El porta alterno se tiñó con azul de toluidina y se correlacionaron las células marcadas con la morfología celular de los cortes contiguos.

Para el estudio inmunohistoquímico post-inclusión en secciones ultrafinas, se cortaron secciones ultrafinas (70nm) y se transfirieron a rejillas de níquel. Las rejillas se colocaron sobre las gotas de los reactivos dispuestas sobre una pieza de Parafilm. Para la eliminación de la resina epoxi, las rejillas se incubaron en ácido periódico 1% durante 10 minutos. Se realizaron 3 lavados con PB de 3 minutos, y se transfirieron a una solución de metaperiodato sódico 2% en H<sub>2</sub>O durante 15 minutos y se lavó de nuevo en gotas de H<sub>2</sub>O 3 veces. Para la inactivación de los grupos aldehído presentes tras la fijación con PFA 2%-GA 2,5%, se incubaron en borohidruro sódico 1% en H<sub>2</sub>O durante 30 minutos, lavadas en Tris-HCL 0.05M-NaCl 0.9% e incubadas en ovoalbúmina 1%

durante 30 minutos. Se transfirieron al anticuerpo primario específico durante dos horas, y se lavaron dos veces en Tris-HCL 0.05M-NaCl 0.9% 10 minutos por lavado. Se procedió a la incubación en 0.05M Tris-HCL- 0.9% NaCl with 1% BSA and 0.5% Tween-20 durante 10 minutos y se transfirieron las rejillas a las gotas con el anticuerpo secundario conjugado con oro apropiado (oro coloidal 10 nm) en la misma solución durante dos horas. Finalmente, las rejillas se lavaron en H<sub>2</sub>O 3 veces y fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo.

<b>Antígeno</b>	<b>Inmunógeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Casa comercial, referencia, dilución</b>
<b>Actina</b>	Actina purificada de la molleja de pollo	ratón monoclonal IgG2bk	Millipore, MAB1501, (1:100)
<b>BLBP</b>	Proteína recombinante unida a GST correspondiente a la proteína de unión a lípidos humana	conejo policlonal	Millipore, ABN14, (1:600)
<b>DsRed</b>	DS-red express	conejo policlonal	Clontech, 632496, (1:200)
<b>EGFR</b>	Dominio C-terminal del receptor de EGF (EGFR) (número Q01279)	conejo policlonal IgG	Millipore, 06-847, (1:200)
<b>GFAP</b>	GFAP purificada de médula espinal de vaca	ratón monoclonal IgG	Millipore, MAB360, (1:500)
<b>GFAP</b>	GFAP purificada de médula espinal de vaca	conejo policlonal IgG	Dako, Z0334, (1:500)
<b>Glast</b>	Péptido sintético correspondiente a 20 residuos del C-terminal de EAAT1 de rata	conejo policlonal IgG	Abcam, Ab416, (1:100)
<b>HP1</b>	HP1 alfa humana (aa1-191)	conejo policlonal IgG	Santa Cruz, sc-28735, (1:100)
<b>H3lys9me3</b>	Péptido sintético para H3 humana (aa1-100, N terminal) (tri methyl K9) conjugado con KLH	conejo policlonal IgG	Abcam, Ab8898, (1:100)
<b>H3lys27me3</b>	Péptido lineal correspondiente a la H3K27me3 humana	ratón monoclonal IgG2bk	Millipore, 05-1951, (1:100)
<b>Lámina B</b>	C-terminal de la proteína lámina-B1 de origen humano	cabra IgG	Santa Cruz, sc-6216, (1:150)
<b>LAP2</b>	N-terminal de LAP2 humana	conejo policlonal IgG	Santa Cruz, sc-28541, (1:100)
<b>LBR</b>	LBR humana (aa 1-218)	cobaya	Dr. Harald Herman lab, DKFZ (1:100)
<b>Nestina</b>	Péptido sintético correspondiente a la Nestina humana (aa 254-270)	Conejo policlonal	Sigma Aldrich, N5413, (1:200)
<b>p57<sup>Kip2</sup></b>	Péptido sintético derivado de p57 kip2 humana	conejo policlonal IgG	Sigma, P035
<b>TRF2</b>	TRF2 humano (aa 49-300)	conejo policlonal IgG	Santa Cruz, sc-9143,
<b>β-catenina</b>	β-catenina de ratón (aa 571-781)	conejo policlonal IgG	BD, 610153
<b>γ-tubulina</b>	Péptido sintético N-terminal de γ-tubulina humana (aa. 38-53, con Lys terminal) conjugado con KHL	conejo policlonal IgG	Sigma, T5192
<b>5mC</b>	Molécula pequeña química correspondiente a la 5-methylcitosina (5-mC)	ratón monoclonal IgG	Abcam, Ab10805

Tabla 5. Listado de anticuerpos primarios.

## 3.6 Cultivos celulares

### 3.6.1 Cultivos adherentes en monocapa

Se realizaron cultivos en monocapa tal y como se describe en (Park et al., 2014). Para el estudio de la morfología nuclear de las células presentes en el cultivo primario en monocapa, las ZSV-V de ratones P7-8 fueron microdisecionadas y disociadas con tripsina 0.25% en EDTA. Las células se sembraron a una concentración de ~30,000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 6 pocillos en medio de proliferación N5: DMEM/F12 (Invitrogen), FCS 5% (Hyclone), EGF 20 ng/mL (Peprotech), bFGF 20 ng/mL (Peprotech) y extracto de pituitaria bovina 35 µg/mL. Tras 4 días (cultivo confluyente) se procedió a la fijación, procesado y análisis de las células con MET y fluorescencia. Para el estudio de la presencia de ELCS nucleares en el cultivo monocapa diferenciado, las células fueron pasadas 4 veces y se eliminaron los factores EGF y FGF para indujo inducir la diferenciación (medio N6) (Figura 13A).

Para descartar el posible efecto de los factores de crecimiento en las ELCS nucleares de las células cultivadas, se realizaron cultivos primarios sin EGF y FGF. Como medio de mantenimiento se usó Neurobasal B-27 (Thermo Fisher) . Adicionalmente, se redujo el tiempo de cultivo y se retiró el suero (Figura 13B).

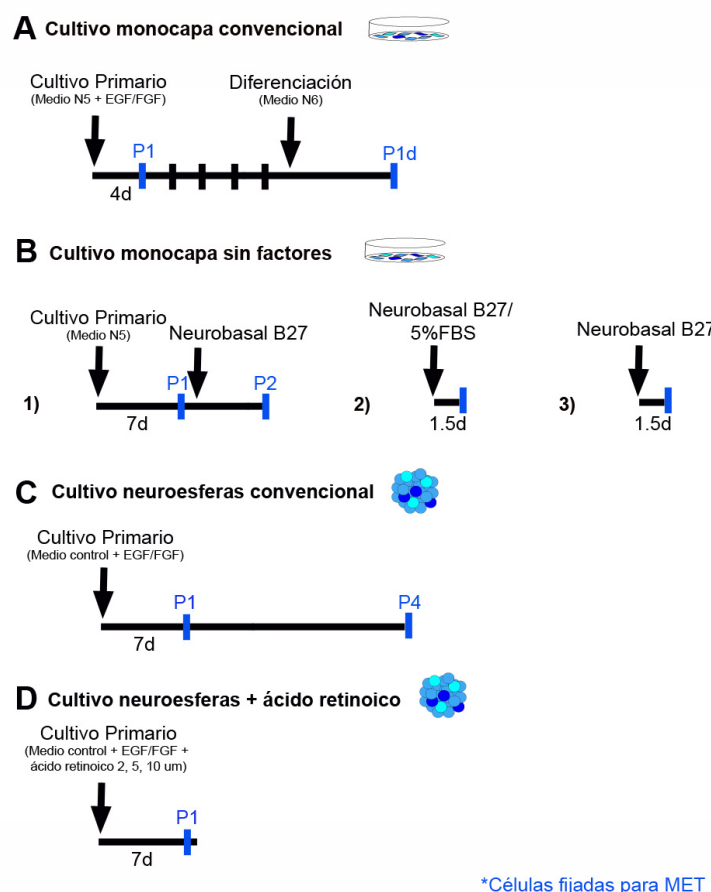
Para los estudios de MET las células fueron fijadas con glutaraldehído al 3%, mientras que las células usadas en los estudios de fluorescencia se fijaron con PFA 4%. Para la determinación de la presencia/ ausencia de ELCS en los presentes ensayos *in vitro* estudiamos más de 1000 células en cortes semifinos y ultrafinos.

### 3.6.2 Cultivos de neuroesferas

Los ratones empleados en el presente ensayo fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se procedió a la extracción del cerebro y a la disección de la pared ventricular tal y como se refleja en el diagrama. La disección se llevó a cabo con un estereoscopio en la solución PBS (Gibco). Durante el proceso de disección las paredes ventriculares diseccionadas se mantuvieron en DMEM (Gibco) en hielo. Las paredes ventriculares fueron troceadas y se procedió a la adición de la solución de papaína para la digestión celular. Tras 30 minutos a 37°C, las células fueron centrifugadas, se bloqueó la actividad de la papaína con BSA y se procedió a la disgregación mecánica de las mismas. Las células se sembraron en medio control (DMEM/F12, L-glutamina 2mM, glucosa 0.6%, putrescina 9.6 mg/mL, progesterona 6.3 ng/mL, sodio selenito 5.2 ng/mL, insulina 0.025 mg/mL, transferrina 0.1 mg/mL, heparina 2 mg/mL y

antibiótico/antimicótico) suplementados con EGF (20 ng/mL: Invitrogen Life Technologies) y FGF (human recombinant FGF, 10 ng/mL; Sigma Aldrich) (Gritti et al., 1999). Las células fueron mantenidas *in vitro* a 37°C en una atmósfera humidificada con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5%. Para los análisis de MET las neuroesferas se fijaron con glutaraldehído al 3% (EMS) en el pase 1 y el pase 4 (Figura 13C). Se estudió la morfología nuclear de más de 1000 células (procedentes de 10 neuroesferas) en secciones semifinas y ultrafinas.

Para el estudio de inducción de las ELCS realizamos cultivos primarios de neuroesferas en los que añadimos ácido retinoico en las concentraciones 2, 5 and 10 µM (Sigma). Tras 7 días, fijamos las neuroesferas con glutaraldehído al 3% y las estudiamos con MET. En todos los ensayos realizados, utilizamos la línea de leucemia mieloide como control positivo de la inducción de ELCS por parte del ácido retinoico. Como control negativo, utilizamos DMSO (2, 5 y 10 µM) (Figura 13D).



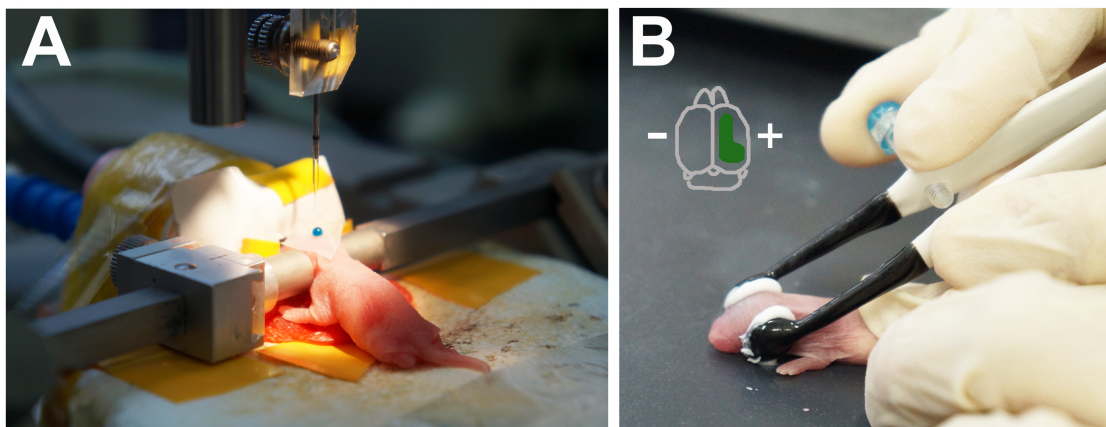
**Figura 13. Ensayos *in vitro* utilizados para el estudio de las ELCS nucleares en células madre de la ZSV-V.** (A) Las células procedentes del cultivo primario en monocapa fueron fijadas en P1. Tras la diferenciación otro grupo de células fue fijado y analizado en el P1. (B) 1) Se estudiaron células cultivadas en medio N5 sin factores de crecimiento. Otro grupo de células fue mantenido con Neurobasal B27 y fijado en P2. 2) Se estudiaron células cultivadas 1.5 días con Neurobasal B27 y FBS 5%. 3) Se estudió el mismo grupo 2) pero retirando el FBS 5%. P1: pase 1, P1d: pase 1 en diferenciación, P2: pase 2, P4: pase 4.



### 3.7 Electroporación postnatal

Para la electroporación postnatal se usaron los plásmidos Td-tomato-Lamin B1-10 (Addgene) y mCherry-Lamin B1-10 (Addgene) ( $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Se preparó la solución de inyección compuesta por cada plásmido de ADN y la solución *green fast* (1:1). Los ratones P1 GFAP:GFP fueron colocados en el estereotáxico y anestesiados con una cámara de isofluorano. Los capilares de vidrio (Wiretrol 5ul) fueron cargados con la solución de inyección evitando la aparición de burbujas. Seguidamente, se llevó a cabo la inyección estereotáxica intraventricular de la solución de ADN en las coordenadas Bregma (A=1.8, P= 2 y L= 1.2). Esperamos un par de minutos tras la inyección y procedimos a la electroporación (CUY21 Single cell) con electrodos P7 (Figura 14). Se realizaron entre dos y tres pulsos hasta alcanzar los 70 voltios. Posteriormente, se reanimaron los ratones.

Para determinar la eficiencia de los plásmidos, se eutanizaron y perfundieron ratones electroporados en P5 y P15 y se analizó de células marcadas en la ZSV-V. El plásmido mCherry-Lamin B1-10 mostró una menor eficiencia (3 células marcadas por sección) y el marcaje fue mas débil. Por el contrario, los cerebros electroporados con el plásmido Td-tomato-Lamin B1-10 presentaron un mayor número de células marcadas (más de 10 por corte) y el marcaje fue intenso. Por lo tanto, los experimentos de *live-imaging* fueron llevados a cabo con ratones electroporados con Td-tomato-Lamin B1-10.



**Figura 14. Inyección estereotáxica y electroporación.** (A) Imagen de la colocación de un ratón P1 en el estereotáxico, mientras se procede a cargar la solución de inyección en la micropipeta. (B) Imagen de la electroporación del ratón inyectado en la imagen A. El polo positivo de los electrodos localiza en el hemisferio inyectado con el plásmido.

### 3.8 Time-lapse

Los ratones P5 GFAP:GFP que habían sido electroporados en P1 se sacrificaron por dislocación cervical. Los cerebros extraídos fueron cortados en secciones coronales de 170  $\mu\text{m}$  de grosor con el vibrátomo (VT1200S, Leica, Wetzlar, Germany) en medio DMEM. Las secciones obtenidas fueron colocadas en una placa con líquido cefalorraquídeo. Con un microscopio de fluorescencia se seleccionaron los cortes que presentaban mayor concentración de células marcadas y se diseccionó la ZSV-V. Las secciones seleccionadas fueron colocadas en una cámara (Warner instruments) bajo la perfusión continua de líquido cefalorraquídeo artificial (1 ml/min) (NaCl 125 mM,  $\text{NaHCO}_3$  26 mM, KCl 3 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1.3 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25 mM, y glucosa 20 mM, pH 7.4, mantenido a 38 °C, y aireado con  $\text{O}_2$  95% y  $\text{CO}_2$  5%). A través de un microscopio confocal laser (LSM710, Carl Zeiss) equipado con un detector de Arseniuro fosforo de galio y un objetivo de 63X, se obtuvieron imágenes secuenciales en z-stack durante 12 horas. Los astrocitos radiales se identificaron claramente por su morfología radial, con la región apical en contacto con la luz ventricular y una larga expansión radial hacia el parénquima.



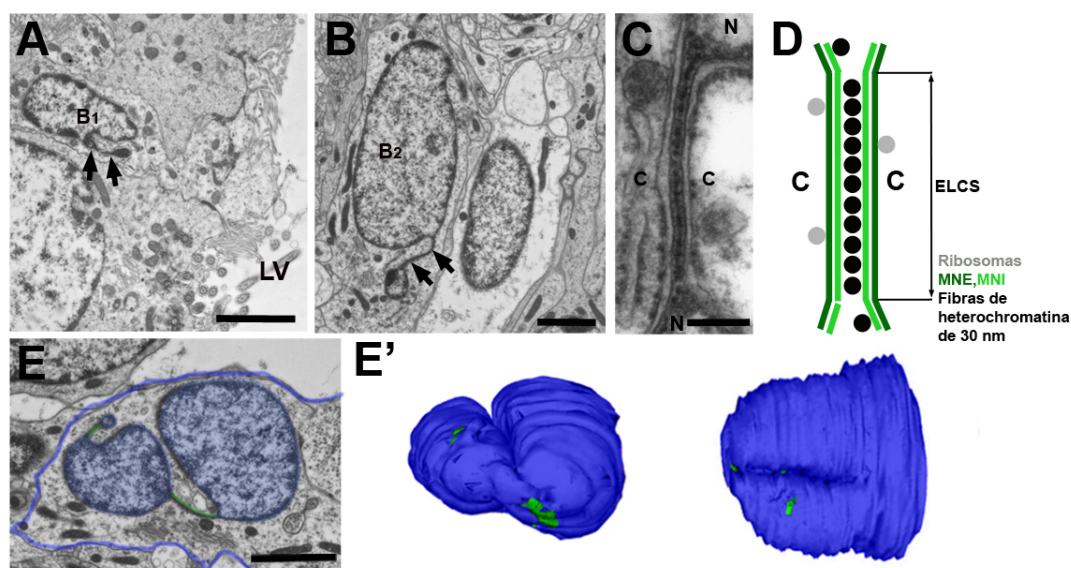
# Resultados



## 4 Resultados

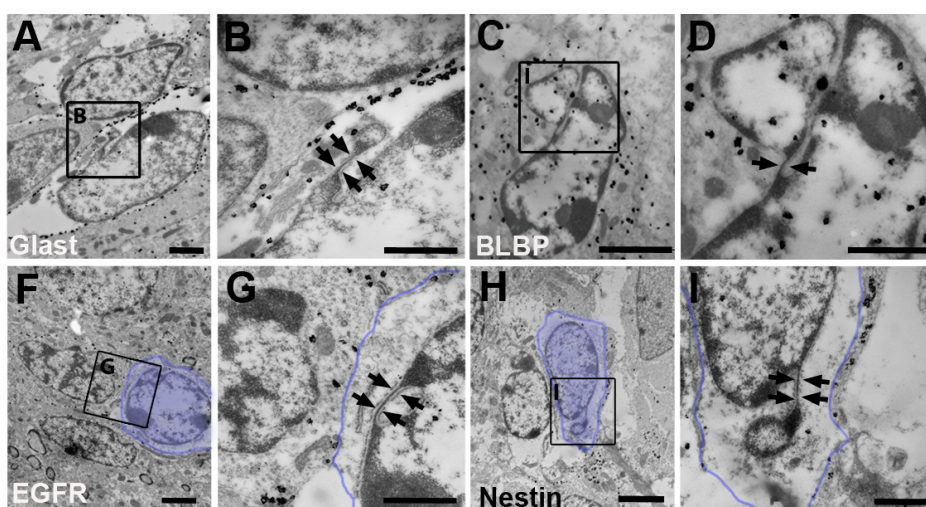
### 4.1 Un subconjunto de células tipo B presentan ELCS nucleares.

