

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**La señalización purinérgica como modulador de la
neurogénesis posnatal y adulta**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Lucía Paniagua Herranz

Directores

**Esmerilda García Delicado
Felipe Ortega de la O**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

La señalización purinérgica como modulador de la neurogénesis posnatal y adulta

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Lucía Paniagua Herranz

DIRECTORES

Esmerilda García Delicado
Felipe Ortega de la O

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**La señalización purinérgica como modulador de
la neurogénesis posnatal y adulta**

Tesis Doctoral

Lucía Paniagua Herranz

Directores de Tesis

Esmerilda García Delicado

Felipe Ortega de la O

Agradecimientos

Son tantas las personas que me han ayudado y apoyado en todo este proceso que merecen un huequito en este apartado. Me van a faltar palabras para agradecerlos como se merece.

En primer lugar a M^a Teresa, por abrirme las puertas del laboratorio y por su conocimiento incalculable. A mis directores de tesis, Esmerilda y Felipe, por haberme dado la oportunidad de iniciarme en esta carrera tan dura pero gratificante a la vez. Esme, gracias por tu cariño, ayuda y por haberme metido el gusanillo de la investigación con nuestros queridos astrocitos. Felipe, gracias por todo lo que me has enseñado científicamente, por confiar en mí y sobre todo por tus maravillosos “chistes” que no me van a abandonar en la vida. Trabajar con vosotros, dejando de lado los momentos de estrés, ha sido un placer debido al cariño y humor constante.

A mis compañeros de labo, Mariajo, Juan Carlos, Lorena, habéis sido mi gran apoyo, más que compañeros sois amigos. Gracias por esos ratos en las comidas, por las risas constantes en todo momento, por las frases, los juegos de mesa, los mapaches, por casi perder el control etc. Sin vosotros esta experiencia no habría sido la misma. A Aida, parte de esta tesis es gracias a ti. Gracias por los consejos, por la ayuda en la distancia y por tu amistad. A mis estudiantes Sara y Ana, porque aunque estuvisteis poquito tiempo mi ayudasteis y apoyasteis muchísimo, creando un gran ambiente en el labo y en la “sala de cultivos”. A las nuevas incorporaciones Celia, Julia, Nagore y Yaiza, por los viernes de pipitas y por echarme una mano siempre que lo he necesitado. Os deseo toda la suerte del mundo en esta etapa que empezáis. El laboratorio se queda en buenas manos con vosotras. A Ricardo y Alberto, por aguantarme y por las risas. En general, gracias al resto del departamento (Raquel, María, Rosa, Nuria, Carmen, M^a Carmen, Javi, Pepe, Magdalena).

A mis amigos de toda la vida, Sergio, Cristian, María, Borja, teneros de amigos desde hace tanto tiempo es un regalo, así que, gracias por todos los momentos vividos, por los consejos, por los momentos de desahogo y por todo lo que nos queda por vivir.

A mi “secta de Móstoles” (Ismael, Silvia, Dani, Iván), por arreglar el mundo, por los vermús interminables y por apoyarme siempre.

A mis chicas slytherin (María V., Irene, Silvia, María G, Eva), no habría podido tener mejores compañeras de máster. Gracias por la “propuesta indecente”, por Granada, Bilbao, Logroño. Irene, no se me ocurre mejor compañera con la que colaborar científicamente. Gracias por tu risa constante, por tu apoyo, tesón y conocimiento. Lo vas a petar en Noruega porque eres una de las personas más trabajadoras que conozco. Espero que el paper *Paniagua & Santos et al.*, se materialice pronto. A Eva, ay compi!, cuantas cosas hemos vivido. No sé ni por dónde empezar, pero gracias por todo el apoyo que me has brindado, por todos los momentos vividos, por haberme presentado a la pata que nos faltaba, Alba, porque quedar con vosotras los viernes después de tanta tensión me ha dado la energía que necesitaba para continuar.

A la Noe's (Álvaro, Javi, Klau, María, Silvia, Vir, Inma, Maroto, Vero), porque aunque nos veamos poco debido a la distancia cuando lo hacemos son risas aseguradas. A Álvaro simplemente por estar. A Silvia, por todo lo que te he molestado con tanto trámite sin quitar la sonrisa.

A mis "Tertulianas piñoneras" (Ana, Miriam, Esther, Sara, María, Belinda, Andrea, Clara, Jérica, Natalia, Cristina) por las maldades, las risas, los bailes, por ayudarme tanto a desconectar. Pero en especial a Miris, porque eres una amiga increíble. Porque los dramas vividos en conjunto acompañados de bailes y vaciles, son menos dramas.

A mis padres, porque si hoy estoy aquí es gracias a ellos. Pero sobre todo a mi madre, por ser mi modelo a seguir. Gracias por el apoyo, por aguantarme, porque me va a faltar vida para agradecerte todo lo que has hecho y haces cada día por mí. Gracias y mil veces gracias.

Por último, y no por eso menos importante, a Manu. Porque me haces infinitamente feliz y contigo la vida es mucho más fácil. Por todo el apoyo, la confianza, el aguante que has tenido y todos los momentos en los que me haces llorar de la risa. Sin ti no lo habría conseguido. No se me ocurre un compañero mejor de viaje.

De corazón, gracias.

Índice

1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN.....	7
3. SUMMARY.....	11
4. INTRODUCCIÓN	15
4.1 LA NEUROGÉNESIS.....	17
4.1.1 La glía radial y la neurogénesis temprana: origen y características principales.....	17
4.1.2 Destino celular.....	18
4.2 EL CEREBELO	21
4.2.1 Histogénesis del cerebelo.....	21
4.2.1.1 El neuroepitelio del cuarto ventrículo	21
4.2.3 El labio róbico	22
4.2.2 Desarrollo posnatal del cerebelo	23
4.2.2.1 La capa granular externa.....	23
4.2.2.2 La capa de neuronas de Purkinje	24
4.2.2.3 Futura materia blanca.....	24
4.2.3 La corteza cerebelosa	25
4.3 LA NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO.....	27
4.3.1 La zona subgranular	27
4.3.2 La zona subependimaria.....	29
4.3.2.1 Origen de la SEZ	29
4.3.2.2 Las células ependimarias	30
4.3.2.3 Las células B1 y su progenie.....	30
4.3.2.4 Mantenimiento de las NSCs: estado quiescente y activado.	32
4.3.2.5 Regionalización y diferenciación celular	34
4.3.2.6 Regulación de la neurogénesis en la SEZ	36
4.4 EL SISTEMA PURINÉRGICO	40
4.4.1 Receptores de adenosina P1	42
4.4.2 Receptores de nucleótidos P2	42
4.4.2.1 Receptores ionotrópicos P2X.....	43
4.4.2.2 Receptores metabotrópicos P2Y.....	45
4.4.3 El transportador vesicular de nucleótidos, VNUT	47
4.4.4 Metabolismo de los nucleótidos	48
4.4.5 El sistema purinérgico en la neurogénesis y el mantenimiento de la homeostasis en el sistema nervioso.....	50
4.4.6 El sistema purinérgico en la SEZ adulta	52
5. OBJETIVOS.....	53
6. MATERIALES Y MÉTODOS	57
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	59
6.1.1 Animales de experimentación	59
6.1.2 Líneas Celulares	59
6.2 EQUIPOS	59
6.3 REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS	61
6.4 MÉTODOS.....	65

6.4.1 Obtención y cultivo de progenitores neurales de cerebelo posnatal de ratón	65
6.4.2 Aislamiento de progenitores neurales de la zona subependimaria de cerebro de ratón adulto	66
6.4.3 Cultivos de la línea celular de neuroblastoma de ratón N2a	68
6.4.4 Videomicroscopia de time-lapse y seguimiento del comportamiento celular	68
6.4.4.1 Procesamiento de los datos	69
6.4.4.2 Seguimiento de célula única	69
6.4.5 Estudios de expresión génica	70
6.4.5.1 Extracción ARN	70
6.4.5.2 Determinación de la concentración y grado de pureza del ARN extraído	71
6.4.5.3 Retrotranscripción del ARN	71
6.4.5.4 PCR cuantitativa en tiempo real	71
6.4.6 Inmunotransferencia	72
6.4.6.1 Extracción de proteínas totales	72
6.4.6.2 Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de membranas	73
6.4.7. Inmunocitofluorescencia	74
6.4.8 Inmunohistofluorescencia	75
5.4.8.1 Obtención de secciones histológicas	75
6.4.8.2 Inmunohistofluorescencia	75
6.4.8.3 Sistema biotina-estreptavidina	76
6.4.9 Determinación microfluorimétrica de la concentración de calcio libre intracelular	76
6.4.10 Electrofisiología	78
6.4.11 Sobreexpresión de VNUT en la línea N2a	79
6.4.12 Inyecciones de vectores virales	79
6.4.12.1 Producción de lentivirus	79
6.4.12.2 Inyección estereotáxica	80
6.4.14. Análisis estadístico	81
7. RESULTADOS.....	83
7.1 LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA COMO MODULADOR DE LA NEUROGÉNESIS POSNATAL CEREBELOSA	85
7.1.1 Los progenitores neurales aislados del cerebelo mantienen su comportamiento neurogénico en ausencia de factores tróficos	85
7.1.2 Los progenitores neurales cerebelosos pierden su capacidad neurogénica a lo largo del desarrollo cerebelar	90
7.1.3 Los progenitores y NSCs aislados del cerebelo dan lugar a todas las poblaciones celulares generadas durante el desarrollo posnatal del mismo.	95
7.1.4 VNUT se expresa en el cerebelo posnatal y co-localiza con las NSCs del cerebelo	101
7.1.5 La inhibición del transportador VNUT induce cambios en el comportamiento de los progenitores neurales cerebelosos aislados a P0, pero no a P5	109
7.2 LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA COMO MODULADOR DE LA NEUROGÉNESIS DE LA SEZ ADULTA	116
7.2.1 Evaluación de la expresión de los receptores purinérgicos de tipo metabotrópico en la SEZ adulta	116
7.2.2 El receptor P2Y ₁₃ es funcional en las NSCs aisladas de la SEZ	123
7.2.3 El receptor P2Y ₁₃ se expresa predominantemente en las NSCs en estado primed	126
7.2.4 La activación del receptor P2Y ₁₃ promueve la activación y progresión en el linaje de las NSCs aisladas de la SEZ adulta	127
7.2.5 La modulación del receptor P2Y ₁₃ induce cambios en el comportamiento de las NSCs aisladas de la SEZ adulta: balance entre quiescencia y activación	132
7.2.6 Efecto del receptor P2Y ₁₃ sobre el modo de división de las NSCs: balance entre autorrenovación y diferenciación	134
7.2.7 La sobreexpresión in vivo del receptor P2Y ₁₃ en la SEZ adulta modula el comportamiento de las NSCs	139

8. DISCUSIÓN	145
8.1 LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA COMO MODULADOR DE LA NEUROGÉNESIS POSNATAL CEREBELOS.....	147
8.2 LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA COMO MODULADOR DE LA NEUROGÉNESIS DE LA SEZ ADULTA.....	153
9. CONCLUSIONES	153
10. BIBLIOGRAFÍA.....	163

1. ABREVIATURAS

2MeSADP: 2-(Metiltio)adenosina 5'-difosfato

5'-NT: Ecto-5'-nucleotidasa

5-HT: Serotonina

aa: Aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADP: Adenosín difosfato

AMP: Adenosín monofosfato

aNSCs: Células madre neurales activadas

AP: Fosfatasa alcalina

AR: Receptor de adenosina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

AT1: Receptor de angiotensina I

AT2: Receptor de angiotensina II

ATP: Adenosín trifosfato

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro

BLBP: Proteína de unión a lípidos cerebrales

BMP: Proteína morfogénica ósea

BSA: Albúmina de suero bovino

CAMKII: Calcio-calmodulina quinasa II

CP: Corteza cerebral

C-terminal: Extremo carboxilo terminal

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DBI: Inhibidor de la unión a diazepam

DCX: Doblecortina

DMEM: Del inglés: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DTT: Ditioneitol

EBSS: *Earl's Balanced Salt Solution.*

EGL: Capa granular externa

ENaC: canal de sodio epitelial

E-NPP: Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfoesterasas.

E-NTPDasas: Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas.

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

FBS: Suero fetal bovino.

