



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**Expresión espacio-temporal de Gas1 durante el desarrollo de la neocorteza y giro dentado  
del hipocampo**

TESIS

Que presenta

M. en C. JESÚS ENRIQUE ESTUDILLO HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de tesis

DR. JOSÉ SEGOVIA VILA

Ciudad de México

Diciembre 2016

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Segovia, a todo mi comité académico y a mi familia.

Agradezco el apoyo económico que recibí durante el trabajo de tesis de doctorado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 127357

## ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Antecedentes .....	3
3.1.El sistema nervioso central se origina del ectodermo .....	3
3.2.Las células neuroepiteliales y la placa neural .....	3
3.3.La glía radial: las CTNs durante el desarrollo embrionario .....	4
3.4.Morfogénesis y desarrollo del sistema nervioso central.....	4
3.5.Desarrollo de la neocorteza: patrones de proliferación y migración...	5
3.6.Desarrollo del giro dentado del hipocampo .....	7
3.7.Moduladores del neurodesarrollo.....	9
3.8.Proteína con ancla GPI .....	9
3.9.Proteínas con ancla GPI en el neurodesarrollo.....	10
3.10.Growth arrest specific 1 (Gas1).....	11
3.11.Gas1 y arresto celular .....	11
3.12.Gas1 y apoptosis .....	12
3.13.Gas1 y angiogénesis.....	12
3.14.Gas1 durante el desarrollo embrionario .....	13
3.15.Mecanismo de acción de Gas1 durante el desarrollo embrionario...	14
3.16.Gas1 durante el desarrollo del sistema nervioso .....	14
4. Planteamiento del problema .....	16
5. Hipótesis .....	16
6. Objetivos .....	16
6.1.Objetivos particulares.....	17

7. Métodos .....	17
7.1. Animales .....	17
7.2. Cultivo celular .....	18
7.3. Ensayo de ELISA .....	18
7.4. Ensayo de western blot .....	18
7.5. Ensayo de marcaje con BrdU .....	19
7.6. Inmunofluorescencias .....	19
8. Resultados .....	21
8.1. Hipocampo .....	27
8.2. Neocorteza .....	37
9. Discusión .....	46
9.1. Relevancia de Gas1 durante el desarrollo del giro dentado .....	51
9.2. Relevancia de Gas1 durante el desarrollo de la neocorteza .....	53
9.3. Gas1 y GFR $\alpha$ 1 durante el desarrollo embrionario .....	54
9.4. Gas1 y las integrinas .....	54
9.5. Gas1 y APP .....	54
9.6. Regulación de la expresión de Gas1 .....	55
9.7. Ventajas técnicas del patrón de expresión de Gas1 .....	56
10. Conclusión .....	57
11. Bibliografía .....	58

## RESUMEN

Gas1 (Growth arrest specific 1) es una proteína pleiotrópica que puede inhibir el ciclo celular cuando se sobreexpresa en tumores pero durante el desarrollo embrionario actúa como un modulador positivo de la proliferación en varios órganos y sistemas. Esta proteína se ha estudiado de manera extensiva durante el desarrollo del cerebelo, sin embargo otras estructuras que expresan altos niveles del ARN mensajero de gas1 durante su desarrollo han permanecido sin estudiarse a nivel de proteína. En este trabajo se investigó el patrón de expresión espacio-temporal de Gas1 durante el desarrollo de la neocorteza y del giro dentado del hipocampo. Se encontró que Gas1 va disminuyendo sus niveles de expresión conforme transcurre el desarrollo del sistema nervioso central y se expresa preferencialmente en células progenitoras mientras que no se observa en neuronas maduras.

Los resultados obtenidos sientan las bases para continuar estudios enfocados a determinar el rol de la proteína Gas1 durante el desarrollo del sistema nervioso central debido a su abundante expresión en las células progenitoras: tanto células troncales neurales como células progenitoras intermedias.

## **ABSTRACT**

Gas1 is a pleiotropic protein that inhibits cell growth when overexpressed in tumors but during development, it acts as a co-receptor for sonic hedgehog to promote the proliferation and survival of various growing organs and systems. This protein has been extensively studied during development in the cerebellum. However, in other structures of the central nervous system, information concerning Gas1 is limited to in situ hybridization studies. We investigate the pattern of Gas1 expression during various developmental stages of the cortex and dentate gyrus of the mouse brain. The levels of Gas1 decrease in the developing brain and the protein is mainly found in progenitor cells but not in neurons during the development of the cortex and dentate gyrus.

### **3 Antecedentes**

#### **3.1 El sistema nervioso central se origina del ectodermo**

En etapas tempranas del desarrollo, después de la formación de la blástula, prosigue el período de gastrulación en el cual se reorganizan las células de esta estructura para formar las tres capas germinales del embrión que son el ectodermo, mesodermo y endodermo (Carlson 2000).

El sistema nervioso central se desarrolla a partir de una población de células del ectodermo; aunque todas las células del ectodermo están predeterminadas a adquirir un fenotipo de linaje neuronal, este fenotipo es reprimido tempranamente en la mayoría de las células de esta capa germinal principalmente por el grupo de ligandos de la familia “Bone Morphogenic Protein” (BMP). Esta represión provoca que adquiera un fenotipo epitelial en vez de neuronal en las células que responden a los BMPs (Carlson 2000; Kandel et al 2013).

Las células del ectodermo que adquieren un linaje neural se encuentran cercanas a una estructura denominada organizador dorsal (labio dorsal del blastóporo en anfibios) el cual posteriormente dará lugar a la notocorda (Stemple 2005). El organizador dorsal induce el fenotipo nervioso mediante la secreción de múltiples antagonistas de los factores BMPs como la nogina y cordina. Los antagonistas inhiben la actividad represora de los BMPs por lo que se favorece el linaje neuronal en las células del ectodermo cercanas al organizador dorsal y logran convertirse en células neuroepiteliales (Carlson 2000; Kandel et al 2013).

#### **3.2 Las células neuroepiteliales y la placa neural**

Al igual que las células epiteliales, las células neuroepiteliales están altamente polarizadas en el eje apico-basal y poseen uniones estrechas; estas células se caracterizan por proliferar de forma simétrica y se organizan en un plano horizontal formando la placa neural la cual es una monocapa de células

neuroepiteliales (Huttner y Brand 1997; Götz y Huttner 2005). Poco tiempo después de la formación de la placa neural, ésta se modifica por el mesodermo subyacente, el cual induce el alargamiento en sentido vertical de los extremos de la placa neural. Esto provoca que la placa neural se invagine y posteriormente que sus extremos se fusionen para formar una estructura tubular conocida como el tubo neural (Gilbert 2000).

### **3.3 La glía radial: las células troncales neurales durante el desarrollo embrionario**

Tras el cierre del tubo neural, las células neuroepiteliales sufren transformaciones fenotípicas, pierden sus uniones estrechas pero mantienen uniones adherentes, también pierden la polaridad apico-basal, y aunque mantienen la expresión de marcadores como Sox2 y nestina, comienzan a expresar otros marcadores como el epítipo RC2, la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP), el transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST) o el factor de transcripción Pax 6 (Aaku-Saraste et al 1996, 1997; Hatakeyama et al 2004; Linker y Stern 2004; Götz y Huttner 2005; Zhang et al 2010; Hutton y Pevny 2011). Por último, su morfología cambia ya que alargan un proceso basal que se extiende hasta la superficie pial transformándose gradualmente en células gliales radiales o en conjunto conocidas como glía radial (Miyata et al 2001; Noctor et al 2004; Götz y Huttner 2005). La glía radial es la población celular que ejerce el rol de células troncales neurales durante etapas embrionarias y postnatales tempranas, las cuales virtualmente darán origen a todos los tipos de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos que componen al sistema nervioso central (Anthony et al 2004; Kriegstein y Alvarez-Buylla 2011).

### **3.4 Morfogénesis y desarrollo del sistema nervioso central**

Después de la formación del tubo neural comienzan a manifestarse cambios drásticos en la morfología de esta estructura, la cual dará lugar al sistema nervioso central. La glía radial no tiene ciclos celulares homogéneos en duración por lo cual

unas regiones del tubo neural proliferan más rápido que otras; este fenómeno tiene como consecuencia que se formen tres vesículas cerebrales: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo (Carlson 2000; Kandel et al 2013).

En etapas más avanzadas las vesículas se vuelven a dividir para dar lugar a un total de cinco vesículas: el proscencéfalo da lugar a dos vesículas que se llaman telencéfalo y diencéfalo, el mesencéfalo no se divide y el romboencéfalo se divide para generar el metencéfalo y el mielencéfalo; a partir de cada una de esas vesículas se generarán las distintas estructuras y núcleos que componen al sistema nervioso (Carlson 2000; Kandel et al 2013). A nivel celular se han logrado grandes avances en el conocimiento de cómo las células se dividen y migran para formar distintas estructuras del sistema nervioso central. La mayoría de los estudios para comprender mejor el desarrollo del sistema nervioso se han enfocado principalmente en el desarrollo de la neocorteza y el hipocampo, sin embargo, los principios mediante los cuales se forman estas estructuras son aplicables a la mayoría del resto de las regiones del cerebro (Kriegstein y Alvarez-Buylla 2011).

### **3.5 Desarrollo de la neocorteza: patrones de proliferación y migración**

Durante el desarrollo de la neocorteza, la glía radial siempre permanece adyacente a los ventrículos laterales generando nuevas neuronas mediante proliferaciones asimétricas; las neuronas se pueden generar de forma directa o indirecta; en el último caso, se genera un progenitor intermediario a partir de la glía radial el cual es capaz de dividirse y generar dos neuronas hijas (Noctor et al 2004, 2007; Fig. 1). Las neuronas migran a regiones por encima de la zona ventricular y subventricular usando como andamio a los procesos de la glía radial para comenzar a generar las seis capas de la neocorteza en un patrón de dentro hacia fuera: primero se formarán las capas más profundas de la neocorteza y hasta el último la mayoría de las capas más externas con excepción de la capa más externa de todas que es de hecho la primera en formarse (Hevner et al 2003; Noctor et al 2004; Evsyukova et al 2013). La migración en sentido vertical de las neuronas usando a la glía radial como andamio se denomina migración radial y es el patrón que adoptan

las neuronas glutamatérgicas que se generan en el telencéfalo dorsal (Noctor et al 2004; Evsyukova et al 2013). Por otra parte, también hay neuronas que migran de forma independiente de la glía radial y lo hacen de una manera perpendicular a la migración radial, esta forma de movimiento se denomina migración tangencial y es el patrón que siguen las neuronas que se generan en la eminencia gangliónica lateral que en su mayoría son interneuronas (Evsyukova et al 2013).

Después del nacimiento, la mayor parte de la glía radial se diferencia a astrocitos (Noctor et al 2008), sin embargo, una subpoblación se queda adherida a los ventrículos laterales y continúa generando nuevas neuronas a lo largo de la vida adulta. La nuevas neuronas formadas en la zona subventricular y ventricular durante la vida adulta migran y se incorporan al bulbo olfatorio (Gage et al 2000, 2002; Alvarez-Buylla y Lim 2004; Ming y Song 2005; Fig. 1).

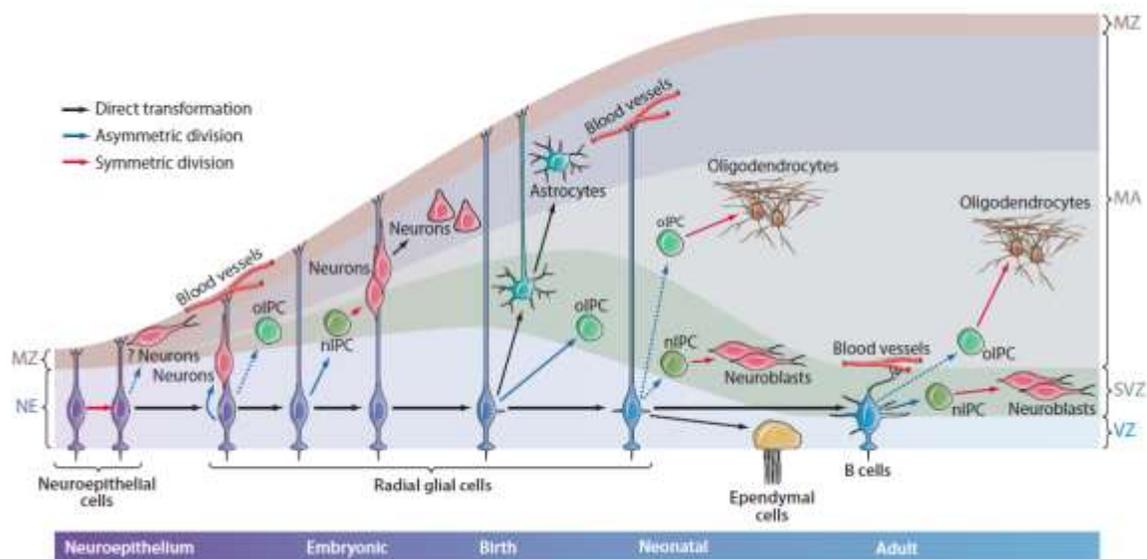


Fig. 1 Proceso de neurogénesis desde etapas tempranas del desarrollo embrionario (neocorteza) hasta el individuo adulto (en la zona ventricular y subventricular de los ventrículos laterales). Las líneas punteadas son propuestas hipotéticas; las líneas sólidas son apoyadas por evidencia. NE neuroepitelio; oiPC células progenitoras intermediarias de oligodendrocitos; niPC células progenitoras intermediarias de neuronas; VZ zona ventricular; SVZ zona subventricular; MA manto; MZ zona marginal. Imagen de Kriegstein y Álvarez-Buylla 2009.

### 3.6 Desarrollo del giro dentado del hipocampo

El giro dentado del hipocampo es una estructura cuya relevancia se ha ido incrementando con el paso del tiempo; es requerido para la formación de nuevas memorias y algunos tipos de comportamientos aprendidos (Eichenbaum et al 2000). Interesantemente es una de las dos únicas estructuras donde continúan generándose nuevas neuronas en el adulto (Gage 2002) y además existe evidencia de que perturbaciones en su función y estructura son causas comunes de la epilepsia y también es una estructura que se afecta profundamente por isquemia global y meningitis (Houser 1990; Liu et al 1998; Nau et al 1999). Todos estos aspectos que se relacionan con el giro dentado del hipocampo han promovido que se estudie más a detalle el desarrollo de esta estructura para comprender mejor su funcionamiento, su rol en condiciones normales y patológicas y las consecuencias de un desarrollo incorrecto (Li y Pleasure 2005; Xu et al 2015).

A diferencia del desarrollo de la neocorteza, el desarrollo del giro dentado del hipocampo se caracteriza por una migración masiva de células desde una región adyacente a los ventrículos laterales conocida como neuroepitelio dentado hacia el sitio donde se va a formar esta estructura. Estas células en migración son principalmente glía radial, progenitores intermediarios y neuroblastos que se dirigen al giro dentado en formación (Altman y Bayer 1990 a,b; Pleasure et al 2000; Li et al 2009; Sugiyama et al 2013) (Fig. 2). Las células en migración forman una estructura transitoria denominada vía de migración dentada (DMS) la cual conecta a las células en migración con el giro dentado (Altman y Bayer 1990 b; Pleasure et al 2000; Li et al 2009). La migración de células proveniente del neuroepitelio dentado finaliza aproximadamente entre los días postnatales 5 y 7 (P5 y P7) tanto en la rata como en el ratón (Altman y Bayer 1990 b; Li et al 2009). A partir del día postnatal 10 (P10) ya se puede apreciar de manera completa la capa granular y continúan observándose figuras mitóticas en la zona subgranular las cuales ya se ha demostrado que son células troncales neurales que continúan generando nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo a lo largo de la vida adulta (Altman y Bayer 1990b; Gage 2002; Lim y Álvarez-Buylla 2004) (Fig. 2).

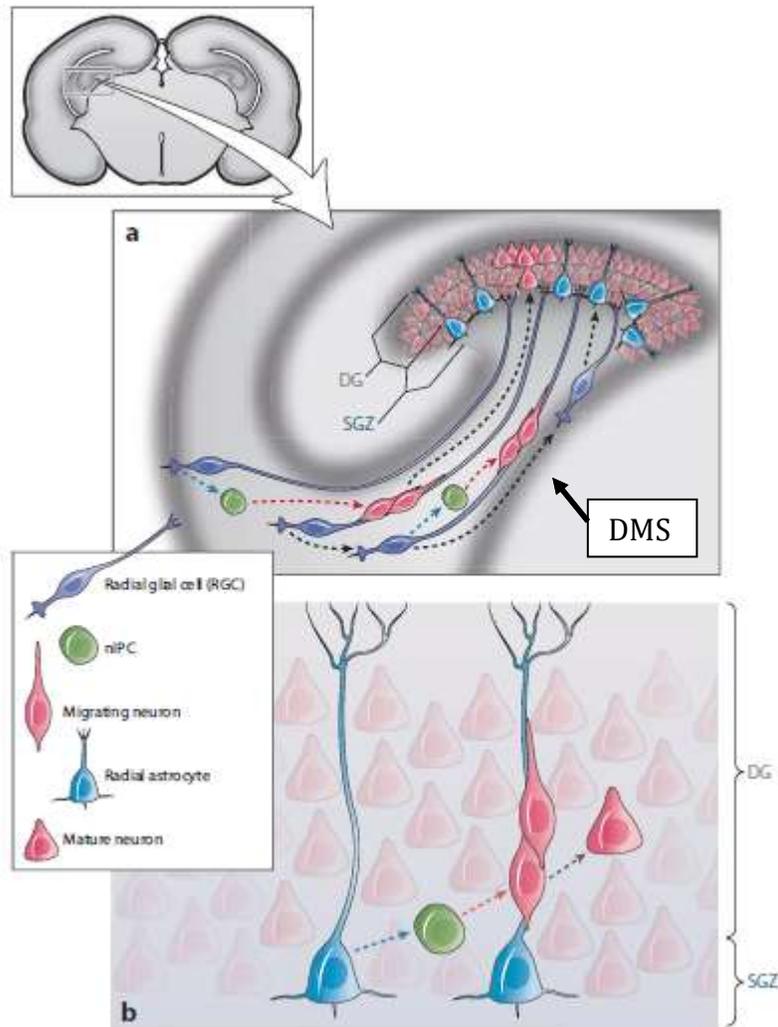


Fig. 2 Morfogénesis del giro dentado del hipocampo. (a) Durante etapas embrionarias y neonatales la glía radial (azul oscuro), neuroblastos (rojo) y progenitores intermedarios (verde) migran desde los ventrículos laterales al giro dentado para formarlo; esta migración genera una estructura transitoria denominada vía de migración dentada (DMS). (b) Durante la vida adulta, los astrocitos radiales que provienen de la glía radial del desarrollo embrionario (azul claro), generan nuevas neuronas (rojo) a través de progenitores intermedarios (verde). Imagen de Kriegstein y Álvarez-Buylla 2009. SGZ zona subgranular; DG giro dentado.

### **3.7 Moduladores del neurodesarrollo**

A grandes rasgos se pueden identificar por lo menos cuatro procesos fundamentales para que se pueda generar correctamente cada una de las estructuras del sistema nervioso central: proliferación, migración, diferenciación y por último muerte celular (Kandel et al 2013). La correcta coordinación de cada uno de estos procesos lleva a que el tubo neural vaya sufriendo diversas transformaciones con grados de complejidad cada vez mayores hasta que finalmente se complete el sistema nervioso central. Sin embargo, existen muchos moduladores del neurodesarrollo a nivel celular y molecular que vuelven más complejo el estudio de este proceso. Estos moduladores van desde aminoácidos y micro RNAs hasta diversos tipos de proteínas (Wang y Kriegstein 2009; Fiore et al 2008; Kandel et al 2013; Evsyukova et al 2013).

A pesar de que existen una gran diversidad de proteínas con alta relevancia en estos procesos como las proteínas Sonic hedgehog (Shh), Wingless (Wnt), o Fibroblast growth factor (Fgf) las cuales actúan como morfógenos o factores de transcripción Sex determining region Y2 (Sox2), Paired box 6 (Pax6) o T box brain protein 2 (Tbr2) existen otros grupos de proteínas que no han sido estudiados de manera tan exhaustiva como los antes mencionados (Ian Simpson y Price 2002; Kandel et al 2013; Hodge et al 2013; Xu et al 2014); uno de esos grupos se trata de las proteínas con ancla de glicosil fosfatidil inositol (GPI)

### **3.8 Proteínas con ancla GPI**

Las proteínas con ancla de glicosil fosfatidil inositol (GPI) son proteínas muy versátiles cuya presencia se extiende a todos los organismos eucariontes; a pesar de no contar con dominios intracelulares puede llevar a cabo diversas funciones como tener actividad enzimática extracelular o modular complejos de señalización

mediante la unión a éstos para estabilizarlos; estas actividades indican que las proteínas con ancla GPI tienen una participación relevante en distintos procesos fisiológicos (Ferguson 1991; Varki et al 1999). Uno de ellos es el desarrollo embrionario y se ha demostrado su importancia debido a que el knock out de varias proteínas con ancla GPI provoca la muerte de embriones en etapas tempranas de su desarrollo o en etapas postnatales tempranas (Fujihara e Ikawa 2015).

### **3.9 Proteínas con ancla GPI en el neurodesarrollo**

Son pocas las proteínas con ancla GPI que se han estudiado durante el desarrollo del sistema nervioso central. Una de las proteínas con ancla GPI que más se han estudiado durante el neurodesarrollo son las efrinas A, las cuales tienen roles importantes en la formación y delimitación de distintas estructuras del cerebro, ya que modulan la migración de axones y de neuronas mediante eventos de quimiorrepulsión; esto provoca que se vayan definiendo los límites de cada núcleo y los patrones de conexión de axones al obligarlos a detenerse en ciertas regiones o a migrar a través de otras rutas alternativas (Wilkinson 2001; Zimmer et al 2008). Otros eventos en los cuales participan las efrinas A son la extensión de neuritas e incluso pueden modular la proliferación en la neurogénesis adulta (Holmberg et al 2005; Cooper et al 2009).