El primer objetivo de la presente tesis fue estudiar los aspectos morfológicos del núcleo de las células B de la ZSV-V de roedores. Trabajos previos han descrito que estas células presentan un núcleo irregular y en ocasiones invaginaciones inusuales de la envoltura nuclear (Capilla-Gonzalez et al., 2014; Doetsch et al., 1997; Guerrero-Cazares et al., 2011), sin embargo estos estudios no detallan las características de estas invaginaciones. Tras realizar un estudio ultraestructural fino de los núcleos de las células B determinamos que estaban formadas por una lámina de cromatina simple de 30 nm delimitada en ambos lados por las membrana nuclear interna y externa. Curiosamente, estas estructuras se asemejaban a las ELCS nucleares previamente descritas en neutrófilos (Olins y Olins, 2009). Sin embargo, desconocíamos si estas estructuras nucleares están presentes en todos los tipos de células tipo B, o tan solo en una subpoblación funcionalmente relevante. Para caracterizar las células B con ELCS, examinamos la ZSV-V de ratones P60 con MET. En secciones ultrafinas, las ELCS se encontraron en el  $11,98\% \pm 0.43\%$  de las células B de la ZSV-V (1052 células estudiadas), incluyendo las células B1 y B2 (Figura 15A,B). Para determinar de una forma más exacta la proporción de células B con ELCS, llevamos a cabo reconstrucciones tridimensionales seriadas del núcleo completo de 160 células B. Encontramos que prácticamente la mitad de los astrocitos de la ZSV-V ( $45.62\% \pm 3.3\%$ ) presentaban ELCS. Frecuentemente, estas células se encontraban formando grupos de 2 a 4 células en las regiones dorsal, lateral y medial de las paredes de los ventrículos laterales, pero ninguna en el estriado adyacente. Además, ninguno de los otros tipos celulares de la ZSV-V (células E, C o A) presentaron esta estructura. Tridimensionalmente, estas células mostraron entre 1 y 2 ELCS nucleares con una longitud entre 0.4–2  $\mu\text{m}$  que representaba aproximadamente el 0.20% del volumen total del núcleo (para ver la secuencia de imágenes reconstruida ver video suplementario). La membrana nuclear externa de las ELCS presentaba ribosomas adheridos y carecía de poros nucleares. Los grumos de heterocromatina generalmente se encontraban asociados a los extremos de las ELCS (Figura 15C-D) y el 90% de las ELCS se encontraban internalizadas en el núcleo irregular (Figura 15E).



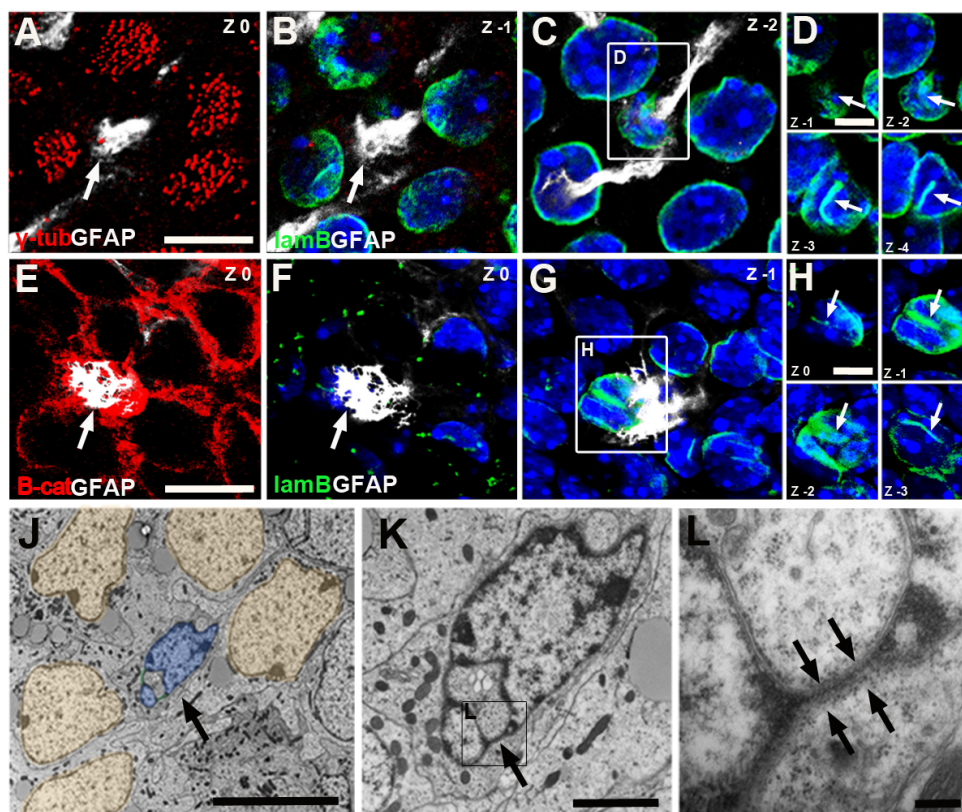
**Figura 15. Las células B de la ZSV-V muestran ELCS.** (A, B) Imágenes de MET de una célula tipo B1 contactando la luz ventricular y una célula B2 con ELCS (flechas). (C, D) Micrografía de una ELCS nuclear y su esquema mostrando la configuración típica de las fibras de heterocromatina de 30 nm limitadas en ambos lados por las membranas nuclear interna y externa. (E) Imagen pseudo-coloreada de una célula tipo B con ELCS mostrando la membrana plasmática y el núcleo en azul, y las ELCS en verde.. (E') reconstrucción 3D del núcleo de una célula tipo B. Las ELCS nucleares se encuentran representadas en verde. Ver el video 1. Escala, 2  $\mu$ m (A, B), 200nm (C), 2  $\mu$ m(E). C: citoplasma, N: núcleo.

Para caracterizar molecularmente la población de células tipo B que presentaba ELCS, llevamos a cabo inmuno-oro pre-inclusión contra los marcadores BLBP, GFAP, Nestina, EGFR y GLAST. Las células con ELCS fueron GFAP+, BLBP+, Glast+, EGFR- y Nestina- (Figura 16A-I). Este patrón de expresión se correspondía con el recientemente descrito para las células madre neural quiescentes (Codega et al., 2014).



**Figura 16. Expresión de marcadores moleculares en las células B con ELCS.** (A-D) Inmunodetección con oro contra GLAST y BLBP. Las células B con ELCS (flechas) expresan ambos marcadores. (F-I) Inmuno-oro contra EGFR y Nestina mostrando que las células con ELCS (pseudo-coloreadas en azul, flechas) son negativas para estos marcadores. Como control positivo interno podemos observar marcaje en las células adyacentes.

Las células tipo B1 (que contactan con el líquido cefalorraquídeo desde el centro del *pinwheel*) son relativamente quiescentes y derivan de la glía radial embrionaria (Fuentealba et al., 2015; Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Para determinar la población de células B1 que presentaba ELCS, modificamos la técnica de preparaciones en *whole-mount* de las paredes ventriculares (Mirzadeh et al., 2010). Con microscopía confocal, realizamos secciones ópticas seriadas de la ZSV-V. Localizamos las terminaciones apicales GFAP+ de las células B1 en el centro del *pinwheel* y las seguimos hasta llegar al núcleo delimitado por la lámina B y DAPI. La mayoría (82.98%  $\pm$  1,03) de las células B1 contactando la luz ventricular presentaron un núcleo irregular y un intenso marcaje contra la lamina B (n = 104 *pinwheels*) (Figura 17A-H). Tras el análisis de secciones ultrafinas en *whole-mount* con MET, confirmamos que la morfología nuclear irregular de las células tipo B1 se correspondía con las ELCS nucleares (Figura 17I-K). Para confirmar que las profundas invaginaciones nucleares que presentaban las B1 correspondían a la zona de las ELCS, analizamos secciones ultrafinas de *whole-mounts* con microscopía electrónica. Nuestros resultados sugieren que una subpoblación de células B1 contienen ELCS.

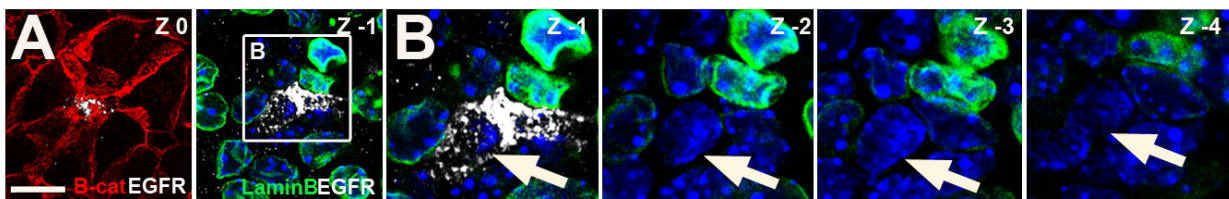


**Figura 17. Las células B1 localizadas en el centro del *pinwheel* presentan ELCS.** (A-H) Imágenes de confocal de un *whole-mount* de la ZSV-V marcado contra  $\gamma$ -tubulina (a-d) rojo,  $\beta$ -catenina (e-h, rojo), GFAP (blanco) y lamina B (verde), para visualizar el núcleo de las células B1 uni-ciliadas. Los detalles muestran secciones en Z del núcleo irregular con elevada expresión de lámina B1 en las células B1 (flechas). (J) Micrografía de un *pinwheel* mostrando el núcleo de una célula B1 con ELCS (pseudocoloreada en azul) y los núcleos de las células ependimarias (marrón). (K-L) Detalle de la célula B1 en (J), presentando ELCS (flechas). Escala, 10  $\mu$ m (A-J), 2  $\mu$ m (K) y 200 nm (L).



## 4.2 Células B durmientes presentan ELCS nucleares

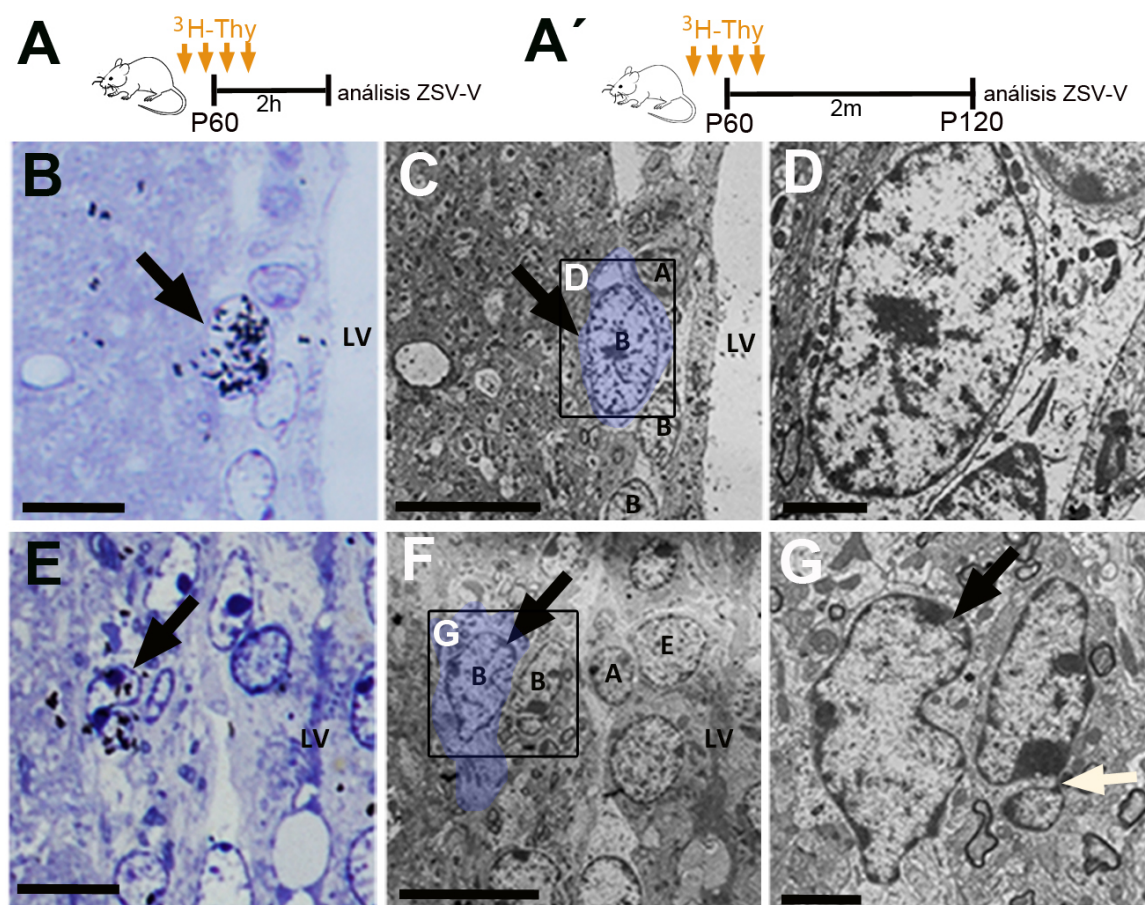
Posteriormente quisimos saber qué estado de activación presentaban las células B con ELCS. Se ha descrito que la expresión de EGFR se encuentra asociada a la activación de las células B (Codega et al., 2014). Encontramos que el  $13.34\% \pm 0.56\%$  de las B1 eran EGFR+, no presentaban ELCS y la expresión de la lamina B era débil o ausente (Figura 18A,B). Por lo tanto, hipotetizamos que las ELCS podían corresponderse a células B quiescentes.



**Figura 18. Las B1 activas no presentan ELCS nucleares.** (A-B) Imágenes de microscopía confocal de un *whole-mount* de la ZSV-V marcado con  $\beta$ catenina (rojo), EGFR (blanco) y lámina B (verde), mostrando una célula B1 EGFR+ (activa) que no presenta marcaje para lámina B (flechas blancas). (B) Los detalles muestran el núcleo de la célula EGFR+ en secciones distintas en el plano Z. Escala: 20  $\mu$ m

Para testar esta hipótesis, decidimos marcar las células en división y determinar si presentaban ELCS. Un grupo de ratones P60 ( $n=4$ ) recibió 4 inyecciones de  $^3\text{H}$ -Timidina cada dos horas y fueron eutanizados a las dos horas de la última inyección (Figura 19A). Se realizó autorradiografía sobre secciones semifinas coronales y se mapearon las células marcadas con  $^3\text{H}$ -Timidina en diferentes niveles rostro-caudales de la ZSV-V. Se seleccionaron 180 células marcadas y se re-seccionaron para el análisis seriado con MET. Treinta de estas células se correspondieron con células tipo B, presentando contornos irregulares, citoplasma claro y filamentos intermedios. Ninguna de estas 30 células presentó ELCS (Figura 19B-D) sugiriendo que las células activadas para la división no presentan ELCS. Posteriormente, estudiamos si tras la división celular las células B podían desarrollar ELCS. Para ello, un grupo de ratones P60 ( $n=4$ ) recibió 4 inyecciones de  $^3\text{H}$ -Timidina y fueron eutanizados dos meses después (Figura 19A'). Tras analizar más de 8000 núcleos localizados en la ZSV-V, tan sólo 20 células presentaron marcaje con  $^3\text{H}$ -Timidina. Nueve de estas células fueron caracterizadas como astrocitos presentando las características descritas en la tabla 1; otras 6 también presentaron características de astrocitos, sin embargo mostraban un contorno más irregular con elevado número de ribosomas libres y pocos filamentos intermedios; por ultimo, las 5 restantes eran células de microglía presentando su característico núcleo oscuro, prominentes grumos de cromatina, un retículo endoplásmico granular y lisosomas. Tras reconstruir tridimensionalmente los núcleos de estas células marcadas, ninguna presentó ELCS

(Figura 19E-G). Estos resultados sugieren que, al menos dos meses tras la activación en la ZSV-V adulta, las células tipo B no desarrollan ELCS.

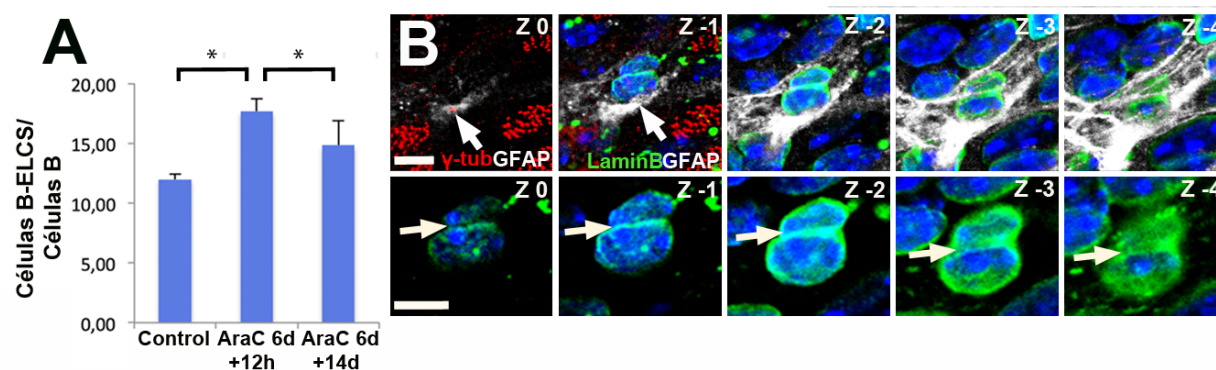


**Figura 19. Las células activadas presentan marcaje con  $^3\text{H}$ -timidina.** (A, A') Protocolos de inyección de  $^3\text{H}$ -Timidina. Los animales P60 recibieron 4 inyecciones de  $^3\text{H}$ -Timidina y la ZSV-V fue estudiada 2 horas y 2 meses tras la última inyección. (B, E) Las células marcadas fueron reconocidas en secciones semifinas teñidas con azul de toluidina (flecha). (B-D) Autorradiografía de la ZSV-V de un ratón P60 mostrando una célula marcada identificada como célula tipo B con núcleo esférico y cromatina condensada (flecha). (E-G) Autorradiografía de la ZSV-V de un ratón P120 mostrando una célula marcada identificada como una célula B con núcleo irregular y grumos de heterocromatina (flecha). Observar que ninguna de las células marcadas presenta ELCS en comparación con la célula B no marcada (flecha blanca). Escala, 10  $\mu\text{m}$  (B, C, E, F), 2  $\mu\text{m}$  (D, G). A: célula A, B: célula B, E: célula ependimaria, LV: ventrículo lateral.

El tratamiento antimitótico con Ara-C induce la muerte de los progenitores en división de la ZSV-V, sin embargo las células madre quiescentes permanecen (Doetsch et al., 1999; Morshead et al., 1994; Pastrana et al., 2009). Por lo tanto, decidimos estudiar si las células que permanecen en la ZSV-V tras el tratamiento con Ara-C intraventricular (6 días) presentaban ELCS. Tras el tratamiento, la población total de células tipo B de la ZSV-V disminuyó debido a la muerte de los astrocitos en división, sin embargo el porcentaje de células tipo B con ELCS se incrementó (de un  $11.98\% \pm 0.43$  a un  $17.68\% \pm 1.04\%$ ). *t*-test,

## Resultados

$p$ -valor  $< 0.05$ ) (Figura 20A). Este resultado indica que la prevalencia de las ELCS en la población de células quiescente o con baja tasa de proliferación de células tipo B también se mantiene con el tratamiento con Ara-C. Además, el estudio con microscopía confocal de los *whole-mounts* tratados con Ara-C mostró que las células B1 localizadas en los *pinwheels* presentaban ELCS y expresaban una mayor cantidad de GFAP derivada de la inyección intraventricular (Figura 20B). Notablemente, el porcentaje de células tipo B con ELCS se redujo 14 días después del tratamiento ( $14.82\% \pm 2.06$ ), coincidiendo con la regeneración de la ZSV-V por parte de los astrocitos activos (Figura 20A). Estos resultados indican que las células tipo B con ELCS sobreviven a los tratamientos con Ara-C, siendo un resultado consistente con la interpretación de que estas células corresponden a células madre neurales quiescentes.

