

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



ESTUDIO DEL DESARROLLO DEL SNC DE LOS ANFIBIOS
URODELOS BASADO EN LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE
PROTEÍNAS LIGANTES DE CALCIO Y FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN PAX

TESIS DOCTORAL DE:

ALBERTO JOVEN ARAUS

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**AGUSTÍN GONZÁLEZ GALLEGOS
NEREA MORENO GARCÍA**

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas



Estudio del desarrollo del SNC de los anfibios urodelos basado en los patrones de expresión de proteínas ligantes de calcio y factores de transcripción Pax



Alberto Joven Araus

2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas



**Estudio del desarrollo del SNC de los anfibios
urodelos basado en los patrones de expresión de
proteínas ligantes de calcio y factores de
transcripción Pax**

Trabajo de investigación que presenta

Alberto Joven Araus

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
en la Universidad Complutense de Madrid
2013

Fdo. D. Alberto Joven Araus

Dirigido por los Doctores

Agustín González Gallegos

Nerea Moreno García

Profesores titulares de Departamento de Biología Celular de la
Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense
de Madrid

Fdo. Dr. Agustín González Gallegos

Fdo. Dra. Nerea Moreno García

El Dr. Agustín González Gallegos y la Dra. Nerea Moreno García, Profesores titulares de Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid,

HACEN CONSTAR: Que Don Alberto Joven Araus ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral “Estudio del desarrollo del SNC de los anfibios urodelos basado en los patrones de expresión de proteínas ligantes de calcio y factores de transcripción Pax”, que ha terminado con el mayor aprovechamiento.

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

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Madrid a 28 de Mayo de dos mil trece.

Fdo. Dr. Agustín González Gallegos

Fdo. Dra. Nerea Moreno García

According to Confucius,

“By three methods we may learn wisdom:

First, by reflection, which is noblest

Second, by imitation, which is easiest

And third by experience, which is the bitterest”

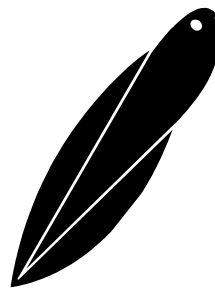
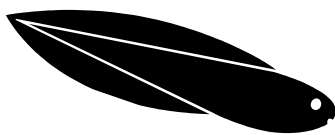
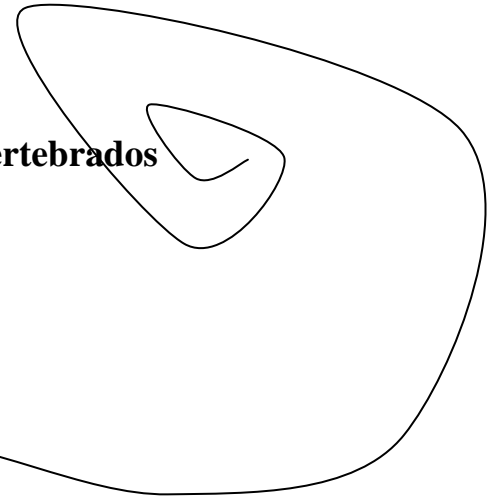
A toda mi familia

1. Introducción general.....	Página 13
Los anfibios urodelos.....	Página 15
El sistema nervioso central (SNC) de vertebrados.....	Página 24
Proteínas ligantes de calcio.....	Página 27
La familia génica Pax.....	Página 28
Objetivos y metodología.....	Página 32
Bibliografía.....	Página 33
2. Expresión de proteínas ligantes de calcio en el SNC a lo largo del desarrollo de <i>Pleurodeles waltl</i>.....	Página 45
Regional distribution of calretinin and calbindin-D28k expression in the brain of the urodele amphibian <i>Pleurodeles waltl</i> during embryonic and larval development.....	Página 47
3. Expresión de los factores de transcripción Pax en desarrollo del SNC de <i>Pleurodeles waltl</i>.....	Página 83
Spatiotemporal Patterns of Pax3, Pax6 and Pax7 Expression in the Developing Brain of a Urodele Amphibian, <i>Pleurodeles waltl</i>	Página 85
4. Expresión de los factores de transcripción Pax en el SNC de <i>Pleurodeles waltl</i> adultos.....	Página 131

Expression patterns of Pax6 and Pax7 in the Adult Brain of a Urodele Amphibian, <i>Pleurodeles waltl</i>	Página 133
5. Resumen de los resultados y discusión general	Página 171
Resumen de resultados.....	Página 173
Discusión general.....	Página 181
-Consideraciones metodológicas.....	Página 181
-Pax y CBPs en la regionalización y diferenciación funcional del SNC de anfibios urodelos: integración sensorial y motora.....	Página 181
-Pax6 y el desarrollo de sistemas sensoriales.....	Página 185
-Pax6 y Pax7 en el sistema fotoneuroendocrino.....	Página 186
-Migraciones de células Pax+ en el SNC.....	Página 188
-Implicación de Pax6 y Pax7 en la proliferación y diferenciación neuronal en el SNC de varias especies de anfibios urodelos.....	Página 193
-Pax7 en la regeneración del encéfalo adulto.....	Página 195
-Bibliografía.....	Página 195
6. Conclusiones	Página 203
7. Summary (resumen en inglés)	Página 207
8. Agradecimientos	Página 213
9. Anexos	Página 217

1. Introducción general

- **Los anfibios urodelos**
- **El sistema nervioso central de vertebrados**
- **Proteínas ligantes de calcio**
- **La familia génica Pax**
- **Objetivos y metodología**



Los anfibios urodelos

Biología de anfibios urodelos

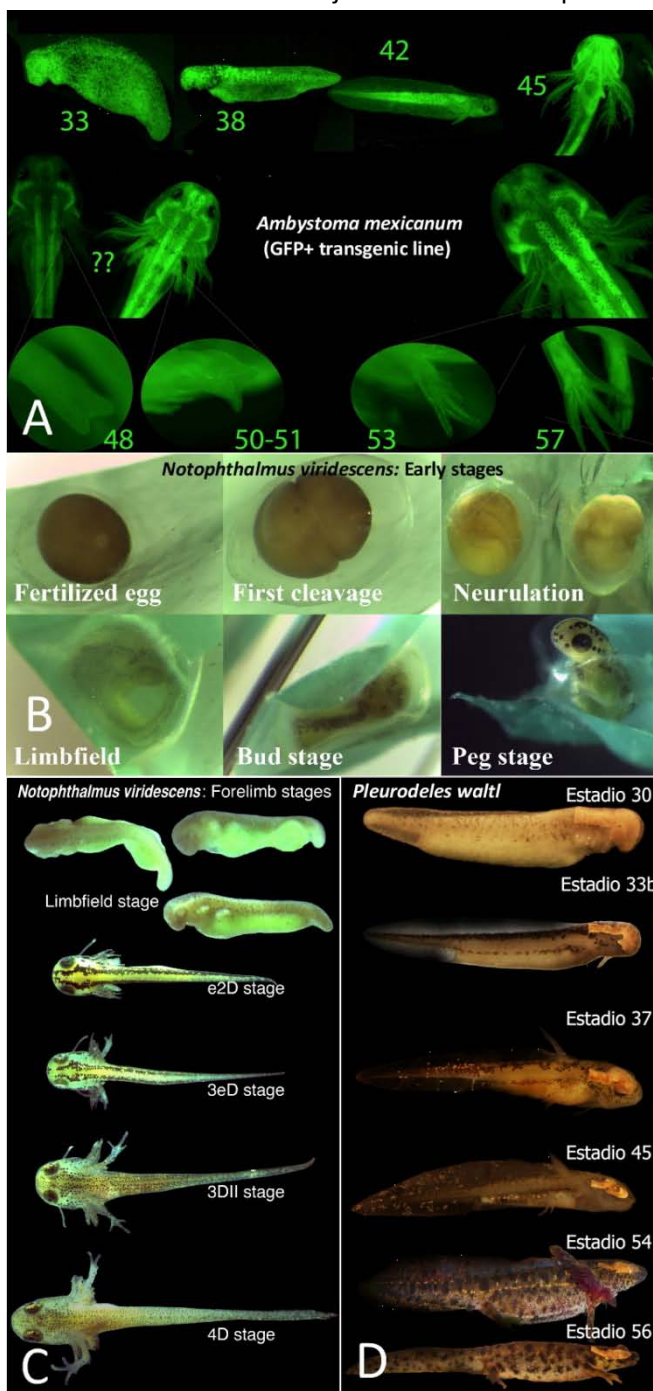
Comúnmente conocidos como salamandras y tritones, la gran mayoría de representantes del orden Caudata (o Urodela) presentan un ciclo biológico bifásico típicamente anfibio (Duellman y Trueb, 1986), en el que un gran número de huevos anamnios es depositado en el agua, donde las larvas se desarrollan como depredadores voraces, para sufrir luego una profunda transformación (la metamorfosis) que les lleva a colonizar el medio terrestre, el nicho ecológico en el que alcanzan la madurez, y desde donde volverán al agua para reproducirse de nuevo (“segunda metamorfosis”) (Duellman y Trueb, 1986; Griffiths, 1995; Salvador y García-París, 2001). El potencial evolutivo de los urodelos está íntimamente unido a este ciclo bifásico, aunque las presiones evolutivas han dado lugar a excepciones a esta norma, como los ajolotes (*Ambystoma mexicanum*) o algunas subpoblaciones de tritón alpino (*Triturus alpestris*), que alcanzan la madurez sin pasar por la metamorfosis y por tanto el ciclo biológico se completa en el medio acuático (Duellman y Trueb, 1986; Denoël et al., 2005; Wiens et al., 2005; Bonett y Chippindale, 2006; ~~faet~~ al., 2006). En el extremo opuesto, ciertas subpoblaciones de los géneros *Salamandra* y *Mertensiella* muestran un ciclo adaptado por completo al medio terrestre, en el que las larvas se desarrollan en el interior de las hembras, sobreviviendo gracias al canibalismo intrauterino y dando lugar a un número menor de salamandras en miniatura completamente desarrolladas y adaptadas al medio terrestre (Wake, 1982, 1989; García-París et al., 2003; Buckley et al., 2007; Buckley, 2012).

El paso evolutivo que impulsó a que los vertebrados salieran del agua para colonizar el medio terrestre en el periodo Devónico (hace unos 350 millones de años), se repite simbólicamente en cada generación de anfibios urodelos, que además son los representantes vivos más parecidos al género extinto *Ichthyostega* (Barbadillo, 1987; Griffiths, 1995). A diferencia de los peces de aquel momento, estos anfibios primitivos ya habían desarrollado diversas adaptaciones que les ayudarían en la conquista del medio terrestre: un esqueleto óseo de gran grosor para asumir el aumento de presión, así como la adquisición de las patas para desplazarse y de una

caja torácica que protegiese los órganos internos. Otra ventaja importante fue la capacidad de mover la cabeza de un lado al otro independientemente de su cuerpo, relacionada con nuevos métodos de alimentación y la exploración del nuevo medio (Barbadillo, 1987; Nöllert y Nöllert, 1992; Griffiths, 1995). Asociados a estos cambios morfológicos hacia el modelo tetrápodo, tuvieron que desarrollarse a la par los sistemas neurales que subyacen en el funcionamiento de las nuevas estructuras: mejoras en el sistema espinal de locomoción e inervación de las patas, así como una posible reorganización que adaptase la recepción de estímulos ya presente en el medio acuático a las exigencias ecológicas del medio terrestre (desarrollo de áreas encefálicas específicas y aumento de complejidad en los territorios conservados) (García-París, 1985; Diesener y Reichholf, 1986; Barbadillo, 1987; Nöllert y Nöllert, 1992; Griffiths, 1995; Salvador y García-París, 2001).

El desarrollo ontogénico de los urodelos ha sido estudiado en profundidad, y ha sido clasificado en tablas de desarrollo en base a la aparición de caracteres morfológicos externos y a la adquisición de comportamientos estereotipados (Glaesner, 1925; Gallien y Durocher, 1957; Armstrong y Malacinski, 1989; Bordzilovskaya et al., 1989; Khan y Liversage, 1995; Shi y Boucaut, 1995; Nye et al., 2003; Wong y Liversage, 2005). Los diferentes estadios pueden agruparse en tres grandes periodos: una primera etapa embrionaria (hasta la eclosión), una etapa larvaria inicial, y un periodo activo de la larva, que es marcado por el inicio de la alimentación (ver figura 1 y anexo 1). A lo largo del desarrollo embrionario se desarrollan los sistemas sensoriales relacionados con la mecanorrecepción y quimiorrecepción (Roberts et al., 1983), y los patrones básicos de locomoción estereotipada se van sucediendo para culminar en la natación (Coghill, 1929; Soffe et al., 1983; Bekoff, 1985). Ya antes de la eclosión se pueden reconocer a ambos lados de la cabeza tres ramas branquiales, y, antes de ellas, un apéndice filamentoso llamado balancín que utilizan para adherirse a las distintas superficies, y que desaparece pronto (Figura 1). Durante la etapa larvaria inicial, las larvas perfeccionan el sistema visual y de línea lateral, y la respuesta de escape asociada a estímulos visuales y mecánicos, aunque suelen permanecer en reposo. Por detrás de las branquias plumosas aparecen las extremidades anteriores, que al contrario que en anuros se desarrollan antes que las posteriores (García-París, 1985; Diesener y Reichholf, 1986; Barbadillo, 1987; Nöllert y Nöllert, 1992; Griffiths,

1995; Salvador y García-París, 2001). Al final de este periodo, las larvas comienzan a atrapar mediante mecanismos de succión pequeños objetos en movimiento que pasan por delante de ellas sin realizar una búsqueda activa de los mismos (observaciones personales). La etapa activa larvaria se puede dividir a su vez en temprana y tardía, en base a la aparición secuencial de caracteres externos y al aumento de complejidad en los métodos de búsqueda y obtención de alimento (ver anexo 1). El uso de la olfacción se pone de manifiesto en la etapa activa tardía, cuando las larvas comienzan a alimentarse también de objetos inmóviles después de



olfatearlos. La fase larvaria concluye con la metamorfosis, proceso durante el cual se reabsorben las branquias plumosas y las crestas cutáneas (Figura 1). También tienen lugar cambios en la estructura de la piel, en los órganos sensoriales, y en los aparatos circulatorio y respiratorio. La duración del desarrollo embrionario y larvario es específica de especie y depende de factores ambientales (temperatura de agua, alimento, grosor de las larvas, densidad poblacional y química del agua) (Griffiths, 1995; Eagleson y McKeown, 1978; ten Donkelaar, 1998). Generalmente, los adultos se alimentan de pequeños invertebrados (tanto en el medio acuático como en el medio terrestre), así como pequeños vertebrados y sus puestas, que reconocen mediante el uso combinado de los sistemas visual, olfativo (Martin et al., 1974) y línea lateral (Griffiths, 1995).

Los anfibios urodelos como modelo animal de experimentación

Los urodelos han sido ampliamente utilizados como modelo animal de experimentación en el último siglo, y fueron de gran valor en la descripción y el conocimiento creciente del desarrollo temprano de vertebrados (Spemann, 1921; Spemann y Mangold, 1924; Holtfreter, 1933; Boucaut, 1979; Duprat, 1982; Eagleson, 1996). Los motivos de su éxito como modelo radican parcialmente en el gran tamaño de sus numerosos embriones, su relativamente fácil manipulación y su lento desarrollo externo (y la posibilidad de manipular la tasa de crecimiento mediante la temperatura), que permiten analizar fácilmente todos los estadios clave del desarrollo ontogénico (Duprat, 1996; Eagleson, 1996; Nieuwkoop, 1996; Gualandris-Parisot et al., 2001).

Figura 1. Clasificación de los estadios larvarios en base a características externas de diferentes especies de anfibios urodelos ampliamente utilizadas como modelo animal de experimentación. **A**, El ajolote mejicano (*Ambystoma mexicanum*) es una especie neotónica que en el presente cuenta con diversas líneas transgénicas, como los de la imagen, que expresan la proteína verde fluorescente bajo un promotor ubicuo (Laboratorio de Elly Tanaka, Max Plank Institut, Dresde). **B**, **C**, El tritón americano del Este (*Notophthalmus viridescens*) ampliamente utilizado en estudios regenerativos (Laboratorio de Andras Simon, Karolinska Institutet, Estocolmo). **D**, El gallipato (*Pleurodeles waltl*) es una especie presente en la península ibérica y norte de África, muy común en laboratorios de todo el mundo debido a su fácil manutención, y sus hábitos principalmente acuáticos (Laboratorio de Agustín González, UCM, Madrid).

Además, el gran tamaño de sus neuronas y sus células neuroendocrinas (Eagleson, 1996), junto con su extraordinario potencial regenerativo (Ferretti, 1996; Mitashov, 1996; Chernoff, 2003; Parish et al., 2007; Kragl et al., 2009), la ausencia de rechazo en trasplantes (Eagleson, 1996; Nacu et al., 2009) y la simplificación secundaria que caracteriza su sistema nervioso (Roth et al., 1992, 1993), han hecho de los urodelos un modelo emergente (en particular en el estudio del desarrollo y regeneración del sistema nervioso) en laboratorios de todo el mundo (Eagleson, 1996; Brockes y Kumar, 2005; Voss et al., 2009; Kirkham et al., 2011; Maden et al., 2013). A esto hay que añadir la reciente disponibilidad de animales transgénicos (Sobkow, 2006; Khattak et al., 2009; Kragl et al., 2009; Hayashi et al., 2013) y el uso de nuevas herramientas genéticas en la caracterización del sistema nervioso central, que están permitiendo un avance sin precedentes en el campo de la neurociencia, siendo los anfibios urodelos el animal modelo protagonista de innovadores estudios en el campo de la medicina regenerativa en todo el mundo (Parish et al., 2007; Nacu y Tanaka 2011; Hayashi et al., 2013; Maden et al., 2013).

El sistema nervioso de los anfibios urodelos

El encéfalo de urodelos ha sido considerado como representante del patrón básico del cerebro de tetrápodos, aunque su organización simplificada de neuronas, debido a la escasa migración radial da lugar a una densa capa de sustancia gris en la que los núcleos y otras estructuras anatómicas pueden ser reconocidas a lo sumo como condensaciones locales (Herrick 1927, 1948, Kicliter y Ebbesson 1976, Fritzsich y Himstedt 1980, Northcutt y Kicliter, 1980; Marín et al., 1997a,b, ten Donkelaar, 1998; Moreno y González, 2007b). Sin embargo, en este encéfalo aparentemente tan simple subyace una simplificación secundaria, dando la impresión de que se trata de una estructura menos diferenciada de lo que realmente es (Roth et al., 1992, 1993). Aunque su anatomía es más simple de lo que cabría esperar dada su posición filogenética, se cree que en realidad el encéfalo urodelo evolucionó de un hipotético vertebrado ancestral que poseía un cerebro más complejo (Northcutt 1984, 1987, Roth et al 1992, 1993). Una vez caracterizado adecuadamente, se puede sacar provecho de esta simplificación secundaria que originalmente dificultó su estudio, ya que se ha demostrado que el sistema nervioso de



Figura 2. Morfología externa del cerebro de *Pleurodeles waltl* con las principales regiones, y el sistema ventricular en sombreado.

urodelos representa de forma simple el patrón básico de tetrápodos. En él se distinguen todas las subdivisiones básicas del SNC de vertebrados, así como las regiones principales dentro de cada una de las partes (Figura 2): prosencéfalo secundario (formado por dos bulbos olfativos, el telencéfalo y el hipotálamo), diencéfalo (prosómeros 1, 2 y 3), mesencéfalo, tronco encefálico (istmo y rombencéfalo) y médula espinal (Moreno y González, 2007a; Morona y González, 2008, 2009). Basándonos en la posición relativa y el empaquetamiento de los cuerpos neuronales, es posible distinguir cuatro zonas en el SNC de urodelos adultos: de la superficie apical (en contacto con el ventrículo) a la lámina basal (hacia las meninges), por definición, la zona ventricular se compone de células que están en contacto con el líquido cefalorraquídeo, la adyacente zona subventricular se compone de una o dos filas de células densamente empaquetadas, mientras que las células se encuentran más dispersas en la zona del manto, y muy aisladas en la zona de fibras (Figura 3). Estas cuatro zonas coinciden con aquellas descritas a mediados del siglo XX: zona ependimaria o periventricular, zona subependimaria, gris central y sustancia blanca, respectivamente (Herrick, 1948).

Estudios realizados en las últimas décadas han permitido caracterizar con relativa precisión las principales zonas del SNC de los urodelos. Principalmente se han basado en estudios de la organización neuroquímica de los distintos sistemas sensoriales, así como el análisis de su conectividad, tanto en el adulto como en el desarrollo (González y Smeets, 1991; González et al., 1995; Moreno et al., 2002; López et al., 2003; Marín et al., 2007a,b; Moreno y González, 2007a; Morona y González,

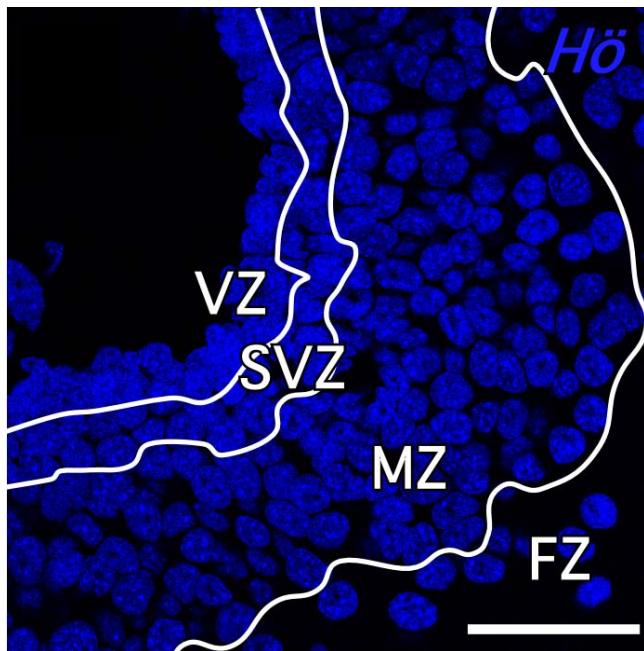


Figura 3. Tinción de núcleos en una sección transversal telencefálica de *Pleurodeles waltl* adulto que pone de manifiesto las diferentes zonas a lo largo del eje mediolateral. Abreviaturas: VZ: zona ventricular; SVZ: zona subventricular; MZ: zona del manto; FZ: zona de fibras. Escala: 100µm.

2008, 2009). Así hoy tenemos un conocimiento bastante detallado de los principales componentes presentes en las distintas regiones encefálicas, que se consideran para todos los grupos de vertebrados:

Prosencéfalo secundario

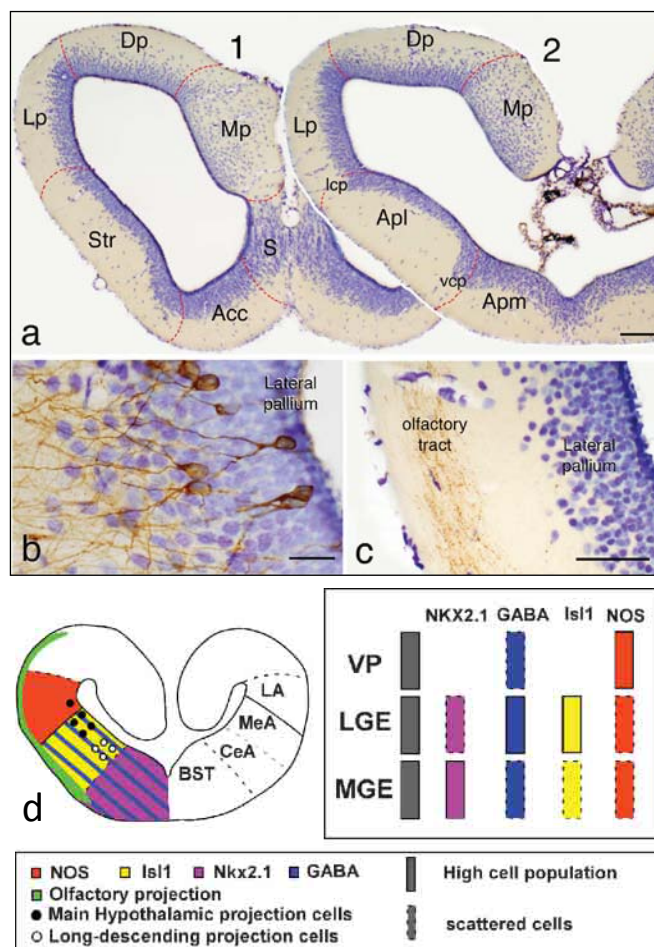
Los **bulbos olfativos** son dos evaginaciones rostrales de los hemisferios telencefálicos que secundariamente forman los bulbos olfativos principales y accesorios. El bulbo principal recibe información olfativa, mientras que el accesorio (carente de ventrículo) recibe información del órgano vomeronasal (ten Donkelaar, 1998). Sus células se encuentran agrupadas en varias capas concéntricas (Northcutt y Kicliter 1980). Se han descrito diversos neurotransmisores: neuronas dopaminérgicas en varias de las láminas, en una posición intermedia entre amniotas y anamniotas (González y Smeets, 1991; Corio et al., 1992), así como células y fibras nitrérgicas (Porteros et al., 1996; Moreno et al., 2002), y fibras serotoninérgicas que alcanzan los bulbos olfativos (Fasolo et al., 1986; Corio et al., 1992; Clairambault et al., 1994).

En los hemisferios telencefálicos se distingue una región palial y otra subpalial. La **región palial** consta de palio medial, dorsal, lateral, (Northcutt y Kicliter,

1980) y ventral (Moreno y González 2007a,b). El *palio medial* es la región que presenta mayor tamaño y migración, y ha sido comparada con el hipocampo de mamífero (Herrick, 1948). El *palio dorsal* está restringido al borde más dorsal del hemisferio telencefálico, y se continúa con el *palio lateral*, cuya zona más cercana a la transición palio-subpalio ha sido caracterizada como *palio ventral*, donde se sitúa la amígdala lateral (Moreno y González 2007a). En cuanto a la neuroquímica, además de las neuronas glutamatérgicas que caracterizan el palio de vertebrados (Villar-Cerviño et al., 2011), el palio de urodelos presenta células nitrérgicas (Moreno et al., 2002), así como inervación serotoninérgica (Fasolo et al., 1986; Corio et al., 1992; Krug et al., 1993; Clairambault et al., 1994) y dopaminérgica (González y Smeets, 1991; González et al., 1995; Corio et al., 1992). Además, neuronas aisladas inmunorreactivas para GABA han sido descritas en las porciones dorsal y medial del palio (Franzoni y Morino, 1989; Naujoks-Manteuffel et al., 1994), así como algunas neuronas nitrérgicas aisladas en el palio dorsal, medial y lateral, en contraposición con el denso neuropilo que caracteriza el palio ventral (Moreno y González, 2007a).

En las zonas de **transición palio-subpalio** se encuentran estructuras que en otros vertebrados han sido caracterizadas genoarquitectónicamente por su origen mixto palial y subpalial: el septo en la región medial (Puelles et al. 2000; Moreno et al., 2010) y el complejo amigdalino en la región lateral (Moreno y González, 2007b). El origen mixto del complejo amigdalino ha sido demostrado en urodelos (Moreno y González, 2007a), pero no hay datos acerca del posible origen dual del septo en anfibios urodelos. Clásicamente, el *septo* es un complejo que se ha dividido en septo lateral, septo medial y banda diagonal de Broca (Northcutt y Kicliter 1980, ten Donkelaar, 1998). Tanto el septo medial como la banda diagonal de Broca presentan células nitrérgicas (Moreno et al., 2002), y células gabaérgicas han sido descritas en el septo medial y lateral (Naujoks-Manteuffel, 1994). En una posición lateral, entre el palio y el estriado, se encuentran las diferentes subdivisiones del *complejo amigdalino*, caracterizadas por la expresión diferencial de NOS, GABA, Nkx2.1, Isl-1 y su patrón de conexiones (Figura 4): amígdala lateral (ventropalial), amígdala central (estriatal) y amígdala medial (de origen subpalial) (Moreno y González 2007a).

Figura 4: a. Secciones transversales rostral (1) y caudal (2) en el hemisferio telencefálico de *P.waltl* mostrando con una tinción Nissl con violeta de Cresilo su apariencia general, así como las principales regiones. b. Detalle del palio lateral en una sección en la cual algunas neuronas fueron marcadas retrógradamente con BDA desde el palio medial, mostrando la morfología común de los somas en la capa periventricular y las arborizaciones dendríticas extendiéndose hacia la capa de fibras superficial. c. Fotografía del palio lateral en la que se aprecian fibras marcadas con BDA desde el bulbo olfativo en el tracto olfativo, localizado en la capa de fibras periféricas. d. Subdivisiones del complejo amigdalino en base a patrones de expresión génica y de conexiones. Abreviaturas: Acc, núcleo accumbens; Apl, amígdala pars lateralis; Apm, amígdala pars medialis; BST, núcleo del lecho de la estría terminal; CeA, amígdala central; Dp, palio dorsal; LA, amígdala lateral; Lcp, prominencia celular lateral; LGE, eminencia ganglionar lateral; Lp, palio lateral; MeA, amígdala medial; MGE, eminencia ganglionar medial; Mp, palio medial; Pa, pallidum; S, septo; Str, estriado; vcp, prominencia celular ventral; VP, palio ventral. Escalas: 200µm(a), 50µm (b), 100µm (c). Modificado de Moreno y González, 2007a.



En la **zona subpalial**, además de los componentes subpaliales del septo y el complejo amigdalino ya referidos en el párrafo anterior, se encuentra la región de los ganglios basales, donde se ha descrito la presencia de ChAT, GABA, sustancia P y enkefalina (Taban y Cathieni, 1983; Naujoks-Manteuffel et al., 1994; López et al., 2003). Los ganglios basales están formados por derivados palidales y estriales, y cuentan con diferentes agrupaciones celulares: en el tercio rostral de la pared ventromedial del hemisferio telencefálico se encuentra el *núcleo accumbens*, que se caracteriza por el patrón de inervación catecolaminérgica (Marín et al., 2007a). Caudalmente se continúa con el *estriado*, que contiene interneuronas gabaérgicas, nitrérgicas y colinérgicas, células Isl-1+, células sustancia P+, y recibe inervación serotonérgica, noradrenérgica y dopaminérgica (Taban y Cathieni, 1983; Fasolo et al., 1986; Dubé et al., 1990; González y Smeets, 1991; Corio et al., 1992; Marín et al., 1997a; López et al., 2003; Moreno et al., 2002; Moreno y González, 2007a). El polo anterior del *pálido ventral* se extiende rostralmente en la región medial situándose subyacente al núcleo accumbens, mientras que el *pálido dorsal* se extiende más caudalmente (Marín et al. 2008). Los derivados palidales son positivos para Nkx2.1 (González et al., 2002a) y presentan células colinérgicas y gabaérgicas (López et al., 2003; Moreno y González, 2007a; Moreno et al., 2009).

El **telencéfalo impar** es la porción del telencéfalo no evaginado que se continúa con el hipotálamo, y se corresponde con el área preóptica, de naturaleza subpalial (clásicamente incluida en el hipotálamo) (revisado en Moreno y González, 2011). Se encuentra topográficamente caudal a las comisuras palial y anterior. En anfibios el área preóptica ha sido caracterizada recientemente por la expresión ventricular de Shh y Nkx2.1, subventricular de Nkx2.1 y Isl1, la ausencia de Otp (Domínguez et al., 2013), y la presencia de células dopaminérgicas (González y Smeets, 1991) y gabaérgicas (Naujoks-Manteuffel, 1994), así como fibras serotonérgicas y gabaérgicas (Fasolo et al., 1986; Franzoni y Morino, 1989). El área preóptica contiene neuronas que extienden una de sus prolongaciones entre las células ventriculares, donde se forman terminales en contacto con el líquido cefalorraquídeo (Arnold, 1968; Vigh-Teichmann et al., 1970; González y Smeets, 1991, 1994). Además, contiene tanto células inmunorreactivas para sustancia-P como células vasotocina y mesotocina (González y Smeets, 1992; Taban y Cathieni, 1983).

En el **hipotálamo** de anfibios se ha caracterizado una región alar (áreas supraoptoparaventricular y

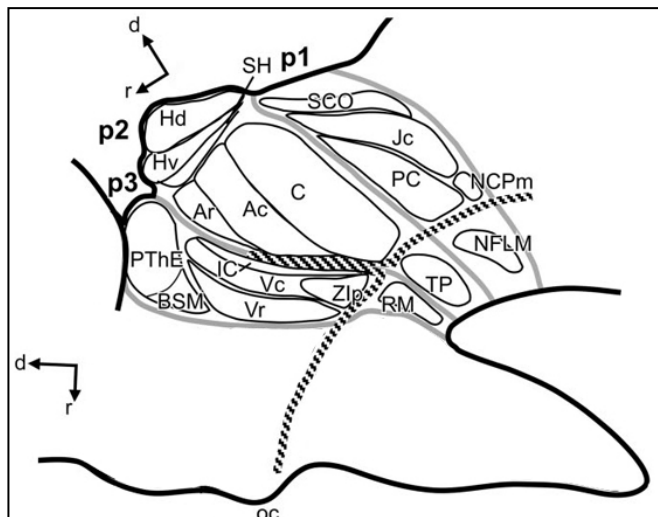


Figura 5. Interpretación del diencéfalo de urodelos y sus principales subdivisiones según el modelo prosomérico. Abreviaturas: Ar: núcleo anterior rostral; Ac: núcleo anterior caudal; BSM: núcleo del lecho de la estría medular; C: núcleo anterior central; Hd: habénula dorsal; Hv: habénula ventral; IC: núcleo intercalado; Jc: núcleo yuxtacomisural; NCPm: núcleo de la comisura posterior magnocelular; NFLM: núcleo intersticial del fascículo longitudinal medial; oc: quiasma óptico; PC: núcleo precomisural; PThE: eminencia pretalámica; sco: órgano subcomisural; SH: zona subhabenular; Tp: tubérculo posterior; Vr: zona ventrorostral; Vc: zona ventrocaudal; Zip: núcleos periventricular de la zona incerta (modificado de Morona y González, 2008).

supraquiasmática) y otra basal (región tuberal y banda mamilar) (Moreno y González, 2011; Domínguez et al., 2013). En otros vertebrados, el hipotálamo alar se caracteriza por la expresión de los factores de transcripción *Sim1*, *Otp* y varios miembros de la familia génica *Dlx* (Medina, 2008), e incluye los núcleos paraventricular, supraóptico y supraquiasmático (Domínguez et al., 2013). El hipotálamo basal se caracteriza por la expresión de *Shh* y *Nkx2.1*, e incluye los núcleos relacionados clásicamente con el receso infundibular (Moreno y González, 2011; Domínguez et al., en preparación). En cuanto a neuroquímica, se han descrito neuronas gabaérgicas dispersas por todo el hipotálamo (Naujoks-Manteuffel, 1994), grupos catecolaminérgicos en el tubérculo posterior, y en los núcleos supraquiasmático y paraventricular (González y Smeets, 1991), células colinérgicas en el núcleo supraquiasmático (López et al., 2003), y serotonérgicas en la región lateral infundibular y en el núcleo del órgano periventricular (Lowry et al., 1996).

Por otra parte, la **hipófisis** o glándula pituitaria es un órgano neuroendocrino subdividido en adenohipófisis, región intermedia y neurohipófisis. La adenohipófisis se encuentra íntimamente relacionada con la eminencia media, que junto con el lóbulo neural forman la neurohipófisis. Tanto la neurohipófisis como la eminencia media se encuentran bajo control hipotalámico a través del tracto hipotálamo-hipofisario (ten Donkelaar, 1998). La región intermedia y la neurohipófisis contienen fibras catecolaminérgicas (Franzoni et al., 1986; Corio et al., 1992), gabaérgicas (Franzoni y Morino, 1989; Artero et al., 1994), y peptidérgicas (Corio et al., 1990; Leon-Olea et al., 1991).

La **paráfisis** es un órgano telencefálico, ya que se sitúa rostralmente al velo transversal, que clásicamente marca el límite entre telencéfalo y diencéfalo. Se trata de una glándula tubular formada por una pared neuroepitelial no estratificada y rodeada por tejido conectivo y sinusoides, que separa el líquido cefalorraquídeo del torrente sanguíneo (Brokheurst, 1979). Está situada adyacente al plexo coroideo del tercer ventrículo (Warren, 1905; Kappers et al., 1950).

Diencéfalo

El diencéfalo consta de tres segmentos (denominados caudorostralmente prosómeros 1-3; p1-3), cuyas porciones alares han sido redefinidas en los últimos años como pretecho (**p1**), tálamo (**p2**, clásicamente tálamo dorsal) y pretálamo (**p3**, clásicamente tálamo ventral). Sus regiones basales contribuyen a constituir lo que se ha denominado tegmento diencefálico prerubral. Los derivados de la placa del techo diencefálico son la eminencia pretalámica (p3), el epitálamo (compuesto por la habénula y la epifisis, en p2) y el órgano subcomisural (p1) (Figura 5).

Si tenemos en cuenta la flexura del tubo neural, p3 es el primer segmento que limita rostralmente con el prosencéfalo secundario, y caudalmente con p2. La **eminencia pretalámica** se considera hoy en día un derivado de la placa del techo (Puelles et al., 2002), y presenta entre otras células nitrérgicas (Moreno et al., 2002). El **pretálamo** ha sido subdividido en los núcleos ventrorostral y ventrocaudal en base a la expresión de proteínas ligantes de calcio (Morona y González, 2008), mientras que en la zona basal ha sido identificada la **región retromamilar** (Morona y González, 2008).

La **epífisis** es un órgano sacular a menudo en contacto con el tercer ventrículo, que consta de fotorreceptores, neuronas y células de soporte. La **habénula** es una estructura asimétrica en urodelos (tanto morfológica como neuroquímicamente), que ha sido relacionada con diversas funciones, entre otras ha sido implicada en la regulación de la orientación y patrones locomotores (ten Donkelaar, 1998). Recibe fibras serotoninérgicas (Fasolo et al., 1986), y contiene células colinérgicas (López et al., 2003) y positivas para sustancia-P (Taban y Cathieni, 1986). Además sus subdivisiones dorsal y ventral pueden visualizarse fácilmente por la tinción diferencial de calbindina y calretinina (Morona y González, 2008). El **tálamo** propiamente dicho (porción alar de p2) ha sido dividido en base a su genoarquitectura, hodología y neuroquímica en núcleos anteriores y posteriores (Puelles et al., 2000; Morona y González, 2008). En la porción basal se localiza el **tubérculo posterior** (ten Donkelaar, 1998; Morona y González, 2008), que contiene células dopaminérgicas (González et al., 1995).

En vertebrados, la placa del techo de p1 forma el **órgano subcomisural**, una estructura glandular altamente conservada en la evolución formada por células endimarias y subependimarias, que secretan glicoproteínas al ventrículo que o bien se disuelven en el líquido cefalorraquídeo, o se agregan para formar la fibra de Reissner. Aunque su función exacta es desconocida, se ha relacionado con el mantenimiento del flujo del líquido cefalorraquídeo, su limpieza/purificación y con procesos morfogenéticos (Rodríguez et al., 1998; Pérez-Fígares et al., 2001). En la parte alar de p1, el **pretecho** ha sido subdividido en los núcleos preteccionales, comisural y yuxtacomisural. Funcionalmente, ha sido relacionado con distintos comportamientos y reflejos guiados por estímulos visuales (ten Donkelaar, 1998). En la zona basal de p1 ha sido identificado el **tegmento preteccional** (Morona y González, 2008).

Mesencéfalo

El mesencéfalo de los anfibios urodelos es pequeño y esencialmente tubular, y en él se distingue una parte alar, y una parte basal en la que se encuentran diversos núcleos del tegmento mesencefálico (Morona y González, 2009). Se trata de una zona difícil de interpretar debido a la forma de cuña derivada del mayor crecimiento de la zona alar y la flexura cefálica, justo rostral a este segmento.

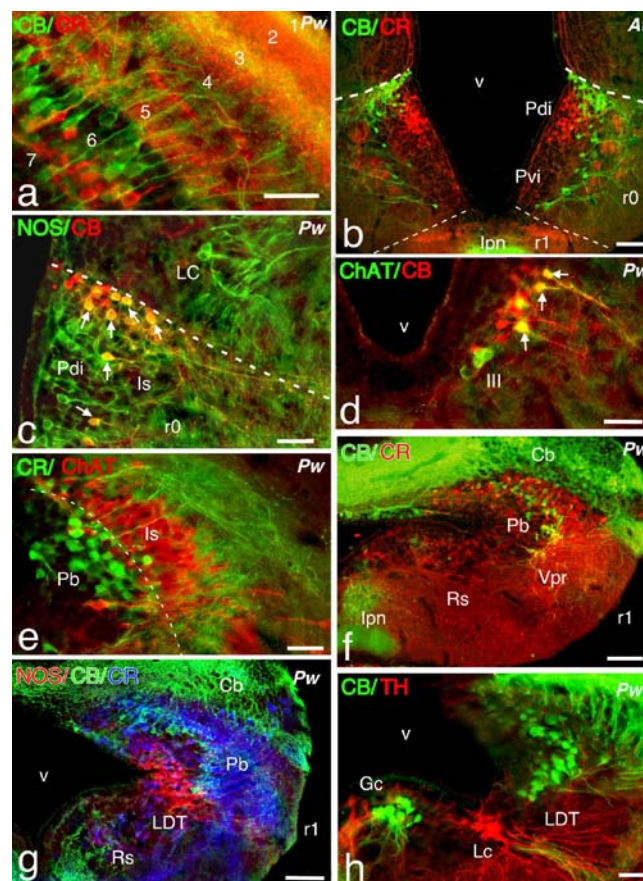


Figura 6. Inmunohistoquímica combinada del tronco cerebral de anfibios urodelos mostrando (a) el techo óptico, (b,c) el tegmento ístmico, (d) el núcleo oculomotor, (e) el núcleo del Istmo y el área parabraquial, (f,g,h) diversas estructuras de r1: cerebelo, área parabraquial, núcleo principal del trigémino, núcleo reticular superior, griseum centrale, núcleo laterodorsal tegmental, núcleo interpeduncular. Abreviaturas: At: *Ambystoma tigrinum*; Cb: cerebelo; Gc: griseum centrale; III: núcleo oculomotor; lpn: neuropilo del núcleo interpeduncular; Is: núcleo del istmo; Lc: locus coeruleus; LC: núcleo mesencefálico laterocaudal; LDT: núcleo laterodorsal tegmental; Pb: área parabraquial; Pdi: núcleo tegmental posterodorsal, parte ístmica; Pvi: núcleo tegmental posterodorsal, parte ístmica; Pw: *Pleurodeles waltli*; r0: istmo; r1: rombómero 1; Rs: núcleo reticular superior; v: ventrículo; Vpr: núcleo sensitivo principal del trigémino. Escalas: 50µm (c,d,e,h), 100µm (a,b,f,g) (Morona y González, 2009).

Estas particularidades llevaron a una mala interpretación de los límites del cerebro medio en anfibios, y durante mucho tiempo se incluyeron dentro del mesencéfalo ciertos núcleos situados en el tegmento preteccional (placa basal de p1) e ístmico (placa basal de r0) (Opdam y Nieuwenhuys, 1976). Sin embargo, estudios posteriores basados en marcadores moleculares han permitido una interpretación más correcta de los diferentes núcleos

dentro del modelo actual de organización del mesencéfalo vertebrado (Díaz et al., 2000; Morona y González, 2009). En urodelos se han caracterizado en base a datos hodológicos y a la distribución de CB y CR las tres zonas alares típicas de vertebrados (griseum tectale, techo óptico y torus semicircularis), y las dos últimas se han propuesto como homólogas al colículo superior y al colículo inferior de mamíferos, respectivamente (Morona y González, 2009).

El **techo óptico** es una estructura laminada en 9 capas (Figura 6). En las capas 6-9 se encuentra el núcleo mesencefálico del nervio trigémino, las capas 4-5 son la vía eferente del techo, y las capas 1-3 reciben aferencias de la retina (Roth et al., 1990). El techo está implicado en la integración de la información multimodal, y ha sido principalmente relacionado con comportamientos de captura de presas y huída frente a depredadores (Ewert, 1984). Contiene células nitrérgicas y gabaérgicas (Naujoks-Manteuffel et al., 1994; Moreno et al., 2002), así como fibras dopaminérgicas distribuidas en capas concretas (González et al., 1995). El **torus semicircularis** en urodelos es una estructura casi inapreciable (en relación con las escasas capacidades auditivas de estos animales), se trata de un engrosamiento en la pared del mesencéfalo que se continúa lateralmente con el techo mesencefálico, y ha sido implicado en el procesamiento de señales auditivas y vibratorias. Se caracteriza por la ausencia de células gabaérgicas (Naujoks-Manteuffel et al., 1994). En cuanto a la **griseum tectale**, sigue el patrón descrito para anfibios, reptiles y aves (Morona y González 2009).

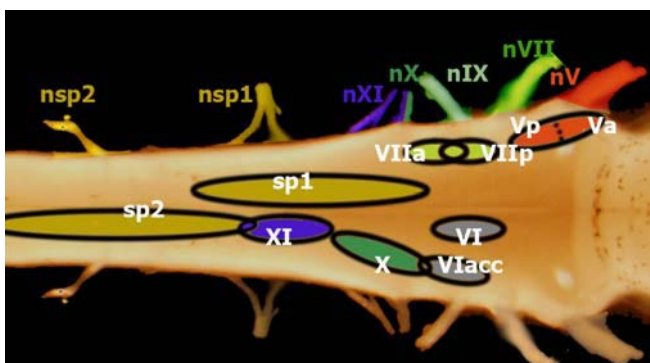


Figura 7. Relación topológica de los nervios craneales (en colores) y sus núcleos motores de origen (letras en blanco) en el rombencéfalo y médula cervical de urodelos (*P.waltl*). Abreviaturas: *n*: nervio; *IX*: glossofaríngeo; *sp*: espinal; *V*: trigémino; *VI*: abducens; *VII*: facial; *X*: vago; *XI*: accesorio del vago.

El **tegmento mesencefálico** en urodelos está formado por una capa de células periventriculares donde se han distinguido en la zona medial los núcleos oculomotor y de Edinger-Westphal, así como un núcleo rojo lateralmente situado en la parte basal. Dorsalmente se sitúan en la zona periventricular los núcleos tegmentales anteroventral, anterodorsal, posterodorsal y posteroventral. Limitando con el segmento ístmico se localiza el núcleo laterocaudal (Sánchez-Camacho et al., 2001; Morona y González, 2009). Se han caracterizado células dopaminérgicas y nitrérgicas en el tegmento mesencefálico (González y Smeets, 1991; González et al., 1995; Moreno et al., 2002). El tegmento participa, junto a otras formaciones, en la generación de respuestas motoras, integración multisensorial, y como estación de relevo a regiones talámicas. El núcleo tegmental dorsal procesa información vestibular (Manteuffel y Naujoks-Manteuffel, 1990).

Istmo

Recientemente se ha demostrado que el límite istmo-mesencefálico es oblicuo, aunque en las secciones transversales clásicas se había incluido dentro del mesencéfalo el istmo y parte del tegmento rombencefálico rostral. La tinción con CB y CR destaca la curva del límite istmo-mesencefálico (Morona y González, 2009). Además, mediante experimentos de doble marcaje con ChAT se ha comprobado que **r0** es oblicuo y curvado, y la demarcación de esta región como un segmento irregular (biconvexo en sección horizontal y curvo en sección sagital) ha proporcionado una nueva interpretación de diversos grupos que habían sido localizados erróneamente (Figura 6): así se ha descrito y delimitado la porción ístmica de los núcleos tegmentales posterodorsal y posteroventral (Morona y González 2009). El segmento ístmico contiene el núcleo del istmo en su parte alar y otros grupos celulares en su parte tegmental como la formación reticular ístmica y el núcleo troclear, de naturaleza colinérgica (López et al., 2003). El núcleo del istmo presenta células colinérgicas (López et al., 2003) y está ampliamente conectado con el techo (Marín y González, 1999).

Rombencéfalo

El rombencéfalo se sitúa en la parte caudal del tronco del encéfalo, rodeando el cuarto ventrículo. Las paredes son gruesas con un marcado surco de His

que en gran medida separa las placas alar y basal. La **placa alar** del rombencéfalo recibe todas las fibras sensitivas de la cabeza, del sistema de la línea lateral, área vestibuloauditiva, gustativas y viscerosensoriales (ten Donkelaar, 1998). En la **placa basal** se encuentran los núcleos motores de los nervios craneales, controlando la función motora de cabeza y cuello, incluyendo los movimientos de la boca y la lengua relacionados con la alimentación (ten Donkelaar, 1998; López et al., 2003; Morona y González, 2009) (Figura 7).

Los nervios craneales III-XII tienen su origen en el tronco encefálico (figura 7), aunque los núcleos oculomotor (III) y troclear (IV) se encuentran en el tegmento mesencefálico e ístmico, respectivamente. Los núcleos descritos en el rombencéfalo de los anfibios (V-XII) se distribuyen en cuatro columnas y, al contrario que en otros vertebrados, no sufren muchos fenómenos de migración a segmentos adyacentes, lo que facilita su interpretación. Además, los anfibios adultos mantienen un patrón segmental larvario en el eje rostrocaudal y en la ordenación lateromedial de los núcleos de los nervios craneales (López et al., 2003; Straka et al. 2006; Morona y González, 2009).

Dentro del rombencéfalo, mediante la ayuda de los patrones de expresión de las proteínas ligantes de calcio calbindina y calretinina, se ha reinterpretado la porción rostral de **r1** (Figura 6) incluyendo en este segmento rombencefálico el núcleo tegmental laterodorsal (inmunoreactivo para NOS y ChAT; Moreno et al., 2002; López et al., 2003), el locus coeruleus (dopaminérgico; González y Smeets, 1991; González et al., 1995), el área parabraquial, el núcleo interpeduncular y las regiones reticulares adyacentes (Morona y González, 2009). El **cerebelo** es un derivado del labio rómbico en la placa alar del rombencéfalo rostral (Aroca y Puelles, 2005; Watson, 2012). Consta de dos lóbulos auriculares pares situados por encima del área octavolateral en la región lateral y del cuerpo del cerebelo, en envuelve el mesencéfalo caudal en la región medial (ten Donkelaar, 1998). En el cerebelo coexisten dos tipos neuronales: las células granulares y las grandes células de Purkinje, que expresan GABA (Franzoni y Morino, 1989; Naujoks-Manteuffel et al., 1994). Los axones de las primeras y las dendritas de las segundas se encuentran en la capa molecular, que continúa caudalmente con el neuropilo superficial del área octavolateral (Larsell, 1967; Nieuwenhuys, 1967). El cerebelo posee una discreta inervación

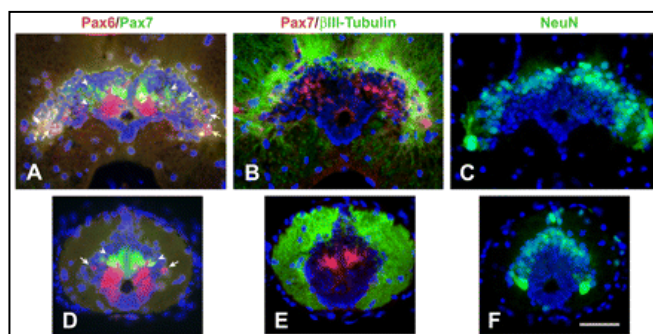


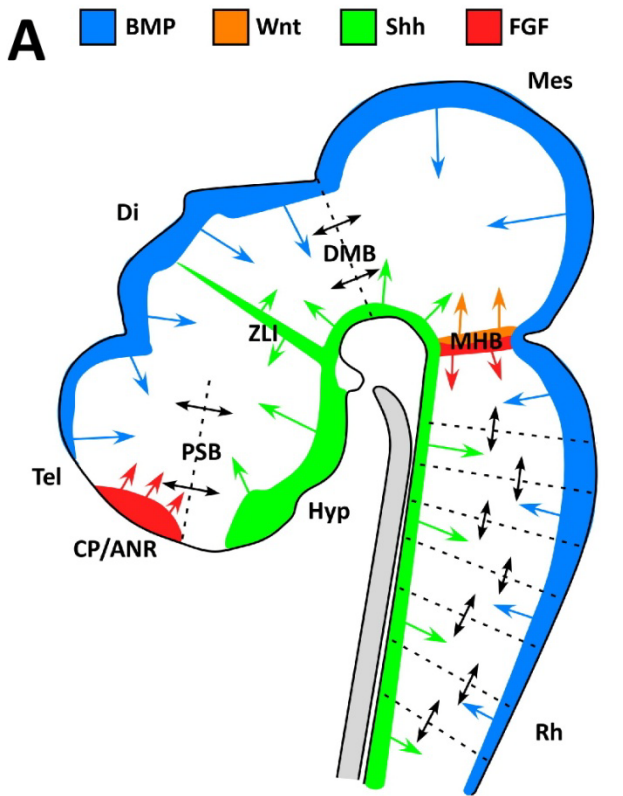
Figura 8. Médula espinal torácica (A,B,C) y caudal (D, E, F) de un adulto de ajolote, *Ambystoma mexicanum*, teñida mediante inmunohistoquímica para Pax6, Pax7 y marcadores neuronales (NeuN y βIII-Tubulina). Tomado de Mchedlishvili et al., 2007.

serotonérgica (Clairambault et al., 1994) y noradrenérgica (González y Smeets, 1991).

A lo largo de todo el rombencéfalo (**r1-8**) y médula espinal, mediante técnicas inmunohistoquímicas ha sido posible la caracterización de grupos serotonérgicos en el rafe (Fasolo et al., 1986), nitrérgicos en la formación reticular, núcleo descendente del trigémino, y núcleo del tracto solitario (Moreno et al., 2002), gabaérgicos en la gris central y zona alar (Naujoks-Manteuffel et al., 1994), células dopaminérgicas en el núcleo del tracto solitario, núcleo de la columna dorsal y en la base de la médula espinal (González y Smeets, 1991; González et al., 1995) y los núcleos colinérgicos de los nervios motores (López et al., 2003).

Médula espinal

La médula de los anfibios urodelos es la porción del SNC más conservada, se extiende a lo largo de todo el canal vertebral, y se encuentra macroscópicamente especializada de acuerdo a la estructura esquelética del animal. Presenta dos dilataciones denominadas intumescencia cervical (o braquial) y lumbar que se sitúan a la altura de las raíces de los nervios que inervan las extremidades superiores e inferiores, respectivamente. En secciones transversales, aunque la sustancia gris de la médula de anfibios urodelos no muestra la forma de H típica de vertebrados terrestres sino que es de apariencia ovalada y compacta, la terminología de vertebrados es aplicable (Figura 8). Las **astas dorsales** constan principalmente de neuronas de pequeño tamaño no agrupadas ni en láminas ni en campos diferenciados. Ventralmente a ésta y dorsal a las motoneuronas colinérgicas se encuentra la **zona in-**



termedia que contiene numerosos elementos funiculares y comisurales, con células de pequeño y mediano tamaño que extienden sus dendritas casi exclusivamente a la sustancia blanca. Las **astas ventrales** contienen numerosas células de gran tamaño que proyectan ventrolateralmente para inervar las fibras musculares esqueléticas (ten Donkelaar, 1998; López et al., 2003).

El sistema nervioso central (SNC) de vertebrados

Origen embriológico del SNC, regionalización y modelo neuromérico

Los primeros eventos que dan forma al encéfalo de vertebrados (segmentación, proliferación, neurogénesis, migración, axonogénesis y sinaptogénesis) tienen un denominador común, y es que están regulados por patrones de expresión génica altamente dinámicos (Puelles y Ferran, 2012). Debido a la interacción ente gradientes espaciotemporales de diferentes morfógenos (Figura 9A) provenientes de los organizadores primarios (como BMPs, Wnt, Shh, ácido retinóico) y a las cascadas de expresión génica producidas subsecuentemente en los organizadores secundarios (en especial de factores de transcripción y sus moléculas reguladoras), la neurulación y posterior diferenciación del encéfalo en desarrollo se producen en un orden espaciotemporal característico, de

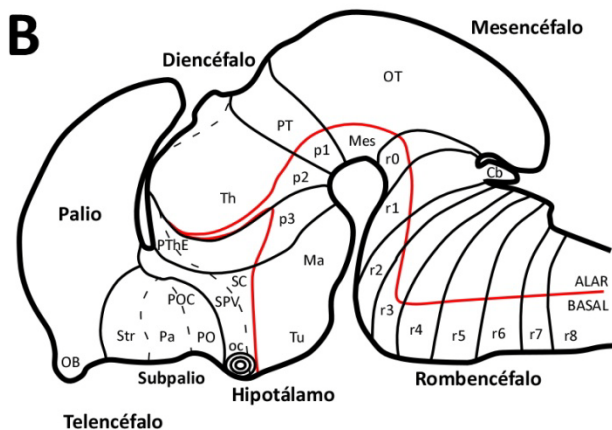
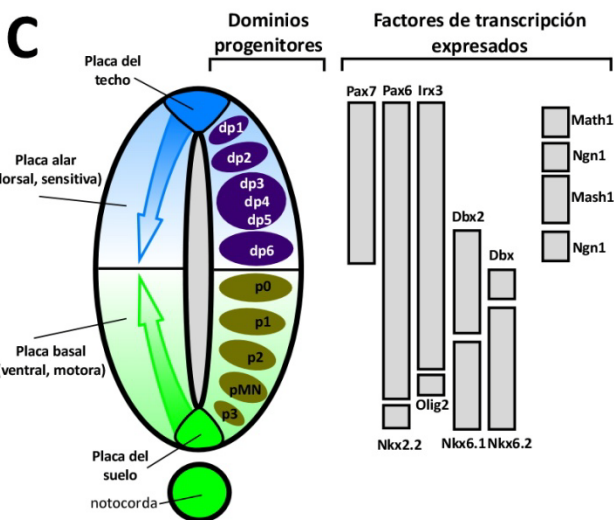


Figura 9. A. En una visión lateral del tubo neural se han representado los organizadores secundarios y sus influencias morfogenéticas mediante flechas que representan la distribución de moléculas señal (modificado de Kiecker y Lumsden, 2009) Abreviaturas: CP/ANR: *placa cortical/cresta neural anterior*; Di: *diencephalo*; DMB: *límite diencephalo-mesencephalo*; Hyp: *hipotálamo*; MHB: *límite mesencephalo-rhombencephalo*; Mes: *mesencephalo*; PSB: *límite palio-subpalio*; Rh: *rhombencephalo*; Tel: *telencephalo*; ZLI: *zona limitante intratalámica*. **B.** Esquema de las principales subdivisiones del encéfalo vertebrado (modificado de Medina., 2008). Abreviaturas: Cb: *cerebelo*; Ma :*mamilar*; Mes: *mesencephalo*; OB: *bulbo olfativo*; oc: *quiasma óptico*; OT: *techo óptico*; p1-3: *prosómeros 1-3*; Pa: *pálido* ; PO: *área preóptica*; POC: *área preópticomisural*; PT: *pretecho*; PTh: *pretálamo*; PThE: *eminencia pretalámica*; r0: *istmo*; r1-8 *rhombómeros 1-8*; SC: *región supraquiasmática*; SPV: *área supraoptoparaventricular*; Str: *estriado*. **C.** Generación de un código espacial de factores de transcripción en la médula espinal de vertebrados, en respuesta a los gradientes de morfógenos (azul:BMPs; verde: Shh); la expresión combinada de estos factores de transcripción sirve para definir dominios progenitores específicos (modificado de Allan, 2009).



manera que mientras las regiones más caudales del tubo neural ya se han cerrado y empiezan a diferenciarse, el polo rostral continúa cerrándose y creciendo, y se repliega para formar la flexura cefálica (Liem et al., 2000; Megason y McMahon, 2002; López et al., 2003; Wilson y Houart, 2004; Dessaud et al., 2007; Eom et al., 2011; Balaskas et al., 2012; Puelles y Ferran, 2012). En el eje anteroposterior del tubo neural en formación, diferencias en la proliferación, migración y adhesión celular orquestadas por conjuntos de genes específicos de cada región conducen a la formación de segmentos neurales o neurómeros (Orr, 1887; Puelles y Ferran, 2012), dando lugar los más rostrales al encéfalo vertebrado (Figura 9A). Centrándonos en esta región, inicialmente se producen tres vesículas conocidas como prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Puelles et al., 2004; Wilson y Houart, 2004). Posteriormente, el prosencéfalo se subdivide en dos vesículas: la más rostral, el prosencéfalo secundario, dará lugar al telencéfalo (la porción dorsal del prosencéfalo secundario se expande formando el telencéfalo par, habitualmente la región de mayor tamaño en el encéfalo de vertebrados adultos), y al hipotálamo, mientras que la más caudal, el diencéfalo, se compone de tres neurómeros, llamados prosómeros p1, p2 y p3. El mesencéfalo mantiene su identidad, y el rombencéfalo se subdivide en el istmo (r0) y los rombómeros r1-8, siendo considerado el cerebelo una evaginación de r1. Caudalmente se encuentra la médula espinal (Figura 9B) (Kuhlenbeck, 1973; Puelles y Rubenstein, 1993, 2003; Puelles et al., 2004). Al mismo tiempo, fenómenos de inducción neural llevados a cabo por numerosos factores genéticos actúan subdividiendo el tubo neural longitudinalmente en cuatro regiones, que de dorsal a ventral se denominan placa del techo, placa alar, placa basal y placa del suelo (Figura 9C) (Kuhlenbeck, 1973; Puelles et al., 2004; Wilson y Maden, 2005).

Con el objetivo de entender cada vez mejor el SNC de vertebrados, una nueva perspectiva impera en la neuroanatomía comparada del siglo XXI: las subdivisiones del encéfalo están siendo reinterpretadas desde un punto de vista evolutivamente conservado, y las estructuras definidas recientemente son objeto de estudios comparativos (especialmente entre vertebrados). Una de las principales herramientas utilizadas en neuroanatomía comparada es el análisis genoarquitectónico, mediante el cual cada dominio progenitor se caracteriza por la expresión de una combinación única de genes reguladores del desarrollo, que a menudo es común en las distintas clases de vertebrados (Puelles y Rubenstein, 1993, 2003; Moreno et al., 2004; 2008a, b; 2010; Ferran et al., 2009; Pombal et al., 2009; Medina et al., 2011; Morona et al., 2011; Puelles y Ferran, 2012). Estos dominios codificados genómicamente a menudo representan áreas neuroepiteliales que producen tipos celulares concretos, cuyos límites no son absolutos, ya que dependen de fenómenos epistáticos (como la distancia a un

determinado organizador) y de la comunicación célula-célula (Puelles y Ferran, 2012). Además, hay una dimensión temporal que hay que tener presente: los fenómenos dinámicos locales dan lugar a situaciones de equilibrio parcial o transitorio de diferenciación molecular y morfológica hacia un estado cada vez más diferenciado (Puelles y Ferran, 2012).

Así, la disposición final de núcleos y neurotransmisores concretos deriva de esas combinaciones únicas de genes

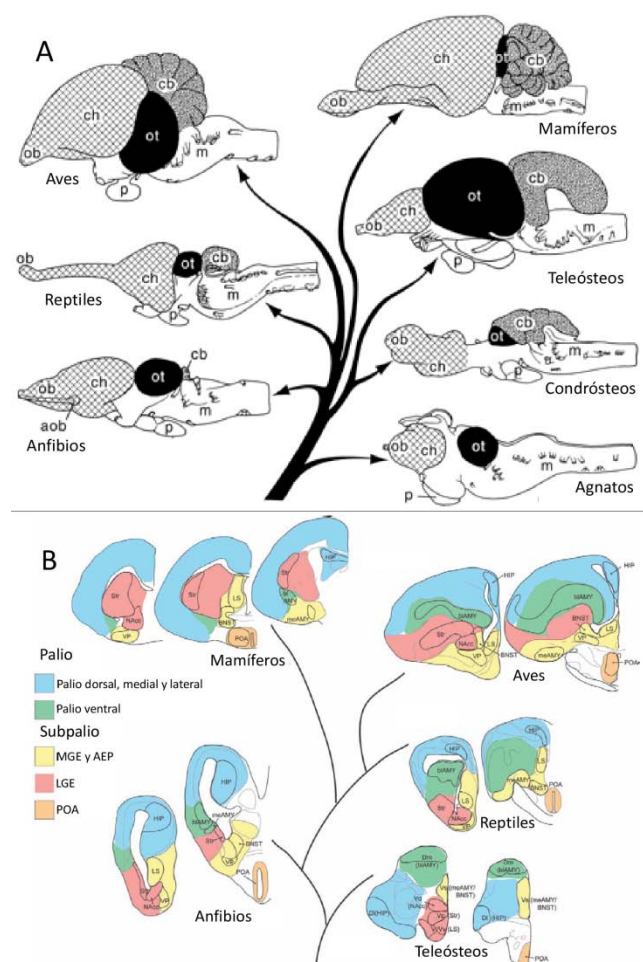


Figura 10. A. En una vista lateral del encéfalo de diversos grupos de vertebrados se aprecia el tamaño relativo de las diferentes partes. (telencéfalo y bulbo olfativo: rombos; techo óptico: negro; cerebelo: gris; hipotálamo, diencéfalo, y médula oblonga: blanco). Modificado de Braun y Northcutt, 1999. Abreviaturas: aob: *bulbo olfativo accesorio*; cb: *cerebelo*; ch: *hemisferios cerebrales*; m: *médula oblonga*; ob: *bulbo olfativo*; ot: *techo óptico*; p: *glándula pituitaria*. **B.** Las estructuras telencefálicas relacionadas con el sistema mesolímbico de recompensa en los diferentes vertebrados sirven como ejemplo para mostrar las diferencias en posición relativa, tamaño y conectividad de los diferentes compartimentos. Modificado de O'Connell y Hoffmann, 2011. Abreviaturas: AEP: *área entopeduncular*; LGE: *eminencia gangliónica lateral*; MGE: *eminencia gangliónica medial*; POA: *área preóptica*.

reguladores a lo largo del tiempo (Prakash y Wurst, 2006; Löhr et al., 2009; Magno et al., 2012; Chakrabarty et al., 2012; Evans et al., 2012), que influyen en la formación del encéfalo en términos de tamaño, posición topológica relativa y conectividad de los diferentes compartimentos (Puelles y Ferran, 2012) (Figura 10). En consecuencia, los patrones de expresión que pueden ser objeto de estudios genoarquitectónicos son los de aquellos genes que codifican para factores de transcripción, o bien para proteínas relacionadas con procesos de diferenciación (enzimas de síntesis o transporte de neurotransmisores, proteínas de adhesión y de comunicación celular) y que son activados/reprimidos siguiendo patrones restringidos espaciotemporalmente en respuesta a regiones reguladoras del genoma (Puelles y Ferran, 2012). Un modelo neuromérico basado en patrones de expresión génica es el principal marco que ayuda a entender las características comunes y específicas pertenecientes a los cerebros de especies tan diferentes como lampreas, pollos y ratones (Pombal y Puelles, 1999; Puelles et al., 2000).