Existen otros tipos de proteínas con ancla GPI que han sido estudiadas durante el desarrollo del sistema nervioso central aunque todavía no de manera exhaustiva. Una de ellas es el receptor a GDNF GFR $\alpha$ 1 del cual se ha descrito su distribución durante el desarrollo del sistema nervioso central pero apenas comienza a saberse de su función en este proceso (Trupp et al 1997; Irala et al 2016). Otra proteína con ancla GPI que ha comenzado a estudiarse mucho desde la perspectiva funcional del desarrollo del sistema nervioso es la proteína Growth Arrest Specific 1 (Gas1) que ha demostrado ser muy versátil ya que puede participar en distintos procesos celulares que van desde proliferación hasta apoptosis y su estudio durante el desarrollo del sistema nervioso central sugiere un rol importante en este proceso.

### 3.10 Growth arrest specific 1 (Gas1)

La proteína Growth arrest specific 1 (Gas1) es una proteína con ancla GPI cuyo gen se descubrió en la línea celular de fibroblastos de origen embrionario NIH3T3, cuando éstas se cultivaron en ausencia de suero por distintos lapsos (Schneider et al 1988; Stebel et al 2000). El gen de *gas1* carece de intrones por lo que se sugiere que proviene de un retrotransposón (Hatinen et al 2007), codifica para una proteína precursora de 345 aminoácidos que se procesa por glicosilación y adición de una molécula de glicosil fosfatidil inositol (GPI), la cual se une a su extremo carboxilo terminal para así anclarse a la cara externa de la membrana celular (Del Sal et al 1994; Stebel et al 2000). Su estructura proteica es similar a la familia de receptores GFR $\alpha$  debido que conserva 10 cisteínas en cada dominio las cuales participan en la formación de puentes disulfuro (Del Sal et al 1994; Schueler-Furman et al 2006). Se considera una proteína pleiotrópica debido a los diferentes efectos que puede tener en las células que la expresan (Domínguez-Monzón et al 2011).

### 3.11 Gas1 y el arresto celular

Después de haber observado la expresión del ARN mensajero de *gas1* en células cultivadas en ausencia de suero, se observó que la expresión ectópica de *gas1* inhibía tanto la proliferación de las células NIH3T3 como el crecimiento de tumores de cáncer de pulmón en modelos de murinos (Evdokiou y Cowled 1998 a, b).

La capacidad de *gas1* para inhibir la proliferación tanto en líneas celulares y tumores ha sido aprovechada para continuar evaluando su potencial en el tratamiento de distintos tipos de tumores. En el 2011, se diseñó una forma soluble de la proteína Gas1 denominada tGas1 la cual tiene la ventaja de poder actuar de forma parácrina (López-Ornelas et al 2011); el uso de tGas1 en el tratamiento de gliomas y tumores de cáncer de mama inhibió su crecimiento cuando se compararon

con los tratamientos controles (López-Ornelas et al 2011; Jiménez et al 2014). Además el tratamiento de las células de cáncer de mama MDA-MB 231 con Gas1 y tGas1 fue capaz de inhibir su crecimiento (Jiménez et al 2014).

Tomando en cuenta estos estudios, se puede concluir que la sobreexpresión de Gas1 y su forma soluble tGas1 inhibe el crecimiento y proliferación de tumores y células cancerosas.

### **3.12 Gas1 y apoptosis**

En otros modelos de estudio se ha observado que Gas1 es capaz de promover apoptosis. Mellstrom y colaboradores en el 2002 observaron que Gas1 comenzaba a expresarse en cultivos organotópicos de hipocampo tras un insulto excitotóxico y que modulaba positivamente la muerte de neuronas hipocampales, además reportaron que tras un insulto isquémico el ARN mensajero de *gas1* comenzaba a aparecer en el hipocampo sugiriendo un posible rol durante la muerte de neuronas en esta estructura (Mellstrom et al 2002).

Por otra parte, se ha observado que la sobreexpresión de Gas1 provoca la apoptosis en gliomas (López-Ornelas 2011) y que uno de los mecanismos por los cuales Gas1 promueve apoptosis es mediante la inhibición de la vía de señalización del factor neurotrófico derivado de la glía o GDNF (Zarco et al 2012).

### **3.13 Gas1 y la angiogénesis**

Poco se sabe acerca de la relación entre Gas1 y la formación de nuevos vasos sanguíneos, sin embargo, varios resultados sugieren su participación en este proceso, tanto en condiciones normales como en patológicas. Interesantemente los tumores tratados con tGas1 presentaban una menor vascularización con respecto a los tumores que llevaban los tratamientos controles (Jiménez et al 2014). Posteriores experimentos *in vitro* han demostrado la capacidad de Gas1 para inhibir la migración de células endoteliales hacia los lugares donde Gas1 se encuentra en

mayor concentración (Jiménez et al 2014). En línea con estos resultados, Mathew y colaboradores en el 2014 encontraron que los tumores de páncreas inducidos en ratones con doble knock out para *gas1* y *boc* tenían mayor tamaño y vascularización que los tumores inducidos en ratones controles (Mathew et al 2014), esta información sugiere que la ausencia de Gas1 podría estar facilitando la migración de células endoteliales al tumor para acelerar su crecimiento. Sin embargo, los autores no dejan en claro si el efecto que observan es por la ausencia de *gas1* o de *boc* por lo que se deben realizar más experimentos para esclarecer cuál de las dos ausencias es la responsable del aumento de la angiogénesis.

### **3.14 Gas1 durante el desarrollo embrionario**

En contraste con la actividad antiproliferativa y apoptótica de Gas1 cuando es sobreexpresado en tumores y líneas celulares, se ha observado que durante el desarrollo embrionario Gas1 actúa como un modulador positivo de la proliferación.

Cuando se compararon los cerebelos de ratones recién nacidos silvestres y knock out (KO) para *gas1* se observó que los últimos tenían un menor tamaño que los primeros, lo cual indica que el gen *gas1* modula positivamente el crecimiento del cerebelo (Lee et al 2001). El mismo patrón que se observó por Lee y colaboradores en el 2001 en el cerebelo, también se observó en el tracto gastrointestinal, riñones y cráneos de ratones KO para *gas1* (Biau et al 2013; Seppala 2007 y 2014; Kann et al 2015).

En congruencia con estos resultados están los hallazgos de la proteína Gas1 presente en las células progenitoras de neuronas cerebelares, de neuronas entéricas y de nefronas (Izzi et al 2011; Biau et al 2013; Kann et al 2015).

Esta información reportada por distintos grupos de investigación indica que la proteína Gas1 se involucra en eventos de proliferación durante el desarrollo embrionario.

### **3.15 Mecanismo de acción de Gas1 durante el desarrollo embrionario**

La forma más conocida mediante la cual Gas1 es capaz de modular la proliferación durante el desarrollo embrionario es actuando como un correceptor del ligando Sonic Hedgehog (Shh) para facilitar su vía de señalización (Lee et al 2001; Martinelli y Fan 2007). La cooperación entre ambas proteínas se ha observado en la porción del tubo neural que va a dar lugar a la médula espinal, en el cerebelo y en cultivos primarios de células progenitoras de neuronas entéricas (Allen et al 2011; Izzi et al 2011; Biau et al 2013).

### **3.16 Gas1 durante el desarrollo del sistema nervioso**

Los primeros estudios del gen *gas1* durante el desarrollo del sistema nervioso central fueron hibridaciones in situ en las cuales se observó el ARN mensajero de *gas1* presente en varias estructuras del cerebro durante su desarrollo que incluyen cerebelo, médula espinal, bulbo olfatorio y particularmente la neocorteza e hipocampo poseen la señal más abundante. Interesantemente y contrario a lo esperado, se observó que los niveles del ARN mensajero de *gas1* tenían sus niveles más altos de expresión en los nichos germinales de las estructuras mencionadas, las cuales están en proliferación durante las etapas estudiadas (Lee et al 2001). Trabajos posteriores reprodujeron la observación de la expresión de *gas1* en los nichos germinales del telencéfalo dorsal que incluyen las regiones que darán origen tanto al hipocampo como a la neocorteza (Seppala et al 2007, 2014). Los altos niveles del mensajero de *gas1* en la neocorteza y el hipocampo sugieren que la proteína también está expresándose y que puede tener un rol trascendente e importante para el correcto desarrollo de estas dos estructuras.

A pesar de los altos niveles reportados de *gas1* durante el desarrollo de la neocorteza y el hipocampo, no se han realizado estudios más detallados acerca del

patrón de expresión de su proteína en esas regiones para después continuar estudios centrados en conocer su función durante el desarrollo de estas dos estructuras.

#### **4 Planteamiento del problema**

Las proteínas con ancla GPI son moduladores muy versátiles de distintos eventos fisiológicos de los cuales el desarrollo embrionario es uno en los que más participación tienen, sin embargo pocas proteínas con ancla GPI se han estudiado de manera detallada durante el desarrollo del sistema nervioso central

Gas1 es una proteína pleiotrópica cuyo ARN mensajero se expresa abundantemente durante el desarrollo de la neocorteza y giro dentado del hipocampo en desarrollo, sin embargo, se desconoce si la proteína está presente durante el desarrollo de estas dos estructuras y tampoco existe información acerca del fenotipo de las células positivas Gas1 en el desarrollo de la neocorteza y giro dentado del hipocampo. Este conocimiento es necesario para continuar estudios enfocados a conocer su rol durante la formación de estas estructuras, el cual se especula que puede resultar crucial por las múltiples funciones que Gas1 es capaz de modular.

#### **5 Hipótesis**

La expresión de Gas1 disminuye durante el desarrollo de la neocorteza y el giro dentado del hipocampo y se expresa en células progenitoras de estas estructuras.

#### **6 Objetivos**

1. Caracterizar el patrón de expresión de Gas1 durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo y neocorteza.
2. Determinar el fenotipo de las células Gas1 positivas en el giro dentado del hipocampo y neocorteza durante su desarrollo.

## **6.1 Objetivos particulares**

Caracterizar el patrón de expresión espacio-temporal de Gas1 durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo y neocorteza por inmunofluorescencia, western blot y ELISA.

Determinar el fenotipo de las células positivas a Gas1 mediante dobles marcajes contra marcadores de progenitores, neuronas y astrocitos.

## **7 Métodos**

### **7.1 Animales**

El protocolo fue aprobado por el consejo interno del CINVESTAV y se siguieron las indicaciones correspondientes de la NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA). Se emplearon ratones de ambos sexos de distintas etapas embrionarias y postnatales las cuales fueron los días de gestación E14.5, E15.5, E16.5 y etapas postnatales de 0 y 7 días de haber nacido (P0 y P7 respectivamente). Para determinar los días exactos de gestación se pusieron machos con hembras por una noche, al siguiente día se consideró como día 0.5 a las hembras que poseían un tapón vaginal de semen. Las hembras preñadas se sacrificaron por dislocación para extraer los embriones. Los embriones fueron sacrificados por decapitación para obtener sus encéfalos los cuales fueron inmediatamente procesados para inmunofluorescencia, ensayos de western blot o ELISA. En el caso de las inmunofluorescencias, los cerebros se colocaron en paraformaldehído al 4% por una noche. Al día siguiente los cerebros se transfirieron a sacarosa al 30% por otra noche para después comenzar a cortar el tejido. Se emplearon ratones adultos de 8 semanas para la extracción de pulmones y corazones. Los ratones adultos se perfundieron con solución salina y posteriormente con PFA al 4%, los órganos perfundidos se colocaron en PFA al 4% una noche y después otra noche en sacarosa al 30% para después comenzar a cortar el tejido.

## **7.2 Cultivo celular**

Las células NIH3T3 se cultivaron en medio DMEM HG con suero. Para los experimentos de privación de suero se privó a un grupo de células de suero por 24 horas; a un segundo grupo de células se le aplicó un pulso de medio DMEM HG compuesto en su 30% por suero que se dejó por 8 horas para reducir los niveles basales de Gas1 en las células (Schneider et al 1988).

Para la obtención de neuroesferas se extrajeron encéfalos de embriones de 14.5 días de gestación. Se disociaron mecánicamente y posteriormente con Acutasa. Después las células se filtraron y se colocaron en medio RenCell complementado con B27, FGF y EGF.

## **7.3 Ensayo de ELISA**

La extracción de proteínas de los encéfalos se realizó con inhibidores de proteasas (Complete, Roche). La medición de los niveles de Gas1 se realizó empleando el kit de ELISA de R&D systems acorde a las instrucciones de los desarrolladores del kit (cat.DY2644 R&D systems). Se tomaron 50 $\mu$ g de proteína de cada muestra para realizar los ensayos. Los datos obtenidos se analizaron y normalizaron para obtener la cantidad de proteína de Gas1 en picogramo por microgramo de proteína.

## **7.4 Ensayo de Western Blot**

La extracción de proteínas de los encéfalos se realizó con inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Para la detección de Gas1 se tomaron 50 $\mu$ g de proteína de cada muestra y se corrieron en un gel de acrilamida al 12%. Las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno para después ser incubadas con el anticuerpo primario de Gas1 (1:500 R&D AF2644) durante la noche en solución bloqueadora (TBS-Tween 0.5% con leche en polvo al 5%). Se empleó un anticuerpo secundario anti cabra para detectar al anticuerpo primario (1:5000).

## 7.5 Ensayo de marcaje con BrdU

Para los ensayos de pulso-caza las hembras preñadas recibieron una sola inyección de 5-bromodeoxiuridina (BrdU; Roche; 50mg/kg diluido en solución salina) de forma intraperitoneal como lo describió Tucker y colaboradores (Tucker et al 2006). El marcaje agudo con BrdU para detectar proliferación se realizó administrando BrdU 100mg/kg de peso corporal en ratones recién nacidos; 4 horas después de la inyección los ratones se sacrificaron para asegurar que la marca del BrdU se restringiera sólo a células en proliferación. Las rebanadas de tejido de ratones que habían recibido BrdU se trataron con HCl 1.2N a 37°C por 45 minutos antes de comenzar el tratamiento para inmunofluorescencias.

## 7.6 Inmnofluorescencia

Se obtuvieron rebanadas de 20 micrómetros de grosor tanto sagitales como coronales de embriones y ratones recién nacidos, Los cortes se permeabilizaron con Tritón X 100 al 0.2% y se bloquearon con BSA al 1% por una hora. Los anticuerpos primarios usados fueron anti Gas1 (R and D systems AF2644 1:50), anti Gas1 biotinilado (R and D systems BAF2644 1:50), anti beta tubulina clase III (Covance MRB-435P 1:200), anti GFAP (Dako Z0334 1:500) anti Sox2 (Santa Cruz Sc-17320 1:500) y anti BrdU (Life technologies 93943). Las secciones se incubaron con los anticuerpos correspondientes toda la noche a temperatura ambiente. Para la detección de los anticuerpos primarios se incubaron los siguientes anticuerpos secundarios o estreptavidina acoplada con un fluoróforo por 2 horas: anti-conejo Alexa Fluor 488 (1:400, Life technologies), anti-cabra Alexa Fluor 488 y 594 (1:400, Life technologies), estreptavidina con Rojo Texas (1:200 Vector SA 5006), estreptavidina con fluoresceína (1:200 Vector SA 5001).

Para el experimento de preadsorción del anticuerpo primario que es contra Gas1, se incubó una noche a 4°C la proteína recombinante de Gas1 con el anticuerpo primario contra Gas1. Como control se incubó el anticuerpo primario contra Gas1 en la solución vehículo en la que venía disuelta la proteína recombinante (BSA 1%).

Al día siguiente se comenzaron las inmunofluorescencias aplicando las soluciones anteriores como anticuerpos primarios.

## 8 Resultados

Para detectar a la proteína Gas1 se empleó el anticuerpo de la casa R&D debido a que es el único anticuerpo probado en ratones knock out para Gas1 (Allen et al 2011). En el presente trabajo se realizaron controles para corroborar la especificidad del anticuerpo primario, para ello se utilizaron con las células NIH3T3, ya que se ha reportado que expresan *gas1* de forma preferencial cuando estas células son cultivadas en ausencia de suero (Schneider et al 1988). Mediante inmunocitoquímica y *western blot* se observó la expresión de la proteína Gas1 preferencialmente en las células NIH3T3 cultivadas sin suero (Fig. 3). En ensayos de *western blot* se observó Gas1 como una única banda de 37 kilodaltones (kDa) que se expresa únicamente en las células cultivadas sin suero (Fig. 3b).

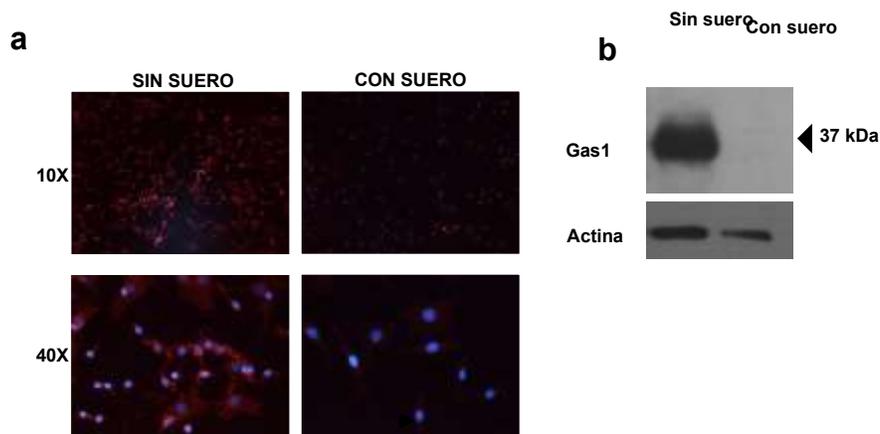


Fig. 3 Expresión de Gas1 en las células NIH3T3. Gas1 se observa preferencialmente en las células cultivadas sin suero tanto por inmunocitoquímica (a) como por western blot (b). En los extractos celulares, Gas1 se observa como una sola banda de 37 kDa que se expresa preferencialmente en las células cultivadas sin suero (b)

Después de haber corroborado la especificidad del anticuerpo en las células NIH3T3 se procedió a realizar pruebas en tejido de ratón. Los resultados mostraron la expresión de Gas1 en la capa germinal externa del cerebelo de ratones recién nacidos (P0) y de 7 días de haber nacido (P7), corroborando y reproduciendo los resultados ya reportados en la literatura (Liu et al 2001; Izzi et al 2011; Figs. 4, 5, 6

y 7). Cuando incubamos el anticuerpo secundario sin haber agregado el primario no se observó señal alguna lo cual descarta la posibilidad de que el anticuerpo secundario hubiese sido inespecífico (Fig. 5).

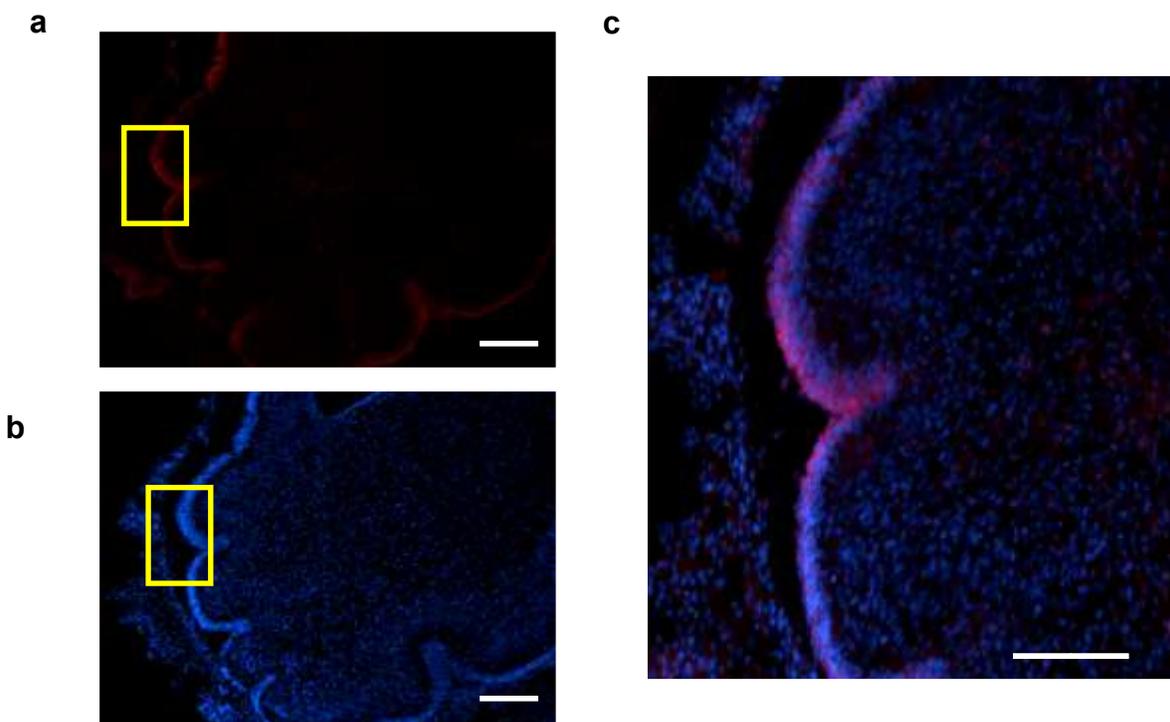


Fig. 4 Expresión de Gas1 en la capa germinal externa de un ratón P0. Corte sagital. Se observa la marca de Gas1 en rojo y núcleos marcados con DAPI en azul. (c) Fusión y amplificación de los dos canales. (a) y (b) barras 100 $\mu$ m; (c) barra 50  $\mu$ m.

También se preadsorbió el anticuerpo primario incubándolo con la proteína recombinante de Gas1, posterior a este paso se realizó una inmunofluorescencia en tejido cerebelar de ratones P0 y P7 con el anticuerpo preadsorbido y también con el anticuerpo no preadsorbido para comparar los resultados y se observó que sólo había señal en donde el anticuerpo contra Gas1 no había sido preadsorbido (Fig. 6 y 7); este resultado demostró que el anticuerpo contra Gas1 es específico para esta proteína.