FGF10: Factor de crecimiento de fibroblastos 10

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GCP: Progenitor de neuronas granulares

GFAP Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

GFAP: Proteína fibrilar ácida de glía

GFP: Proteína verde fluorescente

GLAST: Transportador de aspartato glutamato

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G

GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3

GTP: Guanosín trifosfato

HBSS: Del inglés: Hanks' Balanced Salt solution

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico

IGL: Capa granular interna	PCP: Progenitor de las neuronas de Purkinje
IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
IPC: Progenitor intermedio	PDL: Poli-D-Lisina
ITP: Inosin trifosfato	PEDF: Factor derivado de epitelio pigmentario
IZ: Zona intermedia	PFA: p-formaldehído
JNK: Quinasas c-jun N-terminal	PGE₂: prostaglandia E2
KDa: KiloDalton	PIP: progenitor de interneuronas GABAérgicas
KO: <i>Knockout</i>	PKC: Proteína quinasa C
LCF: Líquido ceforraquídeo	PLC: Fosfolipasa C
LIF: Factor inhibidor de la leucemia	PLL: Poli-L-Lisina
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos	PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ML: Capa molecular	pNSCs: Células madre neurales primed
M-MLV: Enzima transcriptasa inversa del virus de leucemia murina	PWM: Futura materia blanca
MOPS: Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico	qNSCs: Células madre neurales quiescentes
N2a: Células de neuroblastoma de murino 2a	Q-PCR: PCR cuantitativa o PCR a tiempo real.
NB: Medio de cultivo neurobasal	RG: Glía radial
NMDA: N-metil-D-aspartato	RL: Labio rómbico
NP40: Nonidet-P40	RMS: Vía migratoria rostral
NSC: Célula madre neural	RT-PCR: PCR con transcriptasa reversa.
OB: Bulbo olfatorio	SDS: Dodecil sulfato sódico
OCT: Del inglés: <i>Optimal Cutting Temperature</i>	SEM: Error estándar de la media.
OPC: Progenitor de oligodendrocitos	SEZ: Zona subependimaria
P1: Receptores purinérgicos de adenosina	SGZ: Zona subgranular
P2: Receptores purinérgicos de nucleótidos	Shh: Sonic hedgehog
PBS: Tampón fosfato salino	ShRNA: Del inglés: <i>Short hairpin RNA</i>
PCL: Capa de las neuronas de Purkinje	SLC: Familia de transportadores de soluto
	SNC: Sistema nervioso central

TAPs: Progenitores de amplificación

TBS: Tampón Tris-Borato salino

TEMED: Tetrametiletilenodiamina

TNAP: Fosfatasa alcalina específica de tejido

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

Tris: Tris(hidroximetil)-aminometano

UBCs: Células unipolares en cepillo

UDP: Uridina 5'-difosfato

UMP: Uridina 5'-monofosfato

UTP: Uridina 5'-trifosfato

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VGAT: Transportador vesicular de GABA

VGLUT: Transportador vesicular de glutamato

VNUT: Transportador vesicular de nucleótidos

VZ: Neuroepitelio del cuarto ventrículo

2. RESUMEN

La neurogénesis se define como la generación de nuevas neuronas funcionales a partir de las células madre neurales (NSCs). Éstas tienen, teóricamente, la capacidad de generar todos los tipos de células gliales y neuronales del sistema nervioso y de autorrenovarse en un número indefinido de veces sin perder su fenotipo y capacidad de diferenciarse (Gage, 2000, Weissman et al., 2001). Al final del desarrollo embrionario la mayoría de las neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC) están formadas. No obstante el proceso de neurogénesis continúa tanto en la etapa posnatal como adulta.

Numerosos grupos de investigación han tratado de identificar cuál es el comportamiento de las NSCs a lo largo de su progresión de linaje para dar lugar a las distintas poblaciones neurales así como elucidar cuáles son los mecanismos moleculares que controlan el proceso de la neurogénesis. Sin embargo, aún existen numerosos interrogantes por resolver. Entre ellos destacan: i) ¿Hasta qué punto las NSCs son dependientes de programas intrínsecos y/o de las señales provenientes de su nicho neurogénico a la hora de generar sus correspondientes linajes neurales? ii) ¿es una NSC capaz de dar lugar a los tres linajes neurales (astrocitos, oligodendrocitos y neuronas)? o ¿por el contrario presenta restricciones en la elección de su destino celular? iii) ¿Cuáles son las vías de señalización implicadas en la regulación del proceso de neurogénesis? En el presente trabajo pretendemos dar respuesta a algunas de estas cuestiones y analizar la implicación de la señalización mediada por nucleótidos en el comportamiento de las NSCs de dos nichos neurogénicos: el cerebelo posnatal y la zona subependimaria (SEZ) adulta.

Para ello, hemos puesto a punto un protocolo de cultivo de los progenitores posnatales de cerebelo aislados de dos estadios posnatales, P0 y P5, basado en nuestra experiencia previa en el cultivo de progenitores de la zona SEZ adulta murina, a muy baja densidad celular y en ausencia de factores tróficos (Costa et al., 2011, Ortega et al., 2011a). Este modelo, en combinación con la videomicroscopía de time lapse, ha permitido la monitorización del comportamiento de las NSCs, a nivel de célula única y de manera ininterrumpida, permitiéndonos la caracterización de sus árboles de linaje asociados y, por tanto, de su comportamiento en ausencia de las señales del nicho. La identificación de los fenotipos celulares se realizó mediante tinciones inmunocitoquímicas tras finalizar los experimentos, utilizando los siguientes marcadores: β -III tubulina (neuronas), GFAP (astroglia) y GFAP/SOX2 (NSCs). De esta manera hemos demostrado que los progenitores neurales cerebelosos mantienen su naturaleza neurogénica en ausencia de factores tróficos procedentes de su nicho neurogénico. Los progenitores cerebelosos dividen predominantemente de forma simétrica generando neuronas glutamatérgicas e interneuronas GABAérgicas funcionales en proporciones similares a las reportadas *in vivo* (Lackey et al., 2018, White and Sillitoe, 2013). Así mismo, hemos comprobado que las NSCs aisladas del cerebelo posnatal también son capaces de autorrenovarse mediante divisiones asimétricas. No obstante, a medida que se avanza en el desarrollo cerebelar, hemos observado que las NSCs pierden la capacidad de autorrenovación y tienden a adquirir un comportamiento más quiescente. Estos resultados indican que los progenitores neurales cerebelares tempranos podrían desarrollar una parte

considerable de su progresión de linaje de forma autónoma, en ausencia de las señales presentes en su correspondiente nicho, de manera análoga a lo descrito previamente en otros nichos neurogénicos como la corteza en desarrollo (Shen et al., 2006, Temple, 1989) o la SEZ adulta (Costa et al., 2011, Ortega et al., 2011a).

El modelo de cultivo desarrollado en este trabajo constituye, precisamente por su aislamiento del nicho, una herramienta útil para monitorizar cómo afectan al comportamiento de las NSCs, de manera individual, las diversas señales extrínsecas presentes en su entorno celular. En este sentido, los nichos neurogénicos además de ser regiones de formación de nuevas neuronas, reciben proyecciones neuronales de regiones adyacentes y lejanas por lo que la modulación de la neurogénesis a través de neurotransmisores y, en concreto, a través de la señalización purinérgica fue una de las líneas de investigación que se han abordado a lo largo de este trabajo. Nosotros hemos analizado el efecto de un inhibidor del transportador vesicular de nucleótidos VNUT, clodronato, sobre el comportamiento y linaje de los progenitores cerebelosos. Hemos demostrado que la modulación del transportador VNUT, resulta en un descenso del número de NSCs acompañado de un aumento en el número de árboles del linaje simétricos suprimiendo el proceso de autorrenovación. Los resultados obtenidos sugieren que VNUT podría regular el balance entre quiescencia y activación de las células madre, si bien la ventana de actuación parece estar restringida al estadio P0 posnatal.

En la segunda parte del presente trabajo hemos analizado la implicación de la señalización purinérgica en el proceso de neurogénesis en la SEZ adulta, concretamente hemos confirmado que el receptor P2Y₁₃ específico para ADP regula el comportamiento de las NSCs en cultivo. Hemos demostrado que el receptor P2Y₁₃ se expresa en la población de NSCs aisladas de la SEZ y, mayoritariamente, en las NSCs en estado *primed*. La activación del receptor P2Y₁₃ induce la entrada en ciclo celular de las NSCs y su progresión en el linaje, produciendo un aumento del número de clones complejos simétricos de cuatro y cinco rondas de división. Por el contrario, la presencia del antagonista del receptor P2Y₁₃, MRS2211, promueve que las NSCs permanezcan en estado quiescente. Además, la señalización mediada por el receptor P2Y₁₃ no sólo resulta en la activación de las NSCs sino que también reduce su capacidad de autorrenovación. Asimismo, hemos comprobado que la sobreexpresión del receptor *in vivo* induce la activación y la diferenciación de las NSCs de la región ventral de la SEZ murina. En conjunto, el P2Y₁₃ se postula como un potencial biomarcador de las pNSCs que podría regular su transición entre el estado quiescente y la diferenciación neuronal.

Los resultados aportados en este trabajo confirman el papel que juega la señalización mediada por nucleótidos en la neurogénesis posnatal del cerebelo y en la neurogénesis adulta en la zona subependimaria, sugiriendo dos posibles dianas farmacológicas el transportador VNUT y el receptor metabotrópico P2Y₁₃.

3. SUMMARY

Neurogenesis is defined as the generation of new functional neurons from neural stem cells (NSCs). These cells have the theoretical capacity to generate all glial and neuronal cell types of the nervous system and to self-renew an indefinite number of times without losing their phenotype and ability to differentiate (Gage, 2000, Weissman et al., 2001). By the end of embryonic development most of the neurons of the Central Nervous System (CNS) are formed. However, the process of neurogenesis continues in both the posnatal and adult stages.

Several studies have tried to identify the behavior of NSCs along their lineage progression to give rise to the different neural populations as well as to elucidate the molecular mechanisms that govern the process of neurogenesis. However, still many questions remain to be answered. Highlighted among them are: i) To what extent are NSCs dependent on intrinsic programs and/or signals from their neurogenic niche when generating their corresponding neural lineages? ii) Is an NSC capable of giving rise to the three neural lineages (astrocytes, oligodendrocytes and neurons) or, conversely, does it exhibit restrictions in the choice of its cell fate? iii) What are the signaling pathways involved in the regulation of the process of neurogenesis? In the present work we aim to answer some of these questions analysing the involvement of nucleotide-mediated signaling in the behavior of NSCs from two neurogenic niches: the posnatal cerebellum and the adult subependymal zone (SEZ).

To this end, we have developed a protocol for culturing posnatal cerebellar progenitors isolated from two posnatal stages, P0 and P5, based on our previous experience in culturing murine adult SEZ progenitors at low cell density and in the absence of trophic factors (Costa et al., 2011, Ortega et al., 2011a). This model, in combination with time-lapse videomicroscopy, allowed us to continuously monitor the behavior of NSCs, at a single cell level, enabling us to characterize their associated lineage trees and, therefore, their behavior in the absence of niche signals. The identification of cell phenotypes was performed by post-imaging immunocytochemical assays, using the following markers: β -III tubulin (neurons), GFAP (astroglia) and GFAP/SOX2 (NSCs). Thus, we have demonstrated that cerebellar neural progenitors maintain their neurogenic nature in the absence of trophic factors from their neurogenic niche. Cerebellar progenitors divide predominantly symmetrically generating glutamatergic neurons and functional GABAergic interneurons in similar proportions to those reported *in vivo* (Lackey et al., 2018, White and Sillitoe, 2013). Likewise, we have found that NSCs isolated from the posnatal cerebellum are also capable of self-renewal through asymmetric divisions. However, as cerebellar development proceeds, we observed that NSCs tends to lose the self-renewal capacity and acquiring a more quiescent behaviour. These facts are consistent with a considerable part of the lineage progression of cerebellar NSCs and progenitors being reproducible in the absence of their niche, as previously demonstrated for other neurogenic niches such as the developing cortex (Shen et al., 2006, Temple, 1989) or the adult SEZ (Costa et al., 2011, Ortega et al., 2011a).

The culture model developed in this work constitutes, precisely because of its isolation of the niche, a useful tool to monitor how the behavior NSCs is affected by each extrinsic signals present in their cellular environment, individually. In this sense, neurogenic niches, besides being regions of generation of new neurons, are also exposed to neuronal projections from adjacent and distant regions. Thus, the modulation of neurogenesis through neurotransmitters and, in particular, through purinergic signalling, was the main line of research addressed throughout this work. We analysed the effect of an inhibitor of the vesicular nucleotide transporter VNUT, clodronate, on the behavior and lineage of cerebellar progenitors. We have shown that modulation of the VNUT transporter results in a decrease in the number of NSCs accompanied by an increase in the number of symmetric lineage trees. VNUT inhibition also led to a reduction in the process of self-renewal. The results obtained suggest that VNUT could regulate the balance between quiescence and activation of stem cells, although the window of action seems to be restricted to the posnatal P0 stage.