La validez del modelo prosomérico/neuromérico para comparar cerebros entre diferentes clases ha sido avalada por numerosos estudios realizados en un amplio espectro de especies de vertebrados (*mamíferos*: Puelles et al., 2000; Puelles y Rubenstein, 2003; Remedios et al., 2004; *aves*: Puelles et al., 2000; Abellán y Medina 2008; 2009; *reptiles*: Dávila et al., 2000; Pritz y Ruan, 2009; Moreno et al., 2012; *anfibios*: Bachy et al., 2001; 2002; Brox et al., 2003; 2004; Moreno et al., 2004, 2008a; Morona y González, 2008, 2009; *peces*: Kage et al., 2004; Rodríguez-Moldes, 2009; 2011; López et al., 2012). Este conocimiento creciente ayuda en la comprensión de los mecanismos moleculares de la especificación cerebral durante la evolución de vertebrados, y dado que la morfogénesis es el resultado de diversos procesos histogénéticos, el estudio genoarquitectónico comparado de diversos grupos animales a lo largo del desarrollo pone de manifiesto los mecanismos subyacentes en la formación y modelado del complejo cerebro adulto (Kimmel, 1993; Puelles y Ferran, 2012). En conjunto, de todos estos estudios se puede extrapolar un patrón de organización básico que es común para todas las especies analizadas hasta la fecha, aunque cada grupo tiene sus peculiaridades.

Últimos avances en neuroanatomía comparada: marcadores evolutivamente conservados

En neuroanatomía comparada, los avances técnicos han llevado a caracterizar bioquímicamente un gran número de subpoblaciones celulares en base a la expresión de diversos factores de transcripción, neurotransmisores y otras proteínas que se encuentran evolutivamente conservadas (como ciertas enzimas de síntesis de neurotransmisores), lo que ha resultado de gran utilidad en la búsqueda de homología y en la comprensión de la evolución del sistema nervioso. Estas estructuras

homólogas pueden ser utilizadas como puntos de referencia en el análisis de nuevos patrones de expresión génica, al mismo tiempo que ponen de manifiesto las relaciones a menudo existentes entre los distintos marcadores.

En el presente estudio, hemos analizado durante el desarrollo la distribución de las proteínas ligantes de calcio **calbindina D-28K** y **calretinina** para facilitar la interpretación neuromérica del cerebro urodelo en desarrollo, debido a que ponen de manifiesto subdivisiones no reconocibles con métodos clásicos, y sus patrones de expresión han sido previamente analizados en adultos en un contexto neuromérico (Morona y González, 2008; 2009). Además, hemos estudiado durante el desarrollo y en adultos el patrón de expresión de los factores de transcripción **Pax3**, **Pax6** y **Pax7**, ya que se trata de marcadores altamente conservados cuya expresión ha sido descrita en subpoblaciones cerebrales de todos los grupos de vertebrados (Stoykova y Gruss, 1994; Kawakami et al., 1997; Wulliman y Rink, 2001; Bachy et al., 2002; Moreno et al., 2008a; Pritz y Ruan, 2009; Rodríguez-Moldes et al., 2011; Duan et al., 2012; Ferreiro-Galve et al., 2012a,b). Para completar la visión neuromérica del cerebro de urodelos, hemos empleado de forma combinada otros factores de transcripción cuya expresión ha sido utilizada previamente en otros modelos para caracterizar ciertas subdivisiones, como **Nkx2.1**, que marca la eminencia ganglionar medial y sus derivados palidales, y ha sido utilizado para poner de manifiesto el área preóptica y diversos grupos hipotalámicos (Puelles et al., 2000; Bachy et al., 2002; González et al., 2002a,b; Moreno et al., 2007b; van den Akker et al., 2008; Abellán y Medina, 2009; Moreno et al., 2010, 2012; Domínguez et al., 2013; Quintana-Urzaínqui et al., 2012a). El factor de transcripción **Nkx2.2**, fue seleccionado por su utilidad en la regionalización del diencefalo y su relación con el límite alar-basal en respuesta a Shh (Price et al., 1992; Puelles y Rubenstein, 1993; Ericson et al., 1997; Briscoe et al., 1999; Briscoe et al., 2000; Vieira et al., 2005; Vue et al., 2007; Kataoka y Shimogori, 2008; Ferran et al., 2009; Domínguez et al., 2011). **Nkx6.1** se expresa de forma altamente conservada en regiones basales y ha sido utilizado en un contexto prosomérico en otros vertebrados (Puelles et al., 2001; Zhao et al., 2007; Abellán y Medina, 2009; Prakash et al., 2009; Moreno-Bravo et al., 2010; Dichmann y Harland, 2011; Lorente-Cánovas et al., 2012). El factor de transcripción ortopedia (**Otp**) ha sido utilizado previamente como marcador de ciertos grupos hipotalámicos, amigdalinos y rombencefálicos (Simeone et al., 1994; Schwarz et al., 1999; Lin et al., 1999; Wang y Lufkin, 2000; Ju et al., 2004; Aroca et al., 2006; Bardet et al., 2008; Blechman et al., 2007; Medina et al., 2011; Domínguez et al., 2013; Lorente-Cánovas et al., 2012; Moreno et al., 2012). Asimismo, hemos empleado como marcadores anatómicos altamente conservados ciertos neurotransmisores (ácido γ -aminobutírico, **GABA**; serotonina, **5-HT**) y enzimas relacionadas con la síntesis de

acetilcolina, óxido nítrico y dopamina (colina acetiltransferasa, **ChAT**; óxido nítrico sintasa, **NOS**; tirosina hidroxilasa, **TH**), cuya expresión ya había sido descrita previamente en urodelos (Naujoks-Manteuffel et al., 1984; Fasolo et al., 1986; Franzoni y Morino, 1989; González y Smeets, 1991; González et al., 1995; Marín et al., 1997a,b; Moreno et al., 2002; López et al., 2003; Moreno y González, 2007a), lo que permite una interpretación anatómica inequívoca en el marco evolutivo.

Proteínas ligantes de calcio

La calbindina-D28k (CB) y la calretinina (CR) pertenecen a la familia de proteínas ligantes de calcio (CBPs) que se caracterizan por poseer uno o más pares de dominios hélice-lazo-hélice o “manos EF” (Figura 11). Esta secuencia aminoacídica presenta una alta afinidad por los iones Ca^{2+} y fue identificada por primera vez en la parvalbúmina (Christakos et al., 1987; Persechini et al., 1989). La CB, con una masa molecular de 28 KDa, fue hallada y purificada por primera vez en el intestino de pollo (Wasserman et al., 1966), más tarde se comprobó su expresión en otros tejidos y en regiones específicas del cerebro, donde se han llevado a cabo estudios más precisos sobre su papel específico en la homeostasis neuronal del Ca^{2+} . La CR tiene una masa de 30kDa y su secuencia posee un 60% de homología con la CB, pero su localización es exclusivamente neuronal (Rogers, 1987; Parmentier, 1990). A pesar de su elevada homología, sus dominios aminoacídicos tienen distinta organización, lo cual puede reflejar diferencias evolutivas y funcionales para adaptarse a diferentes dianas y de hecho, han sido conservadas separadamente a lo largo de la evolución en todos los tetrápodos (Rogers et al., 1990; Palczewska et al., 2003).

Funciones de las proteínas ligantes de calcio en el SNC de vertebrados

Las funciones que les han sido asignadas, están relacionadas principalmente con la fisiología neuronal. Se ha sugerido que la fracción asociada a membrana podría actuar como sensor y transductor de la señal de Ca^{2+} (Mattson et al., 1991; Leathers y Norman, 1993; Hubbard y McHug, 1995; Burgoyne y Weiss, 2001; Berggard et al., 2002). Por otra parte, actúan como tamponadores de Ca^{2+} , y pueden limitar o redistribuir el Ca^{2+} intracelular modulando la excitabilidad neuronal, por lo que ambas CBPs podrían tener un papel excitoprotector durante periodos prolongados de actividad (Volpe et al.,

1988; Baimbridge et al., 1992). En enfermedades neurodegenerativas, los sistemas que contienen CBPs parecen ser más vulnerables y tener una notable implicación estas patologías (Iacopino y Christakos, 1990; Heizmann y Braun, 1992; Bu et al., 2003). De forma similar, en la médula espinal se ha relacionado con procesos anormales de sensibilidad al dolor, como la alodinia y la hiperalgesia. Sin embargo, los últimos estudios las relacionan especialmente con la regulación de la señal pre y postsináptica y la plasticidad en dendritas (Vecellio et al., 2000; Schwaller et al., 2002; Cheron et al., 2004).

Expresión de las proteínas ligantes de calcio en el SNC de vertebrados y su utilidad en neuroanatomía comparada

Debido a su distribución citosólica mayoritaria, estas proteínas confieren un marcaje inmunohistoquímico de toda la célula (similar a las impregnaciones de los métodos de Golgi) que permiten estudiar, aparte de su distribución en el cerebro, la morfología de las células que las contienen, sus terminaciones dendríticas, posibles proyecciones y campos terminales, por lo que han sido de gran utilidad en estudios neuroanatómicos.

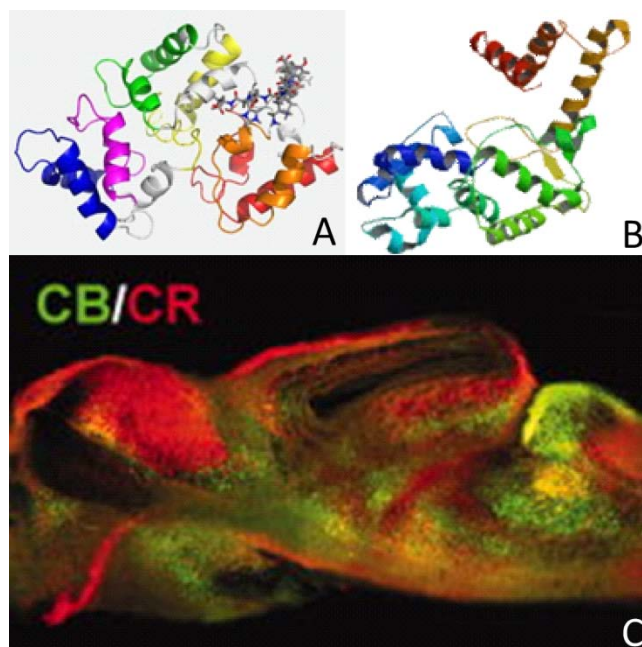


Figura 11. Estructura de las proteínas ligantes de calcio calbindina-D28k (arriba, izquierda, www.dddmag.com) y calretinina (arriba, derecha, www.uscnk.com), que han sido utilizadas en la interpretación prosomérica del cerebro de anfibios adultos y durante el desarrollo en el anuro *Xenopus laevis* (Morona y González, 2013).

Los primeros trabajos realizados en mamíferos describen sistemáticamente la distribución de estas proteínas a lo largo de todo el sistema nervioso central (Enderlin et al., 1987; Celio, 1990; Rogers et al., 1990; Resibois y Rogers, 1992). Posteriormente se emplearon como marcadores de ciertas subpoblaciones neuronales y para poner en evidencia la coherencia entre diferentes núcleos, sus límites y delinear subdivisiones que no son observables mediante otros métodos en diversas especies de vertebrados (Rodríguez-Moldes et al., 1990; Pombal y Puelles, 1999; Bryant et al., 2000; Dávila et al., 2000; Díaz-Regueira y Anadón, 2000; Soares et al., 2001). La CB y la CR presentan una distribución muy extendida en el cerebro de los vertebrados, que es específica para cada una de ellas. Sin embargo, estos patrones de inmunorreactividad se solapan parcialmente, y algunas subpoblaciones neuronales contienen ambas proteínas a la vez (Rogers y Resibois, 1992). En general, los patrones de inmunorreactividad de ambas proteínas muestran características conservadas pero en muchos territorios encefálicos presentan patrones muy específicos en las diferentes especies estudiadas y, por tanto, su utilidad como marcadores se ve condicionada al análisis cuidadoso de sus distribuciones en cada una de estas especies. La mayor parte de los trabajos se han llevado a cabo en mamíferos donde su distribución ha sido mejor detallada y ha servido de base para estudios posteriores, incluidos estudios recientes en anfibios (Figura 11) (Morona y González, 2008; 2009; 2013).

Aunque existen diferencias interespecíficas en la distribución de células que expresan CB y CR que impiden el establecimiento de homologías, ambas proteínas han sido utilizadas como marcadores anatómicos en el encéfalo de vertebrados debido a su amplia distribución (García-Segura et al., 1984; Rodríguez-Moldes et al., 1990; Dávila et al., 2000; Ulfing, 2002; Castro et al., 2006a,b; Morona y González, 2008; 2009; 2013; Graña et al., 2012; 2013). Los datos referentes a urodelos están restringidos a individuos adultos, y facilitan un punto de vista neuromérico del encéfalo adulto (Morona y González, 2008, 2009). En el cerebro anterior, la distribución de CB y CR muestra patrones característicos que facilitan la discriminación clara de diversos grupos telencefálicos e hipotalámicos: la CR es muy abundante en los bulbos olfativos, palio dorsal y ventral, amígdala lateral y medial, región supraquiasmática, hipotálamo mamilar y tuberal, y está presente también en menor medida en el

núcleo accumbens, regiones septales, palidales y estriatales, y área preóptica. La CB es detectada en menor medida en los bulbos olfativos, núcleo accumbens, palio ventral, estriado rostral, pálido, territorios amigdalinos, área preóptica, núcleo supraquiasmático y región tuberal, además de poner de manifiesto junto con la CR el fascículo telencefálico lateral (Morona y González, 2008). Las CBPs también resaltan los segmentos diencefálicos y subdivisiones dentro de ellos: la CB es escasa en p3, muy abundante en la habénula dorsal y en los núcleos anteriores talámicos (p2 alar), y relativamente abundante en los núcleos pretectales en p1, además de marcar el fascículo retroflejo, límite entre p1 y p2. La CR en p3 marca el núcleo intercalado, en p2 está presente en los núcleos talámicos antero-caudal, central, y en el tubérculo posterior, mientras que en p1 marca subpoblaciones en los núcleos pretectales y el núcleo del fascículo longitudinal medial (Morona y González, 2008). En el tronco encefálico la tinción de CB y CR en combinación con otros marcadores pone de manifiesto los segmentos que lo componen, así como la organización longitudinal dentro de cada uno de ellos. El griseum tectale se caracteriza por una menor reactividad para CB y CR que las zonas adyacentes, en el techo se encuentran principalmente en células de las capas 6 y 8, y en las fibras ópticas. El torus muestra poca reactividad, y en el tegmento mesencefálico se distinguen tres bandas, pobladas por diferentes núcleos inmunorreactivos (anterodorsal, posterodorsal, núcleo rojo, de Edinger Wesphal y el oculomotor) (Morona y González, 2009). A continuación, el segmento ístmico se pone de manifiesto por la escasa reactividad para CB en su región alar y la expresión diferencial de CB y CR en la parte ístmica de los núcleos posteroventral y posterodorsal. En el cerebelo la CB marca las células de Purkinje, y respecto al sistema octavolateral, la CR en las vías de mecanorrecepción de la línea lateral y del componente auditivo del nervio octavo, mientras que la CB está relacionada con información vestibular. Por último, la CB marca el neuropilo del núcleo interpeduncular, y ambas CBPs están presentes siguiendo un patrón segmental parcialmente solapado en el rafe, la gris central y la formación reticular (Morona y González, 2009).

La familia génica Pax

La familia Pax apareció muy temprano en la evolución de los animales, donde un hipotético gen

ancestral Pax sufrió duplicaciones, pérdidas y mutaciones en repetidas ocasiones, y sus funciones (en un principio redundantes) se fueron diversificando acompañadas por la expansión de diferentes elementos reguladores, hasta alcanzar la variedad de miembros e isoformas presentes hoy en día en el reino animal (Aburomia et al., 2003; Short y Holland, 2008; Hill et al., 2010; Suga et al., 2010; Holland y Short, 2010; Keller et al., 2010; Wang et al., 2010; Underhill, 2012). Las proteínas codificadas por los miembros de la familia Pax se caracterizan por un motivo dominio de unión al ADN (el dominio par), descrito por primera vez en *Drosophila* (Bopp et al., 1986) y altamente conservado en la evolución (Balczarek et al., 1997; Czerny et al., 1997; Wang et al., 2010). Adicionalmente, varios miembros codifican para un segundo homeodominio de unión al ADN (completo o parcial), y una última secuencia conservada, el octapéptido (Maulbecker y Gruss 1993; Keller et al., 2010). La presencia de estos componentes ha servido para clasificar la familia génica en cuatro grupos (Figura 12A). La primera clase, formada por Pax1 y Pax9, carece de homeodominio y no se expresa en el SNC. Pax3 y Pax7 pertenecen a la segunda clase, la cual codifica el dominio par, el octapéptido y un homeodominio completo. Este grupo se expresa principalmente en células madre del músculo y en regiones medias y caudales del SNC. La tercera clase está formada por Pax2, Pax5 y Pax8, codifican para el dominio par, el octapéptido y un homeodominio parcial, y son importantes en la región ístmica y en la especificación neuronal rombencefálica y espinal. Pax4 y Pax6 fueron incluidos en la cuarta clase, que codifica para el dominio par y el homeodominio pero no el octapéptido, y cuya expresión es fundamental en la formación y mantenimiento de diversas estructuras como los ojos, el páncreas y el telencéfalo (Stuart et al., 1994; Balczarek et al., 1997; Blake et al., 2008; Kang y Krauss, 2010). Por otra parte, se han descrito isoformas en la mayoría de los miembros de la familia génica Pax que han sido asociadas con diferencias en la expresión génica: la actividad transcripcional de las proteínas Pax puede modificarse por diferencias en la especificidad de reconocimiento del ADN, debido a procesamiento alternativo o a la activación de promotores alternativos. Estos procesos finalmente conducen a la existencia de varias isoformas cuya principal diferencia radica en la especificidad de unión del dominio par al ADN, lo que explica la gran variedad de funciones que han sido atribuidas a los distintos

genes Pax (Epstein et al., 1994; Jun y Desplan, 1996; Vogan et al., 1996; Kozmik et al., 1997; Seo et al., 1998; Kay y Ziman, 1998; Vorobyov y Horst, 2004; Kleinjan et al., 2008; Shimizu et al., 2009; Yan et al., 2010; Charytonowicz et al., 2011; Kiselev et al., 2012; Underhill, 2012).

Funciones de los factores de transcripción Pax en el SNC de vertebrados

Los factores de transcripción Pax están relacionados con diversos procesos ontogénicos en metazoos, como reguladores transcripcionales específicos de ciertos tejidos, cuyas funciones son clave en la organogénesis (destino celular y patrones de expresión génica), proliferación celular, migración, hodología, y cuya disfunción produce anomalías (Figura 12B) (Chalepakis et al., 1993; Noll, 1993; Stuart et al., 1994; Wehr y Gruss 1996; Balczarek et al., 1997; Mansouri et al., 1999; Pratt et al., 2000; Stoykova et al., 2000; Chi y Epstein 2002; Haubst, 2004; Sapir et al., 2004; Buckingham y Relaix, 2007; Lang et al., 2007; Métin et al., 2007; Blake et al 2008; Wang et al 2008; Delcroix et al., 2010; Li et al., 2010; Zhang, 2010; Bramswig y Kaestner, 2011). Por otra parte, los factores de transcripción Pax han sido relacionados directamente con diversos procesos regenerativos (revisado en Thompson y Ziman, 2011). Siguiendo un patrón espaciotemporal característico, muchos miembros de la familia génica Pax, como Pax3, Pax6 y Pax7, son expresados en el sistema nervioso central en formación de vertebrados (Stuart et al., 1994; Wehr y Gruss, 1996; Kawakami et al., 1997), dirigiendo y coordinando las respuestas celulares frente a diversos factores, lo que desemboca en la producción de diversos tipos celulares en regiones específicas (Chalepakis, 1993; Stoykova y Gruss, 1994; Tanabe y Jessell, 1996; Osumi et al 1997; Blake et al., 2008). Además, la expresión persiste en ciertos grupos celulares en el SNC de vertebrados adultos, y ha sido relacionada con el mantenimiento de la homeostasis de este complejo tejido (Stoykova y Gruss, 1994; Kukekov et al., 1999; Shin et al., 2003; Duan et al., 2012; Rath et al., 2012), e incluso con mecanismos de reparación de tejido nervioso postraumático, concretamente manteniendo identidad posicional e influyendo en la especificación neuronal y axogénesis en las zonas apropiadas (Mchedlishvilli et al., 2007; Sirko et al., 2009; Winner et al., 2009; Thummel et al., 2010). Aparentemente están relacionados con el

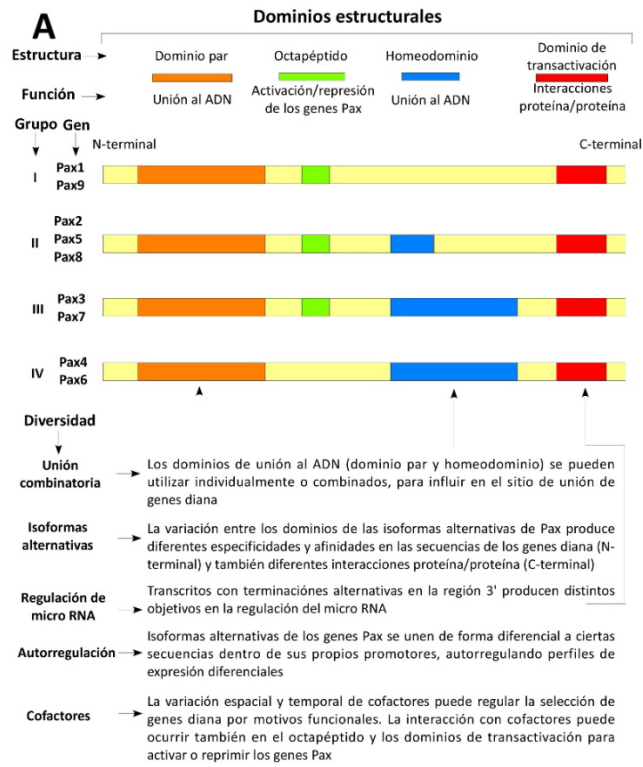
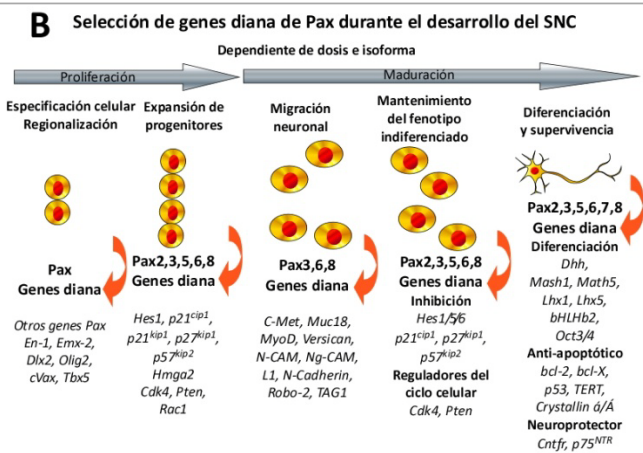


Figura 12. A, Esquema de la estructura de los genes Pax agrupados en subfamilias. Los genes Pax se caracterizan por la presencia de regiones que codifican para un dominio par de unión al ADN y un dominio de transactivación en su extremo C-terminal. Los subgrupos se distinguen en base a la presencia o ausencia de otras regiones estructurales, que codifican para un octapéptido conservado y un homeodominio completo o parcial de unión al ADN. Además, la diversidad de las proteínas Pax aumenta con las diferentes isoformas con distinta especificidad de unión al ADN, y con la regulación alternativa de micro ARN. Mediante el uso individual o combinado de los dominios de unión al ADN, la autorregulación espaciotemporal y la participación de otros cofactores, los diferentes genes diana son seleccionados. **B**, Esquema de las funciones de los genes Pax y sus genes diana en el desarrollo del sistema nervioso central, incluyendo eventos como la regionalización y especificación celular, la expansión de progenitores, migración celular, el mantenimiento del estado indiferenciado, la diferenciación, y el mantenimiento de células diferenciadas mediante mecanismos de supervivencia celular y anti-apoptóticos. Modificado de Thompson y Ziman, 2011.



mantenimiento de nichos de células madre pluripotentes en la madurez, ya que en vertebrados adultos han sido descritos tanto en subconjuntos de poblaciones celulares de diversos tejidos caracterizadas como células progenitoras, como en subpoblaciones de células nerviosas maduras capaces de responder a señales ambientales (Chi y Epstein, 2001; Thompson et al., 2004; 2007; 2008; Thomas et al., 2006; Blake et al., 2008; Fedstova et al., 2008; Matsumoto y Osumi, 2008).

Expresión de los factores de transcripción Pax en el SNC de vertebrados y su utilidad en neuroanatomía comparada

Dada la importancia de los factores de transcripción Pax en los procesos ontogénicos del

encéfalo de vertebrados, varios miembros han sido utilizados como marcadores de regiones específicas, tanto en estudios centrados en regiones concretas como en el análisis general del plan de construcción del cerebro como un todo (Figura 13). Como ejemplos, Pax3, Pax6 y Pax7 han servido para desentrañar la organización tripartita del pretecho (Ferran et al., 2008; 2009; Morona et al., 2011; Merchán et al., 2011), así como la organización dorsoventral y anteroposterior del tubo neural y el cerebro en formación en diversas clases de vertebrados (Stoykova y Gruss, 1994; Puelles et al., 2000; Murakami et al., 2002; Rodríguez-Moldes et al., 2011). A continuación se presenta la expresión de Pax descrita en varios grupos de vertebrados en orden rostrocaudal.

Además de su presencia en la formación y mantenimiento de órganos receptores primarios (órganos olfativos y ojos) (Walther y Gruss, 1991; Ashery-Padan y Gruss, 2001; Hartmann et al., 2003; Nomura et al., 2007; Guo et al., 2010), Pax6 es el miembro cuya expresión se extiende más rostralmente en el encéfalo de vertebrados, tanto en el desarrollo como en individuos adultos (Stuart et al., 1994; Kawakami et al., 1997; Duan et al., 2012). Pax3 y Pax7 se expresan en el cerebro en regiones más caudales, evitando territorios telencefálicos (Stoykova y Gruss, 1994; Kawakami et al., 1997). En el telencéfalo, Pax6 se expresa desde etapas tempranas

en diversas estructuras: bulbo olfativo, palio, estriado dorsal, amígdala y parte del septo (Stoykova y Gruss, 1994; Hauptmann y Gerster, 2000; Puellles et al., 2000; Murakami et al., 2001; Derobert et al., 2002; Moreno et al., 2008a; 2010; Duan et al., 2012; Ferreiro-Galve et al., 2012b; Quintana-Urzaínqui et al., 2012a,b). Tanto Pax6 como Pax7 están presentes en grupos hipotalámicos de otros vertebrados (Stoykova y Gruss, 1994; Medina, 2008; Ohyama et al., 2008; Duan et al., 2012; Moreno et al., 2012; Domínguez et al., 2013), incluyendo la presencia de Pax6 en la adenohipófisis y Pax7 en el lóbulo intermedio de la glándula pituitaria (Bentley et al., 1999; Kioussi et al., 1999; Guner et al., 2008; Sjödal y Gunhaga, 2008; Hosoyama et al., 2010; Budry et al., 2011). Pax7 también se expresa en la paráfisis en desarrollo de aves (Nomura et al., 2007).

En el diencefalo, la expresión de Pax6 ocupa inicialmente toda la parte alar, para quedar restringido conforme avanza el desarrollo a la eminencia pretalámica, pretálamo, habénula, epífisis y pretecho (Stoykova y Gruss, 1994; Pritz y Ruan, 2009; Duan et al., 2012; Moreno et al., 2012; Domínguez et al., 2013). Además, en todos los vertebrados estudiados Pax6 ocupa ciertos grupos tegmentales (basales) en p1 (Agarwala et al., 2001; Murakami et al., 2001; Wullimann y Rink, 2001; Pritz y Ruan, 2009; Merchán et al., 2011; Morona et al., 2011; Duan et al., 2012), y en p3 al menos en reptiles (Pritz y Ruan, 2009; Moreno et al., 2012). En cuanto a la expresión diencefálica de Pax7, ha sido descrita en la porción basal de p3 en tortugas y anfibios anuros (Moreno et al., 2012; Domínguez et al., 2013), y en el pretecho de gran variedad de vertebrados, junto con Pax3 y Pax6 (Wullimann y Rink, 2001; Derobert et al., 2002; Ferran et al., 2008; 2009; Ferreiro-Galve et al., 2008; Pritz y Ruan, 2009; Maczowiak et al., 2010; Morona et al., 2011).

El límite entre diencefalo y mesencefalo se visualiza en términos de expresión de Pax en todos los vertebrados estudiados, por la ausencia de Pax6 y la presencia de Pax3 (durante el desarrollo) y Pax7 en el techo óptico (Matsunaga et al., 2000; Murakami et al., 2001; Wullimann y Rink, 2001; Scholpp y Brand, 2003; Thompson et al., 2007; Moreno et al., 2008a; Pritz y Ruan, 2009; Morona et al., 2011). En el tectum mesencefálico, una población Pax6+ está presente en un amplio rango de vertebrados estudiados (Stoykova y Gruss, 1994; Vitalis et al., 2000; Wullimann y Rink, 2001; Ahsan et al., 2007;

Bayly et al., 2007; Pritz y Ruan, 2009; Duan et al., 2012).

Caudalmente, en el segmento ístmico, se ha descrito expresión de varios miembros del tercer grupo de la familia Pax. Aunque no son objeto de estudio en el presente trabajo, cabe señalar al subgrupo Pax2/Pax5/Pax8, de gran importancia en la formación del organizador ístmico, en la especificación de ciertos tipos de interneuronas, y en la formación del ojo y la cápsula ótica (revisado en Goode y Elgar, 2009). De hecho, Pax2, Pax5 y Pax8 pueden ser utilizados para visualizar el límite entre mesencefalo y rombencefalo (Wada et al., 1998; Fritsch y Glover, 2006).

Desde muy temprano en la formación del SNC, el neuroepitelio que da lugar al rombencefalo y la médula espinal expresa Pax3 y Pax7 en la región dorsal, y Pax6 en regiones intermedias (Goulding et al., 1991; Jostes et al., 1991; Walther y Gruss, 1991; Stoykova y Gruss, 1994; Rodríguez-Moldes et al., 2011). Subsecuentemente, la expresión de Pax6 y Pax7 se expande a regiones subventriculares e intermedias, concretamente células Pax7 forman parte del núcleo interpeduncular (Aroca et al., 2006; Lorente-Cánovas et al., 2012) y subpoblaciones en el cerebelo (Shin et al., 2003), mientras que células Pax6 forman parte de los núcleos cocleares y vestibulares,

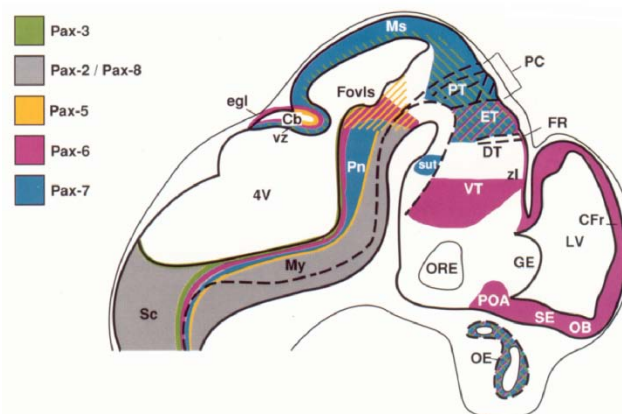


Figura 13. Representación esquemática de la expresión de la familia génica Pax en el cerebro embrionario de ratón (E13 p.c.). Tomado de Stoykova y Gruss, 1994. Abreviaturas: Cb: cerebelo; Cr: corteza frontal; DT: tálamo dorsal; egl: capa granular externa; E: epitálamo; Fovls: fovea isthmica; GE: eminencia ganglionar; LV: ventrículo lateral; Ms: mesencefalo; My: mielencefalo; OB: bulbo olfativo; OE: epitelio olfativo; OE receso óptico; PC: comisura posterior; Pn: puente; PT: pretectum; Sc: médula espinal; SE: septo; sut: subtálamo; vz: zona ventricular; 4V: cuarto ventrículo.

núcleo de la columna dorsal y núcleo del tracto solitario en mamíferos (Stoykova y Gruss, 1994; Duan et al., 2012), además de células granulares del cerebelo y núcleos precerebelosos en vertebrados mandibulados (Engelkamp et al., 1999; Wullimann y Rink, 2001; Gilthorpe et al., 2002; Fink et al., 2006; Rodríguez-Moldes et al., 2008). De hecho, la ausencia de cerebelo en lampreas ha sido correlacionada con la ausencia de Pax6 en el labio rómbico durante el desarrollo (Murakami et al., 2001).

En cuanto a la médula espinal, en urodelos adultos se ha descrito expresión ventricular y subventricular de Pax7 (dorsal) y Pax6 (intermedio), delimitando molecularmente regiones de células progenitoras que mantienen una identidad posicional en procesos homeostáticos y regenerativos (Schnapp et al., 2005; McHedlishvili et al., 2007).

Objetivos y metodología

Como hemos indicado en los apartados previos, el cerebro de los anfibios urodelos es una estructura que representa de manera simple el patrón común del cerebro vertebrado en términos neuroquímicos, hodológicos y funcionales (González y Smeets, 1991; González et al., 1995; Marín et al., 1997a,b; Moreno et al., 2002; López et al., 2003; Moreno y González, 2007a; Morona y González, 2008, 2009). Además, la increíble capacidad de los urodelos de regenerar diferentes estructuras, incluido el cerebro, ha hecho de éstos un valioso modelo animal en el campo de la medicina regenerativa en los últimos años (Parish et al., 2007; Berg et al., 2010, 2011; Kirkham et al., 2011; Mchedlishvili et al., 2012; Maden et al., 2013), por lo que se hacen necesarios análisis neuroanatómicos comparativos que sienten las bases para futuros avances en esta rama de la ciencia. Las primeras interpretaciones en el marco del modelo prosomérico han sido publicadas recientemente en base a la expresión de calbindina-D28k y calretinina (Morona y González, 2008; 2009), pero faltaban datos genoarquitectónicos que corroborasen las nuevas subdivisiones propuestas, así como un análisis detallado de la aparición de los grupos inmunorreactivos durante el desarrollo. Por ello, esta tesis se centra en el análisis neuroanatómico detallado de las CBPs y diversos factores de transcripción durante el desarrollo, así como de individuos adultos. Para una correcta interpretación se han realizado experimentos de doble y triple

marcaje mediante técnicas inmunohistoquímicas de marcadores conservados en la evolución. Hemos utilizado esta técnica porque se ha demostrado que ofrece imágenes de alta resolución cuyos resultados son coherentes con la hibridación in situ (Moreno et al., 2008a; González y Northcutt, 2009; Morona et al., 2011; Ferreiro-Galve et al., 2012b; Lorente-Cánovas et al., 2012). Por último, el lento y modulable desarrollo externo que caracteriza a los anfibios urodelos permite analizar fácilmente diversos eventos morfogenéticos comunes entre tetrápodos, que en otras especies resulta de difícil estudio debido a la presencia del huevo amniótico de saurópsidos y al desarrollo interno típico de mamíferos.

En primer lugar analizamos la distribución de dos proteínas ligantes de calcio (calbindina-D28k y calretinina) en el SNC de *Pleurodeles waltl* a lo largo del desarrollo embrionario, con el objetivo de enmarcar diferentes poblaciones neuronales emergentes en un contexto prosomérico (**Capítulo 2**). Los resultados pusieron de manifiesto la ventaja de los urodelos respecto a los anuros como modelo de experimentación, puesto que subpoblaciones equivalentes aparecen más lentamente en urodelos, permitiendo un análisis más detallado y preciso. A pesar de su utilidad en la interpretación neuromérica del cerebro, se encontraron diferencias interespecíficas con otros vertebrados, por lo que no deben establecerse homologías en base a la expresión de estas proteínas. Con este fin, decidimos afrontar el cerebro de urodelos desde un punto de vista evolutivamente conservado, por lo que estudiamos la expresión de Pax3, Pax6 y Pax7 en combinación con otros marcadores altamente conservados en la evolución, tanto en el desarrollo como en individuos adultos (capítulos 3 y 4). El análisis del desarrollo ontogénico puso de manifiesto la alta conservación de los diferentes dominios histogenéticos delimitados por Pax3, Pax6 y Pax7, junto con Otp, Nkx2.1, Nkx2.2 y Nkx6.1. Además, se pudo analizar espaciotemporalmente cómo células Pax+ van ocupando progresivamente las zonas subventricular y del manto hasta alcanzar la posición final característica de los adultos (interpretada con la ayuda de otros marcadores con distribución conocida, como 5-HT, CB, ChAT, CR, GABA, NOS y TH), además de proporcionar evidencias indirectas de posibles eventos migratorios en la formación del cerebro de anfibios urodelos (**Capítulo 3**). Utilizando como modelo urodelo *Pleurodeles waltl*, observamos que Pax6 y Pax7 (y en menor medida Pax3) están ampliamente distribuidos a lo largo del SNC siguiendo

un patrón neuromérico, al contrario que en otros vertebrados donde la expresión se restringe al desarrollo (probablemente debido a la simplificación secundaria), por lo que aparentemente son necesarios en la homeostasis del cerebro de urodelos adultos (**Capítulo 4**). Por último, con el objetivo de comprobar que los patrones de expresión descritos para *P.waltl* son válidos para otras especies, y que las funciones atribuidas a los genes Pax de otros vertebrados son extrapolables a los anfibios urodelos, se realizaron algunas aproximaciones al estudio de la funcionalidad de Pax6 y Pax7 en el cerebro de *Ambystoma mexicanum*, *Notophthalmus viridescens* y *Pleurodeles waltl* en relación con su papel en el desarrollo y la regeneración del SNC. Los capítulos 2,3 y 4 proveen un marco anatómico detallado y completo para el estudio funcional del SNC de salamandras y tritones, y el análisis comparado de todos estos datos pone de manifiesto la presencia e importancia de Pax en procesos ontogénicos, homeostáticos y regenerativos (en términos de proliferación y migración), como ocurre en mamíferos (**Capítulo 5**).

Bibliografía

- Abellán A, Medina L. 2008. Expression of cLhx6 and cLhx7/8 suggests a pallido-pedunculo-preoptic origin for the lateral and medial parts of the avian bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res Bull* 75(2-4):299-304.
- Abellán A, Medina L. 2009. Subdivisions and derivatives of the chicken subpallium based on expression of LIM and other regulatory genes and markers of neuron subpopulations during development. *J Comp Neurol* 515(4):465-501.
- Aburomia R, Khaner O, Sidow A. 2003. Functional evolution in the ancestral lineage of vertebrates or when genomic complexity was wagging its morphological tail. *J Struct Funct Genomics* 3(1-4):45-52.
- Agarwala S, Sanders TA, Ragsdale CW. 2001. Sonic hedgehog control of size and shape in midbrain pattern formation. *Science* 291(5511):2147-2150.
- Ahsan M, Riley KL, Schubert FR. 2007. Molecular mechanisms in the formation of the medial longitudinal fascicle. *J Anat* 211(2):177-187.
- Allan DW. 2009. Combinatorial Transcription Factor Codes and Neuron Specification. *Encyclopedia of Neuroscience*. Berlin: Springer. p 803-807.
- Armstrong JBM, G.M. 1989. *Developmental Biology of the Axolotl*. New York: Oxford University Press.
- Arnold W. 1968. Über das diencephal-telencephale neurosekretorische System beim Salamander (*Salamanca salamandra* und *S. tigrinum*). *Z Zellforsch* 89:371-409.
- Aroca P, Puelles L. 2005. Postulated boundaries and differential fate in the developing rostral hindbrain. *Brain Res Brain Res Rev* 49(2):179-190.
- Aroca P, Lorente-Cánovas B, Mateos FR, Puelles L. 2006. Locus coeruleus neurons originate in alar rhombomere 1 and migrate into the basal plate: Studies in chick and mouse embryos. *J Comp Neurol* 496(6):802-818.
- Artero C, Fasolo A, Franzoni MF. 1994. Multiple sources of the pituitary pars intermedia innervation in amphibians: a Dil retrograde tract-tracing study. *Neuroscience letters* 169(1-2):163-166.
- Ashery-Padan R, Gruss P. 2001. Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr Opin Cell Biol* 13(6):706-714.
- Bachy I, Vernier P, Retaux S. 2001. The LIM-homeodomain gene family in the developing *Xenopus* brain: conservation and divergences with the mouse related to the evolution of the forebrain. *J Neurosci* 21(19):7620-7629.
- Bachy I, Berthon J, Retaux S. 2002. Defining pallial and subpallial divisions in the developing *Xenopus* forebrain. *Mech Dev* 117(1-2):163-172.
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. 1992. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15(8):303-308.
- Balczarek KA, Lai ZC, Kumar S. 1997. Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Mol Biol Evol* 14(8):829-842.
- Barbadillo LJ. 1987. La guía de Incafo de los anfibios y reptiles de la península ibérica, baleares y canarias. Madrid: Incafo, S.A.
- Bardet SM, Martínez-de-la-Torre M, Northcutt RG, Rubenstein JL, Puelles L. 2008. Conserved pattern of OTP-positive cells in the paraventricular nucleus and other hypothalamic sites of tetrapods. *Brain research bulletin* 75(2-4):231-235.
- Bayly RD, Ngo M, Aglyamova GV, Agarwala S. 2007. Regulation of ventral midbrain patterning by Hedgehog signaling. *Development* 134(11):2115-2124.
- Bekoff A. 1985. Development of Locomotion in Vertebrates, a comparative perspective. In: Gollin ES, editor. *The comparative Development of Adaptive Skills: Evolutionary Implications*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates. p 57-94.
- Bentley CA, Zidehsarai MP, Grindley JC, Parlow AF, Barth-Hall S, Roberts VJ. 1999. Pax6 is implicated in murine pituitary endocrine function. *Endocrine* 10(2):171-177.
- Berg DA, Kirkham M, Beljajeva A, Knapp D, Habermann B, Ryge J, Tanaka EM, Simon A. 2010. Efficient regeneration by activation of neurogenesis in homeostatically quiescent regions of the adult vertebrate brain. *Development* 137(24):4127-4134.
- Berg DA, Kirkham M, Wang H, Frisen J, Simon A. 2011. Dopamine controls neurogenesis in the adult salamander midbrain in homeostasis and during regeneration of dopamine neurons. *Cell Stem Cell* 8(4):426-433.
- Berggard T, Szczepankiewicz O, Thulin E, Linse S. 2002. Myo-inositol monophosphatase is an activated target of calbindin D28k. *J Biol Chem* 277(44):41954-41959.

- Blake JA, Thomas M, Thompson JA, White R, Ziman M. 2008. Perplexing Pax: from puzzle to paradigm. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists 237(10):2791-2803.
- Blechman J, Borodovsky N, Eisenberg M, Nabel-Rosen H, Grimm J, Levkowitz G. 2007. Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein Orthopedia. *Development* 134(24):4417-4426.
- Bonett RM, Chippindale PT. 2006. Streambed microstructure predicts evolution of development and life history mode in the plethodontid salamander *Eurycea tynnerensis*. *BMC Biol* 4:6.
- Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M. 1986. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47(6):1033-1040.
- Bordzilovskaya NPD, T.A.; Duhon, S.T.; Malacinski; G.M. 1989. Developmental-stage series of axolotl embryos. In: Armstrong JBM, G.M., editor. *Developmental Biology of the Axolotl*. Oxford University Press, New York, pp. 201-219
- Boucaut JCB, B. Aubery, M.; Bourrillon, R.; Houillon, C. 1979. Concanavalin A binding to amphibian embryo and effect on morphogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 51:63-72.
- Bramswig NC, Kaestner KH. 2011. Transcriptional regulation of alpha-cell differentiation. *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1:13-20.
- Braun CBN, R. G. 1999. Morphology: Brain and cranial nerves. In: Singer R, editor. *Encyclopedia of paleontology*. p 185-192.
- Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL, Ericson J. 1999. Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398(6728):622-627.
- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J. 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101(4):435-445.
- Brockes JP, Kumar A. 2005. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science* 310(5756):1919-1923.
- Brocklehurst G. 1979. The significance of the evolution of the cerebrospinal fluid system. *Ann Roy Coll Surg Eng* 61:7.
- Brox A, Puelles L, Ferreiro B, Medina L. 2003. Expression of the genes GAD67 and Distal-less-4 in the forebrain of *Xenopus laevis* confirms a common pattern in tetrapods. *J Comp Neurol* 461(3):370-393.
- Brox A, Puelles L, Ferreiro B, Medina L. 2004. Expression of the genes Emx1, Tbr1, and Eomes (Tbr2) in the telencephalon of *Xenopus laevis* confirms the existence of a ventral pallial division in all tetrapods. *J Comp Neurol* 474(4):562-577.
- Bryant DN, LeSauter J, Silver R, Romero MT. 2000. Retinal innervation of calbindin-D28K cells in the hamster suprachiasmatic nucleus: ultrastructural characterization. *J Biol Rhythms* 15(2):103-111.
- Bu J, Sathyendra V, Nagykerly N, Geula C. 2003. Age-related changes in calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human cerebral cortex. *Exp Neurol* 182(1):220-231.
- Buckingham M, Relaix F. 2007. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:645-673.
- Buckley D. 2012. Evolution of Viviparity in Salamanders (Amphibia, Caudata). eLS: John Wiley & Sons, Ltd.
- Buckley D, Alcobendas M, García-Paris M, Wake MH. 2007. Heterochrony, cannibalism, and the evolution of viviparity in *Salamandra salamandra*. *Evol Dev* 9(1):105-115.
- Budry L, Lafont C, El Yandouzi T, Chauvet N, Conejero G, Drouin J, Mollard P. 2011. Related pituitary cell lineages develop into interdigitated 3D cell networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(30):12515-12520.
- Burgoyne RD, Weiss JL. 2001. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem J* 353(Pt 1):1-12.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2006a. Calretinin immunoreactivity in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*: distribution and comparison with some neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes. I. Olfactory organ and forebrain. *J Comp Neurol* 494(3):435-459.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2006b. Calretinin immunoreactivity in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*: distribution and comparison with some neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes. II. Midbrain, hindbrain, and rostral spinal cord. *J Comp Neurol* 494(5):792-814.
- Celio MR. 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35(2):375-475.
- Chakrabarty K, Von Oerthel L, Hellemons A, Clotman F, Espana A, Groot Koerkamp M, Holstege FC, Pasterkamp RJ, Smidt MP. 2012. Genome wide expression profiling of the mesodiencephalic region identifies novel factors involved in early and late dopaminergic development. *Biol Open* 1(8):693-704.
- Chalepakis G, Stoykova A, Wijnholds J, Tremblay P, Gruss P. 1993. Pax: gene regulators in the developing nervous system. *J Neurobiol* 24(10):1367-1384.
- Charytonowicz E, Matushansky I, Castillo-Martin M, Hricik T, Cordon-Cardo C, Ziman M. 2011. Alternate PAX3 and PAX7 C-terminal isoforms in myogenic differentiation and sarcomagenesis. *Clin Transl Oncol* 13(3):194-203.
- Chernoff EA, Stocum DL, Nye HL, Cameron JA. 2003. Urodele spinal cord regeneration and related processes. *Dev Dyn* 226(2):295-307.
- Cheron G, Gall D, Servais L, Dan B, Maex R, Schiffmann SN. 2004. Inactivation of calcium-binding protein genes induces 160 Hz oscillations in the cerebellar cortex of alert mice. *J Neurosci* 24(2):434-441.
- Chi N, Epstein JA. 2002. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 18(1):41-47.
- Christakos S, Malkowitz L, Sori A, Sperduto A, Feldman SC. 1987. Calcium binding protein in squid brain: biochemical similarity

- to the 28,000-Mr vitamin D-dependent calcium binding protein (calbindin-D28k). *J Neurochem* 49(5):1427-1437.
- Clairambault P, Christophe N, Pairault C, Herbin M, Ward R, Reperant J. 1994. Organization of the serotonergic system in the brain of two amphibian species, *Ambystoma mexicanum* (Urodela) and *Typhlonectes compressicauda* (Gymnophiona). *Anat Embryol (Berl)* 190(1):87-99.
- Coghill GE. 1929. Anatomy and the problem of behaviour. London: Cambridge University Press.
- Corio M, Thibault J, Peute J. 1992. Distribution of catecholaminergic and serotonergic systems in forebrain and midbrain of the newt, *Triturus alpestris* (Urodela). *Cell Tissue Res* 268(2):377-387.
- Czerny T, Bouchard M, Kozmik Z, Busslinger M. 1997. The characterization of novel Pax genes of the sea urchin and *Drosophila* reveal an ancient evolutionary origin of the Pax2/5/8 subfamily. *Mech Dev* 67(2):179-192.
- Dávila JC, Guirado S, Puelles L. 2000. Expression of calcium-binding proteins in the diencephalon of the lizard *Psammodromus olgirus*. *J Comp Neurol* 427(1):67-92.
- Delcroix GJ, Curtis KM, Schiller PC, Montero-Menei CN. 2010. EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells. *Differentiation* 80(4-5):213-227.
- Denôel M, Joly P, Whiteman HH. 2005. Evolutionary ecology of facultative paedomorphosis in newts and salamanders. *Biol Rev Camb Philos Soc* 80(4):663-671.
- Derobert Y, Baratte B, Lepage M, Mazan S. 2002. Pax6 expression patterns in *Lampetra fluviatilis* and *Scyliorhinus canicula* embryos suggest highly conserved roles in the early regionalization of the vertebrate brain. *Brain Res Bull* 57(3-4):277-280.
- Dessaud E, Yang LL, Hill K, Cox B, Ulloa F, Ribeiro A, Mynett A, Novitsch BG, Briscoe J. 2007. Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 450(7170):717-720.
- Díaz C, Yanes C, Trujillo CM, Puelles L. 2000. Cytoarchitectonic subdivisions in the subtectal midbrain of the lizard *Galloti galloti*. *J Neurocytol* 29(8):569-593.
- Díaz-Regueira S, Anadón R. 2000. Calretinin expression in specific neuronal systems in the brain of an advanced teleost, the grey mullet (*Chelon labrosus*). *J Comp Neurol* 426(1):81-105.
- Dichmann DS, Harland RM. 2011. Nkx6 genes pattern the frog neural plate and Nkx6.1 is necessary for motoneuron axon projection. *Developmental biology* 349(2):378-386.
- Diesener GR, J. 1986. Lurche und Kriechtiere (Reptiles y anfibios). München: Mosaik Verlag GmbH.
- Domínguez L, González A, Moreno N. 2011. Ontogenetic distribution of the transcription factor nkx2.2 in the developing forebrain of *Xenopus laevis*. *Front Neuroanat* 5:11.
- Domínguez L, Morona R, González A, Moreno N. 2013. Characterization of the hypothalamus of *Xenopus laevis* during development. I. The alar regions. *J Comp Neurol* 521(4):725-59.
- Donkelaar t. 1998. Urodeles. In: Nieuwenhuys R tDH, Nicholson C, editor. The central nervous system of vertebrates. London: Springer. p 1045-1150.
- Duan D, Fu Y, Paxinos G, Watson C. 2012. Spatiotemporal expression patterns of Pax6 in the brain of embryonic, newborn, and adult mice. *Brain Struct Funct*.
- Dube L, Clairambault P, Malacarne G. 1990. Striatal afferents in the newt *Triturus cristatus*. *Brain Behav Evol* 35(4):212-226.
- Duellman WE, Trueb L. 1986. Biology of Amphibians: Johns Hopkins University Press.
- Duprat AM, Gualandris L, Rouge P. 1982. Neural induction and the structure of the target cell surface. *Journal of embryology and experimental morphology* 70:171-187.
- Eagleson GW, McKeown BA. 1978. Factors affecting the larval growth and development of laboratory-reared *Ambystoma gracile* (Baird) from natural populations of different temperature regimes. *Biochem Exp Biol* 14(4):299-304.
- Eagleson GW. 1996. Developmental neurobiology of the anterior areas in amphibians: urodele perspectives. *The International journal of developmental biology* 40(4):735-743.
- Enderlin S, Norman AW, Celio MR. 1987. Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 177(1):15-28.
- Engelkamp D, Rashbass P, Seawright A, van Heyningen V. 1999. Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development* 126(16):3585-3596.
- Eom DS, Amarnath S, Fogel JL, Agarwala S. 2011. Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway. *Development* 138(15):3179-3188.
- Epstein J, Cai J, Glaser T, Jepeal L, Maas R. 1994. Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *J Biol Chem* 269(11):8355-8361.
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, Briscoe J. 1997. Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90(1):169-180.
- Evans AE, Kelly CM, Precious SV, Rosser AE. 2012. Molecular regulation of striatal development: a review. *Anat Res Int* 2012:106529.
- Ewert JP. 1984. Tectal mechanisms that underlie prey-catching and avoidance behaviors in toads. In: Vanegas H, editor. Comparative neurology of the optic tectum. New York: Plenum. p 247-416.
- Fasolo A, Franzoni MF, Gaudino G, Steinbusch HW. 1986. The organization of serotonin-immunoreactive neuronal systems in the brain of the crested newt, *Triturus cristatus carnifex* Laur. *Cell Tissue Res* 243(2):239-247.
- Ferran JL, Sánchez-Arrones L, Bardet SM, Sandoval JE, Martínez-de-la-Torre M, Puelles L. 2008. Early pretectal gene expression pattern shows a conserved anteroposterior tripartition in mouse and chicken. *Brain research bulletin* 75(2-4):295-298.

- Ferran JL, de Oliveira ED, Merchán P, Sandoval JE, Sánchez-Arrones L, Martínez-De-La-Torre M, Puellas L. 2009. Genoarchitectonic profile of developing nuclear groups in the chicken pretectum. *J Comp Neurol* 517(4):405-451.
- Ferreiro-Galve S, Carrera I, Candal E, Villar-Cheda B, Anadón R, Mazan S, Rodríguez-Moldes I. 2008. The segmental organization of the developing shark brain based on neurochemical markers, with special attention to the prosencephalon. *Brain research bulletin* 75(2-4):236-240.
- Ferreiro-Galve S, Rodríguez-Moldes I, Candal E. 2012a. Pax6 expression during retinogenesis in sharks: comparison with markers of cell proliferation and neuronal differentiation. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 318(2):91-108.
- Ferreiro-Galve S, Candal E, Rodríguez-Moldes I. 2012b. Dynamic expression of Pax6 in the shark olfactory system: evidence for the presence of Pax6 cells along the olfactory nerve pathway. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 318(2):79-90.
- Ferretti P. 1996. Re-examining jaw regeneration in urodeles: what have we learnt? *Int J Dev Biol* 40(4):807-811.
- Fink AJ, Englund C, Daza RA, Pham D, Lau C, Nivison M, Kowalczyk T, Hevner RF. 2006. Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26(11):3066-3076.
- Franzoni MF, Thibault J, Fasolo A, Martinoli MG, Scaranari F, Calas A. 1986. Organization of tyrosine-hydroxylase immunopositive neurons in the brain of the crested newt, *Triturus cristatus carnifex*. *J Comp Neurol* 251(1):121-134.
- Franzoni MF, Morino P. 1989. The distribution of GABA-like-immunoreactive neurons in the brain of the newt, *Triturus cristatus carnifex*, and the green frog, *Rana esculenta*. *Cell Tissue Res* 255(1):155-166.
- Fritzsch B, Himstedt W. 1980. Anatomy of visual afferents in salamander brain. *Naturwissenschaften* 67(4):203-204.
- Fritzsch BG, J.C. . . In: , editor. , vol. 2. Oxford: . p 1–24. 2006. Evolution of the deuterostome central nervous system: an intercalation of developmental patterning processes with cellular specification processes. In: Kaas JH, editor. *Evolution of the nervous system*. Oxford: Academic Press.
- Gallien LD, M. 1957. Table chronologique de développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull Biologique* 2:1-19.
- García-Paris M. 1985. Los anfibios de España. Madrid: Neografis, S.L.
- García-Paris M, Alcobendas M, Buckley D, Wake DB. 2003. Dispersal of viviparity across contact zones in Iberian populations of fire salamanders (*Salamandra*) inferred from discordance of genetic and morphological traits. *Evolution* 57(1):129-143.
- García-Segura LM, Baetens D, Roth J, Norman AW, Orci L. 1984. Immunohistochemical mapping of calcium-binding protein immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res* 296(1):75-86.
- Gilthorpe JD, Papantoniou EK, Chedotal A, Lumsden A, Wingate RJ. 2002. The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. *Development* 129(20):4719-4728.
- Glaesner L. 1925 Normentafel zur Entwicklung des gemeinen Wassermolchs (*Molge vulgaris*). . Normentafeln zur Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere.
- González A, Smeets WJ. 1991. Comparative analysis of dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the brain of two amphibians, the anuran *Rana ridibunda* and the urodele *Pleurodeles waltlii*. *J Comp Neurol* 303(3):457-477.
- González A, Smeets WJ. 1992. Comparative analysis of the vasotocinergic and mesotocinergic cells and fibers in the brain of two amphibians, the anuran *Rana ridibunda* and the urodele *Pleurodeles waltlii*. *J Comp Neurol* 315(1):53-73.
- González A, Marín O, Smeets WJ. 1995. Development of catecholamine systems in the central nervous system of the newt *Pleurodeles waltlii* as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 360(1):33-48.
- González A, López JM, Sánchez-Camacho C, Marín O. 2002a. Regional expression of the homeobox gene NKX2-1 defines pallidal and interneuronal populations in the basal ganglia of amphibians. *Neuroscience* 114(3):567-575.
- González A, López JM. 2002b. A forerunner of septohippocampal cholinergic system is present in amphibians. *Neuroscience letters* 327(2):111-114.
- González A, Northcutt RG. 2009. An immunohistochemical approach to lungfish telencephalic organization. *Brain, behavior and evolution* 74(1):43-55.
- Goode DK, Elgar G. 2009. The PAX258 gene subfamily: a comparative perspective. *Dev Dyn* 238(12):2951-2974.
- Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR, Gruss P. 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J* 10(5):1135-1147.
- Grana P, Folgueira M, Huesa G, Anadón R, Yañez J. 2013. Immunohistochemical distribution of calretinin and calbindin (D-28k) in the brain of the cladistian *Polypterus senegalus*. *J Comp Neurol*.
- Griffiths R. 1995. *Newts and salamanders of Europe*. London: T & AD Poyser natural history.
- Gualandris-Parisot L, Husson D, Foulquier F, Kan P, Davet J, Aimar C, Dournon C, Duprat AM. 2001. *Pleurodeles waltli*, amphibian, Urodele, is a suitable biological model for embryological and physiological space experiments on a vertebrate. *Adv Space Res* 28(4):569-578.
- Guner B, Ozacar AT, Thomas JE, Karlstrom RO. 2008. Graded hedgehog and fibroblast growth factor signaling independently regulate pituitary cell fates and help establish the pars distalis and pars intermedia of the zebrafish adenohypophysis. *Endocrinology* 149(9):4435-4451.
- Guo Z, Packard A, Krolewski RC, Harris MT, Manglapus GL, Schwob JE. 2010. Expression of pax6 and sox2 in adult olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 518(21):4395-4418.
- Hartmann B, Lee PN, Kang YY, Tomarev S, de Couet HG, Callaerts P. 2003. Pax6 in the sepiolid squid *Euprymna scolopes*: evidence for a role in eye, sensory organ and brain development. *Mech Dev* 120(2):177-183.
- Haubst N, Berger J, Radjendirane V, Graw J, Favor J, Saunders GF, Stoykova A, Gotz M. 2004. Molecular dissection of Pax6

- function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development. *Development* 131(24):6131-6140.
- Hauptmann G, Gerster T. 2000. Regulatory gene expression patterns reveal transverse and longitudinal subdivisions of the embryonic zebrafish forebrain. *Mech Dev* 91(1-2):105-118.
- Hayashi T, Yokotani N, Tane S, Matsumoto A, Myouga A, Okamoto M, Takeuchi T. 2013. Molecular genetic system for regenerative studies using newts. *Dev Growth Differ* 55(2):229-236.
- Heizmann CW, Braun K. 1992. Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 15(7):259-264.
- Herrick C. 1927. The amphibian forebrain. IV. The cerebral hemispheres of *Amblystoma*. *J Comp Neurol* 43:231-325.
- Herrick C. 1948. The brain of the tiger salamander *Amblystoma tigrinum*. Chicago: University of Chicago Press.
- Hill A, Boll W, Ries C, Warner L, Osswald M, Hill M, Noll M. 2010. Origin of Pax and Six gene families in sponges: Single PaxB and Six1/2 orthologs in *Chalinula loosanoffi*. *Dev Biol* 343(1-2):106-123.
- Holland LZ, Short S. 2010. Alternative splicing in development and function of chordate endocrine systems: a focus on Pax genes. *Integr Comp Biol* 50(1):22-34.
- Holtfreter J. 1933. Der Einfluss von Wirtsalter und verschiedenen Organbezirken auf die Differenzierung von angelagertem Gastrulaektoderm. *W Roux Arch Entw Mech Org* 127:610-775.
- Hosoyama T, Nishijo K, García MM, Schaffer BS, Ohshima-Hosoyama S, Prajapati SI, Davis MD, Grant WF, Scheithauer BW, Marks DL, Rubin BP, Keller C. 2010. A Postnatal Pax7 Progenitor Gives Rise to Pituitary Adenomas. *Genes Cancer* 1(4):388-402.
- Hubbard MJ, McHugh NJ. 1995. Calbindin28kDa and calbindin30kDa (calretinin) are substantially localised in the particulate fraction of rat brain. *FEBS Lett* 374(3):333-337.
- Iacopino AM, Christakos S. 1990. Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(11):4078-4082.
- Jostes B, Walther C, Gruss P. 1990. The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev* 33(1):27-37.
- Ju MJ, Aroca P, Luo J, Puelles L, Redies C. 2004. Molecular profiling indicates avian branchiomotor nuclei invade the hindbrain alar plate. *Neuroscience* 128(4):785-796.
- Jun S, Desplan C. 1996. Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* 122(9):2639-2650.
- Kage T, Takeda H, Yasuda T, Maruyama K, Yamamoto N, Yoshimoto M, Araki K, Inohaya K, Okamoto H, Yasumasu S, Watanabe K, Ito H, Ishikawa Y. 2004. Morphogenesis and regionalization of the medaka embryonic brain. *J Comp Neurol* 476(3):219-239.
- Kang JS, Krauss RS. 2010. Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13(3):243-248.
- Kappers JĚ. 1950. The development and structure of the paraphysis cerebri in urodeles with experiments on its function in *Amblystoma mexicanum*. *J Comp Neurol* 92(1):93-127.
- Kataoka A, Shimogori T. 2008. Fgf8 controls regional identity in the developing thalamus. *Development* 135(17):2873-2881.
- Kawakami A, Kimura-Kawakami M, Nomura T, Fujisawa H. 1997. Distributions of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development. *Mech Dev* 66(1-2):119-130.
- Keller RG, Desplan C, Rosenberg MI. 2010. Identification and characterization of *Nasonia* Pax genes. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 1:109-120.
- Khan PA, ; Liversage, RA. 1995. Development of *Notophthalmus viridescens* embryos. *Develop Growth Differ* 37:529-537.
- Khattak S, Richter T, Tanaka EM. 2009. Generation of transgenic axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Cold Spring Harb Protoc* 2009(8):pdb prot5264.
- Kicliter EaE, S.O.E. . 1976. Frog neurobiology. Llinás R PW, editor. Berlin: Springer.
- Kiecker C, Lumsden A. 2009. Recent advances in neural development. *F1000 Biol Rep* 1:1.
- Kimmel CB. 1993. Patterning the brain of the zebrafish embryo. *Annual review of neuroscience* 16:707-732.
- Kioussi C, O'Connell S, St-Onge L, Treier M, Gleiberman AS, Gruss P, Rosenfeld MG. 1999. Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(25):14378-14382.
- Kirkham M, Berg DA, Simon A. 2011. Microglia activation during neuroregeneration in the adult vertebrate brain. *Neurosci Lett* 497(1):11-16.
- Kiselev Y, Eriksen TE, Forsdahl S, Nguyen LH, Mikkola I. 2012. 3T3 cell lines stably expressing Pax6 or Pax6(5a)--a new tool used for identification of common and isoform specific target genes. *PLoS One* 7(2):e31915.
- Kleinjan DA, Bancewicz RM, Gautier P, Dahm R, Schonhaler HB, Damante G, Seawright A, Hever AM, Yeyati PL, van Heyningen V, Coutinho P. 2008. Subfunctionalization of duplicated zebrafish pax6 genes by cis-regulatory divergence. *PLoS Genet* 4(2):e29.
- Kozmik Z, Czerny T, Busslinger M. 1997. Alternatively spliced insertions in the paired domain restrict the DNA sequence specificity of Pax6 and Pax8. *EMBO J* 16(22):6793-6803.
- Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Schnapp E, Epperlein HH, Tanaka EM. 2008. Novel insights into the flexibility of cell and positional identity during urodele limb regeneration. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73:583-592.
- Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Maden M, Epperlein HH, Tanaka EM. 2009. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460(7251):60-65.