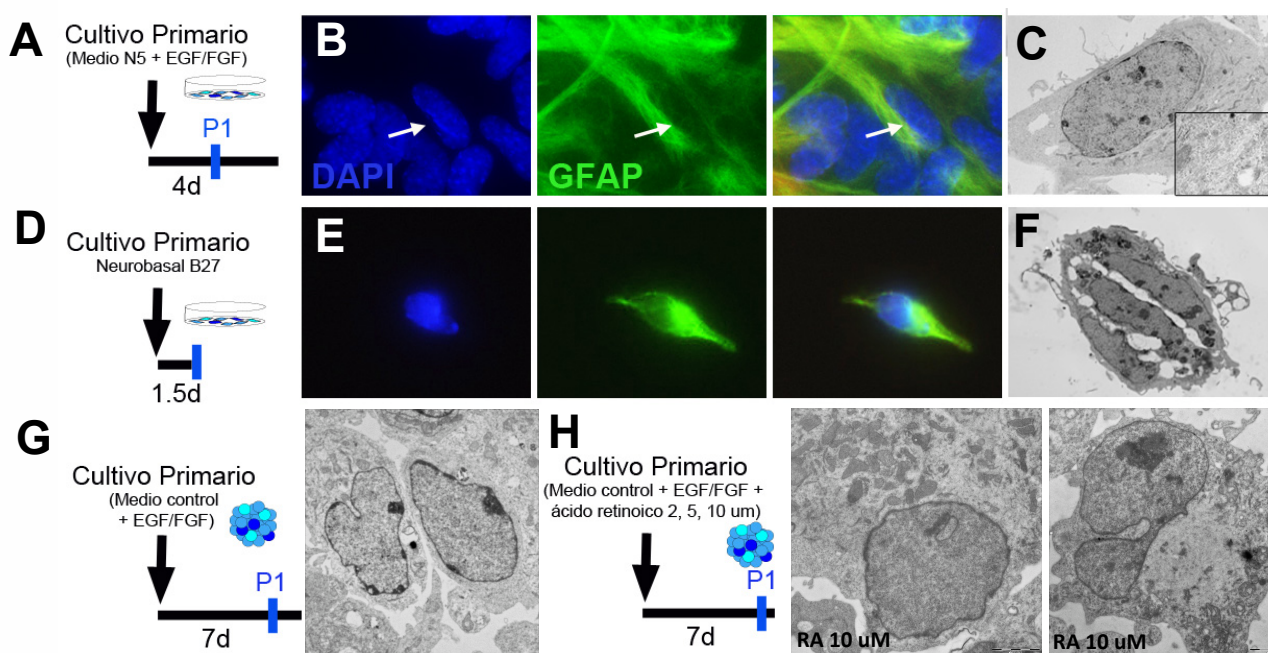


**Figura 20. Las células B con ELCS sobreviven al tratamiento con Ara-C.** (A) Cuantificación de las células B con ELCS/ con respecto al número total de células B 12 horas y 14 días tras el tratamiento con Ara-C (analizado con MET). Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM,  $n = 4$  por grupo (t-test, \*  $p < 0.05$ ). (B) Imágenes de microscopía confocal de un *pinwheel* de la ZSV-V marcado con  $\gamma$ tubulina (rojo), GFAP (blanco) y lámina B (verde), 0h tras el tratamiento con Ara-C. Escala, 10  $\mu$ m, 2  $\mu$ m (B).

### 4.3 Las ELCS nucleares no se preservan *in vitro*

Otra de las cuestiones que quisimos responder era si las células activadas *in vitro* presentaban ELCS. Estudios previos han mostrado que los progenitores de la ZSV-V pueden crecer *in vitro* en forma de neuroesferas o en cultivos en monocapa, reteniendo cierto grado de pluripotencialidad y potencial de auto-renovación (Reynolds y Weiss, 1992; Scheffler et al., 2005). Por lo tanto, nos preguntamos si las células cultivadas en presencia de FGF y EGF podían presentar ELCS. Con MET e inmunofluorescencia, estudiamos más de 1000 células derivadas de neuroesferas en los pases celulares 1 y 4 (ratones P60) y 1000 células de cultivos en monocapa de 1.5, 3 y 4 días. Sin embargo no observamos células con ELCS en ninguna de las condiciones (Figura 21A-G)

La estimulación con ácido retinoico promueve la diferenciación de los neutrófilos y, en consecuencia, la formación de ELCS (Olins et al., 1998). Tras no observar células con ELCS en presencia de los factores de crecimiento, decidimos tratar neuroesferas con distintas concentraciones de ácido retinoico (2, 5 and 10 $\mu$ M). Como control positivo de lobulación y formación de las ELCS, utilizamos células de la línea de leucemia mieloide HL60, las cuales se ha descrito que forman ELCS bajo una concentración de 2  $\mu$ M de ácido retinoico. A pesar de que los controles presentaron diferentes grados de lobulación según la concentración de ácido retinoico, no se observaron ELCS en las células de neuroesferas tratadas (Figura 21H). Por lo tanto, los presentes resultados sugieren que las células presentes en cultivos celulares de células madre no presentan las características nucleares de células madre *in vivo*.

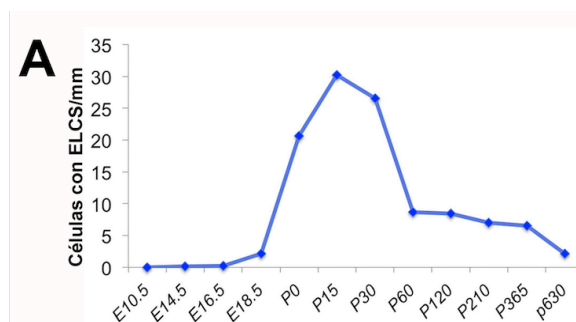


**Figura 21. Las células madre de la ZSV-V cultivadas *in vitro* no presentan ELCS.** (A-C) Células cultivadas en monocapa con medio N5 y EGF/FGF estudiadas en P1. (B) Imagen de fluorescencia de una célula GFAP+ (verde) con núcleo fusiforme sin invaginaciones (DAPI, azul). (C) Micrografía de MET mostrando una célula con filamentos intermedios (detalle) y núcleo redondeado. (D-F) Células cultivadas en monocapa con medio neurobasal B27 durante 1.5 días. (E) Célula GFAP+ con morfología fusiforme y núcleo redondeado. (F) Imagen de MET mostrando células con núcleos elongados. (G) Células cultivadas en neuroesfera con EGF/FGF y estudiadas en P1. Bajo MET estas células presentan un núcleo redondeado e irregulares. (H) Células cultivadas en cultivos de neuroesferas tratadas con ácido **retinoico (RA) 10 $\mu$ M**. Estas células presentan un núcleo redondeado o irregular. Observar que ninguna de las células estudiadas presenta ELCS nucleares. P1: pase 1.

#### 4.4 Origen embrionario de las ELCS nucleares

Durante el desarrollo embrionario, las paredes de los ventrículos laterales están tapizadas por células de glía radial, las cuales darán lugar a las células B de la ZSV-V adulta (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009; Merkle et al., 2004). En el presente trabajo, decidimos determinar en qué momento del desarrollo de la ZSV-V se originaban las ELCS nucleares y si estas ya se encontraban presentes en los precursores gliales. Para ello, estudiamos secciones ultrafinas de la ZV de embriones en cuatro estadios embrionarios (E10.5, E14.5, E16.5 y E18.5) y cuatro estadios postnatales (P0, P15, P30 and P60). Curiosamente, las ELCS comenzaron a observarse en muy baja frecuencia en núcleos de células de glía radial en E14.5 ( $0.14 \pm 0.14$  células con ELCS/mm) y el número de núcleos con ELCS fue incrementándose progresivamente con la edad, alcanzando el número máximo de  $30.63 \pm 9.33$  células con ELCS/mm en P15 (Figura 22). Estas observaciones indican que las ELCS nucleares se originan en los estadios embrionarios y se mantienen en una subpoblación de células tipo B de la ZSV-V adulta.

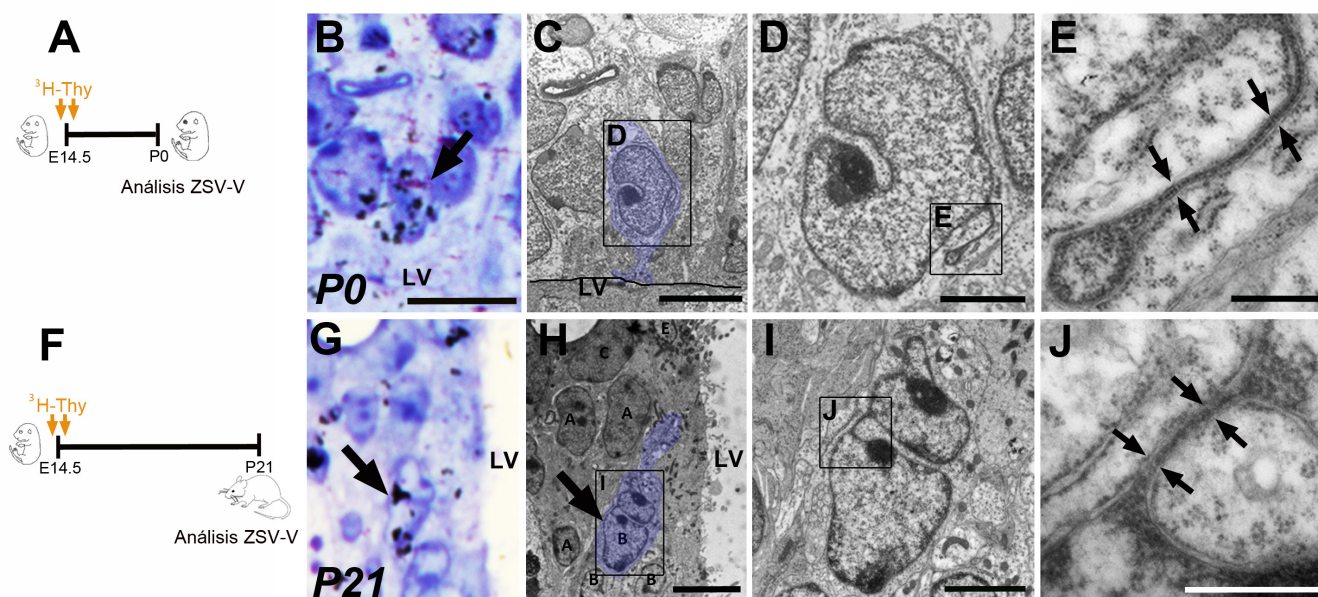
Adicionalmente, estudiamos ratones envejecidos (P120, P210, P365 y P630) para determinar la prevalencia de estas estructuras nucleares en la población de células B con el envejecimiento. Las cuantificaciones en cortes ultrafinos de estas ZSV-Vs con MET revelaron que la población de células B con ELCS se reduce drásticamente con la edad, desde  $8.68 \pm 0.87$  células/mm en P60 a  $2.14 \pm 0.14$  células/mm en P630. Al igual que en P60, llevamos a cabo reconstrucciones tridimensionales seriadas de los núcleos completos de las células B en P630, para determinar la proporción exacta de núcleos con ELCS. Este estudio reveló que el 24% de las células B en P630 presentaban ELCS, confirmándose de nuevo la drástica reducción de esta población con la edad (Figura 22). Además, con el envejecimiento también observamos cambios en la longitud de las ELCS, reduciéndose su longitud de 0.4-2.0  $\mu\text{m}$  en P60 ( $n=3$ , 50 células) a 0.2-1.6  $\mu\text{m}$  en P630 ( $n=3$ , 54 células).



**Figura 22. Células con ELCS a lo largo del desarrollo y la vida adulta.** (A) Cuantificaciones del número de células de la ZSV-V con ELCS/ con respecto al total de células en diferentes estados embrionarios y postnatales. Obsévese que las ELCS

comienzan a aparecer en E14.5 con un valor de 0,24 células/mm, sin embargo el número de células con ELCS se incrementa progresivamente hasta un  $30.63 \pm 9.33$  en P15, y disminuye a partir de P60.

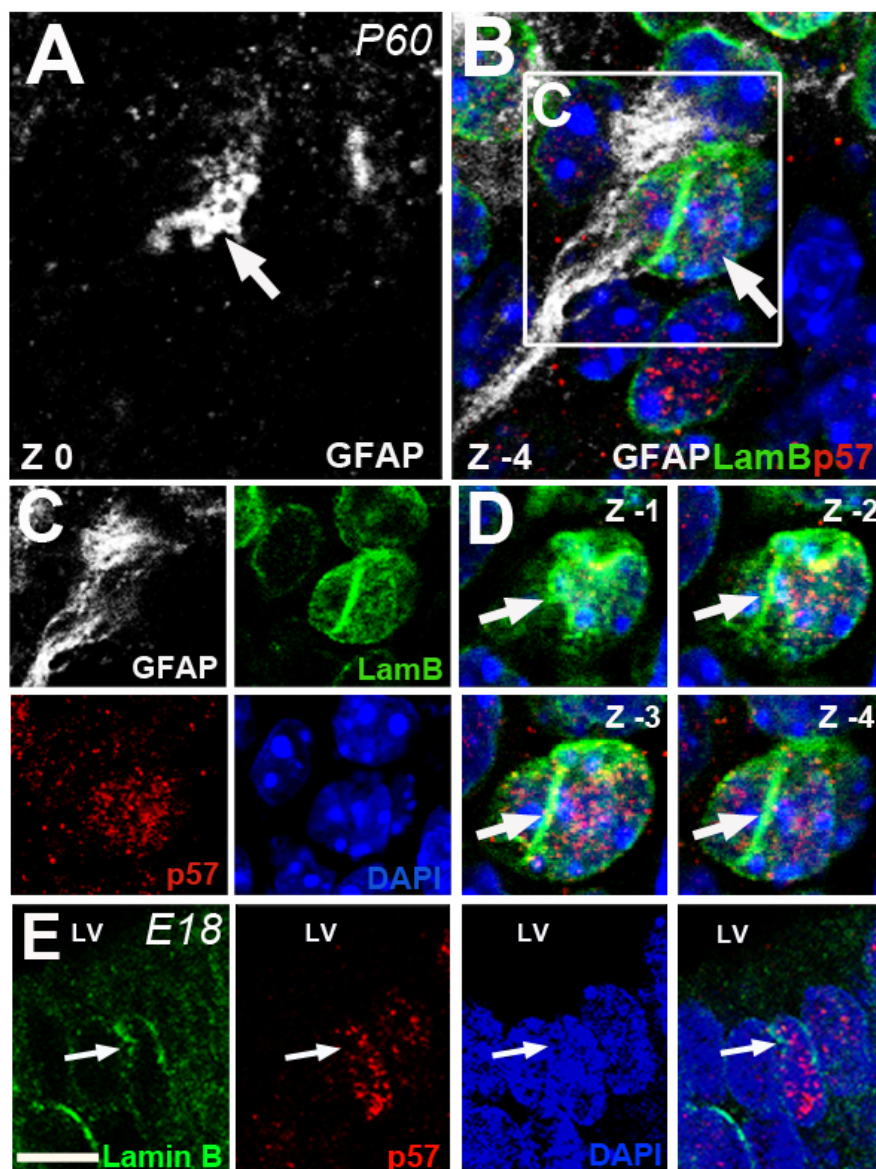
Para determinar si las células con ELCS presentes en los estadios postnatales derivaban directamente de las células precursoras B1, también llamadas pre-B1 (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015), inyectamos  $^3\text{H}$ -timidina en hembras preñadas en E14.5 (2 inyecciones con un intervalo de 12 horas) y eutanizamos a las crías en los estadios post-natales P0 (n=4, Figura 23A) y P21 (n=4, Figura 23F). El estudio autorradiográfico sobre secciones semifinas de distintos niveles rostro-caudales de la ZSV-V reveló células que retenían  $^3\text{H}$ -timidina en la ZSV-V de los ratones P0 y P21. Se realizaron reconstrucciones tridimensionales seriadas de las células marcadas y encontramos que más de la mitad de las células de glía radial marcadas en P0 (10 de 15 células estudiadas) y todas las células B marcadas en P21 (13 de 13 células estudiadas) presentaron ELCS (Figura 23B-E, y G-J, respectivamente). Estos resultados sugieren que las ELCS nucleares se ensamblan en células pre-B1 embrionarias y se mantienen en los progenitores quiescentes durante la transición de glía radial a tipo B.



**Figura 23. Las células quiescentes formadas en E14.5 presentan ELCS.** (A-E) Autorradiografía de una célula marcada con  $^3\text{H}$ -timidina en E14.5 y estudiada en P0. (B) Las células marcadas fueron identificadas en secciones semifinas teñidas con azul de toluidina (flecha). (C-E) Imagen de MET de la célula marcada en (B) presentando características de glía radial y ELCS nucleares (flechas). (F-J) Autorradiografía de una célula marcada con  $^3\text{H}$ -timidina en E14.5 y estudiada en P21. (G) Célula marcada en un corte semifino de la ZSV-V (flecha). (H-J) Micrografía de MET de la célula marcada en (G) identificada como célula B, presentando ELCS nucleares. Escalas 10  $\mu\text{m}$  (B, G), 5  $\mu\text{m}$  (C), 2  $\mu\text{m}$  (D, H, I) 500nm (E, J).

## Resultados

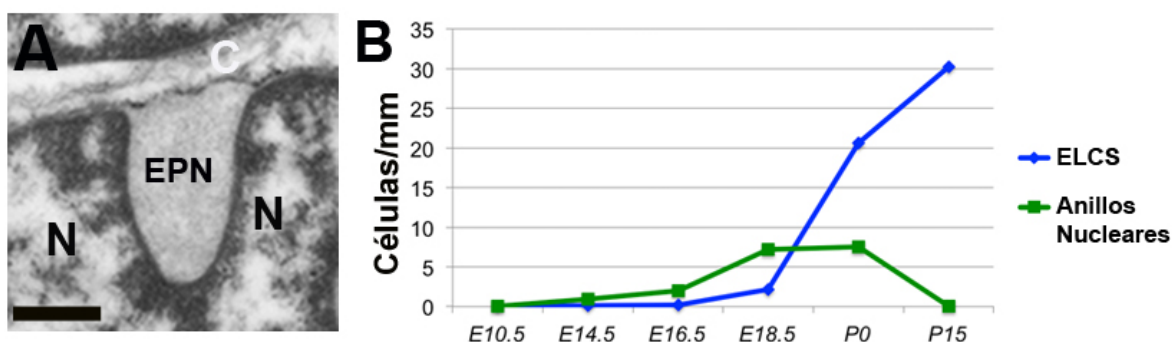
Posteriormente, estudiamos si las células B con ELCS expresaban p57, marcador recientemente descrito en las células madre neurales quiescentes embrionarias y adultas (Furutachi et al., 2015). Para ello, analizamos secciones coronales de embriones E18 y *whole-mounts* de ratones P60 con microscopía confocal. Para estudiar la morfología celular de las células marcadas, usamos la lámina B como marcador de la envoltura nuclear. Las células positivas para la expresión de p57 mostraban un núcleo invaginado con ELCS (Figura 24). En resumen, los datos obtenidos sugieren que las ELCS nucleares son una característica de células madre quiescentes derivadas de células pre-B1.



**Figura 24. Expresión de p57 en células con ELCS.** (A-D) Imágenes de confocal de un *whole-mount* de la ZSV-V de un ratón P60 marcado con GFAP (blanco), lámina B (verde) y p57 (rojo). (A) Expansión apical GFAP+ de una célula B1 contactando la cavidad ventricular. (B-C) La célula GFAP+ localizada en (A) presenta un núcleo irregular con expresión de p57. (D) Serie de imágenes en Z-stack mostrando el núcleo irregular de estas células. (E) Imagen del núcleo irregular de una célula p57+ en la zona ventricular de un ratón E18.