In the second part of the present work we have analysed the involvement of purinergic signalling in the modulation of neurogenesis in the adult SEZ. Specifically, we have confirmed that the ADP-specific P2Y₁₃ receptor regulates the behaviour of NSCs *in vitro*. We have shown that the P2Y₁₃ receptor is expressed in the population of NSCs isolated from the SEZ, being particularly enriched in *primed* NSCs (pNSCs). Activation of the P2Y₁₃ receptor induces cell cycle entry of NSCs and their lineage progression, leading to an increase in the number of symmetric complex clones of four and five division rounds. In contrast, the presence of the P2Y₁₃ receptor antagonist, MRS2211, promotes NSCs to remain quiescent. Moreover, P2Y₁₃ receptor-mediated signalling not only results in the activation of NSCs but also reduces their self-renewal capacity. Furthermore, we found that overexpression of the receptor *in vivo* induces activation and differentiation of NSCs in the ventral region of the murine SEZ. Taken together, P2Y₁₃ is postulated as a potential biomarker of pNSCs that could regulate their transition between quiescent and neuronal differentiation.

The results provided in this work confirm the role of nucleotide-mediated signalling in posnatal neurogenesis in both the cerebellum and in the adult SEZ, suggesting two possible pharmacological targets, the VNUT transporter and the metabotropic receptor P2Y₁₃.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 La neurogénesis

La neurogénesis es el proceso por el cual se generan neuronas funcionales a partir de progenitores neurales denominados células madre neurales (NSCs). Se define teóricamente a una NSC como la célula que tiene la capacidad de generar todos los linajes celulares neurales (astrocitos, oligodendrocitos y neuronas) y puede autorrenovarse en un número indefinido de veces sin perder su fenotipo y su capacidad para diferenciarse (Gage, 2000, Weissman et al., 2001). Sin embargo, los linajes generados no tienen por qué producirse de forma directa a partir de las NSCs, sino que pueden originarse a partir de una o múltiples etapas de amplificación de los distintos precursores intermedios.

Las corrientes iniciales de pensamiento propusieron que las neuronas y las células gliales provenían de dos tipos de precursores distintos que se bifurcaban durante el desarrollo embrionario. De hecho, Rudolf Virchow sugería que las células gliales tenían un origen mesenquimal (His, 1889). Sin embargo, Wilhelm His concluyó que ambos tipos celulares provenían de dos tipos de poblaciones de progenitores, rechazando la teoría del origen mesenquimal de las células gliales (Rakic, 2003). Como consecuencia de estos estudios, se llegó a la conclusión que las células gliales se originaban a partir de lo que hoy conocemos como Glia Radial (RG), mientras que las neuronas derivaban de un tipo de progenitores especializados denominados neuroblastos (His, 1889, Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Sin embargo, gracias a posteriores investigaciones, se pudo demostrar que durante el desarrollo embrionario se genera una población principal de progenitores neurales, responsable de la formación de todos los tejidos neurales y capaces de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Este progenitor neural se denomina RG (Cameron and Rakic, 1991, Sidman and Rakic, 1973).

4.1.1 La glía radial y la neurogénesis temprana: origen y características principales

Durante el desarrollo embrionario, las células madre totipotentes de la masa celular interna del blastocisto forman el embrión, así como el trofoblasto, la lámina externa de células que formarán la placenta. Las células madre embrionarias son pluripotentes y son las responsables de la formación de las tres capas germinales del embrión: endodermo, mesodermo y ectodermo. Durante el proceso de neurulación, se producen una serie de invaginaciones en el ectodermo que forman el tubo neural donde residen los progenitores que originarán las NSCs. Dichos progenitores son células neuroepiteliales, que dividen simétricamente dando lugar a nuevas células neuroepiteliales en estado indiferenciado, incrementando así el reservorio de progenitores (Rakic, 1995). Basalmente, las células neuroepiteliales se unen a la superficie pial, mientras que apicalmente contactan con el lumen del tubo neural.

Hacia el día 9 de desarrollo embrionario (E9) en el ratón, las células neuroepiteliales sufren una serie de cambios que les llevan a transformarse en la RG. Estos cambios consisten en una disminución de las características epiteliales junto con un aumento de la longitud radial

y la expresión de marcadores astrogliales como el transportador de aspartato/glutamato (GLAST), la proteína de unión a lípidos cerebrales (BLBP) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Campbell and Gotz, 2002). Además, estas células adquieren filamentos intermedios y microtúbulos dentro de la fibra radial (Bruckner and Biesold, 1981, Choi and Lapham, 1978, Gadisseux and Evrard, 1985). Para que esta transformación de célula neuroepitelial a RG tenga lugar, es necesaria la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF10) así como del factor de transcripción Hes miembro de la familia bHLH (Gotz and Huttner, 2005).

Los cuerpos celulares de la resultante RG se disponen en la región que rodea los ventrículos laterales denominada zona ventricular (1970). En la parte apical de su membrana emana un cilio primario que constituye un orgánulo clave para el mantenimiento de la polaridad apico-basal.

4.1.2 Destino celular

Durante el desarrollo embrionario, la RG experimenta predominantemente divisiones asimétricas dando lugar a una copia de sí misma (autorrenovación) y a una célula hija que puede ser tanto una neurona como un progenitor intermedio (IPC) (Noctor et al., 2004). Estos IPCs a diferencia de la RG, experimentan mayoritariamente divisiones simétricas a través de las cuales generan dos neuronas o dos IPCs (Figura 1) (Haubensak et al., 2004, Miyata et al., 2004, Noctor et al., 2007). La determinación del destino celular ha sido asociada a los cambios en la duración del ciclo celular de la RG. En concreto, las divisiones neurogénicas están relacionadas con el aumento de la duración de la fase G1, mientras que la RG experimenta divisiones proliferativas, generando IPCs, cuando aumenta la duración de la fase S (Arai et al., 2011, Dehay and Kennedy, 2007).

Asimismo, el proceso de neurogénesis está también regulado por la formación de microentornos. Estos microentornos se caracterizan por la formación de diversos gradientes de señalización que inducen la expresión de distintos factores de transcripción, modulando el destino celular. Entre las vías de señalización principales se incluyen la vía de Wnt y la vía de Notch (Dorsky et al., 1997, Gaiano and Fishell, 2002, Silva et al., 2003, Zhang et al., 2008). Por un lado, la vía de Wnt potencia las divisiones asimétricas de la RG y favorece la formación de progenitores intermedios y diferenciación neuronal a través del aumento de la expresión de *N-myc*. Por otro lado, la vía de Notch mantiene la capacidad proliferativa, induciendo la expresión de los genes *Hes1* y *Hes5* los cuales bloquean la diferenciación celular mediante la represión de genes pro-neurales (Gaiano et al., 2000, Iso et al., 2003). Entre estos genes pro-neurales, reprimidos por Notch, se encuentran *Atoh1*, *Ascl1*, *Nuerog1* y *Neurog2* (Hatakeyama et al., 2004, Hatakeyama et al., 2001). Dicha represión además es crítica para el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación de la RG (Gaiano et al., 2000).

Asimismo, la formación de gradientes de señalización como los de Sonic hedgehog (Shh) o de morfógenos como las proteínas BMPs (Proteínas morfogénicas óseas) inducen la expresión de factores de transcripción como *Emx1*, *Sp8*, *Pax6*, *Gsh1*, *Gsh2*, *Dlx1*, *Dlx2*, *ER81* y *Olig2* (Hochstim et al., 2008, Long et al., 2009) junto con genes pro-neurales como *Ascl1* o *Ngn2*, determinando la especificidad de la célula generada por parte de la RG y los IPC (Guillemot, 2007).

A partir del día embrionario 17 y hasta el día posnatal (P0), la mayoría de RG comienza a transformarse en astrocitos. En este momento los somas de la RG se desplazan desde la zona ventricular hacia zonas más superficiales de la pared cerebral. En este periodo de tiempo, las fibras radiales de la RG comienzan a alargarse y a ramificarse, cambiando su morfología de bipolar a multipolar, adquiriendo así la morfología astrocítica (Mission et al., 1991).

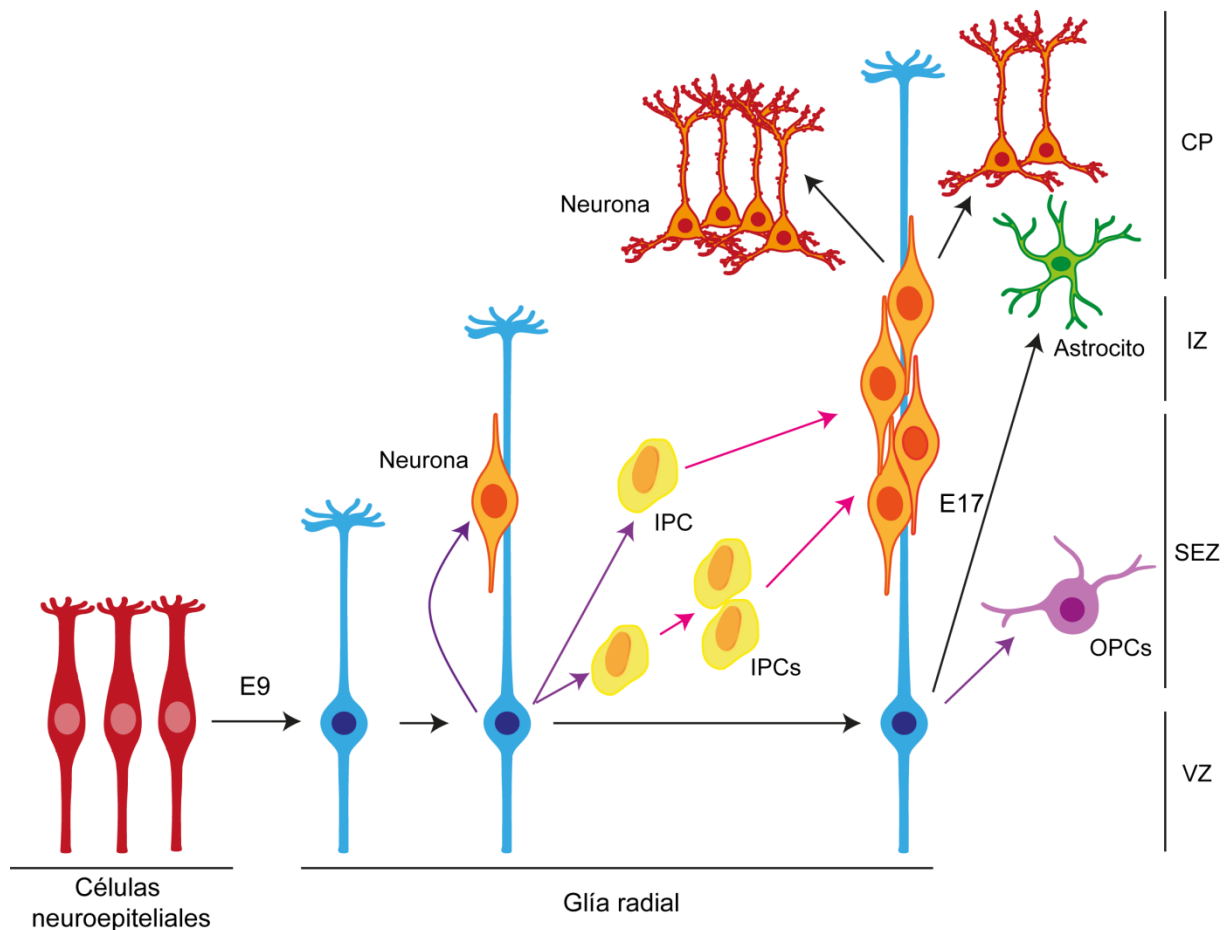


Figura 1. Desarrollo embrionario. Hacia el día E9 las células neuroepiteliales se transforman (flechas negras) en RG. La RG divide asimétricamente (flechas moradas) para dar una copia de sí misma, una neurona o un progenitor intermedio (IPC). Los IPCs dividen simétricamente (flechas magentas) para dar lugar a dos neuronas o a dos IPCs. Los progenitores de oligodendrocitos (OPCs) también se generan a partir de divisiones asimétricas de la RG. A partir del día E17 la mayoría de la RG se transforma en astrocitos. CP: corteza cerebral; IZ: zona intermedia, SEZ: zona subependimaria y VZ: zona ventricular.