- Krug L, Wicht H, Northcutt RG. 1993. Afferent and efferent connections of the thalamic eminence in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Neuroscience letters* 149(2):145-148.
- Kuhlenbeck H, editor. 1973. The central nervous system of vertebrates. Basel: Karger.
- Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA. 1999. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 156(2):333-344.
- Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. 2007. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol* 73(1):1-14.
- Larsell O, editor. 1967. The comparative anatomy and histology of the cerebellum from Myxinooids through Birds. Minneapolis: University of Minnesota Press.
- Leathers VL, Norman AW. 1993. Evidence for calcium mediated conformational changes in calbindin-D28K (the vitamin D-induced calcium binding protein) interactions with chick intestinal brush border membrane alkaline phosphatase as studied via photoaffinity labeling techniques. *J Cell Biochem* 52(2):243-252.
- León-Olea M, Sánchez-Álvarez M, Pina AL, Bayón A. 1991. Evidence for enkephalin- and endorphin-immunoreactive cells in the anterior pituitary of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J Comp Neurol* 305(3):412-420.
- Li L, Yang Y, Xue L. 2010. [Regulatory functions of Pax gene family in *Drosophila* development]. *Yi Chuan* 32(2):115-121.
- Liem KF, Jr., Jessell TM, Briscoe J. 2000. Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* 127(22):4855-4866.
- Lin X, State MW, Vaccarino FM, Grealley J, Hass M, Leckman JF. 1999. Identification, chromosomal assignment, and expression analysis of the human homeodomain-containing gene Orthopedia (OTP). *Genomics* 60(1):96-104.
- Lohr H, Ryu S, Driever W. 2009. Zebrafish diencephalic A11-related dopaminergic neurons share a conserved transcriptional network with neuroendocrine cell lineages. *Development* 136(6):1007-1017.
- López JM, Moreno N, González A. 2003. Ontogeny of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Brain Res Dev Brain Res* 140(1):29-43.
- López JM, Domínguez L, Morona R, Northcutt RG, González A. 2012. Organization of the cholinergic systems in the brain of two lungfishes, *Protopterus dolloi* and *Neoceratodus forsteri*. *Brain Struct Funct* 217(2):549-576.
- Lorente-Cánovas B, Marín F, Corral-San-Miguel R, Hidalgo-Sánchez M, Ferran JL, Puelles L, Aroca P. 2012. Multiple origins, migratory paths and molecular profiles of cells populating the avian interpeduncular nucleus. *Developmental biology* 361(1):12-26.
- Lowry CA, Renner KJ, Moore FL. 1996. Catecholamines and indoleamines in the central nervous system of a urodele amphibian: a microdissection study with emphasis on the distribution of epinephrine. *Brain Behav Evol* 48(2):70-93.
- Mackzowskiak F, Mateos S, Wang E, Roche D, Harland R, Monsoro-Burq AH. 2010. The Pax3 and Pax7 paralogs cooperate in neural and neural crest patterning using distinct molecular mechanisms, in *Xenopus laevis* embryos. *Developmental biology* 340(2):381-396.
- Maden M, Manwell LA, Ormerod BK. 2013. Proliferation zones in the axolotl brain and regeneration of the telencephalon. *Neural Dev* 8(1):1.
- Magno L, Oliveira MG, Mucha M, Rubin AN, Kessaris N. 2012. Multiple embryonic origins of nitric oxide synthase-expressing GABAergic neurons of the neocortex. *Front Neural Circuits* 6:65.
- Mansouri A, Goudreau G, Gruss P. 1999. Pax genes and their role in organogenesis. *Cancer Res* 59(7 Suppl):1707s-1709s; discussion 1709s-1710s.
- Manteuffel G, Naujoks-Manteuffel C. 1990. Anatomical connections and electrophysiological properties of toral and dorsal tegmental neurons in the terrestrial urodele *Salamandra salamandra*. *J Hirnforsch* 31(1):65-76.
- Marín O, Smeets WJ, González A. 1997a. Basal ganglia organization in amphibians: development of striatal and nucleus accumbens connections with emphasis on the catecholaminergic inputs. *J Comp Neurol* 383(3):349-369.
- Marín O, Smeets WJ, González A. 1997b. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of anuran (*Rana perezi*, *Xenopus laevis*) and urodele (*Pleurodeles waltl*) amphibians. *J Comp Neurol* 382(4):499-534.
- Marín O, Smeets WJ, González A. 1998. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *Trends Neurosci* 21(11):487-494.
- Marín O, González A. 1999. Origin of tectal cholinergic projections in amphibians: a combined study of choline acetyltransferase immunohistochemistry and retrograde transport of dextran amines. *Vis Neurosci* 16(2):271-283.
- Martin JB, Witherspoon NB, Keenleyside MHA. 1974. Analysis of feeding behavior in the newt *Notophthalmus viridescens*. *Canadian Journal of Zoology* 52(2):277-281.
- Matsumoto Y, Osumi N. 2008. [Role of Pax6 in the developing central nervous system]. *Brain Nerve* 60(4):365-374.
- Matsunaga E, Araki I, Nakamura H. 2000. Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development* 127(11):2357-2365.
- Mattson MP, Rychlik B, Chu C, Christakos S. 1991. Evidence for calcium-reducing and excitatory-protective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 6(1):41-51.
- Maulbecker CC, Gruss P. 1993. The oncogenic potential of Pax genes. *EMBO J* 12(6):2361-2367.
- McHedlishvili L, Epperlein HH, Telzerow A, Tanaka EM. 2007. A clonal analysis of neural progenitors during axolotl spinal cord regeneration reveals evidence for both spatially restricted and multipotent progenitors. *Development* 134(11):2083-2093.

- McHedlishvili L, Mazurov V, Grassme KS, Goehler K, Robl B, Tazaki A, Roensch K, Duemmler A, Tanaka EM. 2012. Reconstitution of the central and peripheral nervous system during salamander tail regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(34):E2258-2266.
- Medina L. 2008. Evolution and embryological development of forebrain. In: NH B, editor. *Encyclopedic reference of neuroscience*. Berlin: Springer. p 1172-1192.
- Medina L, Bupesh M, Abellán A. 2011. Contribution of genoarchitecture to understanding forebrain evolution and development, with particular emphasis on the amygdala. *Brain, behavior and evolution* 78(3):216-236.
- Megason SG, McMahon AP. 2002. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129(9):2087-2098.
- Merchán P, Bardet SM, Puelles L, Ferran JL. 2011. Comparison of Pretectal Genoarchitectonic Pattern between Quail and Chicken Embryos. *Front Neuroanat* 5:23.
- Metin C, Álvarez C, Moudoux D, Vitalis T, Pieau C, Molnar Z. 2007. Conserved pattern of tangential neuronal migration during forebrain development. *Development* 134(15):2815-2827.
- Mitashov VI. 1996. Mechanisms of retina regeneration in urodeles. *Int J Dev Biol* 40(4):833-844.
- Moreno N, López JM, Sánchez-Camacho C, González A. 2002. Development of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltli*. *J Chem Neuroanat* 23(2):105-121.
- Moreno N, Bachy I, Retaux S, González A. 2004. LIM-homeodomain genes as developmental and adult genetic markers of *Xenopus* forebrain functional subdivisions. *J Comp Neurol* 472(1):52-72.
- Moreno N, González A. 2007a. Regionalization of the telencephalon in urodele amphibians and its bearing on the identification of the amygdaloid complex. *Front Neuroanat* 1:1.
- Moreno N, González A. 2007b. Evolution of the amygdaloid complex in vertebrates, with special reference to the anamnio-amniotic transition. *J Anat* 211(2):151-163.
- Moreno N, González A. 2011. The non-evaginated secondary prosencephalon of vertebrates. *Front Neuroanat* 5:12.
- Moreno N, Retaux S, González A. 2008a. Spatio-temporal expression of Pax6 in *Xenopus* forebrain. *Brain research* 1239:92-99.
- Moreno N, González A, Retaux S. 2008b. Evidences for tangential migrations in *Xenopus* telencephalon: developmental patterns and cell tracking experiments. *Dev Neurobiol* 68(4):504-520.
- Moreno N, González A, Retaux S. 2009. Development and evolution of the subpallium. *Semin Cell Dev Biol* 20(6):735-743.
- Moreno N, Morona R, López JM, González A. 2010. Subdivisions of the turtle *Pseudemys scripta* subpallium based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. *J Comp Neurol* 518(24):4877-4902.
- Moreno N, Domínguez L, Morona R, González A. 2012. Subdivisions of the turtle *Pseudemys scripta* hypothalamus based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. *J Comp Neurol* 520(3):453-478.
- Moreno-Bravo JA, Pérez-Balaguer A, Martínez S, Puelles E. 2010. Dynamic expression patterns of Nkx6.1 and Nkx6.2 in the developing mes-diencephalic basal plate. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 239(7):2094-2101.
- Morona R, González A. 2008. Calbindin-D28k and calretinin expression in the forebrain of anuran and urodele amphibians: further support for newly identified subdivisions. *J Comp Neurol* 511(2):187-220.
- Morona R, González A. 2009. Immunohistochemical localization of calbindin-D28k and calretinin in the brainstem of anuran and urodele amphibians. *J Comp Neurol* 515(5):503-537.
- Morona R, Ferran JL, Puelles L, González A. 2011. Embryonic genoarchitecture of the pretectum in *Xenopus laevis*: a conserved pattern in tetrapods. *J Comp Neurol* 519(6):1024-1050.
- Morona R, González A. 2013. Pattern of calbindin-D28k and calretinin immunoreactivity in the brain of *Xenopus laevis* during embryonic and larval development. *J Comp Neurol* 521(1):79-108.
- Murakami Y, Ogasawara M, Satoh N, Sugahara F, Myojin M, Hirano S, Kuratani S. 2002. Compartments in the lamprey embryonic brain as revealed by regulatory gene expression and the distribution of reticulospinal neurons. *Brain Res Bull* 57(3-4):271-275.
- Murakami Y, Ogasawara M, Sugahara F, Hirano S, Satoh N, Kuratani S. 2001. Identification and expression of the lamprey Pax6 gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates. *Development* 128(18):3521-3531.
- Nacu E, Knapp D, Tanaka EM, Epperlein HH. 2009. Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) embryonic transplantation methods. *Cold Spring Harb Protoc* 2009(8):pdb prot5265.
- Nacu E, Tanaka EM. 2011. Limb regeneration: a new development? *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:409-440.
- Naujoks-Manteuffel C, Himstedt W, Gläsener-Cipollone G. 1994. Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the brain of adult and developing salamanders (*Pleurodeles waltli*, *Triturus alpestris*). *Cell and Tissue Research* 276(3):485-501.
- Nieuwenhuys R. 1967. Comparative anatomy of the cerebellum. *Prog Brain Res* 25:1-93.
- Nieuwkoop PD. 1996. What are the key advantages and disadvantages of urodele species compared to anurans as a model system for experimental analysis of early development? *Int J Dev Biol* 40(4):617-619.
- Noll M. 1993. Evolution and role of Pax genes. *Curr Opin Genet Dev* 3(4):595-605.
- Nöllert AN, C. 1992. Die Amphibien Europas. Bestimmung-Gefährdung-Schutz (Los anfibios de Europa. Identificación-Amenazas-Protección). Stuttgart: Franckh-Kosmos Verlags-GmbH.

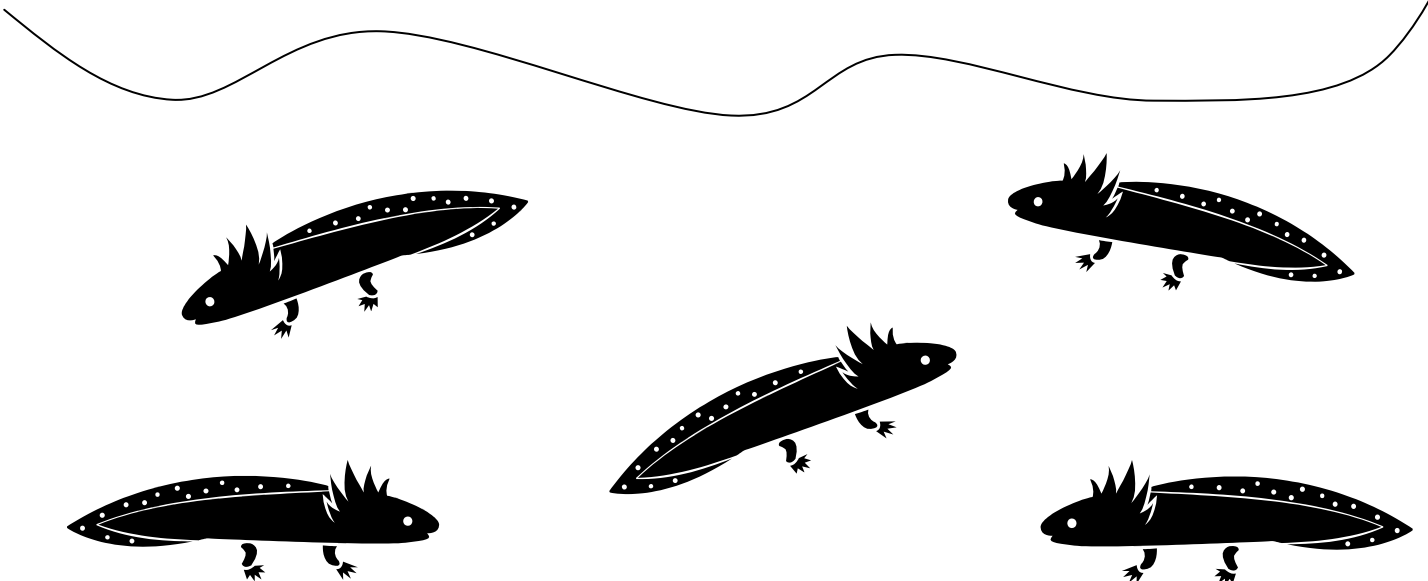
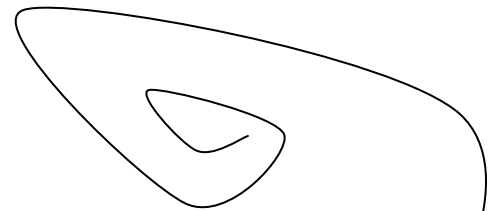
- Nomura T, Haba H, Osumi N. 2007. Role of a transcription factor Pax6 in the developing vertebrate olfactory system. *Development, growth & differentiation* 49(9):683-690.
- Northcutt RG. 1980. Organization of the amphibian telencephalon. In: Ebbesson SOE, editor. *Comparative Neurology of the Telencephalon*. New York Plenum. p 203-255.
- Northcutt RG. 1984. Evolution of the vertebrate central nervous system: patterns and processes. *Am Zool*:701-716.
- Northcutt RG. 1987. Lungfish neural characters and their bearing on sarcopterygian phylogeny. *J Morphol Suppl*. 1:277-297.
- Nye HL, Cameron JA, Chernoff EA, Stocum DL. 2003. Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development. *Dev Dyn* 226(3):555-560.
- O'Connell LA, Hofmann HA. 2011. The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *J Comp Neurol* 519(18):3599-3639.
- Ohyama K, Das R, Placzek M. 2008. Temporal progression of hypothalamic patterning by a dual action of BMP. *Development* 135(20):3325-3331.
- Opdam P, Nieuwenhuys R. 1976. Topological analysis of the brain stem of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J Comp Neurol* 165(3):285-306.
- Orr H. 1887. Contribution to the embryology of the lizard. *J Morphol*(1):311-372
- Osumi N, Hirota A, Ohuchi H, Nakafuku M, Iimura T, Kuratani S, Fujiwara M, Noji S, Eto K. 1997. Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development* 124(15):2961-2972.
- Palczewska M, Groves P, Batta G, Heise B, Kuznicki J. 2003. Calretinin and calbindin D28k have different domain organizations. *Protein Sci* 12(1):180-184.
- Parish CL, Beljajeva A, Arenas E, Simon A. 2007. Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced regeneration model. *Development* 134(15):2881-2887.
- Parmentier M. 1990. Structure of the human cDNAs and genes coding for calbindin D28k and calretinin. *Adv Exp Med Biol* 269:27-34.
- Pérez-Figares JM, Jiménez AJ, Rodríguez EM. 2001. Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microscopy research and technique* 52(5):591-607.
- Persechini A, Moncrief ND, Kretsinger RH. 1989. The EF-hand family of calcium-modulated proteins. *Trends Neurosci* 12(11):462-467.
- Pombal MA, Puelles L. 1999. Prosomeric map of the lamprey forebrain based on calretinin immunocytochemistry, Nissl stain, and ancillary markers. *J Comp Neurol* 414(3):391-422.
- Pombal MA, Megias M, Bardet SM, Puelles L. 2009. New and old thoughts on the segmental organization of the forebrain in lampreys. *Brain, behavior and evolution* 74(1):7-19.
- Porteros A, Arevalo R, Crespo C, Brinon JG, Weruaga E, Aijon J, Alonso JR. 1996. Nitric oxide synthase activity in the olfactory bulb of anuran and urodele amphibians. *Brain Res* 724(1):67-72.
- Prakash N, Puelles E, Freude K, Trumbach D, Omodei D, Di Salvio M, Sussel L, Ericson J, Sander M, Simeone A, Wurst W. 2009. Nkx6-1 controls the identity and fate of red nucleus and oculomotor neurons in the mouse midbrain. *Development* 136(15):2545-2555.
- Prakash N, Wurst W. 2006. Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons. *J Physiol* 575(Pt 2):403-410.
- Pratt T, Vitalis T, Warren N, Edgar JM, Mason JO, Price DJ. 2000. A role for Pax6 in the normal development of dorsal thalamus and its cortical connections. *Development* 127(23):5167-5178.
- Pritz MB, Ruan YW. 2009. PAX6 immunoreactivity in the diencephalon and midbrain of alligator during early development. *Brain Behav Evol* 73(1):1-15.
- Puelles L, Rubenstein JL. 1993. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16(11):472-479.
- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S, Rubenstein JL. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424(3):409-438.
- Puelles L. 2001. Brain segmentation and forebrain development in amniotes. *Brain research bulletin* 55(6):695-710.
- Puelles L, Rubenstein JL. 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26(9):469-476.
- Puelles E, Annino A, Tuorto F, Usiello A, Acampora D, Czerny T, Brodski C, Ang SL, Wurst W, Simeone A. 2004. *Otx2* regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* 131(9):2037-2048.
- Puelles L, Ferran JL. 2012. Concept of neural genoarchitecture and its genomic fundament. *Front Neuroanat* 6:47.
- Quintana-Urzaínqui I, Sueiro C, Carrera I, Ferreiro-Galve S, Santos-Duran G, Pose-Mendez S, Mazan S, Candal E, Rodríguez-Moldes I. 2012a. Contributions of developmental studies in the dogfish *Scyliorhinus canicula* to the brain anatomy of elasmobranchs: insights on the basal ganglia. *Brain, behavior and evolution* 80(2):127-141.
- Quintana-Urzaínqui I, Rodríguez-Moldes I, Candal E. 2012b. Developmental, tract-tracing and immunohistochemical study of the peripheral olfactory system in a basal vertebrate: insights on Pax6 neurons migrating along the olfactory nerve. *Brain Struct Funct*.
- Rath MF, Rohde K, Klein DC, Moller M. 2012. Homeobox Genes in the Rodent Pineal Gland: Roles in Development and Phenotype Maintenance. *Neurochem Res*.
- Remedios R, Subramanian L, Tole S. 2004. LIM genes parcellate the embryonic amygdala and regulate its development. *J Neurosci* 24(31):6986-6990.

- Resibois A, Rogers JH. 1992. Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 46(1):101-134.
- Roberts A, Soffe SR, Clarke JD, Dale N. 1983. Initiation and control of swimming in amphibian embryos. *Symp Soc Exp Biol* 37:261-284.
- Rodríguez EM, Rodríguez S, Hein S. 1998. The subcommissural organ. *Microscopy research and technique* 41(2):98-123.
- Rodríguez-Moldes I. 2009. A developmental approach to forebrain organization in elasmobranchs: new perspectives on the regionalization of the telencephalon. *Brain, behavior and evolution* 74(1):20-29.
- Rodríguez-Moldes I, Carrera I, Pose-Mendez S, Quintana-Urzainqui I, Candal E, Anadón R, Mazan S, Ferreiro-Galve S. 2011. Regionalization of the shark hindbrain: a survey of an ancestral organization. *Front Neuroanat* 5:16.
- Rodríguez-Moldes I, Ferreiro-Galve S, Carrera I, Sueiro C, Candal E, Mazan S, Anadón R. 2008. Development of the cerebellar body in sharks: spatiotemporal relations of Pax6 expression, cell proliferation and differentiation. *Neuroscience letters* 432(2):105-110.
- Rodríguez-Moldes I, Timmermans JP, Adriaensen D, De Groot-Lasseel MH, Scheuermann DW, Anadón R. 1990. Immunohistochemical localization of calbindin-D28K in the brain of a cartilaginous fish, the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). *Acta Anat (Basel)* 137(4):293-302.
- Rogers J, Khan M, Ellis J. 1990. Calretinin and other CaBPs in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 269:195-203.
- Rogers JH. 1987. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol* 105(3):1343-1353.
- Rogers JH, Resibois A. 1992. Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: patterns of partial co-localization. *Neuroscience* 51(4):843-865.
- Roth G, Naujoks-Manteuffel C, Grunwald W. 1990. Cytoarchitecture of the tectum mesencephali in salamanders: a Golgi and HRP study. *J Comp Neurol* 291(1):27-42.
- Roth GD, U.; Nishikawa, K. 1992. How do ontogeny, morphology and physiology of sensory systems constrain and direct the evolution of amphibians? *Am Nat*:S105-S124.
- Roth G, Nishikawa KC, Naujoks-Manteuffel C, Schmidt A, Wake DB. 1993. Paedomorphosis and simplification in the nervous system of salamanders. *Brain Behav Evol* 42(3):137-170.
- Safi R, Vlaeminck-Guillem V, Duffraisse M, Seugnet I, Plateroti M, Margotat A, Duterque-Coquillaud M, Crespi EJ, Denver RJ, Demeneix B, Laudet V. 2006. Paedomorphosis revisited: thyroid hormone receptors are functional in *Necturus maculosus*. *Evol Dev* 8(3):284-292.
- Salvador AG-P, M. 2001. Anfibios españoles. Identificación, historia natural y distribución. Talavera de la Reina: Canseco editores, S.L.
- Sánchez-Camacho C, Marín O, Ten Donkelaar HJ, González A. 2001. Descending supraspinal pathways in amphibians. I. A dextran amine tracing study of their cells of origin. *J Comp Neurol* 434(2):186-208.
- Sapir T, Geiman EJ, Wang Z, Velasquez T, Mitsui S, Yoshihara Y, Frank E, Álvarez FJ, Goulding M. 2004. Pax6 and engrailed 1 regulate two distinct aspects of rensaw cell development. *J Neurosci* 24(5):1255-1264.
- Schnapp E, Kragl M, Rubin L, Tanaka EM. 2005. Hedgehog signaling controls dorsoventral patterning, blastema cell proliferation and cartilage induction during axolotl tail regeneration. *Development* 132(14):3243-3253.
- Scholpp S, Lohs C, Brand M. 2003. Engrailed and Fgf8 act synergistically to maintain the boundary between diencephalon and mesencephalon. *Development* 130(20):4881-4893.
- Schwaller B, Meyer M, Schiffmann S. 2002. 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum* 1(4):241-258.
- Schwarz M, Álvarez-Bolado G, Dressler G, Urbanek P, Busslinger M, Gruss P. 1999. Pax2/5 and Pax6 subdivide the early neural tube into three domains. *Mech Dev* 82(1-2):29-39.
- Seo HC, Saetre BO, Havik B, Ellingsen S, Fjose A. 1998. The zebrafish Pax3 and Pax7 homologues are highly conserved, encode multiple isoforms and show dynamic segment-like expression in the developing brain. *Mech Dev* 70(1-2):49-63.
- Shi DL, Boucaut JL. 1995. The chronological development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (Michah). *Int J Dev Biol* 39:427 - 441.
- Shimizu N, Watanabe H, Kubota J, Wu J, Saito R, Yokoi T, Era T, Iwatsubo T, Watanabe T, Nishina S, Azuma N, Katada T, Nishina H. 2009. Pax6-5a promotes neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Biol Pharm Bull* 32(6):999-1003.
- Shin DH, Lee KS, Lee E, Chang YP, Kim JW, Choi YS, Kwon BS, Lee HW, Cho SS. 2003. Pax-7 immunoreactivity in the post-natal chicken central nervous system. *Anat Histol Embryol* 32(6):378-383.
- Short S, Holland LZ. 2008. The evolution of alternative splicing in the Pax family: the view from the basal chordate amphioxus. *J Mol Evol* 66(6):605-620.
- Simeone A, D'Apice MR, Nigro V, Casanova J, Graziani F, Acampora D, Avantaggiato V. 1994. Orthopedia, a novel homeobox-containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and *Drosophila*. *Neuron* 13(1):83-101.
- Sirko S, Neitz A, Mittmann T, Horvat-Brocker A, von Holst A, Eysel UT, Faissner A. 2009. Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex. *Brain* 132(Pt 8):2252-2264.
- Sjodal M, Gunhaga L. 2008. Expression patterns of Shh, Ptc2, Raldh3, Pitx2, Isl1, Lim3 and Pax6 in the developing chick hypophyseal placode and Rathke's pouch. *Gene Expr Patterns* 8(7-8):481-485.
- Soares JG, Botelho EP, Gattass R. 2001. Distribution of calbindin, parvalbumin and calretinin in the lateral geniculate nucleus and superior colliculus in *Cebus apella* monkeys. *J Chem Neuroanat* 22(3):139-146.

- Sobkow L, Epperlein HH, Herklotz S, Straube WL, Tanaka EM. 2006. A germline GFP transgenic axolotl and its use to track cell fate: dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration. *Developmental biology* 290(2):386-397.
- Soffe SR, Clarke JDW, Roberts A. 1983. Swimming and other centrally generated motor patterns in newt embryos. *J Comp Physiol* 152(4):535-544.
- Spemann H. 1921. Die Erzeugung tierischer Chimären durch heteroplastische embryonale Transplantation zwischen *Triton cristatus* und *taeniatus*. *W Roux Arch Entw Mech Org* 120:374-706.
- Spemann HM, H. . 1924. Über Induktion von Embryonanlage durch implantation artfremder Organisatoren. *WRoux Arch Entw Mech Org* 100:599-638.
- Stoykova A, Gruss P. 1994. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 14(3 Pt 2):1395-1412.
- Stoykova A, Treichel D, Hallonet M, Gruss P. 2000. Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J Neurosci* 20(21):8042-8050.
- Straka H, Baker R, Gilland E. 2006. Preservation of segmental hindbrain organization in adult frogs. *J Comp Neurol* 494(2):228-245.
- Stuart ET, Kioussi C, Gruss P. 1994. Mammalian Pax genes. *Annu Rev Genet* 28:219-236.
- Suga H, Tschopp P, Graziussi DF, Stierwald M, Schmid V, Gehring WJ. 2010. Flexibly deployed Pax genes in eye development at the early evolution of animals demonstrated by studies on a hydrozoan jellyfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Taban CH, Cathieni M. 1983. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the brain of the newt (*Triturus cristatus*). *J Comp Neurol* 216(4):453-470.
- Tanabe Y, Jessell TM. 1996. Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274(5290):1115-1123.
- Thomas T, Nowka K, Lan L, Derwahl M. 2006. Expression of endoderm stem cell markers: evidence for the presence of adult stem cells in human thyroid glands. *Thyroid* 16(6):537-544.
- Thompson J, Lovicu F, Ziman M. 2004. The role of Pax7 in determining the cytoarchitecture of the superior colliculus. *Development, growth & differentiation* 46(3):213-218.
- Thompson JA, Lovicu FJ, Ziman M. 2007. Pax7 and superior collicular polarity: insights from Pax6 (Sey) mutant mice. *Exp Brain Res* 178(3):316-325.
- Thompson JA, Zembrzycki A, Mansouri A, Ziman M. 2008. Pax7 is requisite for maintenance of a subpopulation of superior collicular neurons and shows a diverging expression pattern to Pax3 during superior collicular development. *BMC Dev Biol* 8:62.
- Thompson JA, Ziman M. 2011. Pax genes during neural development and their potential role in neuroregeneration. *Progress in neurobiology* 95(3):334-351.
- Thummel R, Enright JM, Kassen SC, Montgomery JE, Bailey TJ, Hyde DR. 2010. Pax6a and Pax6b are required at different points in neuronal progenitor cell proliferation during zebrafish photoreceptor regeneration. *Exp Eye Res* 90(5):572-582.
- Ulfing N. 2002. Calcium-binding proteins in the human developing brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 165:III-IX, 1-92.
- Underhill DA. 2000. Genetic and biochemical diversity in the Pax gene family. *Biochem Cell Biol* 78(5):629-638.
- Underhill DA. 2012. PAX proteins and fables of their reconstruction. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 22(2):161-177.
- van den Akker WM, Brox A, Puelles L, Durston AJ, Medina L. 2008. Comparative functional analysis provides evidence for a crucial role for the homeobox gene *Nkx2.1/Titf-1* in forebrain evolution. *J Comp Neurol* 506(2):211-223.
- Veccello M, Schwaller B, Meyer M, Hunziker W, Celio MR. 2000. Alterations in Purkinje cell spines of calbindin D-28 k and parvalbumin knock-out mice. *Eur J Neurosci* 12(3):945-954.
- Vieira C, Garda AL, Shimamura K, Martínez S. 2005. Thalamic development induced by Shh in the chick embryo. *Dev Biol* 284(2):351-363.
- Vigh-Teichmann I, Vigh B, Aros B. 1970. Ultrastructure of the CSF contacting neurons of the preoptic nucleus in the newt, *Triturus cristatus*. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 18(4):383-394.
- Villar-Cervino V, Barreiro-Iglesias A, Mazan S, Rodicio MC, Anadón R. 2011. Glutamatergic neuronal populations in the forebrain of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 519(9):1712-1735.
- Vitalis T, Cases O, Engelkamp D, Verney C, Price DJ. 2000. Defect of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor Pax6. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(17):6501-6516.
- Vogan KJ, Underhill DA, Gros P. 1996. An alternative splicing event in the Pax-3 paired domain identifies the linker region as a key determinant of paired domain DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* 16(12):6677-6686.
- Volpe P, Krause KH, Hashimoto S, Zorzato F, Pozzan T, Meldolesi J, Lew DP. 1988. "Calciosome," a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store of nonmuscle cells? *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(4):1091-1095.
- Vorobyov E, Horst J. 2004. Expression of two protein isoforms of PAX7 is controlled by competing cleavage-polyadenylation and splicing. *Gene* 342(1):107-112.
- Voss SR, Epperlein HH, Tanaka EM. 2009. *Ambystoma mexicanum*, the axolotl: a versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies. *Cold Spring Harb Protoc* 2009(8):pdb emo128.
- Vue TY, Aaker J, Taniguchi A, Kazemzadeh C, Skidmore JM, Martin DM, Martin JF, Treier M, Nakagawa Y. 2007. Characterization of progenitor domains in the developing mouse thalamus. *J Comp Neurol* 505(1):73-91.
- Wada H, Saiga H, Satoh N, Holland PW. 1998. Tripartite organization of the ancestral chordate brain and the antiquity

- of placodes: insights from ascidian Pax-2/5/8, Hox and Otx genes. *Development* 125(6):1113-1122.
- Wake MH. 1982. Diversity within a framework of constraints: reproductive modes in amphibians. In: Mossalowski MR, G, editor. *Environmental adaptation and evolution, a theoretical and empirical approach*. Stuttgart: Fisher, G. p 87-106.
- Wake MH. 1989. Phylogenesis of direct development and viviparity in vertebrates. In: Wake DR, G, editor. *Complex Organismal Functions: Integration and Evolution in Vertebrates*. New York: John Wiley & Sons Ltd. p 235-250.
- Walther C, Gruss P. 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113(4):1435-1449.
- Wang Q, Fang WH, Krupinski J, Kumar S, Slevin M, Kumar P. 2008. Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. *J Cell Mol Med* 12(6A):2281-2294.
- Wang W, Lufkin T. 2000. The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol* 227(2):432-449.
- Wang W, Zhong J, Wang YQ. 2010. Comparative genomic analysis reveals the evolutionary conservation of Pax gene family. *Genes Genet Syst* 85(3):193-206.
- Warren J. 1905. The development of the paraphysis and the pineal region in *Necturus maculatus*. *American Journal of Anatomy* 5(1):1-27.
- Wasserman RH, Taylor AN, Kallfelz FA. 1966. Vitamin D and transfer of plasma calcium to intestinal lumen in chicks and rats. *Am J Physiol* 211(2):419-423.
- Watson C. 2012. Hindbrain. In: Watson CP, G.; Puelles, L., editor. *The mouse nervous system: Academic Press-Elsevier*. p 398-423.
- Wehr R, Gruss P. 1996. Pax and vertebrate development. *Int J Dev Biol* 40(1):369-377.
- Wiens J, Bonett R, Chippindale P. 2005. Ontogeny discombobulates phylogeny: paedomorphosis and higher-level salamander relationships. *Syst Biol* 54(1):91-110.
- Wilson L, Maden M. 2005. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282(1):1-13.
- Wilson SW, Houart C. 2004. Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* 6(2):167-181.
- Winner B, Desplats P, Hagl C, Klucken J, Aigner R, Ploetz S, Laemke J, Karl A, Aigner L, Masliah E, Buerger E, Winkler J. 2009. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Exp Neurol* 219(2):543-552.
- Wong CJ, Liversage RA. 2005. Limb developmental stages of the newt *Notophthalmus viridescens*. *Int J Dev Biol* 49(4):375-389.
- Wullmann MF, Rink E. 2001. Detailed immunohistology of Pax6 protein and tyrosine hydroxylase in the early zebrafish brain suggests role of Pax6 gene in development of dopaminergic diencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 131(1-2):173-191.
- Yan Q, Gong L, Deng M, Zhang L, Sun S, Liu J, Ma H, Yuan D, Chen PC, Hu X, Qin J, Xiao L, Huang XQ, Zhang J, Li DW. 2010. Sumoylation activates the transcriptional activity of Pax-6, an important transcription factor for eye and brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(49):21034-21039.
- Zhang Y, Call MK, Yeh LK, Liu H, Kochel T, Wang JJ, Chu PH, Taketo MM, Jester JV, Kao WW, Liu CY. 2010. Aberrant expression of a beta-catenin gain-of-function mutant induces hyperplastic transformation in the mouse cornea. *J Cell Sci* 123(Pt 8):1285-1294.
- Zhao S, Jiang H, Wang W, Mao B. 2007. Cloning and developmental expression of the *Xenopus* Nkx6 genes. *Dev Genes Evol* 217(6):477-483.

2. Expresión de proteínas ligantes de calcio en el SNC a lo largo del desarrollo de *Pleurodeles waltl*



Regional distribution of calretinin and calbindin-D28k expression in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* during embryonic and larval development

Alberto Joven · Ruth Morona · Nerea Moreno · Agustín González

Received: 7 May 2012 / Accepted: 7 July 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract The sequence of appearance of calretinin and calbindin-D28k immunoreactive (CRir and CBir, respectively) cells and fibers has been studied in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Embryonic, larval and juvenile stages were studied. The early expression and the dynamics of the distribution of CBir and CRir structures have been used as markers for developmental aspects of distinct neuronal populations, highlighting the accurate extent of many regions in the developing brain, not observed on the basis of cytoarchitecture alone. CR and, to a lesser extent, CB are expressed early in the central nervous system and show a progressively increasing expression from the embryonic stages throughout the larval life and, in general, the labeled structures in the developing brain retain their ability to express these proteins in the adult brain. The onset of CRir cells primarily served to follow the development of the olfactory bulbs, subpallium, thalamus, alar hypothalamus, mesencephalic tegmentum, and distinct cell populations in the rhombencephalic reticular formation. CBir cells highlighted the development of, among others, the pallidum, hypothalamus, dorsal habenula, midbrain tegmentum, cerebellum, and central gray of the rostral rhombencephalon. However, it was the relative and mostly segregated distribution of both proteins in distinct cell populations which evidenced the developing regionalization of the brain. The results have shown the usefulness in neuroanatomy of the analysis during development of the onset of CBir and CRir structures, but the comparison with previous data has shown extensive variability across vertebrate classes. Therefore, one should be

cautious when comparing possible homologue structures across species only on the basis of the expression of these proteins, due to the variation of the content of calcium-binding proteins observed in well-established homologous regions in the brain of different vertebrates.

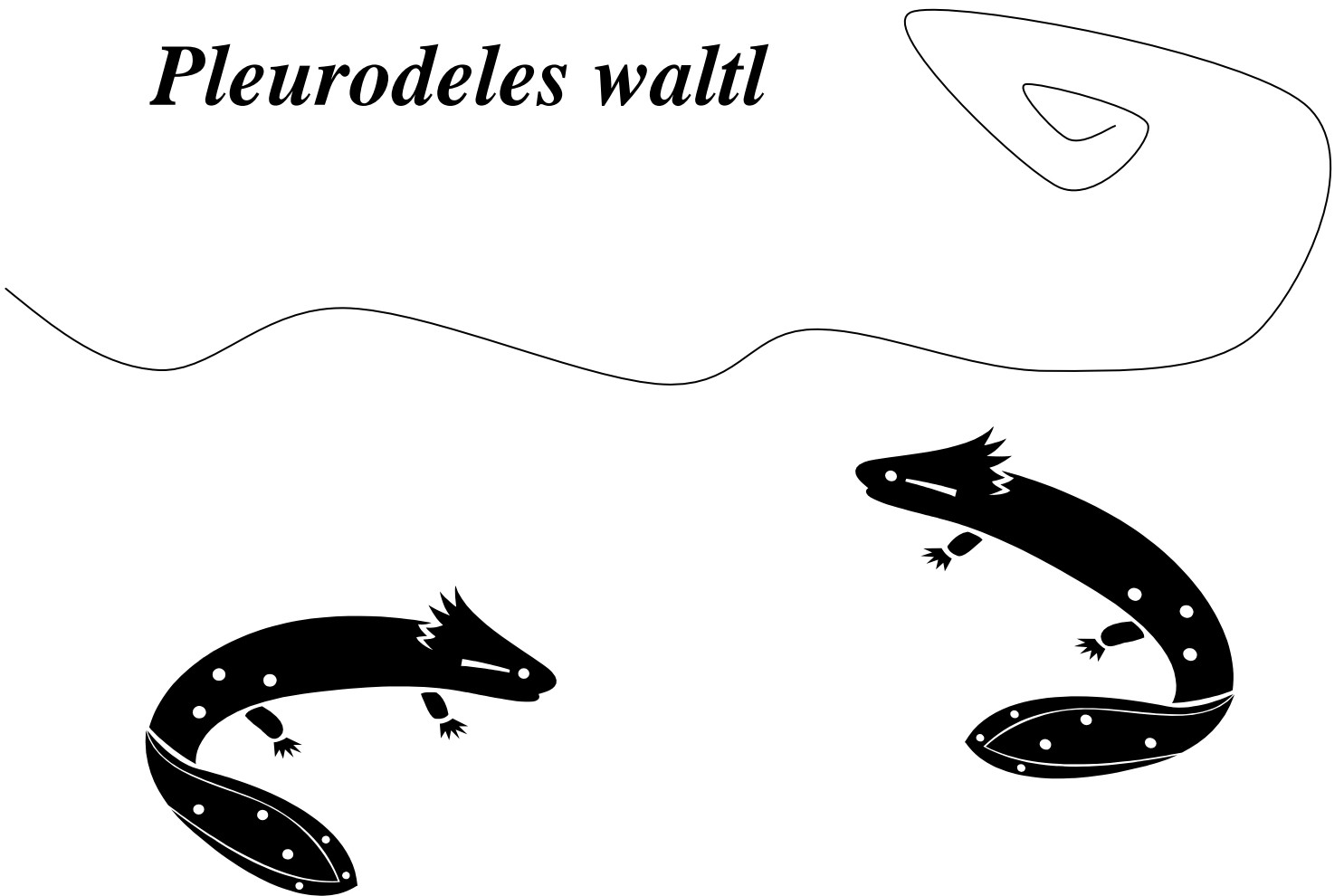
Keywords Calcium-binding proteins · Telencephalon · Thalamus · Brainstem · Evolution · Amphibians

Abbreviations

A	Anterior thalamic nucleus
ac	Anterior commissure
Ac	Anterior thalamic nucleus (caudal part)
Acc	Nucleus accumbens
Ad	Anterodorsal tegmental nucleus
Ahy	Anterior lobe of the hypophysis
AOB	Accessory olfactory bulb
AOL	Area octavolateralis
Ar	Anterior thalamic nucleus (rostral part)
Av	Anteroventral tegmental nucleus
b	Basal mesencephalic band
bpp1	P1 basal plate
BST	Bed nucleus of stria terminalis
C	Central thalamic nucleus
Cb	Cerebellum
cc	Central canal of spinal cord
CeA	Central amygdala
Co	Commissural pretectal domain
DCN	Dorsal column nucleus
dh	Dorsal horn of spinal cord
Dien	Diencephalon
DN	Dorsal nucleus of the AOL
Dp	Dorsal pallium
EC	Epichiasmatic nucleus
epi	Epiphysis

A. Joven · R. Morona · N. Moreno · A. González (✉)
Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología,
Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain
e-mail: agustin@bio.ucm.es

3. Expresión de los factores de transcripción Pax en desarrollo del SNC de *Pleurodeles waltl*



Spatiotemporal Patterns of Pax3, Pax6 and Pax7 Expression in the Developing Brain of a Urodele Amphibian, *Pleurodeles waltl*

Alberto Joven, Ruth Morona, Agustín González and Nerea Moreno*

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

ABSTRACT

The onset and developmental dynamics of Pax3, Pax6 and Pax7 expressions were analyzed by immunohistochemical techniques in the CNS of embryos, larvae and recently metamorphosed juveniles of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. During the embryonic period, the Pax proteins start being detectable in neuroepithelial domains. Subsequently, they become restricted to subsets of cells in distinct brain regions, maintaining different degrees of expression in late larvae and juvenile brains. Specifically, Pax6 is broadly expressed all along the urodele CNS (olfactory bulbs, pallium, basal ganglia, diencephalon, mesencephalic tegmentum, rhombencephalon and spinal cord) and the developing olfactory organ and retina. Pax3 and Pax7 are excluded from the rostral forebrain and were usually observed in overlapping regions during embryonic development, whereas Pax3

expression is highly downregulated as development proceeds. Thus, Pax3 is restricted to the roof plate of prosomere 2, pretectum, optic tectum, rhombencephalon, and spinal cord. Comparatively, Pax7 was more conspicuous in all these regions. Pax7 cells were also found in the paraphysis, intermediate lobe of the hypophysis, and basal plate of prosomere 3. Our data show that the expression patterns of the three Pax genes studied are overall evolutionary conserved, and therefore could unequivocally be used to identify subdivisions in the urodele brain similarly to other vertebrates, that are not clearly discernable with classical techniques. In addition, the spatiotemporal sequences of expression provide indirect evidences of putative migratory routes across neuromeric limits and the alar-basal boundary.

©2013 Wiley Periodicals, Inc.

INDEXING TERMS: Pax genes; immunohistochemistry; segmental organization; telencephalon; diencephalon; mesencephalon; brain evolution

The Pax gene family encodes proteins that are transcription factors and play key roles in embryonic development (Chalepakis et al., 1993; Czerny et al., 1993). In particular, Pax3, Pax6 and Pax7 genes are of special relevance in the correct development of the central nervous system (CNS) (Mansouri et al., 1994; Stoykova and Gruss 1994; Stuart et al 1994; Kawakami et al., 1997; Murakami et al., 2001; Derobert et al., 2002; Haubst et al., 2004; Pritz and Ruan, 2009). Importantly, the proteins encoded by these three genes are highly conserved (Goulding et al., 1993; Matsuo et al., 1993; Epstein et al., 1994; Li et al., 1994, 1997; Kallur et al., 2008) and the deduced amino acid sequences show more than 85% overall identity across vertebrates (Callaerts et al 1997; Hirsch and Harris, 1997; Seo et al., 1998).

From early development, the Pax genes display dynamic spatiotemporal expression patterns and, in coordination with other factors, are essentially involved in brain patterning including cell proliferation and boundary specification (CNS regionalization) at early stages, and orchestrate and maintain differentiation of specific cell subtypes (Stoykova and Gruss, 1994; Kawakami

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Spanish Ministry of Science and Technology. Grant number: BFU2012-31687.

*CORRESPONDENCE TO: Nerea Moreno, PhD, Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. E-mail: nerea@bio.ucm.es

Received January 30, 2013; Revised April 17, 2013; Revised May 17, 2013; Accepted May 27, 2013

et al., 1997; Mastick et al., 1997; Ziman et al., 2001; Haubst et al., 2004; Nural and Mastick, 2004; Thompson et al., 2004, 2007; Ahsan et al., 2007; Lang et al., 2007).

The CNS of urodeles is only roughly segregated into cell clusters that can be hardly identified as nuclei. Actually, most neurons are grouped in a thick periventricular layer, and cell migration can be observed only in discrete brain regions (see ten Donkelaar, 1998). However, in early studies of comparative neuroanatomy it was suggested that the brain of urodeles possesses all major features characteristic of the brain of tetrapods (Herrick, 1927, 1948; Kicliter and Ebbesson, 1976; Fritsch and Himstedt, 1980; Northcutt and Kicliter, 1980), although in a simplified organization possibly acquired secondarily (Northcutt, 1987; Roth et al., 1992, 1993). Thus, the brain of urodeles was used as a model, particularly in developmental studies

because the long and slow embryonic and larval development of urodeles facilitates that stage-specific interactions can be precisely isolated allowing separation of important events that in other models occur rapidly (Pasteels, 1942; Nieuwkoop, 1955; Jacobson, 1959; Cleine and Slack, 1985; Eagleson, 1996; Nieuwkoop, 1996). However, with the introduction of new techniques in neuroanatomy, there has been an unparallel increase in our knowledge of the detailed organization of the CNS of other tetrapods (mainly amniotes) compared to urodeles. This is particularly noticeable in developmental studies where, instead of seasonal breeding urodeles, *Xenopus laevis* is often used as the amphibian model mainly because the convenience of “hormone induced” breeding, which this species permits, making embryos available for experimentation at all times of the year.

Abbreviations

Acc	nucleus accumbens	p1-3	prosomerens 1-3
al	anterior lobe of the hypophysis	p1-3b	basal part of prosomerens 1-3
aol	octavolateral area	p1a	pretectum
BST	bed nucleus of the stria terminalis	p2a	thalamus
Cb	cerebellum	p3a	prethalamus
cc	central canal	PA	pallidum
ce	ciliary epithelium	par	paraphysis
CeA	central amygdala	PO	preoptic area
DB	diagonal band of Brocca	PT	pretectum
dh	dorsal horn	PTh	prethalamus
Di	diencephalon	PThE	prethalamie eminence
Dp	dorsal pallium	r0	isthmus (rhombomere 0)
epi	epiphysis	r1-8	rhombomeres 1-8
Gc	central gray	r1r	rostral portion of rhombomere 1
Hb	habenula	Ra	raphe column
Hyp	hypothalamus	Rh	rhombencephalon
IIIv	third ventricle	Ri	inferior reticular nucleus
il	intermediate lobe of the hypophysis	Rm	medial reticular nucleus
Ip	interpeduncular nucleus	Rs	superior reticular nucleus
IVv	fourth ventricle	sc	spinal cord
LA	lateral amygdala	sco	subcommissural organ
LC	locus coeruleus	Sd	septum dorsalis
LDT	laterodorsal tegmental nucleus	Se	septum
LL	lateral line nuclei	SP	subpallium
Lp	lateral pallium	SPV	supraoptoparaventricular region
Ma	mammillary area	Str	striatum
MeA	medial amygdala	svz	subventricular zone
Mes	mesencephalon	Tel	telencephalon
Mp	medial pallium	tgd	dorsal tegmentum
mz	mantle zone	Th	thalamus
ncl	neuronal cell layer	Ts	torus semicircularis
OB	olfactory bulb	Tu	tuberal area
olf	olfactory organ	Vm	motor trigeminal nucleus
OT	optic tectum	vz	ventricular zone
P	pallium		

In our group, and others, many aspects of brain organization in urodeles were investigated with tract-tracing techniques and immunohistochemistry (Wicht and Himstedt, 1988; Barroso et al., 1993; González et al., 1993; Krug et al., 1993; Marín et al., 1997a-d; Westhoff and Roth, 2002; Laberge and Roth, 2005). A few of these studies included developmental analysis of connectivity and neurotransmitter systems (Marín et al., 1997e; González et al., 1995; Moreno et al., 2002; López et al. 2003). Recently, we have reported the conspicuous distribution of Pax6, Pax7 and, to a lesser extent, Pax3 (paralogous to Pax7) in the adult brain of the newt *Pleurodeles waltl*, allowing us to identify cell groups and boundaries previously undetected by other techniques (Joven et al., 2013). In the present study we have analyzed the distribution of Pax3-, Pax6- and Pax7-immunoreactive cells (Pax3, Pax6 and Pax7 cells, respectively) during the embryonic and larval development of *P. waltl*. The immunohistochemical techniques employed have been shown to allow high-resolution analysis of expressing cells (Hitchcock et al., 1996; Wullimann and Rink, 2001; González and Northcutt, 2009; Ferreiro-Galve et al., 2012a,b; Joven et al., 2013). Our aim was to determine if the pattern of expression in urodeles was similar to that of other vertebrates, and propose homologies across vertebrates on the basis of the expression patterns observed throughout ontogenesis. As in our previous study of the adult brain, we have used the combined analysis of the Pax protein distributions with those of other transcription factors (Nkx2.1, Nkx2.2, Nkx6.1 and Otp) and neuronal markers (calbindin D-28k, CB; calretinin, CR; choline acetyl-transferase, ChAT; tyrosine hydroxylase, TH). These experiments were useful to clarify the actual position of many cell groups, to identify distinct boundaries and to follow the relative position of developing cell subpopulations, which help in bringing a better understanding of brain organization in urodele amphibians.

MATERIAL AND METHODS

Animals and tissue processing

For the present study, a total of 82 embryos, larvae and juveniles of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* were used. The animals were

obtained from the laboratory stock of the Department of Cell Biology, University Complutense of Madrid. Embryos and larvae were collected after spontaneous breeding and kept in tap water at 20–25 °C. They were fed free-living *Artemia* during early development and dried pellets in the case of late larvae. All animals were treated according to the regulations and laws of the European Union (2010/63/EU) and Spain (Royal Decree 53/2013) for care and handling of animals in research, after approval from the Complutense University to conduct the experiments described. Embryos and larvae were staged according to Gallien and Durocher (1957), and sorted into five main periods: embryonic life (25-34), initial larval life (35-39), early active period (40-45), late active larvae (45-55c) and juveniles (56). At appropriate times, the animals were deeply anesthetized by immersion in a 0.4 mg/ml solution of tricaine methanesulfonate (MS222, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) and perfused transcardially with 0.9% NaCl, followed by the fixative MEMFA (0.1M MOPS [4-morpholinepropanesulphonic acid], 2mM EGTA [ethylene glycol tetracetic acid], 1mM MgSO₄, 3.7% formaldehyde). The brain, eyes, olfactory organs, and spinal cord were dissected out and postfixed approximately 3-4 hours in the same fixative solution at 4 °C. At early developmental stages, when perfusion was technically impossible (between stages 26 and 47), the whole animal was fixed by immersion and processed. After fixation, the brains were immersed in a solution of 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4), until they sank. For sectioning on a freezing microtome (Thermo Scientific Microm HM 450) the tissue was embedded in a solution of 20% gelatin with 30% sucrose in PB, and stored overnight in a 4% formaldehyde solution with 30% sucrose in PB at 4°C. For sectioning on a cryostat at -30 °C (Leica CM1850), tissue was pre-embedded at 37 °C overnight in 3.5% gelatin with 30% sucrose in PB, subsequently embedded in 7.5% gelatin with 30% sucrose in PB, and quickly frozen with dry ice. In both cases, brains were sectioned at 14-30 µm in the transverse, sagittal or horizontal planes. Sections were collected in PB (free-floating) or on SuperFrost slides (Thermo Scientific Menzel Gläser Superfrost plus) in three-four series of adjacent sections. In some cases, for antigen retrieval the slides were treated with Citrate

Buffer, pH=6 (10mM sodium citrate dehydrate, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) for 25 minutes at 70°C, followed by 25 minutes at room temperature, and then rinsed again in PB just before the immunohistochemical procedure.

Immunohistochemistry

Immunohistofluorescence procedures were conducted for different primary antibodies, all of which were diluted in 5–10% normal goat serum in PB with 0.1% Triton X-100 (PBT; Sigma, St. Louis, MO) and 2% bovine serum albumin (BSA, Sigma). Different protocols were carried out on free-floating sections, with incubation in the

primary antibodies for 72 hours at 4°C, or for 16–24 hours at room temperature in the antigen retrieval pre-treated slides. The dilution of each primary antibody used is detailed in Table 1.

Single-staining protocols for the detection of Pax6, Pax7 and Pax3 were carried out on the free-floating sections or on the slides as follows: 1) Incubation for 72 hours at 4°C (free-floating sections) or 16–24 hours at room temperature (slides) in the dilution of each primary serum (see Table 1) in PBT. 2) According to the species in which the primary antibody was raised, the second incubations were conducted with the appropriately labeled secondary antibody diluted

TABLE 1.

List of Primary Antibodies

Name	Immunogen	Commercial supplier	MW (kDa)	Dilution
CB _m	<i>E. coli</i> -produced recombinant rat calbindin D-28k	Monoclonal mouse anti-calbindin D-28k; Swant, Bellinzona, Switzerland; catalog No. 300	28	1:500
CB _r	<i>E. coli</i> -produced recombinant rat calbindin D-28k	Polyclonal rabbit anti-calbindin D-28k; Swant, Bellinzona, Switzerland; catalog No. CB-38a	28	1:500
ChAT	Human placental choline acetyltransferase	Polyclonal goat anti-ChAT; Chemicon; catalogue No. AB144P	68	1:100
CR	<i>E. coli</i> -produced recombinant human calretinin	Polyclonal rabbit anti-calretinin; Swant, Bellinzona, Switzerland; catalog No. 7699/4	29	1:1,000
Nkx2.1	Amino acids 110–122 from the amino terminus	Polyclonal rabbit anti-TTF; Biopat Immunotechnologies, Caserta, Italy; catalogue No. PA 0100	42-37	1:500
Nkx2.2	<i>E. coli</i> -derived recombinant chick NKX2.2 NK2 transcription factor related	Monoclonal mouse anti-NKX2.2; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA; catalogue No. 74.5A5	30	1:500
Nkx6.1	<i>E. coli</i> -derived recombinant rat GST- Nkx6.1. aa 299-365 of the C-terminal region of the rat Nkx6.1	Monoclonal mouse anti-Nkx6.1; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA; catalogue No. F55A10	44-46	1:500
Otp	Amino acid sequence: RKALEHTVMSFT of the C-terminal OTP	Polyclonal rabbit anti-Otp; Pickcell Laboratories, Kruislaan, Amsterdam, The Netherlands	34	1:500
Pax3	<i>E. coli</i> -derived recombinant quail PAX3. aa 298-481 of the C-terminal region of the quail Pax3	Monoclonal mouse anti-Pax3; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA; catalogue No. PAX3	42	1:250
Pax6 _m	<i>E. coli</i> -derived recombinant chick PAX6. aa 1–223 of the chick Pax6	Monoclonal mouse anti-Pax6; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA; catalogue No. PAX6	46	1:250
Pax6 _r	Peptide sequence: QVPGSEPDMSQY-WPRLQ of the C-terminus of the mouse PAX6 protein	Polyclonal rabbit anti-Pax6; Covance, California, USA; catalogue No. PBR-278	46	1:300
Pax7	<i>E. coli</i> -derived recombinant chick PAX7. aa 352-523 of the chick Pax7	Monoclonal mouse anti-Pax7; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA; catalogue No. PAX7	55	1:500
TH _r	Protein purified from rat pheochromocytoma	Polyclonal rabbit anti-TH; Chemicon International, Inc, USA; catalogue No. AB152	62	1:1,000
TH _m	TH purified from rat PC12 cells	Monoclonal mouse anti-TH; ImmunoStar, Hudson, WI; catalogue No. 22941	62	1:1,000

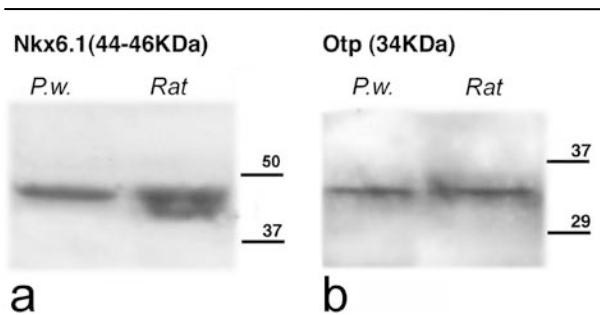


Figure 1. Identification by Western blots of protein bands recognized in *Pleurodeles waltl* for the mouse anti-Nkx6.1 antibody (a), and rabbit anti-Otp antiserum (b). The bands seen in each of the lanes corresponding to the urodele brain extracts are compared with the corresponding band stained for rat brain extracts. The expected molecular weight is indicated for each transcription factor, and the molecular weight standard is represented on the right of each photograph.

1:500 for 90 minutes at room temperature: Alexa 594-conjugated goat anti-rabbit (red fluorescence; Molecular Probes, Eugene, OR; catalog reference: A11037) or Alexa 488-conjugated goat anti-mouse (green fluorescence; Molecular Probes; catalog reference: A21042). In all cases, after being rinsed, the sections were mounted on glass slides and coverslipped with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA; catalog number: H1000). For bright-field immunohistochemistry, sections were rinsed twice in PB, treated with 1% H₂O₂ in PB for 10 minutes to reduce endogenous peroxidase activity, rinsed again three times in PB, and incubated in the primary antibody dilution with 0.025% Triton in PB, as above. Subsequently, they were rinsed in PB for 10 minutes and incubated in the secondary antibodies, biotin-conjugated horse anti-mouse (diluted 1:100 in PBT; Vector Laboratories, Burlingame, CA) or biotin-conjugated swine anti-rabbit (diluted 1:50 in PBT; Dako, Glostrup, Denmark), for 90 minutes at room temperature. After rinsing, the sections were stained with DAB using an ABC Kit (Vector Labs, Burlingame, CA) for 60 minutes at room temperature. The free-floating sections were then mounted on glass slides from a solution of 0.25 % gelatin in 0.05 M Tris-HCl buffer (TB, pH 7.6) and, after dehydration, the slides were coverslipped with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

Double immunohistofluorescence

To study the relative distribution of two proteins in the same sections, a two-step protocol for immunohistofluorescence was used, with cocktails of pairs of primary antibodies (always developed in different species), at the same dilutions and conditions specified in Table 1. According to the species in which the primary antibody was raised, the second incubations were conducted with the appropriate fluorescent-labeled secondary antibody cocktails diluted in PB, for 90 minutes at room temperature: Alexa 594- conjugated goat anti-rabbit (1:500), Alexa 488-conjugated goat anti-mouse (1:500), or Alexa 594-conjugated chicken anti-rabbit (1:500; Molecular Probes; catalog reference: A21442). In all cases, sections were stained with the nuclear marker H \ddot{o} echst (Sigma-Aldrich) to facilitate interpretation of the results, and after being rinsed, the sections were mounted on glass slides and coverslipped with Vectashield.

Western blotting analysis

Two animals were anesthetized in MS222, and the brains were quickly removed and mechanically homogenized in an equal volume of cold buffer (5 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Nonidet P40; Roche, Mannheim, Germany) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (50 μ g/ml phenylmethyl-sulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 25 μ g/ml leupeptin, and 100 nM orthovanadate; all from Sigma). Samples of the supernatants, each containing 50 μ g of protein were applied in each lane of a 12% polyacrylamide gel (#161-0801, Bio-Rad, Hercules, CA) and separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with a Mini-Protean system (Bio-Rad). Samples of a rat brain and molecular weight standards (Precision Plus Protein Dual color Standards, Bio-Rad) were run in other lanes. The separated samples in the gel were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Nonspecific binding sites were blocked by incubation overnight in Tris-HCl buffer (TBS) containing 0.1% Tween-20 (TBST) and 5% nonfat milk, at 4°C. The blots were then incubated for 24 hours at 4°C in primary antibody dilution. After rinsing in TBS, the blots were incubated in horseradish peroxidase-coupled secondary goat anti-mouse

or goat anti-rabbit antisera (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; diluted 1:15,000) for 2 hours at room temperature. Immunoreactive bands were detected by using an enhanced chemiluminescence system (Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL). Photographs were taken after applying an autoradiographic film to the membrane, in the darkness, for 1-4 minutes.

Controls and specificity of the antibodies

General controls for the immunohistochemical reaction included: 1) western blot (see the previous section), 2) staining some selected sections with preimmune mouse, rabbit or goat serum instead of the primary antibody; 3) controls in which either the primary and/or the secondary antibody was omitted. In all these negative controls, the immunostaining was eliminated. In addition, all the antibodies used have been tested, under identical conditions, in tissues devoid of antigen (rat brain slices at levels revealing no expression), as negative control, and in tissues positive for the antigen (rat brain slices at levels expressing the antigen). In all cases, the controls were satisfactory. The specificity of the antibodies used has been assessed by the commercial companies (Table 1), and, in addition, western blotting was conducted for the Nkx6.1 and Otp antibodies, not used in our previous studies (see below). The western blots of brain extract of *Pleurodeles waltl* showed that all antibodies used labeled a single band, which with small variations corresponded well with the bands labeled in the rat lanes (Fig. 1; Morona and González, 2008; 2009; Joven et al., 2013). In the cases of Pax6, CB and TH, monoclonal and polyclonal antibodies were used (Table 1) with fully comparable results in the pattern of immunostaining.

The specificity of the antibodies against CB and CR was assessed by the commercial supplier (Swant; see Table 1). Particularly in anurans (*Xenopus laevis* and *Rana perezi*) and urodeles (*Pleurodeles waltl* and *Ambystoma tigrinum*), the specificity was reported in a previous study (Morona and González 2008), in which the same pattern of staining was observed, and the western blots showed that the antibodies labeled a single band between 28 and 29 kDa that

corresponded well to the band labeled in the rat lane (see Morona and González, 2008).

The ChAT antiserum used was raised against human placental ChAT, and its specificity was analyzed by immunoblot (and western blot) performed in rat, guinea pig, and rabbit in which a band in the range of 68–70 kDa was always observed (see manufacturer's data sheet). In addition, western blot analysis of protein extracts from brains of dogfish, sturgeon, trout, and diverse amphibians, including *Pleurodeles waltl*, showed the presence of similar bands of 68–72 kDa (Anadón et al., 2000; Morona and González, 2009). The band observed in the western blot from *Pleurodeles* (see Morona and González, 2009) corresponded to that of the rat brain extract at the expected molecular weight in relation to the published nucleotide sequence for rat ChAT (NCBI accession number XM_001061520). Furthermore, the staining with this antibody colocalizes with the mRNA distribution of the same enzyme by in situ hybridization probe (Oh et al., 1992).

Thyroid Transcription Factor 1 (known as TTF-1 or Nkx2.1) is a homeodomain containing transcription factor expressed in restricted regions of the brain (Lazzaro et al., 1991). It was recently characterized by western blot in brain tissue from the turtle *Pseudemys scripta* and the anuran *Xenopus laevis* with comparable results (Moreno et al., 2010, 2012b). Western blot analysis with the anti-Nkx2.1 serum also detected a single band for *Pleurodeles waltl* at the same molecular weight as that of the major product detected in rat brain extract (about 42 kDa; Joven et al., 2013), corresponding to the TTF-1 protein according to the nucleotide sequence for rat Nkx2.1 (NCBI accession numbers NM_013093, XM_001079296 and XM_216720). Finally, staining with this antiserum in all species studied colocalizes with the mRNA distribution of the same protein using in situ hybridization (Lazzaro et al., 1991; Marín et al., 2000; Bachy and Rétaux, 2006; García-López et al., 2008).

The anti-Nkx2.2 monoclonal antibody was developed by Dr. T.M. Jessell (Columbia University, New York, NY). The DNA region of NK2 transcription factor in chicks was cloned by polymerase chain reaction into the *E. coli* expression vector. Recombinant protein was expressed and purified. The monoclonal antibody was generated by immunization of mice with the

recombinant protein. It has been tested in mice, rats, chicks, and humans (see Developmental Studies Hybridoma Bank datasheet). The specificity of the Nkx2.2 antibody has been confirmed by an absence of labeling in Nkx2.2-/- mice (Cai et al., 2010). Western blot analysis with the anti-Nkx2.2 antibody detected a single band at the same molecular weight as that of the major product detected in rat brain extract (Joven et al., 2013). This same antibody has also been tested by western blot with chicken brain extract: two bands of 43 kDa and 28 kDa were obtained, and two isoforms were suggested (Ferran et al., 2009). The band observed in *Pleurodeles waltl* corresponds well to the band of 28 kDa observed in chicks and the turtle *Pseudemys scripta* (Moreno et al., 2012a).