## 4.5 La formación de las ELCS forma parte de un proceso dinámico.

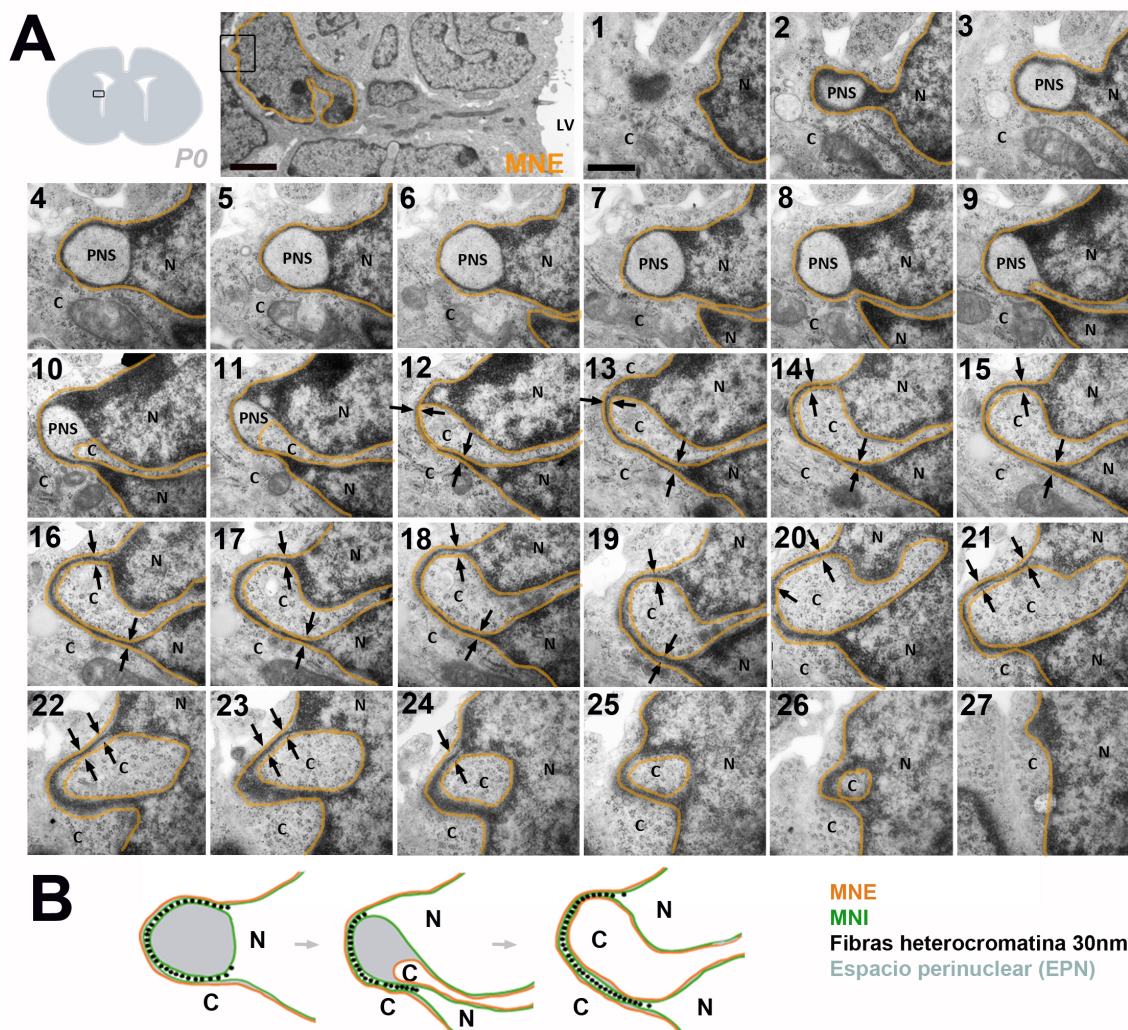
Tras determinar el periodo en el que comienzan a formarse las ELCS nucleares, decidimos estudiar su proceso de formación. A través del estudio tridimensional con MET de los núcleos de células de glía radial, encontramos que algunas de estas células presentaban una separación de las membranas nuclear interna y externa generando un incremento del espacio perinuclear (Figura 25 A). En las secciones ultrafinas esta separación de la envoltura nuclear aparecía como una esfera de espacio perinuclear, por lo que nos referiremos a esta estructura como “anillos de envoltura nuclear”. La membrana nuclear externa se distinguía claramente por presentar ribosomas adheridos en la parte citoplásmica y la membrana nuclear interna por asociarse a la lámina nuclear. Realizamos cuantificaciones del número de células de la ZSV-V que presentaban estos anillos y observamos que estas estructuras aparecían en 0.89 células/mm en E14.5 hasta alcanzar un pico máximo en P0. Estas estructuras no se observaron en ningún otro estadio postnatal estudiado.



**Figura 25. Anillos de envoltura nuclear.** (A) Micrografía de MET del núcleo de una célula de glía radial mostrando una separación puntual de las membranas nuclear interna y externa, la cual genera un incremento del espacio perinuclear. (B) Cuantificaciones del número de células con ELCS (azul) o anillos nucleares (verde)/mm en cortes ultrafinos de la ZSV-V. Observar que el número de células con anillos nucleares en P15 es 0 coincidiendo con el pico máximo de ELCS. Escala, 500 nm (A). C: citoplasma, N: núcleo, EPN: espacio perinuclear.

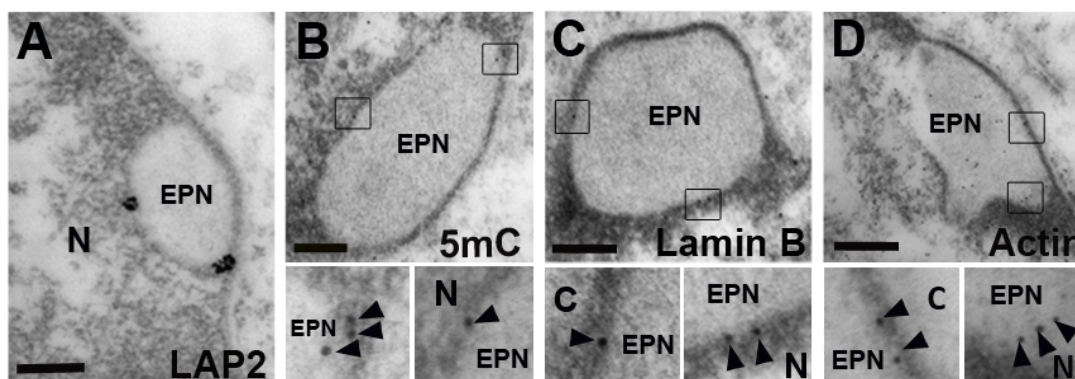
Para caracterizar la organización tridimensional de los anillos de envoltura nuclear e investigar su posible relación con las ELCS nucleares, llevamos a cabo reconstrucciones tridimensionales en ratones P0 con MET. Tras alinear secciones de los anillos de envoltura nuclear, observamos que la membrana nuclear externa se aproximaba a la membrana nuclear interna reduciendo el espacio perinuclear y dando lugar a ELCS (Figura 26A, B). Además, al igual que se observa en las ELCS los anillos nucleares estaban parcialmente delimitados por fibras de cromatina de 30 nm.





**Figura 26. Link entre los anillos de envoltura nuclear y las ELCS en la glía radial.** (A) Reconstrucción seriada del núcleo de una célula de glía radial de la ZSV-V de un ratón P0. (1-27) Reconstrucción seriada de la región marcada en el núcleo de la glía radial. (1-11) Imágenes de MET mostrando los anillos de envoltura nuclear con la característica lámina de cromatina de 30nm y un espacio perinuclear dilatado. La membrana nuclear externa se encuentra delimitada en naranja. (12-27) En la serie se observa que la membrana nuclear externa se aproxima a la interna dando lugar a la típica estructura de las ELCS (flechas) (B) Diagramas de las imágenes 8, 11 y 17 en (A) mostrando como la membrana nuclear externa se alinea con la interna reduciendo el espacio perinuclear y dando lugar a un ELCS. Escala, 2  $\mu$ m (A), 500nm (1-27). C: citoplasma, N: núcleo, EPN: espacio perinuclear.

Adicionalmente, estos anillos presentaban Lap2, proteína transmembrana de la membrana nuclear interna, lámina B y las fibras de heterocromatina 5-mC (Figura 27A-C). Para determinar si el proceso de formación de los anillos era un proceso dinámico, estudiamos la expresión de uno de los componentes del citoesqueleto nuclear, la actina (Figura 27D). Esta se encontraba expresada en mayor concentración en el espacio perinuclear de los anillos, en comparación con el resto de la envoltura nuclear y el nucleoplasma.

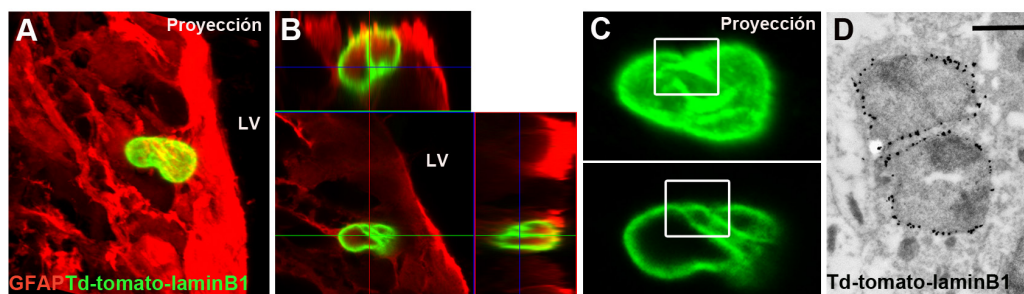


**Figura 27. Marcadores moleculares presentes en los anillos de envoltura nuclear de la glía radial en E18.5.** (A-D) Immunodetección con oro de Lap2, 5-mC, lámina B y actina. (A-C) el marcaje de Lap2, 5-mC y lámina B se localiza en la membrana nuclear interna. (D) La actina se localiza tanto en el EPN como en la lámina nuclear. Escala, 200 nm (A-D). C: citoplasma, N: núcleo, EPN: espacio perinuclear.

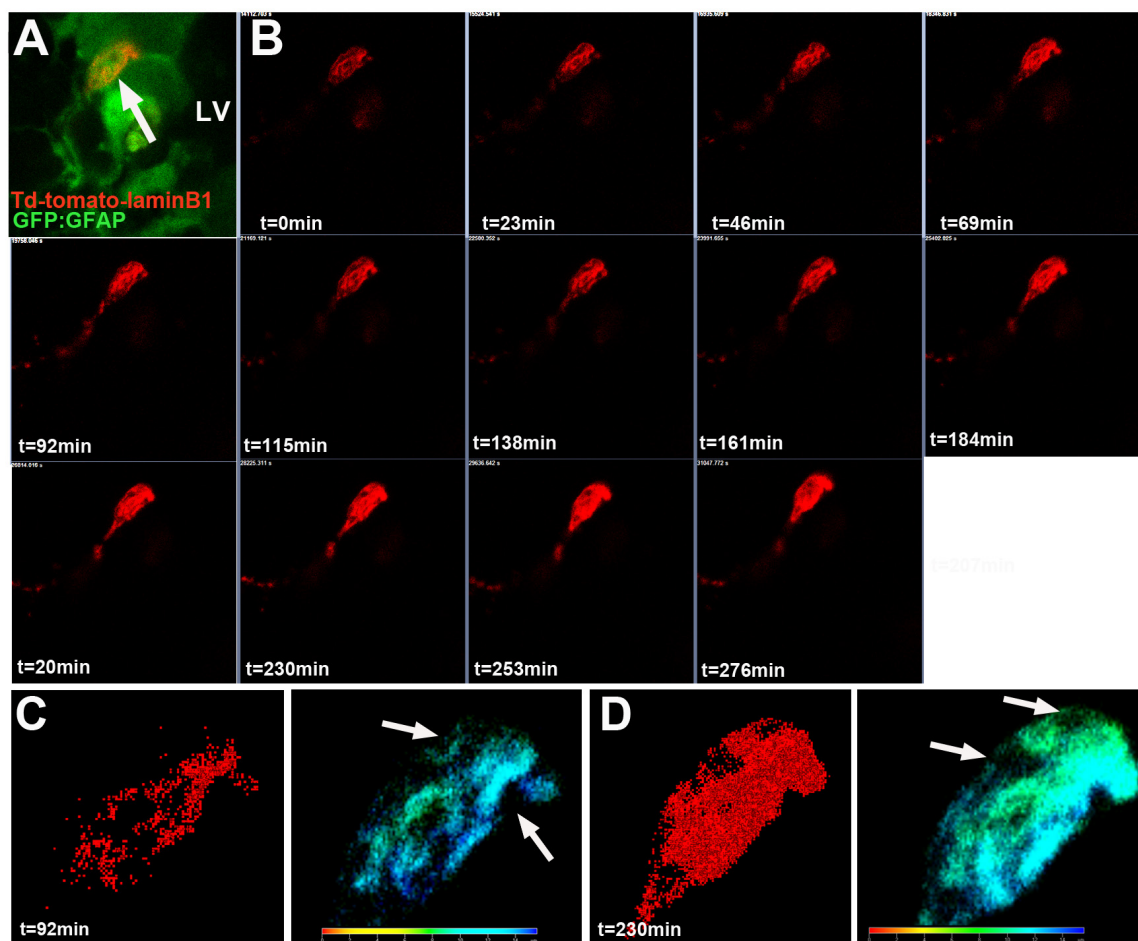
A continuación nos planteamos estudiar el dinamismo nuclear de las células madre en los estadios de formación de las ELCS. Para ello decidimos realizar un estudio de *time-lapse* mediante la electroporación del plásmido Td-tomato-Lamina B1, en ratones P1. En primer lugar, para comprobar que la electroporación del plásmido Td-tomato-lámina-B1 no afectaba a la morfología de las células electroporadas, las estudiamos con microscopía confocal y MET, 3 y 14 días después de la electroporación (P5 y P15). Encontramos células marcadas en ambas y no se observaron cambios anormales de la envoltura nuclear de las células marcadas (Figura 28). Adicionalmente, algunas células endimarias también presentaron marcaje.

Con el objeto de estudiar el dinamismo de los núcleos de los astrocitos B1 *in vivo*, realizamos la electroporación del plásmido Td-tomato-Lamina-B1 en línea transgénica GFAP:GFP, en la que la proteína GFP se expresa bajo el promotor de la GFAP. Los ratones (n=2) fueron sacrificados y se obtuvieron rebanadas frescas en las que se estudió el comportamiento de las células *in vivo*. Las imágenes obtenidas con *time-lapse* revelaron que en pocas horas (2,5), los núcleos de las células estudiadas (6 células) presentaban cambios en su envoltura nuclear, observándose profundas invaginaciones nucleares (Figura 29). Estas observaciones sugieren que la envoltura nuclear de las células madre neurales en las etapas postnatales tempranas es dinámica y presenta invaginaciones que podrían relacionarse con los anillos de envoltura nuclear y ELCS encontrados en las células de glía radial.

## Resultados



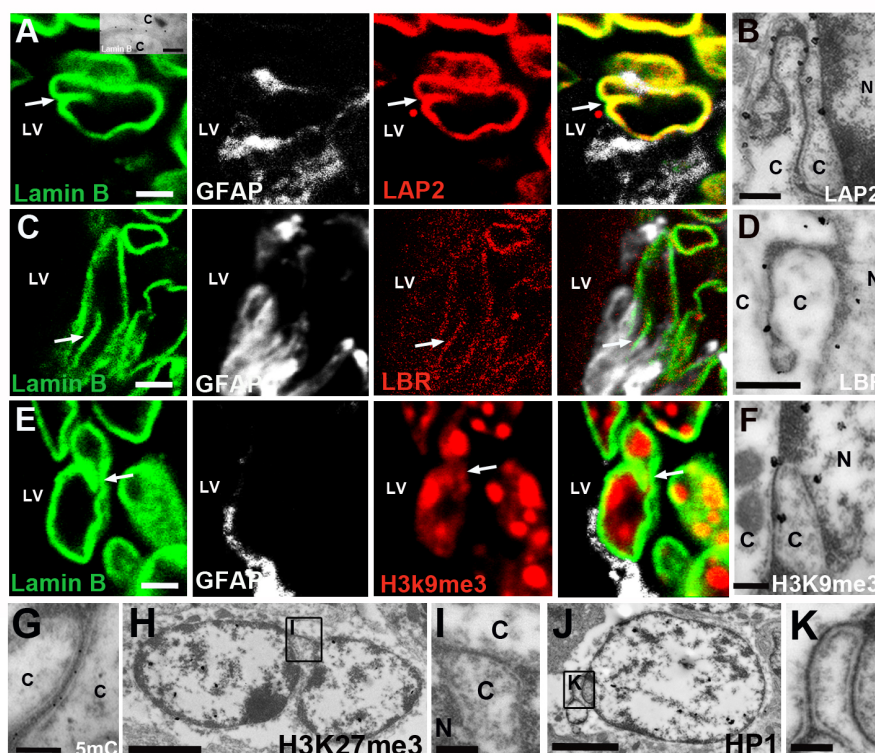
**Figura 28.** Las células de glía radial transfectadas con el plásmido Td-tomato-Lamin B1 presentan ELCS. (A) Proyección de imágenes de confocal mostrando una célula transfectada con Td-tomato-lamin B1 (verde) y GFAP (rojo). (B) Imagen ortogonal de un plano de la célula marcada en (A) mostrando profundas invaginaciones nucleares de la envoltura nuclear. (C) Imagen magnificada del plano de la célula marcada en (B) mostrando que las profundas invaginaciones se relacionan con la zona donde se localizan las ELCS. En la proyección nuclear esta estructura se observa como una invaginación nuclear marcada intensamente. (D) Inmunodetección con oro de Td-tomato-lamin B1 en una célula de glía radial. El plásmido se expresa en la envoltura nuclear y no afecta a la viabilidad celular. Escala, 1  $\mu$ m. LV: ventrículo lateral.



**Figura 29.** Time-lapse del núcleo de una célula de glía radial postnatal electroporada. (A) Imagen confocal de una célula GFP:GFAP+ con morfología radial muy próxima a la cavidad ventricular, expresando Td-tomato-lamin B1. (B) Secuencia temporal de la célula mostrada en (A) con un intervalo de 23 minutos. Las imágenes pertenecen al mismo plano en Z. (C) Representación del núcleo marcado en t=92 minutos y su gradiente de profundidad (rojo: profundo, azul: superficial) donde se observan profundas invaginaciones (flechas). (D) Representación del núcleo t=230 minutos y su gradiente de profundidad. Observar las diferencias con respecto a (C).

## 4.6 ELCS, un compartimento nuclear en células madre neurales

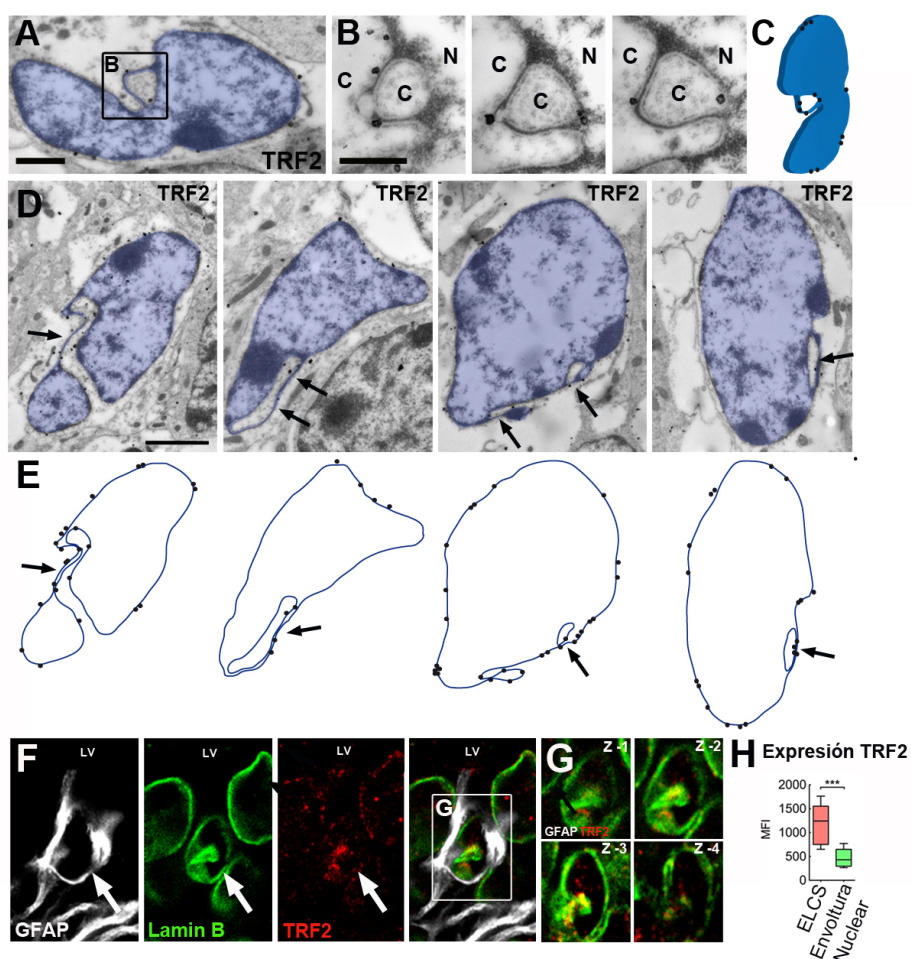
Teniendo en cuenta que las ELCS nucleares se encontraban principalmente formadas por envoltura nuclear, decidimos investigar que componentes estaban expresados en esta región. Realizamos inmuno-oro pre- y post-inclusión contra las proteínas de la membrana nuclear interna Lap2, LBR y la lámina B observando que todas estas proteínas se encontraban distribuidas por toda la envoltura nuclear, incluyendo las ELCS (Figura 30A-C). Nuestra siguiente pregunta fue si las fibras de cromatina de 30 nm presentes en las ELCS podrían expresar marcadores epigenéticos relacionados con heterocromatina y represión. Para ello realizamos inmunos-oro pre- y post-inclusión contra 5-mC, H3K27me3, H3K9me3, y la proteína de heterocromatina HP1. Sorprendentemente, mientras las fibras de cromatina presentes en las ELCS mostraban marcaje para 5-mC and H3K9me3 (Figura 30E-G), H3K27me3 y HP1 estaban presentes en el resto del núcleo pero no en esta región (Figura 30H-K).