Al finalizar el desarrollo embrionario, la mayoría de las neuronas que pueblan el sistema nervioso central (SNC) están formadas. Sin embargo, el proceso de neurogénesis no finaliza con el nacimiento, sino que continúa en la etapa posnatal, siendo uno de los máximos

exponentes de neurogénesis posnatal, el desarrollo del cerebelo. Asimismo, en el estadio adulto se mantiene un remanente de RG en varias localizaciones cerebrales donde continúa la neurogénesis adulta. Las principales zonas de neurogénesis adulta son la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (SGZ) y la zona subependimaria adulta (SEZ) en el ventrículo lateral. No obstante, aunque son muchos los estudios científicos centrados en el estudio del proceso de neurogénesis, existen todavía muchas preguntas sin resolver. Entre ellas podemos destacar aquí: i) ¿cuál es el comportamiento de las NSCs a la hora de dar lugar a su progenie?, ¿está este comportamiento programado de forma intrínseca en las NSCs?, ¿depende exclusivamente de las señales del microentorno neurogénico? o ¿es por el contrario una mezcla de ambos supuestos?, ii) ¿Cuál es la capacidad de un progenitor para generar distintos tipos celulares?, ¿puede un progenitor individual dar lugar tanto a linajes neuronales como gliales? O, por el contrario, ¿poseen los progenitores un destino restringido? Finalmente, iii) otro de los interrogantes se centra en identificar cuáles son las principales vías de señalización que pueden modular el proceso de la neurogénesis.

Referente a las dos primeras cuestiones, todavía existe un debate sobre el papel que tiene la señalización extrínseca e intrínseca. En cuanto a los progenitores de la SGZ, se ha señalado que su potencial de diferenciación está determinado por las señales del entorno (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009, Ming and Song, 2011). Sin embargo, en los progenitores de la SEZ la diferenciación celular parece estar más controlada por factores intrínsecos. De manera que, la producción de los diferentes tipos neuronales se da en regiones específicas del nicho (Brill et al., Hack et al., Merkle et al., 2007).

Atendiendo a la multipotencia de los progenitores neurales, numerosos estudios apuntan que en el desarrollo temprano co-existen progenitores que solo pueden generar neuronas o células gliales en ratones (Anthony et al., 2004, Battiste et al., 2007, Davis and Temple, 1994, Grove et al., 1993, Krushel et al., 1993, Luskin, 1993, Luskin et al., 1988, McCarthy et al., 2001, Mione et al., 1997, Price and Thurlow, 1988, Williams and Price, 1995, Wu et al., 2006). Sin embargo, otros estudios defienden que las células precursoras tienen la capacidad de generar tanto neuronas y astrocitos como neuronas y oligodendrocitos (He et al., 2001, Parnavelas et al., 1991, Reid et al., 1995, Walsh and Cepko, 1988, Walsh and Cepko, 1992, Williams et al., 1991, Yung et al., 2002, Ortega et al., 2013b, Ortega et al., 2013a). No obstante, se desconoce en detalle, qué factores inducen que una célula madre se diferencie, se autorrenueve, o escoja un destino celular concreto.

En consecuencia, la presente tesis se centrará en el estudio del comportamiento de los progenitores neurales de dos nichos neurogénicos y estadios distintos. Concretamente, se analizará el comportamiento de los progenitores neurales de cerebelo en la etapa posnatal y el comportamiento de los progenitores neurales en la SEZ adulta. Además, se prestará especial atención a la potencial modulación que la señalización purinérgica tiene sobre ambos escenarios neurogénicos.

4.2 El cerebelo

El cerebelo constituye una de las zonas más importantes y estudiadas del sistema nervioso central (Leto et al., 2016, Mathis et al., 1997, Sotelo and Wassef, 1991). Aunque el grado de desarrollo entre los vertebrados es distinto, es un área que está presente en todos ellos. Anatómicamente, el cerebelo conecta con el tronco cerebral a través de tres pedúnculos cerebelosos. El cerebelo participa en diversas funciones entre las que destaca el mantenimiento de la postura y el equilibrio. Además, es responsable de la modulación fina del movimiento. Este proceso implica la integración y el procesamiento de la información recibida a través de la aferencias propioceptivas y cognitivas, comparando el movimiento intencional con el que se está realizando (Hashimoto and Hibi, 2012, Ito, 2006). Aunque tradicionalmente, se ha considerado que el cerebelo sólo participaba en la coordinación motora, en los últimos años se ha sugerido el papel de éste en el procesamiento de emociones y la realización de tareas. De hecho, existen evidencias científicas que muestran una actividad diferente del cerebelo de pacientes sanos en comparación con pacientes con esquizofrenia, los cuales presentan una menor actividad cerebelosa en el procesamiento emocional (Mothersill et al., 2016). Lo mismo ocurre en los pacientes con autismo, en los que la activación del cerebelo relacionada con la atención fue menor que en los pacientes sanos (Allen and Courchesne, 2003). Así como en la demencia frontotemporal, donde se han evidenciado cambios estructurales y funcionales del cerebelo que inducen disfunciones cognitivas y de comportamiento (Chen et al., 2019).

4.2.1 Histogénesis del cerebelo

La morfogénesis del cerebelo da comienzo en torno al día embrionario 9 E(9) a partir de la región anterodorsal del romboencéfalo (Butts et al., 2014, Hatten and Heintz, 1995). En ese momento se generan dos zonas germinales, el neuroepitelio del cuarto ventrículo (VZ) y el labio róbico (RL), definidas por la expresión del factor de transcripción *Ptf1a* y *Atho1*, respectivamente (Miale and Sidman, 1961, Laine and Axelrad, 1994, Mugnaini and Floris, 1994) (Figura 2).

4.2.1.1 El neuroepitelio del cuarto ventrículo

El neuroepitelio del cuarto ventrículo es el nicho donde se originan todas las interneuronas GABAérgicas, las neuronas de Purkinje y las neuronas GABAérgicas de los núcleos cerebelosos. Para ello, se requiere la expresión del factor de transcripción *Ptf1a*, el cual define el linaje GABAérgico (Hoshino et al., 2005, Pascual et al., 2007, Zhang and Goldman, 1996).

Dentro del VZ se diferencian dos subpoblaciones de progenitores: los progenitores de las neuronas de Purkinje (PCPs) y los progenitores de las interneuronas GABAérgicas (PIPs). Mientras que los PCPs se caracterizan por la expresión de *Olig2*, los PIPs expresan selectivamente *Pax-2* (Leto et al., 2006, Maricich and Herrup, 1999). Durante las primeras etapas del desarrollo, el VZ está poblado en su mayoría por PCPs, mientras que sólo se

detecta una pequeña proporción de PIPs en la zona rostral. Sin embargo, a medida que avanza el desarrollo se induce la formación de PIPs a partir de PCPs. Este proceso está regulado por la expresión del factor de transcripción *Gsx1* (Seto et al., 2014). Los PIPs son los progenitores responsables de generar en los días E10,5 y E13,5, las neuronas de proyección de los núcleos profundos y las células de Golgi, respectivamente (Leto et al., 2016). La expansión de estas poblaciones de neuronas GABAérgicas está potenciada por la señalización de Shh. Este mitógeno llega al VZ a través del líquido cerebroespinal y es secretado por el plexo coroideo (Huang et al., 2010).

Simultáneamente, los PCPs generan las neuronas de Purkinje, las cuales migran, a continuación, radialmente desde la pared del ventrículo hacia la corteza cerebelosa, formando la capa celular de Purkinje (Xu et al., 2013, Altman and Bayer, 1978, Hibi and Shimizu, 2012). Curiosamente, son las primeras células cerebelosas que comienzan a migrar tras su diferenciación (Beckinghausen and Sillitoe, 2019).

No obstante, en el VZ no sólo se generan neuronas, sino que también se produce una población de oligodendrocitos, la glía de Bergmann y astrocitos. Estos último se generan en torno al día E10,5, coincidiendo con el comienzo de la señalización de Notch, que induce la diferenciación hacia el linaje astrogial.

4.2.3 El labio rúbico

En el labio rúbico se generan los precursores de los tres tipos de neuronas glutamatérgicas que pueblan el cerebelo. Para que se forme dicho nicho neurogénico es necesaria la señalización de la proteína BMP, la cual induce la expresión del factor de transcripción *Atoh1*. Dicho factor es el único gen requerido para la formación de las neuronas glutamatérgicas que derivan del labio rúbico (Englund et al., 2006, Machold and Fishell, 2005, Wang et al., 2005, Wingate, 2001).

Las primeras neuronas glutamatérgicas que se generan durante el desarrollo embrionario son las neuronas de proyección glutamatérgicas de los núcleos cerebelosos. Éstas originadas en torno al día E10,5, migran hacia la zona transitoria nuclear hasta el día E12,5 (Haldipur et al., 2018). Seguidamente se generan los progenitores de las neuronas granulares, los cuales migran tangencialmente hacia la corteza cerebelosa y se disponen por encima de las neuronas de Purkinje, formando la capa granular externa (EGL) (Parmigiani et al., 2015), que cubre toda la superficie cerebelosa en torno al día E15 (Altman and McCrady, 1972, Altman and Bayer, 1997, Chung et al., 2010, Sotelo, 2004). Sin embargo, no es hasta etapas más tardías (E16) cuando se generan los progenitores de las células unipolares en cepillo (UBCs), que pueden seguir generándose en la etapa posnatal (P0-1). Para la formación de estas neuronas glutamatérgicas es imprescindible la expresión del factor de transcripción *Pax6* (Yeung et al., 2016). Una vez generadas, los progenitores de las UBCs abandonan el labio rúbico y migran dorsalmente hacia la capa granular interna (IGL) a través de la futura materia blanca (PWM). En torno al día P2 comienzan a diferenciar y alcanzan la capa

granular interna en el día P10 (Englund et al., 2006). No obstante, la diferenciación de las UBCs continúa hasta el día P28 (Figura 2) (Morin et al., 2001 2001).

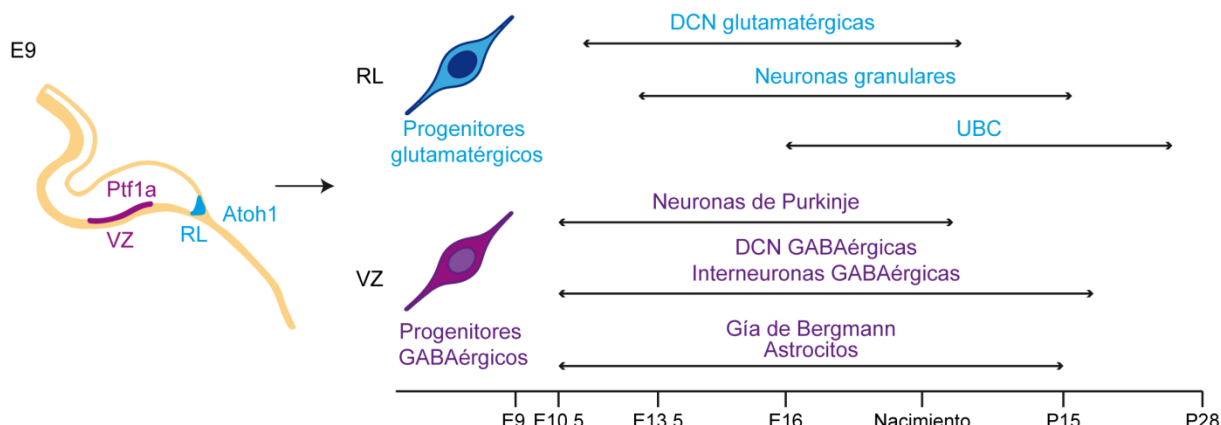


Figura 2. Desarrollo embrionario y posnatal del cerebelo. En el día embrionario E9 a partir de la región anterodorsal del romboencéfalo se generan dos nichos neurogénicos: el labio rúbico (RL) y el neuroepitelio del cuarto ventrículo (VZ). A partir de los progenitores del RL se van a generar las distintas neuronas glutamatergicas que pueblan el cerebelo, mientras que a partir de los progenitores del VZ se generarán las neuronas de Purkinje, las interneuronas GABAérgicas y las células de naturaleza glial. El desarrollo del cerebelo continúa en el estadio posnatal hasta el día P28 cuando se alcanza la citoarquitectura definitiva.

4.2.2 Desarrollo posnatal del cerebelo

Tras el nacimiento, las zonas germinales RL y VZ desaparecen. Sin embargo, el cerebelo presenta la particularidad de realizar la mayor parte de su desarrollo en la etapa posnatal, continuándose la morfogénesis cerebelar en tres zonas proliferativas diferenciadas: la capa granular externa, la capa de las neuronas de Purkinje y la capa de futura materia blanca (Altman and Bayer, 1997, Leto et al., 2016).