The anti-Nkx6.1 monoclonal antibody was developed by Dr. O.D. Mansen (Hagedorn Research Institute, Gentofte, Denmark) against *E. coli*-derived recombinant rat GST-Nkx6.1 (aminoacids 299-365) of the C-terminal region of the rat Nkx6.1. It has been tested in mice, rats, chicks, pigs, humans and zebrafish (see Developmental Studies Hybridoma Bank datasheet). The specificity of this antibody was demonstrated by the absence of staining after preabsorption with the GST-Nkx6.1 fusion protein and western blotting (Pedersen et al., 2006). In addition, the well-conserved expression pattern observed in a broad spectrum of vertebrates coincides with the spatiotemporal distribution detected by means of in situ hybridization (Qiu et al., 1998; Zhao et al., 2007; Cameron et al., 2009; Peltopuro et al., 2010; Dichmann and Harland, 2011; Moreno-Bravo et al., 2010). The western blot analysis conducted in the present study revealed a single band in the lane of *Pleurodeles* tissue, which corresponds well to the major product of the two bands described in rat, about 46-44 kDa (Fig. 1a, Table 1).

Otp is a homeodomain containing factor that is expressed in alternating and highly conserved hypothalamic domains in vertebrates (Simeone et al., 1994; Del Giacco et al., 2006; Bardet et al., 2008; Domínguez et al., 2013). The Otp polyclonal antiserum was generated from the highly conserved sequence 69-bp region at the C-terminal domain and is directed against the C-terminal sequence of the OTP predicted protein product. This antibody was raised against a 13-amino-acid sequence, which is completely

conserved in the species studied by BLAST (Lin et al., 1999). Rabbits were immunized against this peptide linked to keyhole limpet hemocyanin. Sera were screened by western blot and immunocytochemistry, using cell lines transfected with an expression vector encoding the full-length mouse Otp and appropriate controls. Sera were affinity-purified against the Otp C-terminal peptide coupled to cyanogens bromide-activated Sepharose 4b according to standard protocols (Lin et al., 1999). The western blot detected a single band that corresponded to that of the rat brain lane (Fig. 1b). This band corresponded to the Otp homolog protein in *Pleurodeles waltl* and rat because it coincides with the calculated molecular weight (about 34 kDa) in relation to the published nucleotide sequence for *rat* orthopedia homolog (NCBI accession number XM_215445).

The anti-Pax3 antibody was developed by Dr. C.P. Ordahl (Developmental studies hybridoma bank). The DNA region corresponding to amino acids 298-481 of the C-terminal region of quail Pax3 was cloned by polymerase chain reaction into the *E. coli* expression vector. In western blots of chicken brain tissue, the Pax3 antibody detects a single band at the expected molecular weight, and the spatiotemporal distribution obtained by immunohistochemistry coincides with the mRNA expression pattern (Williams and Ordahl, 1994; Ferran et al., 2009). In the western blot performed for *Pleurodeles waltl*, the bands obtained corresponded with those for rat brain extract (Joven et al., 2013).

The mouse anti-Pax6 antibody (Kawakami et al., 1997) was developed by Dr. A. Kawakami (Division of Biological Science, University of Tokyo, Japan). The DNA region corresponding to amino acids 1-223 of chick Pax6 was cloned by polymerase chain reaction into the *E. coli* expression vector. Recombinant protein was expressed and purified. The monoclonal antibody was generated by immunization of mice with the recombinant protein. It has been tested in turtles, chickens, mice, and rats (see Developmental Studies Hybridoma Bank data sheet; Moreno et al., 2010). In *Pleurodeles*, the western blot analysis with the Pax6 antibody detected a single band at the same molecular weight as the major product detected in rat brain extract (about 46 kDa; Joven et al., 2013), and it also coincided with the band observed in

Pseudemys (Moreno et al., 2010) brain extracts. The Pax6 antibody detects two major and two minor products in western blots of chicken brain, suggesting the existence of Pax6 isoforms (Kawakami et al., 1997) and the results of the immunoreaction produced essentially the same topographic localization as the mRNA expression pattern in the brain (Ferran et al., 2009).

The Pax6 serum was generated against a sequence that is highly conserved (see Table 1). The antibody was subsequently purified on a Protein A column and is useful in studying brain, neuronal and olfactory development in eukaryotes (see Covance data sheet). The western blot for the brain extract of *Pleurodeles waltl* showed a band that corresponded well to that in the rat lane, at the correct molecular weight, and is similar to that obtained with the monoclonal anti-Pax6 (Joven et al., 2013). The results of the immunoreaction produced the same topographic localization of labeled cells as the monoclonal antibody, although we observed better staining results (i.e. more intensity and less background) with the mouse anti-Pax6 (DSHB) than with the polyclonal antibody.

The anti-Pax7 antibody (Kawakami et al., 1997) was developed by Dr. A. Kawakami (Division of Biological Science, Nagoya University Graduate School of Science, Nagoya, Japan). The DNA region corresponding to amino acids 352-523 of chick Pax7 was cloned by polymerase chain reaction into the *E. coli* expression vector. Recombinant protein was expressed and purified. The monoclonal antibody was generated by immunization of mice with the recombinant protein. It has been tested in chicken, mouse, zebrafish, rat, human, *Xenopus*, turtle and axolotl (see Developmental Studies Hybridoma Bank data sheet; Morona et al., 2011; Moreno et al., 2012b). In western blots of chicken brain tissue the Pax7 antibody detects three bands and the spatiotemporal distribution pattern obtained by immunohistochemistry corresponded with the mRNA expression patterns (Ferran et al., 2009). In *Pleurodeles*, the western blot analysis with the Pax7 antibody detected a single band at the same molecular weight as the major product detected in rat brain extract (about 55 kDa; see Joven et al., 2013) and also coincides with the band observed in *Xenopus laevis* (Morona et al., 2011) and *Pseudemys scripta* (Moreno et al., 2012b) brain extracts.

The specificity of the monoclonal mouse anti-TH antibody was corroborated by western blot analysis in rats, mice, ferrets, cats and *Aplysia* (see specification data sheet; ImmunoStar), the turtle *Pseudemys scripta* (Moreno et al., 2010), two lungfishes (López et al., 2012), and diverse amphibians, including *Pleurodeles waltl* (Morona and González, 2009), in which it selectively labels a single band at approximately 62 kDa. The western blot performed with brain extracts of *Pleurodeles waltl* revealed a comparable single band at the same molecular weight for the monoclonal and polyclonal anti-TH antibodies used (about 62 kDa; Joven et al., 2013), and the pattern of staining on the sections was identical.

Evaluation and presentation of the results

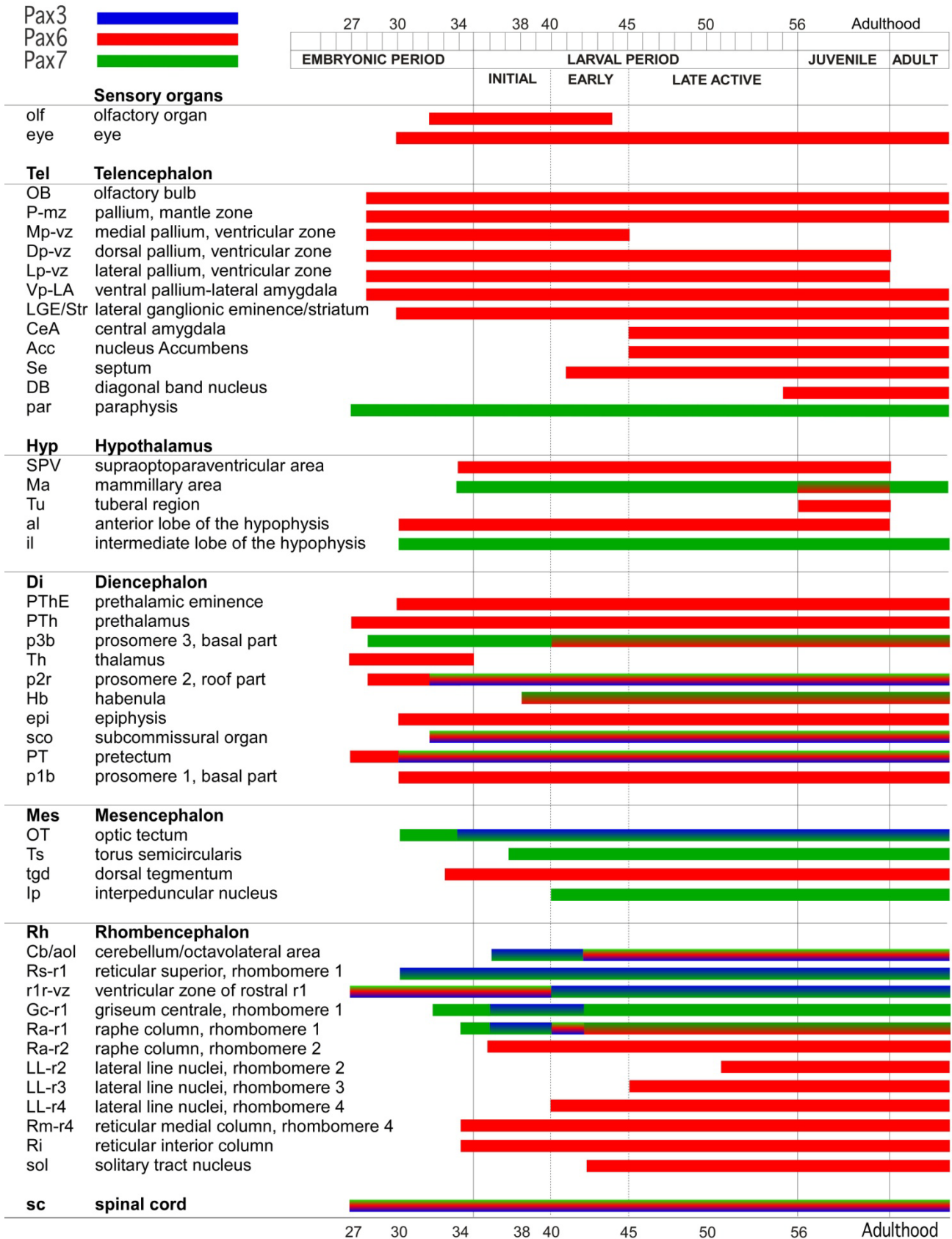
The distribution of Pax3, Pax6 and Pax7 cells in the brain of *Pleurodeles* was charted in selected transverse sections at representative developmental stages (Figs. 2-5). Their relative localization was framed within the newly defined territories in the telencephalon of amphibians and attending to the neuromeric organization of the brain and we used the same nomenclature as in our previous studies with the same species (Morona and González 2008, 2009; Joven et al., 2012, 2013). The spatiotemporal sequence of appearance of the immunoreactive cell groups was detailed in Table 2. Single and double-labeled sections were analyzed with an Olympus BX51 microscope equipped for fluorescence with appropriate filter combinations, and selected sections were photographed using a digital camera Olympus DP72. Photomicrographs were adjusted for contrast and brightness with Adobe PhotoShop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA) and were mounted on plates (Figs. 6-13) using Canvas 11 (ACS Systems International, Santa Clara, CA). Finally, sagittal schemes have been drawn to illustrate our current hypothesis as to the location of neuromeric boundaries during development, inferred from the results of the present study (Supplementary Figure 5). The schematic drawings were also made with the Canvas 11 software.

RESULTS

The distribution patterns of Pax3, Pax6 and Pax7 immunoreactive cells were analyzed in the

TABLE 2

Timetable of the appearance and dynamics of Pax3, Pax6 and Pax7 cell groups in the CNS of *Pleurodeles waltl*



CNS throughout the embryonic and larval development of *Pleurodeles waltl*, including recently metamorphosed juveniles. For each stage, the pattern of distribution and intensity of the immunoreaction were consistent among animals treated identically. The immunodetection after antigen retrieval was particularly useful for the early stages. The key advantages of this species for developmental studies are that the ontogeny extends over a rather long period of time (115-120 days, approximately) and that the development of external features makes it easy to characterize distinct stages, especially useful during the embryonic period. The developmental stages were initially sorted into three main ontogenetic periods (Gallien and Durocher, 1957; Shi and Boucaut, 1995): embryonic period (from one single cell until hatching around stage 34, when swimming behavior is developed), initial larval life (stages 35-38, characterized by the use of balancers to remain adhered to surfaces in a steady state), and active larval period (stages 39-55c, when feeding and complex behaviors develop). Careful analysis of the external characters and physiological and behavioral key events along the active larval period led us to subdivide it into an early active larval life (stages 39-45) and a late active larval period (stages 46-55c) (Joven et al., 2012). The brain of recently metamorphosed juveniles (Stage 56) already shows all main anatomical characteristics as in the adult brain (Joven et al., 2012). In the following sections, we describe the progressive appearance of the labeled structures in relation to these periods of development.

For the description of the results, we will consider the main subdivisions of the brain that can be recognized at the particular developmental stages (Joven et al., 2012). We will attend to the regions previously characterized in the secondary prosencephalon (telencephalon and hypothalamus) of *Pleurodeles* (Moreno and González, 2007a; Morona and González, 2008; Joven et al., 2012, 2013). Pallial and subpallial regions will be considered in the telencephalon, and alar (supraoptoparaventricular and suprachiasmatic) and basal (tuberal and mammillary) regions in the hypothalamus. Topologically caudal, the diencephalon is subdivided into three segments, prosomeres 1-3

(p1-p3). The most rostral, p3, is constituted by the prethalamic eminence (PThE) and the prethalamus (PTh) as roof and alar components, respectively. The intermediate p2 roof and alar regions originate the epithalamus and the thalamus (Th), whereas the caudal p1 contains the subcommissural organ (SCO) and the pretectal region (PT). The smaller basal components form the tegmental region in the diencephalon, extending in the three prosomeres (Puelles and Rubenstein, 2003; reviewed in Puelles et al., 2012b). The mesencephalon is considered a single segment organized in four longitudinal bands (from dorsal to ventral: dorsal, lateral, basal and medial). The isthmus is called r0 and the rhombomeres 1-8 are indicated in relation to the motor nuclei of the cranial nerves (López et al., 2003; Morona and González, 2008, 2009; Joven et al., 2012, 2013). In addition, we will refer to expression in the ventricular zone (vz; cells that are in close contact with the ventricle), the adjacent subventricular zone (svz; one-to-two rows of tightly packed cells), and the mantle zone (mz; migrated cells in the external rows of the cell layer and into the superficial fiber zone). In general, we will describe the results at each developmental stage from rostral to caudal brain regions.

Embryonic stages (27-34)

Conspicuous Pax6 expression was observed by stage 27 in the prospective diencephalon, in particular in p3 and p1, where the most intensely labeled cells were located in the alar part of p1 (Fig. 6a). The first Pax7 and Pax3 positive cells were detected in the rhombencephalon also at stage 27, just after the first spontaneous movements. Labeled cells for both Pax3 and Pax7 occupied the dorsal alar portion of the relatively thick ventricular zone (Fig. 6b), whereas Pax6 was found in more medial domains of the mitotically active caudal neural tube. Expression of Pax7 also occupied most of the developing dorsal mesencephalon (Fig. 6b). In addition, the parapyseal arch was Pax7 positive (Fig. 6c). By stage 28, some scattered Pax7 cells appeared for the first time in the basal portion of p3, as they were double labeled for Nkx2.1 (this situation continued in subsequent stages; see Fig. 7a). At this stage, Pax6 was observed in the dorsal telen-

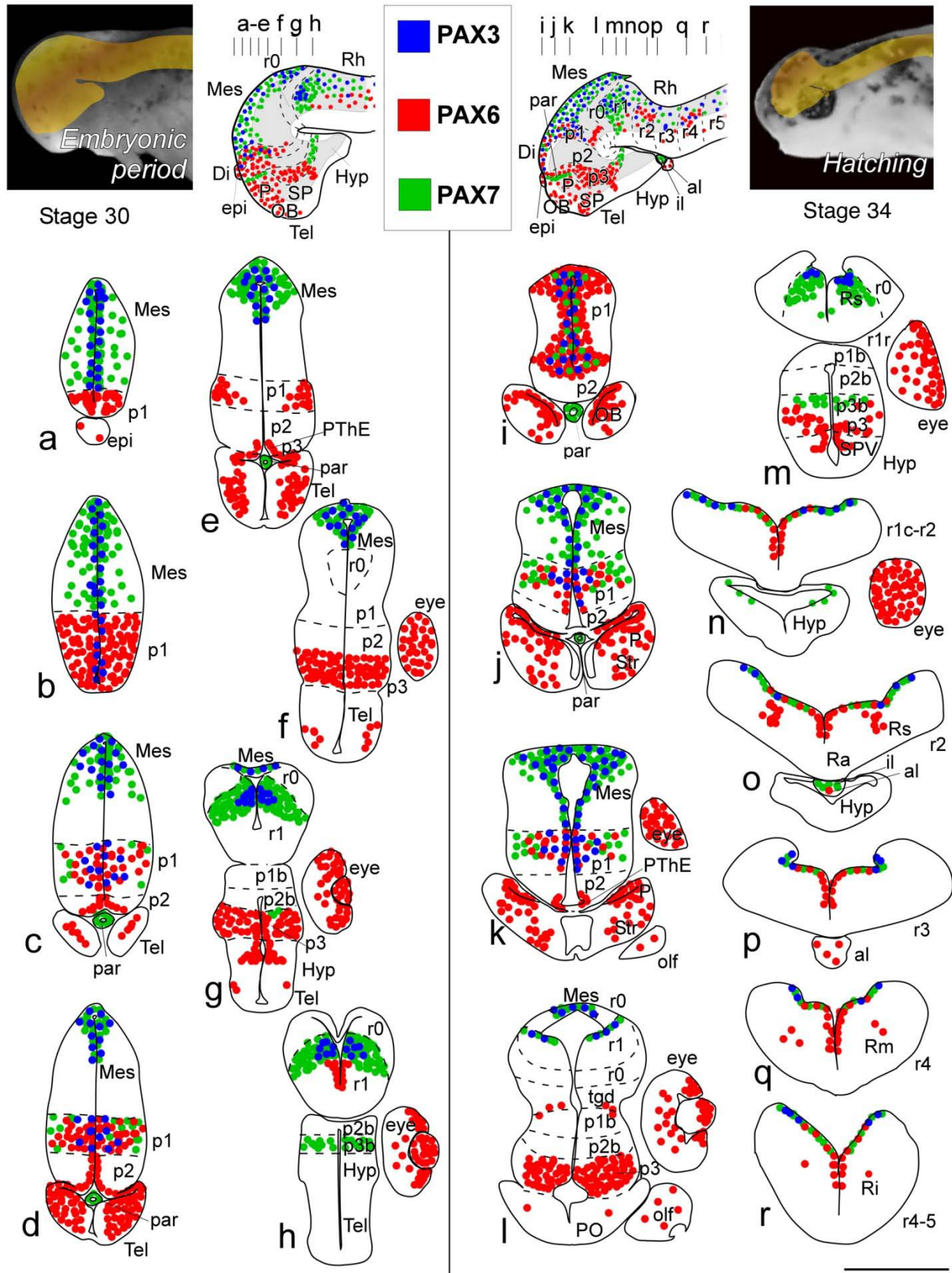


Figure 2. Diagrams of transverse sections through the brain of *Pleurodeles waltl* showing the distribution of immunoreactive cells for Pax3, Pax6 and Pax7 at stage 30 (a-h) and at the end of the embryonic period, coinciding with hatching at stage 34 (i-r). The levels of the sections are indicated in the upper scheme of a lateral view of the brain, in which the grey-filled area represents the ventricles and the dashed lines highlight neuromeric boundaries. For abbreviations, see list. Scale bars = 500 μm.

cephalon (Fig. 6a), in the prospective olfactory bulbs and pallium.

As embryonic development proceeds, the number of cells and the intensity of the immunoreaction increased, especially in some migrated cells of the mantle zone (Figs 6d,e). At stage 30, Pax3 expression remained restricted to rhombencephalic territories and dorsal ventricular zone of the mesencephalon and p1 (Fig. 2a-h). The Pax7 expression detected at this stage in the dorsal mesencephalon and in p1 included the migrated cells in the external layers, and broad domains of Pax7 expression were located in the rostral rhombencephalon (Fig. 2a-h, 6d). In turn, Pax6 expression was observed in the developing eye and in several prosencephalic areas (Figs. 2c-h, 6e), including the prospective bulbar, pallial and alar hypothalamic regions. Of note, Pax6 is more intense as the pallial cells migrated from the ventricle and extended into the lateral ganglionic eminence (subpallial region that gives rise to the striatum) where the Pax6 cells were more intensely labeled. Also by stage 30, the anterior and intermediate lobes of the hypophysis showed for the first time Pax6 and Pax7 expression, respectively. In the diencephalon, the prethalamic eminence could be discerned by the absence of subventricular Pax6 positive cells but staining in the ventricular zone (Fig. 2e). Pax6 was present in the ventricular zone of the alar (thalamic) region (Fig. 2c,d). In addition, strong Pax6 expression could be detected in some cells of the newly formed epiphysis (Fig. 2a). In p1, Pax3, Pax6 and Pax7 expressions were progressively restricted to subsets of cells that constituted distinct subpopulations as development proceeds (Figs. 2c,d, 7b). Only Pax6 cells were located in the basal p1, segregated from the alar population, and both (alar and basal) groups became totally separated by stage 32 (Fig. 7b). Simultaneously, in the dorsal telencephalon and the prospective supraoptoparaventricular (SPV) region (topologically the dorsalmost part of the hypothalamus, confirmed by double experiments with *Otp* and *Nkx2.1*) the ventricular zone was faintly positive for Pax6 (Fig. 6e), whereas the lateral ganglionic eminence continued to show scattered and strongly labeled Pax6 cells. Also at this stages, the basal p3 Pax7 cell subpopulation extended into the hypothalamus (Fig. 7b-d), and the most migrated cells were negative for *Nkx2.1* (Fig. 7c).

In the mesencephalon Pax7 cells were observed scattered in subventricular domains rostrally, but caudally the ventricular zone also showed moderate expression. Concurrently at stage 32, the rostral rhombencephalic Pax7 cell group was present in apposition to the recently generated calretinin-expressing neurons in the reticular nuclei (Fig. 7d).

The embryonic period ends with hatching, which usually occurs at stage 34. By this stage the retina showed moderate expression of Pax6 in the forming lens and the proliferative ciliary epithelium (Figs. 2k-n, 6f,g), and some scattered Pax6 cells were labeled with variable intensity in the differentiating retinal neuronal layers. Double staining showed that some of these cells in the developing ganglion cell layer were already positive for CR, but none were characterized as cholinergic cells in the neuronal cell layer with the ChAT antibody (Fig. 7e). At this stage, Pax6 expression was detected for the first time in individual cells in the olfactory organ and in the developing olfactory nerve, between the olfactory organ and bulb (Figs. 2k,l, 6g). The prospective olfactory bulbs and pallium showed weak Pax6 expression in the ventricular zone, whereas intensely labeled cells were located in the mantle zone, extending into the developing striatum (Figs. 2i-k, 6g,h). In the alar hypothalamus, the prospective SPV showed weak Pax6 expression in cells lining the ventricle, located close to the caudal Pax6 expressing zones of the alar part in p3 (Figs. 2m, 6i). In the dorsal interface between telencephalon and the prethalamic eminence, which was positive for Pax6 in the ventricular layer, Pax7 strongly labeled the paraphysis (Figs. 2i,j, 7g). The prethalamus also showed intense labeling of Pax6 in migrated cells in the mantle zone (Figs. 2l,m, 6i, 7f), whereas in the basal p3 a population of strongly stained Pax7 cells extended into basal hypothalamic territories (Figs. 2m,n, 7f). The roof plate of p1 and p2 was positive for Pax3, Pax6 and Pax7 (Figs. 2i, 7g) and the ventricular Pax6 expression in alar p2 almost disappeared (Figs. 2i-k, 6g,h). Pax3 and Pax7 expression continued caudally in the dorsal p1 and mesencephalon, whereas Pax6 expression caudally ends abruptly in the diencephalo-mesencephalic boundary (Figs. 2j,k, 6j). Of note, a complex staining pattern was found in the pretectal region by hatching. Pax3 cells were located in ventricular and

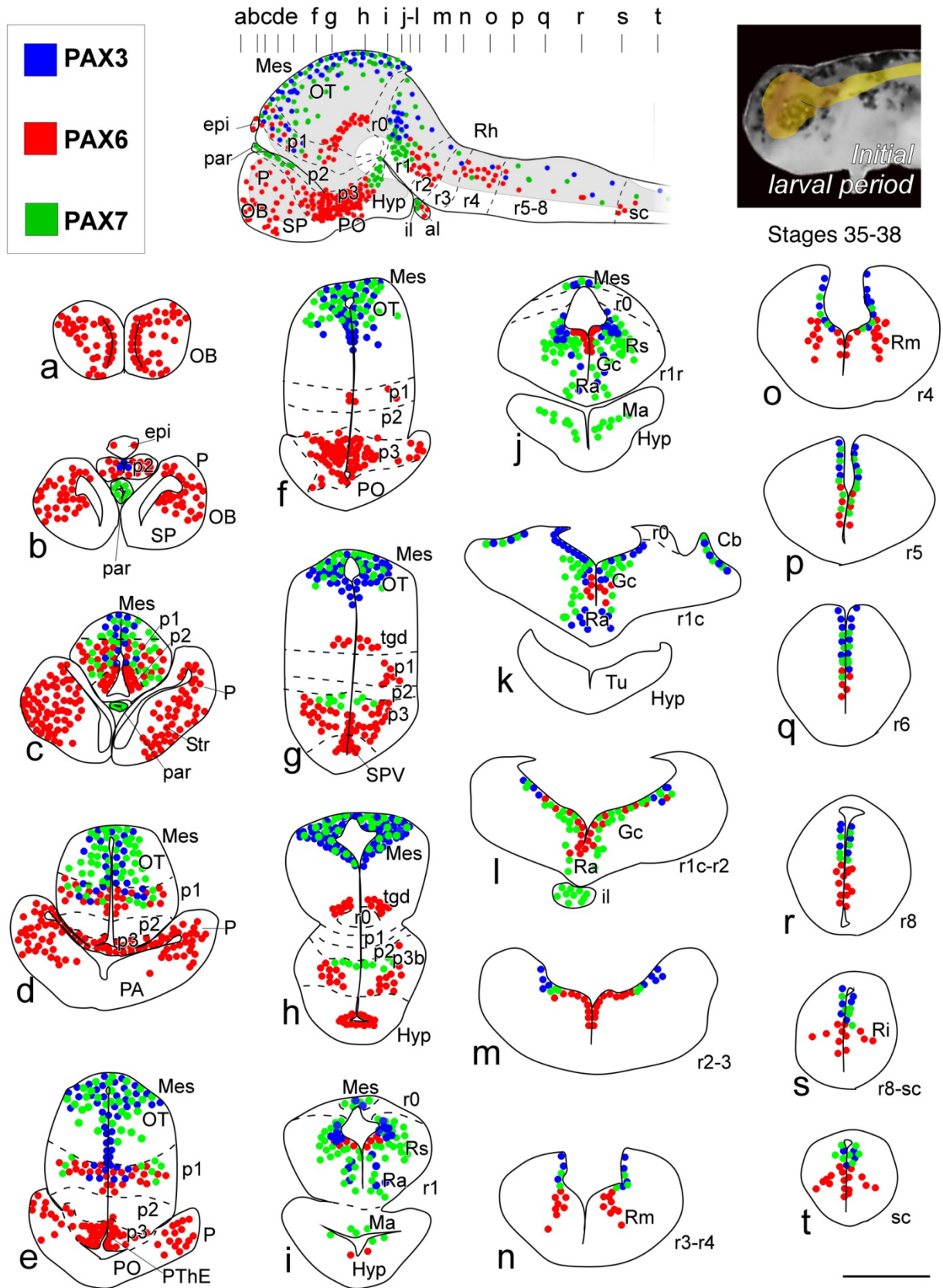


Figure 3. Diagrams of transverse sections through the brain of *Pleurodeles waltl* showing the distribution of immunoreactive cells for Pax3, Pax6 and Pax7 at stage 36, selected as representative stage of the initial larval period (a-t). The levels of the sections are indicated in the upper scheme of a lateral view of the brain, in which the grey-filled area represents the ventricles and the dashed lines highlight neuromeric boundaries. For abbreviations, see list. Scale bar = 500 μ m.

subventricular zones, Pax6 in the ventricular lining and at different levels of the thick cell layer in the mantle, and Pax7 in subventricular and external mantle cell layers (Figs. 2j,k, 6g,h,j, 7g). In the mesencephalon, the dorsal band (tectum) was positive for Pax3 and Pax7, whereas the lateral band possessed some scattered Pax7 cells in its rostral portion, and Pax3 and Pax7 cells were widely distributed in its caudal part (Figs. 2j-l, 6j, 7g). The isthmus is markedly curved at this stage, with the alar portion inclined caudalwards. It was characterized by the absence of Pax3, Pax6 or Pax7 expression, as was corroborated with double labeling for ChAT that stained the isthmus dorsally, and the trochlear nucleus ventrally (Figs. 2l,m, 7h). Caudally, the ventricular layer of the rhombencephalon was characterized by partially overlapped domains of low expression for Pax3, Pax7 and Pax6, from dorsal to ventral zones respectively (Figs. 2n-r, 6k,l). Pax3 and Pax7 were expressed in the alar domain, except the roof plate, and Pax6 extended in the intermediate basal plate, except in the rostral part of r1. Additionally, in the rostral r1 Pax3 was present in ventricular and subventricular positions, and a conspicuous group of strongly Pax7 expressing cells in subventricular layers of the alar r1 (in the reticular column) sharply delineated a ventromedial limit, disrupted only by scattered Pax7 cells in the griseum centrale that extended into basal territories (Figs. 2m, 6k,l). This group is medially located to the cholinergic laterodorsal tegmental nucleus (LDT) and trigeminal motor nuclei (Fig. 7i). Scattered Pax6 cells were seen in the medial and caudal reticular formation of the rhombencephalon (Fig. 2q,r); the most outstanding subpopulation occupying rhombomere r4, as was confirmed by the absence of ChAT positive cells (Figs. 7j). In the spinal cord, the ventricular staining pattern found in the rhombencephalon continued, following the closure of the neural tube, i.e. from dorsal to intermediate domains first Pax3, then Pax7 (Fig. 6m) and last Pax6 were expressed, with some zones overlapping in the adjacent territories.

Initial larval stages (35-38)

After hatching, the larvae are almost motionless, absorbing the remaining yolk. They swim away when bothered, but more often they remain immobile, laying at the bottom or stuck to

the surfaces aided by their balancers. The previous steady behavior is only disrupted either when feeding on live zooplankton by stereotyped suction mechanisms or when escaping, both behaviors triggered by visual/vibrational stimuli. It is only at the end of this period (around stage 37-38) when they start eating.

During this period, the differential growing of progenitor domains and neuronal differentiation processes slightly unfold the neural tube and most cell subpopulations already recognizable with the Pax immunohistochemistry in the embryonic period grow in size and complexity. Pax6 expression in the forebrain remained conspicuous at these stages, in particular in the olfactory system where abundant labeled cells were seen in the olfactory organs and bulbs (Figs. 3a,b; 8c). Double staining revealed that some of the external Pax6 cells corresponded to developing CB, CR and TH positive cells of the olfactory bulb. The ventricular expression of Pax6 in the olfactory bulbs persisted and was continuous with similar expression in the ventricular zone of the pallium. The dorsal striatal Pax6 cells were grouped laterally and showed intense labeling (Figs. 3c, 8c, 9a), whereas the pallidal derivatives (identified by the Nkx2.1 expression) that at these stages contained an increasing ChAT positive cell population, were completely devoid of Pax6 cells (Figs. 3d,e, 8c, 9a). In the caudal pole of the telencephalon, Pax6 and Otp cells were intermingled without colocalization in developing amygdaloid territories. The size and complexity of the paraphysis increased and developed as a folded tube of Pax7 cells in continuous contact with the cerebrospinal fluid and the choroid plexuses (Figs. 3b,c, 9b).

Within the alar hypothalamic region, ventricular expression of Pax6 was present in the SPV (Figs. 3g,h, 8a), as demonstrated by double Pax6/Otp and Pax6/Nkx2.1 labeling. The Pax7 cells in the hypothalamus were found now located medially in a column along the lateral recess of the infundibular ventricle in continuation with the cells located in p3b (Figs. 3g-j, 8b, 9c). Also at these stages, cells were intensely Pax7 immunoreactive in the intermediate lobe of the hypophysis (Figs. 3l, 9m).

The boundary between p3 and the suprachiasmatic region (in the alar hypothala-

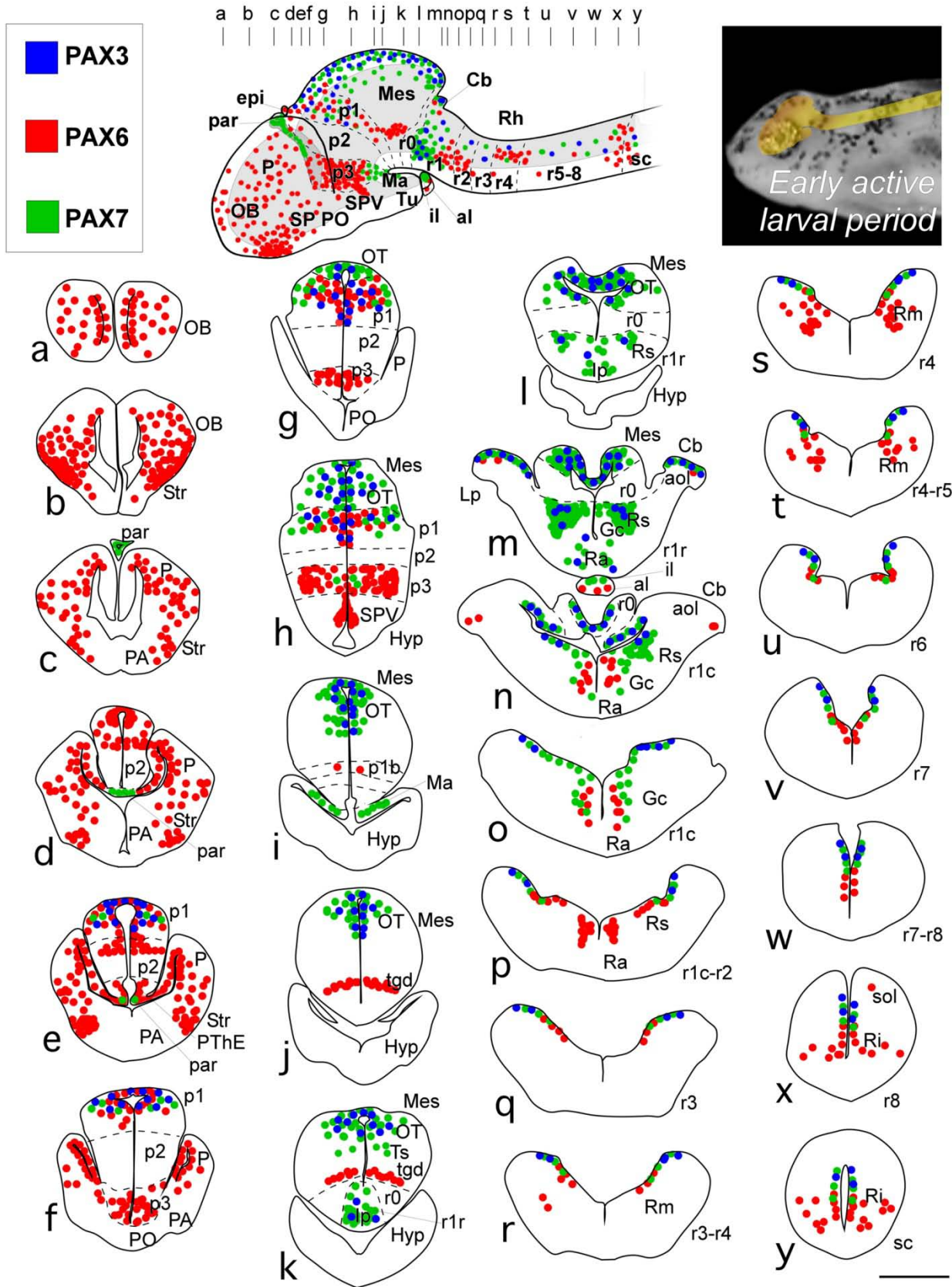


Figure 4. Diagrams of transverse sections through the brain of *Pleurodeles waltl* showing the distribution of immunoreactive cells for Pax3, Pax6 and Pax7 at stage 40, selected as representative stage of the early active larval period (a-y). The levels of the sections are indicated in the upper scheme of a lateral view of the brain, in which the grey-filled area represents the ventricles and the dashed lines highlight neuromeric boundaries. For abbreviations, see list. Scale bar = 500 µm.

mus) was visualized by double staining for TH (Fig. 9h). Thus, Pax7 cells were located in basal p3 in close vicinity with the developing TH immunoreactive cell groups. In addition, the Pax6 cells located most ventrally in p3 were close to the TH cells, but colocalization was not observed in any case. Actually, the Pax6 cells in the prethalamus (alar p3) extended into the basal territories, as was confirmed by double labeling with Nkx2.1 and Nkx6.1. To assign correctly the Pax cell populations in the prethalamus and thalamus, calcium binding proteins and Nkx2.2 expression helped to identify the boundary between the alar p3 and p2 (Fig. 9d). In p2, no Pax7 cells were observed, whereas only moderate immunoreactivity for Pax6 was found in the dorsal ventricular zone (Fig. 3b,c) and very scarce Pax6 positive cells were detected for the first time by the end of this period in the asymmetric habenula. The epiphysis showed strongly stained Pax6 scattered cells (Figs. 3b, 9b). The populations that expressed Pax3, Pax6 and Pax7 in the embryonic p1 progressively segregated at these stages, helping to the identification of distinct pretectal territories. Thus, in addition to the subcommissural organ, the rostral precommissural (PcP) and the commissural (CoP) domains of the pretectum could be recognized on the basis of combined expression patterns of Pax3, Pax6 and Pax7 (Figs. 3c-e, 8c,d,f, 9e). In addition, Pax6 cells were distributed in a basal band of p1, always separated from the ventricular zone.

Pax6 alar expression abruptly ended at the diencephalo-mesencephalic border, coinciding with the appearance of Pax7 in the ventricular zone of the optic tectum (Figs. 3c-e, 8e,f, 9e). In the tectum, the number of Pax3 cells migrated from the ventricle was markedly lower than in the neighboring p1, but the ventricular staining was conspicuous (Figs. 3c-e, 8d). The rostral two thirds of the optic tectum showed only scattered Pax7 cells in the mantle zone, whereas the caudal third possessed higher number of stained cells (Figs. 3c-h, 9e). The torus semicircularis, also in the alar dorsal band of the mesencephalon, became distinguishable at these stages and while some migrated cells were Pax7 immunoreactive, the ventricular zone did not show Pax7 expression (Fig. 8e,f). In the basal mesencephalon, the tegmental Pax6 subpopulation grew and extended up to the

isthmo-mesencephalic boundary, highlighted by the combined labeling of Pax6 and Nkx6.1 (Fig. 9f). The combination with Nkx2.2 unraveled the basal position of this Pax6 group, ventral to the alar-basal boundary marked by the Nkx2.2 expression.

The extent of the isthmus segment (r0) was highlighted by Nkx6.1 and ChAT immunohistochemistry, and was seen to be completely devoid of Pax expressing cells (Figs. 3h-j, 9f). At the level of the recently formed lateral recess of the fourth ventricle, the rudiment of the lateral lobe of the cerebellum started to show moderate Pax3 and Pax7 staining in the ventricular zone (Fig. 3k). From r1 to the spinal cord, Pax3, Pax7 and Pax6 were expressed in the proliferating ventricular zone with partially overlapped domains, in the same pattern as described in the embryonic stages (Figs. 3k-t, 8g-i). The rhombomeric organization of the migrated Pax cell subpopulations was interpreted with the help of the rhombomere-specific expression patterns of Otp, Nkx6.1, TH and ChAT (Fig. 9g-m). The first rhombomere (r1) was divided into rostral and caudal parts for the interpretation of the results, due to the differential expression patterns of Pax proteins and other markers. A discrete Pax3 subpopulation of scattered cells was detected for the first time in the rostral part of r1, occupying medial positions (Figs. 3j,k, 8g). In addition, the rostral r1 showed the most outstanding Pax7 cell group medial to the LDT (intensely ChAT immunoreactive; Fig. 9i,j). This group of densely packed Pax7 cells formed an alar subpopulation from which some scattered cells detached towards basal territories. Differently, in the caudal part of r1 Pax7 migrated cells were not found in alar territories, but were detected medially in the basal plate, (compare Figs. 9i and 9m), in the proximity of a group of Pax6 cells observed for the first time in this position, and that extended into r2 (Figs. 3k,l, 9e,f). Of note, ChAT expressing cells (developing motor cells) avoided the regions where Pax6 and Pax7 cells were detected (Fig. 9i-k,m). After a gap devoid of Pax migrated cells in r3 (Fig. 3m), a migrated Pax6 cell group was seen in the mz of r4 (Figs. 3n, 9g,k,l). In the basal plate of the rostral rhombencephalon, Pax6 cells avoided the Otp expressing territory, thus being located medially to it in r1-r2, and laterally in r4 (Fig. 9l). Differently, some Pax7/Otp double labeled cells

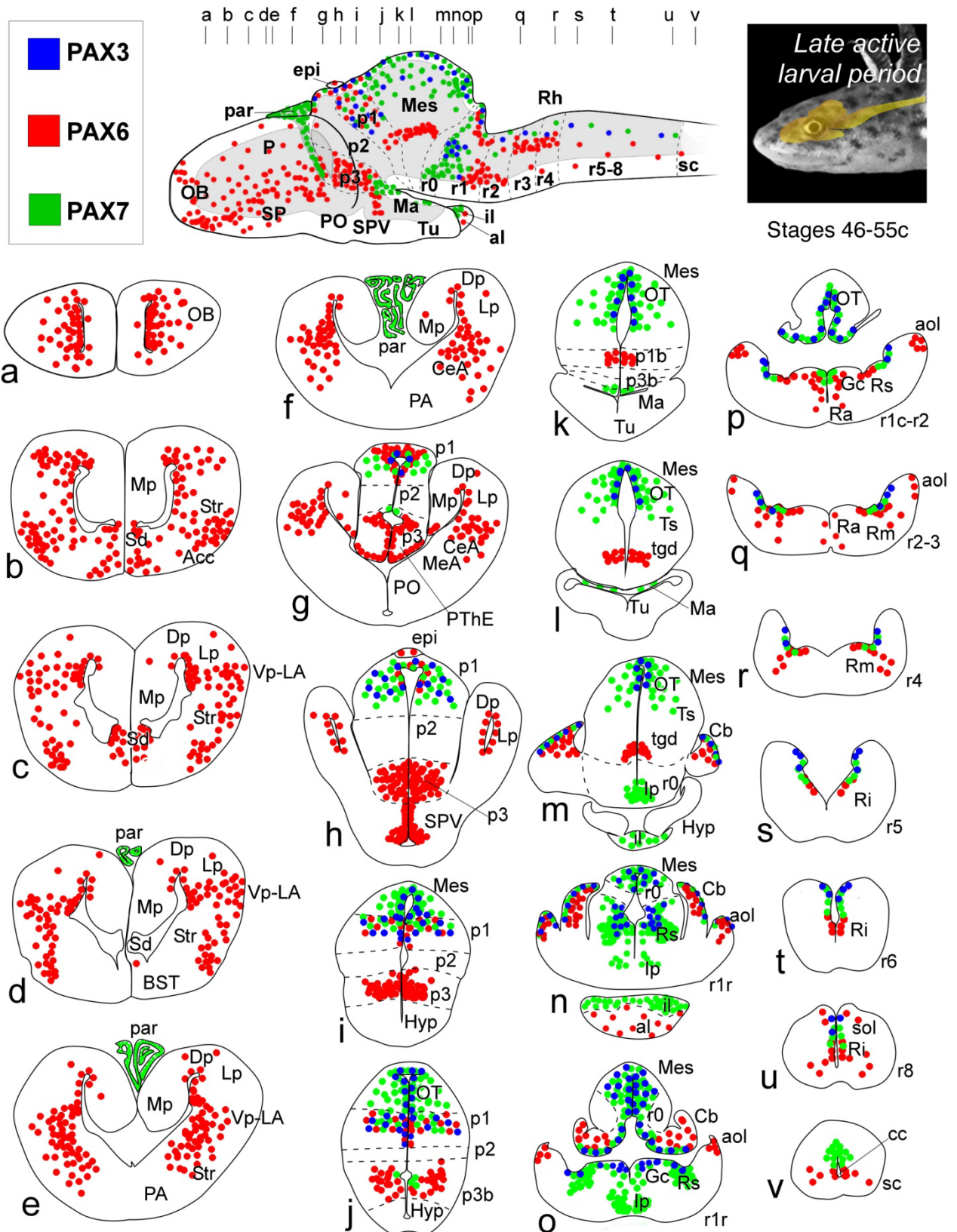


Figure 5. Diagrams of transverse sections through the brain of *Pleurodeles waltl* showing the distribution of immunoreactive cells for Pax3, Pax6 and Pax7 at stage 52, selected as representative stage of the late active larval period (a-v). The levels of the sections are indicated in the upper scheme of a lateral view of the brain, in which the grey-filled area represents the ventricles and the dashed lines highlight neuromeric boundaries. For abbreviations, see list. Scale bar = 500 μm.

were observed in the alar part of r1 (Fig. 9c). In the spinal cord, the ventricular staining pattern described for previous stages persisted, but a few Pax6 cells were now detected separated from the central canal (Figs 3s,t, 8h,i).

Early active larval stages (39-45)

The early active larval life (stages 39-45) is characterized by the progressive formation of the forelimbs, and a major change in feeding behavior: the acquisition of lunging (i.e., combination of suction and swimming) and the modulation of suction. At the end of this period, larvae lose the balancer and use their recently formed forelimbs to walk.

The retinal Pax6 cells were very numerous and occupied the inner nuclear layer and the ganglion cell layer, and double experiments showed that they were not cholinergic (ChAT positive) or dopaminergic (TH positive) cells. The olfactory organ of the early active larvae maintained an important amount of Pax6 expressing cells, and isolated cells were observed in the region of the olfactory nerve (Fig. 10a).

During this period, the telencephalic structures acquire the basic pattern of organization of the adults, especially due to the progressive growth and differentiation of the pallial and subpallial components. In the olfactory bulbs, Pax6 staining was found in the ventricular and mantle zones (Figs. 4a,b, 10a), where many of these cells contained TH, CB and CR. The pallium was Pax6 positive in the ventricular zone, except for a rostral portion of the medial pallium (Figs. 4c-f, 8j, 10b,d). Additionally, isolated cells were seen in the mantle zone of the dorsal and lateral pallial regions, whereas the ventral pallium showed a subset of Pax6 cells in the mantle zone extending into the neighboring striatum, which lacked ventricular staining (Figs. 4b-f, 8j, 10b-d). By the end of this period, the lateral amygdaloid region in the ventral pallium, showed intermingled Pax6 and CR positive cells (Fig. 10b,d). Ventrolaterally, the caudal striatum started to acquire the pattern of dispersed Pax6 cells characteristic of adult newts, whereas rostrally the Pax6 cells were densely packed as in previous stages but extended ventromedially reaching the medial walls (Figs. 4b-e, 8j, 10e,f). The caudal limit of the striatal Pax6 cells was defined by the Nkx2.1 expression in pallial and preoptic areas (Fig. 10c,e), corresponding this

caudal striatal region to the central amygdala, as was confirmed later at stage 45 by the CR and Otp expression patterns (Fig. 10b,f). In the medial telencephalic wall of the hemisphere, the septum showed faint Pax6 expressing cells for the first time by stage 41 (Fig. 8j).

In the hypothalamus, the SPV could be discerned from the adjacent preoptic and suprachiasmatic regions by its negative staining for Nkx2.1 and positive labeling for Otp (Fig. 10e-g). It contained Pax6 expression in the ventricular zone (Figs. 4h, 10e-g). The Pax7 cells of the hypothalamus and hypophysis remained essentially unaltered from previous stages. The anterior lobe of the hypophysis showed Pax6 cells (Figs. 4m, 10k).

The pallial Pax6 expression was continuous with the cells in the prethalamic eminence, without interruption (Figs. 4e, 8k, 10c,d). In the prethalamus, the Pax6 cell population increased, and as in earlier stages, some cells invaded basal territories (Figs. 4h,i, 10h). In p2, isolated Pax6 and Pax7 cells could be detected in the habenula, and p1 retained the pattern of Pax cells described for previous stages (Figs. 4d-h, 8l, 10j).

During the early active larval period the mesencephalon grows noticeably and becomes more differentiated. The pattern of Pax7 expressing cells in the optic tectum was similar to that seen in previous stages, with scattered cells in the rostral two thirds and striking abundance of labeled cells in the caudal third. The Pax7 expression in the torus semicircularis was more evident at these stages (Fig. 4g-l). On the other hand, the population of Pax6 cells in the tegmentum (Figs. 4j,k, 8l) formed a conspicuous band beneath the alar-basal boundary marked by Nkx2.2 (Fig. 10i).

The lateral lobe of the cerebellum extended now rostralwards from the cerebellar commissure, and Pax6 cells were observed in the octavolateral area (Figs. 4m, 8m). The Pax7 subpopulation in r1, mainly located in the superior reticular nucleus, increased and extended rostralwards (Figs. 4l-n, 10j). Ventrally, Pax7 cells located in the interpeduncular nucleus extended rostrally into the isthmus, next to the trochlear nucleus (Fig. 10j). The Pax6 cells in the basal r1 were separated medially from the locus coeruleus towards the raphe (Fig. 10k), and intermingled with Nkx6.1 and Pax7 cells, without colocalization (Figs. 10l, 12a). The Pax6 cells detected in r4 were

segregated into lateral and medial groups, showing the medial group colocalization with Nkx6.1 (Figs. 4r-t, 12b, c). Starting at stage 40, some Pax6 cells seemed to progress rostrally into r3, occupying a thin continuous column in the ventral aspect of the octavolateral area by stage 44 (Fig. 8m). Pax6 cells in the caudal rhombencephalon and spinal cord partially overlapped with Nkx6.1 in the ventricular lining, while the cells migrated from the ventricular zone were interspersed with CR reticular neurons occupying two distinct columns (Figs. 4y, 12d). In addition, scattered Pax6 cells were found in the solitary tract nucleus by stage 42 (Fig. 4x). The pattern of Pax3 and Pax7 expression in the caudal rhombencephalon and spinal cord was similar to that described for earlier stages (Fig. 4u-y).

Late active larval stages (46-55c)

During the late active larval period (stages 46-55c) the larvae start using chemical cues to recognize the food as they begin to predate also on immobile commercial pellets of food. The locomotion types can be associated with different behaviors: walking is used for actively seeking food and swimming is used for lunging and escaping. The hindlimbs develop completely, and this period ends with the metamorphosis.

All main brain structures and subdivisions were clearly recognized at these stages and some changes in Pax expression patterns were observed. In the retina, Pax6 was now restricted to some subsets of cells in the inner nuclear and ganglion cell layers. In contrast to previous stages, the olfactory organ and nerve did not show Pax6 cells anymore, and in the olfactory bulbs the layered distribution of Pax6 cells acquired the adult pattern with the Pax6 cells segregated in both the accessory and main olfactory bulbs (Figs. 5a,b, 11a). The medial pallium lacked Pax6 cells at rostral levels, whereas the dorsal, lateral and ventral pallia still conserved weak ventricular expression (Figs. 5b-e, 11b,c, 12e). Very few scattered cells were detected in the mantle zone of the dorsal and lateral pallial regions (Fig. 11b,c), which were negative for CR staining (Fig. 12e). The ventral pallial mantle cells showed a comparable Pax6 pattern to that seen in dorsal striatum, which lacked ventricular reactivity (Figs. 5c-e, 11b, 12e). In the medial walls of the telencephalic hemispheres, Pax6 expression was distinct in the

septum, including the ventricular zone, from the caudal pole of the olfactory bulb to the preoptic area (Figs. 5b,c, 11b). A particularly conspicuous group of migrated Pax6 cells was noted in the nucleus accumbens and, caudally, dispersed cells were identified in the medial septum (Figs. 5b,c, 11a,b). The amygdaloid territories also showed the same pattern of the adult brain: the lateral (of ventropallial origin) and central (striatal part, caudally continuous with the striatum) components possessed Pax6 cells (Figs. 5c-g, 11b,c, 12e). The paraphysis developed a complex system of tubes of epithelial Pax7 cells and blood vessels (Figs. 5d-g, 11d).

The hypothalamic areas remained mainly unaltered in terms of Pax expression, although they markedly increased in size, especially the hypophysis (Figs. 5k-n, 11e). Pax6 positive ventricular expression in the SPV persisted (Fig. 5h) and the Pax7 cells were located in the mammillary region above the infundibular recess (Fig. 5k,l). The anterior and intermediate lobes of hypophysis presented pale Pax6 isolated cells and intense Pax7 densely packed cells, respectively (Figs. 5m,n, 11e).

The diencephalon also showed the complexity of adult animals. In p3, Pax6 stained the ventricular zone of the prethalamic eminence, the majority of cells in the alar portion, and some cells occupied the mantle zone in basal territories (Figs. 5g-j, 11c,f), whereas Pax7 was abundant in cells of the basal p3 (Fig. 5j,k). The habenula had scattered Pax6 and Pax7 cells disposed in a row, while the roof ventricular zone was positive for Pax3, Pax6 and Pax7 as in the caudally adjacent subcommissural organ in the roof of p1 (Fig. 12f,g). The thalamo-prepectal boundary could

Figure 6. Photomicrographs of single-stained sagittal (a-c) and transverse (d-m), sections through the brain of *Pleurodeles waltl* showing the localization of Pax3, Pax6 or Pax7 cells (indicated on the upper left corner of each photomicrograph). Different embryonic stages (indicated in the upper right corner of each photomicrograph) are illustrated. All images are oriented following the same standard: dorsal is upwards in transverse and sagittal sections, and rostral is to the left in sagittal sections. The dashed lines represent interneuromeric boundaries. Pax6_m corresponds to the monoclonal antibody mouse anti-Pax6, whereas Pax6, represents the polyclonal rabbit anti-Pax6. The arrowhead in (g) points to Pax6 cells in the olfactory nerve. For abbreviations, see list. Scale bars = 100 μ m (a-c, e-i), 50 μ m (d-f, i-m).

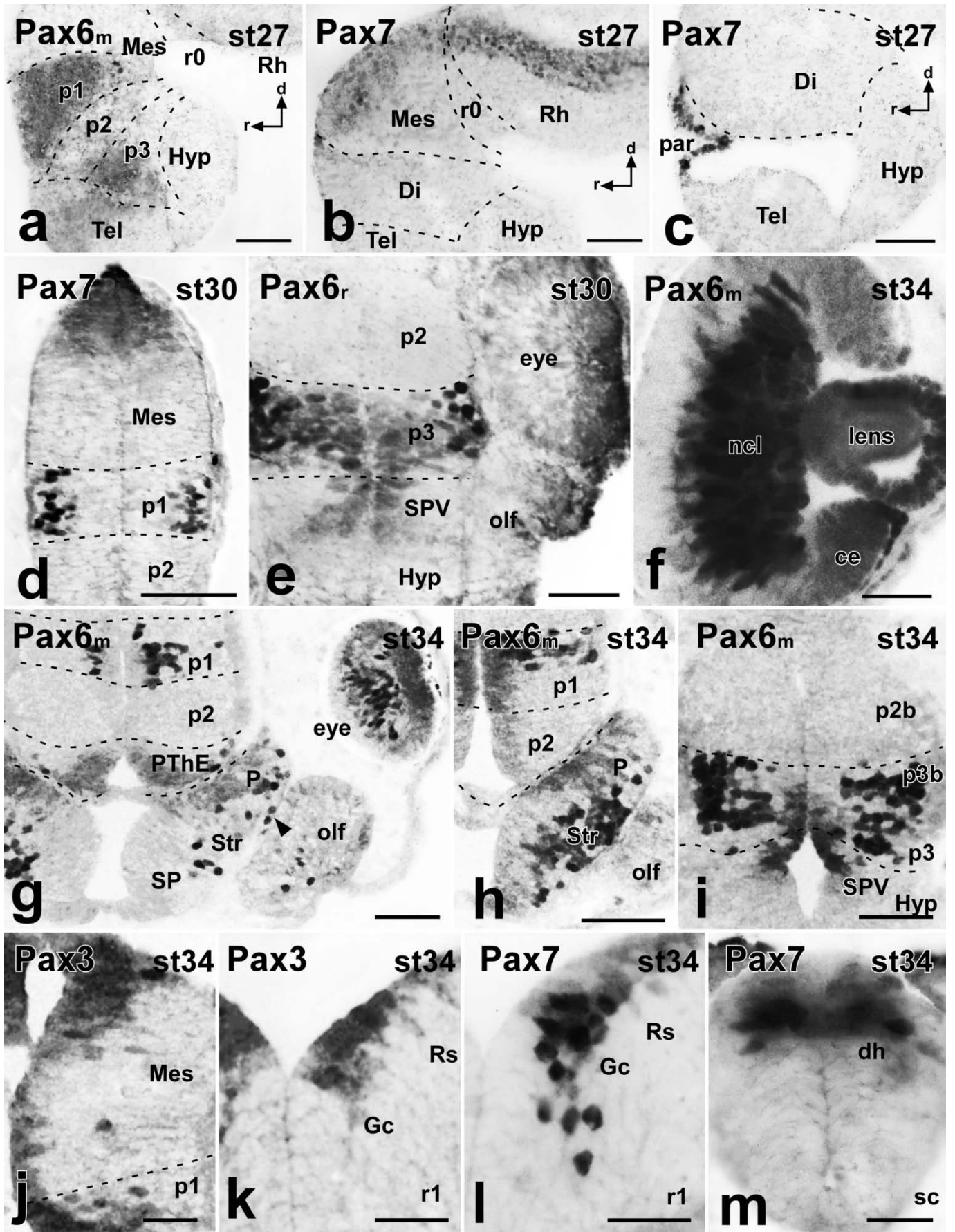


Figure 6.

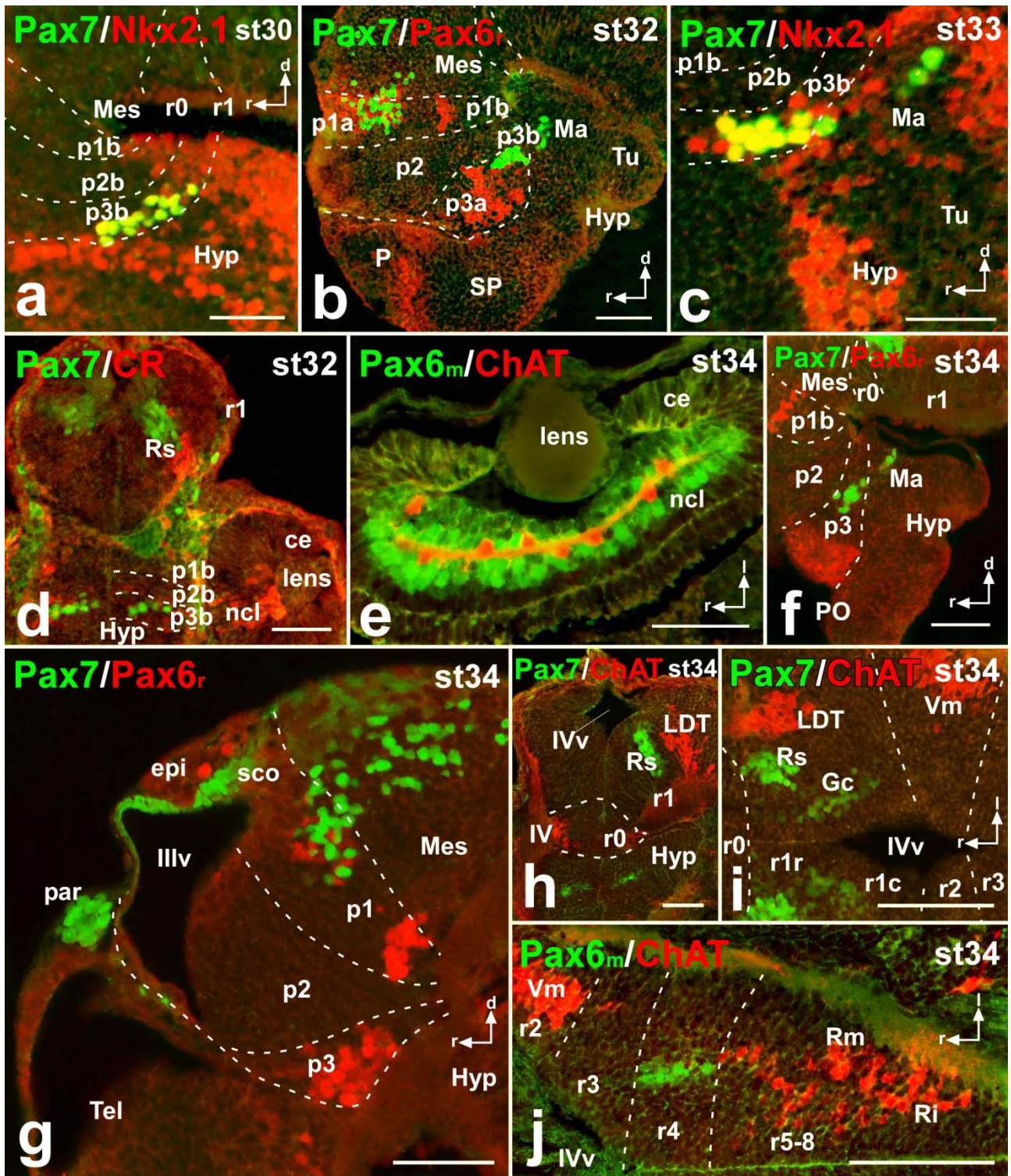


Figure 7. Photomicrographs of double-labeled sagittal (a–c, f, g), transverse (d, h), and horizontal (e, i, j) sections through the brain of *Pleurodeles waltl* showing the localization of Pax6 or Pax7 cells in relationship to other molecules (indicated on the upper left corner of each photomicrograph). Different embryonic stages (indicated in the upper right corner of each photomicrograph) are illustrated. All images are oriented following the same standard: dorsal is upwards in transverse and sagittal sections, and rostral is to the left in sagittal and horizontal sections. The dashed lines represent interneuromeric boundaries. Pax6_m corresponds to the monoclonal antibody mouse anti-Pax6, whereas Pax6_r represents the polyclonal rabbit anti-Pax6. For abbreviations, see list. Scale bars = 100 μm. A magenta–green version of this figure is provided as Supplementary Figure 1.

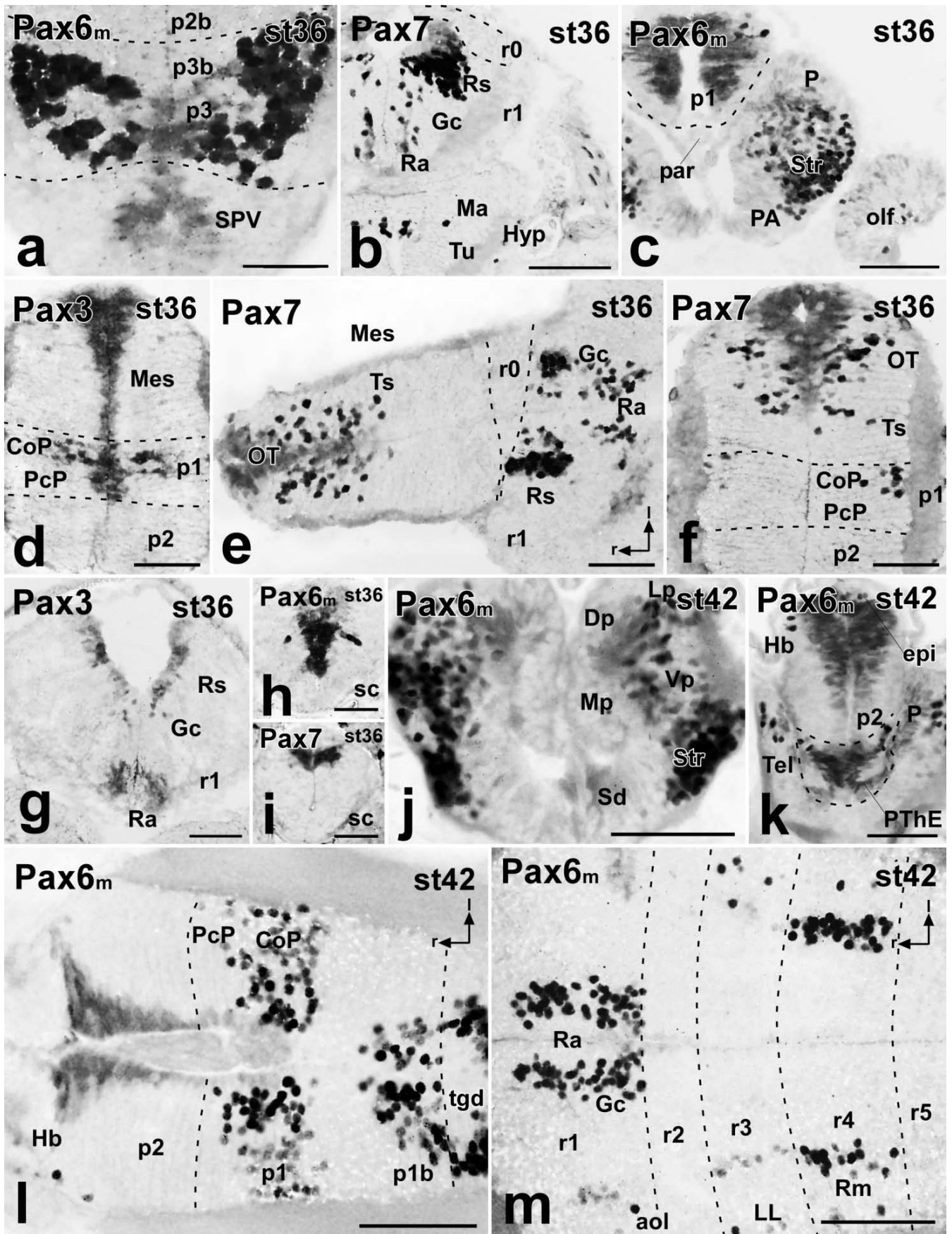


Figure 8.

be discerned by ventricular Pax3 and Pax6 expression in the PcP region but not in the thalamus (Figs. 5i,j, 12f,g). In the pretectum, the tripartite organization into CoP, PcP and juxtacommissural (JcP) parts was apparent and contained abundant and distinctly distributed Pax6 and Pax7 cells, whereas Pax3 cells were scarce and weakly reactive, as in the adult (Figs 5i,j, 11f, 12f,g).