**Figura 30. Expresión de marcadores epigenéticos en las ELCS.** (A) Imágenes de microscopía confocal mostrando células GFAP+ (blanco) con un núcleo irregular (lámina B) y expresando LAP2 en la región de las ELCS. Detalle de MET mostrando el inmunomarcado con oro contra lámina B. (B) Marcaje con oro de LAP2 en la membrana nuclear interna de las ELCS. (C) Inmunofluorescencia mostrando la expresión de LBR (rojo) en la región invaginada de las ELCS (verde). (D) Inmuno-oro contra LBR en la membrana nuclear de las ELCS. (E) Expresión de H3K9me3 en la región de las ELCS. (F) Expresión de H3K29me3 en las ELCS. (F, G) inmuno-oro contra H3K9me3 y 5-mC en las ELCS. (H-K) Inmunomarcado contra H3K27me3 y HP1. Observar en (I, K) que las ELCS no expresan estos marcadores. Escala, 2  $\mu$ m (A, C, E, H, J), 400nm (B), 500nm (D, I, K), 200 nm ((F, J). C: citoplasma, LV: ventrículo lateral.

## Resultados

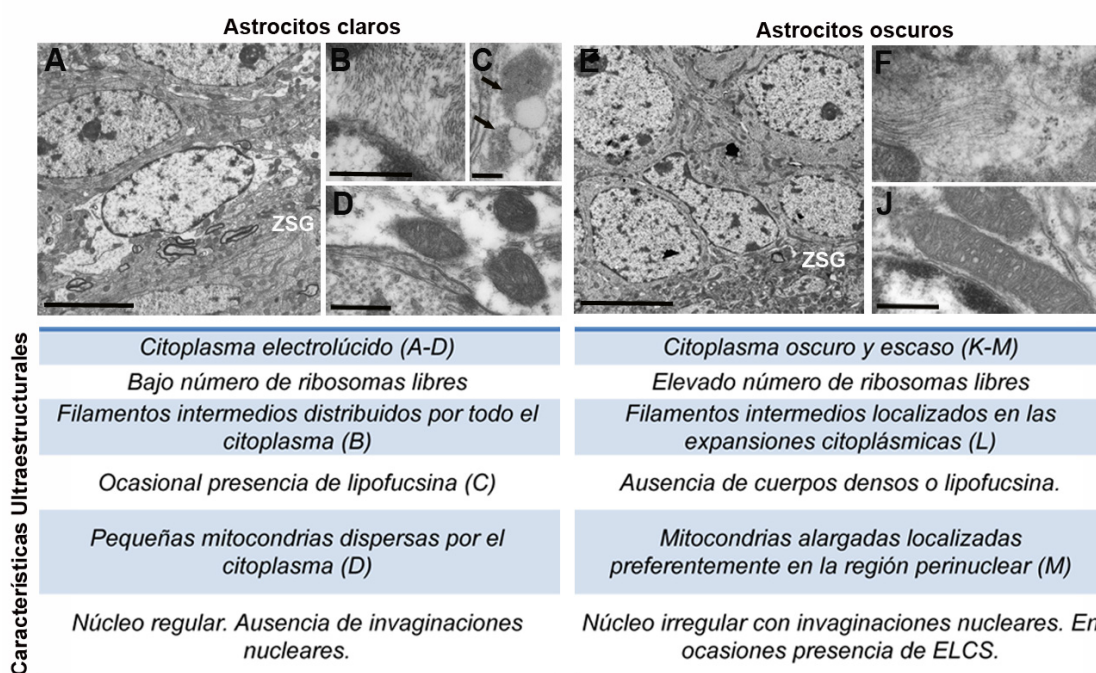
Teniendo en cuenta que las ELCS de las células tipo B de la ZSV-V contenían heterocromatina con modificaciones epigenéticas específicas, decidimos resolver si esta región podría estar asociada a los dominios de heterocromatina telomérica, relacionados con el estado de célula madre. De hecho se ha propuesto que el posicionamiento nuclear de los telómeros podría influir en la longevidad celular y quiescencia. Para ello, estudiamos la expresión de TRF2, y encontramos que esta proteína se encontraba localizada en la periferia nuclear (Figura 31). Tras el análisis, observamos que la proteína TRF2 se expresó preferencialmente en las ELCS y zonas próximas en comparación con el resto del núcleo ( $p < 0.0002$ ; Figura 31F-H). En resumen, estos resultados sugieren que las ELCS representan un compartimento nuclear específico que acoge a dominios de heterocromatina particulares.



**Figura 31. Expresión preferencial de TRF2 en las ELCS y zonas próximas.** (A-C) Imagen pseudo-coloreada del núcleo de una célula B (azul) mostrando marcaje con oro contra TRF2. (B) Secciones seriadas de la región enmarcada en (A) mostrando la localización preferencial de TRF2 en la ELCS. (C) Representación esquemática del núcleo marcado con TRF2 en (A) en tres secciones ultrafinas seriadas. (D, E) Imágenes de núcleos de células B (azul) y sus correspondientes diagramas mostrando la distribución preferencial de TRF2 en la periferia nuclear y las ELCS. (F) Imágenes de confocal mostrando una célula GFAP+ (blanco) contactando con la cavidad ventricular y presentando un núcleo irregular (lámina B, verde), con expresión de TRF2 (rojo) en la región de la ELCS. (G) Imágenes de Z-stack del núcleo enmarcado en (F) mostrando que TRF2 se expresa principalmente en la región de la invaginación correspondiente a las ELCS. (H) Cuantificación de la expresión de TRF2 en las ELCS con respecto al resto de la envoltura nuclear, mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.0002$ ). Escala, 1  $\mu$ m (A, D), 650nm (B). C: citoplasma, N: núcleo.

## 4.7 ELCS nucleares en astrocitos de la ZSG

Aunque el estudio de las ELCS nucleares se ha centrado en las células B de la ZSV-V, nos preguntamos si estas estructuras también podían encontrarse presentes en las células madre de otra región neurogénica, como la ZSG del giro dentado. Para determinar si los astrocitos radiales o células tipo 1 presentaban ELCS, examinamos la ZSG de ratones P60 con MET. Estudios previos describen morfológicamente dos poblaciones de astrocitos, los astrocitos horizontales y radiales. Los astrocitos horizontales se caracterizan ultraestructuralmente por presentar citoplasma claro, una densa red de filamentos intermedios y contorno irregular (Seri et al., 2001). Sin embargo, los astrocitos radiales presentan un mayor número de orgánulos, mayor concentración de poliribosomas y grandes haces de filamentos intermedios en el proceso radial. Debido a la dificultad de diferenciar los astrocitos radiales y horizontales en cortes ultrafinos (ya que no siempre es posible observar la expansión radial), decidimos clasificar ultraestructuralmente a los astrocitos localizados en la ZSG como astrocitos claros y oscuros, tal y como se describe en la figura 32. Curiosamente, los astrocitos claros presentaron núcleos regulares, mientras que los oscuros presentaron núcleos irregulares frecuentemente invaginados (Figura 32B y 33A-C). Adicionalmente, el  $1.5\% \pm 0.63\%$  de los astrocitos oscuros presentaban ELCS nucleares, mientras que no fueron observadas en los astrocitos claros. Además esta estructura tampoco fue observada en neuroblastos, neuronas inmaduras o neuronas maduras.

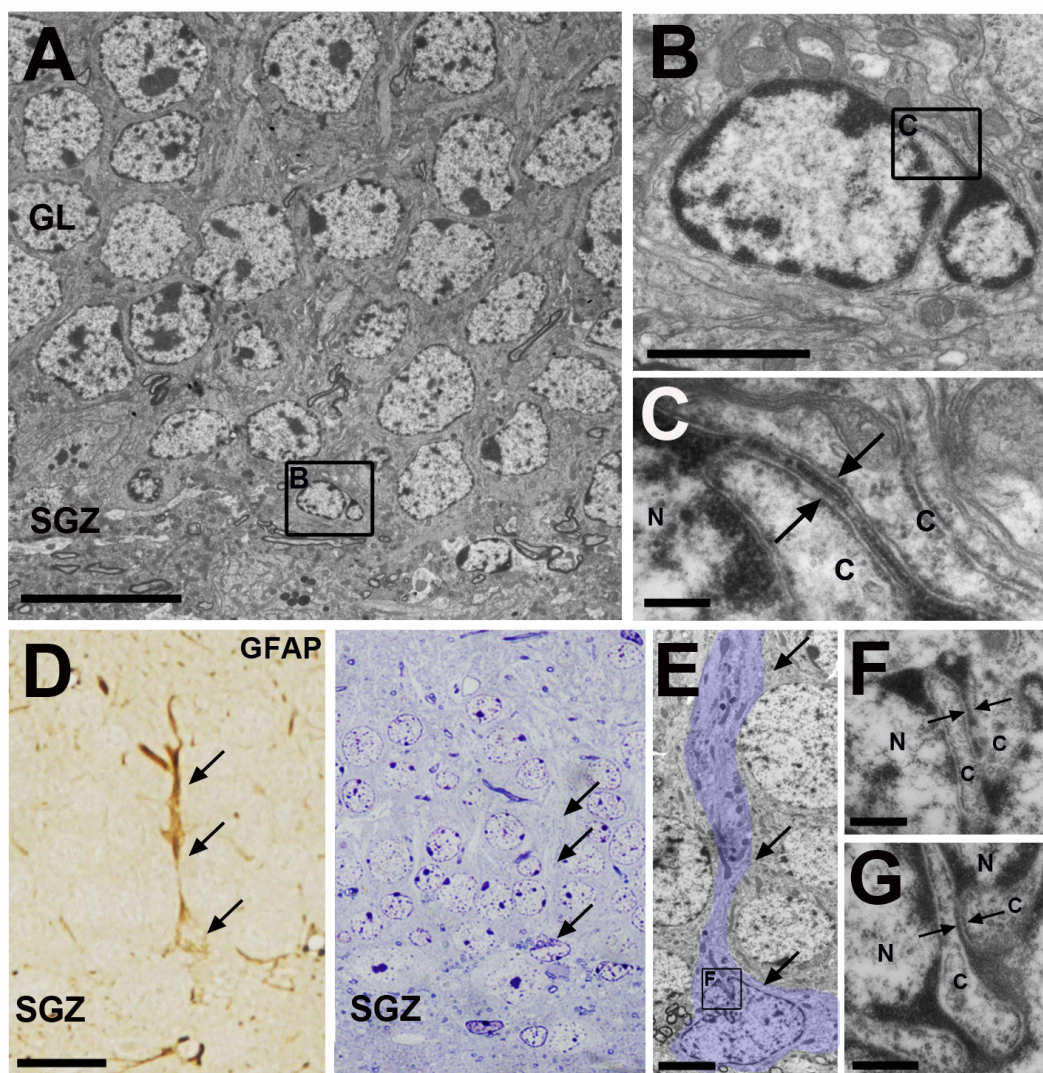


**Figura 32. Ultraestructura de los astrocitos de la ZSG.** (A-D) Micrografías de MET mostrando las características ultraestructurales de los astrocitos claros de la ZSG descritas en la tabla. (E-J) Micrografías de MET presentando

## Resultados

características ultraestructurales de los astrocitos oscuros encontrados en la ZSG descritos en la tabla. Escala, 5  $\mu$ m (A, B), 500 nm (B, D, J).

Para determinar si los astrocitos que habíamos determinado como oscuros, y que presentaban ELCS, formaban parte de la población de astrocitos radiales, realizamos inmunohistoquímica DAB post-inclusión contra GFAP y BLBP, en cortes semifinos. Estas inmunos revelaron que las células GFAP+ o BLBP+ que mostraron una expansión radial hacia el estrato granular presentaban un núcleo irregular y ocasionalmente ELCS (Figura 33D-G). Estas observaciones sugieren que las ELCS son una estructura característica de células madre neurales en las dos principales regiones neurogénicas.



**Figura 33. ELCS nucleares en los astrocitos radiales de la ZSG del giro dentado del hipocampo.** (A-C) Micrografías de MET de un astrocito localizado en la ZSG mostrando un núcleo invaginado y ELCS (flechas). (D) La imagen izquierda muestra una célula GFAP+ con morfología radial en la ZSG. La imagen derecha muestra la misma célula radial en un corte semifino contiguo. (E-G) Imágenes de MET del astrocito radial marcado en (D) mostrando un núcleo irregular con

ELCS (flechas). Escala, Escalas, 20  $\mu\text{m}$  (A), 2  $\mu\text{m}$  (B), 200nm (C), 50  $\mu\text{m}$  (D), 2.5  $\mu\text{m}$  (E), 500 nm (F, G). N: núcleo, C: citoplasma.

#### 4.8 La población de células B con ELCS está preservada evolutivamente.

La siguiente pregunta que nos planteamos fue si estas estructuras nucleares se conservaban evolutivamente en la ZSV-V de otras especies de mamíferos superiores, como los primates. Para resolver esta pregunta, estudiamos la ZSV-V de la especie de primate no-humano *Callithrix jacchus*, también conocido como marmoset común. Un estudio ultraestructural previo en esta especie describe la presencia de las células B1, B2, C, A y E (Sawamoto et al., 2011), sin embargo se desconocen las características morfológicas del núcleo de estas células. Con MET analizamos la morfología nuclear de las células presentes en la ZSV-V en monos neonatales (0-1 día, n=3) y adultos (2.5 años, n=3) y encontramos que las células que mostraron ELCS en sus núcleos presentaban un citoplasma claro y rico en filamentos intermedios, siendo caracterizadas como astrocitos o células tipo B (Figura 34A, B). Además, en ambas edades encontramos células B1 con ELCS, sin embargo, estas fueron mucho más escasas en los monos adultos (13 células B1 con ELCS en neonatales frente 1 en los adultos).

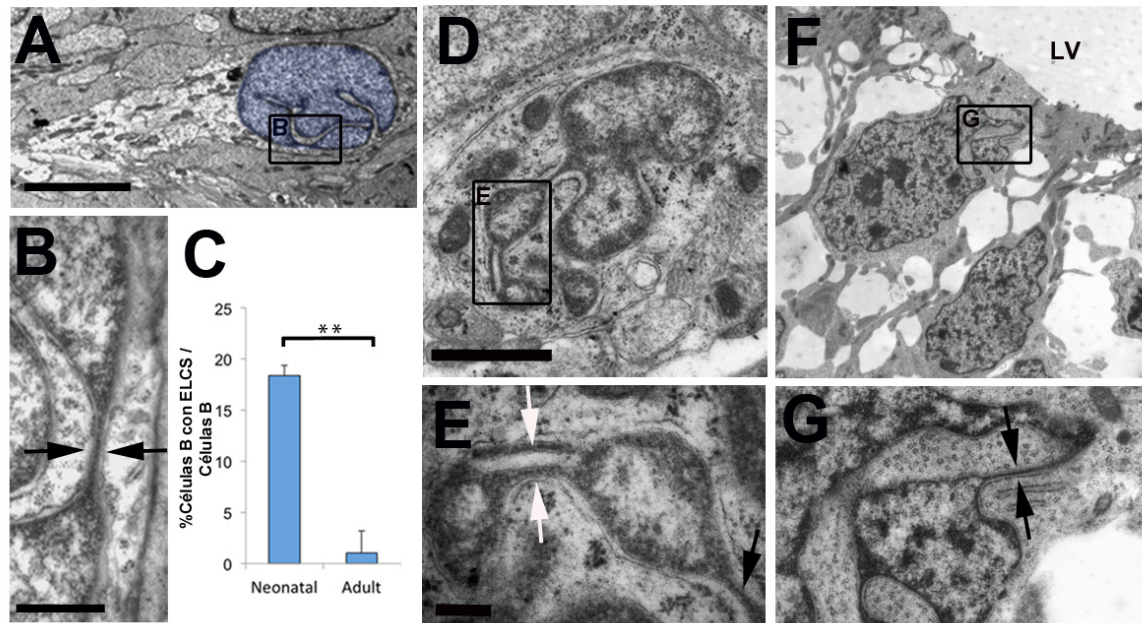
Por otra parte, observamos que la población de células tipo B con ELCS en marmosets neonatales representaba un  $18.37\% \pm 2.21\%$ , mientras que en el adulto esta población se reducía drásticamente hasta un  $1.01\% \pm 1.01\%$  (Figura 34C). En ambas edades, las ELCS encontradas pertenecían al tipo 1-1 a excepción de una célula encontrada en un ejemplar de marmoset neonatal que presentaba ELCS del tipo 1-2 (Figura 34D, E).

Adicionalmente estudiamos con MET una muestra de la ZSV de un feto humano de 18 semanas gestacionales. Realizamos un estudio de las células de glía radial y los progenitores neurales que se localizan en esta zona y observamos que las células de glía radial se caracterizaban por contactar la cavidad ventricular, presentar un cilio primario, y mostrar un citoplasma oscuro con cisternas paralelas de retículo endoplásmico rugoso y microtúbulos en la expansión radial. Al analizar estas células observamos que presentaban un núcleo muy irregular y ELCS (Figura 34F, G). También se observaron mitosis en contacto con la luz ventricular pero no se halló ninguna estructura semejante a las ELCS.



## Resultados

En conjunto, estas observaciones sugieren que las ELCS son una estructura nuclear distintiva de células madre neurales que se encuentra conservada evolutivamente en las especies de mamíferos superiores.



**Figura 34. La glía de la ZSV-V de los primates no humanos y humanos presenta ELCS nucleares.** (A, B) Imágenes de MET de una célula B de la ZSV-V de marmoset adulto, mostrando un núcleo invaginado con ELCS (flechas). (C) Cuantificaciones del número de células B con ELCS en la ZSV-V de monos neonatales y adultos (n=3). Observar la drástica disminución de estas células con la edad (p-valor <0.002). (D, E) Imágenes del núcleo de una célula B encontrada en un mono neonatal mostrando ELCS del tipo 1-1 (flecha negra) y 1-2 (flechas blancas). (F, G) Micrografías de MET de la zona ventricular de un feto humano (18 semanas gestacionales) mostrando una célula de glía radial contactando la cavidad ventricular y presentando ELCS (flechas).

## **Discusión**



## 5 Discusión

El fenómeno de neurogénesis adulta ha sido ampliamente estudiado durante las últimas décadas, ya que la comprensión de los procesos de regulación y activación de las células madre, así como la diferenciación, migración y reemplazamiento neuronal por parte de las nuevas neuronas plantean importantes posibilidades en el ámbito de la terapia celular. El descubrimiento de la naturaleza astrogial de las células madre neurales adultas ha permitido que numerosos grupos hayan caracterizado estas células a nivel morfológico y molecular. Actualmente se acepta que células B1 GFAP positivas con morfología radial son las verdaderas células madre neurales adultas. Además, se ha demostrado que esta población es heterogénea, pudiendo encontrarse en distintos estados de activación y dar lugar a diferentes tipos de neuronas según su localización. Por ello, numerosos grupos trabajan en dilucidar los mecanismos de regulación del genoma de estas células madre.

En el presente estudio caracterizamos una nueva particularidad de la envoltura nuclear de las células madre neurales de la ZSV-V, las *envelope-limited chromatin sheets* o ELCS. A través del estudio ultraestructural fino, el uso de marcadores moleculares, estudios de proliferación y el tratamiento antimetabólico con Ara-C, encontramos que las células tipo B1 con ELCS corresponden a las células madre quiescentes. Los análisis con MET revelaron que las ELCS comienzan a aparecer en la glía radial embrionaria alrededor de E14.5 y están presentes durante toda la vida en una subpoblación de células tipo B de la ZSV-V. Los ensayos de pulso y captura indicaron que las células tipo B quiescentes con ELCS tienen un origen embrionario. Adicionalmente, describimos que las ELCS podrían representar un compartimento nuclear específico, ya que expresan marcadores epigenéticos asociados con represión y telómeros. En conjunto, este trabajo aporta una nueva caracterización de los núcleos de las células madre neurales, contribuyendo a una mayor comprensión de la organización y funcionamiento únicos de la ZSV-V.

### 5.1 ELCS nucleares en la ZSV-V

Las células madre neurales han sido ampliamente estudiadas, no obstante su naturaleza astrogial dificulta distinguirlas de otros astrocitos parenquimáticos no-neurogénicos. Es por ello que numerosos grupos trabajan en encontrar aspectos morfológicos y/o moleculares que permitan diferenciar estas poblaciones. Entre estos

aspectos se ha descrito que la población de células B presenta un núcleo irregular (Doetsch et al., 1997) e inusuales invaginaciones de la envoltura nuclear (Capilla-Gonzalez et al., 2014). Sin embargo, estos estudios no han descrito en detalle la organización de esta inusual morfología nuclear, y poco se conoce acerca de su posible función. La escasez de información acerca de este rasgo de las células B nos llevó a estudiar detalladamente la morfología nuclear de los tipos celulares que componen la ZSV-V. En nuestro estudio observamos que estas estructuras tan sólo se hallaban presentes en las células B de la ZSV-V y se caracterizaban por presentar una fina lámina de cromatina delimitada en ambos lados por las membranas nuclear interna y externa. Esta estructura era muy similar a los palillos de tambor presentes en los neutrófilos, los cuales han sido descritos como láminas de cromatina limitadas por envoltura nuclear o ELCS (Davies y Haynes, 1975). Estas ELCS también han sido observadas en un tumor derivado de células gliales del sistema nervioso central, el meduloblastoma (Tani et al., 1971) y en astrocitos de la zona subcallosa próxima a la ZSV-V de roedores P5 (Wittmann et al., 2009). Por lo tanto, debido a la gran similitud en la organización de las estructuras nucleares encontradas en las células B de la ZSV-V y las ELCS previamente descritas, decidimos adoptar la misma nomenclatura.