4.2.2.1 La capa granular externa

En la capa granular externa se disponen los progenitores de las neuronas granulares *Atoh1*⁺, (GCP) los cuales continúan proliferando en la superficie generando una capa externa de 6-8 células de grosor, mostrando un pico de proliferación entorno al día posnatal 7. Dicha expansión está inducida por el mitógeno Shh, el cual es liberado por las neuronas de Purkinje (Wallace, 1999). Shh induce la expresión de genes como *Gli2*, que asegura la correcta expansión de los progenitores de las neuronas granulares. Además, Shh a través de la sobreexpresión de *ciclina D1*, *D2* y de *N-myc* promueve la proliferación celular, activando la entrada al ciclo celular y la replicación del ADN (De Luca et al., 2016). Una vez terminada la expansión, se produce la salida de ciclo de los progenitores junto con una disminución de los niveles de *Atoh1*. Simultáneamente, las neuronas granulares comienzan a expresar el factor *p27*, que es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina, provocando una desensibilización de las neuronas granulares a la actividad del mitógeno Shh (Durand et al., 1998, Miyazawa et al., 2000).

Por otro lado, en los GCP se inicia la expresión del factor de transcripción *NeuroD1*, el cual promueve su diferenciación hacia neuronas granulares postmitóticas (Miyata et al., 1999). Éstas migran radialmente a través de las prolongaciones de la glía de Bergmann y atraviesan la capa de las neuronas de Purkinje, formando la capa granular interna (van Essen et al., 2020), donde se diferencian totalmente a neuronas granulares maduras (Rakic, 1971). Con respecto a esta migración, se ha demostrado que la Semaforina 6A puede ser determinante en el inicio de la migración de las neuronas granulares (Kerjan et al., 2005). Además, los factores de crecimiento VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular) y BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro) también participan en el proceso de migración siendo incluso secretados por las propias neuronas granulares o por la glía de Bergman (Zhou et al., 2007).

Entre todas las neuronas que se generan durante el desarrollo del cerebelo, las neuronas granulares son las últimas en diferenciarse y alcanzar su posición. De hecho, hasta el día P15 no se disponen la totalidad de las neuronas en la capa granular interna, y no es hasta el día P21 cuando desaparece la capa granular externa (Altman and Bayer, 1997, Xu et al., 2013).

4.2.2.2 La capa de neuronas de Purkinje

Inmediatamente por debajo de la capa granular externa se encuentra la capa de las neuronas de Purkinje. En ella se localiza, aparte claro está de las propias neuronas de Purkinje, la glía de Bergmann, un tipo de astrocitos unipolares que derivan de la RG. Estos progenitores se generan en la zona ventricular en torno al día E13,5. A partir del día E15 comienzan a migrar hacia la capa de las neuronas de Purkinje a través de la PWM (Futura materia blanca), proceso que termina en el día P7 cuando alcanzan su destino y se disponen entre los cuerpos celulares de las neuronas de Purkinje (Yamada and Watanabe, 2002). La glía de Bergmann es necesaria para la correcta migración de las neuronas granulares hacia la capa granular interna. De hecho, durante la segunda semana de desarrollo posnatal se produce un incremento de sus fibras coincidiendo con el pico de proliferación y migración de los progenitores de las neuronas granulares. Además, está demostrado que la glía de Bergmann también participa, junto con las neuronas de Purkinje, en la potenciación de la proliferación y diferenciación celular a través de la señalización de Shh (Araujo et al., 2019). Asimismo, se ha sugerido que la glía de Bergmann podría comportarse como un progenitor de otros tipos celulares en el cerebelo adulto, ya que expresa marcadores de NSCs como SOX1 y SOX2.

4.2.2.3 Futura materia blanca

Adyacente a la capa granular interna naciente se encuentra la PWM. En esta capa se disponen los progenitores de las interneuronas GABAérgicas Pax2⁺ (PIPs), procedentes del VZ, los progenitores de los linajes astrogliales, así como células en proceso de maduración (Leto and Rossi, 2012, Leto et al., 2012). Entre las células que experimentan este proceso de maduración se encuentran las neuronas de proyección de los núcleos profundos y las células

de Golgi, generadas durante el desarrollo embrionario en el VZ. Sin embargo, durante la primera semana de desarrollo posnatal, también se siguen formando nuevas neuronas de proyección de los núcleos profundos y células de Golgi. Esta etapa coincide con un pico de proliferación inducido por la acción de Shh (Huang et al., 2010), así como con el comienzo de la generación del resto de interneuronas GABAérgicas, entre las que se encuentran las células de Lúgaro, las células estrelladas y las células en cesta unipolares (Leto et al., 2006, Sudarov et al., 2011, Weisheit et al., 2006).

Las células de Golgi son las primeras interneuronas en abandonar la PWM hacia la capa granular interna, alcanzándola en el día P4. Simultáneamente, las células de Lúgaro también migran hacia la capa granular interna y se disponen en su parte superior en torno al día P5 (Leto et al., 2016). Por último, las células estrelladas y las células en cesta unipolares abandonan la PWM hacia la capa molecular. Para ello atraviesan la PWM, la capa granular interna y la capa de las neuronas de Purkinje. Finalmente, estas interneuronas alcanzan su destino en la corteza cerebelosa en torno al día P16 (Galas et al., 2017).

Si bien, en la PWM también se disponen progenitores astrogiales procedentes del VZ. Éstos por la acción de Shh proliferan y se diferencian hacia astrocitos en la etapa posnatal. Después estos astrocitos generados migran hacia la capa granular interna o se disponen en la sustancia blanca (Fleming et al., 2013, Huang et al., 2010). Además, en la PWM, cabe destacar la presencia de un tipo de progenitor que difiere de los progenitores que se encuentran en la capa de las neuronas de Purkinje, los cuales generan predominantemente glía de Bergman. Estos progenitores proliferan mucho menos que los de la capa de las neuronas de Purkinje, pero son capaces de generar tanto interneuronas GABAérgicas como astrocitos de la materia blanca (Parmigiani et al., 2015).

Igualmente existe una población de progenitores de oligodendrocitos en la PWM que derivan de progenitores $Olig2^+$ en la VZ en torno al día E13.5 (Sudarov et al., 2011, Zhang et al., 2011). No obstante la mayoría de los oligodendrocitos provienen de OPCs de naturaleza extracerebelosa que colonizan el cerebelo durante el desarrollo embrionario (Grimaldi et al., 2009).

4.2.3 La corteza cerebelosa

Alcanzado el día P21, el desarrollo posnatal del cerebelo finaliza, generándose como resultado la corteza cerebelosa adulta. Ésta presenta una estructura trilaminar a lo largo de la cual se disponen las células generadas durante el desarrollo de cerebelo. La corteza cerebelosa está formada de la zona más externa a la más interna por la capa molecular, la capa de las neuronas de Purkinje y la capa de las neuronas granulares (Cerminara et al., 2015) (Figura 3).

La capa molecular la integran los axones de las neuronas granulares que forman sinapsis con las arborizaciones dendríticas de las neuronas de Purkinje a través de las fibras paralelas. En esta capa también se encuentran las interneuronas en cesta y estrelladas. Estas últimas

establecen contactos sinápticos con las dendritas distales de las neuronas de Purkinje. Además, estableciendo contactos axo-dendríticos con las neuronas de Purkinje se distinguen los terminales de las fibras trepadoras, proveniente de núcleo de la oliva inferior localizada en el bulbo raquídeo y las prolongaciones distales de la glía de Bergman (McKay et al., 2007).

La capa de las neuronas de Purkinje está formada por la disposición ordenada de los somas de dichas células, entre los cuales se dispone la glía de Bergmann. Los axones de las neuronas de Purkinje descienden hacia la sustancia blanca y los núcleos profundos cerebelosos (Cerminara et al., 2015, Roostaei et al., 2014).

La capa de las neuronas granulares alberga los somas de las neuronas granulares, que forman los denominados glomérulos cerebelosos al establecer sinapsis a través de sus dendritas con los axones de las interneuronas de Golgi y con los terminales glutamatérgicos de las fibras musgosas. Además, en esta capa también se disponen los somas de las interneuronas de Lúgaro y de las células unipolares en cepillo (Cajal, 1899, Palkovits et al., 1971, Ito et al., 1984, Schmähmann and Pandya, 1997, D'Angelo, 2011).

Una vez alcanzada la mencionada citoarquitectura del cerebelo adulto, los tres nichos proliferativos desaparecen. Aunque se ha descrito la presencia de NSCs en el cerebelo adulto (Klein et al., 2005), no existen evidencias científicas que sugieran una neurogénesis constitutiva en el cerebelo adulto (Altman and Das, 1966). Si bien, no puede descartarse procesos neurogénicos en respuesta a determinados estímulos y/o daño celular (Ahlfeld et al., 2017, Salih et al., 2022).

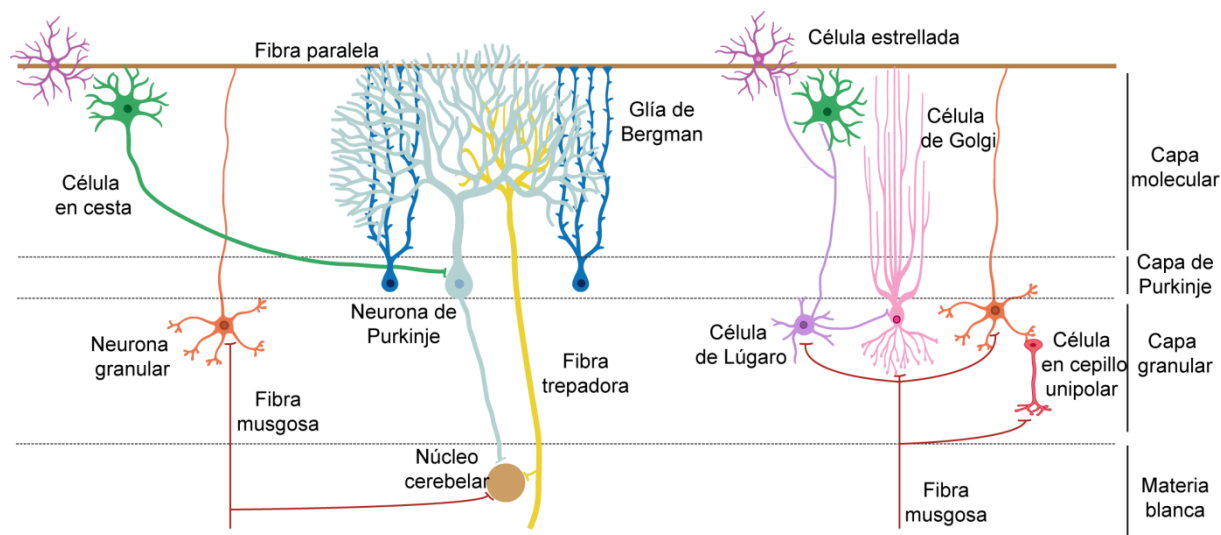


Figura 3. Esquema de la citoarquitectura de la corteza cerebelosa. Se muestran las tres capas de la corteza cerebelosa: la capa molecular, la capa de neuronas de Purkinje y la capa molecular. A través de las fibras musgosas y trepadoras llegan a la corteza cerebelosa las señales excitadoras. Las fibras musgosas sinaptan con las células granulares, mientras que las fibras trepadoras sinaptan con las neuronas de Purkinje.

4.3 La neurogénesis en el cerebro adulto

La neurogénesis adulta fue ignorada por la comunidad científica durante más de 100 años, a pesar de que existían numerosas evidencias que indicaban la formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto. En la década de los sesenta, Altman y colaboradores describieron por primera vez la formación de nuevas neuronas marcando las células en división con [³H]-thimidina y trazando el destino celular. Asimismo, identificaron la formación de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio y en el hipocampo basado únicamente en criterios morfológicos (Altman and Das, 1966). Pero no fue hasta 1990, cuando se propusieron por primera vez los dos nichos neurogénicos en los que tenía lugar el proceso de neurogénesis adulta: **la zona subependimaria de los ventrículos laterales** (Doetsch et al., 1999a, Doetsch et al., 1997, Imayoshi et al., 2008) y **la zona subgranular del giro dentado del hipocampo** (Gould and Cameron, 1996, Kempermann et al., 1997). En ambos nichos queda un remanente de RG que continúa proliferando en la etapa adulta generando nuevas neuronas (Gage, 2002, Alvarez-Buylla and Lim, 2004, Nottebohm, 2004, Ming and Song, 2005, Obernier and Alvarez-Buylla, 2019). Aunque la SEZ y la SGZ sean los dos nichos principales donde se da la neurogénesis adulta, se han descrito otras zonas del SNC donde también tiene lugar. Estas zonas son: la sustancia nigra (Zhao et al., 2003) , el hipotálamo (Evans et al., 2002), la médula espinal (Horner et al., 2000) , la amígdala (Bernier et al., 2002), el estriado (Shapiro et al., 2009, Suzuki and Goldman, 2003) o el bulbo olfatorio (Liu and Martin, 2003, Moreno-Estelles et al., 2012, Pagano et al., 2000), donde se generan nuevas neuronas *in vivo*. Asimismo, se han aislado progenitores multipotentes en la corteza cerebral tras una lesión (Buffo et al., 2008, Sirko et al., 2013). No obstante, la neurogénesis en estas localizaciones es menos robusta que la que tiene lugar en los dos nichos principales.