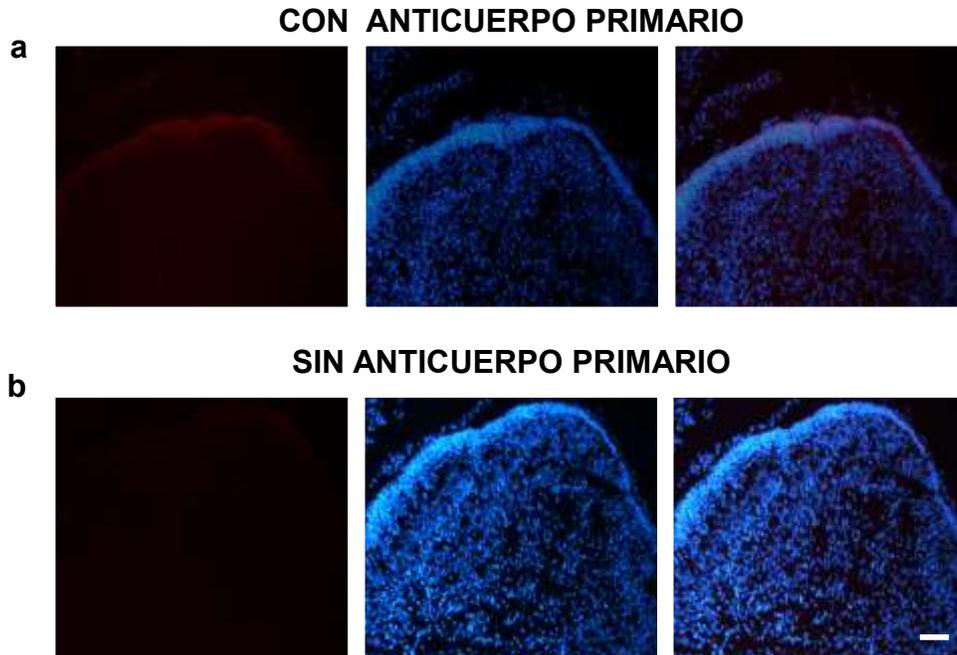


Fig. 5 Control del anticuerpo secundario en cerebelos de ratones recién nacidos. Corte sagital. **(a)** Inmunofluorescencia contra Gas1 empleando anticuerpos primario y secundario, se puede observar la expresión de Gas1 (rojo) en la capa germinal externa del cerebelo como ya se había reportado previamente. **(b)** Inmunofluorescencia sin el anticuerpo primario para Gas1, se puede observar que por sí solo el anticuerpo secundario es incapaz de detectar algún epítipo en el cerebelo. Núcleos teñidos con DAPI (azul). Barra 50  $\mu\text{m}$ .

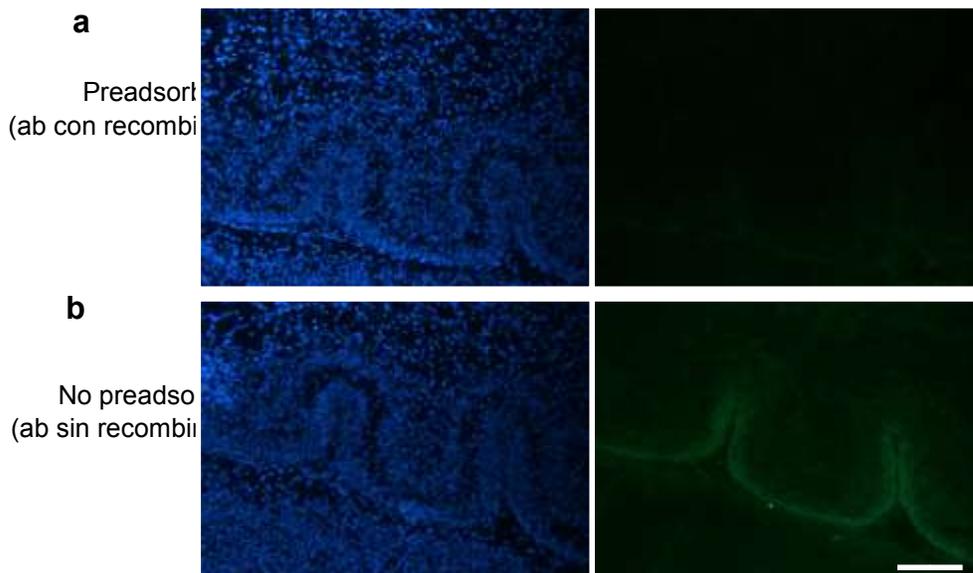


Fig. 6 Preadsortición del anticuerpo primario para Gas1 en cerebelos de ratones P0. Cortes sagitales. **(a)** Cuando se preadsorbe el anticuerpo primario con la proteína recombinante Gas1 no se observa señal de Gas1 (verde) en el cerebelo. **(b)** Cuando se sigue el mismo protocolo pero no se incuba el anticuerpo primario con la proteína recombinante Gas1 se continúa observando la señal de Gas1 (verde) en la capa germinal externa del cerebelo. “ab”, anticuerpo contra Gas1; núcleos teñidos con DAPI (azul). Barra 50  $\mu\text{m}$ .

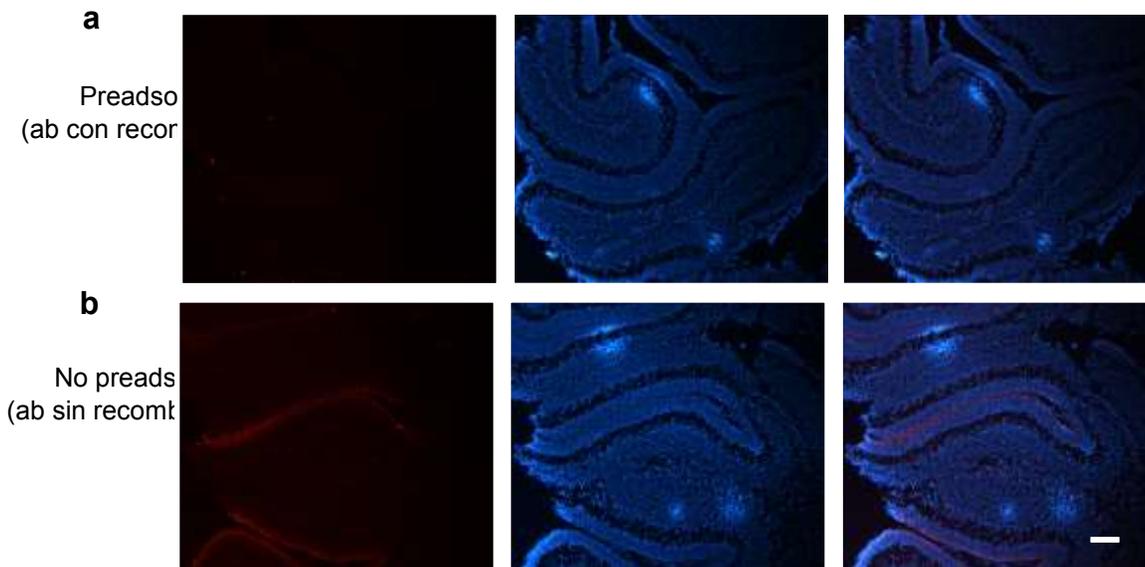


Fig. 7 PreadSORCIÓN del anticuerpo primario para Gas1 en cerebelos de ratones P7. Cortes sagitales. **(a)** Cuando se preadsorbe el anticuerpo primario con la proteína recombinante Gas1 no se observa señal en el cerebelo. **(b)** Cuando se sigue el mismo protocolo pero no se incuba el anticuerpo primario con la proteína recombinante Gas1 se continúa observando la señal de Gas1 (rojo) en la capa germinal externa del cerebelo. “ab” anticuerpo contra Gas1; núcleos teñidos con DAPI (azul) Barra 50  $\mu\text{m}$ .

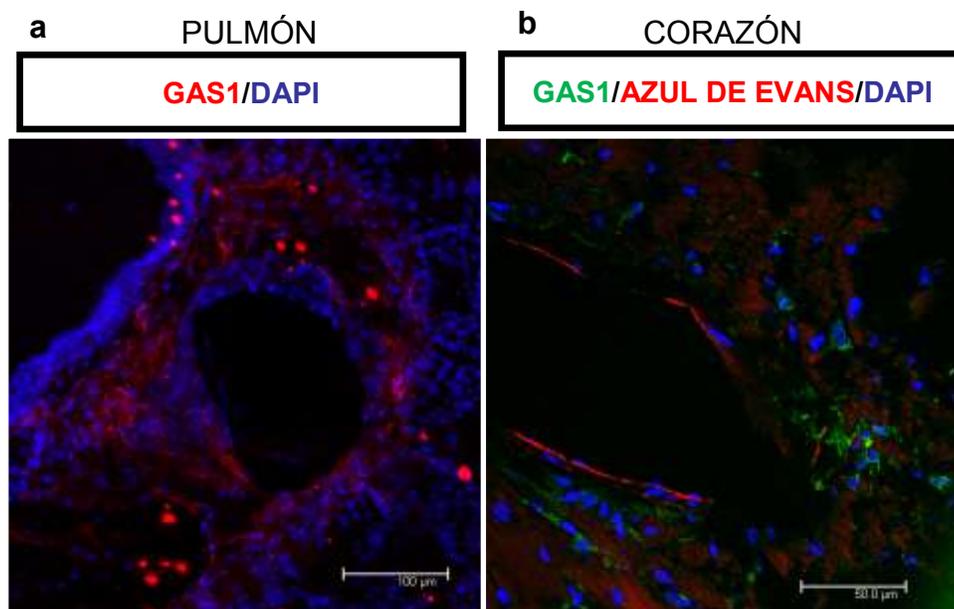


Fig. 8 Inmunofluorescencia para Gas1 en tejidos de pulmón **(a)** y corazón **(b)** de ratón adulto

Debido a que Schneider y colaboradores en 1988 detectaron al ARN mensajero de Gas1 en tejidos de pulmón y corazón (Schneider et al 1988), decidimos corroborar la especificidad del anticuerpo contra Gas1 en estos mismos órganos. La inmunofluorescencia mostró la expresión de la proteína Gas1 tanto en el pulmón y corazón de ratones adultos de manera cercana a los vasos sanguíneos, los cuales se pueden identificar por los núcleos alargados o en forma de huso (Fig 8). Este patrón perivascular ya se había descrito anteriormente en el páncreas (Mathew et al 2014).

Los resultados reportados por otros grupos donde ya ha sido probado el anticuerpo en un ratón KO contra Gas1, en conjunto con los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el anticuerpo primario es una herramienta apta para detectar de manera específica a la proteína Gas1 tanto fuera como dentro del sistema nervioso (Kann et al 2015; Fig. 8). Después de haber validado el anticuerpo, se procedió a realizar los experimentos principales de este proyecto.

Primero se analizaron por *western blot* y ELISA los niveles de la proteína Gas1 durante el desarrollo del sistema nervioso central. Se observó una disminución de Gas1 conforme transcurría el desarrollo del sistema nervioso central (Fig. 9).

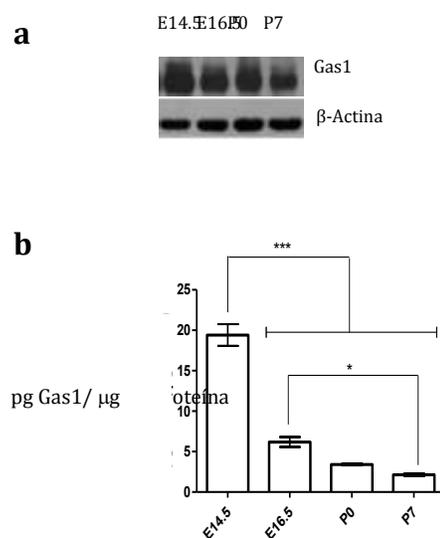


Fig. 9 Expresión de la proteína Gas1 durante el desarrollo del sistema nervioso central. (a) Western blot representativo de encéfalos de embriones y ratones postnatales. (b) ELISA de encéfalos de embriones y ratones postnatales. Para cada etapa n= 5. ANOVA de una vía; análisis estadístico post hoc con la Prueba de Bonferroni \*\*\*P<0.0001; \*P<0.05

Existen reportes que describen por hibridación *in situ* la expresión del ARN mensajero de *gas1* en el giro dentado del hipocampo y neocorteza durante su desarrollo (Lee et al 2001). Para determinar la distribución de la proteína Gas1 durante el desarrollo de la neocorteza y giro dentado del hipocampo se procedió a realizar inmunofluorescencias contra Gas1 en estas estructuras en los días de gestación 14.5 y 16.5 (E14.5 y E16.5) y en ratones P0 y P7 (Fig. 10).

En E14.5 y E16.5 Gas1 se encuentra sólo en el telencéfalo dorsal mientras que en el telencéfalo ventral se encuentra ausente (Fig 10a y b). Interessantemente el telencéfalo dorsal es la estructura que da origen al hipocampo y neocorteza (Yu et al 2014; De Juan Romero y Borrel et al 2015).

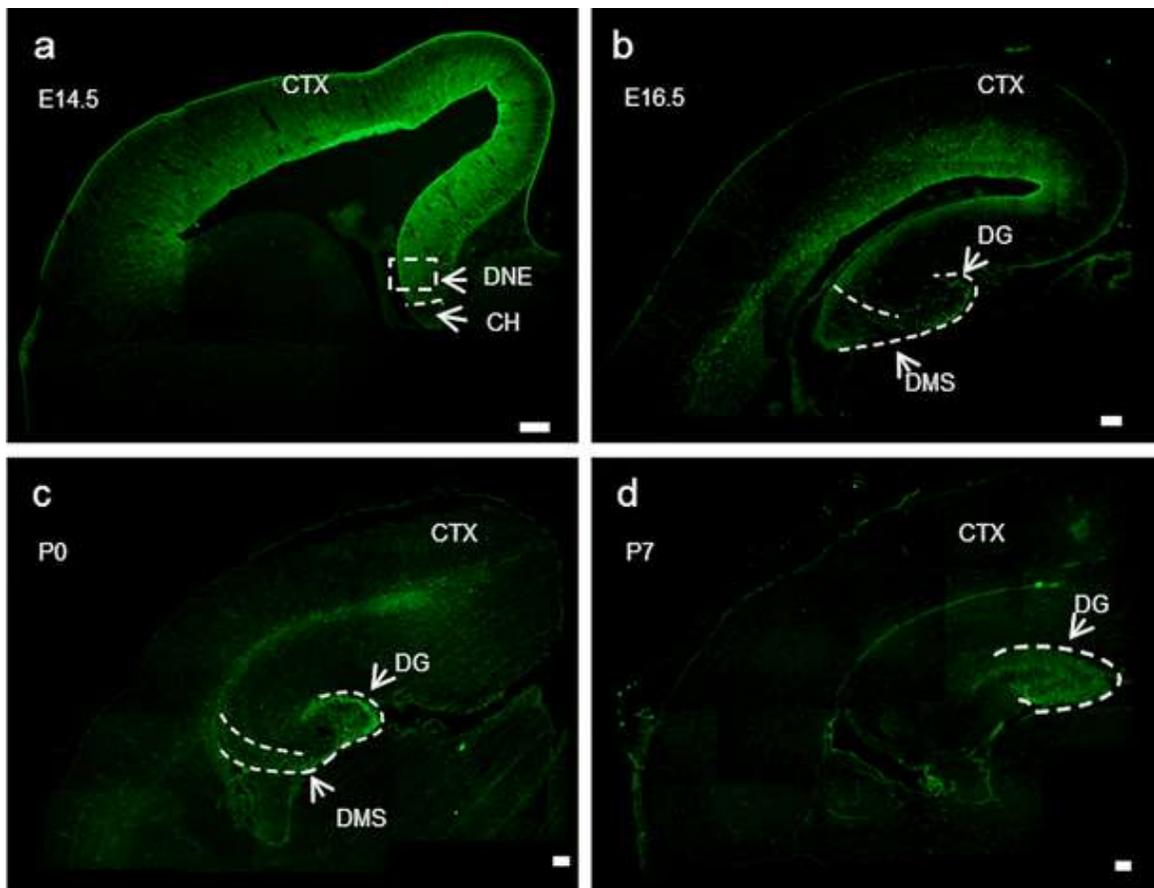


Fig 10. Expresión de Gas1 durante el desarrollo de la neocorteza y giro dentado del hipocampo. Cortes coronales. Imágenes de epifluorescencia de ratones E14.5, E16.5 (a y b), P0 y P7 (c y d), DNE, neuroepitelio dentado, CH casco cortical, DG giro dentado, DMS vía de migración dentada, CTX corteza. Barras 100  $\mu$ m

## 8.1 Hipocampo

Las inmunofluorescencias mostraron la expresión de Gas1 en el neuroepitelio dentado (DNE) (Figs. 10a, 11a), en la vía de migración dentada (DMS) (Figs. 10b, c, 11g-i, m-o) y en el giro dentado (DG) durante todas las etapas analizadas correspondientes a su desarrollo (Figs. 10b-d, 11d-f, j-l, p-r). Interesantemente, cuando desaparece la DMS en P7, también desaparece la expresión de Gas1 en esa zona (Fig. 10d), lo cual sugiere que Gas1 está presente en células en movimiento hacia el giro dentado en formación. Es importante mencionar que la expresión de Gas1 no se observó en el Cuerno de Ammon en ninguna de las etapas analizadas (Fig. 10).

Para determinar el patrón de expresión espacio-temporal de Gas1 durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo, se realizó un ensayo de pulso-caza con BrdU. Se administró BrdU a hembras preñadas en el día de gestación E14.5 y se sacrificaron a distintos tiempos después de la administración de este análogo de timidina: 4 horas (E14.5) y dos días (16.5) después de la administración y en una última condición se dejaron nacer las crías marcadas con BrdU en el día de gestación 14.5 para obtener encéfalos de recién nacidos (P0).

Cuatro horas después de la administración de BrdU se pudo observar la expresión de Gas1 en el DNE y se apreció que la expresión de Gas1 se encontraba en las mismas células que eran positivas a BrdU (Fig. 12a). Este resultado muestra que Gas1 se encuentra presente en células en estado proliferativo ya que el BrdU únicamente se encuentra en células en proliferación a estos tiempos de haber sido administrado.

Dos días después de la administración de BrdU (E16.5) todavía se observan células nacidas en el día E14.5 que continuaban expresando Gas1 y BrdU tanto en la DMS como en el giro dentado del hipocampo en formación (Figs. 12b, c, 13). Sin embargo, también se pudieron apreciar células nacidas en el día E14.5 pero que ya

no expresaban Gas1 dos días después ya que sólo expresaban BrdU (E16.5) (Figs. 12b, c, 13). Estos resultados sugieren que la expresión de Gas1 disminuye conforme las células progenitoras comienzan a diferenciarse.

Finalmente, en un ratón recién nacido se puede apreciar que la mayoría de las células nacidas en el día E14.5 dejaron de expresar Gas1 (Figs. 12d, 14). Este resultado sugiere que Gas1 no se expresa en neuronas maduras. Por otra parte, las células que nacieron en el día E14.5 y que continúan expresando Gas1 en ratones recién nacidos tienen un núcleo de menor tamaño que las células que nacieron en el día E14.5 pero que ya no expresan Gas1 (Fig. 14c-e). Se ha descrito que las células progenitoras del giro dentado del hipocampo tienen un menor tamaño que las neuronas granulares durante el desarrollo de esta estructura (Altman y Bayer 1990a,1990b), lo cual sugiere que estas células que nacieron en el día E14.5 y mantuvieron la expresión de Gas1 pudieran ser células progenitoras que mantuvieron ese fenotipo desde el momento de su nacimiento (Mathews et al 2010; Li et al 2013; Fuentealba et al 2015).

Debido a que Gas1 se observó en células en proliferación se decidió hacer una doble tinción contra Gas1 y Sox2, para determinar si Gas1 estaba presente en células progenitoras ya que Sox2 es un factor de transcripción que se expresa específicamente en células progenitoras durante el desarrollo del sistema nervioso. Se observó que la mayor parte de las células positivas a Gas1 también expresan Sox2 desde E14.5 hasta P0 (Fig. 15) con este resultado se demuestra la expresión de Gas1 en células progenitoras durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo.

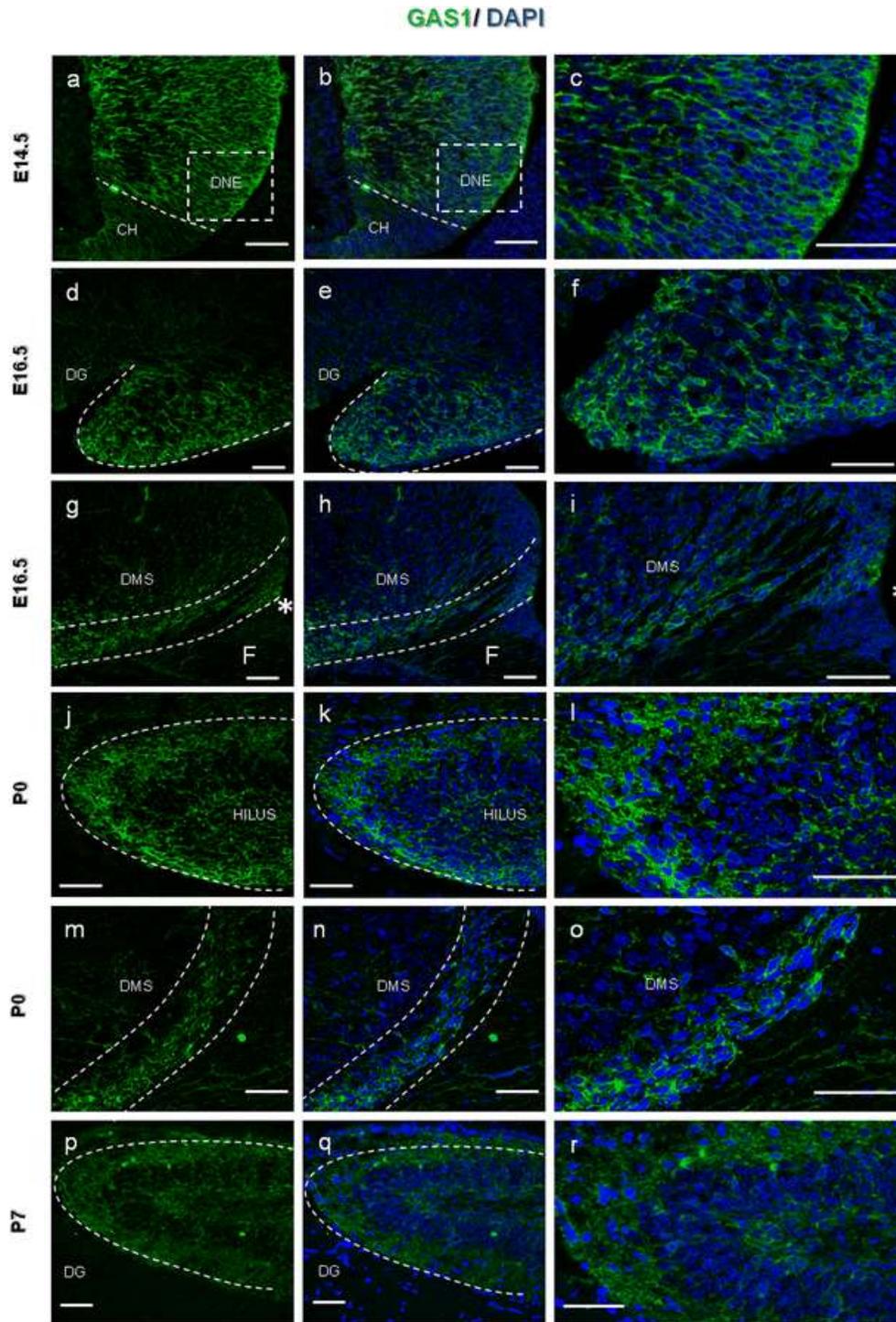


Fig. 11 Expresión de la proteína Gas1 durante el desarrollo del giro dentado. Cortes coronales. Gas1 se expresa en el DNE (**a-c**), en el DG de los ratones E16.5 y P0 (**d-f, j-l**) y en la DMS desde los días E16.5 (**g-i**) hasta P0 (**m-o**). En el día P7 Gas1 continúa presente en el DG. *CH* casco cortical, *DG* giro dentado, *DMS* vía de migración dentada, *DNE* neuroepitelio dentado, *F* fimbria, Asterisco es la muesca dentada. Barras 50  $\mu$ m.