## 5.2 Una subpoblación de células B presenta ELCS

En nuestro estudio encontramos que las ELCS nucleares se encuentran presentes en prácticamente la mitad de las células B de la ZSV-V de ratones P60, mientras que no se observan en los otros tipos celulares que constituyen la ZSV-V (células A, C y E) o en los astrocitos estriatales adyacentes. Esta observación es coincidente con el hecho de que los astrocitos localizados en la ZSV-V o células B han sido identificadas como las células madre neurales (Doetsch et al., 1997), y podría indicar que esta estructura esté relacionada con el mantenimiento de la identidad de célula madre. Tampoco encontramos diferencias en la frecuencia de células con ELCS en las regiones dorso-ventrales o antero-posteriores, hecho que parece sugerir que estas estructuras no participan en la especificación regional de tipo neuronal (Merkle et al., 2007).

Por otra parte, entre la población de células B con ELCS encontramos células tipo B1 y B2. Ambos tipos celulares se encuentran en la ZSV-V y forman parte del nicho neurogénico. Sin embargo, existen discrepancias acerca de la capacidad neurogénica de los astrocitos B2, ya que tan sólo las células B1 están consideradas como las verdaderas células madre neurales (Fuentealba et al., 2012). No obstante, algunos trabajos han demostrado la capacidad proliferativa de las células B2 en condiciones

fisiológicas, tras el tratamiento antimitótico con Ara-C (Doetsch et al., 1999; Pastrana et al., 2009) e incluso con el envejecimiento (Capilla-Gonzalez et al., 2014). Por otra parte, el hecho de que estas células no contacten la cavidad ventricular, y no estén directamente expuestas al líquido cefalorraquídeo, dificulta en gran medida el estudio de linaje celular de esta población y la comprensión de su mecanismo de señalización. Sin embargo cabe destacar que otras células madre neurales tales como los astrocitos radiales de la ZSG (Kempermann, 2011; Seri et al., 2001) o la glía radial externa, localizada en el cerebro humano en desarrollo (Fietz et al., 2010), presentan capacidad neurogénica y no contactan con la cavidad ventricular.

### 5.3 Las ELCS nucleares en células B, un rasgo de quiescencia

Las células madre neurales son una población heterogénea y forman un mosaico de células madre quiescentes y activas (Chaker et al., 2016; Codega et al., 2014; Morshead et al., 1994). En el presente trabajo, observamos que las células B con ELCS presentan un patrón de expresión GFAP<sup>+</sup>, BLBP<sup>+</sup>, Glast<sup>+</sup>, Nestin<sup>-</sup> y EGFR<sup>-</sup>. Este patrón de expresión molecular ha sido recientemente relacionado con la subpoblación de células B quiescentes (Codega et al., 2014). Adicionalmente, nuestros datos muestran que el 82.98 % de las células tipo B1, presentes en *pinwheels* de animales de 2 meses de edad, muestran ELCS nucleares y el 13.34 % expresión de EGFR y núcleo redondeado. Estos resultados son consistentes con observaciones previas en las que las células B1 EGFR<sup>+</sup> activas representan el 11.4% de la población de células B1 (Codega et al., 2014) y 8.6% se dividen activamente (Ponti et al., 2013; 2014). En nuestro trabajo, los estudios de pulso y captura con <sup>3</sup>H-Timidina también muestran que las células activas no presentan ELCS nucleares. Además esta población de células es capaz de sobrevivir al tratamiento con la droga antimitótica Ara-C, aspecto que ha sido relacionado con células quiescentes EGFR<sup>-</sup>, capaces de regenerar la ZSV-V (Doetsch et al., 1999; Pastrana et al., 2009). Sin embargo, tras el tratamiento con Ara-C también sobrevive una población de células con morfología nuclear esférica, hecho que podría explicarse ya que recientes estudios transcriptómicos han sugerido que las células madre neurales quiescentes o durmientes entran en un estado de preparada quiescente o *primed-quiescent* antes de la activación (Llorens-Bobadilla y Martin-Villalba, 2016; Shin et al., 2015). En conjunto, nuestros resultados sugieren que las ELCS presentes en las células B son un rasgo de quiescencia.

En esta línea, estudios realizados en células con ELCS fuera del sistema nervioso central apuntan a que las ELCS podrían formar parte de un programa que silencia genes específicos durante la diferenciación de neutrófilos (Sanchez y Wangh, 1999).

Además, se ha observado que células tumorales con ELCS pueden sobrevivir a tratamientos antimitóticos (Ahearn et al., 1967; Erenpreisa et al., 2002; Stalzer et al., 1965) y que tumores como el dermatofibrosarcoma presentan ELCS y tienen una elevada tendencia a recurrir tras la cirugía (Ghadially, 1985). Por tanto, las ELCS podrían representar un mecanismo de quiescencia en células tumorales quiescentes siendo consistente con nuestras observaciones en las células B de la ZSV-V.

#### **5.4 Las células tipo B no presentan ELCS *in vitro***

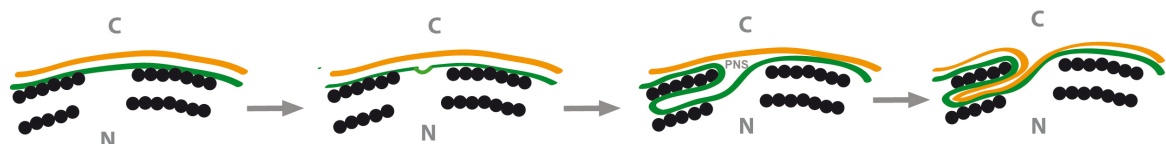
Los ensayos *in vitro* han sido ampliamente usados para estudiar la capacidad de autorrenovación y diferenciación de las células madre neurales (Gil-Perotín et al., 2013). Además, la expansión *in vitro* de células madre neurales ha facilitado el estudio de la organización tridimensional del genoma de estas células (Phillips-Cremins et al., 2013), así como el estudio de la regulación epigenética de las células de la ZSV-V (Lim y Alvarez-Buylla, 2014). Para poder determinar la relación entre las ELCS nucleares en células madre y los mapas de arquitectura de la cromatina previamente descritos, decidimos estudiar la presencia de estas estructuras en cultivos de neuroesferas y monocapa de la ZSV-V. Sin embargo, no observamos ninguna célula con ELCS en ninguno de los dos tipos de cultivos. Estudios previos muestran que los cultivos de neuroesferas y monocapa derivan de células activadas *in vivo* (Codega et al., 2014; Doetsch et al., 2002; Mich et al., 2014), lo que podría explicar la ausencia de estas estructuras. No obstante, no podemos descartar que algunas células madre quiescentes presentes en cultivo desensamblen las ELCS tras la inducción de la proliferación por parte de los factores de crecimiento.

Nuestro siguiente paso fue explorar si el tratamiento con ácido retinoico podía inducir la formación de ELCS en neuroesferas, tal y como se describe en neutrófilos (Olins et al., 2000). Sin embargo, aunque el ácido retinoico juega un importante papel en el desarrollo del sistema nervioso central y se expresa en la ZSV-V postnatal (Zetterström et al., 1999), no encontramos evidencias de la presencia de ELCS nucleares tras el tratamiento. Una posible explicación es que el ácido retinoico induzca la diferenciación de los neutrófilos (Olins et al., 1998), dando lugar a un estado de quiescencia mantenido por las ELCS, mientras que en las células B el mecanismo que cursa con la formación de las ELCS sea diferente ya que estas células no se diferencian. En esta línea, se ha observado que el tratamiento con ácido retinoico estimula la proliferación e incrementa la neurogénesis (Wang, 2005).

El hecho de no poder aislar *in vitro* la población de células B con ELCS supone un gran inconveniente a la hora de realizar estudios genómicos y transcriptómicos del contenido de las ELCS, ya que actualmente los experimentos de microdissección no presentan suficiente resolución como para separar las células con ELCS de las que no lo presentan. Además, no podríamos obtener el suficiente contenido de ADN como para determinar el contenido génico y proteico diferencial de las células B con ELCS en comparación con las que no las presentan. Futuros estudios en los que se determine si las células B con ELCS conservan la estructura tras la separación con FACS-sorter podrían facilitar el aislamiento de esta población y su posible caracterización molecular.

## 5.5 Origen embrionario de las ELCS nucleares en la ZSV-V

Recientes trabajos han determinado que las células madre quiescentes de la ZSV-V adulta se generan entre los estadios E13.5 y E15.5 y se mantienen quiescentes hasta que son reactivadas post-natalmente (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015). Nuestros hallazgos muestran que las ELCS comienzan a aparecer en el núcleo de la glía radial en este mismo periodo, sin embargo su formación continúa hasta P15. Una posible explicación es que el remodelado de la cromatina necesario para el estado quiescente comience durante este periodo de especificación de las células pre-B y no se observe morfológicamente hasta estadios más tardíos. También encontramos expresión de p57, marcador que se ha descrito en la glía radial que retarda la progresión del ciclo celular en las células madre quiescentes (Furutachi et al., 2015). Además nuestras observaciones sugieren que la formación de las ELCS es un proceso dinámico en el que inicialmente se forman anillos de envoltura nuclear que posteriormente darán lugar a las ELCS. Esta hipótesis concuerda con el modelo de “invaginación” propuesto por el grupo del Dr. Olins en el que se describe que las ELCS de tipo 1-1 se formarían a partir de un bolsillo formado por la membrana nuclear interna, que crecería dejando un espacio para fibras de cromatina de 30 nm divergentes. Esta invaginación de la membrana nuclear interna sería seguida por la membrana nuclear externa (Olins and Olins, 2009) (Figura 35).



**Figura 35. Modelo de invaginación de las ELCS.** Hipótesis estructural del origen de las ELCS a partir de la invaginación de la membrana nuclear interna. Sección hipotética de la envoltura nuclear asociada a las fibras de cromatina de 30 nm ilustrando como la invaginación de la membrana nuclear interna (verde) forma un bolsillo separando las fibras de cromatina. La membrana nuclear externa (naranja) sigue a la interna a través del espacio perinuclear y forma las ELCS. C: citoplasma, N: núcleo. Adaptado de (Olins y Olins, 2009).



## 5.6 Pérdida de células B con ELCS con la edad

Los primeros trabajos *in vitro* de la ZSV-V mostraron que las células madre neurales tienen capacidad de autorrenovarse y dan lugar a distintos tipos celulares (Reynolds and Weiss, 1992). Sin embargo, poco se conoce acerca del mecanismo *in vivo* por el cual las células madre neurales se mantienen en la ZSV-V a lo largo de la vida. ¿Existe un pool inicial que se va agotando con la edad? ¿O por el contrario las células B se autorrenuevan? Nuestros resultados muestran que a partir de los dos meses de edad, las células de la ZSV-V que entran en división no vuelven a ensamblar ELCS nucleares. Este resultado es consistente con trabajos previos en los que, a través del estudio de linaje celular, se ha observado un bajo número de células B1 marcadas asociadas a clones neurales en el bulbo olfatorio, sugiriendo una baja frecuencia de autorrenovación de las células B1 (Fuentealba et al., 2015). Además, también se ha sugerido que esta población de células madre quiescentes es necesaria para el mantenimiento a largo plazo de la actividad neurogénica, previniendo el posible agotamiento derivado de las sucesivas divisiones (Furutachi et al., 2015). En esta dirección, también hemos observado una disminución del porcentaje de células con ELCS con la edad, que se reduce a la mitad a los 2 años. Estos resultados se apoyan en estudios en los que se ha mostrado una disminución del potencial neurogénico y una reducción de las células madre neurales en la ZSV-V con la edad (Bouab et al., 2011; Capilla-Gonzalez et al., 2014; Enwere et al., 2004). Por lo tanto, la disminución del número de células con ELCS en la ZSV-V podría asociarse a un agotamiento de las células B en este nicho neurogénico. No obstante, futuros estudios serán necesarios para determinar si las células B1 pierden permanentemente las ELCS tras la activación, o si tras condiciones específicas tales como lesión, podrían reensamblarse de nuevo.

## 5.7 Composición molecular de las ELCS

A diferencia de la superficie celular, el conocimiento acerca de las proteínas que residen en las membranas nucleares y que forman parte de la envoltura nuclear es muy escaso. De más de 1000 proteínas transmembrana asociadas a la envoltura nuclear encontradas, muy pocas han sido caracterizadas (Korfali et al., 2014). En el presente trabajo decidimos estudiar la posible expresión de algunas de estas proteínas en las ELCS para determinar los componentes moleculares de esta inusual estructura. Estudiamos la expresión de la lámina B, Lap2 y LBR y encontramos que se hallaban en las ELCS y en el resto de la envoltura nuclear, no pudiendo determinar un marcador específico de esta región. En esta línea, tampoco se han encontrado componentes de la

envoltura nuclear específicos de las ELCS de neutrófilos, aunque parece existir una mayor expresión de lámina B, Lap2 y LBR (Olins et al., 2000; 2001; 2008; 1998; Olins y Olins, 2004). Curiosamente, Lap2 y LBR se asocian a la lámina B e intervienen en procesos de organización de cromatina (Gruenbaum y Foisner, 2015). LBR ha sido descrita como una proteína fundamental en la formación de las ELCS en neutrófilos, ya que se piensa que la actividad esterol-reductasa de su dominio transmembrana podría contribuir a la síntesis de membrana en el proceso de formación de las ELCS (Subramanian et al., 2011; Tsai et al., 2016).

Nuestro siguiente planteamiento fue determinar los componentes moleculares asociados a las fibras de heterocromatina presentes en las ELCS. Nuestros resultados mostraron que las fibras de 30 nm de cromatina localizadas en las ELCS mostraban el marcador epigenético 5-mC, confirmando que el ADN localizado en esta región se encontraba en estado de heterocromatina. A nivel de modificación de histonas, la heterocromatina presente en las ELCS expresaba la H3K9me3, pero no la H3K27me3. Interesantemente, este distintivo patrón de metilación de la histona 3 permite diferenciar entre la heterocromatina facultativa y constitutiva (Saksouk et al., 2015). La heterocromatina facultativa se forma en condiciones específicas del desarrollo y la diferenciación tisular, y está enriquecida en H3K27me3, mientras que la heterocromatina constitutiva está formada por regiones de secuencias repetitivas, su organización estructural es muy estable y se caracteriza por la metilación de ADN y la H3K9me3 (Nishibuchi y Déjardin, 2017). Por lo tanto, este patrón de metilación diferencial sugiere que las ELCS están principalmente compuestas por heterocromatina constitutiva.

El establecimiento de la conformación de la cromatina requiere de la unión de H3K9me3 a la proteína de unión a heterocromatina HP1 (Nishibuchi y Déjardin, 2017). Además, HP1 actúa como puente entre LBR, la lámina B y la cromatina reprimiendo la expresión génica (Eissenberg and Elgin, 2014). Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos expresión de HP1 en la región en las ELCS. Este hecho lanza algunas preguntas acerca de qué sistema de represión actúa sobre la cromatina localizada en las ELCS. Algunos trabajos muestran que Lap2 puede reprimir y asociarse directamente a la cromatina (Chojnowski et al., 2015; Dechat et al., 2000). Cabe destacar que el pequeño tamaño de las ELCS dificulta en gran medida el estudio de sus componentes con microscopía óptica y de fluorescencia convencional, siendo fundamental la confirmación de la presencia de estos componentes con el detalle que nos permite la MET. No obstante, futuros estudios a través del uso de microscopios de súper

resolución contribuirán en gran medida al estudio de los componentes de la envoltura nuclear implicados en la formación y mantenimiento de las ELCS nucleares.

## **5.8 A los telómeros les gustan las ELCS**

Como hemos expuesto anteriormente, nuestros datos apuntan a que las ELCS contienen heterocromatina constitutiva, característica de regiones pericentroméricas y telómeros (Saksouk et al., 2015). Curiosamente, las proteínas asociadas a telómeros cumplen un importante papel en la regulación de la capacidad proliferativa (Blackburn, 2001; Blasco, 2002). Entre estas proteínas se encuentra TRF2, una proteína asociada a telómeros que contribuye a preservar la integridad telomérica y mantener el estado de autorrenovación de las células madre neurales de la ZSV-V (Grammatikakis et al., 2016b). Nuestros resultados muestran que TRF2 se expresa en la envoltura nuclear de las células madre neurales y además se localiza preferencialmente en la región de las ELCS. Este resultado es consistente con trabajos previos en linfocitos y fibroblastos embrionarios, en los que se observa una localización preferencial de los telómeros cerca de la envoltura nuclear (Gonzalez-Suarez et al., 2009). Además, nuestros resultados muestran que las ELCS se encuentran en células B en estado quiescente, al igual que se ha observado en levaduras quiescentes con una viabilidad a largo tiempo formando un sub-compartimento de cromatina telomérica silenciada (Guidi et al., 2015).

Por otra parte, la presencia de 5-mC en las ELCS parece contradecir el hecho de que los telómeros no son susceptibles de metilación, ya que las secuencias repetitivas de los telómeros (TTAGGG) no presentan citosina. Sin embargo, se ha descrito que las regiones próximas a los telómeros denominadas “regiones subteloméricas” presentan una elevada densidad de islas de citosina o secuencias CpG y se caracterizan por la metilación 5-mC (Gonzalo y Eissenberg, 2016). Además, estas regiones pueden dirigir la localización periférica de sus correspondientes telómeros, sugiriendo que los telómeros de distintos cromosomas podrían tener localizaciones nucleares preferentes (Gonzalo y Eissenberg, 2016). Por lo tanto, es posible que estas regiones también puedan encontrarse dentro o próximas a las ELCS.

En resumen, basándonos en las observaciones previas y la presencia de regiones teloméricas en las ELCS y en su proximidad, proponemos a las ELCS como un compartimento celular para dominios heterocromáticos específicos relacionados con el estado de quiescencia de las células madre neurales de la ZSV-V.

## 5.9 ELCS en la otra región neurogénica, la ZSG

Para determinar si las ELCS eran una característica específica de las células B de la ZSV-V o de las células madre neurales en general, decidimos estudiar el núcleo de los astrocitos radiales de la ZSG del giro dentado del hipocampo. Nuestros resultados mostraron que, al igual que en la ZSV-V, las ELCS tan sólo se encontraban en células de tipo astrogliol. Sin embargo, la proporción de astrocitos con ELCS fue mucho más baja que la encontrada en la ZSV-V (1.5% en la ZSG frente al 11,98% en la ZSV-V). Teniendo en cuenta que la población de astrocitos radiales o células tipo 1 está considerada en general como una población de células madre quiescentes (Furutachi et al., 2013; Gonçalves et al., 2016), la baja proporción encontrada podría contradecirse con el hecho de que las ELCS son un signo de quiescencia en células madre. No obstante, recientes estudios transcriptómicos han revelado que la población de células madre de la ZSG es heterogénea y las células madre quiescentes pueden encontrarse en distintos estados (Shin et al., 2015). Por lo tanto, no podemos descartar que las células de glía radial con ELCS nucleares puedan pertenecer a células madre neurales en un estado de quiescencia específico.

## 5.10 Las ELCS se conservan evolutivamente en la ZSV-V

En el presente trabajo, estudiamos la presencia de las ELCS nucleares en la ZSV-V del primate no-humano marmoset común. Nuestros resultados mostraron que los astrocitos de la ZSV-V de marmoset, al igual que en el ratón, presentaban ELCS nucleares y disminuían drásticamente con la edad. Esta reducción podría estar relacionada con la sustancial disminución de la capacidad neurogénica descrita con el envejecimiento en marmoset (Leuner et al., 2007; McDermott y Lantos, 1990; Sawamoto et al., 2011). Adicionalmente, observamos una reducción de las células B1 en el adulto, lo que también ocurre en roedores, donde parte de la disminución de la capacidad proliferativa se relaciona con la pérdida de células B1. Estos datos sugieren que las ELCS nucleares en células B podrían servir como indicativo de la presencia de células madre con potencial neurogénico.