La SEZ y la SGZ están compuestos por una diversidad de estructuras y poblaciones celulares como neuronas, proyecciones axonales, astrocitos y vasos sanguíneos, creando un ambiente que mantiene las NSCs en estado quiescente e indiferenciado (Morrison and Spradling, 2008). Asimismo, aportan una variedad de señales que pueden modular el comportamiento de las células madre, manteniendo la homeostasis y regulando su proliferación, diferenciación, autorrenovación y destino celular (Fuchs et al., 2004, Blank et al., 2008, Faigle and Song, 2013).

A diferencia del desarrollo embrionario en el que todo el proceso de proliferación, diferenciación y migración siguen un patrón temporal, los pasos de la neurogénesis adulta ocurren de manera paralela, como describiremos a continuación.

4.3.1 La zona subgranular

La zona subgranular está localizada en el giro dentado del hipocampo. Esta zona despierta mucho interés científico debido a la implicación del hipocampo en funciones cognitivas, procesos de memoria y comportamiento (Kheirbek and Hen, 2011, Brooker et al., 2017, Toda and Gage, 2018). El giro dentado del hipocampo está formado por tres capas: la capa

molecular, la capa granular y la zona subgranular. En esta última nacen nuevas neuronas inmaduras a partir de los progenitores neurales. Estos progenitores se conocen con el nombre de células tipo 1, las cuales se encuentran en estado quiescente. Las células tipo 1 presentan un soma triangular y un proceso apical largo. Dicho proceso proyecta dentro de la capa granular y se ramifica cuando se interna en la capa molecular interna (Llorens-Martin et al., 2015). Estos progenitores expresan distintos marcadores como SOX2, nestina o GFAP (Fukuda et al., 2003, Garcia et al., 2004, Suh et al., 2007). Sin embargo, aunque expresan GFAP, son diferentes de los astrocitos maduros tanto funcional como morfológicamente. Además, expresan el factor de transcripción *Hes5*, el cual bloquea la maduración de los progenitores manteniéndolos en estado indiferenciado (Ables et al., 2010, Goncalves et al., 2016, Abbott and Nigussie, 2020). Las células tipo 1 generan los progenitores intermedios denominados células tipo 2, las cuales tienen una gran actividad proliferativa en comparación con las células de las que proceden. A diferencia de las células tipo 1, las células tipo 2 presentan prolongaciones celulares cortas orientadas tangencialmente hacia la zona subgranular y no expresan GFAP. Sin embargo, siguen manteniendo la expresión de SOX2 y nestina. Dentro de las células tipo 2 se diferencian dos subtipos: las células tipo 2a y las células tipo 2b. Morfológicamente, ambas células son similares y expresan nestina. Sin embargo, las células tipo 2b ya no proliferan y comienzan a expresar genes relacionados con la especificación celular, como doblecortina (DCX) (Goncalves et al., 2016, Sanchez-Huerta et al., 2016) (Figura 4).

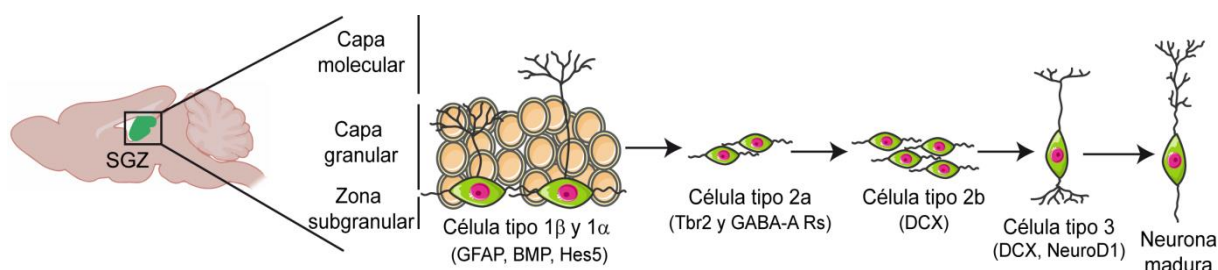


Figura 4. Neurogénesis en la zona subgranular (SGZ). Las células de tipo 1α generan los progenitores intermedios que se denominan células de tipo 2a. Estas proliferan hasta que generan las células tipo 2b, las cuales no proliferan y comienzan a expresar genes de especificación celular. Las células tipo 2b se diferencian hacia las células de tipo 3 que comienzan a diferenciarse hacia neuronas inmaduras. Estas últimas maduran y se integran en las conexiones hipocámpales pre-existentes.

Si las condiciones locales son favorables, las células tipo 2b sobreviven y comienzan a diferenciarse hacia neuroblastos también conocidos como células tipo 3. Dichas células siguen manteniendo la expresión de DCX, pero no expresan nestina (Sanchez-Huerta et al., 2016). A su vez, comienzan a expresar genes asociados con las neuronas granulares dentadas como *Trb2*, *NeuroD1* o *Prox1* (Goncalves et al., 2016, Llorens-Bobadilla et al., 2015). La inhibición de la expresión de dichos factores produce la disminución de la diferenciación neuronal en la zona subgranular (Gao et al., 2009, Kuwabara et al., 2009, Lavado et al., 2010). Las células tipo 3 modifican su orientación con sus dendritas proyectando dentro de la capa molecular dentada y los axones innervando tanto el hilo dentado como la capa celular piramidal CA3 (Danzon et al., 2008). En ese momento las

células tipo 3 comienzan a recibir señales de las neuronas musgosas hiliares, las cuales son neuronas glutamatérgicas. Asimismo, las células tipo 3 son innervadas por fibras colinérgicas procedentes del núcleo de la banda diagonal de Broca y de los núcleos septales (Deshpande et al., 2013). Durante la fase de maduración, los árboles dendríticos adquieren una mayor complejidad y son innervados por la corteza entorrinal, completando así la integración de las nuevas neuronas en el circuito hipocampal pre-existente donde se diferencian hacia neuronas granulares glutamatérgicas (Deshpande et al., 2013, van Praag et al., 2002).

Las células de tipo 1 no sólo generan neuronas, existe un porcentaje de progenitores que son multipotentes (Bonaguidi et al., 2011). De hecho, se ha revelado que las células de tipo 1 se dividen a su vez en dos tipos de células: las células tipo α y tipo β . Las células tipo α son las más abundantes en la SGZ y se caracterizan por una larga prolongación apical con una pequeña arborización de prolongaciones celulares secundarias que se adentra en el primer tercio de la capa molecular. Las células de tipo β se encuentran en una menor proporción y presentan una prolongación radial corta cuyas arborizaciones secundarias solo llegan a la capa granular. Además, mientras que las células de tipo α pueden generar astrocitos, neuronas, células de tipo β y autorrenovarse, las células de tipo β no proliferan (Gebara et al., 2016). Sin embargo, en condiciones fisiológicas estos progenitores no son capaces de generar oligodendrocitos (Steiner et al., 2004). En cuanto a las señales que regulan el proceso de neurogénesis en la SGZ, se ha señalado que la vía de Wnt/ β -catenina está muy activa en esta región. De modo que el bloqueo de la señalización de Wnt inhibe la neurogénesis *in vivo* e *in vitro* (Lie et al., 2005, Steiner et al., 2004).

4.3.2 La zona subependimaria

La zona subependimaria localizada en las paredes lateral y dorsal de los ventrículos laterales es el nicho germinal más grande en el cerebro adulto murino. Las neuronas generadas en esta zona migran hacia el bulbo olfatorio a través de la vía migratoria rostral donde se diferencian y sustituyen a las interneuronas locales, contribuyendo a la discriminación de olores, así como la asociación olor-recompensa (Grelat et al., 2018, Li et al., 2018, Lledo and Saghatelian, 2005).

4.3.2.1 Origen de la SEZ

Durante el desarrollo embrionario, la pared de los ventrículos laterales está compuesta por un área pseudoestratificada que pasa a formar un epitelio en el cerebro adulto. Dicho epitelio está compuesto por dos tipos de células denominadas células endimarias cuboidales (E1) y células B1 pseudoestratificadas. Ambas células tienen un origen común, ya que ambas son producidas por la RG que divide durante el desarrollo fetal. Sin embargo, la proporción de las células B1 y E1 varía a lo largo de los ejes antero-posterior y dorso-ventral de la pared lateral (Mirzadeh et al., 2008, Obernier and Alvarez-Buylla, 2019).

A través de experimentos de seguimiento de célula única se ha observado que las RG divide dando lugar a clones que contienen células E1 o células B1, así como una combinación de ambos tipos celulares. No obstante, existe una población de RG que no muestra este carácter bipotente y solo genera células E1 (Redmond et al., 2019).

En la etapa posnatal temprana, la RG localizada en la pared lateral de los ventrículos retracta su proceso distal y da lugar a las células pre-B1. Estas células expresan la proteína de adhesión VCAM1 en las prolongaciones apicales, la cual parece ser crucial para el mantenimiento de las células madre, ya que la inhibición de la expresión de dicha proteína con shRNA o el bloqueo con anticuerpos induce la disminución del número de células madre a través de la potenciación de la diferenciación celular (Kokovay et al., 2012). En la etapa embrionaria, estas células pre-B1 se mantienen en estado quiescente mediante el aumento del regulador del ciclo celular $p57^{kip2}$ y se activan en la etapa posnatal dando lugar a las células B1 (Fuentealba et al., 2015, Furutachi et al., 2015, Yuzwa et al., 2017).

4.3.2.2 Las células endimarias

Las células endimarias (células E) son células posmitóticas multiciliadas que impulsan el líquido cefalorraquídeo a lo largo del sistema ventricular (Carlen et al., 2009, Mirzadeh et al., 2010, Sawamoto et al., 2006), Spassky et al. (2005). Dichas células se encuentran en la superficie de la pared ventricular junto con las células B1. Primeramente, se sugirió que las células E se comportaban como NSCs (Johansson et al., 1999). Sin embargo, a través del análisis de transcriptoma de célula única y del linaje, se ha confirmado que las células E no muestran propiedades de células madre (Shah et al., 2018). Por el contrario, estas células si son capaces de regular la neurogénesis a través de ANKYRIN3, una proteína adaptadora que está localizada en las uniones apicolaterales de las células E. Cuando se produce una disminución de la expresión de ANKYRIN3, la capa de las células E se altera reduciendo la neurogénesis, ya que la función de las células B1 como progenitoras neurales depende, en gran medida, de la integridad de esta capa celular (Paez-Gonzalez et al., 2011).

4.3.2.3 Las células B1 y su progenie

Las células B1 son las responsables de la formación de neuronas y células gliales en el cerebro adulto (Figura 5). Estas células se conocen como células mono-ciliadas $CD133^+$ (Beckervordersandforth et al., 2010) y se caracterizan por la expresión de diversos marcadores gliales como GFAP, GLAST y la proteína BLBP. En su parte apical, las células B1 poseen un orgánulo denominado cilio primario, responsable de la transmisión de señales extracelulares al interior de la célula. Este cilio primario expresa prominina 1 y contacta con el líquido cefalorraquídeo. El dominio apical además está rodeado de una superficie de células endimarias formando estructuras en molinillo o *pinwheel* (Chaker et al., 2016). En la parte basal las células contactan con los vasos sanguíneos (Mirzadeh et al., 2008).

Las células B1 generan a su vez a los progenitores intermedios de amplificación también conocidos como células C o TAPs (Doetsch et al., 1999b). Como señalan diferentes estudios

in vitro, estas células B1 pueden dividir tanto simétrica como asimétricamente, para generar dos células C o nuevas copias de sí mismas respectivamente (Costa et al., 2011, Ortega et al., 2011a). El factor de transcripción SOX2 juega un papel muy importante en el proceso de autorrenovación, de hecho, el déficit de PRX1, co-activador de SOX2, impide la autorrenovación de las células B1 (Ellis et al., 2004, Shimosaki et al., 2013).

Mientras que las células B1 son progenitores de división lenta, las células C hijas exhiben una división rápida. Además, a diferencia de las células B1, se caracterizan por la expresión de los factores de transcripción *Ascl1* y *Dlx2* y muestran prolongaciones cortas. No obstante, tanto las células B1 activadas como las células C expresan el receptor de EGF (Pastrana et al., 2009). Las células C generan a su vez las células A o neuroblastos tras dividir simétricamente una media de entre tres y cuatro veces (Costa et al., 2011, Ortega et al., 2011a, Ponti et al., 2013). Estas células A, caracterizadas por la expresión de DCX y la molécula de adhesión celular PSA-NCAM, pueden dividir una o dos veces mientras migran a través de la vía migratoria rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio donde se diferencian a interneuronas GABAérgicas o glutamatérgicas y se integran en los circuitos pre-existentes (Brill et al., 2009, Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996, Lois and Alvarez-Buylla, 1994, Lois et al., 1996, Luskin, 1993). Dentro de los neuroblastos se han diferenciado dos subpoblaciones, una de ellas está compuesta por los neuroblastos tempranos que continúan proliferando, mientras que la otra subpoblación está formada por los neuroblastos tardíos que ya han perdido la capacidad proliferativa, pero han adquirido la capacidad de migración (Belenguer et al., 2021a, Belenguer et al., 2021b).