The mesencephalon at these larval stages showed the abundant Pax7 cell population that reached the appearance of adult animals, with cells distributed in all layers of the optic tectum and avoiding the ventricular zone in the torus semicircularis (Figs. 5i-p, 11g). Pax3 cells were less abundant in the mantle zone and were more palely stained than in previous stages, but the dorsal ventricular zone was still strongly positive especially in the caudal pole of the mesencephalon (Fig. 5i-n). The band of Pax6 cells in the dorsal tegmentum slightly folded caudolaterally, most probably as a consequence of the differential growth of neighboring areas (Figs. 5m, 11h).

The rhombencephalic external anatomy does not change much during this period, except for the development of the cerebellum. However, attending to the distinct Pax expression patterns, inter-rhombomeric migratory events can be suggested. The granule cell layer of the cerebellum, and the octavolateral area were populated by migrated Pax6 cells, and the ventricular cell layer was positive for Pax3 and Pax7, as a continuation of the ventricular expression in the mesencephalon, with a gap in r0 (Figs. 5m-p, 11i, 12h). In the rostral portion of

r1, Pax6 ventricular cells were not detected, persisting those positive for Pax3 and Pax7, whereas in the caudal r1 Pax6 was maintained in the ventricular zone (Figs. 5o,p, 11i,k). The cell groups strongly reactive for Pax7 and, to a lesser extent for Pax3, extended rostrally (Fig. 5n). Progressively, the ventrally located Pax7 cells were seen in the interpeduncular nucleus (Figs. 5m,n, 11e,j). In r2-r3, Pax6 was additionally detected at stage 52 in alar regions of the octavolateral area, in the lateral line nuclei as was confirmed by double staining for Pax6/CR (Figs. 5o-q, 12i). In the medial part of the caudal r1 and r2, Pax6 and Nkx6.1 were expressed in distinct cell subpopulations (as shown in previous stages, see Fig.10l), in contrast to the situation found in r3 and r4 where a conspicuous cluster of double labeled cells was detected (Fig. 12j). By the end of this period, the lateral line nuclei already possessed Pax6 cells from r1 to r4 distributed in different clusters (Fig. 5n-r). At stage 54, more Pax6 cells were detected in the alar portion of the caudal rhombencephalon, in the nucleus of the solitary tract (Fig. 5u). In the spinal cord, the Pax7 immunoreactivity in the ventricular zone was maintained as in previous stages but some cells invaded also subventricular dorsolateral domains (Figs. 5v, 12k). Pax6 maintained the pattern of expression observed in early active larval stages and, in the caudal rhombencephalon and spinal cord, partial overlap of Pax6 and Nkx6.1 was noted, with distinct double labeled cells (Fig. 12l).

Juvenile (56)

Except for the gonadal maturation, the juvenile animals already have all the adaptations of adults, switching terrestrial and aquatic lifestyles depending on environmental cues. In land, they develop biting and tongue prehension as feeding behaviors, while in water chemical recognition always precedes the suction behavior.

The Pax immunoreactivity in recently metamorphosed animals is undistinguishable from that of late larvae (Fig. 13a-f) except for a transient Pax6 expression in the basal hypothalamic mammillary and tuberal regions (Fig. 13g). Some other subtle differences compared to the adult expression patterns were noted in the juvenile. Thus, based on our previous work (Joven et al., 2013) we can infer that in the transition into adulthood, Pax6

Figure 8. Photomicrographs of single-stained transverse (a-d, f-k) and horizontal (e, l, m) sections through the brain of *Pleurodeles waltl* showing the localization of Pax3, Pax6 or Pax7 cells (indicated on the upper left corner of each photomicrograph). Different stages (indicated in the upper right corner of each photomicrograph) corresponding to initial larvae (a-i) and early active larvae (j-m) are illustrated. All images are oriented following the same standard: dorsal is upwards in transverse sections and rostral is to the left in horizontal sections. The dashed lines represent interneuromeric boundaries. Pax6_m corresponds to the monoclonal antibody mouse anti-Pax6, whereas Pax6_r represents the polyclonal rabbit anti-Pax6. For abbreviations, see list. Scale bars = 50 μm (a, h, i), 100 μm (b-g, j-m).

expression is lost in the anterior lobe of the hypophysis, and in the ventricular zone of the lateral pallium, dorsal pallium and SPV. Strikingly, Pax3 expression is restricted to some scattered cells in rostral rhombencephalon, dorsal ventricular mesencephalon and pretectum. Pax7 expression is maintained through the adult in all cell populations described, except for the ventricular expression in the spinal cord.

DISCUSSION

We examined the Pax3, Pax6, and Pax7 expression patterns during the ontogenetic development of the CNS of *Pleurodeles waltl*. The immunohistochemical approach that we have used yields high-resolution staining of cell nuclei from early stages. In similar studies conducted in other species, the use of immunohistochemistry for the detection of the Pax proteins and in situ hybridization for the localization of Pax mRNA resulted in identical patterns of staining (Hitchcock et al., 1996; Wullimann and Rink, 2001; Moreno et al., 2008a; González and Northcutt, 2009; Morona et al., 2011; Ferreiro-Galve et al., 2012b; Joven et al., 2012b; Lorente-Cánovas et al., 2012). The localization of these three transcription factors, in many cases in combination with other ancillary markers, has been shown useful for unambiguous interpretation of most brain subdivisions in the urodele CNS (Joven et al., 2013), which is a difficult task particularly through ontogeny, due to the variable brain flexure and the uneven growth of different areas during development (Joven et al., 2012).

The three Pax members studied are expressed from early development in specific regions often defining genoarchitectonic boundaries. However, as development proceeds some groups of cells were seen to invade neighboring territories originally negative for Pax labeling, such as the case of some hypothalamic or rhombencephalic regions. As we will discuss below, this observation suggests cell migration, which in the urodele brain is very scarce and difficult to assess (see ten Donkelaar, 1998).

There is extensive literature dealing with Pax gene expression in representatives of all major vertebrate classes, including *Pleurodeles*, and the expression patterns reported are highly comparable across species, especially during

development (Haubst et al., 2004; Stoykova and Gruss, 1994; Stuart et al., 1994; Kawakami et al., 1997; Murakami et al., 2001; Derobert et al., 2002; Moreno et al., 2008a; Pritz and Ruan, 2009; Morona et al., 2011; Duan et al., 2012; Joven et al., 2013).

Comparative spatiotemporal analysis of Pax3, Pax6 and Pax7 expression in the nervous system across vertebrates

In spite of their secondary simplification, in the brains of embryos, larvae and adult specimens of urodeles four zones are progressively recognized on the basis of the relative position of cells from the ventricle to the pial surface, and the degree of cell packing. Thus, ventricular, subventricular, mantle and fiber zones can be discerned, which largely correspond to the layers described in classical studies that were named the periventricular or ependymal zone, the subependymal zone, the stratum griseum or central grey, and the overlying white layer or stratum album (Herrick, 1948). In the present study we use both nomenclatures for comparative purposes with other vertebrates.

Retina

During retinogenesis Pax6 is essential for the multipotency of retinal progenitors and their normal proliferation, and have a subsequent function in the specification of a subtype of mature amacrine cells, acting as activator of proneural genes (Ashery-Padan and Gruss, 2001).

Figure 9. Photomicrographs of double-labeled horizontal (a, j-l), sagittal (b, c, e-h), and transverse (d, i, m) sections through the brain of *Pleurodeles waltl* showing the localization of Pax6 or Pax7 cells in relationship to other molecules (indicated on the upper left corner of each photomicrograph). Different stages (indicated in the upper right corner of each photomicrograph) corresponding to initial larvae are illustrated. All images are oriented following the same standard: dorsal is upwards in transverse and sagittal sections, and rostral is to the left in sagittal and horizontal sections. The dashed lines represent interneuromeric boundaries. Pax6_m corresponds to the monoclonal antibody mouse anti-Pax6, whereas Pax6, represents the polyclonal rabbit anti-Pax6, and TH, the polyclonal rabbit anti-TH. For abbreviations, see list. Scale bars = 200 μm (c, f, i-k, m), 100 μm (a, b, e, g, l), 50 μm (d, h). A magenta–green version of this figure is provided as Supplementary Figure 2.

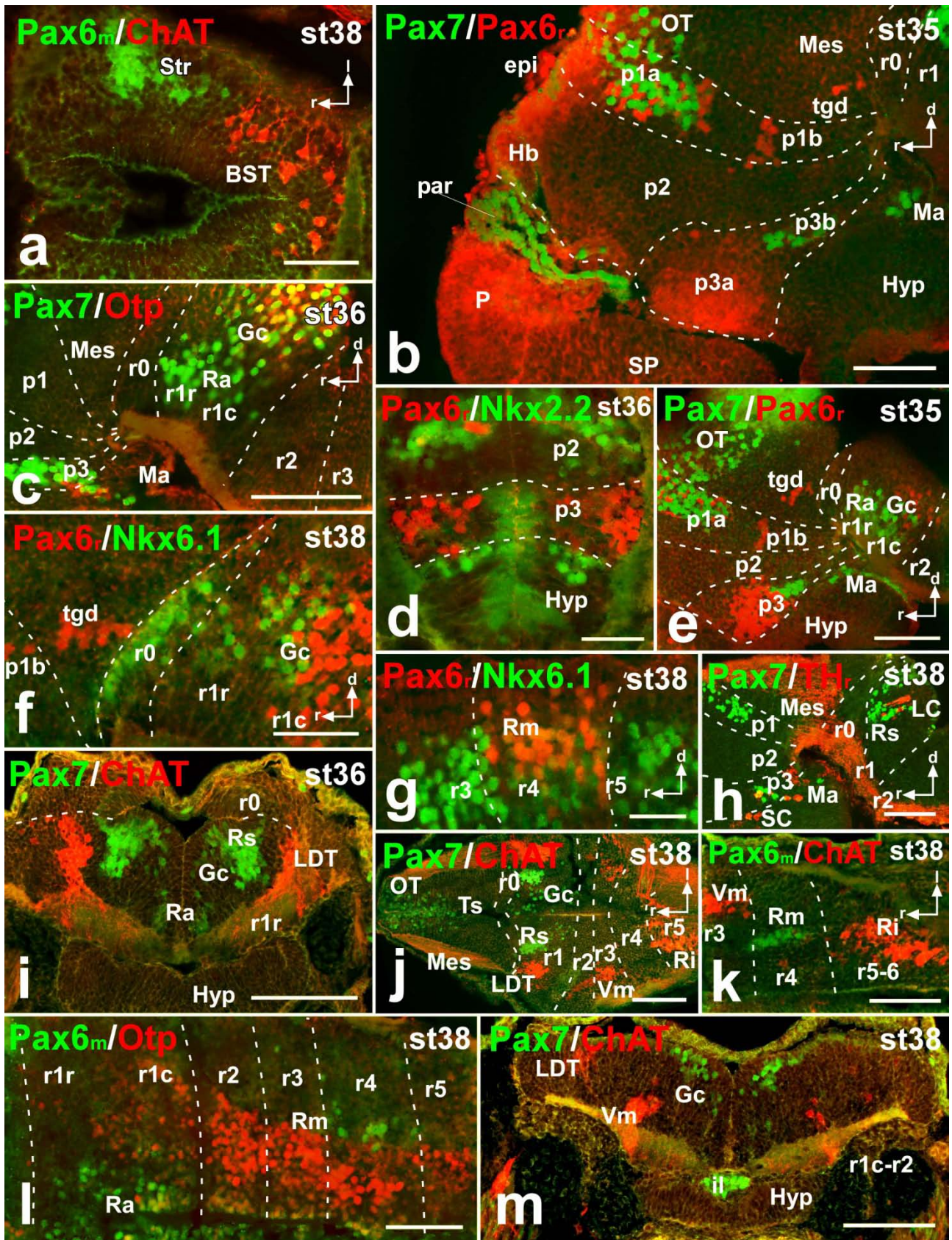


Figure 9.

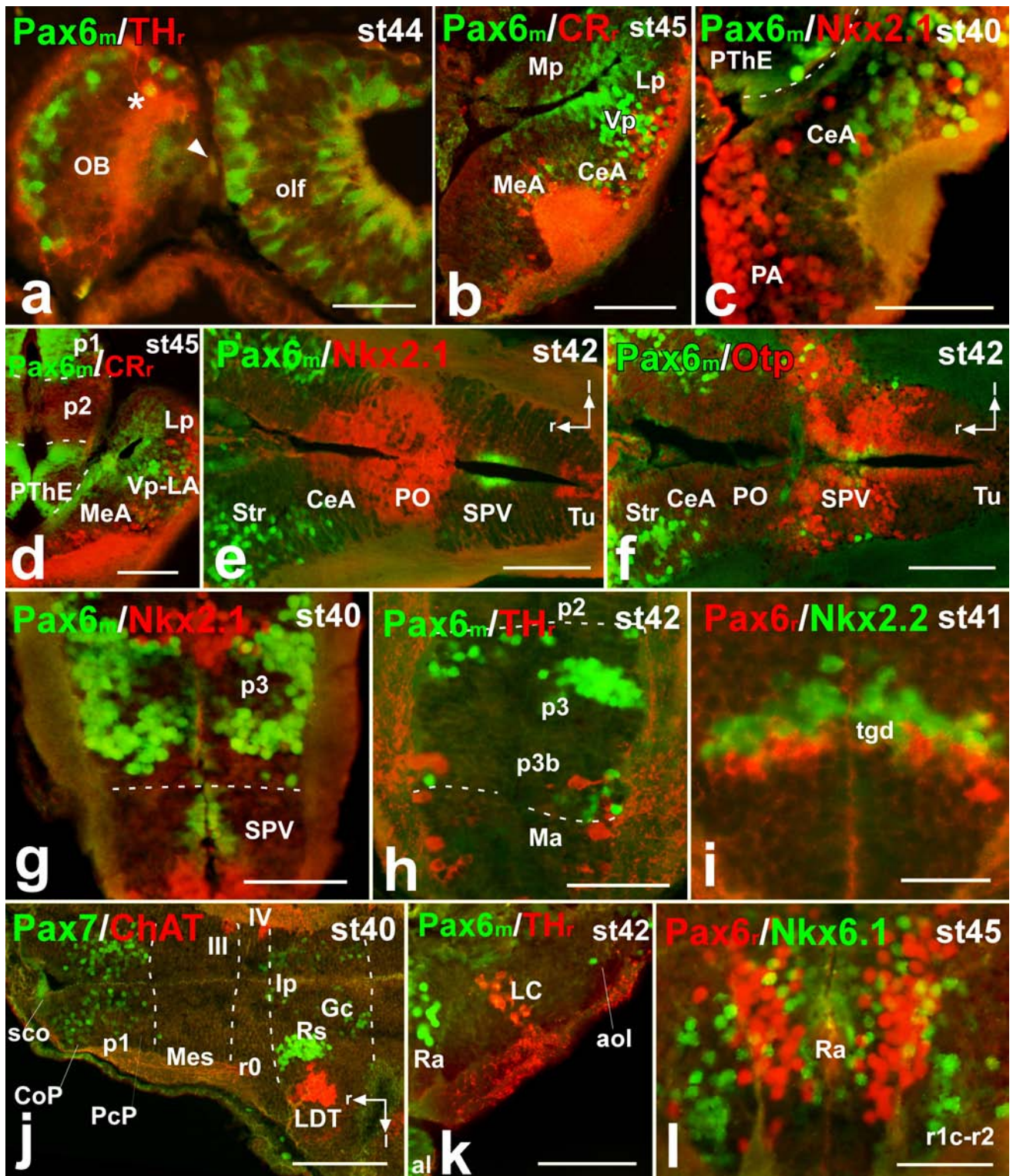


Figure 10. Photomicrographs of double-labeled transverse (a-d, g-i, k, l) and horizontal (e, f, j) sections through the brain of *Pleurodeles waltl* showing the localization of Pax6 or Pax7 cells in relationship to other molecules (indicated on the upper left corner of each photomicrograph). Different stages (indicated in the upper right corner of each photomicrograph) corresponding to early active larvae are illustrated. All images are oriented following the same standard: dorsal is upwards in transverse and sagittal sections, and rostral is to the left in sagittal and horizontal sections. The dashed lines represent interneuromeric boundaries. Pax6_m corresponds to the monoclonal antibody mouse anti-Pax6, whereas Pax6, represents the polyclonal rabbit anti-Pax6, CR, the polyclonal rabbit anti-CR, and TH, the polyclonal rabbit anti-TH. The arrowhead points to a Pax6 cell in the olfactory nerve; the asterisk highlights a double Pax6/TH cell in the olfactory bulb (a). For abbreviations, see list. Scale bars = 50 μ m (a, c, g, i, l), 100 μ m (b, d-f, h), 200 μ m (j, k). A magenta–green version of this figure is provided as Supplementary Figure 3.

In *Pleurodeles* at the end of the embryonic period, faint Pax6 expression is widely detected in the optic cups during retinogenesis, specifically in the growing neuroretina and the forming lens vesicle. Before hatching, when the functionality of the retina can be assessed because larvae show escape response triggered by visual stimuli, the ciliary marginal proliferative zone retains low Pax6 expression levels. The expression is excluded from mature cells in the outer layers of the retina, remaining only in the deep inner nuclear layer and the ganglion cell layer, until adulthood (Joven et al., 2013). These results are almost identical to those reported for *Xenopus* (Hirsch and Harris, 1997) and other vertebrates (Guduric-Fuchs et al., 2009; Ferreiro-Galve et al., 2012a). The double labeling experiments conducted in *Pleurodeles* show that Pax6 is never directly expressed in ChAT or TH amacrine cells, in line with data reported in elasmobranchs (Ferreiro-Galve et al., 2012a).

Olfactory organ

As in the case of the eye placode, Pax6 is early expressed in the olfactory placode (Walther and Gruss, 1991; López-Mascaraque et al., 2005; Nomura et al., 2007) and it has conserved roles in the development of the olfactory organ across vertebrate and invertebrate species (van Heyningen and Williamson, 2002; Hartmann et al., 2003). In *Pleurodeles*, weak Pax6 expression appears first in the apical surface of the developing olfactory epithelium during the formation of the olfactory organ primordium (Stages 25-32, data not shown). By stage 32, the first Pax6 isolated cells in more basal positions are detected, coinciding with the observation of first neurons and pioneer fibers of the olfactory nerve by means of CR immunoreactivity (Joven et al., 2012), and Pax6 scattered cells are present in the olfactory nerve during the initial and early active larval periods (Stages 34-44). These observations are comparable to those recently described in the developing olfactory organ of the dogfish (Quintana-Urzaínqui et al., 2012a). However, the migratory period characterized in the dogfish by the observation of Pax6 cells along the course of the olfactory nerve was only

partially assessed in *Pleurodeles*, mainly because of the proximity of the olfactory organ and the developing olfactory bulb. In *Pleurodeles* Pax6 expressing cells are broadly distributed in the olfactory organ from stages 34 to 44, until stage 45, suggesting its implication during the early maturation period, before the olfactory system becomes fully functional and feeding is governed by visual and vibratory cues (initial and early active larval periods). Pax6 disappears during the late larval period, coinciding with the beginning of active seeking of food in the bottom, and is not detected in adults. In contrast, in rats Pax6 expression has been shown to persist in the adult olfactory epithelium (Guo et al., 2010).

Olfactory bulbs

Despite the scarce lamination shown in their CNS, urodeles show considerable degree of layering in the olfactory bulbs, as well as complex networks of interneurons, which are conserved in vertebrate evolution (ten Donkelaar, 1998; Laberge, 2008). Pax6 expression in the OB is also a conserved feature in the vertebrate lineage, from agnathans through mammals, including humans (Stoykova and Gruss, 1994; Hauptmann and Gerster, 2000; Puelles et al., 2000; Franco et al., 2001; Murakami et al., 2001; Derobert et al., 2002; Hauptmann et al., 2002; Moreno et al., 2008a; Verdiev et al., 2009; Moreno et al., 2010, 2012a; Duan et al., 2012; Ferreiro-Galve et al., 2012b; Joven et al., 2013). Pax6 expression is present in the region that gives rise to the main and accessory olfactory bulbs, starting at stage 27 as weak ventricular expression that gradually increases in cells situated towards the marginal zones, close to the developing layer of olfactory fibers. The first double Pax6/TH, Pax6/CB and Pax6/CR interneurons were detected by the end of the early active larval period, just before the olfactory organs and nerves lose the Pax6 expression and the larvae actually use of the olfactory system. The population of TH cells in the olfactory bulbs increases rapidly during the late active larval period (González et al., 1995) and they always express Pax6, as in the adult (Joven et al., 2013). Our results and those reported for the zebrafish (Wullimann and Rink, 2002) and dogfish (Quintana-Urzaínqui et al., 2012a) suggest that the implication of Pax6 in dopaminergic and calbindin-containing cell

differentiation and/or maintenance is a conserved feature in vertebrates.

Multiple origin of mammalian OB interneurons has been suggested: initially originating locally from precursors placed in the OB vz (Vergaño-Vera et al., 2006), and later arising from migrating intermediate progenitors that colonize the OBs from other neighboring regions of the rostral forebrain, specifically through the rostral migratory stream (Young et al., 2007; Lledo et al., 2008; de Chevigny et al., 2012). The neuroanatomical regions that contribute to the rostral migratory stream show abundant Pax6 expression (Stoykova and Gruss, 1994; Duan et al., 2012). In *Pleurodeles*, a dual origin of bulbar interneurons is suggested by the Pax6 expression observed in the OB vz, and the spatially continuous expression of Pax6 cells from the rostral striatum and ventral pallium to the OB. Similar tracking studies to those conducted in mammals are needed to confirm the multiple origins of the bulbar Pax6 cells in urodeles.

Pallium

The four pallial regions characteristic of the telencephalon of tetrapods have been identified in *Pleurodeles* by their distinct staining patterns of several neuronal markers and transcription factors (Moreno and González, 2007a; Morona and González, 2008; Joven et al., 2013). Thus, we referred to medial, dorsal, lateral, and ventral pallial regions in the description of the distribution of Pax6 expression, the only Pax gene that has been demonstrated to have multiple roles during the formation of the pallium/cortex (Yun et al., 2001; Bachy et al., 2002; Bishop et al., 2002; Jiménez et al., 2002; Muzio et al., 2002; Schuurmans and Guillemot, 2002; Assimacopoulos et al., 2003; Talamillo et al., 2003; Carney et al., 2006; O'Leary et al., 2007; Quinn et al., 2007; Tamai et al., 2007; Gopal and Golden, 2008; Piñon et al., 2008; Tuoc et al., 2009; Ceci et al., 2010; Moreno et al., 2010; Cocas et al., 2011; Georgala et al., 2011). In *Pleurodeles*, like in other tetrapods (Smith-Fernández et al., 1998; Puelles et al., 2000), Pax6 is a general marker of the pallial neuroepithelium during the embryonic period. By hatching, some subsets of cells gain or lose intensity of staining as they migrate radially towards the pial surface of the pallium, and cells are also detected in the developing striatal territory. No actual radial Pax6

progenitor vz associated to it was observed, suggesting that some cells originated in the pallial vz migrate tangentially into the subpallium. During the initial larval period Pax6 expression is lost in the vz of the medial pallium, whereas weak immunoreactivity still persists in the vz of the other regions. In particular, Pax6 cells are abundant in the svz and mz of the ventral pallium. This situation continues through the metamorphic juvenile, and in adults the ventricular expression is maintained only in the ventral pallium (Joven et al., 2013). Of particular interest is the Pax6 expression noted in our study, and in those of other vertebrate species, in the pallio-subpallial boundary (psb). Actually, in mammals Pax6 has been implicated in its specification (Yun et al., 2001; Molnár and Butler, 2002; Stenman et al., 2003; Manuel and Price, 2005; Carney et al., 2009; Georgala et al., 2011). The evolutionary conserved pattern of expression of Pax6 in the psb indicates its importance in the correct telencephalic development. Actually, recent studies have demonstrated a special signaling center in the psb, the anti-hem (in opposition to the hem defined in the medial telencephalon at the hippocampal primordium), that differs from other telencephalic signaling centers by expressing molecules later than other centers and in a more graded manner (Assimacopoulos et al., 2003). The lack of Pax6 (sey/sey mutants) results in the lack the anti-hem, suggesting that Pax6 is essential in the regulation of the anti-hem development (Assimacopoulos et al., 2003) and, thus, to allow the correct cells immigrations (Chapouton et al., 1999). Pax6 cells from the psb appear to migrate to specific emerging amygdaloid nuclei and other basal telencephalic structures (Carney et al., 2006)

Figure 11. Photomicrographs of single-stained transverse (a-e, g-k), and sagittal (f) sections through the brain of *Pleurodeles waltl* showing the localization of Pax6 or Pax7 cells (indicated on the upper left corner of each photomicrograph). Different stages (indicated in the upper right corner of each photomicrograph) corresponding to late larvae (a-k) are illustrated. All images are oriented following the same standard: dorsal is upwards in transverse and sagittal sections, and rostral is to the left in sagittal sections. The dashed lines represent interneuromeric boundaries. Pax6_m corresponds to the monoclonal antibody mouse anti-Pax6, whereas Pax6_p represents the polyclonal rabbit anti-Pax6. For abbreviations, see list. Scale bars = 200 μm (a-c, i), 100 μm (d, f, j), 50 μm (e, g, h, k).

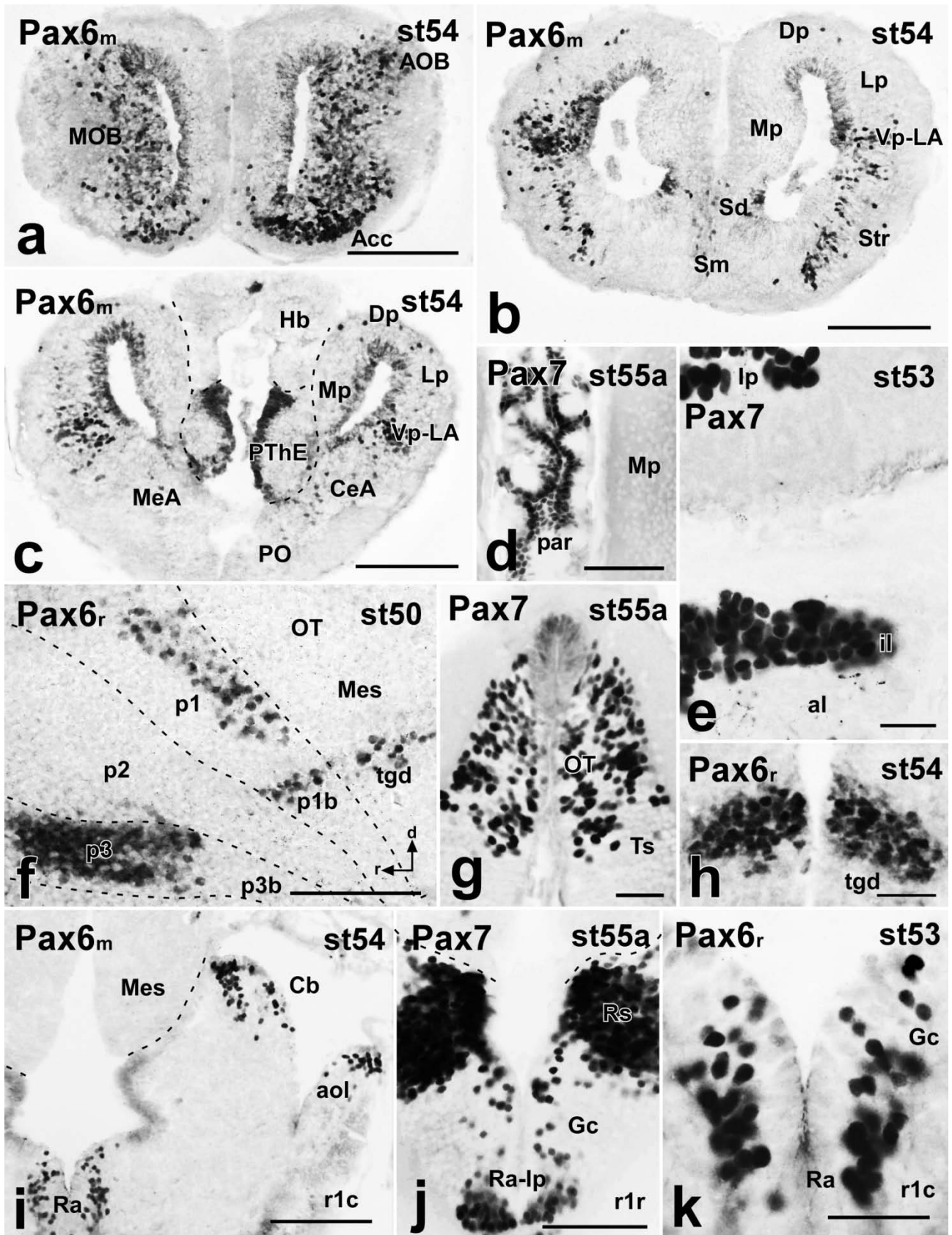


Figure 11.

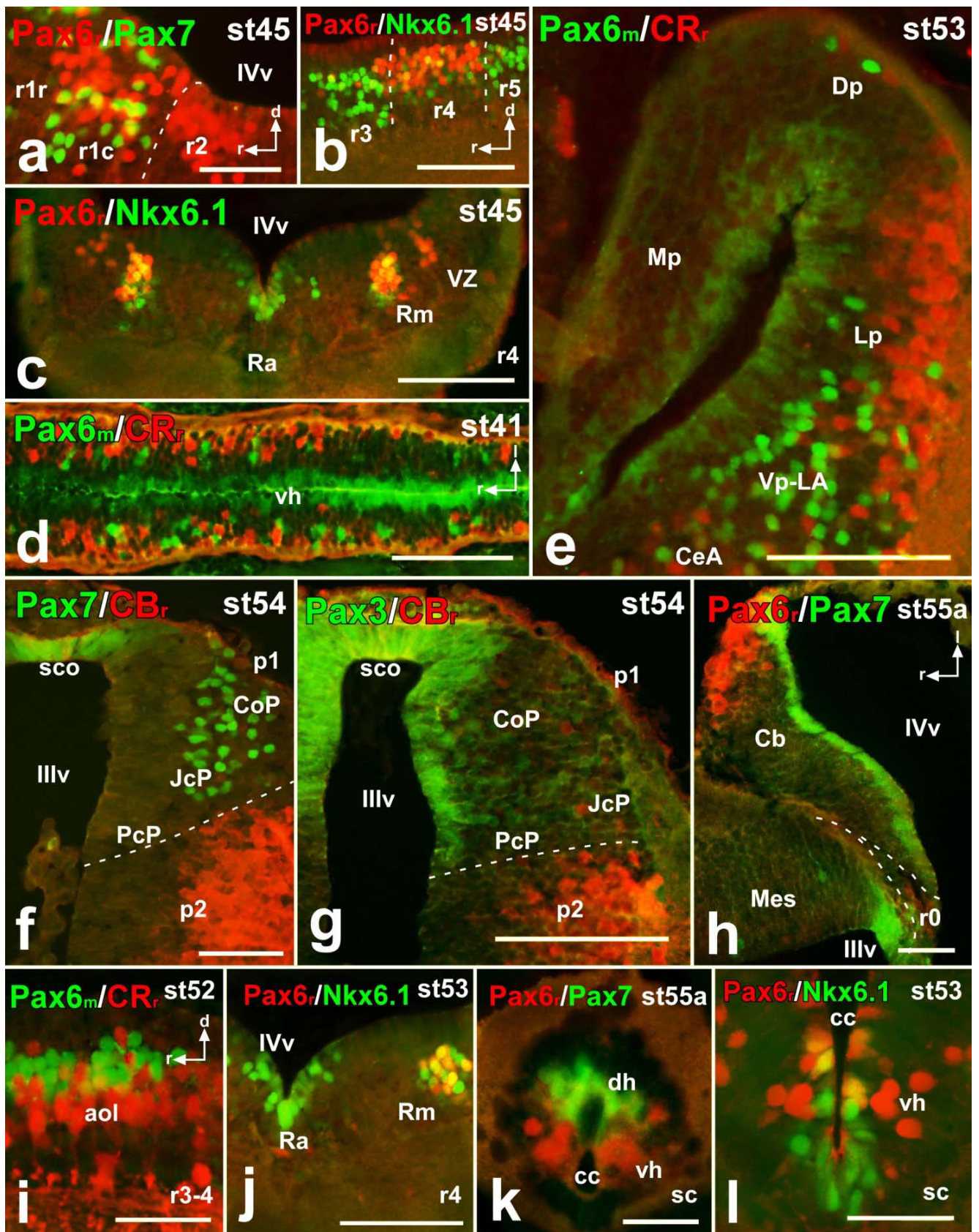


Figure 12.

and, albeit in our study cell tracking experiments were not conducted, the spatiotemporal sequence of Pax6 cells emerging in the subpallium suggests similar migrations, in agreement with similar observations in the dogfish (Ferreiro-Galve et al., 2008; Rodríguez-Moldes, 2009; Quintana-Urzaínqui et al., 2012b).

Septum

The current interpretation of the septum, classically considered a subpallial region, includes pallial, pallidal and striatal derivatives (Puelles et al., 2000; Medina, 2008; Moreno et al., 2010; Medina et al., 2011). In *Pleurodeles*, slightly after the onset of the early active larval period, Pax6 cells can be detected in the dorsal septum, extending subsequently into the lateral and medial septal domains by the end of the late active larval period. Double staining of Pax6 with Nkx2.1 (a pallidal marker) shows that both transcription factors are expressed in slightly intermingled cells, but no double-labeled cells are observed throughout development (present results) or in the adult (Joven et al., 2013). Several studies support a conserved expression pattern of Pax6 in the septum across vertebrates (Stoykova and Gruss, 1994; Puelles et al., 2000; Moreno et al., 2010; Duan et al., 2012).

Interestingly, Pax6 is expressed in the vz of the dorsal septum, in a region that corresponds in the medial hemispheric wall to the psb in the lateral wall in *Pleurodeles*. This region might be comparable with the hem signaling center, which

in mammals expresses Pax6 and lacks Nkx2.1 (Flames et al., 2007). In addition, the pattern of distribution of Pax6 cells observed in the dorsal septum during development and in the adult (Joven et al., 2013) is identical to that observed in *Xenopus* and in the turtle *Pseudemys scripta*, corroborating a mixed pallial/subpallial origin of the neurons in this region (Moreno et al., 2008b, 2010).

Basal ganglia

The basal ganglia of urodeles share a common pattern of organization with all tetrapods, including the presence of the striatum, nucleus accumbens and pallidum (Marín et al., 1998; Laberge and Roth, 2005; Moreno and González, 2007a). The Pax6 expression pattern in *Pleurodeles* can therefore be considered within these regions.

In the *Pleurodeles* subpallium, the homologous region to the lateral ganglionic eminence (LGE) shows Pax6 expression (only in the mz) as early as stage 30. This expression continues along development to its final distribution in the adult striatum and central amygdala (the striatal component of the amygdala; Moreno and González, 2006). The striatum becomes recognizable from the early active larval period. It contains abundant Pax6 cells that extend caudally to populate the prospective central amygdala, identifiable by stage 45. Conversely, in amniotes Pax6 is not observed in the vz of the LGE at any developmental stage (with the only exception of its most dorsal portion), and the Pax6 cells observed in ventral striatal zones seem to derive from this region (Flames et al., 2007; Abellán and Medina, 2009; Moreno et al., 2010). In *Pleurodeles*, only weak Pax6 expression is detected in the developing dorsal striatum and, more intensely, in the psb (see above). Therefore, it seems plausible that in *Pleurodeles* cell migrations from these regions into the striatum proper also occur, as demonstrated in *Xenopus* (Moreno et al., 2008a).

The nucleus accumbens becomes recognizable in *Pleurodeles* in the late active larval period, and contains Pax6 cells until adulthood (Joven et al., 2013). Similarly, studies in chicks, turtles and mice showed that the primordium of nucleus accumbens, immediately caudal to the olfactory bulb, expresses Dlx2 and Pax6 in cells entering

Figure 12. Photomicrographs of double-labeled sagittal (a, b, i), transverse (c, e-g, j-l), and horizontal (d, h) sections through the brain of *Pleurodeles waltl* showing the localization of Pax3, Pax6 or Pax7 cells in relationship to other molecules (indicated on the upper left corner of each photomicrograph). Different stages (indicated in the upper right corner of each photomicrograph) corresponding to early active (a-d) and late active larvae (e-l) are illustrated. All images are oriented following the same standard: dorsal is upwards in transverse and sagittal sections, and rostral is to the left in sagittal and horizontal sections. The dashed lines represent interneuromeric boundaries. Pax6_m corresponds to the monoclonal antibody mouse anti-Pax6, whereas Pax6_r represents the polyclonal rabbit anti-Pax6, CR_r the polyclonal rabbit anti-CR, and CB_r the polyclonal rabbit anti-CB. For abbreviations, see list. Scale bars = 50 μm (a, h, i, k, l), 100 μm (b-g, j). A magenta–green version of this figure is provided as Supplementary Figure 4.

the mantle zone radially (Puelles et al., 2000; Moreno et al., 2010).

Amygdaloid complex

A common pattern of organization of the amygdaloid complex in tetrapods has been proposed on the basis of the analysis of nuclei origin and specification (Moreno and González, 2006; 2007b; Martínez-García et al., 2012). In *Pleurodeles*, a multimodal/multiorigin amygdala has been analyzed (Moreno and González, 2006, 2007b), which is composed by the lateral amygdala (LA), a ventropallial derivative that receives the olfactory information, the medial amygdala (MeA) of subpallial origin that is the main secondary vomeronasal center, and the central amygdala (CeA) that is a striatal area representing the autonomic amygdaloid subdivision (Moreno and González, 2007b). In this context the Pax6 expression was reported in adult *Pleurodeles* in the LA and the CeA, but not in the MeA (Joven et al., 2013). During development, Pax6 cells are already detected in the prospective LA in the ventral pallium in the embryonic period, and this specific region could be identified by calretinin immunoreactivity (Joven et al., 2012). We already referred to the Pax6 expression in the CeA, which starts by stage 45, coinciding to the beginning of the late active larval period.

Hypothalamus

According to a recent study in *Xenopus* (Domínguez et al., 2013), and in line with other studies in amniotes and anamniotes, we have considered in the hypothalamus of *Pleurodeles* two main alar regions, the supraoptopeduncular (SPV) and suprachiasmatic (SC) regions, and two basal regions, the tuberal and mammillary regions (for review see Moreno and González, 2011; Medina, 2008; Puelles et al., 2012a).

Within the alar hypothalamus of *Pleurodeles*, Pax6 expression in the vz of the SPV can be detected from stage 34 until the end of the metamorphosis. The actual localization of the labeling in the SPV was unmistakably assessed by the combined labeling for Otp (marker of the SPV) and Nkx2.1 (marker of the adjacent preoptic area and SC). Similar Pax6 expression in the alar hypothalamus was not observed in other anamniotes (Murakami et al., 2001; Moreno et

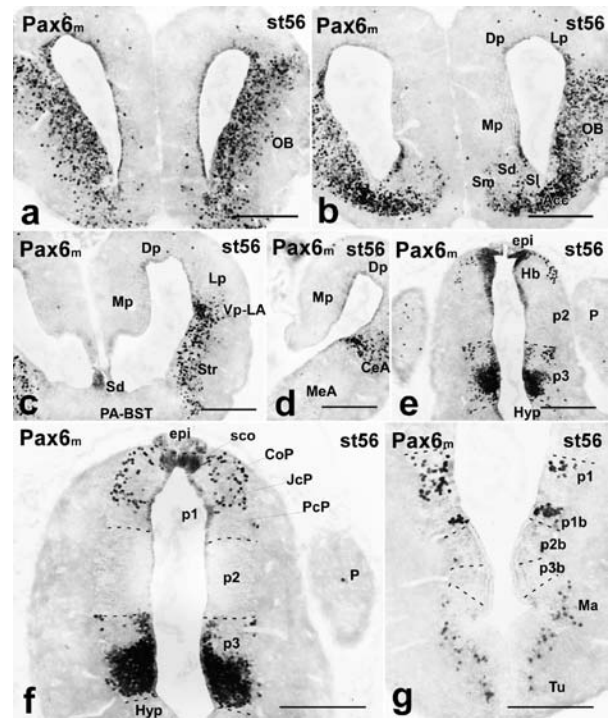


Figure 13. Photomicrographs of single-stained transverse sections through the brain of a metamorphic newt *Pleurodeles waltl* showing the localization of Pax6 in the telencephalon (a-d), diencephalon (e,f) and basal hypothalamus (g). In all photomicrographs dorsal is oriented upwards. The dashed lines represent interneuromeric boundaries. The monoclonal mouse anti-Pax6 antibody was used. For abbreviations, see list. Scale bars = 200 μm.

al., 2008a; Moreno and González, 2011; Domínguez et al., 2013), although Pax6 expression seems to be a characteristic of the SPV of amniotes (Medina, 2008; Moreno et al., 2012a). Interestingly, in experimental studies in urodeles Pax6 has been demonstrated to be necessary not only for eye morphogenesis but also for the formation of the alar hypothalamic region (Eagleson et al., 2001).

The relatively large basal hypothalamus of *Pleurodeles* showed just a few Pax6 cells, transiently in juveniles, and Pax7 cells in the mammillary region from early stages through adulthood (Joven et al., 2013). Only faint Pax6 cells were transiently detected in the tuberal region in the juvenile. In particular, following the spatiotemporal pattern of expression of the Pax7 cells in the mammillary region (assessed in double labeling experiments with Nkx2.1), they seem to derive from the population of Pax7 cells detected at early stages in the adjacent basal plate of p3. The catecholaminergic groups in this

region appear to be in close relationship with both Pax6 and Pax7 cells during development, but not actual colocalization was observed, so a direct role of these Pax genes in the formation of these neurons in newts cannot be assessed.

In relation to the hypothalamus, Pax6 expression is detectable in the primordium of the anterior lobe of the hypophysis, from the embryonic period, and persists at low levels in the juvenile brain, being virtually lost in the adult (Joven et al., 2013), which suggest a role of Pax6 in the ontogenesis of this region. Similar expression during development has been reported also in zebrafish (Guner et al., 2008), chicken (Sjödahl and Gunhaga, 2008) and mammals (Bentley et al., 1999; Kioussi et al., 1999; Dasen and Rosenfeld, 2001). In turn, a conspicuous population of Pax7 cells is detected from embryonic stages in the intermediate lobe of the hypophysis in *Pleurodeles*. In zebrafish, Pax7 cells have been described in a comparable pars intermedia (Guner et al., 2008), and also in mammals Pax7 constitutes a specific marker of a postnatal progenitor cell subpopulation and the melanotrope cells of the intermediate lobe of the hypophysis (Hosoyama et al., 2010; Budry et al., 2011).

Paraphysis

The large paraphysis of urodeles was already located within the telencephalon as it is rostral to the velum transversum, which classically marks the limit between the two subdivisions of the forebrain (Warren 1905), and according to its development it was described as a posterior telencephalic organ adjacent to the choroid plexus of the third ventricle (Kappers et al., 1950). The paraphysis in newts is a ramified tubular gland with a single layered neuroepithelial wall surrounded by connective tissue and sinusoids, and lying outside the arachnoid thus serving as interface between the cerebrospinal fluid and the blood (Brocklehurst, 1979). A remarkable observation in *Pleurodeles* was the specific and intense Pax7 labeling in the paraphysis from stage 27, when it is only an invagination of the telencephalic roof plate, and the expression is maintained until its complex ramified tubular structure is observed between the telencephalic hemispheres in adults (Joven et al., 2013). Thus, our present results suggest that the paraphysis is a roof plate derivative that

originates at the limit between p3 and the evaginated telencephalon, more likely belonging to the first one. In the modified prosomeric model the paraphysis was disregarded, and the choroid plexus was the only derivative considered from the roof plate of p3 and telencephalon (Puelles and Rubenstein 2003).

Prosomere 3

The rostral diencephalic prosomere (p3) limits dorsally with the evaginated telencephalon in the roof plate derived PThE, and rostrally with the non-evaginated prosencephalon, including the basal ganglia, preoptic area and hypothalamus. The PThE in amniotes is usually restricted to embryonic stages, but in urodeles it persists until adulthood (Trujillo et al., 2005; Joven et al., 2013). It exhibits ventricular Pax6, while the PTh is filled by Pax6 expressing cells also in the svz and mz, in a similar manner to that seen in all vertebrates studied (Puelles et al., 2000; Wullimann and Rink, 2001; 2002; Bachy et al., 2002; Moreno et al., 2008a; Pritz and Ruan, 2009; Moreno et al., 2010; 2012a; Duan et al., 2012; Domínguez et al., 2013). The prethalamic Pax6 cell population is among the first detected in *Pleurodeles* embryos (stage 27), and the PThE Pax6 expression appears slightly later (stage 30). In the PTh, the Pax6 ventricular staining decreases from dorsal to ventral zones, suggesting that Pax6 cells are originated dorsally and migrate to the mz of more basal territories. Actually, double labeling experiments for Pax6, TH, and Nkx2.1 highlighted the localization of some migrated cells in the basal tegmental region of this segment, p3b (present results). Comparable results were described for mammals and reptiles (Stoykova and Gruss, 1994; Pritz and Ruan, 2009; Moreno et al., 2012a).

Pax6 cells located in the alar plate of p3 in the mouse were demonstrated to develop into dopaminergic neurons of the medial zona incerta (Vitalis et al., 2000; Mastick and Andrews, 2001), where TH/Pax6 double labeled cells were found during development (Mastick and Andrews, 2001). In contrast, our observations in *Pleurodeles* showed Pax6 cells close to the TH cells in the homologous region of the zona incerta, but actual colocalization in the same cells was not observed. Interestingly, no TH/Pax6 double labeled cells were detected in a confocal analysis of the development of dopaminergic

diencephalic neurons in the zebrafish, although close apposition of several Pax6 cells surrounding a given TH cell body were observed, still suggestive of a functional relationship of Pax6 in the development of dopaminergic cells in diencephalon (Wullimann and Rink, 2001).

Pax7 cells located in the basal part of p3 were clearly detectable in *Pleurodeles* from the embryonic period. Expression of Nkx2.1 in all Pax7 cells of p3b suggests their actual basal nature, in contrast to the adjacent tuberal hypothalamus where only Nkx2.1 is expressed. This observation is in concordance with those obtained by means of similar labeling approaches in anuran amphibians (Domínguez et al., 2013) and other vertebrates (Moreno et al., 2012a). As already mentioned, the scattered Pax7 cells observed in the mammillary region, analyzed throughout development, seem to arise in p3b and would have down regulated the expression of Nkx2.1, as it occurs in the cells originated in the medial ganglionic eminence that migrate to the cortex (Nóbrega-Pereira et al., 2010). Although actual migration was not assessed in our experiments, similar origin in p3b for the Pax7 cells located in the hypothalamus has been proposed for anurans and chelonians (Moreno et al., 2012a; Domínguez et al., 2013).

Prosomere 2

The intermediate prosomere of the diencephalon contains in its alar region the thalamus (Th; formerly dorsal thalamus), plus the epiphysis (or pineal complex) and the habenula. It also includes a small basal territory that is less characterized (for review see Jones, 2007; Puelles et al., 2012b). First Pax6, and slightly later Pax3 and Pax7, are expressed in the roof vz of the epithalamus in larvae, juveniles (present results) and adults (Joven et al., 2013). In the mouse, the developing pineal gland expresses Pax6 (Walther and Gruss, 1991) and its importance was revealed in mutants lacking Pax6, which do not develop a pineal gland (Mitchell et al., 2003). Also in the epithalamus, the habenula possesses some scattered double Pax6/Pax7 cells in the superficial fiber zone, first detectable at stage 38.

At early embryonic stages, Pax6 is present in the ventricular zone of the prospective thalamus, disappearing in late embryos. The boundary of the Th with the PTh (rostrally) and the pretectum (PT; caudally) can be defined throughout

development by the lack of Pax expression in the Th, like in mammals (Stoykova et al., 1996; Warren and Price, 1997; Kawano et al., 1999; Pratt et al., 2000; Puelles and Rubenstein, 2003; Grindley et al., 1997; Pratt et al., 2000). Pax6 is also expressed in the Th of early embryos in zebrafish (Hauptmann and Gerster, 2000; Wullimann and Rink, 2001), lamprey (Murakami et al., 2001) and dogfish (Derobert et al., 2002; Ferreiro-Galve et al., 2008). In addition, Pax6 expression in the basal part of p2 was not observed in *Pleurodeles*, in line with results in all other species studied, with the only exception of the Alligator during early development (Pritz and Ruan, 2009).

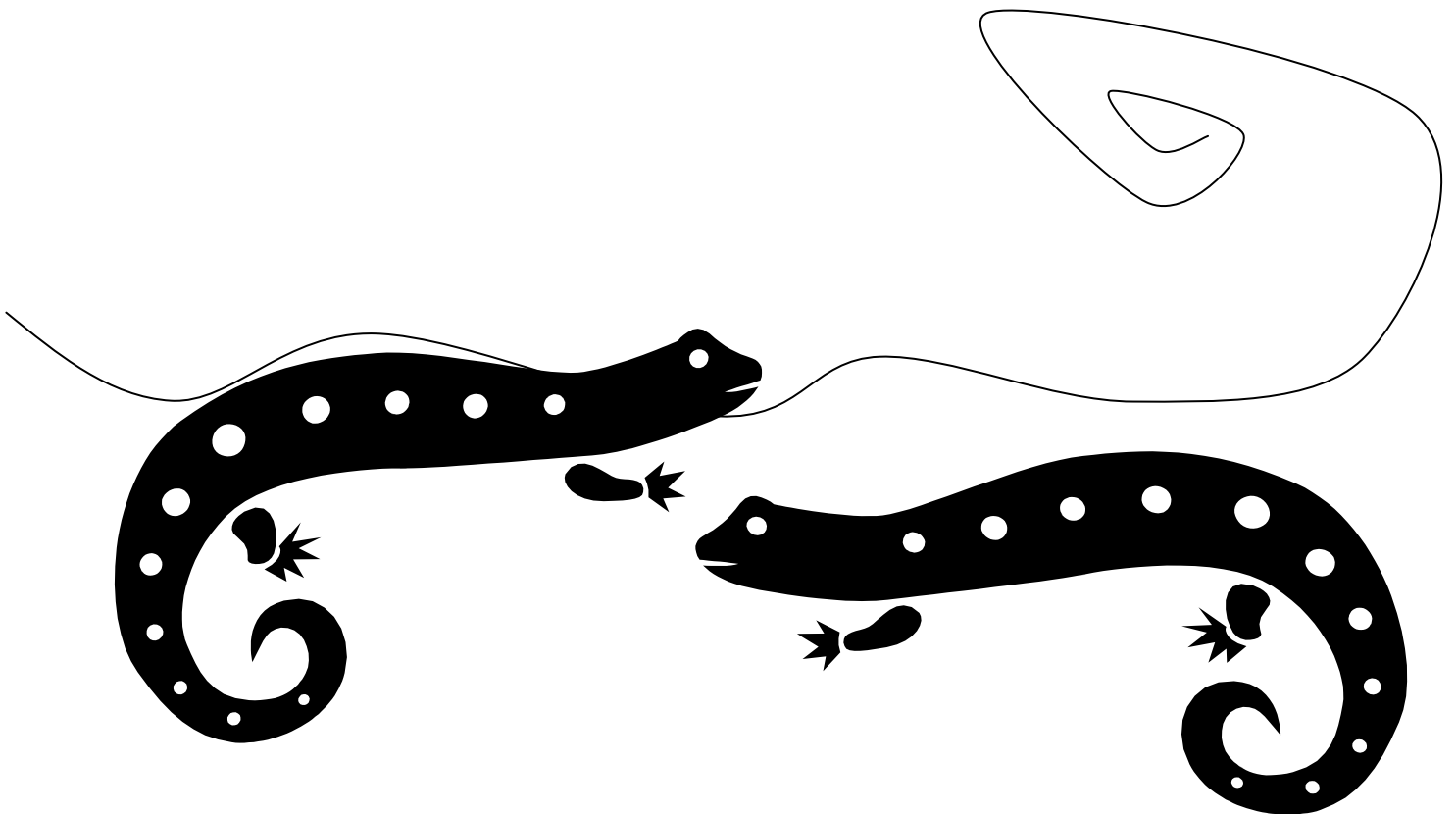
Prosomere 1

This segment constitutes the most caudal diencephalic portion, delimited by the retroflex fascicle at the p2-p1 boundary, and the posterior commissure and the oculomotor nucleus at the p1-mesencephalic boundary. It contains in its roof and alar portions the subcommissural organ and the pretectal nuclei, respectively (Puelles et al., 2012b). The subcommissural organ, which is involved in the cerebrospinal fluid circulation and/or homeostasis (Pérez-Fígares et al., 2001; Meiniel, 2007), is the only part of the brain where Pax3, Pax6 and Pax7 colocalize in the same cells.

The alar p1 in vertebrates shares common gene expression patterns during development that have served to the definition of three anteroposterior subdivisions of the pretectum: the PcP, JcP and CoP domains (Ferran et al., 2007; 2008; 2009; Morona and González, 2008; Merchán et al., 2011; Morona et al., 2011). In *Pleurodeles* Pax3 and Pax6 expression early occupy the vz of the whole pretectum, while Pax7 expression is not detected in the vz (except for the sco), but is intense in cells in svz and mz. In *Xenopus*, Pax3 and Pax7 expressions were detected in the PcP alar subdomain, establishing its pretectal nature and distinct molecular identity with respect to the JcP and CoP (Morona et al., 2011). Also in *Xenopus* Pax7 is early expressed in the JcP domain (Morona et al., 2011), as in *Pleurodeles* (present results), in contrast to the lack of expression reported in the chicken and mouse (Ferran et al., 2007; 2008).

In all vertebrates analyzed the caudal boundary of the pretectal region is defined molecularly mainly by the expression of Pax6 and,

4. Expresión de los factores de transcripción Pax en el SNC de *Pleurodeles waltl* adultos



Expression Patterns of Pax6 and Pax7 in the Adult Brain of a Urodele Amphibian, *Pleurodeles waltl*

Alberto Joven, Ruth Morona, Agustín González, and Nerea Moreno*

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

ABSTRACT

Expression patterns of Pax6, Pax7, and, to a lesser extent, Pax3 genes were analyzed by a combination of immunohistochemical techniques in the central nervous system of adult specimens of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Only Pax6 was found in the telencephalon, specifically the olfactory bulbs, striatum, septum, and lateral and central parts of the amygdala. In the diencephalon, Pax6 and Pax7 were distinct in the alar and basal parts, respectively, of prosomere 3. The distribution of Pax6, Pax7, and Pax3 cells correlated with the three pretectal domains. Pax7 specifically labeled cells in the dorsal mesencephalon, mainly in the optic tectum, and Pax6 cells were the only cells found in the tegmentum. Large populations of Pax7 cells occupied the rostral rhombencephalon, along with lower numbers of Pax6 and Pax3 cells. Pax6 was found in

most granule cells of the cerebellum. Pax6 cells also formed a column of scattered neurons in the reticular formation and were found in the octavolateral area. The rhombencephalic ventricular zone of the alar plate expressed Pax7. Dorsal Pax7 cells and ventral Pax6 cells were found along the spinal cord. Our results show that the expression of Pax6 and Pax7 is widely maintained in the brains of adult urodeles, in contrast to the situation in other tetrapods. This discrepancy could be due to the generally pedomorphic features of urodele brains. Although the precise role of these transcription factors in adult brains remains to be determined, our findings support the idea that they may also function in adult urodeles. *J. Comp. Neurol.* 521:2088–2124, 2013.

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

INDEXING TERMS: Pax genes; immunohistochemistry; segmental organization; telencephalon; diencephalon; brain evolution

The central nervous system (CNS) of urodele amphibians (newts and salamanders) has long been studied by comparative neuroanatomists (Herrick, 1927, 1948; Kicliter and Ebbesson, 1976; Fritsch and Himstedt, 1980; Northcutt and Kicliter, 1980), and its simplified organization of neurons and fiber systems was considered by some researchers to be common to all tetrapods. Newer data generated by modern techniques, however, allowed identification of the neuroanatomical features that characterize most brain regions in amniotes, although their homologs could not be identified in amphibians. This was particularly true for urodeles, where only limited cell migration from the ventricular lining exists in adults, and most neurons are crowded into a dense periventricular cell layer, and nuclei and distinct structures could be recognized only as local condensations (see ten Donkelaar, 1998). Thus, many features of the brain of urodeles seem to be less differentiated than in tetrapod outgroups, including cartilaginous and bony fishes, and some characters in urodele brains are even more simple than those in

agnathan brains (Northcutt, 1984, 1987; Roth et al., 1992, 1993). This situation was explained as a case of secondary simplification of the brain, implying that urodele brains are more primitive than their phylogenetic position as tetrapods would indicate (Northcutt, 1987; Roth et al., 1992, 1993). Our knowledge of the organization of urodele brains increased with the use of specific tract-tracing and immunohistochemical techniques, which allowed identification of distinct neuronal populations, revealing that the organization of the nonsegregated periventricular cell layer is much more complex

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Spanish Ministry of Science and Technology; Grant numbers: BFU2009-12315 and BFU2012-31687.

*CORRESPONDENCE TO: Nerea Moreno, PhD, Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. E-mail: nerea@bio.ucm.es

Received September 12, 2012; Revised November 21, 2012; Accepted November 27, 2012

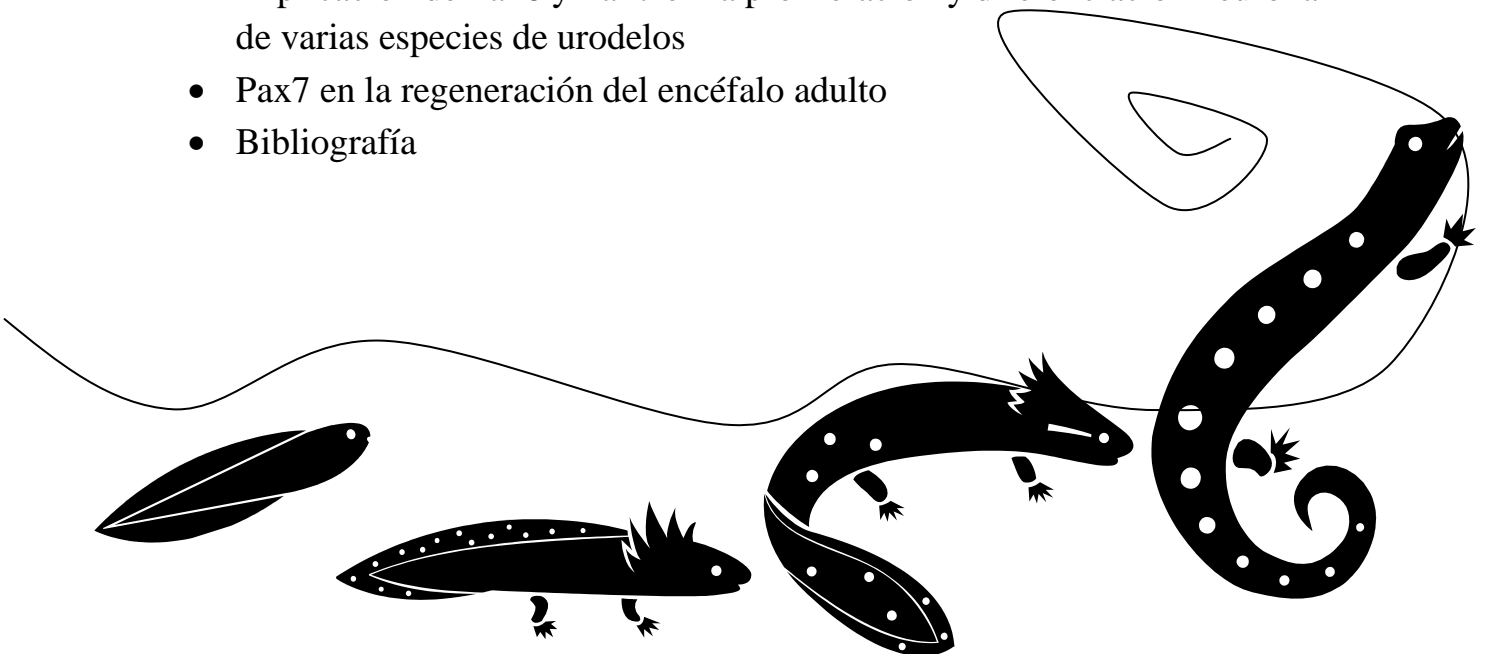
DOI 10.1002/cne.23276

Published online December 10, 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

5. Resumen de los resultados y discusión general

- **Resumen de resultados**
- **Discusión general**
 - Consideraciones metodológicas
 - Pax y CBPs en la regionalización y diferenciación funcional del SNC de anfibios urodelos: integración sensorial y motora
 - Pax6 y el desarrollo de sistemas sensoriales
 - Pax6 y Pax7 en el sistema fotoneuroendocrino
 - Migraciones de células Pax+ en el SNC
 - Implicación de Pax6 y Pax7 en la proliferación y diferenciación neuronal de varias especies de urodelos
 - Pax7 en la regeneración del encéfalo adulto
 - Bibliografía



Resumen de resultados

Como hemos detallado en la introducción (**capítulo 1**), los anfibios urodelos son un modelo animal de gran utilidad en el estudio del sistema nervioso central (SNC), debido principalmente a su desarrollo externo, su posición filogenética, la simplificación secundaria que caracteriza su encéfalo y su enorme potencial regenerativo. Los estudios previos han puesto de manifiesto diversos aspectos hodológicos, neuroquímicos y funcionales del SNC, aunque los datos publicados referentes a su organización se restringen a ciertas regiones o a marcadores concretos. En el presente estudio hemos analizado el desarrollo del SNC en urodelos y su regionalización en un contexto neuromérico, que permite establecer zonas homólogas entre diferentes clases de vertebrados en base a patrones de expresión génica. Con este fin, se analizan los patrones de inmunorreactividad de calbindina-D28k (CB), calretinina (CR), Pax3, Pax6 y Pax7 en el SNC de urodelos a lo largo de todo el desarrollo (embrionario, larvario y adulto) en relación con otros marcadores conocidos. Los datos se discuten desde un punto de vista comparativo, utilizando la bibliografía disponible respecto a la distribución de estas proteínas en otras especies. En consecuencia, nuestros resultados proporcionan una visión global del patrón de organización neuromérica del SNC de vertebrados, al mismo tiempo que ponen de manifiesto ciertas adaptaciones evolutivas específicas de urodelos. En primer lugar, la distribución de proteínas ligantes de calcio (CBPs) sigue las subdivisiones propuestas en los actuales modelos sintéticos de segmentación del cerebro en vertebrados, y permite visualizar la morfología celular de numerosas subpoblaciones neuronales (Fig.1). Por otra parte, los patrones de expresión de Pax3, Pax6 y Pax7 destacan la importancia de estos factores de transcripción en la organización dorsoventral y rostrocaudal del SNC de urodelos, así como en la especificación y diferenciación de ciertos tipos celulares, como ocurre en otros vertebrados (Fig.2).

En el **capítulo 2** se presenta la aparición de células inmunorreactivas para CB (CB+) y CR (CR+), que son analizadas en un contexto neuromérico y discutidas en relación con datos disponibles en otras especies, poniendo particular énfasis en las diferencias encontradas con el desarrollo de *Xenopus*. Desde etapas tempranas, tanto la CR como la CB se

expresan en el SNC de *P.waltl* (aunque la CB en menor medida), y salvo en algunos casos concretos, las células CBP+ se detectan con más intensidad conforme avanza el desarrollo larvario y mantienen su expresión en individuos adultos.