Por otra parte, la proporción de células B con ELCS, estudiadas en cortes ultrafinos simples en los primates neonatales y jóvenes, era menor que la de ratones de la misma edad (neonatal: 24% en ratones P0 y 18% en marmoset; adulto: 2,14% en ratones P360 y 1,01% en marmoset). En esta línea, algunos trabajos han descrito que la proliferación, neurogénesis y migración celular en marmoset tiene lugar en una

## *Discusión*

proporción substancialmente menor a la observada en roedores (Bunk et al., 2010; Sawamoto et al., 2011).

En nuestro trabajo también encontramos ELCS nucleares en células de glía radial embrionaria humana en un feto de 18 semanas gestacionales. Un estudio realizado en la eminencia ganglionar de fetos humanos de 24 semanas gestacionales describe la presencia de unas estructuras denominadas “fusiones nucleares” en células claras (Guerrero-Cazares et al., 2011). Estas estructuras presentan la misma organización que las ELCS nucleares, aunque no se describe el tipo celular en el que se encuentran. Estos resultados indican que las ELCS nucleares son una característica de las células de glía radial embrionaria muy conservada en la evolución.

Finalmente, en el presente trabajo no presentamos resultados relacionados con la presencia de ELCS nucleares en muestras de la ZSV-V humana adulta ya que en estudios previos de nuestro grupo encontramos que los astrocitos presentes en las capas GAP y ribbon de la ZSV-V adulta presentan un núcleo redondeado sin invaginaciones nucleares (Chaichana et al., 2009; Quiñones-Hinojosa et al., 2005). Una posible explicación para el hecho de que no se hayan observado estas estructuras nucleares en los astrocitos de la ZSV-V humana adulta, es el hecho de que no se han identificado astrocitos B1 contactando la cavidad ventricular debido a la compleja red de filamentos intermedios presente en la capa GAP humana adulta. Otra posible explicación es que, al igual que hemos descrito en ratón y marmoset, la proporción de células madre con ELCS podría disminuir drásticamente con la edad, en paralelo con la importante disminución de la capacidad proliferativa descrita en la ZSV-V humana adulta (Bergmann et al., 2015; Paredes et al., 2015).

# **Conclusiones**



## 6 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. Una subpoblación de células B de la ZSV-V adulta de ratones presenta láminas de cromatina simple de 30 nm delimitadas en ambos lados por las membranas nucleares interna y externa. Estas estructuras se corresponden a las *envelope limited chromatin sheets* o ELCS nucleares.
2. Las ELCS nucleares se encuentran presentes en las poblaciones de astrocitos tipo B1 y B2 de la ZSV-V de ratones. El porcentaje de células B con ELCS disminuye drásticamente con la edad de un 45,62% en P60 a un 24% en P630 (21 meses).
3. Las células B con ELCS presentan el patrón de expresión molecular GFAP+, BLBP+, GLAST+, Nestina- y EGFR-, característico de células madre quiescentes de la ZSV-V. Y representan el 82,98% de las células madre neurales de la ZSV-V o células tipo B1 en ratones P60.
4. Las células B activas, caracterizadas por la expresión de EGFR y la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina, no presentan ELCS nucleares. Además, dos meses después de la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina, las células B de ratones P60 no reensamblan estas estructuras.
5. Las células B con ELCS presentes en la ZSV-V adulta sobreviven al tratamiento con el antimitótico Ara-C.
6. Las células presentes en los cultivos *in vitro* de neuroesferas y monocapa derivados de la ZSV-V de ratones adultos no presentan ELCS nucleares.
7. Las ELCS nucleares comienzan a formarse en el estadio E14.5, en una población de células de glía radial quiescentes p57+, precursoras de las células B1 de la ZSV-V adulta. Este proceso de formación es dinámico y tiene lugar a partir de una invaginación de la membrana nuclear interna, que genera un incremento del espacio perinuclear, y aísla una lámina de cromatina de 30 nm denominado “anillo de envoltura nuclear”. Esta invaginación es seguida por la membrana nuclear interna.



## Conclusiones

8. Las ELCS nucleares presentes en las células B representan un compartimento nuclear específico caracterizado por la expresión de las proteínas de la envoltura nuclear lámina B, Lap2 y LBR, los factores epigenéticos 5-mC y H3k9me3 y la presencia telómeros.

9. Una pequeña población de astrocitos radiales de la ZSG del giro dentado del hipocampo de ratones presenta ELCS nucleares semejantes a las observadas en la ZSV-V.

10. La ZSV-V neonatal y adulta del primate *Callithrix jacchus* presenta células B con ELCS nucleares idénticas a las observadas en células B de roedores. Estas células sufren una drástica disminución con la edad.

11. Las células de glía radial localizadas en la eminencia ganglionar media del humano fetal presentan ELCS nucleares idénticas a las observadas en glía radial y células B en la ZSV-V de ratones y monos.

12. Los resultados obtenidos en el estudio de la morfología nuclear de las células madre presentes en la ZSV-V de roedores, primates no-humanos y humanos, sugiere que las ELCS nucleares se encuentran conservadas en las células madre neurales de la ZSV-V de mamíferos a lo largo de la evolución.

## **Bibliografía**



## 7 Bibliografía

Ahearn, M.J., Lewis, C.W., Campbell, L.A., and Luce, J.K. (1967). Nuclear bleb formation in human bone marrow cells during cytosine arabinoside therapy. *Nature* 215, 196–197.

Alfaro-Cervelló, C., Soriano-Navarro, M., Mirzadeh, Z., Alvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J.-M. (2012). Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. *J. Comp. Neurol.* 520, 3528–3552.

Altman, J. (1962). Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Exp. Neurol.* 5, 302–318.

Alvarez-Buylla, A., Kohwi, M., Nguyen, T.M., and Merkle, F.T. (2008). The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 73, 357–365.

Alvarez-Buylla, A., Theelen, M., and Nottebohm, F. (1990). Proliferation “hot spots” in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5, 101–109.

Alvarez-Buylla, A., and Ihrie, R.A. (2014). Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 33, 105–111.

Anderson, D.R. (1966). Ultrastructure of normal and leukemic leukocytes in human peripheral blood. *J. Ultrastruct. Res.* 14, 1–42.

Barton, J.C., Parmley, R.T., Carroll, A.J., Huang, S.T., Goodnough, L.T., Findley, H.W., and Ragab, A.H. (1987). Preleukemia in Fanconi's anemia: hematopoietic cell multinuclearity, membrane duplication, and dysgranulogenesis. *J. Submicrosc. Cytol.* 19, 355–364.

Bauchet, L., Lonjon, N., Vachery-Lahaye, F., Boullaran, A., Privat, A., and Hugnot, J.-P. (2013). Isolation and culture of precursor cells from the adult human spinal cord. *Methods Mol. Biol.* 1059, 87–93.

Beaumont, A., Othman, S., and Fragu, P. (1981). The fine structure of papillary carcinoma of the thyroid. *Histopathology* 5, 377–388.

Belmont, A.S., Zhai, Y., and Thilenius, A. (1993). Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography. *J. Cell Biol.* 123, 1671–1685.

Benarroch-Popivker, D., Pisano, S., Mendez-Bermudez, A., Lototska, L., Kaur, P., Bauwens, S., Djerbi, N., Latrick, C.M., Fraiser, V., Pei, B., et al. (2016). TRF2-Mediated Control of Telomere DNA Topology as a Mechanism for Chromosome-End Protection. *Molecular Cell* 61, 274–286.

Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M.S.Y., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Landén, M., Druid, H., et al. (2012). The Age of Olfactory Bulb Neurons in Humans. *Neuron* 74, 634–639.

Bergmann, O., Spalding, K.L., and Frisén, J. (2015). Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a018994.

Bird, A.P., and Wolffe, A.P. (1999). Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451–454.

Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398.

Blackburn, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661–673.

## Bibliografía

- Blasco, M.A. (2002). Telomerase beyond telomeres. *Nature Reviews Cancer* 2, 627–633.
- Bouab, M., Paliouras, G.N., Aumont, A., Forest-Bérard, K., and Fernandes, K.J.L. (2011). Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* 173, 135–149.
- Brachner, A., and Foisner, R. (2011). Evolvement of LEM proteins as chromatin tethers at the nuclear periphery. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1735–1741.
- Bunk, E.C., Stelzer, S., Hermann, S., Schäfers, M., Schlatt, S., and Schwamborn, J.C. (2010). Cellular organization of adult neurogenesis in the Common Marmoset. *Aging Cell* 10, 28–38.
- Bunting, R.W., and Selig, M.K. (2002). Localization of DNA in Ultrascopic Nuclear Appendages of Polymorphonuclear White Blood Cells from Patients with Low Serum B12. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50, 1381–1388.
- Burke, B., and Stewart, C.L. (2012). The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 13–24.
- Capilla-Gonzalez, V., Cebrian-Silla, A., Guerrero-Cazares, H., Garcia-Verdugo, J.M., and Quiñones-Hinojosa, A. (2013). The generation of oligodendroglial cells is preserved in the rostral migratory stream during aging. *Front Cell Neurosci* 7, 147.
- Capilla-Gonzalez, V., Cebrian-Silla, A., Guerrero-Cazares, H., Garcia-Verdugo, J.-M., and Quiñones-Hinojosa, A. (2014). Age-related changes in astrocytic and ependymal cells of the subventricular zone. n/a–n/a.
- Caviness, V.S., and Takahashi, T. (1995). Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain and Development* 17, 159–163.
- Chaichana, K.L., Guerrero-Cazares, H., Capilla-Gonzalez, V., Zamora-Berridi, G., Achanta, P., Gonzalez-Perez, O., Jallo, G.I., Garcia-Verdugo, J.-M., and Quiñones-Hinojosa, A. (2009). Intra-operatively obtained human tissue: Protocols and techniques for the study of neural stem cells. *Journal of Neuroscience Methods* 180, 116–125.
- Chaker, Z., Codega, P., and Doetsch, F. (2016). A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *WIREs Dev Biol* 5, 640–658.
- Chojnowski, A., Ong, P.F., Wong, E.S., Lim, J.S., Mutalif, R.A., Navasankari, R., Dutta, B., Yang, H., Liow, Y.Y., Sze, S.K., et al. (2015). Progerin reduces LAP2 $\alpha$ -telomere association in Hutchinson-Gilford progeria. *eLife* 4, 10114.
- Clausen, K.P., and Haam, von, E. (1969). Fine structure of malignancy-associated changes (MAC) in peripheral human leukocytes. *Acta Cytol.* 13, 435–442.
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., DeLeo, A.M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014). Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron* 82, 545–559.
- Cremer, T., and Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics* 2, 292–301.
- Dallapiccola, B., Ferranti, G., Giannotti, A., Novelli, G., Pasquini, L., and Porfirio, B. (1984). A live infant with trisomy 14 mosaicism and nuclear abnormalities of the neutrophils. *Journal of Medical Genetics* 21, 467–470.
- Davies, H.G., and Haynes, M.E. (1975). Light- and electron-microscope observations on certain leukocytes in a teleost fish and a comparison of the envelope-limited monolayers of chromatin structural units in different species. *J. Cell. Sci.* 17, 263–285.

- Davies, H.G., and Small, J.V. (1968). Structural units in chromatin and their orientation on membranes. *Nature* 217, 1122–1125.
- Dechat, T., Vlcek, S., and Foisner, R. (2000). Review: Lamina-Associated Polypeptide 2 Isoforms and Related Proteins in Cell Cycle-Dependent Nuclear Structure Dynamics. *Journal of Structural Biology* 129, 335–345.
- Delgado, R.N., Lu, C., Lim, D.A., Delgado, R.N., and Lu, C. (2016). Maintenance of neural stem cell regional identity in culture. 1–10.
- Djaldetti, M., Bergman, M., Salman, H., Cohen, A.M., and Bessler, H. (2004). Ultrastructural features of bone marrow cells from patients with acquired sideroblastic anemia. *Microsc. Res. Tech.* 63, 155–158.
- Djaldetti, M., Gardyn, J., Maran, R., Floru, S., and Mittelman, M. (2009). Ultrastructural Observations on a Variant of Acute Promyelocytic Leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 9, 427–431.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *Journal of Neuroscience* 17, 5046–5061.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.-M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36, 1021–1034.
- Dromard, C., Guillon, H., Rigau, V., Ripoll, C., Sabourin, J.C., Perrin, F.E., Scamps, F., Bozza, S., Sabatier, P., Lonjon, N., et al. (2008). Adult human spinal cord harbors neural precursor cells that generate neurons and glial cells in vitro. *J. Neurosci. Res.* 86, 1916–1926.
- Eggenchwiler, J.T., and Anderson, K.V. (2007). Cilia and Developmental Signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 345–373.
- Eguchi, M., Hanamura, K., Tsukada, M., Komiyama, A., and Akabane, T. (1977). Quantitative observations of nuclear pockets and nuclear shape of acute leukemic cells in childhood. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 40, 493–499.
- Eisenberg, J.C., and Elgin, S.C.R. (2014). HP1a: a structural chromosomal protein regulating transcription. *Trends in Genetics* 30, 103–110.
- Encinas, J.M., Michurina, T.V., Peunova, N., Park, J.-H., Tordo, J., Peterson, D.A., Fishell, G., Koulakov, A., and Enikolopov, G. (2011). Division-Coupled Astrocytic Differentiation and Age-Related Depletion of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Stem Cell* 8, 566–579.
- Enwere, E., Shingo, T., Gregg, C., Fujikawa, H., Ohta, S., and Weiss, S. (2004). Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J. Neurosci.* 24, 8354–8365.
- Epstein, M.A., Barr, Y.M., and Achong, B.G. (1966). Preliminary observations on new lymphoblast strains (EB4, EB5) from Burkitt tumours in a British and a Ugandan patient. *Br. J. Cancer* 20, 475–479.
- Erenpreisa, J., Ivanov, A., Cragg, M., Selivanova, G., and Illidge, T. (2002). Nuclear envelope-limited chromatin sheets are part of mitotic death. *Histochem. Cell Biol.* 117, 243–255.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317.

## Bibliografía

Feliciano, D.M., Bordey, A., and Bonfanti, L. (2015). Noncanonical Sites of Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a018846–15.

Feng, L., and Heintz, N. (1995). Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development* 121, 1719–1730.

Ferrón, S., Mira, H., Franco, S., Cano-Jaimez, M., Bellmunt, E., Ramírez, C., Fariñas, I., and Blasco, M.A. (2004). Telomere shortening and chromosomal instability abrogates proliferation of adult but not embryonic neural stem cells. *Development* 131, 4059–4070.

Fietz, S.A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Bräuninger, M., Stenzel, D., Fish, J.L., Corbeil, D., Riehn, A., Distler, W., Nitsch, R., et al. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nature Publishing Group* 13, 690–699.

Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L.-P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H., and Kempermann, G. (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience* 23, 373–382.

Fiorelli, R., Cebrian-Silla, A., Garcia-Verdugo, J.-M., and Raineteau, O. (2013). The adult spinal cord harbors a population of GFAP-positive progenitors with limited self-renewal potential. *61*, 2100–2113.

Flament-Durand, J., and Brion, J.P. (1985). *Tanycytes: Morphology and Functions: A Review*. (Elsevier), pp. 121–155.

Fuentealba, L.C., Obernier, K., and Alvarez-Buylla, A. (2012). Adult Neural Stem Cells Bridge Their Niche. *Stem Cell* 10, 698–708.

Fuentealba, L.C., Rompani, S.B., Parraguez, J.I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C.L., and Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161, 1644–1655.

Fujita, S. (2014). *Neuroscience Research*. *Neuroscience Research* 86, 3–13.

Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I., and Gotoh, Y. (2013). p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *The EMBO Journal* 32, 970–981.

Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K.I., Hirabayashi, Y., et al. (2015). Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 18, 657–665.

Gadisseux, J.F., and Evrard, P. (1985). Glial-neuronal relationship in the developing central nervous system. A histochemical-electron microscope study of radial glial cell particulate glycogen in normal and reeler mice and the human fetus. *Dev. Neurosci.* 7, 12–32.

Garcia-Verdugo, J.-M., Ferrón, S., Flames, N., Collado, L., Desfilis, E., and Font, E. (2002). The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res. Bull.* 57, 765–775.

Gay, S., and Foiani, M. (2015). Chapter Six – Nuclear Envelope and Chromatin, Lock and Key of Genome Integrity (Elsevier).

Ghadially, F.N. (1997). Case for the panel. Mitochondrial inclusions in prostate adenocarcinoma. *Ultrastruct Pathol* 21, 475–477.

Ghadially, F.N. (1985). *Diagnostic Electron Microscopy of Tumours*.

Ghadially, F.N. Ultrastructural pathology of the cell and matrix.

Giachino, C., and Taylor, V. (2009). Lineage analysis of quiescent regenerative stem cells in the adult brain by genetic labelling reveals spatially restricted neurogenic niches in the olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience* 30, 9–24.

Gil-Perotín, S., Duran-Moreno, M., Belzunegui, S., Luquin, M.-R., and Garcia-Verdugo, J.-M. (2009). Ultrastructure of the subventricular zone in *Macaca fascicularis* and evidence of a mouse-like migratory stream. *J. Comp. Neurol.* 514, 533–554.

Gil-Perotín, S., Duran-Moreno, M., Cebrian-Silla, A., Ramírez, M., García-Belda, P., and Garcia-Verdugo, J.-M. (2013). Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec (Hoboken)* 296, 1435–1452.

Gonçalves, J.T., Schafer, S.T., and Gage, F.H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167, 897–914.

Gonzales-Roybal, G., and Lim, D.A. (2013). Chromatin-based epigenetics of adult subventricular zone neural stem cells. *Front. Genet.* 4, 194.

Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A.B., Perkins, S.M., Vermolen, B., Lichtensztejn, D., Grotzky, D.A., Morgado-Palacin, L., Gapud, E.J., Sleckman, B.P., Sullivan, T., et al. (2009). Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. 28, 2414–2427.

Gonzalo, S., and Eissenberg, J.C. (2016). ScienceDirect Tying up loose ends: telomeres, genomic instability and lamins. *Current Opinion in Genetics & Development* 37, 109–118.

Goodman, T., and Hajihosseini, M.K. (2015). Hypothalamic tanycytes—masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Front. Neurosci.* 9, 995–999.

Gorkin, D.U., Leung, D., and Ren, B. (2014). The 3D Genome in Transcriptional Regulation and Pluripotency. *Stem Cell* 14, 762–775.

Gómez-Gaviro, M.V., Scott, C.E., Sesay, A.K., Matheu, A., Booth, S., Galichet, C., and Lovell-Badge, R. (2012). Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1317–1322.

Grammatikakis, I., Zhang, P., Mattson, M.P., and Gorospe, M. (2016a). The long and the short of TRF2 in neurogenesis. *Cell Cycle* 15, 0–00.

Grammatikakis, I., Zhang, P., Mattson, M.P., and Gorospe, M. (2016b). The long and the short of TRF2 in neurogenesis. *Cell Cycle* 15, 3026–3032.

Gritti, A., Frölichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E.A., Cova, L., Pagano, S.F., Bjornson, C.R., and Vescovi, A.L. (1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *Journal of Neuroscience* 19, 3287–3297.

Gruenbaum, Y., and Foisner, R. (2015). Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 131–164.

Guerrero-Cazares, H., Gonzalez-Perez, O., Soriano-Navarro, M., Zamora-Berridi, G., Garcia-Verdugo, J.-M., and Quiñones-Hinojosa, A. (2011). Cytoarchitecture of the lateral ganglionic eminence and rostral extension of the lateral ventricle in the human fetal brain. *J. Comp. Neurol.* 519, 1165–1180.

Guidi, M., Ruault, M., Marbouty, M., Loïodice, I., Cournac, A., Billaudeau, C., Hocher, A., Mozziconacci, J., Koszul, R., and Taddei, A. (2015). Spatial reorganization of telomeres in long-lived quiescent cells. *Genome Biology* 1–15.



## Bibliografía

Hamilton, L.K., Truong, M.K.V., Bednarczyk, M.R., Aumont, A., and Fernandes, K.J.L. (2009). Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Nsc* 164, 1044–1056.

Han, Y.-G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J.-M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 11, 277–284.

Hoffmann, K., Sperling, K., Olins, A.L., and Olins, D.E. (2007). The granulocyte nucleus and lamin B receptor: avoiding the ovoid. *Chromosoma* 116, 227–235.

Horner, P.J., Power, A.E., Kempermann, G., Kuhn, H.G., Palmer, T.D., Winkler, J., Thal, L.J., and Gage, F.H. (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 20, 2218–2228.