Se considera que la mayoría de las células B1 dividen simétricamente (Calzolari et al., 2015). De hecho, se estima que el 70-80% de las células B1 dividen simétricamente generando células C y reduciendo el número de NSCs a lo largo del tiempo. No obstante, parece existir una población de células B1 (20-30%) que se autorrenuevan a través de divisiones simétricas. Tras la autorrenovación, las nuevas células B1 pueden mantenerse quiescentes en la SEZ durante más de 16 semanas o reactivarse y dividir simétricamente para progresar en el linaje, generando nuevas células C (Obernier et al., 2018). Atendiendo a la morfología celular, se ha observado que las NSCs pierden la prolongación basal antes de dividir y formar las células C, mientras que las NSCs que van a dividir simétricamente para autorrenovarse no pierden esa prolongación (Obernier et al., 2018). Debido al alto porcentaje de células B1 que progresan en el linaje, tras el primer año de vida de los murinos, el número de células B1 sufren una reducción drástica. Sin embargo, aunque el número de nuevas neuronas también va decayendo a lo largo del tiempo, esta depleción no es tan drástica como la de las células B1. De hecho, el número de neuronas en el bulbo olfatorio no se ve afectado por la edad, lo que sugiere la existencia de una segunda población de células madre en el cerebro adulto del ratón (Obernier et al., 2018). Esta segunda población podría ser el pool de NSCs que se autorrenuevan a través de divisiones simétricas. Sin embargo, también se ha propuesto una población de NSCs que dividen asimétricamente responsables del mantenimiento del bulbo

olfatorio (Calzolari et al., 2015). Todo ello, sugiere la co-existencia de distintos tipos de NSCs en la SEZ.

Además, las células B1 no sólo producen neuronas, sino que pueden generar células B2 (Obernier et al., 2018). Estas células B2 representan una población de astrocitos proliferativos, cuya función es todavía desconocida (Doetsch et al., 1997). Una posible hipótesis señala que estas células B2 podría ser la población de reserva de NSCs tras la disminución de las células B1, que mantiene el bulbo olfatorio a lo largo de la vida (Obernier et al., 2018).

Igualmente, las células B1 pueden originar oligodendrocitos a través de progenitores intermedios en el cuerpo calloso (Casper and McCarthy, 2006, Kessaris et al., 2006, Menn et al., 2006, Nait-Oumesmar et al., 1999, Ortega et al., 2013b). En cuanto a este linaje, se ha descrito una mayor generación de oligodendrocitos en la zona dorsal, donde la expresión del factor de transcripción *Olig2* es crucial (Marshall et al., 2005). Tanto las células B1 como las células C pueden expresar también *Olig2* (Menn et al., 2006), cuya sobreexpresión promueve la oligodendrogénesis e inhibe la diferenciación neuronal (Hack et al., 2005).

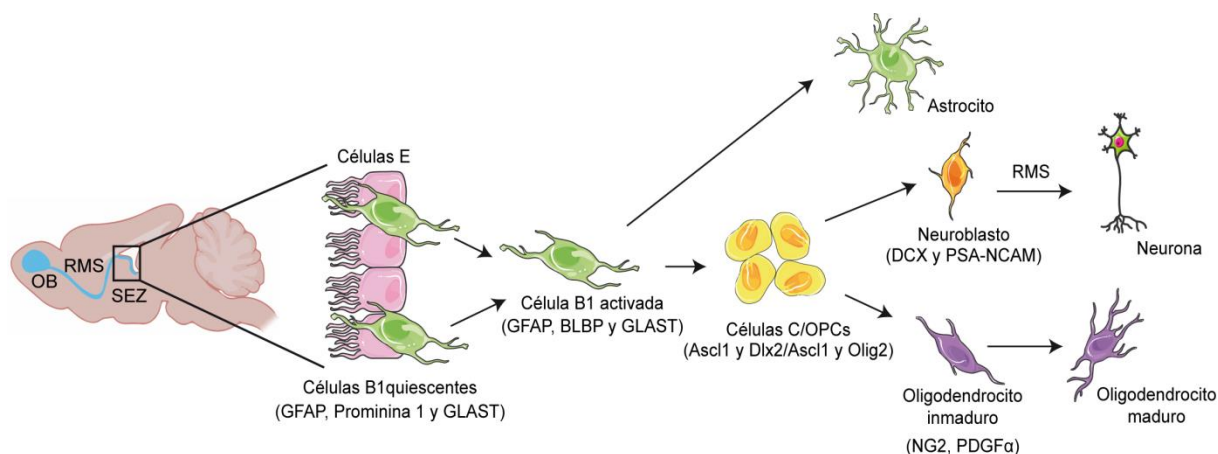


Figura 5. Neurogénesis en la SEZ adulta. Las células B1 que están en contacto con las células endimarias (E1) y tienen características astrogiales generan las células C o de amplificación. Estas células experimentan una serie de rondas de división para dar lugar a las células A que generan las nuevas neuronas que migran hacia el bulbo olfatorio (OB) a través de la vía migratoria rostral (RMS). Las células B1 también pueden generar progenitores de oligodendrocitos (OPCs) que dan lugar a los oligodendrocitos. Además, las células B1 también pueden generar astrocitos.

4.3.2.4 Mantenimiento de las NSCs: estado quiescente y activado.

En la SEZ coexisten tres poblaciones de NSCs (células B1), quiescentes (qNSCs), *primed* (pNSCs) y activadas (aNSCs), en función del estado de activación en el que se encuentren (Figura 6) (Belenguer et al., 2021b, Belenguer et al., 2021a). Se define una qNSC como una célula quiescente, que sobrevive a un tratamiento antimitótico y que puede generar nuevos linajes celulares tras la depleción de células madre activas y progenitores de amplificación (Codega et al., 2014, Daynac et al., 2013, Mich et al., 2014). Por último, el tratamiento con drogas antimitóticas como la temozolamida (TMZ) o la citosina β -D-arabinofuranosa (Ara-C) induce la muerte de las aNSCs, mientras mantiene intacta la población de las qNSCs y pNSCs.

Las tres poblaciones de NSCs representan un 6-10% de las células que se aíslan de la SEZ y se clasifican en función de los niveles de GLAST y EGFR que presentan. De modo que tanto las qNSCs como las pNSCs presentan bajos niveles de EGFR, característica que permite diferenciarlas de las aNSCs. En cuanto a los niveles de GLAST, las qNSCs presentan altos niveles, mientras que las pNSCs y aNSCs presentan bajos niveles. Además, las aNSCs pueden encontrarse en las distintas etapas del ciclo celular, mientras que las qNSCs y pNSCs se caracterizan por encontrarse en G_0/G_1 (Belenguer et al., 2021b, Belenguer et al., 2021a). No obstante, el contenido mitocondrial y el tamaño celular de las pNSCs son mayores que en las qNSCs (Belenguer et al., 2021b, Belenguer et al., 2021a).

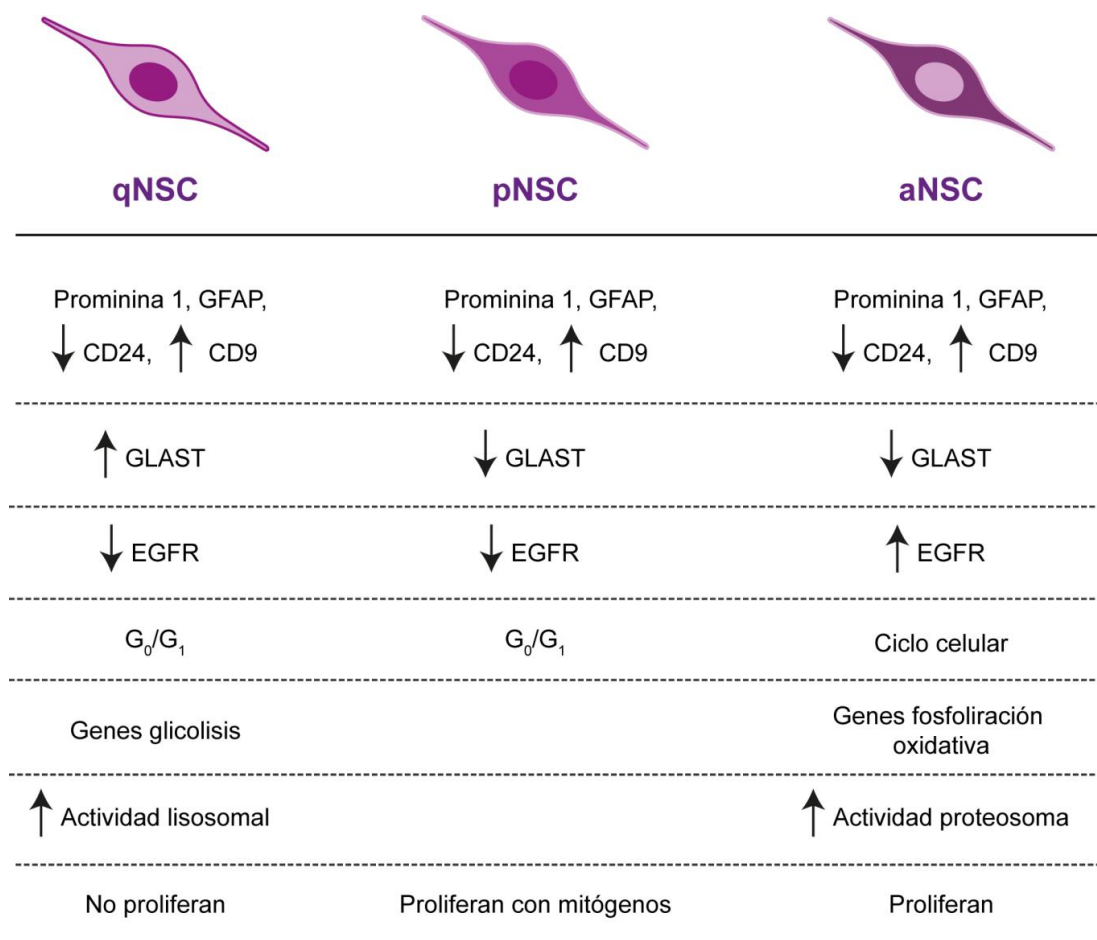


Figura 6. Principales marcadores de las células madre quiescentes (qNSCs), *primed* (pNSCs) y activadas (aNSCs).

El aislamiento de las tres subpoblaciones y el análisis de su transcriptoma han permitido determinar la identidad y características de los distintos estados de activación. De modo que los genes asociados a los canales iónicos, la señalización o la adhesión celular están ampliamente expresados en las poblaciones quiescentes, sugiriendo la existencia de un tipo de actividad celular para mantener dicho estado de quiescencia. Sin embargo, en las células activadas existe un aumento de la expresión de genes asociados al ciclo celular (*Egfr* y *Cdk2*), la reparación del DNA o la síntesis proteica. Asimismo, en los estados quiescentes se produce una mayor expresión de genes que participan en la glicolisis, mientras que en el estado activado son los genes relacionados con la fosforilación oxidativa los que se

encuentran altamente expresados (Dulken et al., 2017, Llorens-Bobadilla et al., 2015). Estas diferencias en cuanto al metabolismo celular reflejan la mayor síntesis proteica que se da en las células activadas en comparación con las quiescentes. Además, atendiendo a los mecanismos para mantener la homeostasis proteica, las células quiescentes poseen más lisosomas y agregados proteicos asociados a lisosomas, mientras que las activadas muestran una mayor actividad del proteosoma (Dulken et al., 2017).