Desde muy temprano en el desarrollo, los órganos olfativos contienen abundantes células receptoras CR+. Prácticamente todas las fibras olfativas y vomeronasales contienen CR a lo largo del desarrollo, y en consecuencia tras la inmunodetección de CR quedan realizados tanto los nervios olfativos como los glomérulos. En lo referente a las células granulares del bulbo olfativo, la subpoblación de células CR+ aparece desde etapas embrionarias, mientras que la subpoblación CB+ se detecta a partir de estadios larvarios tardíos. Comparativamente, las neuronas CB+ y CR+ de las regiones paliales son escasas, y aparecen más tarde en el desarrollo de *Pleurodeles* que en el de *Xenopus*. Como sucede en el bulbo, la aparición de neuronas CR+ precede a la de células CB+, que desde estadios tardíos ocupan principalmente la región del palio ventral. En el palio dorsal, una subpoblación CR+ aparece en el posible equivalente del neocortex de mamífero, aunque por su morfología y distribución durante el desarrollo, estas células no se deben comparar con las interneuronas CR+ de origen extrapalial descritas en ratón. El palio medial, la región homóloga del hipocampo de aves y mamíferos, muestra expresión transitoria de CB como en otros vertebrados, si bien sucede en etapas más tardías que en *Xenopus*. Una situación similar se da en la región subpallial, concretamente en el septo, donde se observa una expresión transitoria de ambas proteínas en individuos juveniles que en *Xenopus* aparece antes de la metamorfosis. En cuanto a los ganglios basales, la aparición de CR precede a la de CB en *Pleurodeles*, al contrario que en *Xenopus*. El número de células CB+ y CR+ en el estriado es bajo durante todo el desarrollo, mientras que en el pálido el número de células CR+ disminuye y las CB+ aumentan progresivamente. Respecto al complejo amigdalino, la amígdala lateral contiene células CR+ desde estadios tempranos, mientras que las células CB+ pueden verse a partir de etapas tardías. La amígdala medial se caracteriza por

Figura 1 (página siguiente). Representación esquemática de la interpretación neuromérica del cerebro en desarrollo de *Pleurodeles waltl* en base a la expresión de CB y CR. Se han seleccionado los estadios 30 (a), 34 (b), 36 (c), 42 (d) y 52 (e), en representación de todo el desarrollo. Abreviaturas: ver lista en capítulo 3.

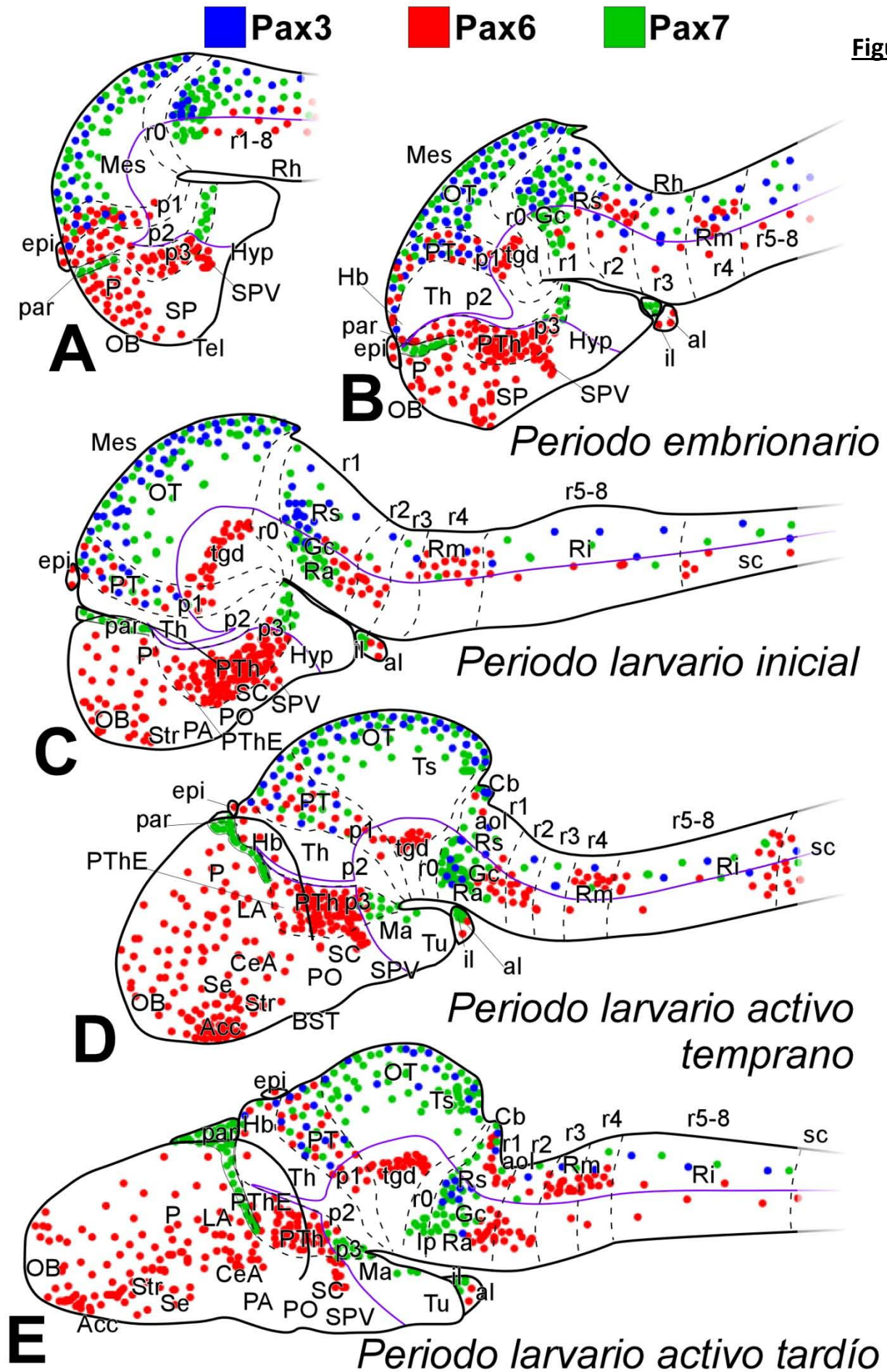


Figura 2

una gran subpoblación de neuronas CR+ y otra menor de neuronas CB+. Desde etapas larvianas tempranas se detecta una población CR+ en la amígdala central, mientras que las células CB+ aparecen tras la metamorfosis. En cuanto al hipotálamo alar, en la región supraquiasmática emergen primero células CR+ y luego CB+ en el juvenil. En contraposición, en la región supraoptoparaventricular (SPV) primero aparece la CB y después la CR. El hipotálamo basal (mamilar y tuberal) expresan CR desde etapas tempranas y CB sólo a partir de estadios tardíos.

En el diencéfalo, las CBPs se localizan en regiones específicas de los prosómeros 1, 2 y 3 (p1, p2, p3). La CR aparece antes que la CB, concretamente en la zona basal de los diferentes prosómeros (p1b, p2b, p3b) su expresión ayuda a localizar la región retromamilar (en p3b), el tubérculo posterior (en p2b) y la región prerubral (en p1b). Estas zonas se pueden distinguir con claridad mediante la progresiva aparición de células CB+, en p1 desde la etapa temprana y en p2 desde la etapa tardía. En la porción alar de p3, la distribución de ambas proteínas pone de manifiesto las subdivisiones rostral y caudal del núcleo ventral del pretálamo. A diferencia de mamíferos, la eminencia pretalámica carece de expresión de estas CBPs. En p2, la habénula ventral contiene CR a partir del periodo embrionario, mientras que la habénula dorsal expresa CB algo más tarde, desde el comienzo de la etapa larvaria. La habénula dorsal y el fascículo retroflejo muestran una marcada asimetría en urodelos, que se hace patente con la tinción de CB/CR, ya que la expresión de CB disminuye en el lado derecho en etapas tardías. En p2 alar, primero aparecen células CR+ que ocupan los núcleos talámicos central y anterior. Posteriormente aparecen las células CB+ en la zona anterior, que van ocupando regiones más caudales del núcleo anterior. Las primeras neuronas CR+ aparecen en el pretecho al final de la etapa embrionaria, pero no se segregan en tres dominios rostrocaudales hasta las etapas tardías, como sucede en otros vertebrados.

En el mesencéfalo, con excepción de la porción caudal, el tegmento y la banda dorsal (griseum tectale, techo óptico y torus semicircularis) contienen células CR+ desde estadios embrionarios. en el techo

Figura 2 (página anterior). Representación esquemática de la interpretación neuromérica del cerebro en desarrollo de *Pleurodeles waltl* en base a la expresión de Pax3, Pax6 y Pax7. Se han seleccionado los estadios 30 (a), 34 (b), 36 (c), 42 (d) y 52 (e), en representación de todo el desarrollo. Abreviaturas: ver lista en capítulo 3.

óptico, las células CR+ de la banda dorsal van ocupando posiciones más caudales de forma progresiva, al mismo tiempo que las fibras CR+ provenientes de la retina colonizan las capas superficiales en un gradiente rostrocaudal. La CB se detecta más adelante en estas regiones, en concreto a lo largo del periodo larvario activo temprano.

En cuanto al rombencéfalo, en el istmo o rombómero cero (r0) hay células CB+ en la porción ístmica del núcleo tegmental posteroventral desde el periodo larvario activo temprano, y en el juvenil metamórfico aparecen también células CR+. Los juveniles también tienen una subpoblación CB+ en la región alar del núcleo del istmo. En rombencéfalo rostral, las células de Purkinje del cerebelo son CB+, mientras que el área octavolateral expresa CR desde el periodo embrionario y CB a partir de la eclosión. Las fibras mecanoreceptoras de la línea lateral contienen CR, mientras que las fibras acústicovestibulares del octavo par craneal expresan CB. Sin embargo, es en los últimos estadios larvarios cuando se observa una segregación clara. La región del núcleo laterodorsal tegmental muestra células CB+ entremezcladas con otras CR+ desde poco después de la eclosión. En la zona basal de r1, aparecen primero células CR+, y luego CB+ que ocupan progresivamente posiciones más ventrales hacia la región del núcleo interpeduncular, cuyo neuropilo es positivo para CB. Las primeras células CR+ que aparecen en los embriones de *Pleurodeles* lo hacen antes de que aparezcan los primeros movimientos espontáneos, y se encuentran en la formación reticular a la altura de la vesícula ótica. Ya en la eclosión, la expresión se extiende a todo el rombencéfalo siguiendo una distribución segmentaria con grupos celulares parcialmente solapados, sobre todo entre el tercer y el sexto rombómero (r3-r6). Esta observación sugiere movimientos migratorios en el rombencéfalo, incluyendo desplazamientos inter-romboméricos. En la médula espinal la aparición de células CR+ precede a la de CB+, que además son menos numerosas.

En el **capítulo 3** se realiza un análisis espaciotemporal de los patrones de expresión de Pax3, Pax6 y Pax7 a lo largo del desarrollo embrionario en relación con otros factores de transcripción (Nkx2.1, Nkx2.2, Nkx6.1 y Otp) y marcadores evolutivamente conservados (CB, CR, ChAT, TH) cuya expresión era conocida en anfibios urodelos, lo que permite una interpretación inequívoca de ciertos límites en el marco

neuromérico. Además, nuestros resultados ofrecen una visión global del SNC en formación gracias a las combinaciones utilizadas, y a menudo sugieren movimientos migratorios difíciles de observar en el encéfalo de anfibios urodelos. En general, la expresión de proteínas Pax aparece con poca intensidad asociada a regiones ventriculares progenitoras específicas (vz), y conforme las células avanzan en los procesos de diferenciación a lo largo del eje medio lateral por las zonas subventricular (svz) y del manto (mz), los niveles de expresión varían en cada célula a nivel individual, que puede mantener la expresión de Pax en niveles bajos, aumentarla, o reducirla por completo. En el caso de Pax3, la expresión se va extinguiendo conforme avanza el desarrollo, mientras que Pax6 y Pax7 se encuentran ampliamente distribuidos en diversas subpoblaciones de células diferenciadas.

En primer lugar, nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de Pax6 en la formación y refinamiento de ciertos órganos sensoriales. La expresión de Pax6 en el epitelio y nervio olfativos es débil y transitoria, y su desaparición coincide con la adquisición del uso de la olfacción en la búsqueda y captura de presas. Por otra parte, en la retina indiferenciada, prácticamente la totalidad de células es Pax6+. Hacia el final del periodo embrionario, la retina se diferencia, y las células Pax6+ adquieren una gran variedad en términos de niveles de expresión: bajos niveles en el epitelio ciliar proliferativo, ausente en la capa nuclear externa y variable tanto en la capa ganglionar como en la nuclear interna. Nuestros experimentos de doble marcaje demostraron que Pax6 no se expresa directamente en células ChAT+ ó TH+, aunque sí se observaron células Pax6+ doblemente marcadas para 5-HT, CB y CR.

En la porción palial del telencéfalo (incluyendo los bulbos olfativos), Pax6 se expresa a lo largo del desarrollo en la vz desde etapas embrionarias tempranas. Los bulbos olfativos contienen abundantes células Pax6+ que gradualmente van ocupando la capa granular interna de los bulbos olfativos principal y accesorio, y persisten en animales metamorfoseados. Algunas de estas células fueron caracterizadas como interneuronas Pax6+/TH+, Pax6+/CB+ y Pax6+/CR+, que aparecen por primera vez al final del periodo larvario activo inicial, justo antes de que desaparezca la expresión en el epitelio y nervio olfativo. Caudalmente, en la región medial encontramos el septo, que expresa Pax6 dorsalmente y Nkx2.1 en su porción ventral, lo que corrobora un origen mixto palial-subpalial

propuesto para otros vertebrados. En el palio, la expresión de Pax6 se restringe a la vz y algunas células aisladas de la mz en sus porciones medial, dorsal y lateral. La expresión ventricular desaparece del palio medial en la etapa larvaria activa, y del palio laterodorsal durante el periodo juvenil. La porción ventral del palio y su estructura derivada, la amígdala lateral, contienen abundantes células Pax6 (también en adultos) que ocupan desde estadios embrionarios todos los estratos, invadiendo la región del estriado dorsal en las zonas svz y mz. La subpoblación estriatal Pax6+ ocupa la región de la amígdala central, reconocible desde la etapa activa tardía, y simultáneamente, el núcleo accumbens muestra células Pax6+ de forma llamativa, que mantienen su expresión en adultos. Para terminar con los ganglios basales, el presente estudio muestra la relación entre las células Pax6+, que ocupan regiones estriatales, y los derivados palidales, Nkx2.1+. En el hipotálamo alar, Pax6 se expresa en la vz del SPV desde la vida larvaria inicial hasta la metamorfosis (corroborado por dobles marcajes con Otp y Nkx2.1). Es entonces cuando se detectan de forma transitoria algunas células Pax6+ en las regiones basales del hipotálamo (tuberal y mamilar), que desaparecen en individuos adultos. Respecto a las células Pax7+ que ocupan la región mamilar desde la etapa larvaria tardía, los patrones espaciotemporales observados en estadios tempranos sugieren robustamente que esas células se originan en la porción basal de p3, y migran siguiendo el receso infundibular hasta su localización final. En relación con el hipotálamo, la hipófisis o glándula pituitaria contiene células Pax7 en el lóbulo intermedio, y Pax6 en el lóbulo anterior, como en otros vertebrados. Por último, la paráfisis contiene abundantes células Pax7+ desde muy temprano en el desarrollo, lo que permite distinguirla con facilidad de los plexos coroideos. Tanto su origen embrionario (una invaginación en la placa del techo rostral al velo transversal) como la localización de su anclaje en larvas, juveniles y adultos (topológicamente rostral a la eminencia pretalámica, identificada molecularmente por Pax6) indican que la paráfisis es una estructura telencefálica. De esta manera, nuestros datos revelan que la paráfisis representa el límite rostral de la expresión de Pax7, como derivado telencefálico de la placa del techo.

Desde muy temprano en el desarrollo, Pax6 se expresa en la vz de todo el diencefalo. En p3, Pax6 se observa en la vz de la eminencia pretalámica poco después de ser detectado en el pretálamo. La subpoblación más llamativa de Pax6 se localiza en el

pretálamo, y marca los límites rostral y dorsal de la porción alar de este segmento con el prosencéfalo secundario, corroborados por doble inmunohistoquímica para Nkx2.1, Nkx2.2, Otp, y TH, y también el límite entre p2 y p3, confirmado por la expresión de CB, CR y Nkx2.2. Sin embargo, la expresión de Pax6 no se limita a la porción alar de este segmento, ya que algunas células invaden regiones basales (Pax7+/Nkx2.1+) desde el comienzo de la etapa larvaria activa. Por otra parte, desde etapas embrionarias Pax7 se localiza en p3b, aunque parte de estas células invaden durante el desarrollo el hipotálamo mamilar, donde permanecen hasta en el adulto. En p2, después de la eclosión la expresión ventricular de Pax6 va desapareciendo gradualmente para quedar restringida a la placa del techo, junto con algunas células dispersas en la habénula (se trata de células Pax6+/Pax7+ que son visibles desde el inicio de la alimentación). Además, la epífisis contiene algunas células Pax6+. Respecto a p1, Pax3 y Pax6 ocupan la vz, svz y mz de su porción alar y la vz del órgano subcomisural, mientras que Pax7 sólo está presente en la vz de este último, y en células de las capas svz y mz de regiones alares. De esta manera, la expresión de las tres proteínas Pax en esta región permite visualizar la organización tripartita del pretecho. Además, en la porción dorsal de p1 basal, un grupo de células Pax6+ se encuentra separado de las poblaciones pretechoales, y en continuación con las células Pax6 del tegmento mesencefálico, al igual que en otros vertebrados.

El límite entre diencéfalo y mesencéfalo se visualiza muy bien mediante la expresión de Pax6: la amplia distribución de células Pax6+ en p1 alar, contrasta con la ausencia de expresión en el techo óptico, como en todos los vertebrados. En el mesencéfalo alar, Pax3 y Pax7 tienen grandes dominios de expresión, aunque Pax3 se restringe a las zonas vz y svz, y deja de expresarse paulatinamente a lo largo del desarrollo, mientras que Pax7 mantiene grandes índices de expresión incluso en el adulto. La diferenciación del mesencéfalo se puede visualizar mediante el seguimiento temporal de la expresión de Pax7: conforme el techo óptico adquiere la morfología adulta en regiones rostrales, las regiones caudales muestran bajos niveles de expresión en la mayoría de las células, recordando la expresión neuroepitelial de estadios tempranos. El límite alar-basal del mesencéfalo se visualiza por la expresión de Nkx2.2, que forma una banda longitudinal por encima de la banda de células Pax6+, como se ha descrito en otros

vertebrados. Por otra parte, el límite caudal de esta subpoblación se puede visualizar molecularmente por la expresión de Nkx6.1 en el istmo.

El segmento ístmico carece de expresión de Pax3, Pax6 y Pax7, pero al igual que en aves expresa Nkx6.1. Es a partir de estadios larvarios tardíos cuando algunas células Pax7+ pertenecientes a la porción rostral del núcleo interpeduncular invaden el segmento ístmico, corroborado mediante la presencia del núcleo troclear (ChAT+). En el resto del rombencéfalo y en la médula espinal, el neuroepitelio expresa diversos factores de transcripción en dominios parcialmente solapados, en el siguiente orden dorsoventral: Pax3, Pax7, Pax6, Nkx6.1 y Nkx2.2, como en otros vertebrados. Durante el periodo embrionario, el rombencéfalo rostral sufre un engrosamiento, y los distintos rombómeros se especifican molecularmente, como se demuestra con la expresión de los genes Pax y las combinaciones empleadas. El rombómero 1 es el más grande de todos, y puede ser dividido en sus porciones rostral (r1r) y caudal (r1c) en base a la expresión de distintos marcadores, entre ellos los factores de transcripción Pax3, Pax6, Pax7, Otp, y Nkx6.1. El cerebelo contiene células Pax3+/Pax7+ en el ventrículo desde antes de la expansión del labio rómbico. Después, hacia la mitad de la etapa larvaria activa temprana, células Pax6+ provenientes del área octavolateral se expanden a la capa granular del cerebelo. Las células Pax7 originadas en r1r cerca del límite alar-basal (y poco después también algunas Pax3) invaden territorios basales, desde donde avanzan hacia territorios más rostrales como parte del núcleo interpeduncular, confirmado mediante doble marcaje Pax7/ChAT. Además de la expresión ventricular, Pax3 y Pax7 están presentes en la gris central, y se encuentran células Pax7+ dispersas en la formación reticular en r1r, cerca del locus coeruleus (TH+) y mediales respecto al núcleo laterodorsal tegmental (ChAT+). En r1c, las células Pax3+, Pax6+, Pax7+ y Nkx6.1+ se entremezclan en las regiones basales, medialmente a la columna Otp+ que ocupa la gris central de todo el rombencéfalo. El grupo de Pax6 aparece primero en r2 durante los estadios larvarios iniciales, y posteriormente se detectan células también en r1c a partir del comienzo del periodo activo temprano. Caudalmente, un grupo de células Pax6+ ocupa la svz-mz de la formación reticular en r4 desde la eclosión, cuya localización se confirma mediante la ausencia de grupos motores en este segmento. Esta subpoblación se separa en dos física y molecularmente a lo largo del desarrollo: muchas de

las células que ocupan regiones reticulares son Pax6+/Nkx6.1+, mientras que otro grupo de células, entre las que se encuentran dobles Pax6+/CB+, se puede detectar progresivamente en los núcleos de la línea lateral, y conforme avanza el desarrollo va ocupando los rombómeros rostrales. Por último, Pax6 fue detectado en el núcleo del tracto solitario, relacionado con el procesamiento de la información gustativa, y en el núcleo de la columna dorsal, implicado en la discriminación de la información táctil de la piel y propioceptiva proveniente de músculos y tendones.

En cuanto a la médula espinal, una peculiaridad fue observada en comparación con la expresión de Pax6 y Pax7 descrita en ajolotes adultos: tras la metamorfosis, la expresión de Pax7 desaparece de la vz y queda restringida a la svz.

En el **capítulo 4** se describen los patrones de expresión de Pax3, Pax6 y Pax7 en el encéfalo adulto de *Pleurodeles waltl*, en combinación con otros factores de transcripción (Nkx2.1, Nkx2.2) y varios marcadores neuronales (CB, CR, ChAT, GABA, NOS, TH, 5-HT), que además de dar información sobre la identidad neuronal de algunas células Pax+, pueden ser utilizados como referencia topológica en la interpretación de los grupos inmunorreactivos. Los resultados obtenidos destacan la presencia de Pax6, Pax7 y Pax3 (en mucha menor medida) en las diferentes regiones de urodelos adultos. Pax6 ocupa todo el eje rostrocaudal del SNC, mientras que Pax3 y Pax7 se distribuyen caudalmente al telencéfalo (excepto por la presencia de Pax7 en la paráfisis). La localización de células Pax+ tanto en regiones ventriculares como en neuronas diferenciadas, sugiere que, al igual que en otros vertebrados las proteínas Pax son requeridas tanto en la proliferación como en la diferenciación de tipos celulares concretos en el urodelo adulto. Además, los patrones de expresión analizados facilitan la interpretación prosomérica del encéfalo de *Pleurodeles waltl*, puesto que confirman un gran número de límites propuestos en base a citoarquitectura clásica, estudios hodológicos y patrones de expresión. Los resultados son analizados desde un punto de vista comparado, por lo que se centran en la conservación de los patrones de expresión de Pax3, Pax6 y Pax7 en el encéfalo de vertebrados, y las peculiaridades propias de urodelos adultos.

En cuanto al prosencéfalo secundario, siguiendo un orden rostrocaudal, las primeras células Pax6+ se encuentran en los bulbos olfativos, tanto en la vz

como en neuronas de la capa granular interna y alrededor de los glomérulos. Muchas de estas neuronas son positivas para CR, CB, y TH, como sucede en otros vertebrados adultos. En la mayor parte del palio de urodelos adultos (medial, dorsal y lateral), Pax6 se expresa en unas pocas células aisladas en la mz. El palio ventral, que contiene la amígdala lateral, se caracteriza por la localización ventricular, subventricular y del manto de abundantes células Pax6+. Esta región es comparable al límite palio-subpalial de mamíferos, una zona de gran importancia en la migración de células paliales al estriado. La mayoría de las células Pax6+ en urodelos adultos se encuentran en regiones subpaliales, distribuidas en el septo, los ganglios basales y el complejo amigdalino. El complejo septal en urodelos adultos contiene células Pax6+ en sus porciones dorsal, lateral y banda diagonal de Broca, ligeramente codistribuidas con otras células Nkx2.1+ y NOS+ (sin colocalización), como en otros vertebrados. En cuanto a los ganglios basales, numerosas células Pax6+ ocupan la región del núcleo accumbens, identificado por el neuropilo dopaminérgico situado en el telencéfalo ventromedial. Estas células se continúan caudalmente con el estriado, que muestra abundantes células Pax6 en svz y mz, aunque muy pocas fueron detectadas en la vz. En la porción caudal del estriado se sitúa la amígdala central, que también contiene células Pax6+. Las regiones palidales, identificadas por la expresión de Nkx2.1 (área comisural preóptica y núcleo del lecho de la estría terminal) y ChAT (sistema colinérgico basal), carecen de Pax6, como sucede también en el área preóptica (Nkx2.1). En el hipotálamo de *Pleurodeles* adultos tampoco se detectó Pax6 (interpretado con la ayuda de CB, CR, TH y 5-HT). La presencia de Pax7 en el prosencéfalo secundario se limita a la paráfisis y el hipotálamo mamilar, y en relación a éste, el lóbulo intermedio de la hipófisis también contiene abundantes células Pax7+. De forma complementaria, el lóbulo anterior muestra algunas células con una débil señal Pax6+.

En p3, la eminencia pretalámica contiene células Pax6 sólo en la vz, en contraste con la expresión masiva que ocupa también las zonas svz y mz en el pretálamo, limitándose a la mz en regiones basales. En la porción basal de p3, se encuentran células Pax7+, algunas de las cuales expresan también Nkx2.1, como en otros vertebrados. Los límites de p3 se visualizan mediante las combinaciones Pax6/Pax7, Pax6/Nkx2.2 y Pax7/5-HT, con patrones de expresión que se excluyen mutuamente. En p2, Pax6 fue

detectado en la epífisis, y en algunas células Pax6+/Pax7+ que se sitúan en la habénula. Respecto a p1, Pax3, Pax6 y Pax7 se expresan en el órgano subcomisural, un engrosamiento de la vz situado en la placa del techo de p1 relacionado con la homeostasis y circulación del líquido cefalorraquídeo. En el pretecho, el núcleo comisural contiene distintas subpoblaciones de células Pax3+ en la vz, svz y zona profunda de la mz, así como células Pax6+ comprendidas entre la vz y la zona de fibras (fz), y células Pax7+ que ocupan desde la svz hasta el límite con la fz, algunas de las cuales se corresponden con neuronas TH+. El dominio yuxtacomisural contiene células Pax6+ y Pax7+, y estas últimas a menudo coexpresan GABA. En cuanto a la región precomisural, sólo contiene células Pax3+ en la vz. Por último, en la zona basal de p1, se encuentra una subpoblación Pax6+, que continúa en el tegmento mesencefálico.

El mesencéfalo alar se caracteriza por la abrupta desaparición de células Pax6+, al igual que en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha. Sin embargo, una discreta expresión de Pax3 ocupa las zonas vz y svz, y gran parte de las células de todos los estratos expresan Pax7 con diferentes intensidades, aunque son más numerosas en los estratos profundos de la mz. El marcaje Pax7/CR es útil en la confirmación de los límites de esta región, aunque no se observan células doblemente marcadas. La naturaleza neuronal de algunas de estas células Pax7+ se puede comprobar con el uso de otros marcadores neuronales, concretamente GABA y NOS. Además, el torus semicircularis contiene células Pax7+, evitando la vz. En la porción dorsal del tegmento mesencefálico la subpoblación Pax6+ ocupa la svz y la zona profunda de la mz hasta el límite con r0, donde termina de forma abrupta. Los experimentos de doble marcaje demostraron que este grupo se sitúa topológicamente ventral a la columna Nkx2.2+ que marca el límite alar-basal mesencefálico, y dorsal al núcleo oculomotor (ChAT+), el área tegmental ventral (TH+) y a una subpoblación de células CB+. Además algunas fibras TH+ rodean las células Pax6+ entre las zonas svz y mz.

En el rombencéfalo rostral algunas células Pax7+ se sitúan en r0, tanto en la región alar adyacente al núcleo del istmo (ChAT+), como en el núcleo interpeduncular, confirmado por la presencia del núcleo troclear (ChAT+), y del neuropilo interpeduncular (ChAT+/CB+). Caudalmente el grupo continúa, y en la columna del rafe en r1 se encuentran algunas células Pax7+/GABA,

entremezcladas con células 5-HT+ (aunque sin colocalizar ambos marcadores). Ocupando posiciones más laterales, algunas células Pax7+ ocupan la gris central, donde se entremezclan con células Pax6+ que alcanzan el límite caudal de r2, marcado por el núcleo motor del trigémino (ChAT+). Caudalmente, el grupo Pax7+ ocupa posiciones más laterales que las células Pax6+. En la formación reticular (y por encima de ésta en r1 rostral), se observa un número importante de células Pax7+ (además de una pequeña subpoblación de células Pax3+) que no se corresponden con las interneuronas inhibitorias de esta región (GABA+), y se sitúan medialmente al núcleo laterodorsal tegmental de naturaleza nitrérgica (NOS+) y colinérgica (ChAT+) en r1r, y medialmente al locus coeruleus de naturaleza noradrenérgica (TH+) en r1c. En el cerebelo, las células granulares se caracterizan por la expresión de Pax6, mientras que Pax7 se detectó en la vz. Las células de Purkinje (CB+) no expresan ni Pax6 ni Pax7. A diferencia de mamíferos, en urodelos adultos el núcleo laterodorsal tegmental no contiene células Pax6. La expresión de Pax7 en la vz intermedio-alar se mantiene a lo largo de todo el rombencéfalo en el adulto, mientras que sólo algunas células muestran expresión ventricular de Pax6, localizadas sobre todo en los extremos rostral y caudal del rombencéfalo. En el área octavolateral se encuentran células Pax6+ en las zonas dorsal (electroreceptora de la línea lateral anterior) y ventral (fibras provenientes del nervio octavo) ocupando las zonas svz y mz. Las células de la zona dorsal se continúan espacialmente con la expresión en la capa granular del cerebelo, mientras que en la zona ventral se detectaron numerosas neuronas Pax6+/CB+. Además, se observaron células Pax6+ dispersas en la mz de la formación reticular, y localizadas entre las neuronas motoras de los núcleos facial y trigémino. En el rombencéfalo caudal, Pax6 también está presente en la región del núcleo del tracto solitario y el núcleo de la columna dorsal.

La médula espinal de *Pleurodeles waltl* adulto también contiene subpoblaciones Pax6+ y Pax7+. Las células Pax7+ ocupan la svz dorsal, mientras que Pax6 se encuentra en la vz intermedio-ventral, y algunas células de la mz se sitúan por encima de las neuronas somatomotoras.

En la retina, Pax6 se localiza en la capa nuclear interna y en la capa de células ganglionares, y probablemente representan células amacrinias y ganglionares como en otros vertebrados.

Discusión general

Consideraciones metodológicas

Nuestro estudio está basado en el análisis de patrones de expresión mediante técnicas inmunohistoquímicas (fluorescencia y campo claro). Hemos utilizado estas técnicas porque se ha demostrado que ofrecen imágenes de alta resolución cuyos resultados son coherentes con los obtenidos mediante hibridación *in situ* (Moreno et al., 2008a; González y Northcutt, 2009; Morona et al., 2011; Ferreiro-Galve et al., 2012a,b; Lorente-Cánovas et al., 2012). La especificidad de los anticuerpos utilizados fue rigurosamente comprobada en cada caso mediante análisis de Western Blot, en donde las bandas obtenidas en los extractos de encéfalo de *Pleurodeles* coinciden con las obtenidas en homogeneizado de encéfalo de otras especies (capítulos 3-4; Morona y González, 2008; 2009). Además, se realizaron controles negativos de la reacción inmunohistoquímica: sustitución del anticuerpo primario por suero de diferentes especies, u omisión de la incubación con el anticuerpo primario ó secundario. En todos los casos el marcaje fue eliminado. Como control positivo se realizaron experimentos en cerebros de otras especies de vertebrados donde la presencia del antígeno ha sido descrita.

Las figuras 1 y 2 muestran una visión sagital del encéfalo en desarrollo, con los principales grupos CBP+ y Pax+, respectivamente, descritos en los capítulos 2 y 3. Los patrones de expresión de Pax3, Pax6 y Pax7 en el desarrollo de *Pleurodeles waltl* apoyan la bibliografía previa que indica el papel de estos factores de transcripción en la proliferación, migración y diferenciación celular, aunque esta hipótesis no había sido comprobada directamente. Por su localización, las células Pax+ situadas en la vz podrían ser células progenitoras, y respecto a los movimientos migratorios tangenciales, en la figura 4 se representan las posibles rutas sugeridas en base a la expresión dinámica de subpoblaciones Pax+ (capítulo 3). Con el objetivo de clarificar estas hipótesis basadas en la bibliografía, hemos incluido una serie de resultados preliminares obtenidos en varias especies de anfibios urodelos: *Pleurodeles waltl* (anexo 3; laboratorio del Dr. Agustín González, Departamento de Biología Celular, Fac. Biología, UCM, Madrid), *Ambystoma mexicanum* modificados

genéticamente (Figuras 3 y 5, anexo 4; laboratorio de la Dra. Elly Tanaka, Max Plank Institute of Molecular Cell Biology and Genetics / Center of Regenerative Therapies Dresden, Dresde, Alemania), y *Nothophthalmus viridescens* (Figuras 5 y 6; anexo 5; laboratorio del Dr. Andras Simon, Department of Cell and Molecular Biology of Karolinska Institute, Estocolmo, Suecia).

En lo referente a las secciones siguientes, además del análisis conjunto de los capítulos 2-4, se presentan estos datos en preparación relativos a la *proliferación* (MCM2, PCNA, PHH3, BrdU, EdU), *migración* (sistema cre-loxP, BrdU, EdU, análisis estequiométricos) y *diferenciación* (Vimentina, GFAP, NeuN, Sox2, animales transgénicos GFP+ bajo el promotor de la β -actina) de las subpoblaciones Pax en el cerebro de urodelos. Los anticuerpos seleccionados se han utilizado previamente en otros estudios de las especies mencionadas (capítulos 3-4; Naujoks-Manteuffel y Niemann, 1994; Parish et al., 2007; Berg et al., 2010; 2011; Kirkham et al., 2012). Los análisis de BrdU y EdU siguen siendo utilizados hoy en día en numerosos estudios para demostrar movimientos migratorios en el tejido nervioso (Crozier et al., 2011; Shetty et al., 2011), y se realizaron en individuos de las tres especies. En cuanto a los ajolotes transgénicos, han sido desarrollados y utilizados en estudios previos del laboratorio de la Dra. Tanaka (Sobkow et al., 2006; Khattak et al., 2009; Kragl et al., 2009; Epperlein et al., 2012; Nacu et al., 2013). Por otra parte, el análisis estequiométrico presentado en el anexo 2 consiste en el cálculo del índice de marcaje celular relativo (Howard y Reed, 2005) en las diferentes subpoblaciones del *Pleurodeles waltl* adulto, y sirve para apoyar las migraciones propuestas. Por último, el modelo de lesión cerebral utilizado para comprobar el posible papel de Pax en la regeneración cerebral fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Simon (Parish et al., 2007; Berg et al., 2010; 2011; Kirkham et al., 2012).

Pax y CBPs en la regionalización y diferenciación funcional del SNC de anfibios urodelos: integración sensorial y motora

La aparición y desarrollo de los diferentes grupos inmunorreactivos para miembros de la familia Pax y CBPs, detalladas en los capítulos 2 y 3, ponen de manifiesto la maduración del sistema nervioso subyacente en la adquisición de comportamientos

estereotipados resultantes de la integración sensorial y motora (ver anexo 1).

Durante el **periodo embrionario** las larvas desarrollan la línea lateral mecanoreceptora, terminaciones nerviosas en la piel que se excitan ante estímulos nocivos, y un sistema visual primitivo en el órgano pineal que se excita con la oscuridad (Roberts y Clarke, 1983; Bekoff, 1985). La aparición de inmunorreactividad Pax+ en el órgano subcomisural, epífisis, paráfisis, e hipófisis en este periodo podría estar relacionada con el establecimiento de ritmos biológicos internos (ver apartado “Pax y sistema fotoneuroendocrino”). Los embriones también muestran los primeros movimientos musculares (de forma espontánea e inducidos por estímulos mecánicos y lumínicos) que culminan en la natación esporádica (ten Donkelaar, 1998). Por otra parte, la aparición del latido del corazón y la formación del sistema digestivo maduro indican que se está organizando simultáneamente el sistema visceral (Gallien y Durocher, 1957). En primer lugar, la respuesta de escape ocasionada por estímulos visuales o lumínicos se puede relacionar con la expresión de Pax6 en la retina y epífisis, y con Pax3/Pax7 en el techo óptico. En otros vertebrados, el mesencéfalo alar se caracteriza por la expresión de Pax3 y Pax7 (Shin et al., 2003; Thomas et al., 2004; Chen et al., 2006; Thompson et al., 2007) y por la ausencia de células Pax6+ (Murakami et al., 2001; Wulliman y Rink, 2001; Ferreira-Galve et al., 2008; Moreno et al., 2008a; Pritz y Ruan, 2009; Morona et al., 2011; Duan et al., 2012). Sin embargo, una discreta expresión de Pax3 ocupa las zonas vz y svz, y gran parte de las células de todos los estratos expresan Pax7 con diferentes intensidades, aunque son más numerosas en los estratos profundos de la mz. El conjunto de modalidades sensoriales y respuestas motoras de los embriones de urodelo es controlado principalmente por el rombencéfalo, la primera región del encéfalo en diferenciarse, como se puede apreciar por la aparición de células ChAT+ en los grupos motores durante el desarrollo embrionario (López et al., 2003). El neuroepitelio expresa los factores de transcripción Pax3, Pax7, Pax6, Nkx6.1 y Nkx2.2 (siguiendo un orden dorsoventral) en dominios parcialmente solapados en el rombencéfalo y la médula espinal (capítulo 3). Similares patrones de expresión han sido descritos previamente en otras clases de vertebrados (Ericson et al., 1997; Díez el Corral., 2003; Genethliou et al., 2009). En relación con las nuevas habilidades mecanoreceptoras, los

nuevos patrones de locomoción generados, y el control visceral, abundantes neuronas CR+ pueden verse en el área octavolateral, formación reticular, núcleo de la columna dorsal, núcleo del tracto solitario y médula espinal (capítulo 2). Además, algunas células Pax6+ ocupan la mz en la formación reticular rombencefálica en estos estadios (capítulo 3). Se ha sugerido previamente que Pax6 está implicado en la especificación de subtipos neuronales en el rombencéfalo de mamíferos (Osumi et al., 2007), y la expresión de Pax6 entre r2-r8 descrita en este estudio es comparable a la de mamíferos (Stoykova et al., 1994; Duan et al., 2012).

Después de eclosionar, en la **etapa larvaria inicial**, las larvas permanecen prácticamente inmóviles adheridas a diferentes superficies mediante los balancines (excepto *A.mexicanum*, que no tiene, y permanece inmóvil en el fondo). Muestran respuestas de escape que son desencadenadas por estímulos visuales y vibratorios, y al final de este periodo comienzan a alimentarse mediante succión de pequeños invertebrados que les pasan por delante (ten Donkelaar, 1998; observaciones personales). Este periodo se caracteriza por el enderezamiento del tubo neural y el crecimiento de las áreas prosencefálicas, donde las subpoblaciones Pax6+ del bulbo, palio y estriado se van segregando (capítulo 3), y las células CR+ se localizan en poblaciones separadas en el bulbo, palio, estriado, pálido, área preóptica e hipotálamo tuberal, mientras que la CB no se encuentra en ninguna de estas estructuras (capítulo 2). Simultáneamente aparecen las células Pax6+/Pax7+ en la habénula, y poco después algunas células Pax7+ alcanzan r0 en la porción rostral del núcleo interpeduncular (capítulo 3). Por otra parte, en este periodo también aparecen las primeras neuronas CB+ en la habénula, y sus axones llegan al neuropilo del núcleo interpeduncular al principio de la etapa larvaria activa (capítulo 2). La habénula, junto con la estría medular y el núcleo interpeduncular forman el sistema dorsal de conducción diencefálica (DDC), que ha sido relacionado con diversas funciones: control de la circuitería dopaminérgica (actividad motora y sistema de recompensa), cognición, respuestas aversivas, ritmos circadianos y comportamiento reproductivo (Bianco y Wilson, 2009). Como se puede observar en base a la expresión de Pax7, CB y CR, en el caso de urodelos el establecimiento del DDC se correlaciona con el inicio de la alimentación. Por otra parte, durante estos estadios iniciales algunas células Pax7+

ocupan el torus semicircularis, una estructura relacionada con el procesamiento auditivo (muy pobre en anfibios urodelos) que probablemente es utilizado en la detección de posibles enemigos (Himstedt, 1994). Además, la aparición de esta proteína en el techo óptico coincide en el tiempo con el incremento de axones retinofugales (capítulo 2), y en mamíferos la importancia de Pax7 en el establecimiento de la polaridad del colículo superior (homólogo del techo óptico) en respuesta a la llegada de axones retinofugales ha sido demostrada (Thompson et al., 2007), sugiriendo nuestros datos eventos similares en urodelos. Una población transitoria de células Pax3+ aparentemente migra hacia regiones ventrales acompañando a las células Pax7+ que se sitúan en el interpeduncular, y en relación con el área octavolateral, aparecen las primeras células Pax3+/Pax7+ en la vz del cerebelo y Pax6+ en la mz de la formación reticular. Patrones de expresión similares han sido descritos en otros vertebrados (Stoykova y Gruss, 1994; Shin et al., 2003; Aroca et al., 2006; Duan et al., 2012; Lorente-Cánovas et al., 2012).

Con el inicio de la alimentación comienza la **etapa larvaria activa temprana**: las larvas comienzan a mover la cabeza hacia los lados cuando permanecen inmóviles en la búsqueda de alimento, y perfeccionan sus métodos de caza por succión añadiendo a este comportamiento un movimiento de aproximación a la presa llamado “embestida” (Deban et al., 2001), y aprendiendo a modular ambos en función de la fuente de alimento disponible. Al final de la etapa larvaria temprana las larvas han desarrollado las patas delanteras, un nuevo modo de locomoción que utilizan para explorar el medio (ten Donkelaar, 1998; Griffiths, 1995; Deban et al., 2001; observaciones personales). Como dato complementario, en esta etapa Pax7 se expresa en numerosas células de los músculos de las patas en formación (anexo 4), que probablemente se corresponden con células satélite y mioblastos (Collins et al., 2009). En este periodo, desaparecen las células Pax3 en la mz del rombencéfalo rostral, así como las células Pax6+ del órgano olfativo y del palio medial; por primera vez se detectan subpoblaciones Pax6+ en el septo, la porción basal de p3, área octavolateral, cerebelo y r1c-r2, y como hemos mencionado antes, las células Pax7 del núcleo interpeduncular alcanzan r0 (capítulo 3). Numerosas neuronas CB+ emergen a lo largo de todo el eje rostrocaudal encefálico, excluyendo territorios hipotalámicos en el núcleo anterior

talámico, parte basal de p1, mesencéfalo, istmo y rombencéfalo. La expresión de CR aumenta considerablemente, sobre todo en las zonas paliales. Los componentes central y medial de la amígdala se vuelven reconocibles por sus neuronas CB+ y CR+, y también aparecen las primeras neuronas CB+ en el núcleo del lecho de la estría terminal, pálido y mesencéfalo (capítulo 2), en relación con el procesamiento de información multimodal utilizada en la captura de presas y en la respuesta de escape (Ingle, 1976; Ewert, 1984; Roth et al., 1990; 1999). La expresión de Pax6 se detecta por primera vez en las inmediaciones del núcleo del tracto solitario, que recibe información de los nervios glossofaríngeo, vago y la porción sensorial del trigémino, y está implicado principalmente en el procesamiento de la información gustativa (Bradley et al., 2007). En global, durante este periodo las larvas adquieren los principales mecanismos de búsqueda y obtención de alimento, junto con la mayoría de los grupos celulares implicados en estos procesos (analizados en base a la expresión de Pax y CBPs), que irán creciendo en tamaño y complejidad durante la etapa siguiente.

Durante el **periodo larvario activo tardío**, las larvas desarrollan por completo las patas traseras, y empiezan a combinar los comportamientos estereotipados presentes en estadios anteriores (caminar, mover la cabeza, alimentación por succión con embestida) para realizar una búsqueda activa de alimento (anexo 1). Los movimientos que realizan se vuelven cada vez más coordinados, coincidiendo con la aparición en el cerebelo de células granulares Pax6+ (capítulo 3) y células de Purkinje CB+ (capítulo 2). Los urodelos son poco selectivos con su dieta, pero la experiencia previa con diferentes tipos de presa influye en el desarrollo de los métodos de búsqueda y captura de alimento (Griffiths, 1995). En este momento emergen abundantes neuronas Pax6+ en el bulbo olfativo que también expresan CR, CB, y TH, como sucede en otros vertebrados (Wullimann y Rink, 2002; Vergaño-Vera et al., 2006; de Chevigny et al., 2012a). Con el perfeccionamiento de sus nuevas habilidades, las larvas comienzan a alimentarse también de objetos inmóviles, que inicialmente aceptan o rechazan en función de su dureza y palatabilidad. Con la experiencia adquirida, poco a poco las larvas aprenden a discriminar los objetos inmóviles guiándose sólo por el olfato, y evitan ingerir así partículas no deseadas (ten Donkelaar, 1998; Griffiths, 1995; Deban et al., 2001; observaciones personales). Curiosamente, durante

este periodo las larvas aprenden a utilizar el sistema olfativo no sólo en la obtención de alimento, sino también en el reconocimiento de individuos conespecíficos (ver anexo 1 en lo referente a canibalismo y modulación de la agresión intraespecífica). El desarrollo del prosencéfalo secundario se va completando en este momento, como se puede ver por la aparición de CB en el bulbo olfativo, palio, septo, SPV y región mamilar. Además, la CR aparece en el septo (de forma transitoria, como sucede con la CB) (capítulo 2). En la región retroquiasmática, y la expresión de Pax6 se extiende en la mz del septo, palio ventral y estriado, haciendo posible el reconocimiento claro de sus respectivos derivados: el núcleo accumbens, el núcleo de la banda diagonal, la amígdala central y la amígdala lateral (capítulo 3). En base a sus conexiones, se ha propuesto que los ganglios basales de anfibios urodelos pueden estar implicados en el procesamiento superior de información multimodal (Marín et al 2007a,b). En cuanto al complejo amigdalino, la subdivisión lateral recibe información olfativa, la amígdala medial es el principal centro secundario vomeronasal, y la amígdala central representa la división autonómica de la amígdala (Moreno y González, 2007). Estas subdivisiones contienen células Pax6 en la etapa larvaria activa tardía, aunque en el caso de la amígdala medial sólo algunas células aisladas pueden observarse entremezcladas con las células Otp+ que caracterizan esta región (capítulo 3). Esta expresión transitoria en la amígdala medial, no detectada en individuos adultos (capítulo 4), podría estar relacionada con el aumento de interacciones sociales de las larvas y la reducción de comportamientos caníbales. Por otra parte, la completa maduración del DDC incluye la formación de la estría medular, que se puede observar en etapa larvaria activa tardía con CB y CR (capítulo 3). La estría medular contiene fibras provenientes de diversas estructuras paliales, estriatales, septales, preopto-hipotalámicas, pretalámicas y habenuares (Kokoros y Northcutt, 1977; Clairambault et al., 1986; Sassoè Pognetto et al., 1991), por lo que podría ser considerada como una estructura integradora de información multimodal. La expresión de Pax6, CB y CR en estas estructuras sigue sufriendo modificaciones durante etapas tardías e incluso tras la metamorfosis (capítulos 3-4), por lo que el aumento de complejidad gradual en el repertorio comportamental de anfibios urodelos también podría estar asociado al DDC, como en mamíferos (Bianco y Wilson, 2009).

Tras la metamorfosis, los *Pleurodeles juveniles* suelen adentrarse en el medio terrestre en la naturaleza, donde se desarrollan por completo hasta alcanzar la edad adulta y volver a sus lugares de cría (García-París, 1985; Salvador y García-París, 2001). En el caso de la colonia de laboratorio, estos jóvenes metamórficos pasan unos días flotando o en los objetos emergentes para volver poco después al fondo del agua donde encuentran más fácilmente refugio y alimento. Estos pequeños tritones se congregan en grietas, agujeros y otros escondites oscuros, y los ataques intraespecíficos se reducen al mínimo (García-París, 1985; Salvador y García-París, 2001; observaciones personales). En este periodo, se completa el desarrollo cerebral, y la característica más reseñable es la maduración progresiva del telencéfalo (donde disminuye la expresión palial de Pax6), hipotálamo (que muestra una expresión transitoria de Pax6 en sus porciones alar y basal, y adquiere diversas subpoblaciones CB+ y CR+), septo (que presenta una expresión transitoria de CB y CR), diversos núcleos diencefálicos (se detecta la aparición de CB en el núcleo ventrorostral de p3 en adulto, núcleo central talámico en juveniles y dominio yuxtacomisural del pretecho en adultos), r0 (CB y CR ocupan el núcleo del ístmo y la porción ístmica de los núcleos posterodorsal y posteroventral), y rombencéfalo en menor medida (aparición de CR en el núcleo motor del trigémino) (capítulos 2-4).

Muchos urodelos **adultos** recorren grandes distancias para llegar cada año a sus lugares de cría (Griffiths, 1995). Al igual que las aves migratorias, los urodelos cuentan con un sistema de magnetorrecepción dependiente de luz que utilizan en la navegación, y está influenciado por fotorreceptores extraoculares, probablemente situados en la glándula pineal y/o hipotálamo (Deutschlander et al., 1999), aunque recientemente se ha demostrado en pez cebra existen fotorreceptores extraoculares también en el rombencéfalo (Kokel et al., 2013). Pax6 se expresa en la glándula pineal e hipotálamo alar durante estadios larvarios, y poco después de la metamorfosis se encuentra también en el hipotálamo basal de forma transitoria. Como característica compartida con anfibios anuros (Domínguez et al., 2013), reptiles (Moreno et al., 2012) y aves (Abellán y Medina, 2009), Pax6 no fue detectado en el área preóptica, al contrario que en mamíferos (Duan et al., 2012). Además, Pax7 se localiza en una pequeña subpoblación en el hipotálamo mamilar que persiste

en adultos. Como peculiaridad propia del grupo, el núcleo laterodorsal tegmental no tiene células Pax6 como sucede en ratones adultos (Duan et al., 2012). El grupo tegmental Pax3+ descrito en urodelos adultos (capítulo 4) puede compararse con el núcleo tegmental de Gudden de mamíferos, que también expresa Pax3 en adultos (Stoykova y Gruss, 1994), proyecta a los cuerpos mamilares y ha sido relacionado con velocidad angular de la cabeza, aprendizaje y navegación (Morest, 1961; Bassett y Taube, 2001; Saunders et al., 2012). Respecto a la médula espinal, nuestros datos confirman la expresión de Pax6 y Pax7 descrita en *Ambystoma mexicanum* (Schnapp et al., 2005; McHedlishvili et al., 2007), excepto en lo relativo a Pax7 en la vz, presente en ajolotes adultos y ausente en el gallipato.

Pax6 y el desarrollo de sistemas sensoriales

La implicación de Pax6 en el desarrollo de órganos sensoriales ha sido demostrada no sólo en vertebrados, sino también en invertebrados (van Heyningen and Williamson, 2001; Hartmann et al., 2003; Nomura et al., 2007). En esta sección también se hace referencia a las estructuras que han sido relacionadas con el procesamiento secundario de las distintas modalidades sensoriales.

Sistema olfativo. En un estudio comparativo reciente llevado a cabo en el elasmobranquio *Scyliorhinus canicula* se establecieron tres periodos en el desarrollo del sistema olfativo de vertebrados en base a la expresión de Pax6, y se describió por primera vez en vertebrados la presencia de células Pax6+ en el nervio olfativo (Quintana-Urzaínqui et al., 2012a). En anfibios urodelos, el *periodo pionero* se caracteriza por una débil expresión de Pax6 en la superficie apical del epitelio olfativo en formación, y sucede en estadios embrionarios (estadios *Pw*25-32). A partir del estadio *Pw*32 se pueden observar las primeras células Pax6+ de inmunorreactividad intensa, situadas en posiciones más basales (capítulo 3), coincidiendo con la observación de las primeras fibras y neuronas CR+ en sistema olfativo (capítulo 2). Además, un gran número de células Pax6 ocupa progresivamente posiciones laterales en los bulbos olfativos durante esta etapa. El *periodo migratorio* es difícil de visualizar en urodelos debido al pequeño tamaño del nervio olfativo en estos estadios. Sin embargo, se observaron células Pax6 en el nervio olfativo desde momentos cercanos a la eclosión hasta el comienzo de la etapa larvaria activa tardía

(estadios *Pw*34-44), aunque el origen y destino de estas células Pax6+ no está claro (capítulo 3). A mitad de este periodo, en la etapa activa temprana, las larvas comienzan a alimentarse por sí mismas, aunque los sistemas visual y de la línea lateral son los principales encargados de detectar presas. Es entonces cuando aparecen las primeras células CB+ en el bulbo olfativo, y la expresión de Pax6 se organiza en capas. Como peculiaridad propia de urodelos, la expresión de Pax6 desaparece del epitelio y nervio olfativos al comienzo de la etapa activa tardía, durante el *periodo de maduración* (estadios *Pw* 45-56). Comparativamente, durante el desarrollo embrionario de ratón Pax6 es esencial en la formación de la placoda olfativa y en la orientación correcta de las células mitrales (López-Mascaraque et al., 2005; Nomura et al., 2007). Además, la expresión de Pax6 persiste en el epitelio olfativo en células caracterizadas como progenitoras y neuronas (Guo et al., 2010). A pesar de que el bulbo olfativo constituye el principal destino del nervio olfativo principal, algunos axones continúan por los tractos olfativos medial, dorsolateral y ventrolateral para sinaptar con diversas estructuras tanto telencefálicas (pallio, amígdala, septo y estriado) como extratelencefálicas (hipotálamo, habénula, pretecho, techo, tegmento) (ten Donkelaar, 1998). Todas estas regiones contienen células Pax+, y muestran su estructura madura durante el periodo larvario activo (capítulos 2-3).

Sistema visual. Durante la retinogénesis en vertebrados, se ha demostrado que Pax6 es imprescindible para mantener la pluripotencia de progenitores así como determinados tipos celulares (Ashery-Padan and Gruss, 2001; Erclik et al., 2009; Bhatia et al., 2011). En urodelos, hacia el final del periodo embrionario, la retina va adquiriendo patrones de expresión relacionados con la diferenciación de las diversas estructuras: la expresión de Pax6 es baja en la zona proliferativa, y en las neuronas postmitóticas la expresión de Pax6 a nivel celular es muy variable (capítulo 3), como sucede en otros vertebrados (Guduric-Fuchs et al., 2009; Hsieh and Yang, 2009; Ferreiro-Galve et al., 2012b; Quintana-Urzaínqui et al., 2012b). Las células Pax6+ de las capas neuronales aparentemente representan células amacrinas y ganglionares como en otras especies (Hitchcock et al., 1996). Pax6 parece ser importante también en procesos regenerativos (Rodger et al., 2006). Curiosamente, la expresión de Pax6 se mantiene en *Pleurodeles* adultos (capítulo 4), capaces de regenerar estructuras

oculares (Mitashov et al., 1995), mientras que en *Ambystoma*, incapaz de regenerar la retina en adulto, la expresión de Pax6 en esta estructura desaparece gradualmente (del Rio-Tsonis et al., 1995). Los experimentos de doble marcaje sugieren que desde algo antes de la eclosión Pax6 está implicado en la formación de neuronas CB+, CR+ y 5-HT, pero no en las TH+ o ChAT + en *Pleurodeles* (capítulo 3), en línea con datos obtenidos en otras especies (Lakoewsky et al., 2007; Nomura et al., 2007; Ferreiro-Galve et al., 2012b; Quintana-Urzaínqui et al., 2012b).

Simultáneamente, en el pretecho y la porción rostral del techo óptico aparecen las primeras neuronas CR+, y las fibras ópticas colonizan estas regiones conforme evoluciona la expresión de Pax3, Pax6 y Pax7 hacia un estado más diferenciado (capítulos 2-3). En este momento la funcionalidad del sistema visual queda patente por su utilización en la alimentación y escape. Durante los periodos larvario y juvenil, la retina, el pretecho y el techo mesencefálico crecen en tamaño, y la organización general de los patrones de expresión de Pax6 y Pax7 se mantiene inalterada, aunque Pax3 queda restringido a una pequeña población ventricular en adultos, y el número y complejidad de las neuronas CB+ y CR+ aumenta a lo largo del desarrollo (capítulos 2-4). Los patrones de expresión son similares en otras especies de vertebrados, lo indicativo del alto grado de conservación de los mecanismos moleculares que controlan la formación del sistema visual en vertebrados (Díaz-Regueira y Anadón, 2000; Thomas et al., 2004; Thompson et al., 2008; Morona y González, 2013).

Sistema octavolateral. El área octavolateral en urodelos se sitúa en la región alar dorsal del rombencéfalo y consta de tres columnas sensitivas (ten Donkelaar, 1998). La columna dorsal recibe fibras electro-sensitivas de la línea lateral anterior, la columna intermedia está dedicada a la mecanorrecepción de la línea lateral (anterior y posterior), y la columna ventral recibe fibras del nervio octavo (Fritsch, 1981). La CR marca el componente mecanorreceptor de la línea lateral junto con algunas fibras del nervio octavo que podrían corresponder con el componente auditivo de urodelos (Morona y González, 2009), y aparece en la región octavolateral durante el periodo embrionario (capítulo 2). La CB se localiza en relación con información vestibular (Morona y González, 2009), y aparece después que la CR, también antes de la eclosión. En cuanto a Pax6, en el momento de la eclosión aparece en la svz-mz de la formación

reticular de r4, y va ocupando progresivamente posiciones más rostrales en los núcleos de la línea lateral conforme las larvas desarrollan sus habilidades de recepción de estímulos octavolaterales, lo que sugiere la implicación de Pax6 en el desarrollo de este sistema sensorial. Comparativamente, Pax6 también ha sido descrito en los núcleos cocleares y vestibulares de ratones (Stoykova y Gruss, 1994; Duan et al., 2012). El cerebelo, centro secundario de integración octavolateral en urodelos (Fritsch, 1988), es el principal centro de coordinación motora, y es esencial en el procesamiento cognitivo y la discriminación sensorial. Su diferenciación comienza en estadios larvarios activos tempranos, como se puede ver por la aparición de células granulares, Pax6+, y las grandes células de Purkinje, CB+. Aunque su tamaño final es relativamente pequeño en relación con otros vertebrados, el aumento de la coordinación motora es un hecho observable en estos estadios.

Pax6 y Pax7 en el sistema fotoneuroendocrino

El sistema fotoneuroendocrino está implicado en la producción de ritmos biológicos endógenos (circadianos y circanuales) en sincronización con las fluctuaciones externas de luz y temperatura, que optimiza ciertos procesos biológicos (como los periodos de actividad diaria o la reproducción) para que sucedan en condiciones favorables (Underwood., 1997; Steele et al., 2003; Moser et al., 2006; Haus, 2007). En vertebrados, este sistema consta de varios componentes: la proyección retino-hipotalámica, los recientemente descritos fotorreceptores no visuales profundos (situados en el septo, área preóptica y el rombencéfalo), y los órganos receptores pineales con sus diversos transductores neuroendocrinos (Oksche y Hartwig, 1979; Vigh et al., 2002; Fernandes et al., 2012; Mueller y Neuhauss, 2012; Kokel et al., 2013; Valdez et al., 2013).

Los ritmos circadianos parecen estar originados por la interacción entre fotorreceptores no visuales localizados en diferentes regiones del SNC (retina, septo, núcleo supraquiasmático, y glándula pineal), y la producción de melatonina en respuesta a variaciones en las condiciones de luz/oscuridad (Vigh et al., 2002; Guido et al., 2010; Reiter et al., 2011; Valdez et al., 2013). Pax6 es fundamental en el desarrollo de células fotorreceptoras en todos los grupos animales (revisado en Arendt, 2003; Gehring,

2005), por lo que además de su papel en el ojo, la presencia de este factor de transcripción en el septo, SPV y rombencéfalo (capítulos 3-4) apoya la posible existencia de fotorreceptores profundos en anfibios urodelos. Por otra parte, al menos en la retina de peces teleosteos, los niveles de Pax6 varían en respuesta a las condiciones de fotoperiodo (Rodger et al., 2006), lo que demuestra la importancia de Pax6 en la integración a nivel celular de señales ambientales (Blake et al., 2008). Junto con la epífisis, también Pax6+, los ojos son la principal fuente de melatonina en anfibios (Serino et al., 1993; Chiba et al., 2005), y se ha demostrado que el funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario dependiente de metoxindoles epifisarios (entre ellos la melatonina) muestra ritmos estacionales (Bentham et al., 1985; Bondarenko y Gevorkyan, 2008). Consecuentemente, diversas hormonas se producen en la glándula pituitaria bajo influencias circadianas y circanales (Ronchi et al., 1998; Bao et al., 2008; Nader et al., 2010). Además de la presencia de Pax6 en las zonas que participan en la recepción y transducción de la información lumínica, Pax6 y Pax7 se encuentran en regiones hipotalámicas y diferentes lóbulos de la hipófisis en urodelos, como en mamíferos (Budry et al., 2011; Duan et al., 2012). Este sistema epifisario-hipotálamo-hipofisario es de gran importancia en procesos que requieren una compleja regulación neuroendocrina a lo largo del ciclo vital de anfibios urodelos, como son la metamorfosis y la adquisición estacional de caracteres sexuales secundarios en época de cría, que algunos autores han denominado “segunda metamorfosis” (Nash and Fankhauser, 1959; Gona et al., 1970; Dent, 1982; Flavin et al., 1982). El papel de Pax6 en el lóbulo anterior ha sido relacionado principalmente con la formación de esta estructura, aunque la presencia en individuos adultos sugiere que es importante también después de la metamorfosis (capítulo 4). Otro ejemplo de la importancia de las proteínas Pax en la homeostasis neuroendocrina del urodelo adulto es la presencia de hormona estimuladora de melanóforos en el lóbulo intermedio de la hipófisis (Pax7+), que activa los melanóforos de la piel para oscurecer al animal en condiciones de poca iluminación, bajo control hipotalámico (Tuinhof 1994a,b; Roubos et al., 2010).

Al mismo tiempo, se cree que la generación de ritmos circanales guarda relación directa con diferentes índices de proliferación, diferenciación y muerte celular, en relación con la hipófisis y el

hipotálamo tuberal (Lincoln and Hazlerigg, 2010; Hazlerigg and Lincoln, 2011). Aunque sin tener en cuenta un posible efecto circanual, en el cerebro de urodelos adultos se han observado regiones proliferativas en diversas estructuras, sobre todo a lo largo del sistema olfativo (bulbos olfativos, palio lateroventral, amígdala lateral) y en territorios hipotalámicos (Berg et al., 2010; Maden et al., 2013). Tanto el sistema olfativo como el hipotálamo y la hipófisis están influidos estacionalmente por señales hormonales, expresan Pax6 y Pax7 en urodelos, y son regiones de gran importancia en procesos que siguen ritmos circanales, como la hibernación y la reproducción (Simpson and Follett, 1981; Iwata et al., 2000; Toyoda and Kikuyama, 2000; Moore et al., 2005; capítulos 3-4). Además, no hay que olvidar la capacidad proliferativa de las células ventriculares Pax+, ni tampoco su función como reguladores transcripcionales en respuesta a variaciones ambientales (Blake et al., 2008). En línea con esta hipótesis, se han encontrado diferencias circanales en la proliferación celular y supervivencia neuronal en el cerebro de vertebrados que muestran un ciclo biológico fuertemente estacional (Huang et al., 1998; Cerri et al., 2009; Migaud et al., 2011).

Por otra parte, dado que las células progenitoras se encuentran en contacto directo con el líquido cefalorraquídeo (LCR), la lógica lleva a pensar que éste contiene las señales necesarias para modificar la longitud del ciclo celular en diversas subpoblaciones del SNC. Las conexiones eferentes de la glándula pineal (que como hemos mencionado recibe información lumínica no visual y contiene células Pax6+) incluyen estructuras circunventriculares, como son el órgano subcomisural y la glándula parapineal, y además, en anfibios urodelos el lumen de la epífisis está en contacto directo con el LCR (Oksche y Hartwig, 1979). El órgano subcomisural es positivo para Pax3, Pax6 y Pax7 (capítulos 3-4), está implicado en la homeostasis del LCR y sus secreciones están sujetas a ritmos circadianos (Pérez-Fígares et al., 2001; Meiniel, 2007). En relación con la regulación osmótica, la hipófisis es una estructura Pax7+ (capítulos 3-4) que mantiene la comunicación entre el sistema circulatorio y el LCR (Brocklehurst, 1979): contiene receptores de arginina/vasotocina en urodelos (Hasunuma et al., 2010), y secreta diversas sustancias al LCR (Fernández-Llebrez et al., 1982; Farnesi et al., 1994).