GAS1/BRDU/DAPI

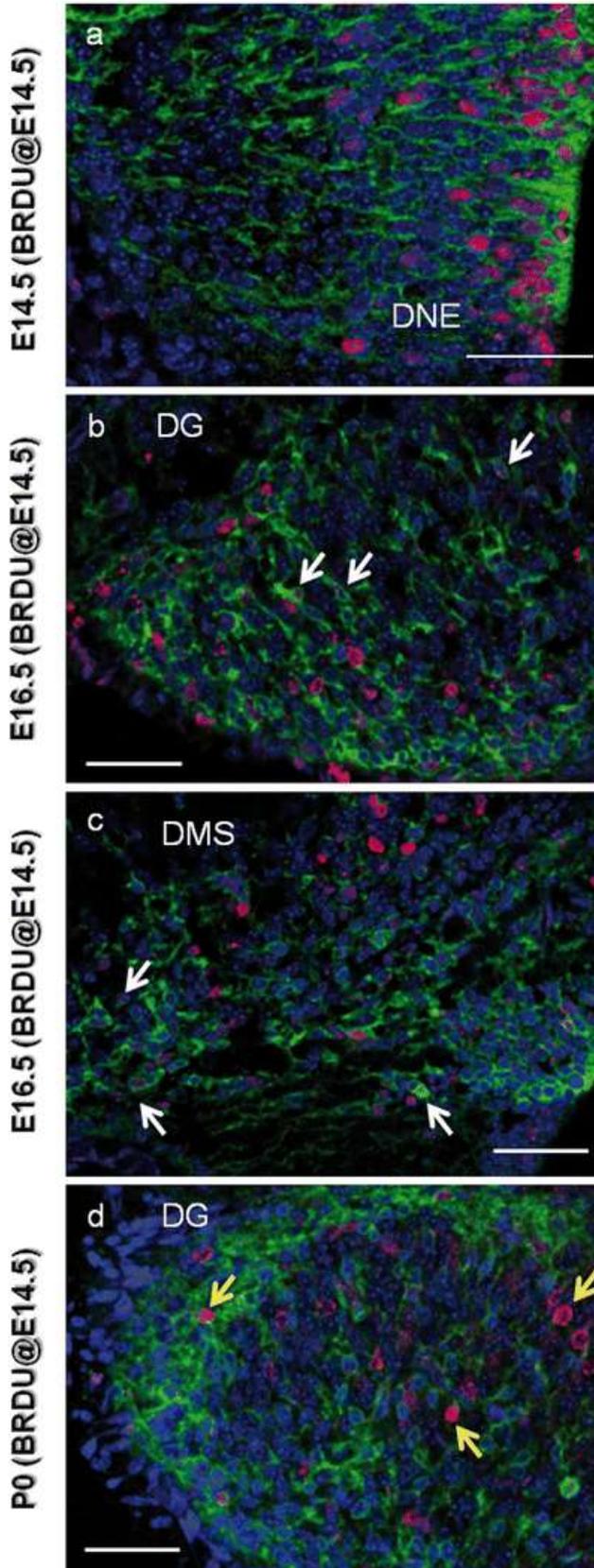


Fig. 12. Ensayo de pulso-caza durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo. Cortes coronales. Gas1 está presente en células recién nacidas en el DNE (a). También se mantiene en células dos días después de la administración de BrdU (E16.5) específicamente en el DG en formación (flechas blancas en (b)) y en la DMS (flechas blancas, (c)). Las células marcadas en el día E14.5 y analizadas en ratones recién nacidos (P0) no expresan Gas1 (flechas amarillas, (d)). DG giro dentado, DMS vía de migración dentada, DNE neuroepitelio dentado. Barras 50  $\mu$ m.

**GAS1/ BRDU/ DAPI**

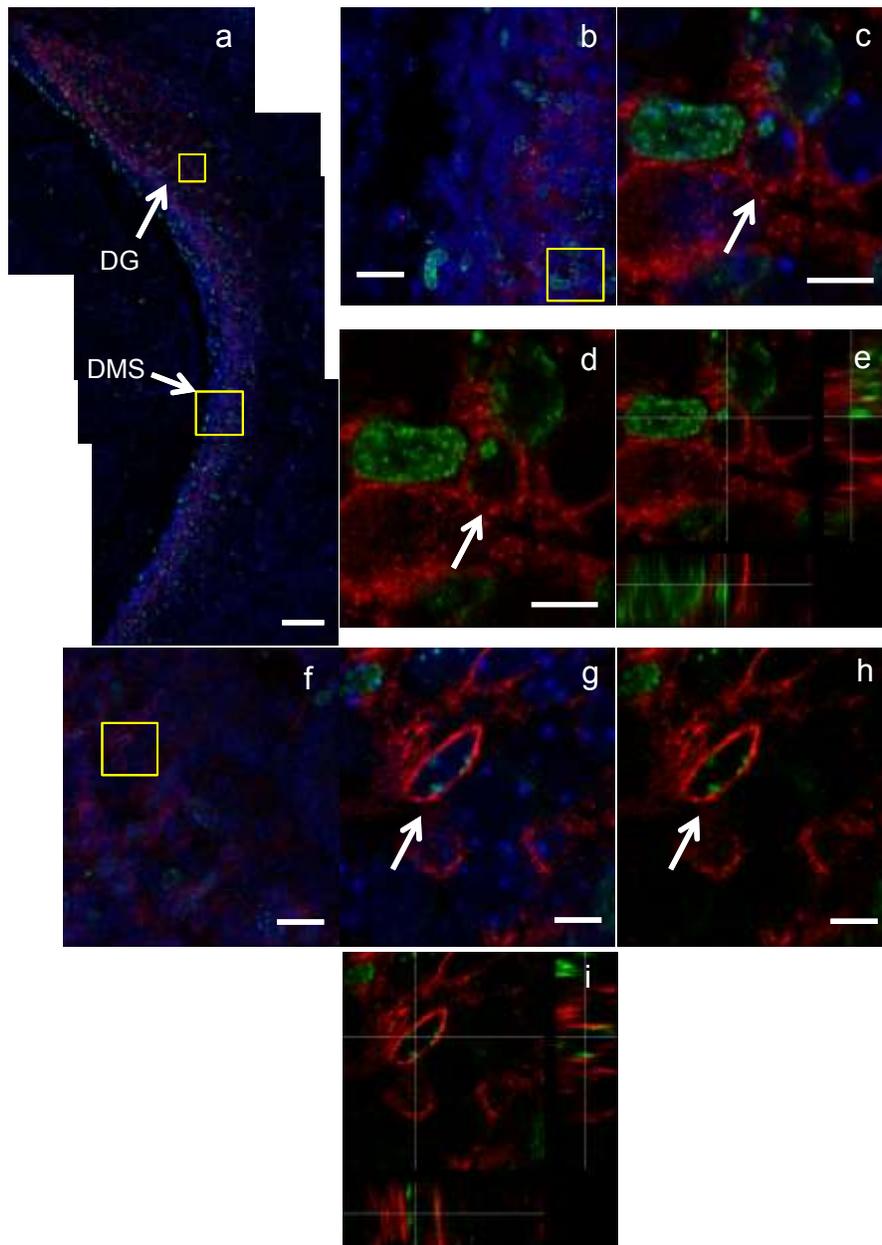


Fig. 13 Ensayo de pulso-caza en durante el desarrollo del giro dentado: dos días después de la administración de BrdU (E16.5). Corte coronal. **(a)** Imagen panorámica del DG de un embrión E16.5 que recibió BrdU en el día E14.5. **(b-e)** Una célula positiva a Gas1 y BrdU en la DMS (flecha) del recuadro amarillo correspondiente a esta estructura ubicada en la figura **(a)**; **(c-e)** son magnificaciones de **(b)**. **(f-i)** Una célula positiva a Gas1 y BrdU en el DG (flecha) del recuadro correspondiente a esta estructura en la figura **(a)**; **(g-i)** son magnificaciones de **(f)**. DMS vía de migración dentada; DG giro dentado. **(a)** Barra 100  $\mu\text{m}$ ; **(b)** barra 20  $\mu\text{m}$ ; **(c)** y **(d)** barras 5  $\mu\text{m}$ ; **(f)** barra 20  $\mu\text{m}$ ; g y h barra 5  $\mu\text{m}$ .

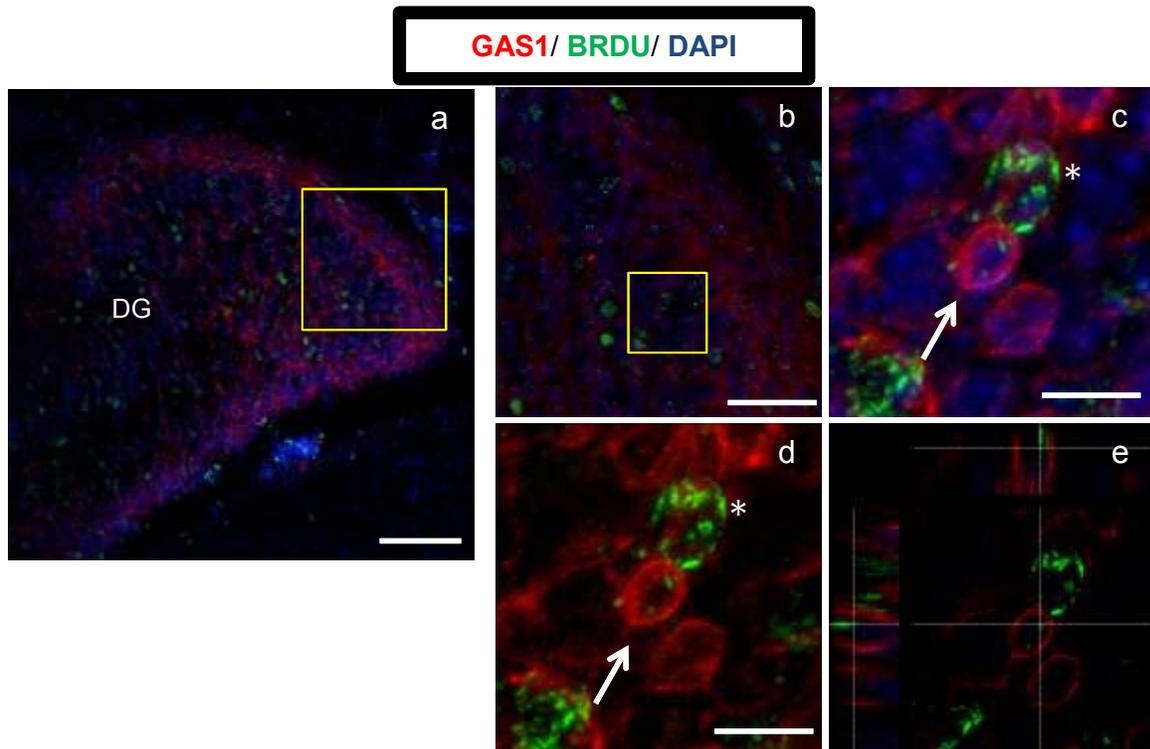


Fig. 14 Ensayo de pulso-caza durante el desarrollo del giro dentado: imágenes de un ratón P0 después de la administración de BrdU en su día de gestación E14.5. **(a)** Imagen panorámica del DG de un ratón recién nacido. **(b-e)** Una célula positiva a Gas1 y BrdU en el giro dentado (flecha) junto con una célula positiva a BrdU que no expresa Gas1 (asterisco). **(c-e)** son magnificaciones del recuadro amarillo en **(b)**. **(a)** Barra 100  $\mu\text{m}$ ; **(b)** barra 50  $\mu\text{m}$ ; **(c-d)** barra 10  $\mu\text{m}$ .

Se llevaron a cabo ensayos adicionales en los cuales a ratones recién nacidos se les administró BrdU y se sacrificaron 4 horas después de su administración para asegurar sólo el marcaje de células en proliferación. Después se realizaron inmunofluorescencias contra Gas1 y BrdU para ver si existían células en proliferación que continuaran expresando Gas1. Se observó que Gas1 todavía estaba presente en células que se encontraban en proliferación, sin embargo se pudo ver que Gas1 también estaba en células quiescentes (Fig. 16).

SOX2/ GAS1

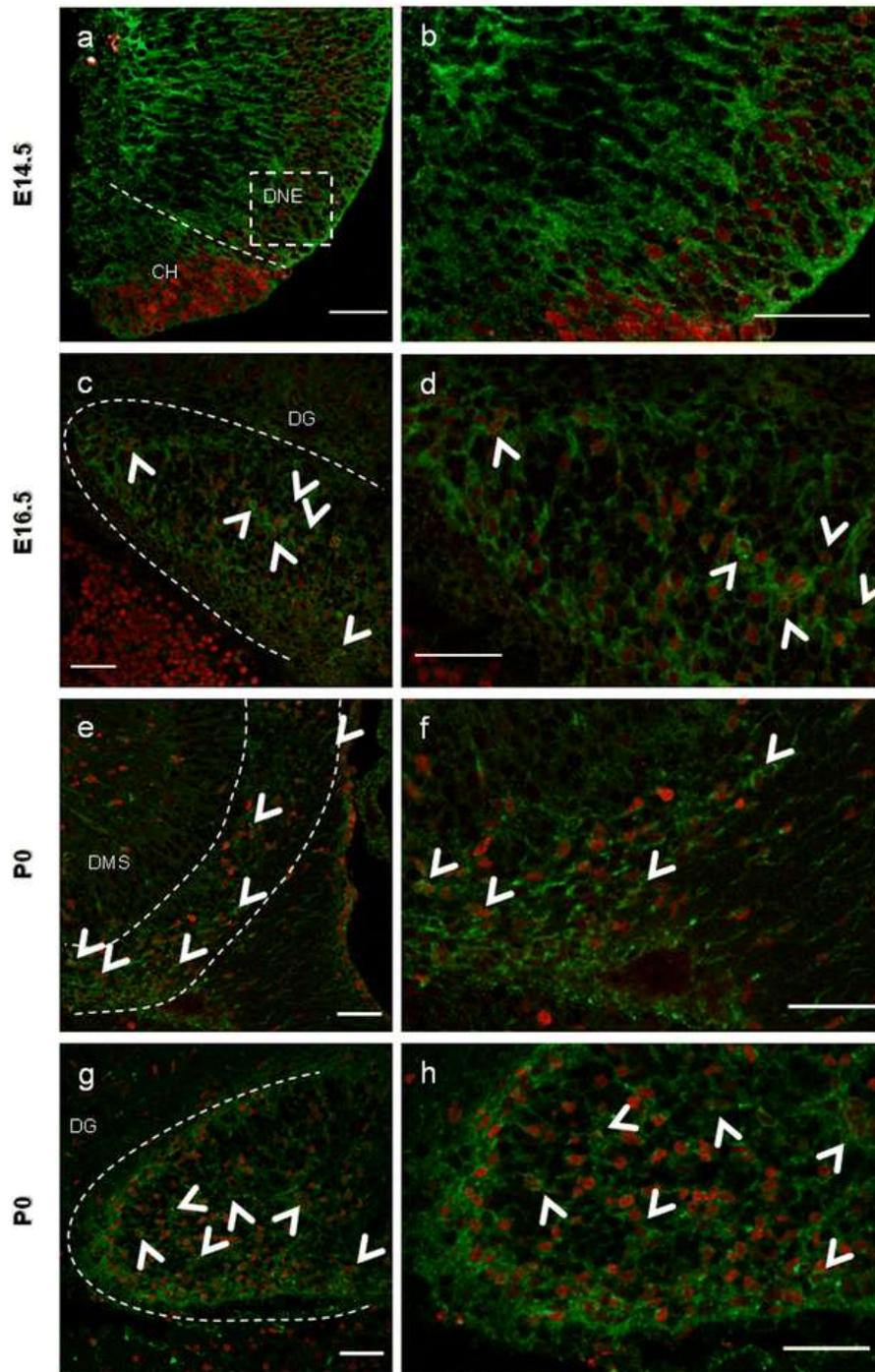


Fig. 15 Gas1 se expresa en células progenitoras del giro dentado del hipocampo. Inmunofluorescencia de Gas1 y Sox2 durante distintas etapas del desarrollo del DG. Las cabezas de flecha indican células que expresan tanto Gas1 como Sox2. *CH* casco cortical, *DG* giro dentado, *DMS* vía de migración dentada, *DNE* neuroepitelio dentado. Barras 50  $\mu$ m.

Para comprobar la presencia de Gas1 en células progenitoras se extrajeron encéfalos de embriones de ratón del día E14.5 y se realizaron cultivos primarios de células progenitoras neuronales en forma de neuroesferas. Se pudo observar por RT-PCR y *western blot* que las neuroesferas de embriones del día E14.5 expresan Gas1 a nivel de ARN mensajero y proteína (Fig. 17). Por inmunofluorescencia se puede observar que Gas1 colocaliza con nestina el cual es un filamento intermedio que se emplea como marcador de células progenitoras (Fig. 18). En conjunto, estos datos muestran la presencia de Gas1 en células progenitoras y este patrón de expresión se extiende incluso a modelos de cultivos celulares.

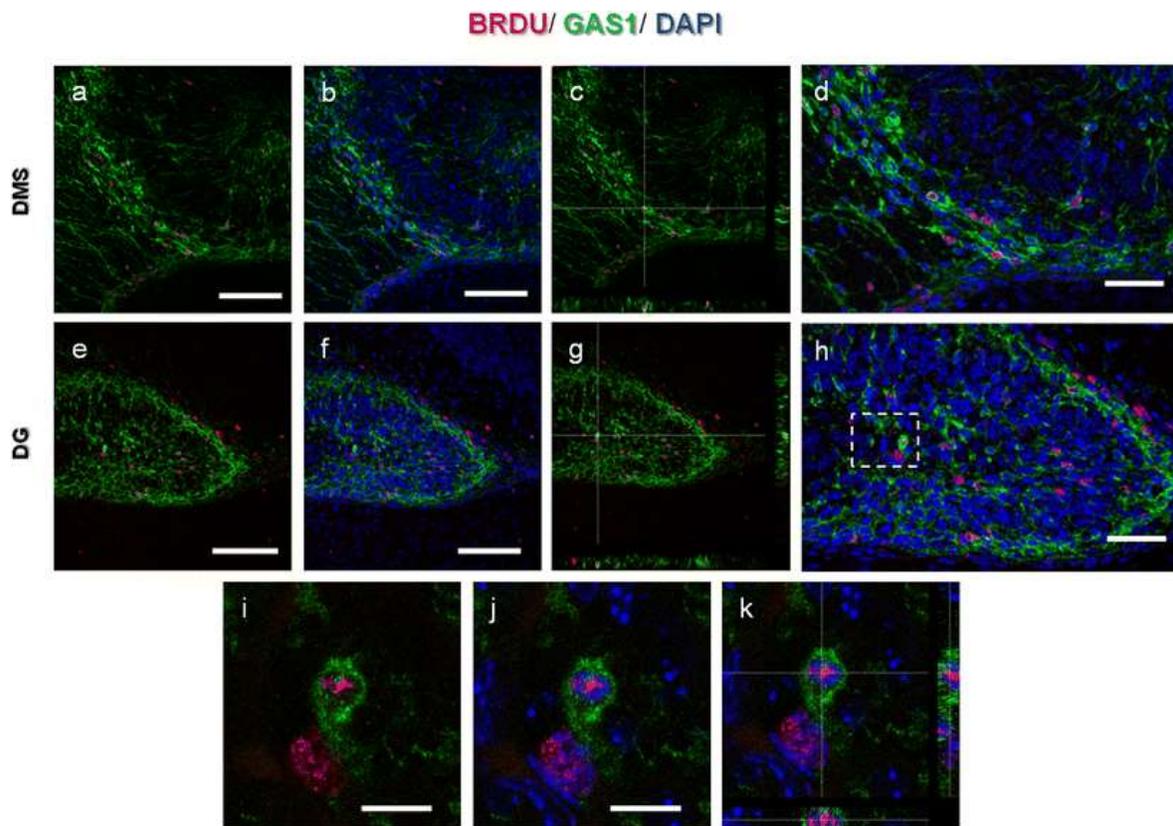


Fig. 16 Gas1 se expresa en células en proliferación en un ratón recién nacido (P0). **(a-d)** Células en proliferación positivas a Gas1 y BrdU en la DMS. **(e-h)** Células en proliferación positivas a Gas1 y BrdU en el DG. **(h)** Se puede observar en el hilus una célula en proliferación resaltada en el recuadro de líneas discontinuas. **(i-k)** La célula del recuadro en h a mayor amplificación. DG giro dentado, DMS vía de migración dentada. **(a-h)** Barra 100  $\mu\text{m}$ ; **(i-k)** barra 10  $\mu\text{m}$ .

Para determinar si Gas1 era expresado en neuronas se realizó una doble tinción contra Gas1 y Beta tubulina clase III, el cual es un filamento intermedio específico de neuronas. No se encontró colocalización entre ambos marcadores ni en etapas embrionarias ni en ratones recién nacidos (Figs. 19, 20).