Hsieh, J., and Zhao, X. (2016). Genetics and Epigenetics in Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a018911–a018917.

Ihrle, R.A., and Alvarez-Buylla, A. (2011). Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron* 70, 674–686.

Iyengar, B.R., Choudhary, A., Sarangdhar, M.A., Venkatesh, K.V., Gadgil, C.J., and Pillai, B. (2014). Non-coding RNA interact to regulate neuronal development and function. *Front Cell Neurosci* 8, 47.

Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33, 245–254.

Juliandi, B., Abematsu, M., and Nakashima, K. (2010). Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation. *Development, Growth & Differentiation* 52, 493–504.

Kaslin, J., Ganz, J., and Brand, M. (2008). Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 101–122.

Katayama, I., and Schneider, G.B. (1977). Further ultrastructural characterization of hairy cells of leukemic reticuloendotheliosis. *Am. J. Pathol.* 86, 163–182.

Kempermann, G. (2004). Functional significance of adult neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 14, 186–191.

Kempermann, G. (2011). Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* 33, 1018–1024.

Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., and Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosciences* 27, 447–452.

Kim, Y., Sharov, A.A., McDole, K., Cheng, M., Hao, H., Fan, C.-M., Gaiano, N., Ko, M.S.H., and Zheng, Y. (2011). Mouse B-type lamins are required for proper organogenesis but not by embryonic stem cells. *Science* 334, 1706–1710.

Kokoeva, M.V., Yin, H., and Flier, J.S. (2007). Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 505, 209–220.

Korfali, N., Wilkie, G.S., Swanson, S.K., Srsen, V., las Heras, de, J., Batrakou, D.G., Malik, P., Zuleger, N., Kerr, A.R.W., Florens, L., et al. (2014). The nuclear envelope proteome differs notably between tissues. *Nucleus* 3, 552–564.

Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural

Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184.

Krijger, P.H.L., Di Stefano, B., de Wit, E., Limone, F., van Oevelen, C., de Laat, W., and Graf, T. (2016). Cell-of-Origin-Specific 3D Genome Structure Acquired during Somatic Cell Reprogramming. *Stem Cell* 1–15.

Kusne, Y., Duran-Moreno, M., Cabrales, E., Gil-Perotín, S., Ortiz, C., Bin Chen, Garcia-Verdugo, J.-M., Sanai, N., Mirzadeh, Z., and Alvarez-Buylla, A. (2016). Bi- and unciliated ependymal cells define continuous floor-plate-derived tanycytic territories. *Nat Comms* 8, 1–12.

Lange, C., Turrero Garcia, M., Decimo, I., Bifari, F., Eelen, G., Quaegebeur, A., Boon, R., Zhao, H., Boeckx, B., Chang, J., et al. (2016). Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis. *The EMBO Journal* 35, 924–941.

Lee, D.A., and Blackshaw, S. (2012). Functional implications of hypothalamic neurogenesis in the adult mammalian brain. *International Journal of Developmental Neuroscience* 30, 615–621.

Lehtinen, M.K., Zappaterra, M.W., Chen, X., Yang, Y.J., Hill, A.D., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., et al. (2011). The Cerebrospinal Fluid Provides a Proliferative Niche for Neural Progenitor Cells. *Neuron* 69, 893–905.

Lepousez, G., Valley, M.T., and Lledo, P.-M. (2013). The impact of adult neurogenesis on olfactory bulb circuits and computations. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 339–363.

Leuner, B., Kozorovitskiy, Y., Gross, C.G., and Gould, E. (2007). Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 104, 17169–17173.

Levine, G.D., and Dorfman, R.F. (1975). Nodular lymphoma: an ultrastructural study of its relationship to germinal centers and a correlation of light and electron microscopic findings. *Cancer* 35, 148–164.

Licht, T., Goshen, I., Avital, A., Kreisel, T., Zubedat, S., Eavri, R., Segal, M., Yirmiya, R., and Keshet, E. (2011). Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 108, 5081–5086.

Lim, D.A. (2013). Chromatin-based epigenetics of adult subventricular zone neural stem cells. 1–11.

Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in Neurosciences* 1–9.

Lin, R., and Iacovitti, L. (2015). Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. *Brain Research* 1628, 327–342.

Llorens-Bobadilla, E., and Martin-Villalba, A. (2016). ScienceDirect Adult NSC diversity and plasticity: the role of the niche. *Current Opinion in Neurobiology* 42, 68–74.

Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., and Martin-Villalba, A. (2015). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Stem Cell* 1–29.

Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145–1148.

Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978–981.

Lopez-Juarez, A., Howard, J., Ullom, K., Howard, L., Grande, A., Pardo, A., Waclaw, R., Sun, Y.Y., Yang, D., Kuan, C.Y., et al. (2013). Gsx2 controls region-specific activation of neural stem

## Bibliografía

cells and injury-induced neurogenesis in the adult subventricular zone. *Genes & Development* 27, 1272–1287.

López-Otín, C., Galluzzi, L., Freije, J.M.P., Madeo, F., and Kroemer, G. (2016). Metabolic Control of Longevity. *Cell* 166, 802–821.

Luo, J., Daniels, S.B., Lenington, J.B., Notti, R.Q., and Conover, J.C. (2006). The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* 5, 139–152.

Lutzner, M.A., and Hecht, F. (1966). Nuclear anomalies of the neutrophil in a chromosomal triplication: the D1 (13-15) trisomy syndrome. An electron microscopic study. *Lab. Invest.* 15, 597–605.

Martens, D.J., Seaberg, R.M., and Van Der Kooy, D. (2002). In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 16, 1045–1057.

McDermott, K.W.G., and Lantos, P.L. (1990). Cell proliferation in the subependymal layer of the postnatal marmoset, *Callithrix jacchus*. *Developmental Brain Research* 57, 269–277.

Meletis, K., Barnabé-Heider, F., Carlén, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O., and Frisén, J. (2008). Spinal Cord Injury Reveals Multilineage Differentiation of Ependymal Cells. *PLoS Biol* 6, e182–15.

Menn, B. (2006). Origin of Oligodendrocytes in the Subventricular Zone of the Adult Brain. *Journal of Neuroscience* 26, 7907–7918.

Merkle, F.T., Fuentealba, L.C., Sanders, T.A., Magno, L., Kessar, N., and Alvarez-Buylla, A. (2013). Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nat Neurosci* 17, 207–214.

Merkle, F.T., Mirzadeh, Z., and Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317, 381–384.

Merkle, F.T., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.-M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17528–17532.

Mich, J.K., Signer, R.A., Nakada, D., Pineda, A., Burgess, R.J., Vue, T.Y., Johnson, J.E., and Morrison, S.J. (2014). Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *eLife* 3, e02669–27.

Ming, G.-L., and Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70, 687–702.

Mirzadeh, Z., Han, Y.G., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2010). Cilia Organize Ependymal Planar Polarity. *Journal of Neuroscience* 30, 2600–2610.

Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.-M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Stem Cell* 3, 265–278.

Mollo, F., and Stramignoni, A. (1967). Nuclear projections in blood and lymph node cells of human leukaemias and Hodgkin's disease and in lymphocytes cultured with phytohaemagglutinin. *Br. J. Cancer* 21, 519–523.

Mollo, F., Canese, M.G., and Stramignoni, A. (1969). Nuclear sheets in epithelial and connective tissue cells. *Nature* 221, 869–870.

- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S., and van der Kooy, D. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13, 1071–1082.
- Nishibuchi, G., and Déjardin, J. (2017). The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals. *Chromosome Research* 1–11.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., and Kriegstein, A.R. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci.* 22, 3161–3173.
- Olins, A.L., Buendia, B., Herrmann, H., Lichter, P., and Olins, D.E. (1998). Retinoic acid induction of nuclear envelope-limited chromatin sheets in HL-60. *Exp. Cell Res.* 245, 91–104.
- Olins, A., Herrmann, H., Lichter, P., and Olins, D.E. (2000). Retinoic Acid Differentiation of HL-60 Cells Promotes Cytoskeletal Polarization. *Exp. Cell Res.* 254, 130–142.
- Olins, A., Herrmann, H., Lichter, P., Kratzmeier, M., Doenecke, D., and Olins, D.E. (2001). Nuclear Envelope and Chromatin Compositional Differences Comparing Undifferentiated and Retinoic Acid- and Phorbol Ester-Treated HL-60 Cells. *Exp. Cell Res.* 268, 115–127.
- Olins, A., Zwerger, M., Herrmann, H., Zentgraf, H., Simon, A., Monestier, M., and Olins, D. (2008). The human granulocyte nucleus: Unusual nuclear envelope and heterochromatin composition. *European Journal of Cell Biology* 87, 279–290.
- Olins, A.L., and Olins, D.E. (2004). Cytoskeletal influences on nuclear shape in granulocytic HL-60 cells. *BMC Cell Biol* 5, 30.
- Olins, D.E., and Olins, A.L. (2009). Nuclear envelope-limited chromatin sheets (ELCS) and heterochromatin higher order structure. *Chromosoma* 118, 537–548.
- Paredes, M.F., James, D., Gil-Perotin, S., Kim, H., Cotter, J.A., Ng, C., Sandoval, K., Rowitch, D.H., Xu, D., McQuillen, P.S., et al. (2016). Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science* 354, aaf7073–aaf7073.
- Paredes, M.F., Sorrells, S.F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2015). Brain size and limits to adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 524, 646–664.
- Park, D.H., Hong, S.J., Salinas, R.D., Liu, S.J., Sun, S.W., Sgualdino, J., Testa, G., Matzuk, M.M., Iwamori, N., and Lim, D.A. (2014). Activation of Neuronal Gene Expression by the JMJD3 Demethylase Is Required for Postnatal and Adult Brain Neurogenesis. *Cell Reports* 1–10.
- Pastrana, E., Cheng, L.-C., and Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 6387–6392.
- Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S.W.M., Solovei, I., Brugman, W., f, S.G., Flicek, P., Kerkhoven, R.M., van Lohuizen, M., et al. (2010). Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation. *Molecular Cell* 38, 603–613.
- Phillips-Cremins, J.E., Sauria, M.E.G., Sanyal, A., Gerasimova, T.I., Lajoie, B.R., Bell, J.S.K., Ong, C.-T., Hookway, T.A., Guo, C., Sun, Y., et al. (2013). Architectural Protein Subclasses Shape 3D Organization of Genomes during Lineage Commitment. *Cell* 153, 1281–1295.
- Pixley, S.K., and de Vellis, J. (1984). Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Research* 317, 201–209.
- Pombo, A., and Dillon, N. (2015). Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 245–257.

## Bibliografía

Ponti, G., Obernier, K., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Lineage progression from stem cells to new neurons in the adult brain ventricular-subventricular zone. *Cell Cycle* 12, 1649–1650.

Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., and Alvarez-Buylla, A. (2013). Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E1045–E1054.

Quiñones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotín, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.-M., and Alvarez-Buylla, A. (2005). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: A niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.* 494, 415–434.

Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.

Rodríguez, E.M., González, C.B., and Delannoy, L. (1979). Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res.* 201, 377–408.

Röber, R.A., Weber, K., and Osborn, M. (1989). Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* 105, 365–378.

Saksouk, N., Simboeck, E., and Déjardin, J. (2015). Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* 8, 3.

Sanai, N., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2007). Comment on “Human Neuroblasts Migrate to the Olfactory Bulb via a Lateral Ventricular Extension.” *Science* 318, 393b–393b.

Sanai, N., Nguyen, T., Ihrle, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.-H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.-M., et al. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478, 382–386.

Sanchez, J.A., and Wangh, L.J. (1999). New insights into the mechanisms of nuclear segmentation in human neutrophils. *J. Cell. Biochem.* 73, 1–10.

Sauer, F.C. (1935). The cellular structure of the neural tube. *J. Comp. Neurol.* 63, 13–23.

Sawamoto, K., Hirota, Y., Alfaro-Cervelló, C., Soriano-Navarro, M., He, X., Hayakawa-Yano, Y., Yamada, M., Hikishima, K., Tabata, H., Iwanami, A., et al. (2011). Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain. *J. Comp. Neurol.* 519, 690–713.

Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J.A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N.S., Garcia-Verdugo, J.-M., Marin, O., Rubenstein, J.L.R., et al. (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311, 629–632.

Schalch, T., and Steiner, F.A. (2016). Structure of centromere chromatin: from nucleosome to chromosomal architecture. *Chromosoma* 1–13.

Scheffler, B., Walton, N.M., Lin, D.D., Goetz, A.K., Enikolopov, G., Roper, S.N., and Steindler, D.A. (2005). Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 9353–9358.

Schirmer, E.C., and Gerace, L. (2005). The nuclear membrane proteome: extending the envelope. *Trends Biochem. Sci.* 30, 551–558.

Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., and Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 7153–7160.

- Seri, B., García-Verdugo, J.M., Collado-Morente, L., McEwen, B.S., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* *478*, 359–378.
- Sexton, T., and Cavalli, G. (2013). The 3D Genome Shapes Up For Pluripotency. *Stem Cell* *13*, 3–4.
- Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K., and Inoue, Y. (1997). Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *Journal of Neuroscience* *17*, 9212–9219.
- Shin, J., Berg, D.A., Zhu, Y., Shin, J.Y., Song, J., Bonaguidi, M.A., Enikolopov, G., Nauen, D.W., Christian, K.M., Ming, G.-L., et al. (2015). Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Stem Cell* *17*, 360–372.
- Shook, B.A., Manz, D.H., Peters, J.J., Kang, S., and Conover, J.C. (2012). Spatiotemporal Changes to the Subventricular Zone Stem Cell Pool through Aging. *Journal of Neuroscience* *32*, 6947–6956.
- Sirerol-Piquer, M.S., Cebrian-Silla, A., Alfaro-Cervelló, C., Gomez-Pinedo, U., Soriano-Navarro, M., and Verdugo, J.-M.G. (2012). GFP immunogold staining, from light to electron microscopy, in mammalian cells. *Micron* *43*, 589–599.
- Solovei, I., Wang, A.S., Thanisch, K., Schmidt, C.S., Krebs, S., Zwerger, M., Cohen, T.V., Devys, D., Foisner, R., Peichl, L., et al. (2013). LBR and Lamin A/C Sequentially Tether Peripheral Heterochromatin and Inversely Regulate Differentiation. *Cell* *152*, 584–598.
- Spassky, N. (2005). Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *Journal of Neuroscience* *25*, 10–18.
- Stalzer, R.C., Kiely, J.M., Pease, G.L., and Brown A.L. (1965). Effect of 5-fluorouracil on human hemtopoiesis. A morphologic study. *Cancer* *18*, 1071–1078.
- Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H., and Kempermann, G. (2006). Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *54*, 805–814.
- Subramanian, G., Chaudhury, P., Malu, K., Fowler, S., Manmode, R., Gotur, D., Zwerger, M., Ryan, D., Roberti, R., and Gaines, P. (2011). Lamin B Receptor Regulates the Growth and Maturation of Myeloid Progenitors via its Sterol Reductase Domain: Implications for Cholesterol Biosynthesis in Regulating Myelopoiesis. *The Journal of Immunology* *188*, 85–102.
- Takamori, Y., Tamura, Y., Kataoka, Y., Cui, Y., Seo, S., Kanazawa, T., Kurokawa, K., and Yamada, H. (2007). Differential expression of nuclear lamin, the major component of nuclear lamina, during neurogenesis in two germinal regions of adult rat brain. *European Journal of Neuroscience* *25*, 1653–1662.
- Tani, E., Takeuchi, J., Ishijima, Y., Higashi, N., Fujihara, E., Ametani, T., and Ando, K. (1971). Elongated nuclear sheet and intranuclear myelin figure of human medulloblastoma. *Cancer Res.* *31*, 2120–2129.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.-M., and Doetsch, F. (2008). A Specialized Vascular Niche for Adult Neural Stem Cells. *Stem Cell* *3*, 279–288.
- Taverna, E., Götz, M., and Huttner, W.B. (2014). The Cell Biology of Neurogenesis: Toward an Understanding of the Development and Evolution of the Neocortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 465–502.
- Thiele, J., Ballard, A.C., Georgii, A., and Vykoupil, K.F. (1977). Chronic megakaryocytic-granulocytic myelosis—an electron microscopic study including freeze-fracture. II. Granulocytes,

## Bibliografía

- erythrocytes, plasma cells and myeloid stroma. *Virchows Arch a Pathol Anat Histol* 375, 129–146.
- Thiele, J., Wagner, S., Bertsch, H.P., Wienhold, S., Fischer, R., Dienemann, D., Stein, H., and Zankovich, R. (1990). Pro-megakaryoblasts in bone marrow tissue from patients with primary (idiopathic) osteo-myelofibrosis (agnogenic myeloid metaplasia). An immunomorphometric study on trephine biopsies. *Pathol. Res. Pract.* 186, 589–596.
- Tong, C.K., Han, Y.G., Shah, J.K., Obernier, K., Guinto, C.D., and Alvarez-Buylla, A. (2014a). Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.*
- Tong, C.K., and Alvarez-Buylla, A. (2014). SnapShot: Adult Neurogenesis in the V-SVZ. *Neuron* 81, 220–220.e221.
- Tong, C.K., Chen, J., Cebrian-Silla, A., Mirzadeh, Z., Obernier, K., Guinto, C.D., Tecott, L.H., Garcia-Verdugo, J.-M., Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2014b). Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Stem Cell* 14, 500–511.
- Tong, C.K., Fuentealba, L.C., Shah, J.K., Lindquist, R.A., Ihrie, R.A., Guinto, C.D., Rodas-Rodriguez, J.L., and Alvarez-Buylla, A. (2015). A Dorsal SHH-Dependent Domain in the V-SVZ Produces Large Numbers of Oligodendroglial Lineage Cells in the Postnatal Brain. *Stem Cell Reports* 5, 461–470.
- Trejo, J., Piriz, J., Llorens-Martin, M.V., Fernandez, A.M., Bolós, M., LeRoith, D., Nuñez, A., and Torres-Aleman, I. (2007). Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol Psychiatry* 12, 1118–1128.
- Tsai, P.-L., Zhao, C., Turner, E., and Schlieker, C. (2016). The Lamin B receptor is essential for cholesterol synthesis and perturbed by disease-causing mutations. *eLife* 5, 4181.
- Wang, T.W. (2005). Retinoic acid regulates postnatal neurogenesis in the murine subventricular zone-olfactory bulb pathway. *Development* 132, 2721–2732.
- Wittmann, M., Queisser, G., Eder, A., Wiegert, J.S., Bengtson, C.P., Hellwig, A., Wittum, G., and Bading, H. (2009). Synaptic activity induces dramatic changes in the geometry of the cell nucleus: interplay between nuclear structure, histone H3 phosphorylation, and nuclear calcium signaling. *J. Neurosci.* 29, 14687–14700.
- Wu, H., Coskun, V., Tao, J., Xie, W., Ge, W., Yoshikawa, K., Li, E., Zhang, Y., and Sun, Y.E. (2010). Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science* 329, 444–448.
- Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M., and Ide, C. (2005). Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp. Neurol.* 192, 251–264.
- Ye, W., Mairet-Coello, G., Pasoreck, E., and DiCicco-Bloom, E. (2009). Patterns of p57Kip2 expression in embryonic rat brain suggest roles in progenitor cell cycle exit and neuronal differentiation. *Devel Neurobio* 69, 1–21.
- Zacharias, H. (1995). Emil Heitz (1892-1965): chloroplasts, heterochromatin, and polytene chromosomes. (Genetics Society of America).
- Zetterström, R.H., Lindqvist, E., Mata de Urquiza, A., Tomac, A., Eriksson, U., Perlmann, T., and Olson, L. (1999). Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur. J. Neurosci.* 11, 407–416.
- Zhu, P., and Li, G. (2016). Higher-order structure of the 30-nm chromatin fiber revealed by cryo-EM. *IUBMB Life* 68, 873–878.

Zuleger, N., and Schirmer, E.C. (2011). *The Nuclear Lamina as a Chromatin Organizer* (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).

Zullo, J.M., Demarco, I.A., Piqué-Regi, R., Gaffney, D.J., Epstein, C.B., Spooner, C.J., Luperchio, T.R., Bernstein, B.E., Pritchard, J.K., Reddy, K.L., et al. (2012). DNA Sequence-Dependent Compartmentalization and Silencing of Chromatin at the Nuclear Lamina. *Cell* 149, 1474–1487.

Zupanc, G.K.H. (2002). Adult Neurogenesis and Neuronal Regeneration in the Central Nervous System of Teleost Fish. *Brain Behav. Evol.* 58, 250–275.

(2015). Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis. 1–12.