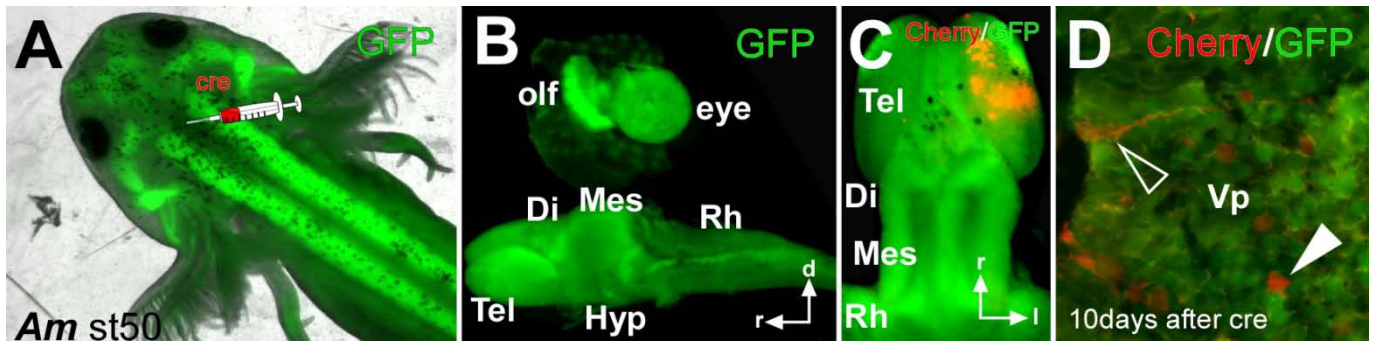


Figura 3. *Ambystoma mexicanum* (*Am*) transgénicos generados en el laboratorio de la Dra. Elly Tanaka (Max-Planck Institut, Dresden). **A:** lugar de inyección intraventricular. **B:** morfología externa del cerebro, órgano olfativo y ojo tras la disección. **C,D:** ejemplo de migración tangencial visualizado mediante el sistema cre-loxP.

En resumen, Pax6 y Pax7 tienen una amplia distribución en estructuras generadoras de ritmos circadianos como son el septo, el hipotálamo, la retina y la epífisis (Serino et al., 1993; Chiba et al., 2005) en urodelos adultos (capítulo 4). Además, la epífisis, la paráfisis y el órgano subcomisural se caracterizan por la secreción de diversas sustancias al LCR, y por expresar diversos miembros de la familia génica Pax desde muy temprano en el desarrollo hasta individuos adultos (capítulos 3-4). Por otra parte, se ha demostrado la capacidad de las células Pax+ para responder a señales ambientales (Blake et al., 2008), incluyendo cambios en el fotoperiodo (Rodger et al., 2006), y no hay que menospreciar el potencial proliferativo de las células Pax+ en las diversas regiones ventriculares del SNC durante el desarrollo, la homeostasis y la regeneración (discutido en las más adelante). Estas observaciones en conjunto abren un novedoso e interesante campo de investigación: la posible implicación de las proteínas Pax en la generación de ritmos biológicos internos.

Migraciones de células Pax+ en el SNC

Como ya se ha mencionado, la localización espacial de Pax6 y Pax7 en los diferentes estratos del SNC de *Pleurodeles waltl* sugiere que estas proteínas podrían estar implicadas en diferentes eventos celulares relacionados con la formación y el mantenimiento de diversas subpoblaciones, incluyendo proliferación, migración y diferenciación (capítulos 3-4). En concreto, las proteínas Pax han sido relacionadas a menudo con la migración celular, tanto en el desarrollo como en cáncer (Robson et al., 2006; Lang et al., 2007; Wang et al., 2008).

Durante la formación del encéfalo en vertebrados, la proliferación celular se concentra en las zonas vz y svz, y conforme las células se diferencian ocupan progresivamente las zonas mz y fz siguiendo la glía radial (migración radial) (Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009). Pax6 ha sido implicado en el proceso de la migración radial de precursores neuronales a la corteza cerebral de los mamíferos (Talamillo et al., 2003), y de células precursoras de oligodendrocitos en el tubo neural de embriones de pollo (di Lullo et al., 2011). Además, atraídas por diversos factores, ciertas células/subpoblaciones en diferenciación invaden regiones vecinas, hasta alcanzar su destino final, a menudo situado en una región de la mz/fz que se encuentra alejada de la región progenitora de origen (migración tangencial) (revisado en Ghashghaei et al., 2007). También se ha propuesto que la expresión Pax6 en las neuronas postmitóticas podría estar mediando el crecimiento de los axones, y que la migración de las neuronas talámicas aparentemente sigue rutas tanto gliales como sustratos axonales (Ortino et al., 2003). Mediante un análisis clonal se ha ilustrado en pollo cómo el diencefalo contiene células que migran tangencialmente fuera de la vz, aparentemente siguiendo caminos axónicos (Golden et al., 1997). La presencia de células proliferativas asociadas a la vz y el fenómeno de la migración radial ha sido demostrado en el cerebro de anfibios urodelos adultos (Berg et al., 2010; Maden et al., 2013). Al igual que en otros tetrápodos, durante la migración radial las células se desplazan hacia la superficie pial a medida que se van diferenciando (Ghashghaei et al., 2007). En cuanto a la migración tangencial, la hemos podido demostrar de forma preliminar en *Ambystoma mexicanum* transgénicos mediante el sistema cre-loxP: la administración intraventricular de

la proteína cre-recombinasa en bajas concentraciones (Fig.3A) transformó un pequeño número de células ventriculares, cuya progenie fue analizada Diez días después (Fig.3C,D). Las células transformadas dejan de expresar GFP+ y producen Cherry+ de manera estable. En este caso concreto, las células Cherry+ se encontraban en la vz ventropalial y en la svz y mz del bulbo olfativo, palio y estriado (Fig.3C). Además, este sistema permite visualizar la morfología de células aisladas, y discriminar su naturaleza glial/neuronal en base a ésta (Fig.3D). Se han sugerido previamente posibles movimientos migratorios tangenciales en el telencéfalo de *Pleurodeles*, en base a la presencia de células inmunorreactivas para Nkx2.1 y GABA dispersas en las regiones del cuerpo estriado y palio, respectivamente (Moreno et al., 2007).

La secuencia espaciotemporal de aparición de las distintas subpoblaciones de Pax6 y Pax7, y los patrones de expresión dinámicos a lo largo del desarrollo y en relación con otros marcadores observados nos llevaron a proponer ciertos movimientos migratorios (Fig. 2), en su mayoría comparables a los descritos en otros tetrápodos (capítulo 3). Por otra parte, dado que la morfología del cerebro adulto es el resultado final de todo el proceso ontogenético, se calculó el índice de marcaje celular de las subpoblaciones Pax+ que ocupan la svz y la mz (anexo 2). En aquellos casos en que la desviación estándar era muy elevada, se realizó un análisis minucioso a lo largo de los ejes rostrocaudal y dorsoventral, cuyos datos pudieron ser agrupados en subgrupos independientes. Los datos obtenidos se discuten en este apartado en relación con posibles eventos migratorios.

Comenzando por el telencéfalo, se ha caracterizado extensamente en mamíferos que ciertas células progenitoras Pax6+ localizadas en la svz producen una subpoblación de interneuronas que forman la corriente migratoria rostral hacia los OBs (Lois et al., 1996; Peretto et al., 1997; Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2005; Sun et al., 2010; de Chevigny et al., 2012b). Comparativamente, en otros vertebrados se ha descrito una svz proliferativa subpalial similar, que podría representar la corriente migratoria rostral (Bachy et al., 2002; Moreno et al., 2008b; Charvet et al., 2009). Además, los datos obtenidos a partir de ratones transgénicos (que expresan EGFP en las neuronas GABAérgicas) mostraron rutas migratorias adicionales en el cerebro postnatal de roedores (Inta et al., 2008). Los neuroblastos originados en la svz emigran no sólo al

bulbo, sino que también se dirigen hacia numerosas regiones del cerebro anterior que continúan expresando Pax6 en ratones adultos (Stoykova y Gruss, 1994; Puelles et al., 2000), incluyendo la corteza, el cuerpo estriado y el núcleo accumbens (Inta et al., 2008). La corriente lateral cortical es un evento migratorio de la frontera corticoestriatal (equivalente al palio ventral de urodelos) a las estructuras en desarrollo del telencéfalo basal (la corteza piriforme y amígdala) en mamíferos (Carney et al., 2006). Incluso en peces teleósteos, a pesar de la organización evertida del prosencéfalo (Nieuwenhuys, 2011; Folgueira et al., 2012), se ha sugerido una migración de células Pax6+ que se origina en territorios paliales para ocupar posteriormente el subpalio y el bulbo olfativo (Wullimann y Rink, 2001). La comparación de nuestros datos con los patrones de expresión descritos en peces permite hipotetizar sobre las posibles homologías existentes entre telencéfalos evaginados y evertidos (Northcutt, 2008; Bradford, 2009; Mueller, 2011). La aparición de Pax6 observada durante el desarrollo (capítulo 3), y la expresión espacialmente continua en *Pleurodeles* adultos (capítulo 4) en regiones ventropaliales (≈25%) y bulbares (≈35%), sugieren eventos migratorios similares a la corriente migratoria rostral (hacia el bulbo olfativo) en anfibios urodelos. Por otra parte, las células Pax6+ originadas en la vz ventropalial ocupan posteriormente el estriado, y su derivada la amígdala central (todas estas zonas contienen ≈25% de células Pax6+), lo que podría representar el equivalente a la corriente lateral cortical de mamíferos (hacia el estriado). En otros vertebrados esta región se considera el límite palial-subpalial, y se ha demostrado que células Pax6 migran tanto a núcleos específicos emergentes amigdalinos y otras estructuras basales (Carney et al., 2006), como a los bulbos olfativos a través de la corriente migratoria rostral (Lledo et al., 2008). La secuencia espaciotemporal observada y la continuidad física existente entre las diferentes estructuras sugiere migraciones similares en anfibios urodelos. En mamíferos algunas células Pax6+ colonizan la amígdala medial provenientes del límite palio-subpalio y de la eminencia ganglionar medial (Tole et al., 2005; Carney et al., 2009; Bupesh et al., 2011). La expresión de Pax6 en urodelos también ocupa la vz de estas regiones, y se detectaron células aisladas Pax6+ desde la eminencia pretalámica hasta la región Otp+ que caracteriza la amígdala medial (capítulo 3), aunque estas células no se detectaron en el adulto

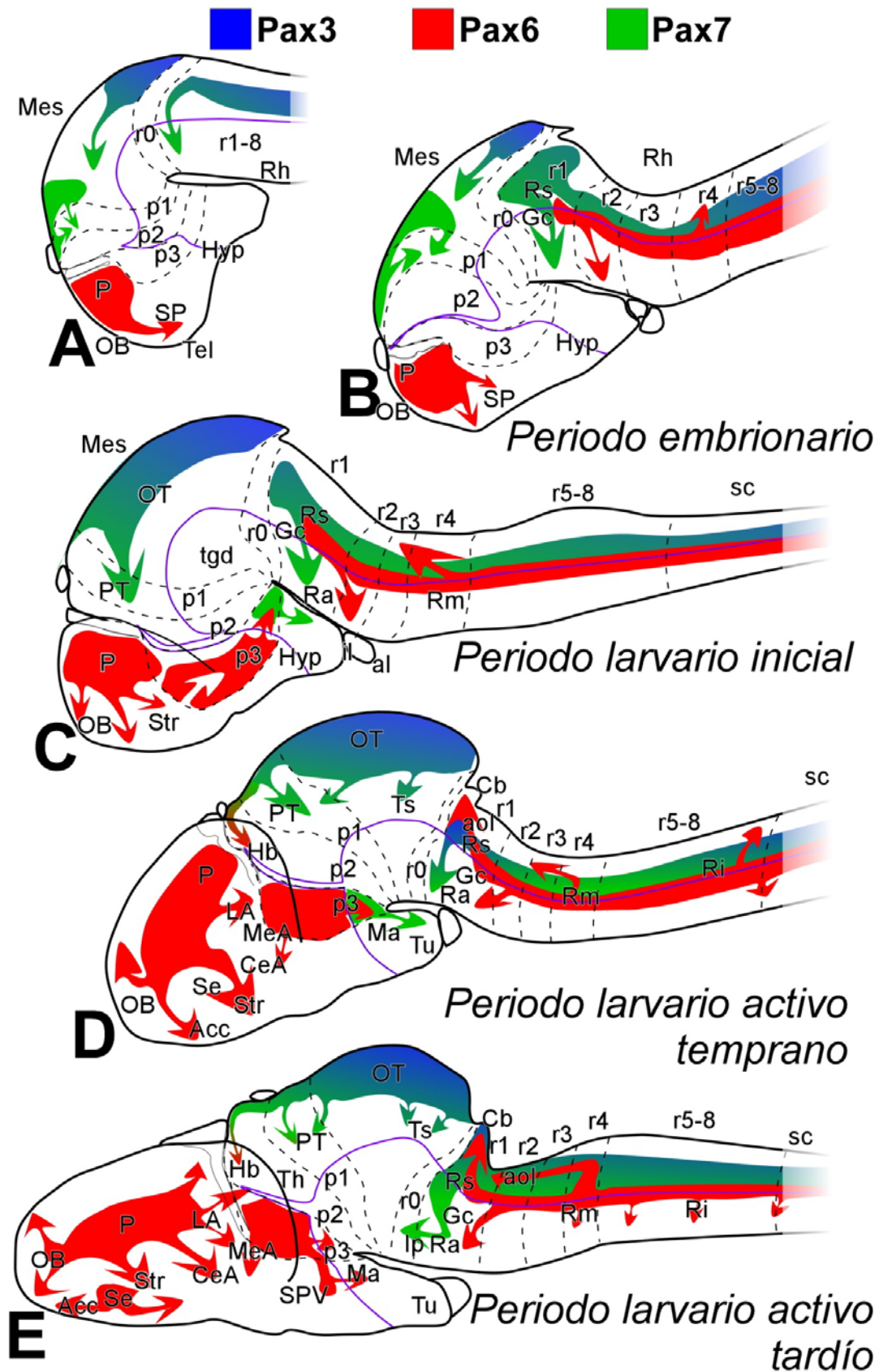


Figura 4. Representación esquemática en el cerebro en desarrollo de *Pleurodeles waltl* de las migraciones de subpoblaciones Pax+ propuestas en base al análisis espaciotemporal de patrones de expresión de Pax3, Pax6 y Pax7. Se han seleccionado los estadios 30 (a), 34 (b), 36 (c), 42 (d) y 52 (e), en representación de todo el desarrollo. Abreviaturas: ver lista en capítulo 3.

(capítulo 4). Estos resultados apoyan el origen múltiple de la amígdala medial en vertebrados, principalmente palial, pero con componentes paliales y extratelencefálicos. Más aún, el núcleo accumbens y el septo dorsal son también Pax6+, y se encuentran en continuación espacial con los bulbos olfativos y el estriado. Además, los valores obtenidos en el bulbo olfativo y el núcleo accumbens (≈35%) indican que probablemente ambas regiones anatómicas son el destino final de ciertas células Pax6+, que se acumularían rostralmente como consecuencia de movimientos tangenciales. Los datos obtenidos en el septo fueron analizados por separado en sus porciones rostral (≈55%) y caudal (≈10%). El alto valor obtenido en la porción rostral del septo podría explicarse como el resultado final de fenómenos migratorios provenientes del propio septo, el núcleo accumbens y el estriado rostral, regiones que muestran una continuidad en términos de expresión de Pax6. El patrón de distribución de Pax6 y Nkx2.1 en el septo es similar al encontrado en otras especies de vertebrados (Moreno et al., 2008a; 2010). El ≈10% detectado en la porción caudal del septo junto con la ausencia de Pax6 en la vz de esta región probablemente implicarían la colonización de la porción subpalial del septo por parte de células Pax6+ provenientes de la porción palial del septo, cuya vz contiene Pax6. En apoyo a estas hipótesis de movimientos migratorios intratelencefálicos, la inmunohistoquímica de PSA-NCAM se considera una importante característica de la migración de células de vertebrados, y ha sido descrita en relación con todos los territorios telencefálicos mencionados en urodelos adultos y en desarrollo (Gianola et al., 2001). Curiosamente, en el *Pleurodeles* adulto PSA-NCAM queda restringida al sistema olfativo, a diferencia con el adulto de *Ambystoma* que también muestra reactividad en palio dorsal y amígdala. Sin embargo, en este estudio se utilizó sólo un adulto de cada especie, por lo que estos resultados deberían ser refutados (Gianola et al., 2001).

El hipotálamo de urodelos es una región interesante en cuanto a la expresión dinámica de Pax6 y Pax7. En primer lugar, aparentemente parte de las células Pax7+ de p3 basal colonizan el hipotálamo durante el periodo larvario inicial, siguiendo el curso del receso infundibular, hasta alcanzar la región mamilar, donde la subpoblación se mantiene en el adulto (capítulos 3-4). Recientemente se han descrito células Pax7 en el hipotálamo basal de otros vertebrados (Moreno et al., 2012; Domínguez et al., 2013), aunque su posible origen

diencefálico sólo ha sido ilustrado durante el desarrollo de urodelos (capítulo 3). Por otra parte, Pax6 aparece en estadios embrionarios en la vz del SPV (hipotálamo alar) a diferencia de otros anfibios (Moreno et al., 2008a; Domínguez et al., 2013). Con la metamorfosis, aparece una subpoblación transitoria de células Pax6+ dispersas en la mz del hipotálamo basal (tuberal y mamilar), y que no se observa en individuos adultos (capítulo 4), y que podría proceder del SPV, o más probablemente, de p3b. Pax6 está implicado en la correcta formación del hipotálamo de vertebrados, como se demuestra por las malformaciones presentes en los mutantes Pax6 de diversas especies (Vitalis et al., 2000; Eagleson et al., 2001), y estos defectos podrían estar asociados con procesos migratorios. En cuanto a p3, la porción alar contiene células Pax6+, que son mucho más abundantes en los niveles caudales (≈50%) que en los rostrales (≈15%), lo que sugiere que las células Pax6 se originan rostralmente para migrar tangencialmente hacia posiciones basales. Algunas de estas células se sitúan lateralmente a las células Pax7+ de p3 basal, y otras alcanzan el hipotálamo en individuos juveniles (capítulo 3). En lo referente al pretecho, Pax3 y Pax6 se distribuyen de forma relativamente homogénea mientras que el análisis estequiométrico separó la subpoblación Pax7+ en tres, cuyos índices de marcaje obtenidos fueron ≈15%, ≈35% y ≈25% (de rostral a caudal). Nuestros datos sugieren que al menos parte de las células Pax7+ podrían proceder del techo óptico, siguiendo una migración con componentes radial (hacia la pía) y tangencial (hacia territorios rostrales), mientras que las células Pax3+ y Pax6+ (entre el ≈15% y el ≈20%) se originarían exclusivamente en la vz pretectal alar. Se ha descrito una corriente migratoria similar en la formación de oligodendrocitos diencefálicos (García-López y Martínez, 2010). La proporción de células Pax7 en el techo óptico dorsomedial no difiere de la analizada en el pretecho más caudal (≈25%), lo que apoya la migración interneuromérica propuesta en el párrafo anterior. Por otra parte, la porción lateroventral del techo y el torus semicircularis contienen una proporción mayor de células Pax6+ (≈40%), y este último no tiene expresión ventricular, por lo que se podría proponer una leve desviación tangencial hacia territorios basales, detectable desde estadios larvarios (capítulo 3). En lo relativo a los contajes correspondientes al área tegmental dorsal y p3 basal, los datos separan claramente dos regiones, sugiriendo un desplazamiento de células de la región caudal (≈10%) hacia la rostral (≈35%).

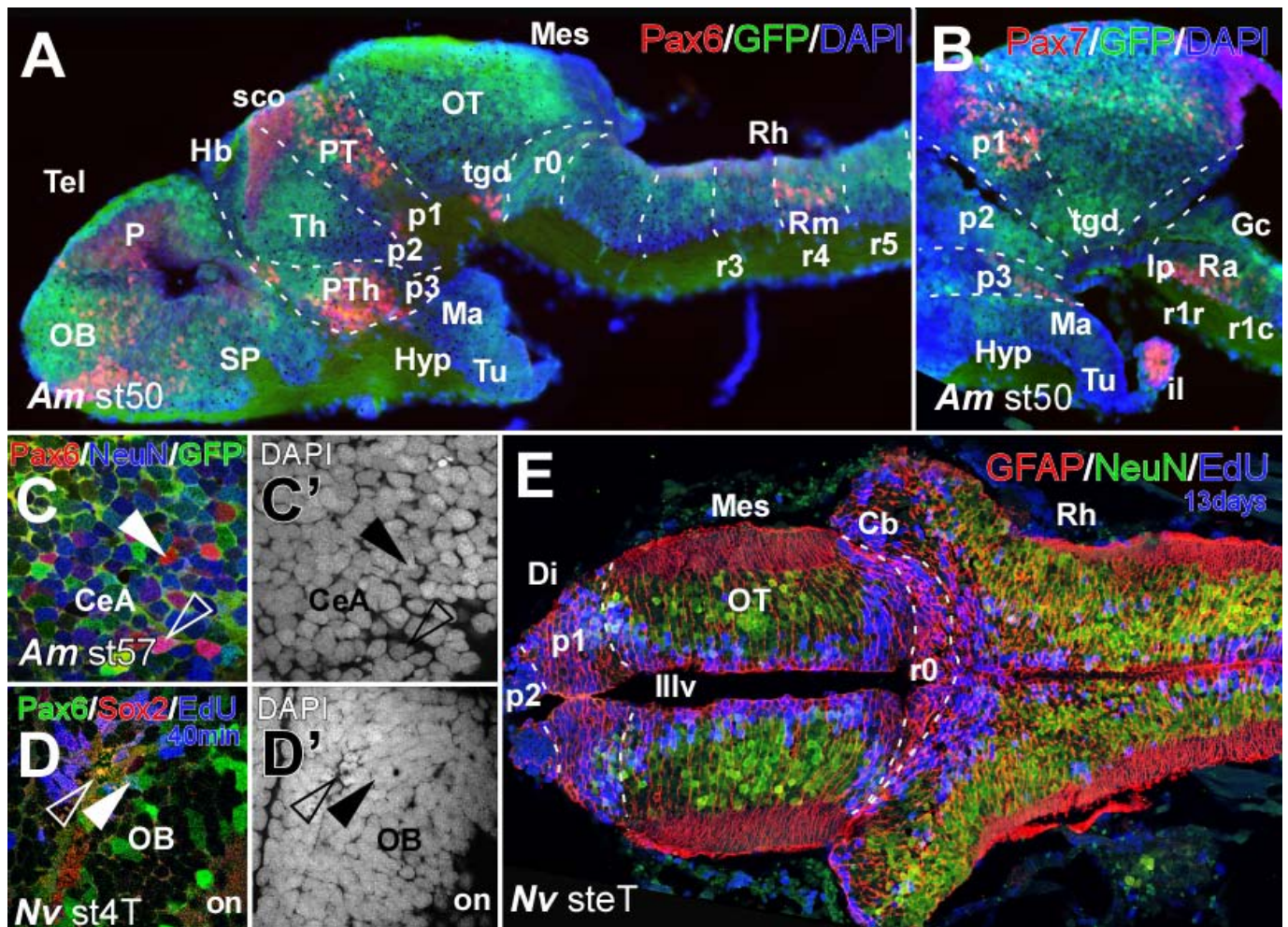


Figura 5. Datos preliminares obtenidos en *Notophthalmus viridescens* (*Nv*) y *Ambystoma mexicanum* GFP+ (*Am*), en los laboratorios del Dr. Andras Simon (Karolinska Institutet, Stockholm) y la Dra. Elly Tanaka (Max Planck Institut, Dresden), respectivamente. **A,B:** la heterogeneidad de las subpoblaciones Pax+ y la organización neuromérica se observan en cortes sagitales tras una tinción simple realizada en un ajolote GFP+. **C,C':** sección transversal del hemisferio derecho telencefálico de *Ambystoma* GFP+, en la región de la amígdala central. Las puntas de flecha señalan células Pax6+ que son tanto positivas (punta de flecha vacía) como negativas (punta de flecha rellena) para el marcador neuronal NeuN. **D,D':** sección transversal del hemisferio derecho telencefálico de *Notophthalmus*, a la altura del bulbo olfativo. Las puntas de flecha señalan células progenitoras Sox2+ que también expresan Pax6+ en niveles bajos, y que se encuentran en diversos momentos del ciclo celular, tanto en la fase de mitosis (punta de flecha vacía) como en la de síntesis de ADN (punta de flecha rellena). **E:** sección horizontal del encéfalo de *Notophthalmus*, que muestra como las células generadas en general siguen los procesos de la glía radial conforme se van diferenciando, además de poner de manifiesto las diferencias regionales en términos de acumulación de células EdU+. Abreviaturas: ver lista en capítulo 3. (Joven et al., en preparación).

En el rombencéfalo de vertebrados, las migraciones celulares entre rombómeros durante el periodo embrionario son escasas, y están restringidas a núcleos específicos (Marín y Puelles, 1995; Wingate y Lumsden, 1996; Cambroner y Puelles, 2000). Algunas células Pax7 provenientes de r1 colonizan el istmo a lo largo del desarrollo larvario, corroborado por experimentos de doble inmunohistoquímica con ChAT, CB, CR, GABA, y Nkx6.1 (capítulos 3-4). En el adulto pueden detectarse células Pax7+ en regiones alares, junto al núcleo del istmo, y en la zona basal, el núcleo interpeduncular también contiene células

Pax7+ (capítulo 4), en línea con resultados obtenidos en pollo (Shin et al., 2003; Lorente-Cánovas et al., 2012). En urodolos, el cerebelo contiene células Pax3+/Pax7+ en la vz desde etapas larvianas tempranas, y desde el comienzo de la etapa larvaria activa aparecen células Pax6+ en el área octavolateral (r1-r2) y el cerebelo (r1) (capítulo 3). En aves se ha descrito cómo la parte alar de r2 da lugar a la aurícula del cerebelo (Marín y Puelles, 1995). En la porción rostral del rombómero r1, un grupo de células Pax7+, y algunas Pax3+, atraviesan el límite alar-basal, y cuando alcanzan posiciones basales avanzan

rostralmente hasta alcanzar r0, tanto en aves como en urodelos (Lorente-Cánovas et al., 2012; capítulo 3). Por último, una subpoblación de Pax6 localizada inicialmente en la formación reticular de r4 se disgrega parcialmente, ocupando posiciones alares hacia los núcleos de la línea lateral, e invadiendo los sucesivos rombómeros. Se han descrito migraciones similares mediante el estudio de quimeras pollo/codorniz (Wingate y Lumsden, 1996).

Implicación de Pax6 y Pax7 en la proliferación y diferenciación neuronal en el SNC de varias especies de anfibios urodelos

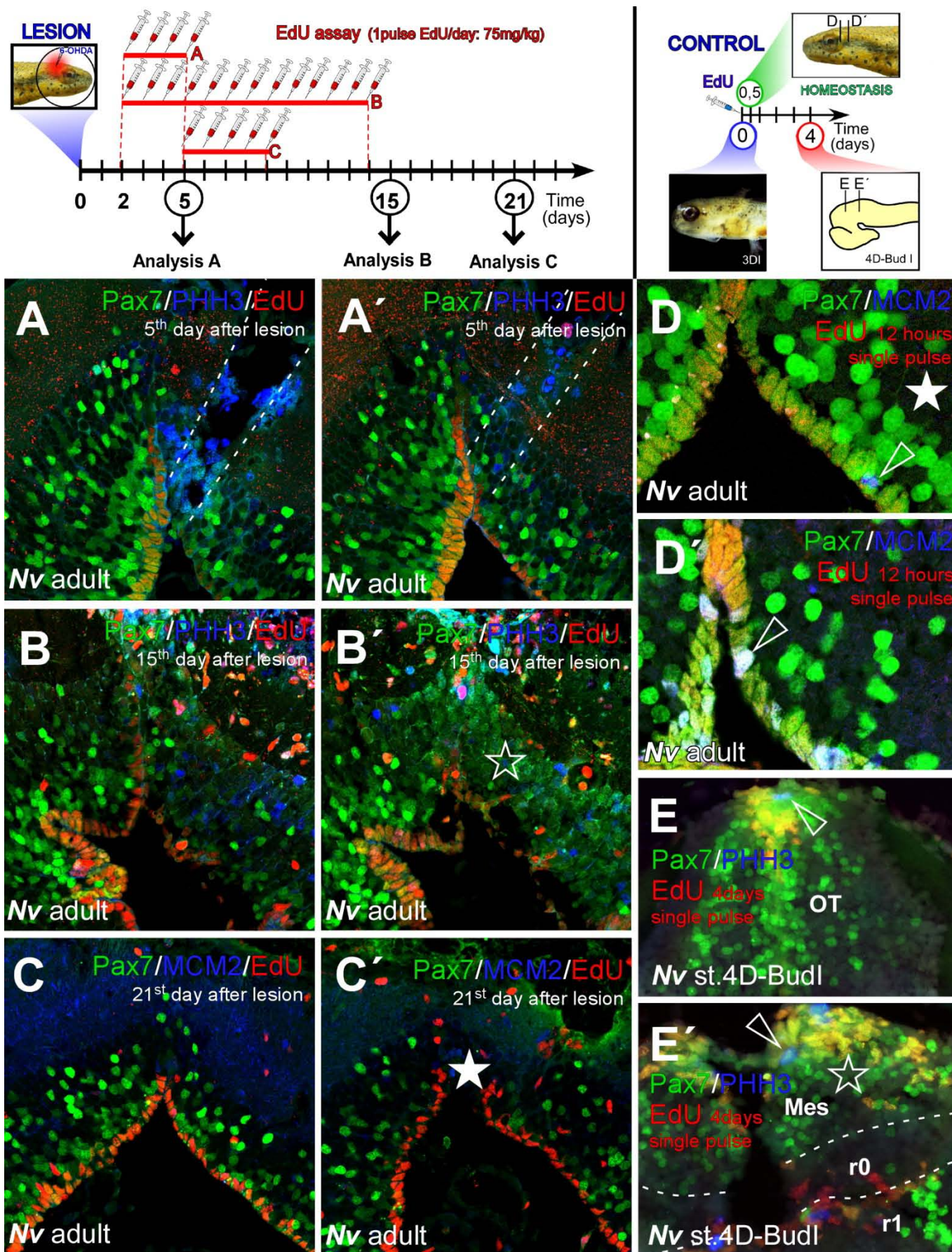
En cuanto a la proliferación y diferenciación neuronal, para corroborar la implicación demostrada previamente para los factores de transcripción Pax en otros vertebrados (Nural and Mastick, 2004; Ahsan et al., 2007; Georgala et al., 2011) hemos realizado diversas aproximaciones metodológicas en varias especies de urodelos que presentamos a continuación. Hemos tenido en consideración los diferentes niveles de inmunorreactividad de las proteínas Pax, ya que se ha demostrado que guardan relación con fenómenos de proliferación y diferenciación, como sucede con Pax6 en el desarrollo de la retina de aves y el telencéfalo de ratones (Hsieh y Yang, 2009; Samson et al., 2009). En general, la expresión de Pax6 y Pax7 descrita previamente en *P.waltl* (capítulos 3 y 4) es similar a la que encontramos en las otras dos especies utilizadas (Figs. 5 y 6; anexos 4 y 5).

Por una parte, se analizaron larvas de *Pleurodeles waltl*, tras inyectar BrdU intraperitonealmente. Los resultados obtenidos en esta especie confirmaron el doble rol de Pax6 y Pax7 en la proliferación y diferenciación neural (anexo 3), y los datos son comparables a los publicados en otras especies de vertebrados (Kohwi et al., 2005; Wullimann et al., 2011; Ferreiro-Galve et al., 2012a,b; Quintana-Urzainqui et al., 2012a,b).

También analizamos la distribución de Pax6 y Pax7 en el cerebro de *Ambystoma mexicanum* transgénicos (Sobkow et al., 2006), que expresan GFP bajo el promotor de la β -actina (Fig.3A,B). La expresión de la β -actina ha sido relacionada con la proliferación, crecimiento y migración celular en otros vertebrados (Kumar et al., 1995; Barallo et al., 1999; Ruan y Lai, 2007; Bunnell et al., 2011). En estos

animales GFP+, las células en el SNC muestran diferentes niveles de fluorescencia, como sucede en los ratones transgénicos equivalentes (Gray et al., 2011), lo que permite discriminar diferentes regiones. Por otra parte, este mosaico fluorescente muestra la heterogeneidad celular subyacente en el cerebro "simplificado" de anfibios urodelos y es coherente con la organización prosomérica (Fig.5A,B). La diversidad de las células Pax+ que ocupan la mz es aparente en animales GFP+, donde se aprecia gran variabilidad en términos de fluorescencia relativa tanto de GFP como de las proteínas Pax a nivel celular (Fig.5A,B). La identidad progenitora de las células teñidas débilmente para Pax6 en la vz se corroboró en diferentes regiones del SNC con doble inmunohistoquímica Pax6/PCNA (anexo 4), mientras que la identidad neuronal de algunas de las células Pax6 que ocupan la mz, como sucede en mamíferos (Maekawa et al., 2005; Duan et al., 2012), se certificó mediante el marcador neuronal NeuN (Fig.5C).

Por último, se analizaron larvas de estadios representativos de *Notophthalmus viridescens*. Después de administrar EdU intraperitonealmente, se realizó triple inmunohistoquímica para Pax6 o Pax7 junto con diversos marcadores del ciclo celular. Los resultados obtenidos muestran tanto células Pax+ proliferando asociadas a las vz y svz (Fig.5D) como dobles Pax+/EdU+ en la mz días después de la incorporación de EdU (anexo 5). Nuestros datos indican que la citoarquitectura de los diferentes nichos neurogénicos y la velocidad de producción neural son específicos de cada región, como sucede en el pez cebra adulto (Lindsey et al., 2012; Schmidt et al., 2013). Aunque la naturaleza glial/neuronal de las subpoblaciones Pax+ no fue corroborada directamente en esta especie, mediante la combinación GFAP/NeuN/EdU se comprobó que las células EdU+ en general siguen los procesos de la glía radial conforme se van diferenciando (Fig.5E), como en otros vertebrados (Maekawa et al., 2005; Bernardos et al., 2007; Sakurai y Osumi, 2008; Kaslin et al., 2009). La red glial, visualizada mediante Sox2, vimentina y GFAP, y las células con fenotipo neural (NeuN+) ocupan posiciones comparables en el desarrollo de las tres especies estudiadas. Los datos obtenidos en las tres especies indican que los factores de transcripción Pax se expresan tanto en células madre ventriculares, como en células dife-



renciadas que en ocasiones se corresponden con neuronas, como en otros vertebrados (Maekawa et al., 2005; Blake et al., 2008; Duan et al., 2012). Globalmente, estos resultados demuestran la función de Pax6 y Pax7 en la proliferación, migración y diferenciación celular de ciertas subpoblaciones durante el desarrollo larvario de anfibios urodelos.

Pax7 en la regeneración del encéfalo adulto

La característica más llamativa del SNC de anfibios urodelos es su increíble potencial regenerativo, que se mantiene incluso los individuos adultos, capaces de regenerar de forma funcional desde una porción de la médula espinal hasta la retina (Straube y Tanaka, 2006; Mchedlishvili et al., 2007), pasando por zonas dañadas del cerebro (Maden et al., 2013). La regeneración parece envolver procesos de activación de células madre y/o reprogramación de células ya diferenciadas (Mescher, 1996; Kragl et al., 2009; Morrison et al., 2010; Kirkham et al., 2011). Esto los convierte en un interesante modelo nervioso a estudiar y explotar: los urodelos ya están siendo utilizados como modelo de regeneración neuronal, con la finalidad de desarrollar nuevas terapias para tratar enfermedades como el Parkinson, que hoy en día todavía no tiene cura (Parish et al., 2007; Berg et al., 2010; 2011).

Por otra parte, ya hemos mencionado la importancia de los factores de transcripción Pax en diversos eventos celulares que están implicados en

Figura 6 (página anterior). Datos preliminares sobre el papel de Pax7 en la regeneración del techo óptico en *Notophthalmus viridescens* (Nv), obtenidos en el laboratorio del Dr. Andras Simon (Karolinska Institutet, Stockholm). En el esquema superior se muestra el diseño experimental. **A-C'**: secciones transversales de la zona del pinchazo en el techo óptico correspondientes al grupo experimental. En A, A' la trayectoria de la aguja ha sido resaltada mediante líneas discontinuas. **D-E'**: secciones transversales del techo óptico en condiciones homeostáticas, correspondientes a un individuo adulto (D,D') y a una larva activa temprana (E,E'). En E', las líneas discontinuas representan límites interneuroméricos. Las puntas de flecha señalan células Pax7 proliferando en condiciones homeostáticas. La estrellas sirven para resaltar la similitud entre los patrones de expresión de Pax7 encontrados, por una parte entre el techo en regeneración y su formación durante el desarrollo (B', E'), y por otra parte entre las condiciones homeostáticas en el adulto y el techo completamente regenerado (C', D). Abreviaturas: ver lista en capítulo 3. (Joven et al., *en preparación*).

procesos regenerativos (revisado en Thompson y Ziman, 2011), lo que nos llevó a testar la posible implicación de Pax6 y Pax7 durante la regeneración neuronal. Para ello, se utilizó un modelo parkinsoniano de lesión dopaminérgica mediante la inyección intraventricular de 6-OHDA (Parish et al., 2007). Aunque no se observaron cambios en los patrones de expresión de Pax6 en relación con la ablación química y la regeneración dopaminérgica, la inmunohistoquímica para Pax7 (en combinación con EdU y marcadores del ciclo celular) sugiere un papel activo de este factor de transcripción en la regeneración de la lesión física producida por el pinchazo (Figura 4). Cinco días después de la lesión se encontraron abundantes células Pax7 en proliferación asociadas a la zona del pinchazo (Fig.4A,A'). A los quince días, el hueco dejado por el pinchazo estaba ocupado por abundantes células Pax7, todas ellas con bajos niveles de fluorescencia, y la proliferación había disminuído considerablemente (Fig.4B,B'). Por último, tres semanas después de la lesión, el hemisferio dañado aparentemente había vuelto a la normalidad: prácticamente no había células proiferando, y la expresión de Pax7 se asemeja a las condiciones homeostáticas, con numerosas células Pax7-, otras con niveles bajos de expresión, y algunas fuertemente inmunorreactivas (Fig.4C,C'). Curiosamente, el hemisferio contralateral mantuvo la expresión normal de Pax7 (Fig.4D-D'), mientras que en el hemisferio lesionado se observaron patrones dinámicos que recuerdan a la expresión de Pax7 en el mesencéfalo en desarrollo (Fig.4E,E').

Estos resultados preliminares apoyan la relación entre la expresión del factor de transcripción Pax7 y la regeneración mesencefálica en anfibios urodelos adultos. Concretamente, parece que Pax7 está implicado en la proliferación tras una lesión física, espacialmente restringida a la zona dañada. Con el aumento en la comprensión de la biología ontogénica y de la potencialidad regeneradora de estos anfibios, es de esperar que en los próximos años los urodelos jueguen un papel clave en el campo de la medicina regenerativa.

Bibliografía

Abellan A, Medina L. 2009. Subdivisions and derivatives of the chicken subpallium based on expression of LIM and other regulatory genes and markers of neuron subpopulations during development. *J Comp Neurol* 515(4):465-501.

- Ahsan M, Riley KL, Schubert FR. 2007. Molecular mechanisms in the formation of the medial longitudinal fascicle. *J Anat* 211(2):177-187.
- Arendt D. 2003. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol* 47(7-8):563-571.
- Aroca P, Lorente-Cánovas B, Mateos FR, Puelles L. 2006. Locus coeruleus neurons originate in alar rhombomere 1 and migrate into the basal plate: Studies in chick and mouse embryos. *J Comp Neurol* 496(6):802-818.
- Ashery-Padan R, Gruss P. 2001. Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr Opin Cell Biol* 13(6):706-714.
- Bachy I, Berthon J, Retaux S. 2002. Defining pallial and subpallial divisions in the developing *Xenopus* forebrain. *Mech Dev* 117(1-2):163-172.
- Bao AM, Meynen G, Swaab DF. 2008. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain research reviews* 57(2):531-553.
- Barrallo A, González-Sarmiento R, García-Isidoro M, Ciudad P, Porteros A, Rodríguez RE. 1999. Differential brain expression of a new beta-actin gene from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur J Neurosci* 11(1):369-372.
- Bassett JP, Taube JS. 2001. Neural correlates for angular head velocity in the rat dorsal tegmental nucleus. *J Neurosci* 21(15):5740-5751.
- Bekoff A. 1985. Development of Locomotion in Vertebrates, a comparative perspective. In: Gollin ES, editor. *The comparative Development of Adaptive Skills: Evolutionary Implications*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates. p 57-94.
- Bentham JV, Mans DR, Haldar-Misra C, Ebels I, Bailemans MG. 1985. Daily and seasonal rhythmicity in the methylation of pineal indolic compounds in adult male golden hamsters, kept under natural conditions. *J Neural Transm* 64(3-4):295-321.
- Berg DA, Kirkham M, Beljajeva A, Knapp D, Habermann B, Ryge J, Tanaka EM, Simon A. 2010. Efficient regeneration by activation of neurogenesis in homeostatically quiescent regions of the adult vertebrate brain. *Development* 137(24):4127-4134.
- Berg DA, Kirkham M, Wang H, Frisen J, Simon A. 2011. Dopamine controls neurogenesis in the adult salamander midbrain in homeostasis and during regeneration of dopamine neurons. *Cell Stem Cell* 8(4):426-433.
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA. 2007. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27(26):7028-7040.
- Bhatia B, Jayaram H, Singhal S, Jones MF, Limb GA. 2011. Differences between the neurogenic and proliferative abilities of Muller glia with stem cell characteristics and the ciliary epithelium from the adult human eye. *Exp Eye Res* 93(6):852-861.
- Bianco IH, Wilson SW. 2009. The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1519):1005-1020.
- Blake JA, Thomas M, Thompson JA, White R, Ziman M. 2008. Perplexing Pax: from puzzle to paradigm. *Dev Dyn* 237(10):2791-2803.
- Bondarenko LA, Gevorkyan AR. 2007. Circadian rhythms of in vitro incorporation of 3H-melatonin into organs of the hypothalamic-pituitary-thyroid system in rats. *Bull Exp Biol Med* 143(6):747-748.
- Bradley RM, King MS, Kin M, Smith DV, Lemon CH, Hill DL, May OL. 2007. The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing. Bradley RM, editor. Boca Raton FL: Taylor & Francis Group, LLC.
- Braford MR, Jr. 2009. Stalking the everted telencephalon: comparisons of forebrain organization in basal ray-finned fishes and teleosts. *Brain Behav Evol* 74(1):56-76.
- Brocklehurst G. 1979. The significance of the evolution of the cerebrospinal fluid system. *Ann Roy Coll Surg Eng* 61:7.
- Budry L, Lafont C, El Yandouzi T, Chauvet N, Conejero G, Drouin J, Mollard P. 2011. Related pituitary cell lineages develop into interdigitated 3D cell networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(30):12515-12520.
- Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM. 2011. beta-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol Biol Cell* 22(21):4047-4058.
- Bupesh M, Abellan A, Medina L. 2011. Genetic and experimental evidence supports the continuum of the central extended amygdala and a multiple embryonic origin of its principal neurons. *J Comp Neurol* 519(17):3507-3531.
- C.V. H, Reed MG. 2005. *Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy*. Oxford: Garland Science/BIOS Scientific.
- Cambronero F, Puelles L. 2000. Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras. *J Comp Neurol* 427(4):522-545.
- Carney RS, Alfonso TB, Cohen D, Dai H, Nery S, Stoica B, Slotkin J, Bregman BS, Fishell G, Corbin JG. 2006. Cell migration along the lateral cortical stream to the developing basal telencephalic limbic system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26(45):11562-11574.
- Carney RS, Cocas LA, Hirata T, Mansfield K, Corbin JG. 2009. Differential regulation of telencephalic pallial-subpallial boundary patterning by Pax6 and Gsh2. *Cereb Cortex* 19(4):745-759.
- Charvet CJ, Owerkowicz T, Striedter GF. 2009. Phylogeny of the telencephalic subventricular zone in sauropsids: evidence for the sequential evolution of pallial and subpallial subventricular zones. *Brain Behav Evol* 73(4):285-294.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature genetics* 38(2):228-233.
- Chiba A, Hattori A, Iigo M. 2005. Daily and circadian variations of the pineal and ocular melatonin contents and their contributions to the circulating melatonin in the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Zoolog Sci* 22(1):65-70.
- Clairambault P, Pairault C, Fasolo A. 1986. Habenular connections in the brain of the newt, *Triturus cristatus* carnifex Laurenti. *J Hirnforsch* 27(1):111-119.
- Collins CA, Gnocchi VF, White RB, Boldrin L, Perez-Ruiz A, Relaix F, Morgan JE, Zammit PS. 2009. Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *PLoS One* 4(2):e4475.
- Croizier S, Amiot C, Chen X, Presse F, Nahon JL, Wu JY, Fellmann D, Risold PY. 2011. Development of posterior hypothalamic neurons enlightens a switch in the prosencephalic basic plan. *PLoS One* 6(12):e28574.
- de Chevigny A, Core N, Follert P, Gaudin M, Barbry P, Beclin C, Cremer H. 2012a. miR-7a regulation of Pax6

- controls spatial origin of forebrain dopaminergic neurons. *Nat Neurosci* 15(8):1120-1126.
- de Chevigny A, Core N, Follert P, Wild S, Bosio A, Yoshikawa K, Cremer H, Beclin C. 2012b. Dynamic expression of the pro-dopaminergic transcription factors Pax6 and Dlx2 during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *Front Cell Neurosci* 6:6.
- Deban SM, O'Reilly JC, Nishikawa KC. 2001. The Evolution of the Motor Control of Feeding in Amphibians. *American Zoologist* 41(6):1280-1298.
- Del Rio-Tsonis K, Washabaugh CH, Tsonis PA. 1995. Expression of pax-6 during urodele eye development and lens regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11):5092-5096.
- Dent JN. 1982. On the interaction of thyroxine and oxytocin with prolactin on the growth of the tail fin in the red-spotted newt. *Gen Comp Endocrinol* 47(3):269-275.
- Deutschlander ME, Borland SC, Phillips JB. 1999. Extraocular magnetic compass in newts. *Nature* 400(6742):324-325.
- Di Lullo E, Haton C, Le Poupon C, Volovitch M, Joliot A, Thomas JL, Prochiantz A. 2011. Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube. *Development* 138(22):4991-5001.
- Díaz-Regueira S, Anadon R. 2000. Calretinin expression in specific neuronal systems in the brain of an advanced teleost, the grey mullet (*Chelon labrosus*). *J Comp Neurol* 426(1):81-105.
- Díez del Corral R, Olivera-Martínez I, Goriely A, Gale E, Maden M, Storey K. 2003. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40(1):65-79.
- Domínguez L, Morona R, González A, Moreno N. 2013. Characterization of the hypothalamus of *Xenopus laevis* during development. I. The alar regions. *J Comp Neurol* 521(4):725-759.
- Donkelaar t. 1998. Urodeles. In: Nieuwenhuys R tDH, Nicholson C, editor. *The central nervous system of vertebrates*. London: Springer. p 1045-1150.
- Duan D, Fu Y, Paxinos G, Watson C. 2012. Spatiotemporal expression patterns of Pax6 in the brain of embryonic, newborn, and adult mice. *Brain Struct Funct*.
- Eagleson GW. 1996. Developmental neurobiology of the anterior areas in amphibians: urodele perspectives. *Int J Dev Biol* 40(4):735-743.
- Epperlein HH, Khattak S, Knapp D, Tanaka EM, Malashichev YB. 2012. Neural crest does not contribute to the neck and shoulder in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *PLoS One* 7(12):e52244.
- Erclik T, Hartenstein V, McInnes RR, Lipshitz HD. 2009. Eye evolution at high resolution: the neuron as a unit of homology. *Dev Biol* 332(1):70-79.
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, Briscoe J. 1997. Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90(1):169-180.
- Ewert JP. 1984. Tectal mechanisms that underlie prey-catching and avoidance behaviors in toads. In: Vanegas H, editor. *Comparative neurology of the optic tectum*. New York: Plenum. p 247-416.
- Farnesi RM, Tei S, Vagnetti D, Santarella B, Pollacci P. 1994. Ultrastructure of the paraphysis in *Bufo bufo* larvae. *J Morphol* 219(1):7-13.
- Fernandes AM, Fero K, Arrenberg AB, Bergeron SA, Driever W, Burgess HA. 2012. Deep brain photoreceptors control light-seeking behavior in zebrafish larvae. *Curr Biol* 22(21):2042-2047.
- Fernández-Llebrez P, Becerra J, Marín-Giron F. 1982. Ultrastructure of the paraphysis cerebri of the water snake *Natrix maura* L. *J Comp Neurol* 208(4):345-351.
- Ferreiro-Galve S, Candal E, Rodríguez-Moldes I. 2012a. Dynamic expression of Pax6 in the shark olfactory system: evidence for the presence of Pax6 cells along the olfactory nerve pathway. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 318(2):79-90.
- Ferreiro-Galve S, Carrera I, Candal E, Villar-Cheda B, Anadon R, Mazan S, Rodríguez-Moldes I. 2008. The segmental organization of the developing shark brain based on neurochemical markers, with special attention to the prosencephalon. *Brain Res Bull* 75(2-4):236-240.
- Ferreiro-Galve S, Rodríguez-Moldes I, Candal E. 2012b. Pax6 expression during retinogenesis in sharks: comparison with markers of cell proliferation and neuronal differentiation. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 318(2):91-108.
- Flavin M, Duprat AM, Rosa J. 1982. Effect of thyroid hormones on the switch from larval to adult hemoglobin synthesis in the salamander *Pleurodeles waltlii*. *Cell Differ* 11(1):27-33.
- Folgueira M, Bayley P, Navratilova P, Becker TS, Wilson SW, Clarke JD. 2012. Morphogenesis underlying the development of the everted teleost telencephalon. *Neural Dev* 7:32.
- Fritzsich B. 1981. The pattern of lateral-line afferents in urodeles. A horseradish-peroxidase study. *Cell Tissue Res* 218(3):581-594.
- Fritzsich B. 1988. The lateral-line and inner-ear afferents in larval and adult urodeles. *Brain Behav Evol* 31(6):325-348.
- Gallien LD, M. 1957. Table chronologique de développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull Biologique* 2:1-19.
- García-López R, Martínez S. 2010. Oligodendrocyte precursors originate in the parabasal band of the basal plate in prosomere 1 and migrate into the alar prosencephalon during chick development. *Glia* 58(12):1437-1450.
- García-Paris M. 1985. *Los anfibios de España*. Madrid: Neografis, S.L.
- Gehring WJ. 2004. Historical perspective on the development and evolution of eyes and photoreceptors. *Int J Dev Biol* 48(8-9):707-717.
- Genethliou N, Panayiotou E, Panayi H, Orford M, Mean R, Lapathitis G, Malas S. 2009. Spatially distinct functions of PAX6 and NKX2.2 during gliogenesis in the ventral spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 382(1):69-73.
- Georgala PA, Carr CB, Price DJ. 2011. The role of Pax6 in forebrain development. *Dev Neurobiol* 71(8):690-709.
- Ghashghaei HT, Lai C, Anton ES. 2007. Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nature reviews Neuroscience* 8(2):141-151.
- Gianola S, Clairambault P, Franzoni MF. 2001. Relationships between neuronal cell adhesion molecule and LHRH neurons in the urodele brain: a developmental immunohistochemical study. *Eur J Histochem* 45(3):229-238.
- Golden JA, Zitz JC, McFadden K, Cepko CL. 1997. Cell migration in the developing chick diencephalon. *Development* 124(18):3525-3533.

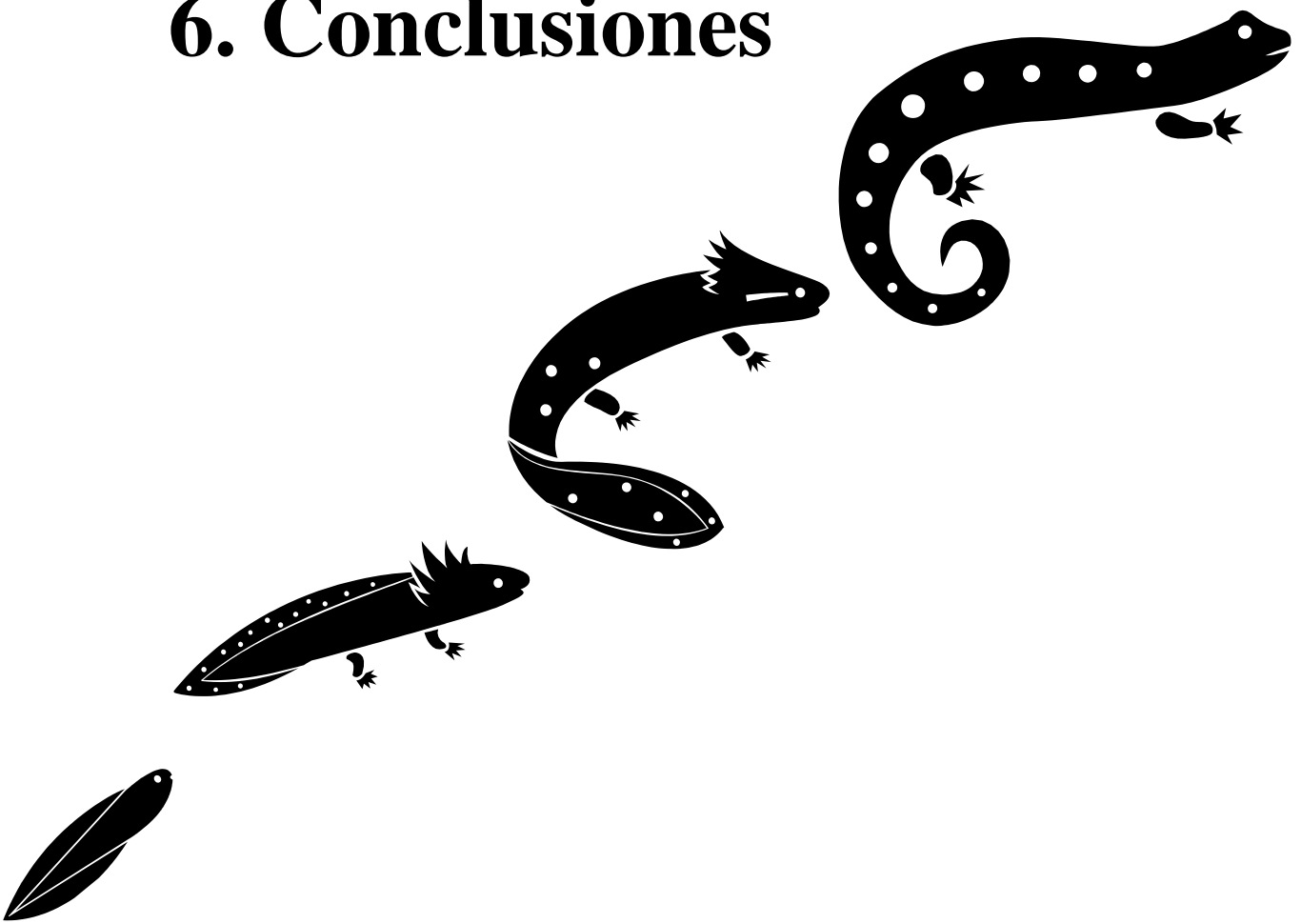
- Gona AG, Pearlman T, Etkin W. 1970. Prolactin--thyroid interaction in the newt, *Diemictylus viridescens*. *J Endocrinol* 48(4):585-590.
- González A, Northcutt RG. 2009. An immunohistochemical approach to lungfish telencephalic organization. *Brain Behav Evol* 74(1):43-55.
- Gray SJ, Foti SB, Schwartz JW, Bachaboina L, Taylor-Blake B, Coleman J, Ehlers MD, Zylka MJ, McCown TJ, Samulski RJ. 2011. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Hum Gene Ther* 22(9):1143-1153.
- Griffiths R. 1995. *Newts and salamanders of Europe*. London: T & AD Poyser natural history.
- Guido ME, Garbarino-Pico E, Contin MA, Valdez DJ, Nieto PS, Verra DM, Acosta-Rodríguez VA, de Zavalia N, Rosenstein RE. 2010. Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system. *Prog Neurobiol* 92(4):484-504.
- Guo Z, Packard A, Krolewski RC, Harris MT, Manglapus GL, Schwob JE. 2010. Expression of pax6 and sox2 in adult olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 518(21):4395-4418.
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Gotz M. 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nature neuroscience* 8(7):865-872.
- Hartmann B, Lee PN, Kang YY, Tomarev S, de Couet HG, Callaerts P. 2003. Pax6 in the sepiolid squid *Euprymna scolopes*: evidence for a role in eye, sensory organ and brain development. *Mech Dev* 120(2):177-183.
- Haus E. 2007. Chronobiology in the endocrine system. *Adv Drug Deliv Rev* 59(9-10):985-1014.
- Hazlerigg DG, Lincoln GA. 2011. Hypothesis: cyclical histogenesis is the basis of circannual timing. *J Biol Rhythms* 26(6):471-485.
- Himstedt W. 1994. Sensory systems and orientation in *Salamandra salamandra*. *Mertensiella* 4:225-239.
- Hitchcock PF, Macdonald RE, VanDeRyt JT, Wilson SW. 1996. Antibodies against Pax6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of the goldfish. *J Neurobiol* 29(3):399-413.
- Hsieh YW, Yang XJ. 2009. Dynamic Pax6 expression during the neurogenic cell cycle influences proliferation and cell fate choices of retinal progenitors. *Neural Dev* 4:32.
- Hsieh YW, Yang XJ. 2009. Dynamic Pax6 expression during the neurogenic cell cycle influences proliferation and cell fate choices of retinal progenitors. *Neural Dev* 4:32.
- Huang L, DeVries GJ, Bittman EL. 1998. Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J Neurobiol* 36(3):410-420.
- Ingle D. 1976. Behavioral correlates of central visual function in anurans. In: Llinas R, Prech W, editors. *Frog neurobiology*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Inta D, Alfonso J, von Engelhardt J, Kreuzberg MM, Meyer AH, van Hooft JA, Monyer H. 2008. Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(52):20994-20999.
- Iwata T, Toyoda F, Yamamoto K, Kikuyama S. 2000. Hormonal control of urodele reproductive behavior. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126(2):221-229.
- Kaslin J, Ganz J, Geffarth M, Grandel H, Hans S, Brand M. 2009. Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche. *J Neurosci* 29(19):6142-6153.
- Khattak S, Richter T, Tanaka EM. 2009. Generation of transgenic axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Cold Spring Harb Protoc* 2009(8):pdb prot5264.
- Kirkham M, Berg DA, Simon A. 2011. Microglia activation during neuroregeneration in the adult vertebrate brain. *Neurosci Lett* 497(1):11-16.
- Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A. 2005. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(30):6997-7003.
- Kokel D, Dunn TW, Ahrens MB, Alshut R, Cheung CY, Saint-Amant L, Bruni G, Mateus R, van Ham TJ, Shiraki T, Fukada Y, Kojima D, Yeh JR, Mikut R, von Lintig J, Engert F, Peterson RT. 2013. Identification of nonvisual photomotor response cells in the vertebrate hindbrain. *J Neurosci* 33(9):3834-3843.
- Kokoros JJ, Northcutt RG. 1977. Telencephalic efferents of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum tigrinum* (Green). *J Comp Neurol* 173(4):613-628.
- Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Maden M, Epperlein HH, Tanaka EM. 2009. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460(7251):60-65.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* 32:149-184.
- Kumar K, Wu XL. 1995. Expression of beta-actin and alpha-tubulin mRNA in gerbil brain following transient ischemia and reperfusion up to 1 month. *Brain Res Mol Brain Res* 30(1):149-157.
- Lakowski J, Majumder A, Lauderdale JD. 2007. Mechanisms controlling Pax6 isoform expression in the retina have been conserved between teleosts and mammals. *Dev Biol* 307(2):498-520.
- Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. 2007. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol* 73(1):1-14.
- Lincoln GA, Hazlerigg DG. 2010. Mammalian circannual pacemakers. *Soc Reprod Fertil Suppl* 67:171-186.
- Lindsey BW, Darabie A, Tropepe V. 2012. The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain. *J Comp Neurol* 520(10):2275-2316.
- Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A. 2008. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 31(8):392-400.
- Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271(5251):978-981.
- López JM, Moreno N, González A. 2003. Ontogeny of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Brain Res Dev Brain Res* 140(1):29-43.
- López-Mascaraque L, García C, Blanchart A, De Carlos JA. 2005. Olfactory epithelium influences the orientation of mitral cell dendrites during development. *Dev Dyn* 232(2):325-335.
- Lorente-Cánovas B, Marín F, Corral-San-Miguel R, Hidalgo-Sanchez M, Ferran JL, Puelles L, Aroca P. 2012. Multiple origins, migratory paths and molecular profiles

- of cells populating the avian interpeduncular nucleus. *Dev Biol* 361(1):12-26.
- Maden M, Manwell LA, Ormerod BK. 2013. Proliferation zones in the axolotl brain and regeneration of the telencephalon. *Neural Dev* 8(1):1.
- Maekawa M, Takashima N, Arai Y, Nomura T, Inokuchi K, Yuasa S, Osumi N. 2005. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes Cells* 10(10):1001-1014.
- Marin F, Puelles L. 1995. Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur J Neurosci* 7(8):1714-1738.
- Marin O, González A, Smeets WJ. 1997a. Basal ganglia organization in amphibians: afferent connections to the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378(1):16-49.
- Marin O, González A, Smeets WJ. 1997b. Basal ganglia organization in amphibians: efferent connections of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 380(1):23-50.
- McHedlishvili L, Epperlein HH, Telzerow A, Tanaka EM. 2007. A clonal analysis of neural progenitors during axolotl spinal cord regeneration reveals evidence for both spatially restricted and multipotent progenitors. *Development* 134(11):2083-2093.
- Meinil A. 2007. The secretory ependymal cells of the subcommissural organ: which role in hydrocephalus? *Int J Biochem Cell Biol* 39(3):463-468.
- Mescher AL. 1996. The cellular basis of limb regeneration in urodeles. *Int J Dev Biol* 40(4):785-795.
- Migaud M, Batailler M, Pillon D, Franceschini I, Malpoux B. 2011. Seasonal changes in cell proliferation in the adult sheep brain and pars tuberalis. *J Biol Rhythms* 26(6):486-496.
- Mitashov VI. 1996. Mechanisms of retina regeneration in urodeles. *Int J Dev Biol* 40(4):833-844.
- Moreno N, Domínguez L, Morona R, González A. 2012. Subdivisions of the turtle *Pseudemys scripta* hypothalamus based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. *J Comp Neurol* 520(3):453-478.
- Moreno N, González A. 2007. Regionalization of the telencephalon in urodele amphibians and its bearing on the identification of the amygdaloid complex. *Front Neuroanat* 1:1.
- Moreno N, González A, Retaux S. 2008b. Evidences for tangential migrations in *Xenopus* telencephalon: developmental patterns and cell tracking experiments. *Dev Neurobiol* 68(4):504-520.
- Moreno N, Morona R, López JM, González A. 2010. Subdivisions of the turtle *Pseudemys scripta* subpallium based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. *J Comp Neurol* 518(24):4877-4902.
- Moreno N, Retaux S, González A. 2008a. Spatio-temporal expression of Pax6 in *Xenopus* forebrain. *Brain Res* 1239:92-99.
- Morest DK. 1961. Connexions of the dorsal tegmental nucleus in rat and rabbit. *J Anat* 95:229-246.
- Morona R, Ferran JL, Puelles L, González A. 2011. Embryonic genoarchitecture of the preteectum in *Xenopus laevis*: a conserved pattern in tetrapods. *J Comp Neurol* 519(6):1024-1050.
- Morona R, González A. 2008. Calbindin-D28k and calretinin expression in the forebrain of anuran and urodele amphibians: further support for newly identified subdivisions. *J Comp Neurol* 511(2):187-220.
- Morona R, González A. 2009. Immunohistochemical localization of calbindin-D28k and calretinin in the brainstem of anuran and urodele amphibians. *J Comp Neurol* 515(5):503-537.
- Morona R, González A. 2013. Pattern of calbindin-D28k and calretinin immunoreactivity in the brain of *Xenopus laevis* during embryonic and larval development. *J Comp Neurol* 521(1):79-108.
- Morrison JI, Borg P, Simon A. 2010. Plasticity and recovery of skeletal muscle satellite cells during limb regeneration. *FASEB J* 24(3):750-756.
- Moser M, Penter R, Fruehwirth M, Kenner T. 2006. Why life oscillates--biological rhythms and health. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1:424-428.
- Mueller KP, Neuhauss SC. 2012. Light perception: more than meets the eyes. *Curr Biol* 22(21):R912-914.
- Mueller T, Dong Z, Berberoglu MA, Guo S. 2011. The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). *Brain Res* 1381:95-105.
- Murakami Y, Ogasawara M, Sugahara F, Hirano S, Satoh N, Kuratani S. 2001. Identification and expression of the lamprey Pax6 gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates. *Development* 128(18):3521-3531.
- Nacu E, Glausch M, Le HQ, Damanik FF, Schuez M, Knapp D, Khattak S, Richter T, Tanaka EM. 2013. Connective tissue cells, but not muscle cells, are involved in establishing the proximo-distal outcome of limb regeneration in the axolotl. *Development* 140(3):513-518.
- Nader N, Chrousos GP, Kino T. 2010. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol Metab* 21(5):277-286.
- Nash G, Fankhauser G. 1959. Changes in the pattern of nitrogen excretion during the life cycle of the newt. *Science* 130(3377):714-716.
- Naujoks-Manteuffel C, Niemann U. 1994. Microglial cells in the brain of *Pleurodeles waltl* (Urodela, Salamandridae) after wallerian degeneration in the primary visual system using *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4-cytochemistry. *Glia* 10(2):101-113.
- Nieuwenhuys R. 2011. The development and general morphology of the telencephalon of actinopterygian fishes: synopsis, documentation and commentary. *Brain Struct Funct* 215(3-4):141-157.
- Nomura T, Haba H, Osumi N. 2007. Role of a transcription factor Pax6 in the developing vertebrate olfactory system. *Dev Growth Differ* 49(9):683-690.
- Northcutt RG. 2008. Forebrain evolution in bony fishes. *Brain Res Bull* 75(2-4):191-205.
- Nural HF, Mastick GS. 2004. Pax6 guides a relay of pioneer longitudinal axons in the embryonic mouse forebrain. *J Comp Neurol* 479(4):399-409.
- Oksche A, Hartwig HG. 1979. Pineal sense organs--components of photoneuroendocrine systems. *Prog Brain Res* 52:113-130.
- Ortino B, Inverardi F, Morante-Oria J, Fairen A, Frassoni C. 2003. Substrates and routes of migration of early generated neurons in the developing rat thalamus. *Eur J Neurosci* 18(2):323-332.
- Osumi N, Hirota A, Ohuchi H, Nakafuku M, Imura T, Kuratani S, Fujiwara M, Noji S, Eto K. 1997. Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development* 124(15):2961-2972.