En conjunto estos resultados muestran que durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo Gas1 se expresa en células progenitoras pero no en neuronas durante las etapas estudiadas.

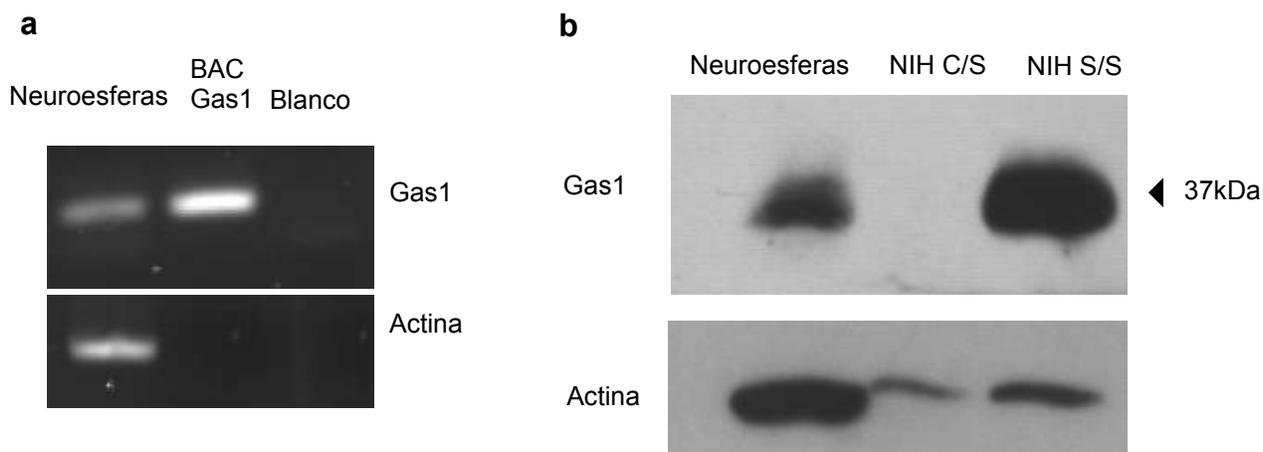


Fig. 17 Gas1 se expresa en neuroesferas de embriones en el día de gestación E14.5. **(a)** Western blot de neuroesferas. **(b)** RT-PCR de neuroesferas.

**GAS1 NESTINA DAPI**

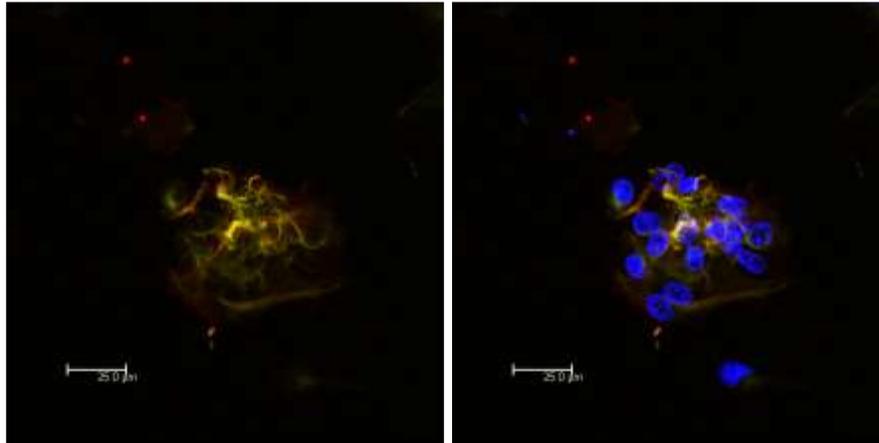


Fig. 18 Gas1 se expresa en células progenitoras de neuroesferas de embriones en el día de gestación E14.5. Inmunofluorescencia contra Gas1 y nestina

**$\beta$ -TUBULIN CLASS III/ GAS1**

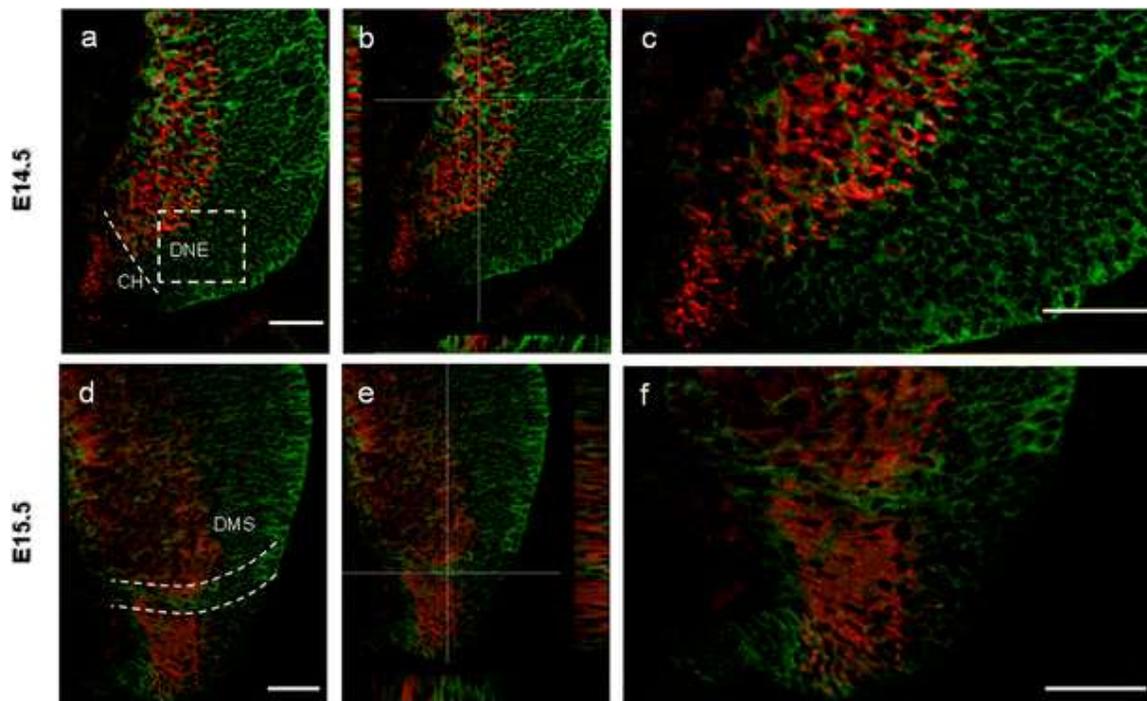


Fig. 19 Gas1 no se expresa en neuronas en el DNE, ni en la DMS de embriones E14.5 y E15.5. **(a-c)** Doble inmunofluorescencia para Gas1 y Beta tubulina clase III en embriones E14.5. **(d-f)** Doble inmunofluorescencia para Gas1 y Beta tubulina clase III en embriones E15.5. *CH* casco cortical, *DG* giro dentado, *DMS* vía de migración dentada. **(a-h)** Barra 50  $\mu$ m.

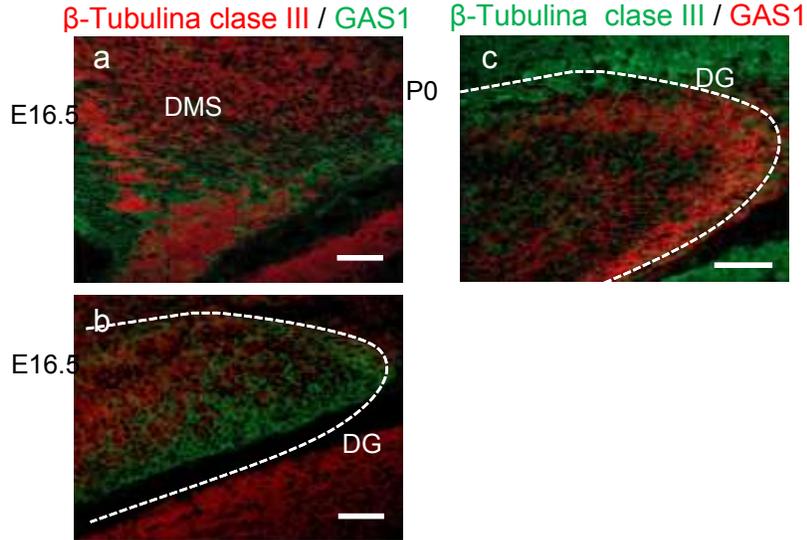


Fig. 20 Gas1 no se expresa en neuronas en la DMS ni en el DG en embriones E16.5 y recién nacido (P0). **(a-b)** Doble inmunofluorescencia para Gas1 y Beta tubulina clase III en embriones E16.5. **(c)** Doble inmunofluorescencia para Gas1 y Beta tubulina clase III en P0. DG giro dentado, DMS vía de migración dentada. **(a-c)** Barra 50  $\mu\text{m}$ .

## 8.2 Neocorteza

Durante el desarrollo de la neocorteza se observa la expresión de Gas1 en la zona ventricular y zona subventricular (Figs. 10, 21). Interesantemente, estas zonas son los nichos germinales de la neocorteza y alberga a células progenitoras que darán origen a las seis capas de esta estructura.

Para determinar el patrón de expresión espacio-temporal de Gas1 durante el desarrollo de la neocorteza se realizó un ensayo de pulso-caza de la misma manera que en el giro dentado del hipocampo (Fig. 12). Acorde a lo reportado en la literatura, sólo se observaron células en proliferación en los nichos germinales ya descritos anteriormente los cuales son la zona ventricular y subventricular (VZ-SVZ) (Fig. 22a). Se observó que la marca de BrdU se restringe a estas regiones a cuatro horas después de haber sido administrado (Fig. 22a). Interesantemente, se observó

que Gas1 se expresaba en las mismas células que expresaban BrdU indicando su presencia en células progenitoras en proliferación (Fig. 22a).

En el día de gestación E16.5 se pudo observar que las células que se marcaron con BrdU en el momento de su nacimiento en el día E14.5 comenzaron a desplazarse fuera de los nichos germinales de la neocorteza (Fig. 22b). Se observa que conforme estas células migran y se alejan de la VZ-SVZ, disminuyen la expresión de Gas1 lo cual sugiere que Gas1 es regulado a la baja conforme inicia el proceso de diferenciación a neuronas.

De acuerdo con la idea de que la expresión de Gas1 disminuye conforme las células progenitoras van alcanzado un fenotipo más diferenciado, se observó que las células marcadas con BrdU en el día E14.5 ya no expresaban Gas1 en ratones P0 (Fig. 22c); se puede apreciar que estas células nacidas en el día E14.5 han alcanzado su posición final en la placa cortical (CP) lo cual sugiere que Gas1 no se expresa en neuronas maduras (Fig. 22c).

En conjunto, estos resultados indican que Gas1 está presente en células progenitoras en división y que su expresión va disminuyendo conforme las células van diferenciándose a neuronas maduras.

Debido a que se observó la presencia de Gas1 en células en división se decidió realizar una inmunofluorescencia contra Gas1 y Sox2 para determinar si Gas1 estaba presente en células progenitoras (Fig 23). Se observó una que ambos marcadores se encontraban en las mismas células en todas las etapas analizadas del desarrollo de la neocorteza (Fig. 23). Este resultado sustenta los resultados anteriores indicando la presencia de Gas1 en células progenitoras.

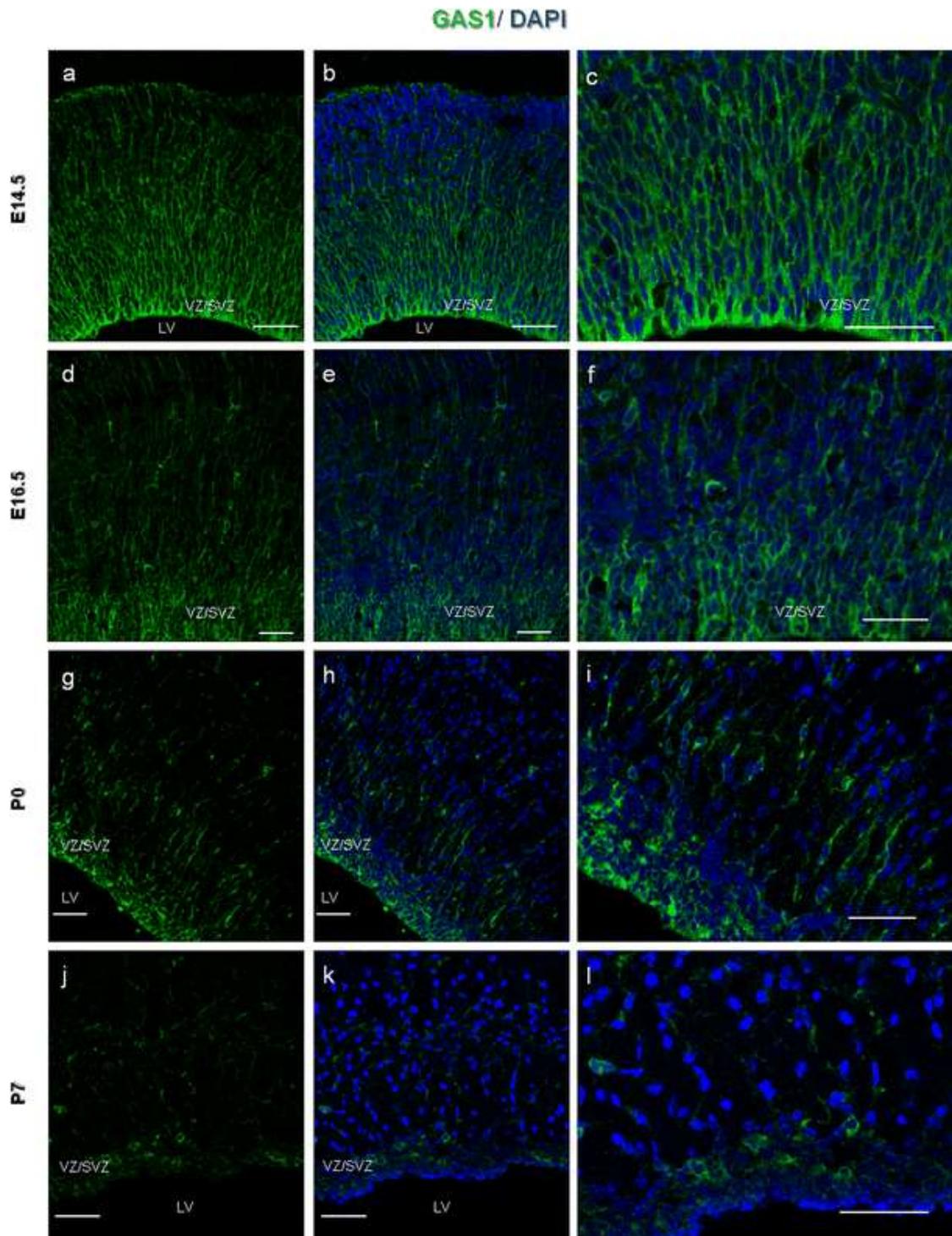


Fig. 21 Expresión de la proteína Gas1 durante el desarrollo de la neocorteza. Cortes coronales. (a-l) Gas1 se expresa en el la VZ/SVZ a lo largo del desarrollo de la neocorteza. Se puede apreciar que conforme transcurre el desarrollo de la neocorteza, la expresión de Gas1 va disminuyendo. VZ/SVZ zona ventricular y subventricular, LV ventrículo lateral. Barras 50  $\mu$ m

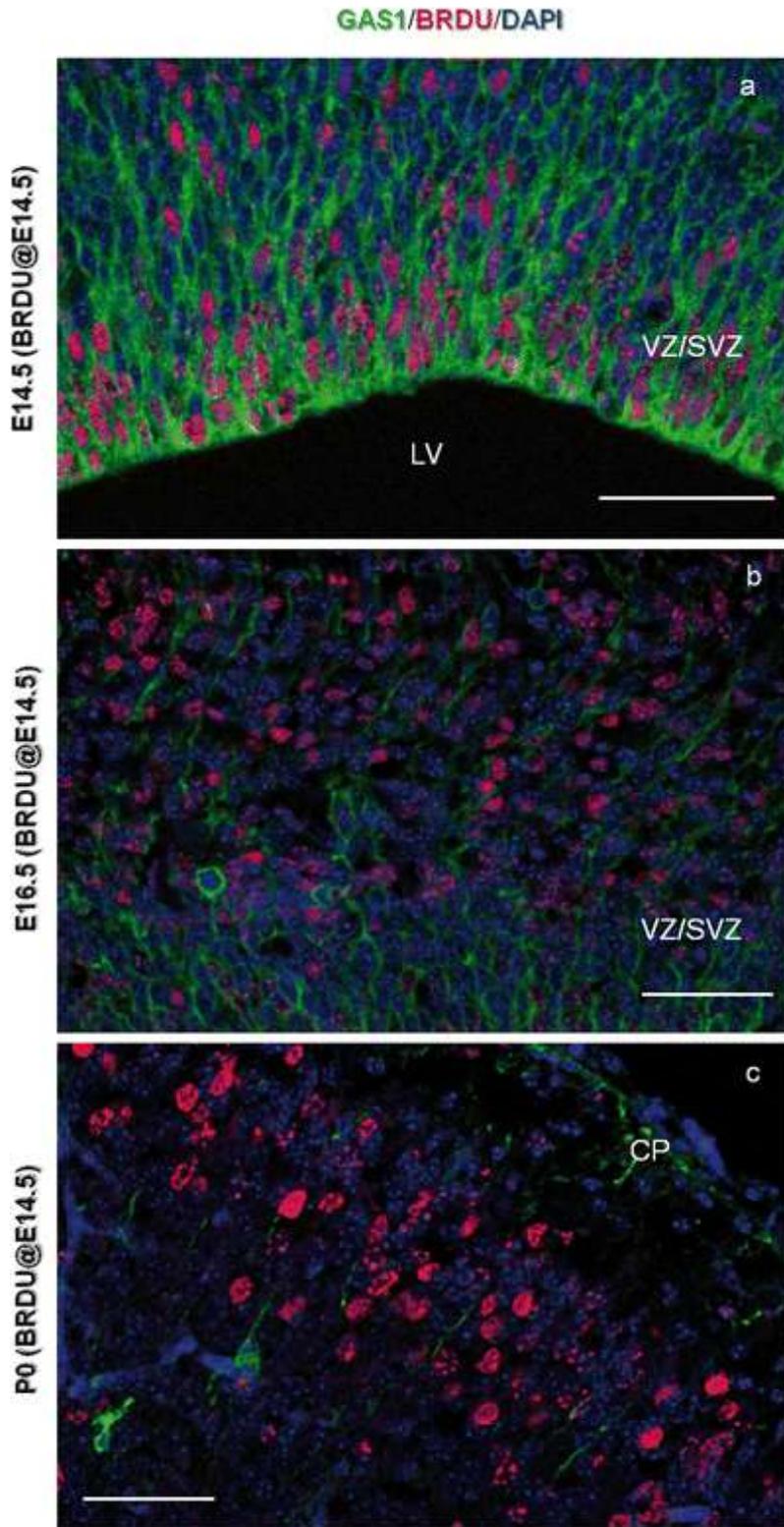


Fig. 22. Ensayo de pulso-caza durante el desarrollo de la neocorteza. Cortes coronales. **(a)** Gas1 está presente en células recién nacidas en la ZV/SVZ. **(b)** Dos días después de su nacimiento (E16.5) las células migran fuera de la VZ/SVZ y se disminuye la expresión de Gas1. **(c)** En ratones recién nacidos, las células nacidas en el día E14.5 ya no expresan Gas1, indicando que la expresión de Gas1 se pierde en neuronas maduras. VZ/SVZ zona ventricular y subventricular, LV ventrículo lateral, CP placa cortical. Barras 50  $\mu$ m.

## SOX2/GAS1

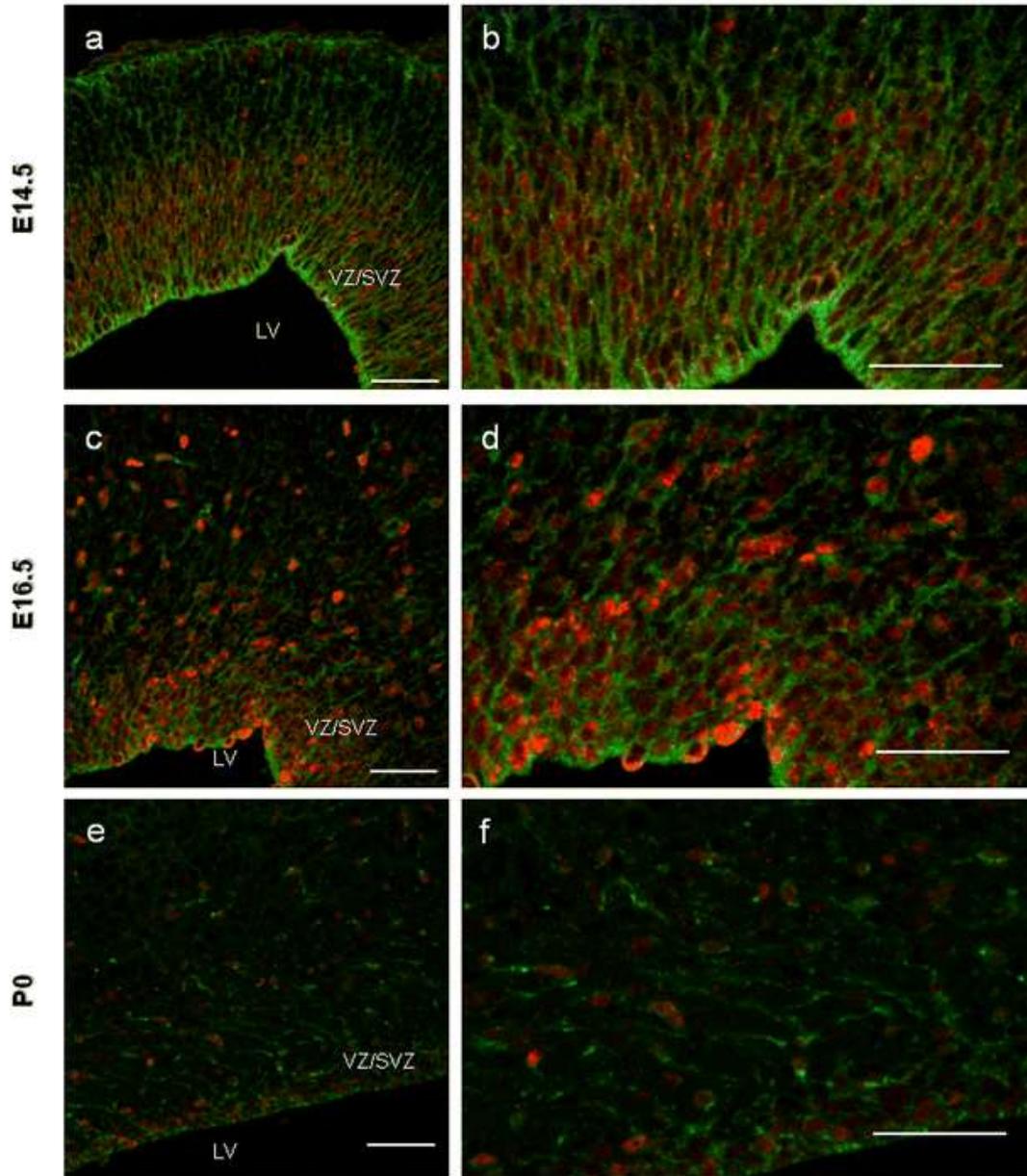


Fig. 23 Gas1 se expresa en los progenitores de la neocorteza. Cortes coronales. Inmunofluorescencia de Gas1 y Sox2 durante distintas etapas del desarrollo de la neocorteza donde se puede observar una amplia colocalización entre ambos marcadores en los nichos germinales de esta estructura que son la VZ/SVZ. VZ/SVZ zona ventricular y subventricular, LV ventrículo lateral. Barras 50  $\mu$ m.