- Parish CL, Beljajeva A, Arenas E, Simon A. 2007. Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced regeneration model. *Development* 134(15):2881-2887.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L. 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull* 42(1):9-21.
- Perez-Figares JM, Jimenez AJ, Rodríguez EM. 2001. Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc Res Tech* 52(5):591-607.
- Pritz MB, Ruan YW. 2009. PAX6 immunoreactivity in the diencephalon and midbrain of alligator during early development. *Brain Behav Evol* 73(1):1-15.
- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S, Rubenstein JL. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424(3):409-438.
- Quintana-Urzainqui I, Rodríguez-Moldes I, Candal E. 2012a. Developmental, tract-tracing and immunohistochemical study of the peripheral olfactory system in a basal vertebrate: insights on Pax6 neurons migrating along the olfactory nerve. *Brain Struct Funct*.
- Quintana-Urzainqui I, Sueiro C, Carrera I, Ferreiro-Galve S, Santos-Duran G, Pose-Mendez S, Mazan S, Candal E, Rodríguez-Moldes I. 2012b. Contributions of developmental studies in the dogfish *Scyliorhinus canicula* to the brain anatomy of elasmobranchs: insights on the basal ganglia. *Brain Behav Evol* 80(2):127-141.
- Reiter RJ, Rosales-Corral S, Coto-Montes A, Boga JA, Tan DX, Davis JM, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. 2011. The photoperiod, circadian regulation and chronodisruption: the requisite interplay between the suprachiasmatic nuclei and the pineal and gut melatonin. *J Physiol Pharmacol* 62(3):269-274.
- Roberts A, Softe SR, Clarke JD, Dale N. 1983. Initiation and control of swimming in amphibian embryos. *Symp Soc Exp Biol* 37:261-284.
- Robson EJ, He SJ, Eccles MR. 2006. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer* 6(1):52-62.
- Rodger J, King CE, Lukehurst S, Chen PB, Dunlop SA, Beazley LD, Ziman MR. 2006. Changing Pax6 expression correlates with axon outgrowth and restoration of topography during optic nerve regeneration. *Neuroscience* 142(4):1043-1054.
- Ronchi E, Spencer RL, Krey LC, McEwen BS. 1998. Effects of photoperiod on brain corticosteroid receptors and the stress response in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Brain Res* 780(2):348-351.
- Roth G, Dicke U, Grunwald W. 1999. Morphology, axonal projection pattern, and response types of tectal neurons in plethodontid salamanders. II: intracellular recording and labeling experiments. *J Comp Neurol* 404(4):489-504.
- Roth G, Naujoks-Manteuffel C, Grunwald W. 1990. Cytoarchitecture of the tectum mesencephali in salamanders: a Golgi and HRP study. *J Comp Neurol* 291(1):27-42.
- Roubos EW, Van Wijk DC, Kozicz T, Scheenen WJ, Jenks BG. 2010. Plasticity of melanotrope cell regulations in *Xenopus laevis*. *Eur J Neurosci* 32(12):2082-2086.
- Ruan W, Lai M. 2007. Actin, a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta* 385(1-2):1-5.
- Sakurai K, Osumi N. 2008. The neurogenesis-controlling factor, Pax6, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(18):4604-4612.
- Salvador A, García-París M. 2001. Anfibios españoles. Identificación, historia natural y distribución. Talavera de la Reina: Canseco editores, S.L.
- Sansom SN, Griffiths DS, Faedo A, Kleinjan DJ, Ruan Y, Smith J, van Heyningen V, Rubenstein JL, Livesey FJ. 2009. The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet* 5(6):e1000511.
- Sassoe Pognetto M, Pairault C, Clairambault P, Fasolo A. 1991. The connections of the anterior pallium in *Pleurodeles waltl* and *Triturus carnifex*: an HRP study. *J Hirnforsch* 32(3):397-407.
- Saunders RC, Vann SD, Aggleton JP. 2012. Projections from Gudden's tegmental nuclei to the mammillary body region in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J Comp Neurol* 520(6):1128-1145.
- Schmidt R, Strahle U, Scholpp S. 2013. Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. *Neural Dev* 8:3.
- Schnapp E, Kragl M, Rubin L, Tanaka EM. 2005. Hedgehog signaling controls dorsoventral patterning, blastema cell proliferation and cartilage induction during axolotl tail regeneration. *Development* 132(14):3243-3253.
- Serino I, d'Istria M, Monteleone P. 1993. A comparative study of melatonin production in the retina, pineal gland and harderian gland of *Bufo viridis* and *Rana esculenta*. *Comp Biochem Physiol C* 106(1):189-193.
- Shetty AK, Hattiangady B, Rao MS, Shuai B. 2011. Deafferentation enhances neurogenesis in the young and middle aged hippocampus but not in the aged hippocampus. *Hippocampus* 21(6):631-646.
- Shin DH, Lee KS, Lee E, Chang YP, Kim JW, Choi YS, Kwon BS, Lee HW, Cho SS. 2003. Pax-7 immunoreactivity in the post-natal chicken central nervous system. *Anat Histol Embryol* 32(6):378-383.
- Simpson SM, Follett BK. 1981. Pineal and hypothalamic pacemakers: Their role in regulating circadian rhythmicity in Japanese quail. *J Comp Physiol* 144(3):381-389.
- Sobkow L, Epperlein HH, Herklotz S, Straube WL, Tanaka EM. 2006. A germline GFP transgenic axolotl and its use to track cell fate: dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration. *Dev Biol* 290(2):386-397.
- Steele CT, Zivkovic BD, Siopes T, Underwood H. 2003. Ocular clocks are tightly coupled and act as pacemakers in the circadian system of Japanese quail. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284(1):R208-218.
- Stoykova A, Gruss P. 1994. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 14(3 Pt 2):1395-1412.
- Straube WL, Tanaka EM. 2006. Reversibility of the differentiated state: regeneration in amphibians. *Artif Organs* 30 (10): 743-755.
- Sun W, Kim H, Moon Y. 2010. Control of neuronal migration through rostral migration stream in mice. *Anat Cell Biol* 43(4):269-279.
- Talamillo A, Quinn JC, Collinson JM, Caric D, Price DJ, West JD, Hill RE. 2003. Pax6 regulates regional development and neuronal migration in the cerebral cortex. *Dev Biol* 255(1):151-163.
- Thomas M, Lazic S, Beazley L, Ziman M. 2004. Expression profiles suggest a role for Pax7 in the establishment of

- tectal polarity and map refinement. *Exp Brain Res* 156(3):263-273.
- Thompson JA, Lovicu FJ, Ziman M. 2007. Pax7 and superior collicular polarity: insights from Pax6 (Sey) mutant mice. *Exp Brain Res* 178(3):316-325.
- Thompson JA, Zembrzycki A, Mansouri A, Ziman M. 2008. Pax7 is requisite for maintenance of a subpopulation of superior collicular neurons and shows a diverging expression pattern to Pax3 during superior collicular development. *BMC Dev Biol* 8:62.
- Thompson JA, Ziman M. 2011. Pax genes during neural development and their potential role in neuroregeneration. *Progress in neurobiology* 95(3):334-351.
- Tole S, Remedios R, Saha B, Stoykova A. 2005. Selective requirement of Pax6, but not Emx2, in the specification and development of several nuclei of the amygdaloid complex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(10):2753-2760.
- Toyoda F, Kikuyama S. 2000. Endocrine regulation of reproductive behavior in the newt *Cynops pyrrhogaster*. *Zoolog Sci* 17(5):561-570.
- Tuinhof R, Artero C, Fasolo A, Franzoni MF, Ten Donkelaar HJ, Wismans PG, Roubos EW. 1994a. Involvement of retinohypothalamic input, suprachiasmatic nucleus, magnocellular nucleus and locus coeruleus in control of melanotrope cells of *Xenopus laevis*: a retrograde and anterograde tracing study. *Neuroscience* 61(2):411-420.
- Tuinhof R, González A, Smeets WJ, Scheenen WJ, Roubos EW. 1994b. Central control of melanotrope cells of *Xenopus laevis*. *Eur J Morphol* 32(2-4):307-310.
- Underwood H, Siopes T, Edmonds K. 1997. Eye and gonad: role in the dual-oscillator circadian system of female Japanese quail. *Am J Physiol* 272(1 Pt 2):R172-182.
- Valdez DJ, Nieto PS, Díaz NM, Garbarino-Pico E, Guido ME. 2013. Differential regulation of feeding rhythms through a multiple-photoreceptor system in an avian model of blindness. *FASEB J*.
- van Heyningen V, Williamson KA. 2002. PAX6 in sensory development. *Human molecular genetics* 11(10):1161-1167.
- Vergano-Vera E, Yusta-Boyo MJ, de Castro F, Bernad A, de Pablo F, Vicario-Abejon C. 2006. Generation of GABAergic and dopaminergic interneurons from endogenous embryonic olfactory bulb precursor cells. *Development* 133(21):4367-4379.
- Vigh B, Manzano MJ, Zadori A, Frank CL, Lukats A, Rohlich P, Szel A, David C. 2002. Nonvisual photoreceptors of the deep brain, pineal organs and retina. *Histol Histopathol* 17(2):555-590.
- Vitalis T, Cases O, Engelkamp D, Verney C, Price DJ. 2000. Defect of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor Pax6. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(17):6501-6516.
- Wang Q, Fang WH, Krupinski J, Kumar S, Slevin M, Kumar P. 2008. Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. *J Cell Mol Med* 12(6A):2281-2294.
- Wingate RJ, Lumsden A. 1996. Persistence of rhombomeric organisation in the postsegmental hindbrain. *Development* 122(7):2143-2152.
- Wullimann MF, Mueller T, Distel M, Babaryka A, Grothe B, Koster RW. 2011. The long adventurous journey of rhombic lip cells in jawed vertebrates: a comparative developmental analysis. *Front Neuroanat* 5:27.
- Wullimann MF, Rink E. 2001. Detailed immunohistology of Pax6 protein and tyrosine hydroxylase in the early zebrafish brain suggests role of Pax6 gene in development of dopaminergic diencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 131(1-2):173-191.
- Wullimann MF, Rink E. 2002. The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. *Brain Res Bull* 57(3-4):363-370.

6. Conclusiones



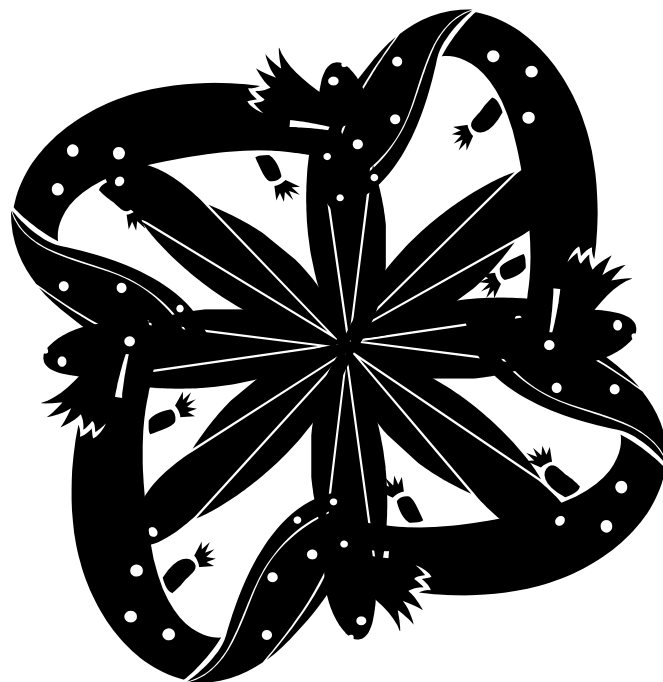
CONCLUSIONES

1. La aparición temprana en el desarrollo de los patrones de expresión de CB y CR, y su progresiva maduración permiten la visualización de determinados aspectos del desarrollo de diversas subpoblaciones del encéfalo de *Pleurodeles*, que no se observan sólo en base a la citoarquitectura.
2. A pesar de la validez de la inmunohistoquímica para CB y CR con fines neuroanatómicos (tales como resaltar con precisión la morfología de células individuales en regiones concretas), nuestros resultados demostraron que no se deben establecer homologías únicamente en base a la presencia de proteínas ligantes de calcio, dada la gran variabilidad observada en regiones cuya homología ha sido previamente corroborada en el encéfalo de diferentes vertebrados.
3. La inmunolocalización de alta resolución de los factores de transcripción codificados por la familia génica Pax, en combinación con otros marcadores, ha proporcionado las herramientas necesarias para la identificación de numerosas estructuras encefálicas, no reconocibles por métodos clásicos, en el cerebro de anfibios urodelos. Además, la expresión de Pax3, Pax6 y Pax7 en el encéfalo de *Pleurodeles* desentraña los límites anatómicos descritos en los modelos neuroméricos vigentes de organización encefálica.
4. La distribución regional de Pax3, Pax6 y Pax7, analizada conjuntamente con los patrones de expresión de CB y CR, y en relación con importantes acontecimientos fisiológicos y comportamentales de su ciclo biológico, ponen de manifiesto la maduración progresiva de los sistemas neurales subyacentes en la percepción sensorial (sistemas olfativo, visual, línea lateral) , integración multisensorial (en diferentes regiones del encéfalo) y la producción de respuestas motoras estereotipadas (en el encéfalo y la médula espinal).
5. Las subpoblaciones Pax6+, Pax7+ y Pax3+ observadas en *Pleurodeles*, *Notophthalmus* y *Ambystoma* ponen de manifiesto la destacada consistencia de los patrones de expresión de los factores de transcripción Pax en el desarrollo de vertebrados, con sólo algunas diferencias interespecíficas puntuales. En consecuencia, los patrones de expresión de las proteínas Pax3, Pax6 y Pax7 pueden ser utilizados para apoyar la presencia de regiones homólogas entre vertebrados.
6. En el encéfalo de anfibios urodelos, donde las migraciones celulares son muy escasas, la secuencia espaciotemporal de los miembros Pax en estudio ha proporcionado evidencias indirectas de posibles rutas migratorias no radiales. Estas incluyen movimientos

migratorios en el nervio olfativo, a través del límite paliosubpalial, a lo largo de una corriente migratoria rostral en el telencéfalo, del diencefalo basal al hipotálamo, de territorios alares a basales (y viceversa) en el rombencéfalo, y no respetando los límites interromboméricos. Nuestros últimos datos preliminares apoyan las rutas propuestas.

7. La expresión de Pax6 y Pax7 se mantiene ampliamente en el encéfalo de urodelos adultos, al contrario que en la situación encontrada en otros tetrápodos, donde la expresión en el adulto se restringe a regiones encefálicas concretas. Esta discrepancia se puede relacionar con la naturaleza pedomórfica del encéfalo de urodelos, e incluso con las increíbles y únicas habilidades regenerativas de estos animales.
8. Los niveles de expresión de las subpoblaciones Pax+ son variables a nivel celular de forma consistente entre especies de urodelos, y nuestros datos preliminares correlacionan las células ventriculares y subventriculares con moderada expresión de Pax, actividad progenitora e identidad de glía radial. En la zona del manto, las células positivas contienen diferentes niveles de reactividad, no asociado directamente a una naturaleza glial ó neuronal.
9. Aunque la función de los factores de transcripción Pax en el encéfalo de urodelos está sin clarificar, nuestros datos preliminares indican que las células que expresan Pax6 y Pax7 están relacionadas con la proliferación, diferenciación, y mantenimiento del estado diferenciado, tanto en homeostasis como en regeneración, durante el desarrollo y en adultos.

6. Summary



SUMMARY

Introduction

The study of the CNS in urodele amphibians (salamanders and newts) is of a great interest from an evolutionary point of view, due to its phylogenetic position: urodeles represent the closest living descendant of the common ancestor from whom tetrapods evolved, and their brains should also be similar (Northcutt and Kass, 1995). In addition, their external and slow development can be modulated by temperature, which permits analyzing events that occur rapidly in other models. Due to a reduction in the rate of proliferation and differentiation of nervous tissue, which affects the migration and lamination processes, the nervous system of urodeles has a secondary simplification (Roth et al., 1993). However, you can take advantage of this feature because once properly characterized, the urodele nervous system cleanly represents the basic pattern of tetrapods: secondary forebrain (consisting of the telencephalon and hypothalamus), diencephalon (prosomeres 1, 2 and 3), mesencephalon, isthmus, rhombencephalon and spinal cord (Puelles and Rubenstein, 2003; Moreno et al. 2007; Morona et al., 2008, 2009). These anatomical areas are characterized by differential expression of gene combinatory networks from early development, which are constant among vertebrates (Puelles y Ferran, 2012). Although the urodele brain has not developed a cerebral cortex as complex as in other species, even the adults are able to functionally regenerate damaged large parts of the nervous system (Straube and Tanaka, 2006; Mchedlishvili et al., 2007). This fact makes of them an interesting lab creature: urodeles are already being used as a model for understanding the mechanisms underlying neuronal regeneration, in order to develop new therapies to treat diseases such as Parkinson's, which today has no cure (Parish et al., 2007; Berg et al., 2010, 2011). With the increased understanding of the biology, ontogeny and regenerative potential of these amphibians, it is expected that research in urodeles will play a key role in regenerative medicine in the upcoming years. However, the current knowledge of the urodele brain organization is quite limited, and the use of the neuromeric paradigm in the interpretation of our results provides a consistent frame for future comparative-based studies, and partly represents the rationale of the present work. On the other hand, the use of comparative neuroanatomy of living species and the extensive information available on their corresponding biology help us understand how neural systems are. We can learn so much from the homologies and analogies between species, in order to understand valuable data about the evolution of the CNS.

Objectives

Our study focuses on the expression patterns of calcium binding proteins and Pax transcription factors. Calbindin D-28k and calretinin were selected to show the segmental paradigm in development, because the adult expression patterns had been previously reported (Morona y González, 2008; 2009). On the other hand, Pax3, Pax6 and Pax7 are highly conserved in evolution, and related to the formation and maintenance of the CNS in a neuromeric manner (Osumi et al., 2008), so they were chosen for the analysis of both the developing and adult urodele brain. We have analyzed the brain anatomy of the urodele species *Pleurodeles waltl* during embryonic development based on the expression of calcium binding proteins calbindin D-28k and calretinin (Joven et al., 2012), and subsequently we analyzed the dynamic expression patterns of the transcription factors Pax3, Pax6 and

Pax7 in combination with other known markers, both in the developing and adult *Pleurodeles waltl* (Joven et al., 2013a,b). In addition, we show some preliminary data obtained in other urodele species (*Ambystoma mexicanum* and *Notophthalmus viridescens*) regarding Pax6 and Pax7 expression patterns, and its putative role in proliferation.

Research content

In *chapter 2*, the sequence of appearance of calretinin and calbindin-D28k immunoreactive (CRir and CBir, respectively) cells and fibers has been studied in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Embryonic, larval and juvenile stages were studied. The early expression and the dynamics of the distribution of CBir and CRir structures have been used as markers for developmental aspects of distinct neuronal populations, highlighting the accurate extent of many regions in the developing brain, not observed on the basis of cytoarchitecture alone. CR and, to a lesser extent, CB are expressed early in the central nervous system and show a progressively increasing expression from the embryonic stages throughout the larval life and, in general, the labeled structures in the developing brain retain their ability to express these proteins in the adult brain. The onset of CRir cells primarily served to follow the development of the olfactory bulbs, subpallium, thalamus, alar hypothalamus, mesencephalic tegmentum, and distinct cell populations in the rhombencephalic reticular formation. CBir cells highlighted the development of, among others, the pallidum, hypothalamus, dorsal habenula, midbrain tegmentum, cerebellum, and central gray of the rostral rhombencephalon. However, it was the relative and mostly segregated distribution of both proteins in distinct cell populations, which evidenced the developing regionalization of the brain. The results have shown the usefulness in neuroanatomy of the analysis during development of the onset of CBir and CRir structures, but the comparison with previous data has shown extensive variability across vertebrate classes. Therefore, one should be cautious when comparing possible homologue structures across species only on the basis of the expression of these proteins, due to the variation of the content of calciumbinding proteins observed in well-established homologous regions in the brain of different vertebrates.

In *chapter 3*, the onset and developmental dynamics of Pax3, Pax6 and Pax7 expressions were analyzed by immunohistochemical techniques in the CNS of embryos, larvae and recently metamorphosed juveniles of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. During the embryonic period, the Pax proteins start being detectable in neuroepithelial domains. Subsequently, they become restricted to subsets of cells in distinct brain regions, maintaining different degrees of expression in late larvae and juvenile brains. Specifically, Pax6 is broadly expressed all along the urodele CNS (olfactory bulbs, pallium, basal ganglia, diencephalon, mesencephalic tegmentum, rhombencephalon and spinal cord) and the developing olfactory organ and retina. Pax3 and Pax7 are excluded from the rostral forebrain and were usually observed in overlapping regions during embryonic development, whereas Pax3 expression is highly downregulated as development proceeds. Thus, Pax3 is restricted in the juvenile to the roof plate of prosomere 2, pretectum, optic tectum, rhombencephalon, and spinal cord. Comparatively, Pax7 was more conspicuous in all these regions. Pax7 cells were also found in the paraphysis, intermediate lobe of the hypophysis, and basal plate of prosomere 3. Our data show that the expression patterns of the three Pax genes studied are overall evolutionary conserved, and therefore could unequivocally be used to identify subdivisions in the urodele brain similarly to other vertebrates, that are not clearly discernable with classical techniques. In addition, the spatiotemporal sequences of expression provide indirect evidences of putative migratory routes across neuromeric limits and the alar-basal boundary.

In *chapter 4*, the expression patterns of Pax6, Pax7, and, to a lesser extent, Pax3 genes were analyzed by a combination of immunohistochemical techniques in the central nervous system of adult specimens of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Only Pax6 was found in the telencephalon, specifically the olfactory bulbs, striatum, septum, and lateral and central parts of the amygdala. In the diencephalon, Pax6 and Pax7 were distinct in the alar and basal parts, respectively, of prosomere 3. The distribution of Pax6, Pax7, and Pax3 cells correlated with the three pretectal domains. Pax7 specifically labeled cells in the dorsal mesencephalon, mainly in the optic tectum, and Pax6 cells were the only cells found in the tegmentum. Large populations of Pax7 cells occupied the rostral rhombencephalon, along with lower numbers of Pax6 and Pax3 cells. Pax6 was found in most granule cells of the cerebellum. Pax6 cells also formed a column of scattered neurons in the reticular formation and were found in the octavolateral area. The rhombencephalic ventricular zone of the alar plate expressed Pax7. Dorsal Pax7 cells and ventral Pax6 cells were found along the spinal cord. Our results show that the expression of Pax6 and Pax7 is widely maintained in the brains of adult urodeles, in contrast to the situation in other tetrapods. This discrepancy could be due to the generally paedomorphic features of urodele brains. Although the precise role of these transcription factors in adult brains remains to be determined, our findings support the idea that they may also function in adult urodeles.

Conclusions

The results confirm the proposed regionalization of the urodele brain, and by experiments with BrdU, EdU and combinations with other cell cycle markers have obtained data about the dynamics of cell populations expressing PAX (proliferation, migration, maturation), and its importance in the formation, maintenance and CNS regeneration in urodele amphibians (Joven et al., *in preparation*). Altogether, the results point to the following conclusions:

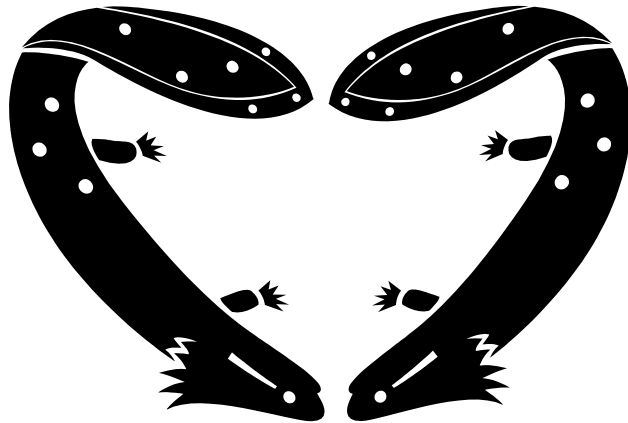
1. The early onset and the dynamics of CB and CR expression during development are suited markers in following developmental aspects of specific neuronal subpopulations in the developing brain of *Pleurodeles*, and highlight accurately morphological features which are not observed on the basis of cytoarchitecture alone.
2. In spite of the validity of the CB and CR immunohistochemical detection for neuroanatomical purposes such as highlighting accurately the morphology of individual cell bodies in specific regions, our results demonstrated that straightforward comparison based only on the presence of calcium-binding proteins with the aim to establish homologies should not be made, due to the great variability observed in well-established homologous regions in the brain of different vertebrates.
3. The high-resolution immunolocalization of the transcription factors encoded by the Pax gene family in combination with other markers has provided crucial guides for the identification of distinct brain structures and anatomical boundaries in the developing brain of urodele amphibians that are not recognized with classical methods, both in adult and during development. Furthermore, the expression of Pax3, Pax6 and Pax7 in the brain of *Pleurodeles* unravels the anatomical boundaries described in the current models of neuromeric organization of the brain.

4. The regional distribution of Pax3, Pax6 and Pax7 analyzed together with CB and CR expression patterns in relationship to physiological and behavioral key events reveal the progressive maturation of the nervous systems underlying sensory perception (olfactory, visual and lateral line systems), multisensory integration (in different brain structures) and the subsequent stereotyped motor responses (brain and spinal cord) in newt's life history.
5. The observation of Pax6, Pax7 and Pax3 in *Pleurodeles*, *Notophthalmus* and *Ambystoma* highlights the remarkable consistent patterns of Pax expression across tetrapods during development, with only subtle regional differences across species. Thus, Pax expression patterns can be used to support homologous brain regions between vertebrates.
6. In the brain of urodele amphibians where cell migrations are very scarce, the spatiotemporal sequences of expression of the studied Pax members have provided indirect evidences of putative tangential migratory routes. Those include migrations in the olfactory nerves, across the palliosubpallial boundary, along a rostral migratory stream in the telencephalon, from the basal diencephalon to the mammillary hypothalamus, from alar to basal territories in the hindbrain, from basal to alar rhombencephalic regions, and across rhombomeric boundaries. The proposed migrations are supported by our last preliminary data.
7. The expression of Pax6 and Pax7 is widely maintained in the brains of adult urodeles, in contrast to the situation in other tetrapods where adult expression become restricted to concrete brain regions. This discrepancy can be linked to the paedomorphic nature of urodele's brain, or even to the unique and remarkable regenerative abilities of these animals.
8. There are different levels of expression at a cellular level in the different Pax-expressing subpopulations consistent between urodele species, and our preliminary data correlate low expressing ventricular and subventricular cells with a radial glial progenitor identity, whereas in the mantle zone the positive cells show different degrees of reactivity not directly associated to a glial/neural nature.
9. Although the precise role of these transcription factors in the brain of urodeles remains to be properly determined, our preliminary data indicate that Pax-expressing cells are related to proliferation, differentiation, and tissue maintenance both in homeostasis and during regeneration, in larvae and adults.

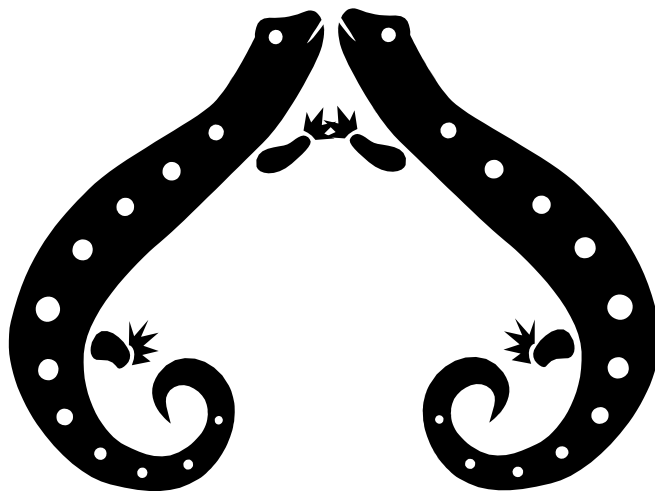
Bibliography

- Berg, D.A.; Kirkham, M.; Beljajeva, A.; Knapp, D.; Habermann, B.; Ryge, J; Tanaka, E.M. y Simon A. Efficient regeneration by activation of neurogenesis in homeostatically quiescent regions of the adult vertebrate brain. *Development*. 137(24):4127-34
- Berg, D.A.; Kirkham, M.M.; Wang, H.; Frisén, J. y Simon, A. 2011. Dopamine Controls Neurogenesis in the Adult Salamander Midbrain in Homeostasis and during Regeneration of Dopamine Neurons. *Cell Stem Cell*. 8(4):426-33.

- Joven A, Morona R, Moreno N, González A. 2012. Regional distribution of calretinin and calbindin-D28k expression in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* during embryonic and larval development. *Brain Struct Funct*:1-35. DOI: 10.1007/s00429-012-0442-1.
- Joven A, Morona R, González A, Moreno N. 2013a. Expression patterns of Pax6 and Pax7 in the adult brain of a urodele amphibian, *Pleurodeles waltl*. *J Comp Neurol* 521:2088-2124.
- Joven A, Morona R, González A, Moreno N. 2013b. Spatiotemporal patterns of Pax6 and Pax7 expression in the developing brain of a urodele amphibian, *Pleurodeles waltl*. *J Comp Neurol* *in press*.
- Joven, A.; Morona, R.; Moreno, N. y González, A. 2012. Regional distribution of calretinin and calbindin-D28k expression in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* during embryonic and larval development. *Brain Struct Funct*. 2012 Jul 28. [Epub ahead of print]
- Mchedlishvili, L.; Epperlein, H. H.; Telzerow, A. y Tanaka, E.M. 2007. A clonal analysis of neural progenitors during axolotl spinal cord regeneration reveals evidence for both spatially restricted and multipotent progenitors. *Development*, Vol. 134, no. 11, pp. 2083-2093.
- Moreno N, González A. 2007. Regionalization of the telencephalon in urodele amphibians and its bearing on the identification of the amygdaloid complex. *Front Neuroanat* 1:1.
- Moreno, N.; Retaux, S. and González, A. 2008. Spatio-temporal expression of *Pax-6* in *Xenopus* forebrain. *Brain Research* 1239: 92-99.
- Morona, R. y González, A. 2008. Calbindin-D28k and Calretinin Expression in the Forebrain of Anuran and Urodele Amphibians: Further Support for Newly Identified Subdivisions. *J Comp Neurol* 511: 187–220.
- Morona, R. y González, A. 2009. Immunohistochemical Localization of Calbindin-D28k and Calretinin in the brainstem of Anuran and Urodele Amphibians. *J Comp Neurol* 515: 503-537.
- Northcutt, R.G. y Kass, J.H. 1995. The emergence and evolution of mammalian neocortex. *Trends Neurosci* 18 (9):373-379.
- Osumi, N.; Shinonara, H; Numayama-Tsuruta, K. and Maekawa, M. 2008. Concise Review: Pax6 Transcription Factor Contributes to Both Embryonic and Adult Neurogenesis as a Multifunctional Regulator. *Stem Cells* 2008:26:1663-1772.
- Parish, C.L.; Beljajeva, A. Arenas, E.; Simon, A. 2007. Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in salamander lesion-induced regeneration model. *Development* 134: 2881-2887.
- Puelles L, Rubenstein JL. 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26:469-476.
- Puelles, L.; Ferran, J.L. 2012. Concept of neural genoarchitecture and its genomic fundament. *Front Neuroanat* 6:47
- Roth, G.; Nishikawa, K.C.; Naujoks-Manteuffel, C.; Schmidt, A.; Wake, D.B. 1993. Paedomorphosis and simplification in the nervous system of salamanders. *Brain Behav Evol* 42 (3): 137-170.
- Straube, W.L.; Tanaka, E.M. 2006. Reversibility of the differentiated state: regeneration in amphibians. *Artif Organs* 30 (10): 743-755.



8. Agradecimientos



Son muchas las personas que se merecen una mención en este apartado final de la tesis al que tanto me ha costado llegar... Así que voy a resumir, y si me dejas a alguien os pido que me perdonéis y que lo achacéis a las altas horas de la mañana a las que estoy escribiendo estas líneas.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, Agustín y Nerea por vuestra eterna paciencia, por vuestra manera de enseñar, por la confianza depositada en mí, y sobre todo por darme la oportunidad de trabajar con tritones, un sueño de la infancia hecho realidad. A mis compañeros de grupo gracias por tantos momentos vividos, con especial mención a Jorge... Muchas gracias por enseñarme a enseñar, por todas las horas dedicadas y por tus clases de escalada. A Laura y Ruth, mis maestras, compañeras y amigas...no tengo palabras para expresar mi gratitud por tantos momentos compartidos... Jesús, gracias por estar siempre ahí para escuchar cuando se necesita, y por tus valiosos consejos. Sandra, gracias por ser así, y ya sabes, esto es como la boda del hermano mayor... eres la siguiente! Mucho ánimo que tú puedes! Por último gracias a mis padawan del "Pleuroteam" ... no perdáis el buen rollo que os caracteriza!

Me gustaría agradecer también a todo el Departamento de Biología Celular sin pararme a dar nombres concretos, por el buen trato que recibido por parte de todos y cada uno de vosotros en todo momento, por la experiencia de dar y recibir clases con vosotr@s, por las comidas de navidad, por saber preocuparse de uno no sólo en lo laboral, y en definitiva por las amistades forjadas en estos años. Gracias.

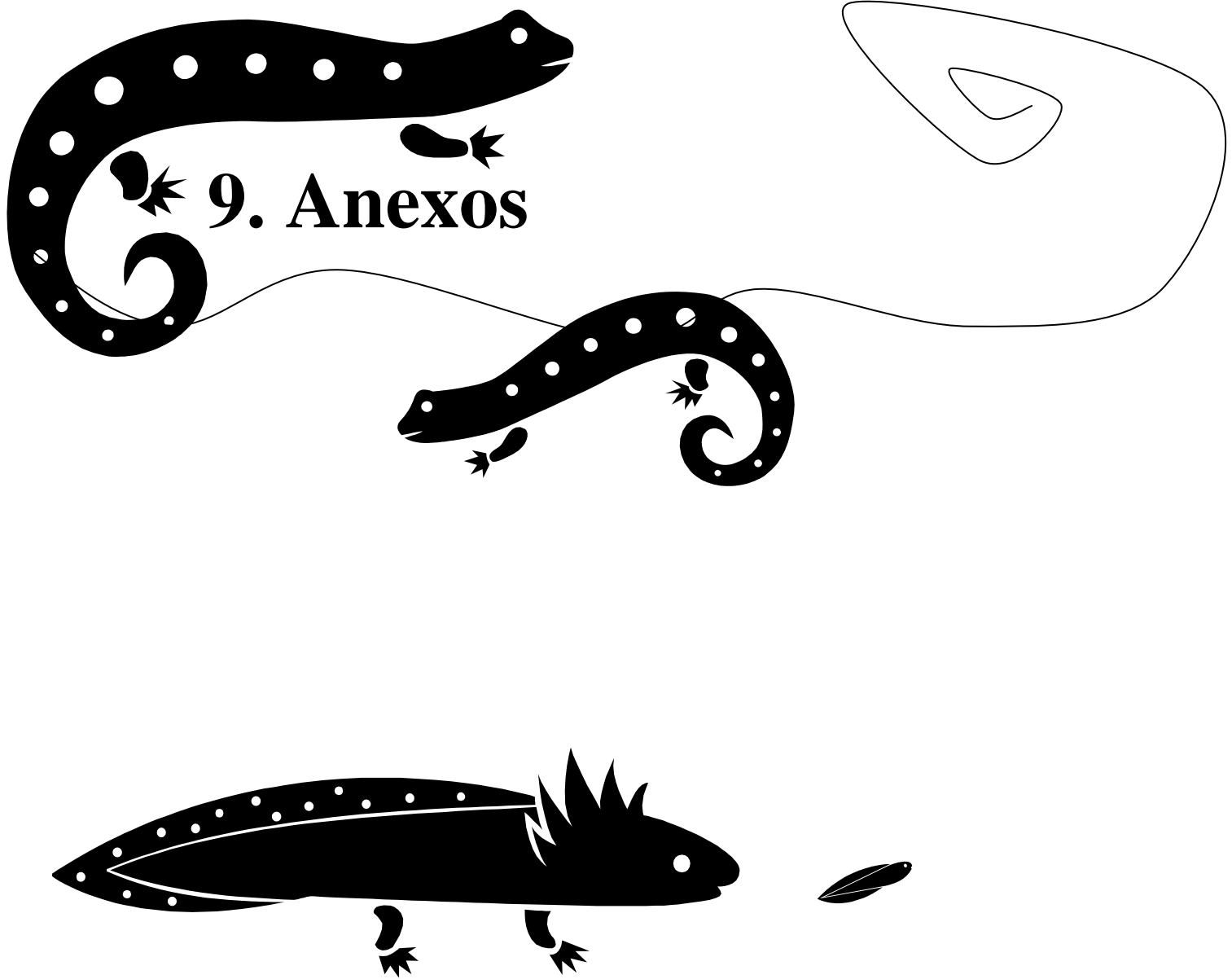
Gracias también a todos los compañeros de pasillos, animalario, cafetería, y escaleras de la Facultad que me he ido encontrando en todo tipo de momentos y que han hecho mis días más llevaderos y humanos, tanto dentro como fuera de la facultad, en especial a l@s colegas del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Thank you Elly and Andras for accepting me into your respective labs and for all the life experience acquired during those two exciting and productive periods. I also want to thank every one of your group members and surrounding people for exchange of knowledge, smiling together, and so many good memories. I remember you all and you are so many... So, no names and Thank you all.

Gracias a mis amigos, que me han sabido aguantar en buenos y malos momentos. Gracias por nuestro erasmus que no termina, por las partidas de Catán y por las cañitas madrileñas, mañas, valencianas y vascas. Gracias por hacer que no pase el tiempo.

Y por supuesto, gracias a mi familia, porque siempre estáis ahí, incluso si desaparezo durante meses, y por que os debo todo lo que soy... Esta tesis os la dedico a todos y cada uno de vosotros, a los que están y a los que se fueron: padres, herman@s, ti@s, sobrin@s, abuel@s... Somos demasiados como para poner nombres. Os quiero.

Por último, esta tesis no habría sido posible sin la beca FPI de la que fui beneficiario, gestionada por la Universidad Complutense, y que me permitió comer, alquilar, vivir y realizar dos estancias en el extranjero mientras trabajaba en investigación, por lo que también estoy extremadamente agradecido a todas las personas del ámbito de la política que favorecen el desarrollo de la carrera científica en España.



ANEXO 1

Development of locomotion in urodeles (*3)

- **First movements (head flexure stage):** muscular activity begins with contraction of a few segments of axial musculature in the anterior trunk (future neck region)
- **C-coil stage:** with coordination of ipsilateral myotomes
- **S-wave stage:** bilateral coordination and ipsilateral phase lag
- **Swimming**

- **Primitive reflex mechanism (*2):** Muscular response to a mechanical stimulus. Few elements have differentiated and constitute the first reflex archs: Rohon-Beard cells (transient primary afferent neurons in the dorsal part of the cord, receiving proprioceptive and exteroceptive information), primitive commissural neurons (floor plate neurons) and primitive motoneurons

Definitions on feeding behaviours (*4)

- **Suction feeding:** consists in drawing a single, relatively large item into the mouth by a single expansion of the buccal cavity, and is performed only in water.
- **Lunging:** is a forward movement of the entire body and can be combined with other behaviours.
- **Jaw prehension (biting):** is the grasping of prey between the jaws and is performed both in water and on land.
- **Tongue prehension:** is the grasping of prey with the tongue, and involves tongue protraction/projection followed by tongue retraction.
- **Stereotyped movements** are those that exhibit relatively low variation
- **Modulation** is the variation of movements produced by active adjustment of movements by the CNS, excluding the variations caused solely by differences in the physical circumstances in which the behavior is performed such as the medium, the mass of the prey or body temperature

Personal observations:

- **Cannibalism:** urodele larvae are highly cannibalistic when they are raised at high density or when food is scarce. They can predate over small congeners if available, or eat each other part of the tail, limbs or gills, which subsequently will regenerate (although not the gills). Indeed, the impressive regeneration events occurring in urodeles could have evolved as a solution for intra-specific aggression during developmental period, a feature that is shared in all urodeles, even those that show internal development.
- **Feeding: active seeking:** late larvae walk in the bottom sniffing it around and stopping to eat when they detect chemically palatable food, such as inmotile, commercial pellets. They also swim towards a potential prey such as living invertebrates or sinking pellets.
- **Feeding: keeper recognition:** late larvae swim toward the keeper as they associate the presence with a source of food. The presence of the keeper can be enough to trigger active seeking behavior in resting larvae, and it's an evidence of learning processes at late stages.
- **Intraspecific aggression modulation:** intra-specific attacks are probably modulated by learning events during the active larval period. Larvae grown as cannibals will follow their tank-mates and try to obtain food from them as a source even as post-metamorphic newts. However, when larvae are grown at low densities and with food enough, they rarely bite each other, and they can be housed at higher densities after a critical period (at the end of the late active larval period), as they recognize the others as con-specifics and not as a sensorial stimulus triggering feeding mechanisms.

BIBLIOGRAPHY

Table (*0)

- **Ambystoma mexicanum**
 - Armstrong JBM, G.M. 1989. Developmental Biology of the Axolotl. New York: Oxford University Press.
 - Bordzilovskaya NPD, T.A.; Duhon, S.T.; Malacinski; G.M. 1989. Developmental-stage series of axolotl embryos. In: Armstrong JBM, G.M., editor. Developmental Biology of the Axolotl.. Oxford University Press, New York, pp. 201-219
 - Nye HL, Cameron JA, Chernoff EA, Stocum DL. 2003. Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development. Dev Dyn 226(3):555-560
- **Notophthalmus viridescens**
 - Wong CJ, Liversage RA. 2005. Limb developmental stages of the newt *Notophthalmus viridescens*. Int J Dev Biol 49(4):375-389.
 - Khan PA, ; Liversage, RA. 1995. Development of *Notophthalmus viridescens* embryos. Develop Growth Differ 37:529-537.
 - Numbers of stages and missing data (early embryo and metamorphosis) adapted from those of *Triturus taeniatus* (Glaesner, 1925) and *Pleurodeles waltl* (Gallien and Durocher, 1957)
 - Glaesner L. 1925 Normentafel zur Entwicklung des gemeinen Wassermolchs (*Molge vulgaris*). . Normentafeln zur Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere.
 - Gallien LD, M. 1957. Table chronologique de développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah. Bull Biologique 2:1-19.
- **Pleurodeles waltl**
 - Gallien LD, M. 1957. Table chronologique de développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah. Bull Biologique 2:1-19.
 - Shi DL, Boucaut JL. 1995. The chronological development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (Michah). Int J Dev Biol 39:427 - 441.

Other considerations: physiological and behavioural key events: (*1)

- Roberts A, Soffe SR, Clarke JD, Dale N. 1983. Initiation and control of swimming in amphibian embryos. Symp Soc Exp Biol 37:261-284.
 - Ten Donkelaar. 1998. Urodeles. In: Nieuwenhuys R tDH, Nicholson C, editor. The central nervous system of vertebrates. London: Springer. p 1045-1150. (*2)
 - Bekoff A. 1985. Development of Locomotion in Vertebrates, a comparative perspective. In: Gollin ES, editor. The comparative Development of Adaptive Skills: Evolutionary Implications. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates. p 57-94. (*3)
 - Deban SM, O'Reilly JC, Nishikawa KC. 2001. The Motor Control of Feeding in Amphibians. Amer. Zool. (2001) 41 (6): 1280-1298. (*4)
- Ten Donkelaar. 1998. Urodeles. In: Nieuwenhuys R tDH, Nicholson C, editor. The central nervous system of vertebrates. London: Springer.

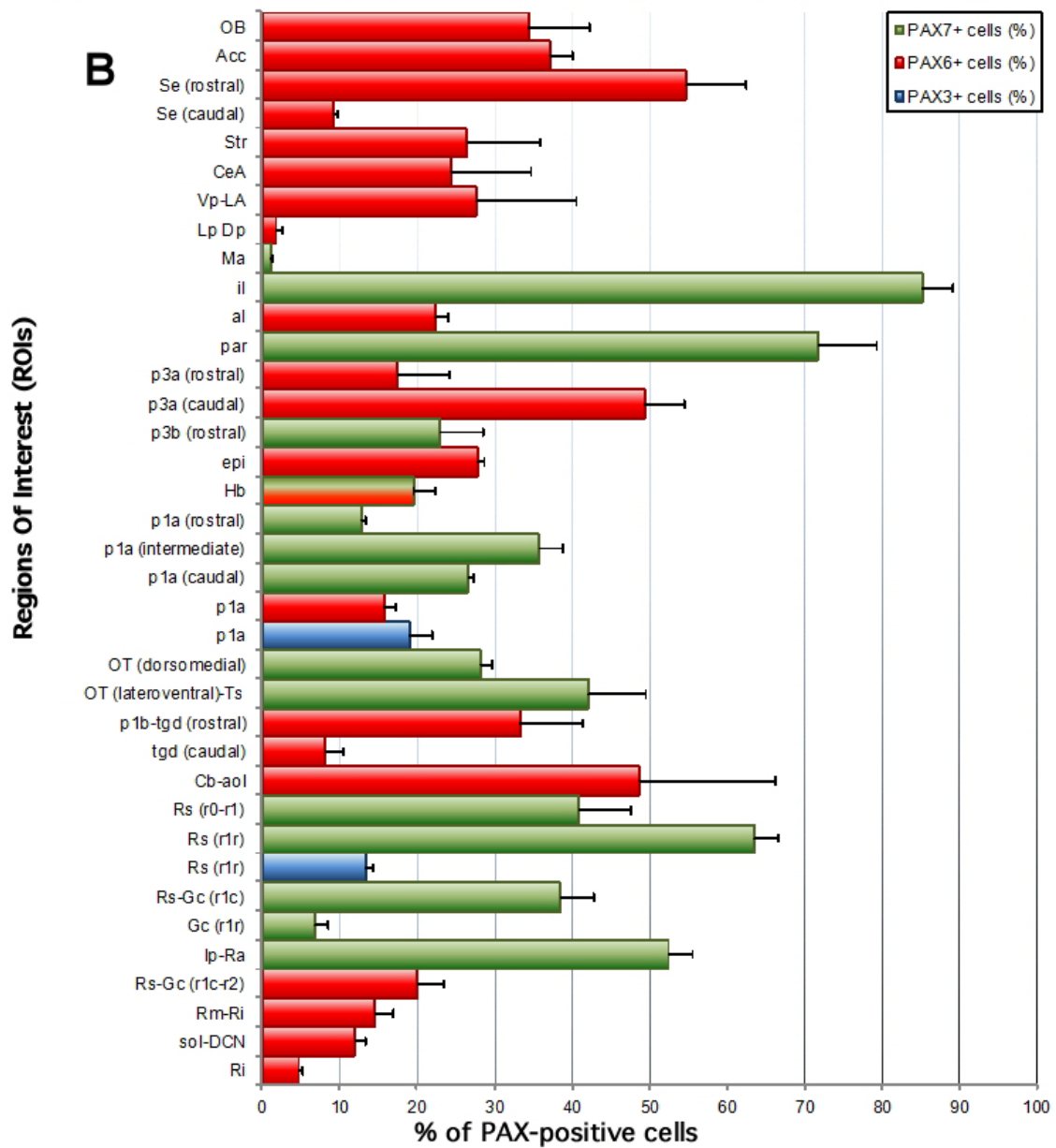
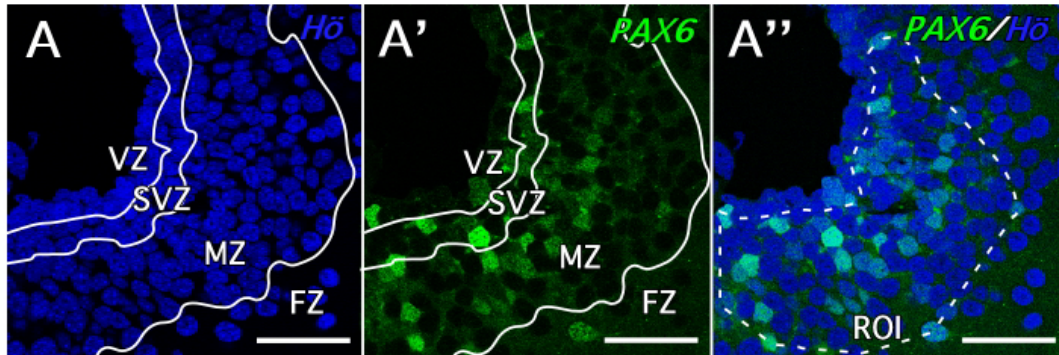
ANEXO 1

Life history	Am	Pw	Nv	External characters	Other considerations: physiological and behavioural key events
Embryonic life	1-41	0-34	Limbfield Bud Stage	<ul style="list-style-type: none"> Fertilization, laying, first cleavages (Pw St. 0-4) Blastulation (Pw St. 5-7) Gastrulation (Pw St. 8-13) Neurulation, somatogenesis (5 pairs of somites), eye primordium formation (Pw St. 14-21) Somatogenesis (from 5 to 9 pairs of somites), pronephros and tailbud formation, otic placode and gill primordia appearance (Pw St. 22-24) From 10 to 19 pairs of somites, branchial furrowing, body axis straightening, tailbud enlargement, olfactory organ primordium, melanophores in trunk and balancer appearance (Pw St. 25-29) Limbfield: From 20 somites on, Lateral line formation, appearance of melanophores in head region, unbranched gills enlargement and circulation establishment in gills and tail (Pw St. 30-32) Bud stage I: Forelimb bud primordium formation, eye maturation, operculum and mouth formation, gill branching and elongation, second lateral line bypasses the forelimb on the ventral side (Pw St. 33) Bud stage II: Mouth opening, forelimb bud formation, balancer elongation (Pw St. 34) <p>-----</p> <ul style="list-style-type: none"> In <i>Notophthalmus viridescens</i>, the embryo is encapsulated in a series of five concentric jelly layers. Due to the limited sac space and the strong layers covering it, the embryo is naturally curved as growing proceeds <i>Amystoma mexicanum</i> don't develop balancers 	<p>Development of sensory systems</p> <ul style="list-style-type: none"> Mechanoreceptive free endings in the skin Skin excitability to noxious stimuli A visual system based on the pineal eye, which is excited by dimming <p>Development of locomotion in urodeles</p> <ul style="list-style-type: none"> First movements (head flexure stage) C-coil stage S-wave stage Swimming <p>From developmental staging papers (*0), (*1)</p> <ul style="list-style-type: none"> Primitive reflex mechanism: Muscular response to a mechanical stimulus Heart beating appearance Spontaneous muscular movements Sporadic swimming Hatching
Initial larval life	42-44	35-38	Peg stage e2D stage	<ul style="list-style-type: none"> Peg stage: Larva transparent, internal organs including heart, stomach, visceral arches and auditory capsules are visible, balancer at the maximum point of development (Pw St. 35-36) e2D stage: Forelimb bud elongation (final shape: paddle), mouth opening, gill branching and elongation, yolk absorption (Pw St. 37-38) 	<ul style="list-style-type: none"> Use of balancers to remain adhered in all surfaces Escape response triggered by visual/vibrational stimuli Feeding: stereotyped suction
Life history	Am	Pw	Nv	External characters	Other considerations: physiological and behavioural key events
Early active larval life	45-52	39-45	<p>Forelimb 2D stage: (39-40) e3D stage: (41) 3DI stage: (42) 3DII stage: (43-44) 4D stage: (45)</p> <p>Hindlimb Limbfield: (41-42) Bud I stage: (42-43) Bud II stage: (43-44) Bud III stage: (45)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Formation of three fingers and elbow articulation in forelimbs, hindlimb bud primordia appearance, balancer thinning, gill branching and elongation, numerous melanophores distributed in the caudal fin (Pw St. 39-42) Formation of the forth finger in forelimbs, hindlimb bud formation, balancer reduction (Pw St. 43-45) 	<ul style="list-style-type: none"> Head movements from side to side Feeding: lunging Feeding: modulation of suction+lunging Cannibalism at high density of larvae Coordinated walking in the bottom
Late active larval life	53-57	46-55c	<p>Hindlimb eT stage: (46-48) 2T stage: (49-50) 3T stage: (51-52a) 4T stage: (52a-53) 5T stage: (54-56)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Balancer disappearance, Formation of two fingers in hindlimbs (Pw St. 46-49) Formation of the five fingers and articulation in hindlimbs, gills at the maximum point of development (Pw St. 50-55a) Gills reduced to its half size, fin regression, limbs thickening, skin transformation in trunk region (Pw St. 55b) First moulting, skin transformation in the whole animal, flattened head, gills extremely reduced (Pw St. 55c) 	<ul style="list-style-type: none"> Feeding: active seeking Feeding: keeper recognition Spasmodic movement of the hindlimb The knee is used in a walking motion Intraspecific aggression modulation Pulmonar breathing Floating
Juvenile	57	56	Eft	<ul style="list-style-type: none"> Metamorphosis I: fin and gills complete disappearance, skin change, eyes reorientation (Pw St. 56) Body growing, sexual maturation (Pw St. 56+) Metamorphosis II: Skin change, fin development (Pw St. 56+) <p>-----</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Amystoma mexicanum</i> don't metamorphose 	<p><i>Notophthalmus viridescens</i> & <i>Pleurodeles waltl</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Terrestrial lifestyle of the eft Aquatic lifestyle of breeding adults Terrestrial and aquatic lifestyles of non-breeding adults depending on environmental cues Feeding: jaw prehension or biting Feeding: tongue prehension <p><i>Amystoma mexicanum</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Completely aquatic lifestyle
Adult	57+	56+	Adult		

ANEXO 2

Quantification analysis: confocal images were processed for counting after PAX/Hö staining as shown in **A**, **A'**, **A''**. For every confocal obtained image, highlighted total nuclei could be arranged in 4 zones: VZ, SVZ, MZ and FZ (**A**), then PAX expression (**A'**) was merged with Hö (**A''**), and ROIs were delineated by the external most cells expressing PAX (those placed at the edges were obviated for counting) as shown by the dashed line-restricted area in **A''**. Relative cell labeling index (Howard and Reed, 2008) was then calculated, and mean values (together with their counterpart standard deviations) are presented in **B** for every distinguishable PAX-expressing subpopulation in a rostrocaudal order of appearance.

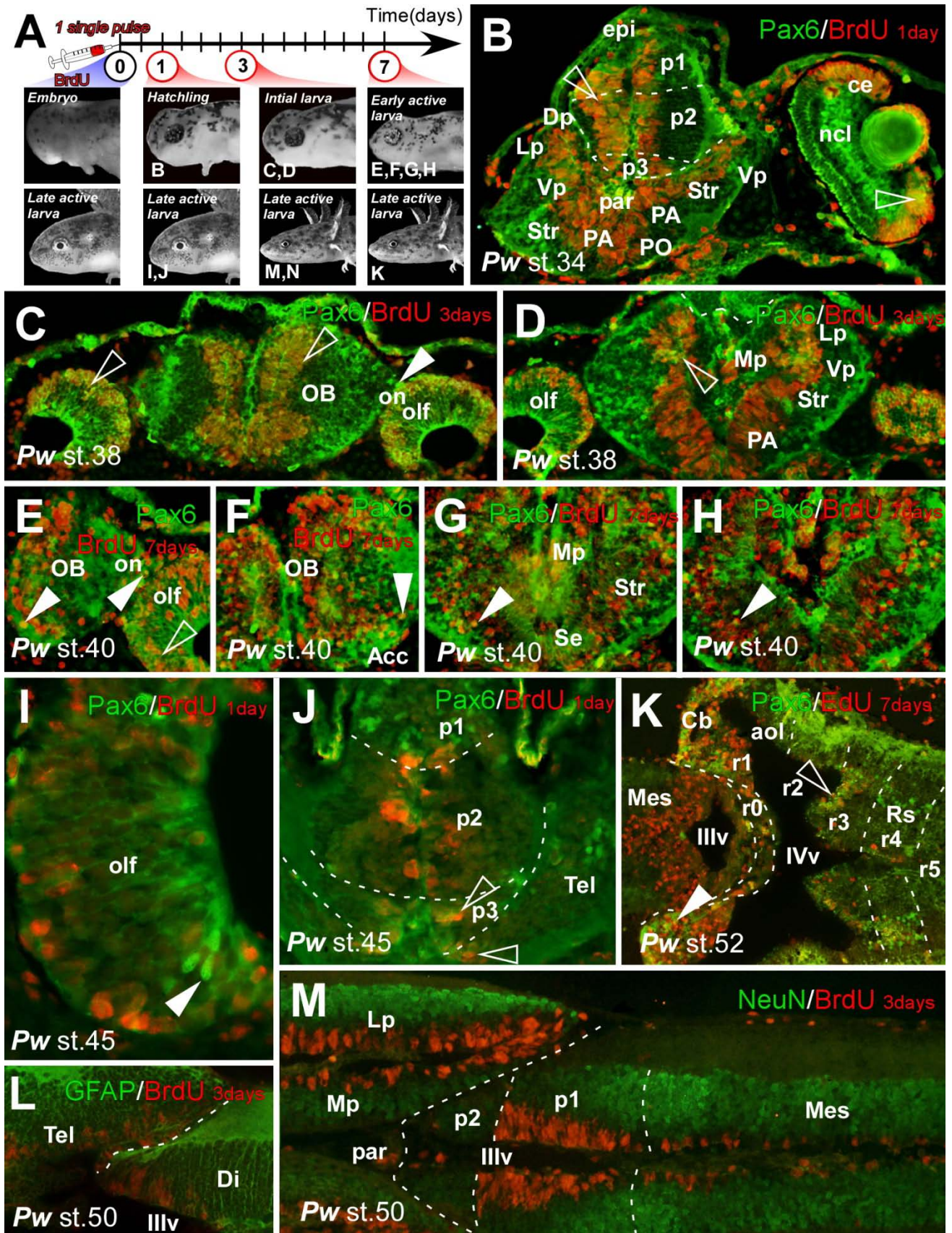
ANEXO 2



ANEXO 3

In a set of preliminary experiments, we analyzed larvae of *Pleurodeles waltl* (Pw) after BrdU chase at different timepoints (**A**). The results obtained in this species confirmed the double role of Pax6 in proliferation and neural differentiation (**B-K**). Glial network was visualized by vimentin (**N**), and neural cell phenotype by NeuN (**M**). Empty arrowheads point to Pax6+ progenitor cells, and fulfilled arrowheads point to differentiated cells. See list for abbreviations of chapter 3. Data obtained in the laboratory of Dr. González, Department of Cell Biology, Faculty of Biology, UCM, Madrid.

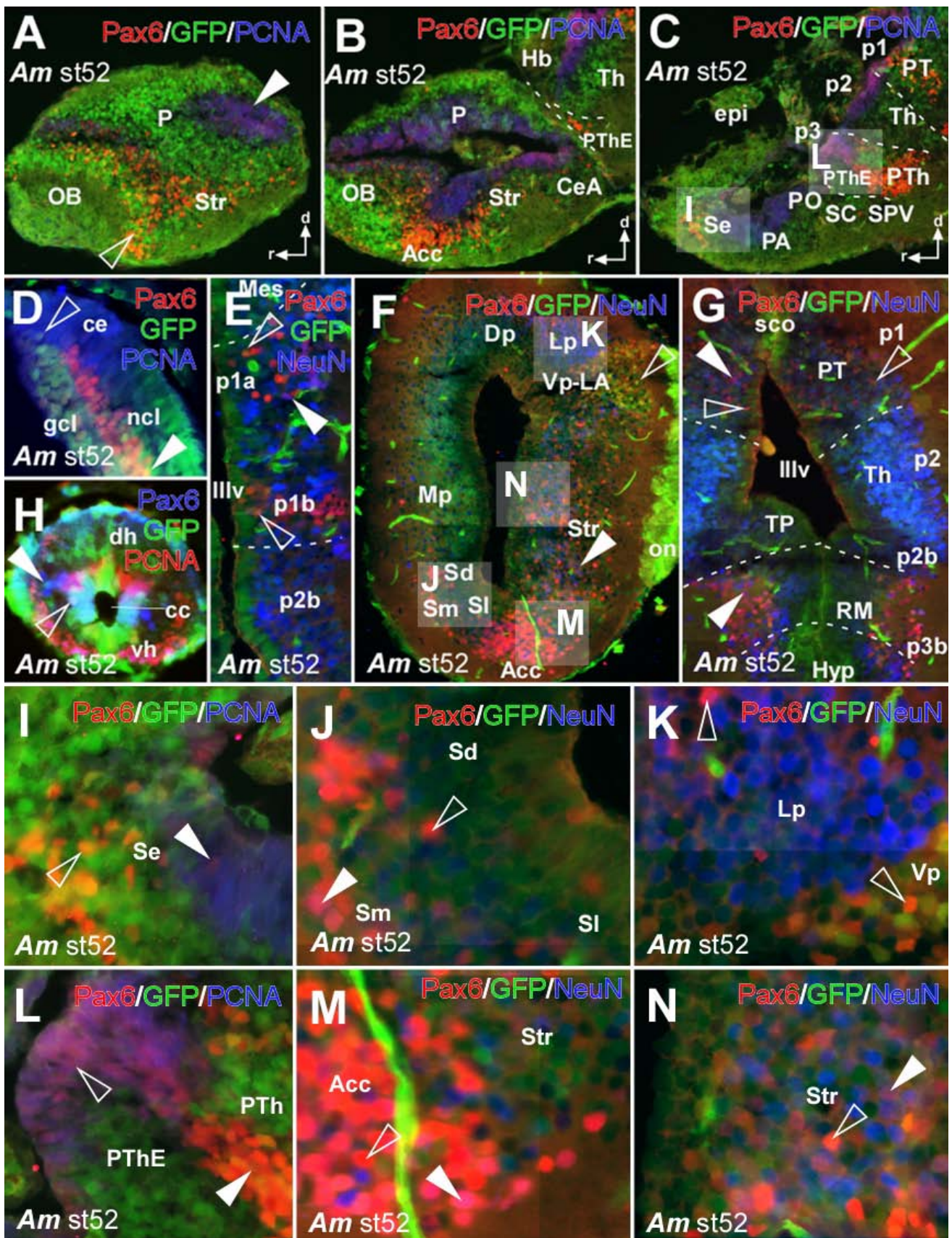
ANEXO 3



ANEXO 4

Preliminary data obtained in *Ambystoma mexicanum* (*Am*) genetically modified for expressing GFP under the promoter of the β -actin. **A-C, I, L:** Pax6 is expressed in forebrain ventricular proliferating cells (fulfilled arrowheads) as well as in differentiating cells (empty arrowheads). **D,E:** Also in the developing retina and spinal cord Pax6-low expressing cells were proliferating, and high levels of both Pax6 and GFP were observed in presumptively fully differentiated cells. **F,G, J, K, M, N:** Some of the Pax6+ cells in the mz correspond to differentiated neurons (fulfilled arrowheads), whereas others were negative for the neuronal marker NeuN. See list for abbreviations of chapter 3. Data obtained in the laboratory of Dr. Tanaka, Max Plank Institute of Molecular Cell Biology and Genetics / Center of Regenerative Therapies Dresden, Dresden, Germany.

ANEXO 4



ANEXO 5

Data in preparation related to the proliferation (MCM2, pHH3, BrdU, EDU) migration (Edu) and differentiation (GFAP, NeuN, Sox2) of Pax6+ and Pax7+ subpopulations in the brain of *Nothophthalmus viridescens* (*Nv*) larvae are presented. EdU was injected intraperitoneally into *Nv* larvae at representative stages, whose brains were analyzed 13 days later (**A**). In controls, 40 minutes after injection, the majority of cells that have incorporated EdU are located in areas svz vz and express Sox2 (**E**) and various cell cycle markers such as MCM2, PCNA and pHH3 (data not shown). The results obtained in the experimental group show both Pax + proliferating cells associated with vz svz and double Pax + / EdU + at mz (**B-G, H, I, K**). Addition, it was checked by triple immunohistochemistry GFAP / NeuN / EdU that cells EdU + in general continue the processes of the glia radial as they are differentiating (**F, J, L**), although the glial / neuronal nature of Pax + subpopulations not was corroborated directly in this species. Pax+ progenitor cells are highlighted by an empty arrowhead, whereas differentiating cells double labeled for Pax6/EdU at 13 days post EdU-administration. See list for abbreviations of chapter 3. Data obtained in the laboratory of Andras Simon, Department of Cell and Molecular Biology of Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

ANEXO 5