Adicionalmente, se determinó la existencia de células en proliferación en ratones recién nacidos que expresaran Gas1. Se observó que existen dos

poblaciones positivas a Gas1: células en proliferación y células quiescentes (Fig. 24).

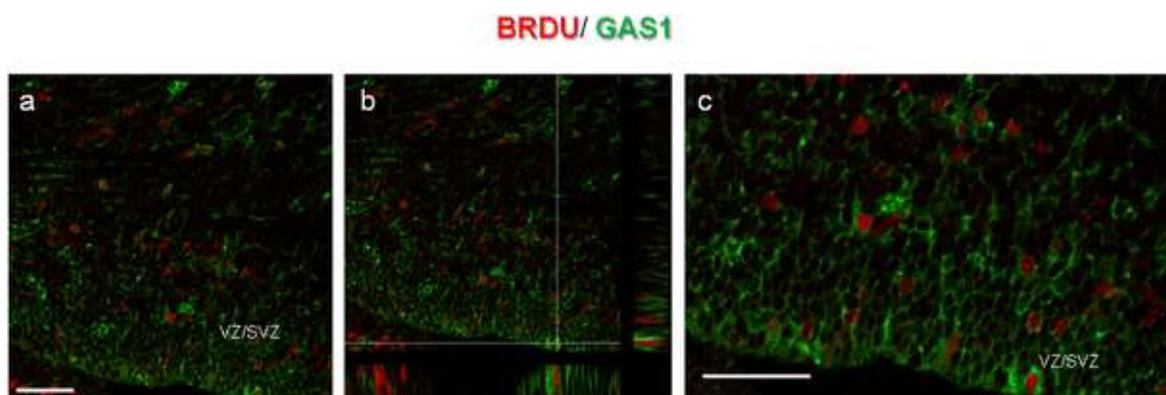


Fig. 24 Gas1 se expresa en células en proliferación en la neocorteza de ratones P0. Cortes coronales. (a-c) Se observa que en la VZ/SVZ hay células en proliferación positivas a Gas1 debido a que expresan BrdU y células quiescentes que expresan Gas1 porque no expresan BrdU. VZ/SVZ zona ventricular y subventricular. Barras 50  $\mu$ m.

Para determinar si Gas1 se expresa en neuronas maduras se realizaron inmunofluorescencias contra Gas1 y Beta tubulina clase III. Se observa que Gas1 no colocaliza con las neuronas positivas a Beta tubulina clase III en las múltiples etapas del desarrollo de la neocorteza que se analizaron (Figs. 25, 26, 27, 28); además se puede apreciar un patrón excluyente de ambos marcadores: la señal más intensa de Gas1 se encuentra cercana a los ventrículos laterales, por el contrario la señal más fuerte de Beta tubulina clase III se observa en la región más alejada de los ventrículos laterales (Figs. 25, 26, 27, 28). Si bien en algunos campos las fibras positivas a Gas1 se encuentran cercanas a los axones marcados con beta tubulina clase III, se puede distinguir que las señales provienen de fibras independientes, esto se puede apreciar cuando se observan las imágenes a mayores magnificaciones (Figs. 26, 27).

En conjunto estos resultados indican que Gas1 está presente en células progenitoras que incluso están dividiéndose, sin embargo su expresión disminuye conforme las células progenitoras se diferencian a neuronas durante el desarrollo de la neocorteza.

$\beta$ -Tubulin III/ GAS1

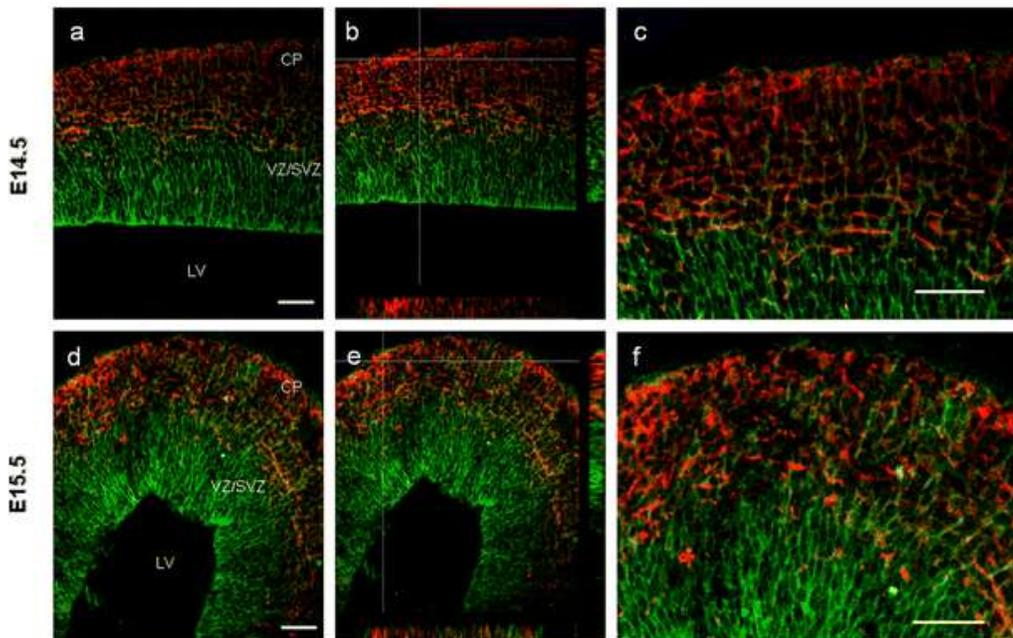


Fig. 25 Gas1 no colocaliza con neuronas. Inmunofluorescencia de Gas1 y beta tubulina clase III en neocortezas de embriones de los días E14.5 y E15.5. CP placa cortical, VZ/SVZ zona ventricular y subventricular, LV ventrículo lateral. Barras 50  $\mu$ m.

$\beta$ -Tubulina Clase III/ GAS1/ DAPI

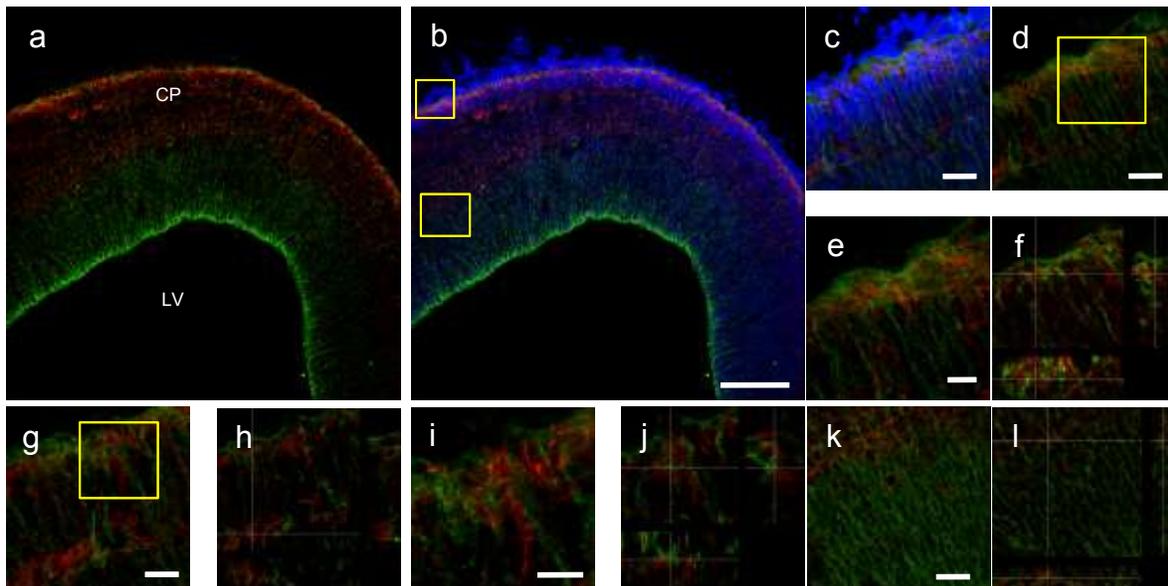


Fig. 26 Gas1 no colocaliza con neuronas. Inmunofluorescencia de Gas1 y beta tubulina clase III en la neocorteza de un embrión E14.5. (c-d) Magnificaciones del recuadro superior en (b). (e) Magnificación de (d). (f) Sección ortogonal de (e). (h) Sección ortogonal de (g). (i) Magnificación de (g). (j) Sección ortogonal de (i). (k) Magnificación del recuadro inferior en (b). (l) corte ortogonal de (k). LV ventrículo lateral, CP placa cortical. (a, b) barras 100  $\mu$ m; (c,d) y (k) barras 20  $\mu$ m; (e, g, i) barras 10  $\mu$ m.

**$\beta$ -Tubulina Clase III / GAS1 / DAPI**

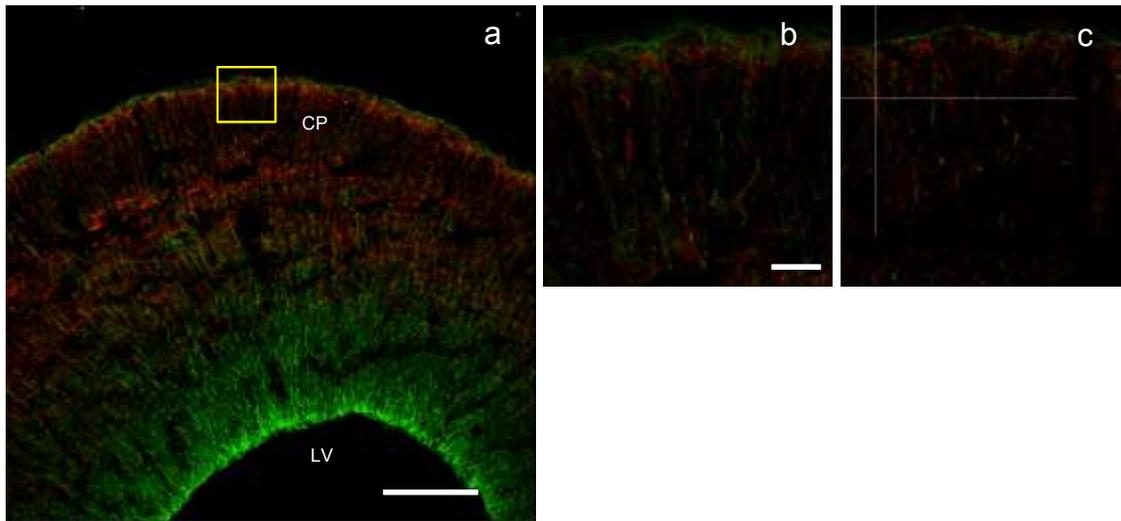


Fig. 27 Gas1 no colocaliza con neuronas. Inmunofluorescencia de Gas1 y beta tubulina clase III en la neocorteza de un embrión del día E15.5. **(b-c)** Magnificaciones del recuadro en **(a)**. LV ventrículo lateral, CP placa cortical. **(a)** barra 100  $\mu$ m; **(b)** barra 20  $\mu$ m.

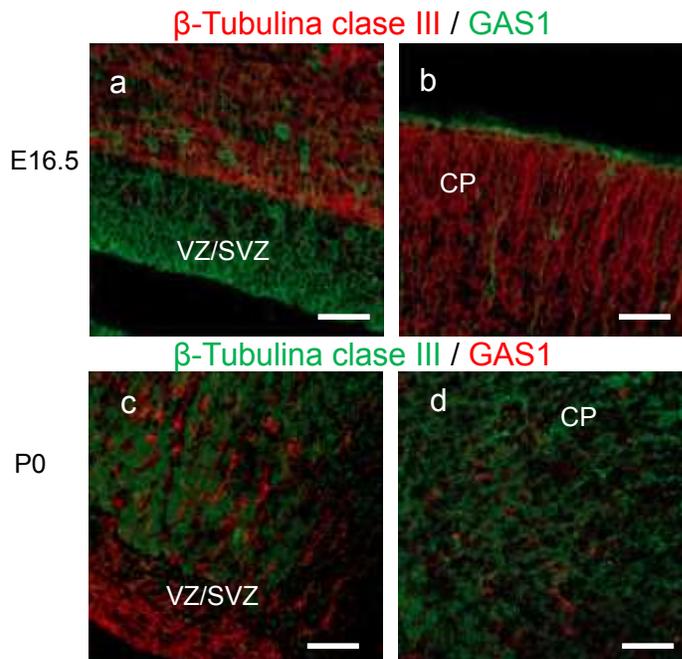


Fig. 28 Gas1 no colocaliza con neuronas. **(a-b)** Inmunofluorescencia de Gas1 y beta tubulina clase III en la neocorteza de un embrión E16.5. **(c-d)** Inmunofluorescencia de Gas1 y beta tubulina clase III en la neocorteza de ratones P0. LV ventrículo lateral; VZ/SVZ zona ventricular y subventricular; CP placa cortical. Barras 50  $\mu$ m.

Los astrocitos comienzan a aparecer en grandes números a partir del nacimiento para terminar de poblar el sistema nervioso central (Kriegstein y Álvarez-Buylla et al 2011). Por tanto, se analizó la presencia de astrocitos positivos a Gas1 en la neocorteza, la vía de migración dentada y el giro dentado del hipocampo de ratones recién nacidos (P0) mediante inmunofluorescencias contra Gas1 y GFAP, el cual es un marcador de astrocitos. Cuando se analizaron las tres estructuras sólo se observó colocalización entre Gas1 y GFAP sólo en una subpoblación de células del giro dentado del hipocampo (Figs 29 y 30).

En conjunto estos resultados demuestran que Gas1 se expresa preferencialmente en células progenitoras del giro dentado y la neocorteza durante su desarrollo y que muchas de estas células están en proliferación. Por otra parte las ni las neuronas ni la mayor parte de la población de astrocitos expresan Gas1; sólo una pequeña fracción de astrocitos expresan Gas1 en el giro dentado de un ratón recién nacido.

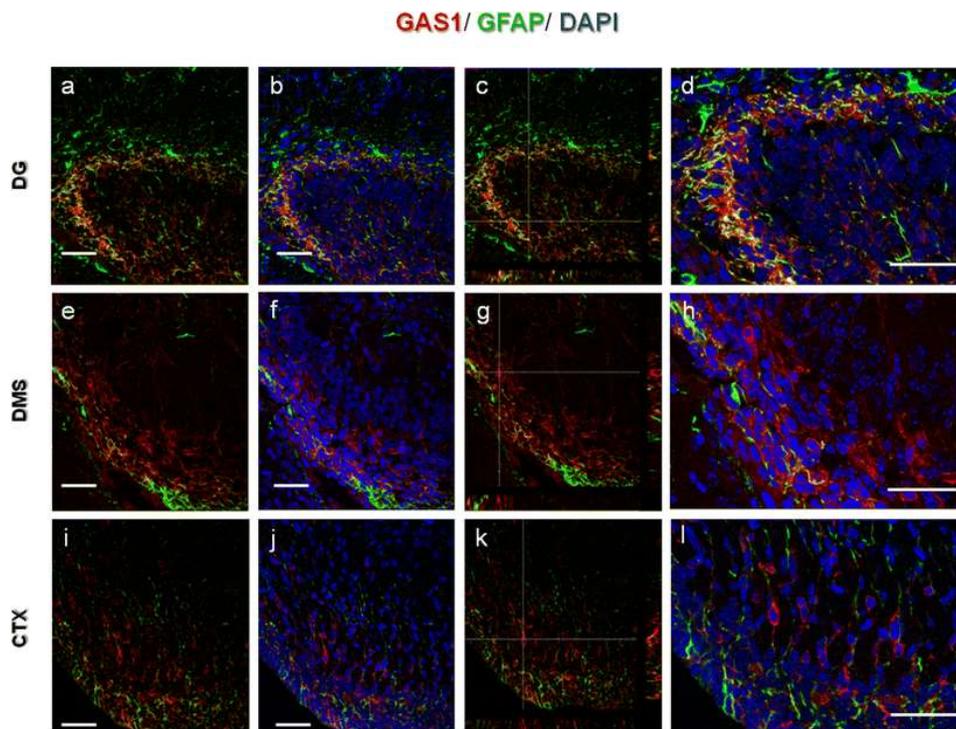


Fig. 29 Inmunofluorescencia de Gas1 y Gfap en ratones recién nacidos. Se puede observar que Gas1 sólo colocaliza con GFAP en el giro dentado del hipocampo. *DG* giro dentado, *DMS*, vía de migración dentada, *CTX* corteza. Barras 50  $\mu$ m.

GAS1/ GFAP/ DAPI

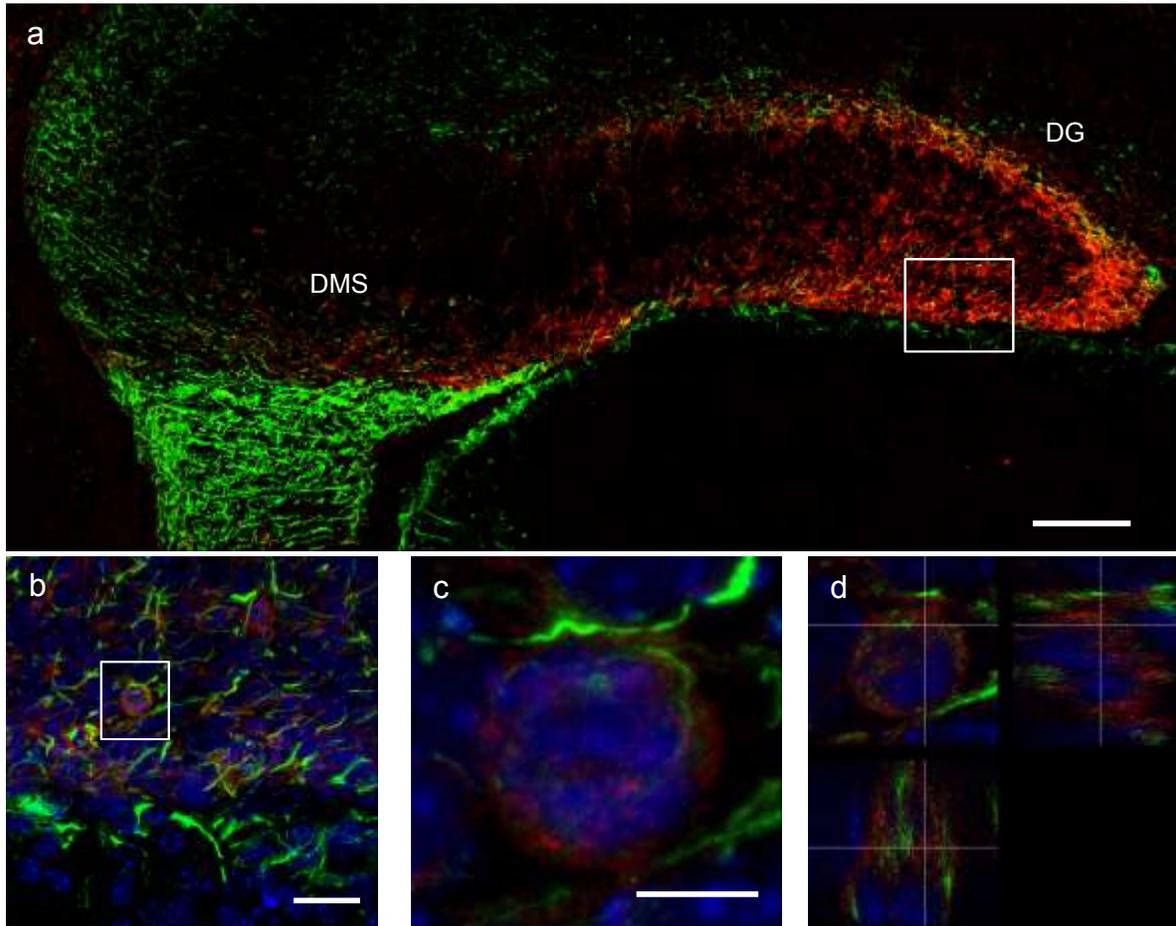


Fig. 30 Inmunofluorescencia de Gas1 y Gfap en el giro dentado del hipocampo de un ratón recién nacido. **(b)** Amplificación del recuadro en **(a)** donde se puede ver una célula positiva a Gas1 y Gfap en el DG. **(c)** Amplificación del recuadro en **(b)** donde se observa la célula positiva a Gas1 con filamentos Gfap positivos dentro de ella. **(d)** Corte ortogonal de c en donde se puede apreciar los filamentos de Gfap rodeado de la marca de Gas1. DG giro dentado, DMS vía de migración dentada. **(a)** Barra 100  $\mu\text{m}$ ; **(b)** barra 20  $\mu\text{m}$ ; **(c)** barra 5  $\mu\text{m}$

## 9 Discusión

Durante el desarrollo del sistema nervioso, la neurogénesis presenta mucha actividad y se extiende desde etapas tempranas del desarrollo hasta la vida adulta. Este proceso se modula por múltiples factores intrínsecos y extrínsecos con respecto a las células troncales neurales (CTNs), progenitores intermedios y neuroblastos (Menini 2010).

Gas1 es una proteína versátil capaz de realizar múltiples funciones dependiendo el contexto en el que se exprese lo cual sugiere que ejerce un rol importante en cualquier vía de señalización y evento fisiológico en el que esté presente. En las etapas embrionarias y neonatales, el gen *gas1* se expresa a nivel de ARN mensajero durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo y la neocorteza (Lee et al 2001b). Esto abre la posibilidad de que la proteína Gas1 pudiese expresarse en estas estructuras durante su morfogénesis y además sugiere una función importante de esta proteína durante el desarrollo de la neocorteza y giro dentado. Sin embargo, hasta ahora el patrón de expresión de la proteína Gas1 durante el desarrollo embrionario y postnatal había permanecido desconocido.

En este trabajo, mediante distintas técnicas experimentales, se describió el patrón de expresión de Gas1 a lo largo de distintas etapas del desarrollo de la neocorteza y el giro dentado del hipocampo, además de que se descubrieron los tipos celulares que expresan esta proteína durante su desarrollo embrionario y postnatal.

Inicialmente se corroboró la especificidad del anticuerpo para detectar a la proteína Gas1. Se observó que en congruencia con lo reportado anteriormente (Schneider et al 1988), las células NIH3T3 expresan la proteína Gas1 de manera preferencial cuando son cultivadas sin suero, lo cual indica la especificidad del anticuerpo (Fig. 3). Se pudieron reproducir resultados de otros grupos de investigación donde se observó la expresión de Gas1 en la capa germinal externa del cerebelo (Izzi et al 2011; Figs. 4,5,6 y 7) y se corroboró que esta señal no es un falso positivo provocado por el anticuerpo secundario (Fig. 5). También se preadsorbió el anticuerpo primario con la proteína recombinante de Gas1 y se comprobó nuevamente su especificidad (Figs. 6 y 7). Además se probó el anticuerpo en tejido de corazón y pulmón y se pudo apreciar que el patrón de expresión de Gas1 era perivascular (Fig. 8) lo cual es un patrón ya reportado en el páncreas (Mathew et al 2014).

Después de validar el anticuerpo se encontró que los niveles de la proteína Gas1 disminuyen conforme transcurre el desarrollo del sistema nervioso central (Figs. 9 y 10). De manera interesante se observó la expresión de Gas1 en los nichos germinales de la neocorteza y el giro dentado del hipocampo (Figs. 10, 11 y 21). Adicionalmente se observó que el patrón de expresión correlaciona con la progresiva desaparición de las células progenitoras del sistema nervioso central conforme transcurre su desarrollo (Altman et al 1990a, b; Noctor et al 2004; Haubensak et al 2004), estos resultados sugerían la expresión de Gas1 en las células progenitoras.

Experimentos posteriores como el ensayo de pulso-caza demostraron la expresión de Gas1 en células en proliferación (Figs. 12 y 22) lo cual reforzaba la propuesta de que Gas1 estaba presente en las células progenitoras que se encontraban en división. Interesantemente, Gas1 se encuentra presente durante la migración de algunas células durante el desarrollo del giro dentado y la neocorteza (Figs. 12c, 13 y 22b). Sin embargo en una tercera etapa analizada, cuando casi todas las células nacidas en el día de gestación E14.5 se han diferenciado a neuronas, Gas1 deja de expresarse (Figs. 12d y 22c). Se pudo apreciar una población remanente de células que nacieron en el día de gestación E14.5 y que mantenían la expresión de Gas1 en el giro dentado del hipocampo (Fig. 14); es probable que estas células sean células progenitoras que se mantuvieron con ese fenotipo hasta que el ratón naciera ya que se ha demostrado, tanto en el giro dentado del hipocampo como en la zona ventricular y subventricular, la existencia de células troncales neurales que nacen durante etapas embrionarias y conservan su fenotipo troncal hasta la etapa adulta (Mathews et al 2010; Li et al 2013; Fuentealba et al 2015).

Las inmunofluorescencias dobles de Gas1 y Sox2 o Beta tubulina clase III dieron resultados consistentes con los experimentos de pulso-caza. Sox2 está presente virtualmente en casi todas las células positivas a Gas1 (Figs. 15 y 23); también se observó la presencia de Gas1 en células en división en ratones recién nacidos (Figs. 16 y 24). A pesar de que en el giro dentado y neocorteza la expresión

de Sox2 se observa en la mayoría de las células positivas a Gas1, también existe la posibilidad de que Gas1 se esté expresando en otros tipos de células progenitoras que no son positivas a Sox2 debido a la amplia heterogeneidad de las células progenitoras (Hutton y Pevny 2011; Sugiyama et al 2013). Por otra parte, la presencia de Gas1 en las células progenitoras de las neuroesferas de embriones refleja fielmente lo observado *in vivo* (Figs. 17 y 18).

En contraste con la presencia de Gas1 en las células progenitoras, se observó que Gas1 no está presente en neuronas maduras (Figs. 19, 20, 25, 26, 27, 28) ya que Gas1 y Beta tubulina clase III se expresan en dominios distintos, esto es evidente principalmente en la neocorteza (Figs. 25,26,27,28), incluso a mayor amplificación se demostró la ausencia de colocalización entre Beta tubulina clase III y Gas1 ya que se trataban de filamentos independientes (Figs. 26 y 27). Estos patrones de exclusión entre Gas1 y Beta tubulina clase III sugieren que Gas1 podría ser un marcador de células progenitoras tanto en la neocorteza como en el giro dentado del hipocampo.

También observamos la disminución de células progenitoras en división que expresan Gas1 (Figs 16 y 24), este cambio debe ser estudiado en experimentos posteriores a este trabajo y posiblemente se debe a cambios en los microambientes de los nichos neurogénicos conforme el ratón va creciendo y a largo plazo envejeciendo (Lee et al 2012) o incluso puede deberse a modificaciones genéticas de los progenitores (Götz et al 2005; Kriegstein y Álvarez-Buylla 2011). Debido a que los estudios recientes reportan la presencia de Gas1 en células progenitoras durante el desarrollo de distintos órganos (Izzi et al 2011; Biau et al 2013; Kann et al 2015), otra posibilidad es que las células quiescentes positivas a Gas1 sean células progenitoras que se mantienen en arresto por largo tiempo incluso hasta llegar a la vida adulta (Fuentealba et al 2015).

La ausencia de Gas1 en la mayoría de los astrocitos positivos a Gfap descarta la posibilidad de que se encuentren en este tipo celular (Figs 29 y 30), además, estos resultados van en línea con otros hallazgos donde observaron que

*gas1* disminuía su expresión conforme las células progenitoras se diferenciaban a astrocitos (Obayashi et al 2009); sin embargo la presencia de Gas1 en una subpoblación de astrocitos en el giro dentado del hipocampo de un ratón recién nacido resulta intrigante; tomando en consideración este hallazgo y el que existen células troncales neurales postnatales que expresan Gfap (Seri et al 2004; Steiner et al 2006; Kriegstein y Álvarez-Buylla 2011) y que a lo largo de este trabajo y otros anteriores Gas1 se ha encontrado preferencialmente en nichos germinales y en células progenitoras (Izzi et al 2011; Biau et al 2013; Kann et al 2015) se sugiere que estas células positivas a Gas1 y Gfap podrían ser células troncales neurales, sin embargo, es necesario realizar más experimentos enfocados a dilucidar qué tipo de células positivas a Gfap son las que expresan Gas1.

Los resultados obtenidos en este trabajo van en línea con reportes de otros grupos de investigación independientes, en los cuales se observa la expresión de Gas1 en células progenitoras de nefronas, neuronas entéricas y de neuronas cerebelares (Izzi et al 2011; Biau et al 2013; Kann et al 2015). La presencia de Gas1 en células progenitoras en división pero no en neuronas, sugiere que durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo y la neocorteza Gas1 tiene una función que se relaciona más con la proliferación que con eventos de detención del ciclo celular y apoptosis, ya que sus niveles van disminuyendo conforme la célula progenitora comienza a diferenciarse tanto a neurona como a astrocito (Fig. 31). Sin embargo, debido a la capacidad de Gas1 para participar en distintas vías de señalización que incluyen a Shh, el factor neurotrófico derivado de la glía (Gdnf) y las vías desencadenadas por la proteína precursora amiloide (APP), no es posible dilucidar fácilmente la función que ejerce Gas1 durante el desarrollo en las dos estructuras que se estudiaron en este trabajo (Martinelli y Fan 2007; Chapuis et al 2011; Izzi et al 2011; Biau et al 2013). Por otra parte, resulta interesante la presencia de Gas1 en células quiescentes en ratones recién nacidos; la restricción de Gas1 a los nichos neurogénicos y su colocalización con marcadores de células progenitoras como Sox2 o nestina sugieren que estas células quiescentes positivas a Gas1 son células progenitoras en arresto, sin embargo, se deben realizar trabajos más detallados como triples tinciones para conocer el fenotipo de las células quiescentes

positivas a Gas1 ya que también existe la posibilidad de que las células positivas a Gas1 que están en contacto directo con los ventrículos laterales pudieran ser células endimarias o incluso neuroblastos en migración, los cuales se localizan en la zona subventricular (Doetsch et al 1997).

### **9.1 Relevancia de Gas1 durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo**

Existe una correlación interesante entre Gas1 y el desarrollo del giro dentado del hipocampo. La morfogénesis de esta estructura está en investigación (Li et al 2013; Hodge et al 2013). Muchas señales contribuyen a su desarrollo, entre ellas Shh tiene una contribución crucial para su organización y citoarquitectura (Machold et al 2003; Han et al 2008). Interesantemente, los correceptores para Shh que son Gas1, Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes (Cdo) y Brother of Cdo (Boc) son tan esenciales como el mismo ligando para desencadenar esta vía de señalización (Allen et al 2011). Sin embargo, ninguno de estos co-receptores se ha estudiado durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo, ni se habían determinado su patrón de expresión a nivel protéico en esta estructura.

Los ensayos para determinar el patrón de expresión de Cdo, Boc e incluso Gas1 durante el desarrollo embrionario se habían restringido a hibridaciones *in situ* y nunca se extendieron estos estudios a nivel de proteína (Trupp et al 1997; Lee et al 2001; Mulleri et al 2002). En este trabajo se reportó por primera vez el patrón de expresión a nivel de proteína de uno de los tres co-receptores de Shh el cual fue Gas1, sin embargo, todavía queda por conocer su rol durante la morfogénesis del giro dentado del hipocampo. Los datos descritos ilustrados en este proyecto sugieren que Gas1 podría estar participando en la vía de Shh aunque también puede participar en otras vías que no dependan de la vía canónica de este morfógeno, ya que se ha observado que existen poblaciones de células progenitoras que no responden a la vía convencional de Shh, la cual involucra al factor de transcripción Gli1 (Li et al 2013). A pesar de que Gas1 pudiera estar presente en las células que no tienen activa la vía canónica de Shh, existe la

posibilidad de que pudiera estar participando en otras vías no canónicas de este morfógeno las cuales promueven eventos de repulsión e incluso atracción de axones, estas vías no involucran la activación del factor de transcripción Gli1 (Yam et al 2013). Además de participar en conjunto con Shh, Gas1 también es capaz de modular otras vías de señalización como la de GDNF, artemina e incluso podría modular la producción de APP (Martinelli y Fan 2007; Chapuis et al 2011; Zarco et al 2011; Jimenez et al 2014).

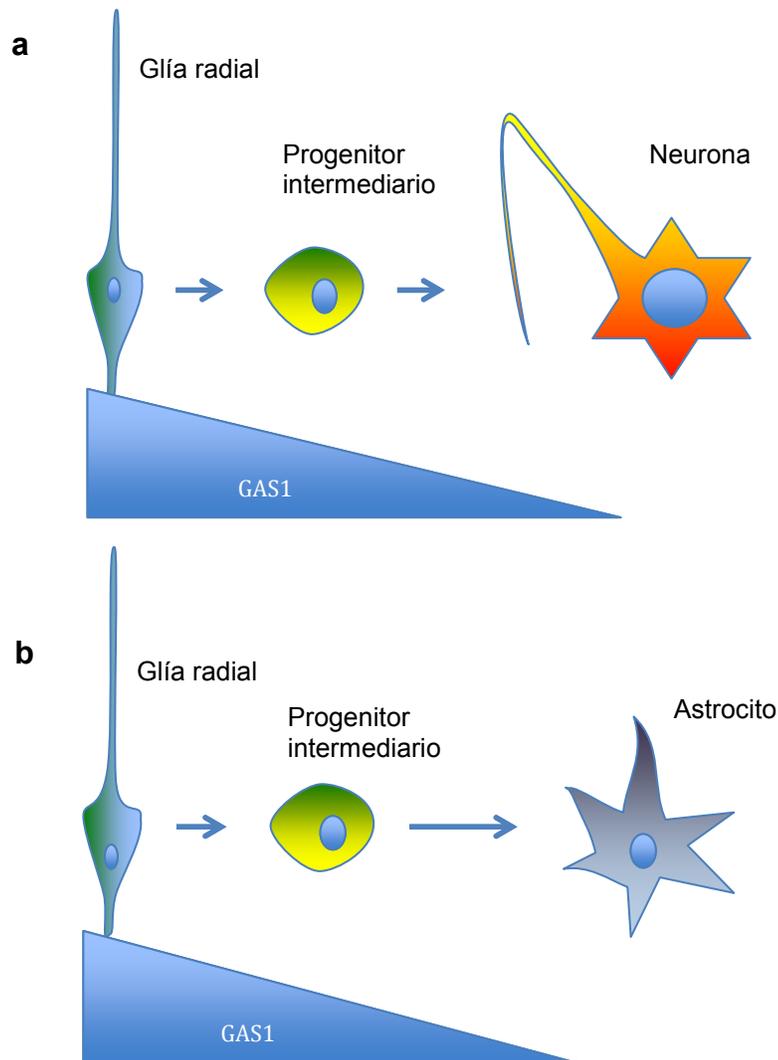


Fig. 31 Expresión de Gas1 durante la diferenciación de neuronas (a) y astrocitos (b) en el desarrollo embrionario.

## 9.2 Relevancia de Gas1 durante el desarrollo de la neocorteza

La presencia de Gas1 durante el desarrollo de la neocorteza también resulta interesante debido a su localización preferencialmente adyacente a los ventrículos laterales. Gas1 es una proteína con ancla GPI (Stebel et al 2000) y existe la posibilidad de que pueda ser escindida por metaloproteasas de una manera similar a la del receptor GFR $\alpha$ 1 (Paratcha et al 2001) el cual comparte una alta homología estructural con Gas1 (Schueler-Furman et al 2006). Es importante mencionar que ya se ha diseñado en el laboratorio una forma soluble de Gas1 la cual tiene un efecto terapéutico en el tratamiento de tumores (López-Ornelas et al 2011, 2014; Jiménez et al 2014). Además, el reciente descubrimiento de una forma soluble de Gas1 tanto en la orina como en el líquido cefalorraquídeo de ratas adultas (van Roeyen et al 2013; Ayala-Sarmiento et al 2016) sugiere fuertemente la presencia de una forma soluble de Gas1 en el líquido cefalorraquídeo de los embriones, la cual pudiera estar siendo producida por las células progenitoras que expresan Gas1 y que se encuentran delineando los ventrículos laterales. La posible liberación de Gas1 al líquido cefalorraquídeo del embrión aumentaría el alcance de su actividad ya que le conferiría la capacidad de actuar de una forma parácrina pudiendo así interactuar con proteínas localizadas en otras regiones donde no se está produciendo Gas1.

Otro aspecto relevante es que durante el desarrollo de la neocorteza la vía canónica de Shh no tiene mucha participación, lo cual indica que posiblemente la función de Gas1 no sea mediar esta vía, sin embargo, existen las vías no canónicas de Shh las cuales están relacionadas con eventos de atracción y repulsión de axones (Yam et al 2013; Choe et al 2015; Jin et al 2015). Existe la posibilidad de que Gas1 pudiera estar actuando como un repulsor de axones ya que los dominios donde se expresa Beta tubulina clase III son contrarios a los dominios donde se expresa Gas1 (Figs. 25,26,27,28). Además, se ha descrito en otros trabajos la capacidad de Gas1 para repeler axones en las microvellosidades del intestino en desarrollo (Jin et al 2015).

### **9.3 Gas1 y GFR $\alpha$ 1 durante el desarrollo embrionario**

Existe una relación estructural entre GFR $\alpha$ 1 y Gas1 lo cual sugiere que ésta última es capaz de interferir con la primera (Schueler-Furman 2008). Varios estudios han demostrado que Gas1 es capaz de modular negativamente la vía de GDNF la cual involucra la participación del receptor GFR $\alpha$ 1. Este fenómeno se ha observado tanto en cáncer como en el desarrollo del sistema nervioso (Zarco et al 2012; Biau et al 2013). La vía de GDNF modula positivamente la diferenciación de neuronas del sistema nervioso entérico, además la ausencia de Gas1 provoca que la tasa de diferenciación neuronal aumente cuando se agrega GDNF a las células progenitoras de neuronas entéricas lo cual indica que Gas1 es un modulador negativo de la diferenciación (Biau et al 2013). Recientemente se ha demostrado que GFR $\alpha$ 1 y GDNF también modulan positivamente la arborización dendrítica de las neuronas hipocampales (Irala et al 2016). En el presente trabajo se observó que Gas1 no se expresaba en neuronas durante el desarrollo de la neocorteza y el giro dentado, lo que sugiere que Gas1 debe ser regulado a la baja para que puedan ocurrir procesos de diferenciación neuronal mediados por GDNF y GFR $\alpha$ 1 (Biau et al 2013; Irala et al 2016).

### **9.4 Gas1 y las integrinas**

Del Sal y colaboradores demostraron mediante análisis bioinformáticos que la secuencia de aminoácidos de Gas1 posee un motivo de unión a integrinas denominado RGD (Del Sal et al 1994), este resultado sugiere que Gas1 podría interactuar con las integrinas y participar en eventos regulados por estas proteínas transmembranales como puede ser la migración de neuroblastos durante el desarrollo del sistema nervioso central (Evsyukova et al 2013).

### **9.5 Gas1 y APP**

Chapuis y colaboradores demostraron que Gas1 es capaz de intervenir en la síntesis de la proteína precursora amiloide o APP evitando así su maduración y que

llegue a la membranas (Chapuis et al 2011). Estos resultados indican que Gas1 modula negativamente cualquier vía de señalización que involucre a APP y sus derivados. Mediante ratones transgénicos knock out para APP se ha demostrado que esta proteína es importante para una distribución correcta de axones comisurales y para una apropiada generación de neuritas en las neuronas hipocampales (Rama et al 2012; Weyer et al 2014). Con base en estos reportes se puede sugerir que la regulación a la baja de la proteína Gas1 en las neuronas es necesaria para que puedan generarse de manera correcta las neuritas de las neuronas hipocampales y para que los axones comisurales tengan una distribución correcta.

## 9.6 Regulación de la expresión de Gas1

Aún queda por conocer qué induce que Gas1 deje de expresarse y el por qué disminuye su expresión conforme transcurre la diferenciación de las células progenitoras a neuronas durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo y neocorteza.

Se sabe poco acerca de la regulación transcripcional de *gas1*. Referente a los elementos que regulan a la baja la expresión de *gas1*, Ma y colaboradores demostraron en el carcicoma de tiroides que *gas1* es regulado a la baja por el micro-ARN 34a (miR-34a) (Ma et al 2013). Interesantemente otros estudios de diferenciación neuronal indican que las neuronas completamente diferenciadas expresan miR-34a (Agostini et al 2011a,b; Aranha et al 2011). Además, se ha visto que en cerebros de distintas edades el miR-34a aumenta conforme los ratones crecen (Bommer et al 2007; Agostini 2011a). Estos resultados indican que la posible razón por la que Gas1 disminuye sus niveles conforme transcurre el desarrollo del sistema nervioso central sea por el aumento de este micro ARN, sin embargo se requieren más estudios que puedan demostrar esta hipótesis.

Múltiples evidencias indican que Gas1 modula negativamente las vías de señalización de GDNF y GFR $\alpha$ 1 y que impide la maduración de APP por lo cual se

puede considerar que inhibe su función. Como se ha mencionado anteriormente, las vías de señalización que involucran a GDNF, GFR $\alpha$ 1 y APP se relacionan con distintos eventos dentro de los cuales están la diferenciación de neuronas entéricas, hipocampales y el correcto direccionamiento de los axones; estos trabajos sugieren que Gas1 puede actuar como un modulador negativo de estos procesos mientras sean modulados positivamente por GDNF, GFR $\alpha$ 1 y APP (Chapuis et al 2011; Rama et al 2012; Biau et al 2013; Weyer et al 2014; Irala et al 2016). Tomando estos estudios mencionados y los hallazgos de este proyecto de investigación en donde Gas1 se expresa en células progenitoras pero no en neuronas, se puede interpretar que Gas1 es regulado a la baja en neuronas para que éstas puedan diferenciarse y extender axones y dendritas adecuadamente mediante la activación de vías como la de GDNF, GFR $\alpha$ 1 e incluso APP. Ante esta situación es necesario hacer experimentos en cultivos primarios o *in vivo* para determinar si Gas1 modula de forma positiva o negativa la diferenciación neuronal.

### **9.7 Ventajas técnicas del patrón de expresión de Gas1**

Como se mencionó anteriormente, la presencia exclusiva de Gas1 en las células progenitoras permite utilizar a esta proteína como una herramienta de selección. Gas1 es una proteína con ancla GPI por lo cual se expresa preferencialmente en la cara externa de la membrana celular (Stebel et al 2000); esta propiedad permitiría seleccionar de manera específica a las células positivas a Gas1 para estudiarlas de manera aislada.

En este trabajo se encontró que la expresión de Gas1 se restringe a las células progenitoras del telencéfalo dorsal las cuales darán origen principalmente a neuronas piramidales glutamatérgicas de la neocorteza y neuronas granulares glutamatérgicas del giro dentado del hipocampo (Greig et al 2013; Yu et al 2014; De Juan Romero y Borrell 2015). Debido a que existe una amplia heterogeneidad de células progenitoras en el sistema nervioso central se puede considerar una ventaja selectiva la expresión de Gas1 sólo en el telencéfalo dorsal y no en el ventral para aislar con ayuda de la microdissección láser una población específica de células

progenitoras que en este caso serían de la neocorteza y del giro dentado del hipocampo para probar su potencial de generar fenotipos específicos de neuronas lo cual representaría un modelo de estudio muy útil en la medicina regenerativa.

Otro aspecto interesante dentro de este trabajo es que se observó la expresión de Gas1 de forma adyacente a los vasos sanguíneos tanto en el corazón como en el pulmón (Fig. 8); este patrón de expresión perivascular ya se ha observado anteriormente en el páncreas (Mathew et al 2014). Recientemente se ha descrito que las células troncales mesenquimales también tienen un patrón perivascular en varios órganos que incluyen al pulmón, corazón y páncreas, además responden a Shh porque tienen activo el factor de transcripción Gli1 (Kramann et al 2015). Estas correlaciones con respecto al patrón de distribución perivascular tanto de Gas1 como de las células troncales mesenquimales sugiere la posible presencia de Gas1 en este tipo de células troncales por lo cual resultaría interesante estudiar si Gas1 también se expresa de forma selectiva en esta población celular y de ser así Gas1 también podría ser una herramienta útil para aislar de forma específica estas células para poder estudiarlas de forma aislada o para evaluar su potencial en medicina regenerativa.

## **10. Conclusión**

En conjunto estos resultados demuestran la expresión de Gas1 en células progenitoras pero no en neuronas durante el desarrollo de la neocorteza y giro dentado del hipocampo; además se describe cómo los niveles de expresión de la proteína Gas1 disminuyen conforme transcurre el desarrollo del sistema nervioso central, lo cual indica su relevancia en una restringida ventana de tiempo la cual corresponde al desarrollo de distintas estructuras del sistema nervioso. Esta especificidad de Gas1 que se refiere al tiempo y regiones donde se expresa, sugiere fuertemente un rol importante de esta proteína durante el desarrollo de distintas estructuras del cerebro; además, dicha exclusividad puede ser aprovechada para aislar células progenitoras con fenotipos específicos. Anteriormente se había determinado la relevancia de Gas1 para el desarrollo del cerebelo (Liu et al 2001),

ahora prosigue investigar su importancia durante el desarrollo de otras estructuras del sistema nervioso central como la neocorteza y el giro dentado del hipocampo.

## 11. Bibliografía

- Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., & Huttner, W. B. (1996). Loss of Occludin and Functional Tight Junctions, but Not ZO-1, during Neural Tube Closure—Remodeling of the Neuroepithelium Prior to Neurogenesis. *Developmental Biology*, *180*(2), 664–679. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0336>
- Agostini, M., Tucci, P., Killick, R., Candi, E., Sayan, B. S., Rivetti di Val Cervo, Melino, G. (2011). Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(52), 21093–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112061109>
- Agostini, M., Tucci, P., Steinert, J. R., Shalom-Feuerstein, R., Rouleau, M., Aberdam, Melino, G. (2011). microRNA-34a regulates neurite outgrowth, spinal morphology, and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(17), 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112063108>
- Allen, B. L., Song, J. Y., Izzi, L., Althaus, I. W., Kang, J. S., Charron, F., McMahon, A. P. (2011). Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Developmental Cell*, *20*(6), 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.018>
- Allen, B. L., Tenzen, T., & McMahon, A. P. (2007). The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes and Development*, *21*(10), 1244–1257. <https://doi.org/10.1101/gad.1543607>
- Altman, J., & Bayer, S. A. (1990). Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *The Journal of Comparative Neurology*, *301*(3), 325–42. <https://doi.org/10.1002/cne.903010302>
- Altman, J., & Bayer, S. A. (1990b). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *The Journal of Comparative Neurology*, *301*(3), 365–381. <https://doi.org/10.1002/cne.903010304>
- Alvarez-Buylla, A., & Lim, D. A. (2004). For the long run: Maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, *41*(5), 683–686. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00111-4)

- Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G., & Heintz, N. (2004). Radial glia serve as neural progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*, *41*, 881–890.
- Aranha, M. M., Santos, D. M., Solá, S., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. P. (2011). miR-34a Regulates Mouse Neural Stem Cell Differentiation. *PloS One*, *6*(8), e21396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021396>
- Ayala-Sarmiento, A. E., Estudillo, E., Pérez-Sánchez, G., Sierra-Sánchez, A., González-Mariscal, L., Martínez-Fong, D., & Segovia, J. (2016). GAS1 is present in the cerebrospinal fluid and is expressed in the choroid plexus of the adult rat. *Histochemistry and Cell Biology*, *146*(3), 325–336. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1449-0>
- Biau, S., Jin, S., Fan, C.-M., Airaksinen, M. S., Saarma, M., Allen, B. L., McMahon, A. P. (2013). Gastrointestinal defects of the Gas1 mutant involve dysregulated Hedgehog and Ret signaling. *Biology Open*, *2*(2), 144–55. <https://doi.org/10.1242/bio.20123186>
- Bommer, G. T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A. J., Kuick, R., Love, R. E., Fearon, E. R. (2007). p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Current Biology*, *17*(15), 1298–1307. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.068>
- Carlson BM. 2000. Embriología Humana y Biología del Desarrollo. 2ª Ed. Ediciones Harcourt.
- Chapuis, J., Vingtdeux, V., Campagne, F., Davies, P., & Marambaud, P. (2011). Growth arrest-specific 1 binds to and controls the maturation and processing of the amyloid-beta precursor protein. *Human Molecular Genetics*, *20*(10), 2026–2036. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr085>
- Choe, Y., Huynh, T., & Pleasure, S. J. (2015). Epithelial cells supply Sonic Hedgehog to the perinatal dentate gyrus via transport by platelets. *eLife*, *4*(OCTOBER2015), 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.07834>
- Cooper, M. A., Kobayashi, K., & Zhou, R. (2009). Ephrin-A5 regulates the formation of the ascending midbrain dopaminergic pathways. *Developmental Neurobiology*, *69*(1), 36–46. <https://doi.org/10.1002/dneu.20685>
- De Juan Romero, C., & Borrell, V. (2015). Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia*, *63*(8), 1303–1319. <https://doi.org/10.1002/glia.22827>
- Del Sal, G., Collavin, L., Ruaro, M. E., Edomi, P., Saccone, S., Valle, G. D., & Schneider, C. (1994). Structure, function, and chromosome mapping of the growth-suppressing human homologue of the murine gas1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(5), 1848–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1848>

- Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(13), 5046–5061.
- Domínguez-Monzón G, González-Ramírez R, Segovia J. 2011. Molecular mechanisms of action of Gas1 and its possible therapeutic applications. *Current signal transduction therapy*. 6(1) pp 106-112.
- Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature Reviews. Neuroscience*, 1(1), 41–50. <https://doi.org/10.1038/35036213>
- Evdokiou, A., & Cowled, P. A. (1998). Growth-regulatory activity of the growth arrest-specific gene, GAS1, in NIH3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res*, 240(2), 359–367. [https://doi.org/S0014-4827\(98\)94011-3](https://doi.org/S0014-4827(98)94011-3) [pii]r10.1006/excr.1998.4011
- Evdokiou, A., & Cowled, P. A. (1998). Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines. *International Journal of Cancer*, 75(4), 568–577. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980209\)75:4<568::AID-IJC13>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980209)75:4<568::AID-IJC13>3.0.CO;2-5)
- Evsyukova, I., Plestant, C., & Anton, E. S. (2013). Integrative mechanisms of oriented neuronal migration in the developing brain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29(July), 299–353. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122400>
- Ferguson, M. A. J. (1991). Glycosyl- p hosp hatidylinositol Membrane Anchors : The Tale of a Tail.
- Fiore, R., Siegel, G., & Schratt, G. (2008). MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(8), 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2007.12.006>
- Fuentealba, L. C., Rompani, S. B., Parraguez, J. I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C. L., Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells Article Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells, 1644–1655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.041>.Embryonic
- Fujihara, Y., & Ikawa, M. (2015). Supplementary key words : Genetics Phospholipids / Phosphatidylinositol Gene expression Phospholipases Glypican GPIase. *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1194/jlr.R063032>
- Gage, F. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287(5457), 1433–1438. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1433>
- Gage, F. H. (2002). Neurogenesis in the Adult Brain. *J. Neurosci.*, 22(3), 612–613. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121631>

- Gilbert SF. 2000. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA) Formation of the Neural Tube.
- Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>
- Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. 2013. *Nature Reviews. Neuroscience*. 14(11):755-69.
- Han, Y., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J., Aguilar, a, Schneider-Maunoury, S., & Alvarez-Buylla, a. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nature Neuroscience*, 11(3), 277–84. <https://doi.org/10.1038/nn2059>
- Harrison, J. F., Rinne, M. L., Kelley, M. R., Druzhyna, N. M., Wilson, G. L., & Ledoux, S. P. (2007). Altering DNA base excision repair: use of nuclear and mitochondrial-targeted N-methylpurine DNA glycosylase to sensitize astroglia to chemotherapeutic agents. *Glia*, 55(14), 1416–1425. <https://doi.org/10.1002/glia>
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., & Kageyama, R. (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development (Cambridge, England)*, 131(22), 5539–50. <https://doi.org/10.1242/dev.01436>
- Hatinen T, Holm L, Airaksinen MS. 2007. Loss of neurturin in frog-comparative genomics study of GDNF family ligand-receptor pairs. *Mol Cell Neurosci*; 34(2): 155-6
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., & Huttner, W. B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 3196–201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308600100>
- Hevner, R. F., Daza, R. A. M., Rubenstein, J. L. R., Stunnenberg, H., Olavarria, J. F., & Englund, C. (2003). Beyond laminar fate: Toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons. *Developmental Neuroscience*, 25(2–4), 139–151. <https://doi.org/10.1159/000072263>
- Hodge, R. D., Garcia, A. J., Elsen, G. E., Nelson, B. R., Mussar, K. E., Reiner, S. L., Hevner, R. F. (2013). Tbr2 expression in Cajal-Retzius cells and intermediate neuronal progenitors is required for morphogenesis of the dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(9), 4165–80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4185-12.2013>
- Holmberg, J., Armulik, A., Senti, K. A., Edoff, K., Spalding, K., Momma, S., Frisén, J. (2005). Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor

proliferation and neurogenesis. *Genes and Development*, 19(4), 462–471.  
<https://doi.org/10.1101/gad.326905>

Huttner, W. B., & Brand, M. (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(1), 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(97\)80117-1](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80117-1)

Hutton, S. R., & Pevny, L. H. (2011). SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon. *Developmental Biology*, 352(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.01.015>

Ian Simpson, T., & Price, D. J. (2002). Pax6; a pleiotropic player in development. *BioEssays*, 24(11), 1041–1051. <https://doi.org/10.1002/bies.10174>

Irala, D., Bonafina, A., Fontanet, P. A., Alsina, F. C., Paratcha, G., & Ledda, F. (2016). GDNF/GFR $\alpha$ 1 complex promotes development of hippocampal dendritic arbors and spines via NCAM. *Development*, (October). <https://doi.org/10.1242/dev.140350>

Izzi, L., Lévesque, M., Morin, S., Laniel, D., Wilkes, B. C., Mille, F., Charron, F. (2011). Boc and gas1 each form distinct shh receptor complexes with ptch1 and are required for shh-mediated cell proliferation. *Developmental Cell*, 20(6), 788–801.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.017>

Jiménez, A., López-Ornelas, A., Estudillo, E., González-Mariscal, L., González, R. O., & Segovia, J. (2014). A soluble form of GAS1 inhibits tumor growth and angiogenesis in a triple negative breast cancer model. *Experimental Cell Research*, 327(2), 307–317.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.06.016>

Jin, S., Martinelli, D. C., Zheng, X., Tessier-Lavigne, M., & Fan, C.-M. (2015). Gas1 is a receptor for sonic hedgehog to repel enteric axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(1), E73–80.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1418629112>

Kandel et al 2013. Principles of neural science. 5th Edition. McGraw Hill

Kann, M., Bae, E., Lenz, M. O., Li, L., Trannguyen, B., Schumacher, V. a, Kreidberg, J. a. (2015). WT1 targets Gas1 to maintain nephron progenitor cells by modulating FGF signals. *Development*, 142(7), 1254–66. <https://doi.org/10.1242/dev.119735>

Kramann, R., Schneider, R. K., Dirocco, D. P., Machado, F., Fleig, S., Bondzie, P. A., Humphreys, B. D. (2015). Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell*, 16(1), 51–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.004>

Kriegstein, A., & Alvarez-buylla, A. (2011). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annual Reviews of Neuroscience*, 149–184.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>.The

- Lee, C. S., Buttitta, L., & Fan, C. M. (2001). Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(20), 11347–11352. <https://doi.org/10.1073/pnas.201418298> [pii]
- Lee, C. S., & Fan, C. M. (2001). Embryonic expression patterns of the mouse and chick Gas1 genes. *Mechanisms of Development*, *101*(1–2), 293–297. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00283-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00283-0)
- Lee, S. W., Clemenson, G. D., & Gage, F. H. (2012). New neurons in an aged brain. *Behavioural Brain Research*, *227*(2), 497–507. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.10.009>
- Li, G., Fang, L., Fernández, G., & Pleasure, S. J. (2013). The Ventral Hippocampus Is the Embryonic Origin for Adult Neural Stem Cells in the Dentate Gyrus. *Neuron*, *78*(4), 658–672. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.019>
- Li, G., Kataoka, H., Coughlin, S. R., & Pleasure, S. J. (2009). Identification of a transient subpial neurogenic zone in the developing dentate gyrus and its regulation by Cxcl12 and reelin signaling. *Development (Cambridge, England)*, *136*(2), 327–335. <https://doi.org/10.1242/dev.025742>
- Li, G., & Pleasure, S. J. (2005). Morphogenesis of the dentate gyrus: What we are learning from mouse mutants. *Developmental Neuroscience*, *27*(2–4), 93–99. <https://doi.org/10.1159/000085980>
- Linker, C., & Stern, C. D. (2004). Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development (Cambridge, England)*, *131*, 5671–5681. <https://doi.org/10.1242/dev.01445>
- Liu, J., Solway, K., Messing, R. O., & Sharp, F. R. (1998). Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(19), 7768–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742147>
- Liu, Y., May, N. R., & Fan, C.-M. (2001). Growth Arrest Specific Gene 1 Is a Positive Growth Regulator for the Cerebellum. *Developmental Biology*, *236*(1), 30–45. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0146>
- Lopez-Ornelas, A., Mejia-Castillo, T., Vergara, P., & Segovia, J. (2011). Lentiviral transfer of an inducible transgene expressing a soluble form of Gas1 causes glioma cell arrest, apoptosis and inhibits tumor growth. *Cancer Gene Ther*, *18*(2), 87–99. <https://doi.org/cgt201054> [pii]r10.1038/cgt.2010.54
- López-Ornelas, A., Vergara, P., & Segovia, J. (2014). Neural stem cells producing an inducible and soluble form of Gas1 target and inhibit intracranial glioma growth. *Cytotherapy*, *16*(7), 1011–1023. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.12.004>

- Ma, Y., Qin, H., & Cui, Y. (2013). MiR-34a targets GAS1 to promote cell proliferation and inhibit apoptosis in papillary thyroid carcinoma via PI3K/Akt/Bad pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(4), 958–963. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.010>
- Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., Fishell, G. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron*, 39(6), 937–950. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00561-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00561-0)
- Martinelli, D. C., & Fan, C. M. (2007). Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes and Development*, 21(10), 1231–1243. <https://doi.org/10.1101/gad.1546307>
- Mathew, E., Zhang, Y., Holtz, A. M., Kane, K. T., Song, J. Y., Allen, B. L., & di Magliano, M. P. (2014). Dosage-dependent regulation of pancreatic cancer growth and angiogenesis by Hedgehog signaling. *Cell Reports*, 9(2), 484–494. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.010>
- Mathews, E. A., Morgenstern, N. A., Piatti, V. C., Zhao, C., Jessberger, S., Schinder, A. F., & Gage, F. H. (2010). A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 518(22), 4479–4490. <https://doi.org/10.1002/cne.22489>
- Mellstrom, B., Cena, V., Lamas, M., Perales, C., Gonzalez, C., & Naranjo, J. R. (2002). Gas1 is induced during and participates in excitotoxic neuronal death. *Mol Cell Neurosci*, 19(3), 417–429. <https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1092> [pii]
- Menini, A. 2010. Neurobiology of olfaction. Neurogenesis in the adult olfactory bulb. 11.1, 11.2.5.2, 11.2.5.3, 11.4, 11.5. CRC Press.
- Ming, G.-L., Guo-li, M., & Hongjun, S. (2005). Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.*, 28(1), 223–250. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459>
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., & Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron*, 31(5), 727–741. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00420-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00420-2)
- Mulieri, P. J., Kang, J. S., Sassoon, D. A., & Krauss, R. S. (2002). Expression of the boc gene during murine embryogenesis. *Developmental Dynamics*, 223(3), 379–388. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10063>
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., & Kriegstein, A. R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 508(1), 28–44. <https://doi.org/10.1002/cne.21669>

- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience*, 7(2), 136–144. <https://doi.org/10.1038/nn1172>
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., & Kriegstein, A. R. (2007). Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. *Archives of Neurology*, 64(5), 639–642. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.5.639>
- Obayashi, S., Tabunoki, H., Kim, S. U., & Satoh, J. (2009). Gene expression profiling of human neural progenitor cells following the serum-induced astrocyte differentiation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(3), 423–438. <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9338-2>
- Paratcha, G., Ledda, F., Baars, L., Couplier, M., Besset, V., Anders, J., Iba, C. F. (2001). Released GFR  $\alpha$  1 Potentiates Downstream Signaling , Neuronal Survival , and Differentiation via a Novel Mechanism of Recruitment of c-Ret to Lipid Rafts. *Differentiation*, 29, 171–184.
- Pleasure, S. J., Collins, A. E., & Lowenstein, D. H. (2000). Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(16), 6095–105. <https://doi.org/20/16/6095> [pii]
- Rama, N., Goldschneider, D., Corset, V., Lambert, J., Pays, L., & Mehlen, P. (2012). Amyloid precursor protein regulates netrin-1-mediated commissural axon outgrowth. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), 30014–30023. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.324780>
- Schneider, C., King, R. M., & Philipson, L. (1988). Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian-cells. *Cell*, 54, 787–793. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90199-7](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(88)90199-7)
- Schueler-Furman, O., Glick, E., Segovia, J., & Linial, M. (2006). Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands? *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(2), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.12.004>
- Seppala, M., Depew, M. J., Martinelli, D. C., Fan, C. M., Sharpe, P. T., & Cobourne, M. T. (2007). Gas1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interacts with sonic hedgehog. *Journal of Clinical Investigation*, 117(6), 1575–1584. <https://doi.org/10.1172/JCI32032>
- Seppala, M., Xavier, G. M., Fan, C.-M., & Cobourne, M. T. (2014). Boc modifies the spectrum of holoprosencephaly in the absence of Gas1 function. *Biology Open*, 3(8), 728–40. <https://doi.org/10.1242/bio.20147989>
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult

- dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 478(4), 359–378.  
<https://doi.org/10.1002/cne.20288>
- Stebel, M., Vatta, P., Ruaro, M. E., Del Sal, G., Parton, R. G., & Schneider, C. (2000). The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. *FEBS Letters*, 481(2), 152–158. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02004-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02004-4)
- Stemple, D. L. (2005). Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development*, 132(11), 2503–2512. <https://doi.org/10.1242/Dev.01812>
- Sugiyama, T., Osumi, N., & Katsuyama, Y. (2013). The germinal matrices in the developing dentate gyrus are composed of neuronal progenitors at distinct differentiation stages. *Developmental Dynamics*, 242(12), 1442–1453.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.24035>
- Trupp, M., Belluardo, N., Funakoshi, H., & Ibáñez, C. F. (1997). Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(10), 3554–3567.
- TuckerES, PolleuxF, LaMantiaA-S (2006) Position and time specify the migration of a pioneering population of olfactory bulb interneurons. *Dev Biol* 297:387–401
- van Roeyen, C. R. C., Zok, S., Pruessmeyer, J., Boor, P., Nagayama, Y., Fleckenstein, S., ... Floege, J. (2013). Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation. *Kidney International*, 83, 251–63.  
<https://doi.org/10.1038/ki.2012.400>
- Wang, D. D., & Kriegstein, A. R. (2009). Defining the role of GABA in cortical development. *J. Physiol.*, 587(Pt 9), 1873–1879.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.167635>
- Wei, G., Deng, X., Agarwal, S., Iwase, S., Disteche, C., & Xu, J. (2016). Patient Mutations of the Intellectual Disability Gene KDM5C Downregulate Netrin G2 and Suppress Neurite Growth in Neuro2a Cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 60(1), 33–45.  
<https://doi.org/10.1007/s12031-016-0770-3>
- Weyer, S. W., Zagrebelsky, M., Herrmann, U., Hick, M., Ganss, L., Gobbert, J., Müller, U. C. (2014). Comparative analysis of single and combined APP/APLP knockouts reveals reduced spine density in APP-KO mice that is prevented by APP $\alpha$  expression. *Acta Neuropathologica Communications*, 2, 36. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-36>
- Wilkinson DG. (2001). Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(March), 155–64. <https://doi.org/10.1038/35058515>

- Xu, L., Tang, X., Wang, Y., Xu, H., & Fan, X. (2015). Radial glia, the keystone of the development of the hippocampal dentate gyrus. *Molecular Neurobiology*, *51*(1), 131–141. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8692-y>
- Yam, P. T., & Charron, F. (2013). Signaling mechanisms of non-conventional axon guidance cues: The Shh, BMP and Wnt morphogens. *Current Opinion in Neurobiology*, *23*(6), 965–973. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.09.002>
- Yu, D. X., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2014). How to make a hippocampal dentate gyrus granule neuron. *Development (Cambridge, England)*, *141*, 2366–75. <https://doi.org/10.1242/dev.096776>
- Zarco, N., González-Ramírez, R., González, R. O., & Segovia, J. (2012). GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway. *Apoptosis*, *17*(6), 627–635. <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0696-8>
- Zhang, X., Huang, C. T., Chen, J., Pankratz, M. T., Xi, J., Li, J., Zhang, S. (2011). NIH Public Access, *7*(1), 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.017.Pax6>
- Zimmer, G., Garcez, P., Rudolph, J., Niehage, R., Weth, F., Lent, R., & Bolz, J. (2008). Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons. *European Journal of Neuroscience*, *28*(1), 62–73. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06320.x>