Atendiendo al mantenimiento de los diferentes estados (quiescente, *primed* y activado), se ha observado que la expresión de los factores de transcripción *Sox9*, *Id2* e *Id3* está implicada en el mantenimiento de la quiescencia, mientras que los factores *Egr1*, *Sox4*, *Sox11*, *Fox* y *Ascl1* se expresan en el estado activado (Llorens-Bobadilla et al., 2015). En concreto, *Ascl1* juega un papel muy importante en la activación de las NSCs (Andersen et al., 2014), ya que potencia la expresión de *Dll1* y *jagged1*, ambos ligandos del receptor Notch (Kopan and Ilagan, 2009). Dicho receptor ha sido propuesto como un elemento clave en la regulación del estado quiescente y en la generación de la heterogeneidad de las NSCs (Basak et al., 2012, Giachino and Taylor, 2014, Imayoshi et al., 2010, Kawaguchi et al., 2013). La expresión del receptor Notch2 está enriquecida en las qNSCs, mientras que sus ligandos *Dll1* y *Dll3* muestran un patrón de expresión opuesto. La activación de los receptores Notch en las células vecinas induce la expresión de los factores de transcripción *Hes1* y *Hes5*, los cuales reprimen la expresión de genes pro-neurales y del ligando *Dll1*, inhibiendo la diferenciación neuronal (Llorens-Bobadilla et al., 2015). Teniendo en cuenta que las NSCs quiescentes y activadas están en contacto directo (Codega et al., 2014, Kawaguchi et al., 2013, Mich et al., 2014), las células activadas podrían estar manteniendo el estado quiescente. Conforme a esto, Llorens-Boadilla y colaboradores determinaron que la inhibición del receptor Notch en las qNSCs con DAPT, un inhibidor de la γ -secretasa, era suficiente para activar las células quiescentes y disminuir el porcentaje de las mismas (Llorens-Bobadilla et al., 2015).

4.3.2.5 Regionalización y diferenciación celular

La formación de los distintos tipos celulares en la SEZ es otra de las áreas de conocimiento sujeta a un interesante debate. Todavía se desconoce qué empuja a las NSCs a diferenciarse hacia un tipo celular o a autorrenovarse. En este sentido, como hemos indicado previamente, se mantienen sin resolver cuestiones cruciales como: ¿el comportamiento y diferenciación de las NSCs está sujeto al entorno?, ¿existen mecanismos internos a la propia célula que lo define?, o ¿es un balance entre la señalización extrínseca e intrínseca?

Una de las primeras preguntas que hay que hacerse para determinar estas cuestiones es si las NSCs son multipotentes. Los estudios llevados a cabo en neuroesferas indican que las NSCs serían multipotentes. Sin embargo, en estos estudios la adición de mitógenos para la formación de las neuroesferas puede alterar la decisión final de las células (Reynolds and Weiss, 1996, Gritti et al., 2002, Vergano-Vera et al., 2009, Doetsch et al., 2002, Costa et al., 2011). Estudios más recientes apuntan a un carácter bipotente o incluso unipotente (Bonaguidi et al., 2011, Ortega et al., 2013b, Calzolari et al., 2015, Obernier et al., 2018). De

hecho, se ha identificado progenitores bipotentes capaz de generar mediante divisiones asimétricas células oligodendrogiales NG2 positivas y células astrogiales GFAP positivas, así como neuroblastos y células astrogiales, pero no se ha observado un progenitor que pueda dar tanto un linaje neurogénico como oligodendrogénico (Ortega et al., 2013a).

En cuanto a las cuestiones iniciales, se conoce que la formación de los distintos tipos celulares estaría sujeta a la localización de células B a lo largo de los ejes antero-posterior y dorso-ventral de la pared lateral del ventrículo (Delgado and Lim, 2015, Kelsch et al., 2007, Kohwi et al., 2005, Kohwi et al., 2007, Merkle et al., 2007, Merkle et al., 2004, Young et al., 2007). Mientras que la región ventral es una zona de nacimiento de interneuronas granulares profundas y células periglomerulares calbindina positivas, en la región dorsal se generan primordialmente oligodendrocitos, interneuronas granulares superficiales y células periglomerulares TH-positivas. De manera que, si se trasplantan células de la región dorsal a la ventral o viceversa, las neuronas producidas son las de la región de la que proceden los explantes, lo que sugeriría una determinación intrínseca del patrón de diferenciación celular (Merkle et al., 2014, Merkle et al., 2007). Sin embargo, la localización de las NSCs no parece ser el único determinante, sino que se han definido una serie de factores de transcripción que potencian la diferenciación hacia los distintos linajes (Mizrak et al., 2019) así como señales extrínsecas que podrían modular también el proceso.

En este sentido, en la zona dorsal, la expresión del factor de transcripción *Pax6* induce la formación de neuronas dopaminérgicas. Por ello, los progenitores neurales que se localizan dorsalmente generan células periglomerulares positivas para tirosina hidroxilasa (TH). Además, en la zona dorsal también se ha descrito la presencia de progenitores *Pax6/Ascl1*⁺ que generan dos linajes distintos. Uno de ellos expresa *Pax6-Dlx* y da lugar a interneuronas GABAérgicas, mientras que el otro expresa *Pax6/Neurog2/Trb2* y genera neuronas glutamatérgicas. De manera que los progenitores *Pax6/Ascl1*⁺ pueden dar lugar tanto al linaje GABAérgico como glutamatérgico. No obstante, se desconoce la señal o señales que induce la diferenciación de los progenitores hacia un linaje u otro, aunque se ha propuesto que la señalización de Wnt mediada por la β -catenina podría inducir la diferenciación hacia el linaje glutamatérgico al potenciar la expresión de *Neurog1* y *Neurog2* (Brill et al., 2009). En la zona ventral, la expresión del factor de transcripción *SP8* induce predominantemente neuronas periglomerulares calbindina positivas (Waclaw et al., 2006). Además, en esta región también se expresan los marcadores *Nkx2.1* y *Nkx6.2*, involucrados en la formación de las neuronas granulares profundas.

Sin embargo, como se ha indicado previamente, el destino celular no sólo está sujeto a la localización de las NSCs y a la expresión de diversos factores de transcripción. Se han identificado señales extrínsecas que también participan en la definición de linaje. Una de las vías de señalización más implicadas en la diferenciación neuronal es la señalización de Shh. En la región ventral Shh activa al factor de transcripción *Gli3* induciendo la expresión de genes propios de las neuronas granulares profundas (Ihrie et al., 2011). De modo que la inhibición de la señalización de Shh produce la pérdida de estas neuronas. Asimismo, la

ablación de Gli3 en la zona dorsal resulta en una pérdida de células Olig2⁺, señalando la implicación de Shh en la formación de oligodendrocitos (Embalabala et al., 2022). En concordancia al papel que juega la señalización extrínseca, se ha demostrado la formación de nuevas neuronas dopaminérgicas tras la infusión de ácido γ-aminobutírico (GABA) en el bulbo olfatorio (Akiba et al., 2009).

Por lo tanto, la población de NSCs en la SEZ es heterogénea tanto en el origen como en la producción de células, en función de su localización, de la expresión de distintos factores de transcripción y potencialmente de la exposición a determinados estímulos extrínsecos.

4.3.2.6 Regulación de la neurogénesis en la SEZ

El comportamiento de las aNSCs en el proceso de generación de nuevas neuronas en la SEZ puede verse regulado por numerosas señales producidas por los distintos componentes del nicho. A lo largo de la SEZ se dispone un plexo vascular planar que permite la interacción entre los factores proporcionados por la sangre, las células endoteliales y los progenitores neurales (Doetsch et al., 1999a, Shen et al., 2008, Tavazoie et al., 2008). Además, la modulación ejercida por la microglía presente en el área, las señales de fuera del nicho aportadas por el líquido cefalorraquídeo (LCF) o la señalización por neurotransmisores a través de conexiones locales o procedentes de zonas más alejadas a la zona subependimarias también van a regular el proceso neurogénico.

- **El nicho vascular**

Las NSCs presentan un pie que contacta, en su zona basal, directamente con los vasos sanguíneos (Mirzadeh et al., 2008, Tavazoie et al., 2008). Además, las células C en proliferación forman agregados que se encuentran también en contacto con estos vasos. Este contacto estrecho entre los progenitores neurales y el tejido vascular sugiere que existen señales derivadas del endotelio vascular que regulan el proceso de la neurogénesis (Shen et al., 2008, Tavazoie et al., 2008). Este es el caso del factor VEGF, cuya señalización está implicada en la proliferación y supervivencia de los progenitores neurales, así como en la maduración y migración de los neuroblastos generados en la SEZ (Gotts and Chesselet, 2005, Licht et al., 2010, Mani et al., 2010, Meng et al., 2006, Schanzer et al., 2004, Wada et al., 2006, Wittko et al., 2009, Zhang et al., 2003). De hecho, se ha postulado el sistema VEGF-C/VEGFR-3 como una diana para la modulación de la neurogénesis (Calvo et al., 2011).

Asimismo, el factor de crecimiento epidérmico EGFL7 secretado por las células endoteliales y por neuronas modula la neurogénesis a través de la vía de Notch. EGFL7 inhibe la activación de la vía de Notch por su ligando canónico Jagged1, induciendo el paso de aNCS a qNCS, evitando la expansión de toda la población de NSCs. Además, en ratones *knockout* para este factor, se produce una alteración de las interneuronas de bulbo olfatorio afectando la percepción de olores (Bicker et al., 2017). Las células endoteliales también liberan betacelulina (BTC), un miembro de la familia de EGF, que estimula la generación de nuevas

neuronas promoviendo la proliferación de las NSCs y de las células C (Gomez-Gavero et al., 2012).

- **Las células endimarias**

Las NSCs contactan tanto con otras NSCs como con la superficie de las células E1 a través de uniones GAP en el centro de los *pinwheels*. Estas últimas afectan a la actividad de las proteínas BMPs, a través de la secreción de un antagonista denominado noggin (Lim et al., 2000). La señalización mediada por BMPs es una de las señales principales para promover la neurogénesis. Tanto las células B1 como las células C expresan BMP2 y BMP4, así como sus correspondientes receptores. Cuando las células endimarias liberan noggin, se inhibe la señalización inducida por BMPs, potenciando la diferenciación glial e inhibiendo la proliferación celular (Mercier and Douet, 2014). De acuerdo con esto, la infusión de Noggin en el ventrículo o la delección de Smad4, mediador de la señalización de BMPs, induce la expresión del factor de transcripción *Olig2*, generando un incremento en la oligodendrogénesis a expensas de la neurogénesis (Colak et al., 2008). Asimismo, el tratamiento de progenitores neurales de la SEZ con noggin incrementa el número de células NG2⁺ (Ortega et al., 2013b). Estos resultados sugieren el papel modulador de la señalización mediada por BMPs en la región ventral de la SEZ.

Además, las células endimarias secretan el factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF), que induce la activación de Hes1 y Hes5 mediando la autorrenovación de las NSCs a través de la vía de Notch (Jin et al., 2003, Ramirez-Castillejo et al., 2006, Gomez-Gavero et al., 2012, Andreu-Agullo et al., 2009).

- **El líquido ceforraquídeo**

Más allá del nicho local, las NSCs de la SEZ albergan un cilio primario que está involucrado en la transducción de señales que proceden del LCF (Corbit et al., 2005, Rohatgi et al., 2007, Tong et al., 2014b). El LCF constituye un reservorio de distintas moléculas de señalización como FGF, Shh, el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la interleuquina 1 β o Wnt, que van a regular el proceso neurogénico (Huang et al., 2010, Lehtinen et al., 2011). Como ya se ha mencionado previamente Shh es un morfógeno y un factor de crecimiento crítico durante el desarrollo, que mantiene las NSCs en la etapa posnatal y regula la proliferación de células C (Huangfu and Anderson, 2005, Singer et al., 2019, Singla and Reiter, 2006). La interleuquina 1 β induce la expresión de las moléculas de adhesión VCAM1 en las células B1, reduciendo su proliferación (Kokovay et al., 2012), mientras que LIF potencia la autorrenovación de las NSCs a expensas de la neurogénesis (Bauer and Patterson, 2006). Por el contrario, la señalización de Wnt está asociada al linaje oligodendrogénico, ya que la activación de su vía canónica potencia la producción de oligodendrocitos. Además, se ha observado que esta señalización está elevada en la zona dorsal, la cual muestra un mayor porcentaje de células NG2 positivas (Ortega et al., 2013b).

Sin embargo, se desconoce el sensor molecular que detecta estos cambios en el flujo de los diferentes factores circulantes. Se ha propuesto que los canales iónicos, especialmente los

localizados en el cilio primario, pueden ser estos sensores que van a detectar distintos estímulos y los van a traducir en una simple señal rápida. Este es el caso del canal de sodio epitelial (ENaC), el cual se encuentra generalmente abierto proporcionando un flujo constante de calcio. En las NSCs y su progenie, el canal ENaC se encuentra altamente expresado y más concretamente la subunidad α (Beckervordersandforth et al., 2010, Sirko et al., 2015). Esta subunidad es esencial para que el canal sea funcional y se ha mostrado que una reducción de su función o de los niveles de proteínas de la subunidad α inhibe la proliferación y la supervivencia de las células de la SEZ (Petrik et al., 2018). A tenor de esto, un estudio reciente ha señalado el papel que tienen los flujos de Ca^{2+} intracelulares sobre el comportamiento de las NSCs. De modo que las aNSCs presentan niveles de Ca^{2+} intracelular más elevados que las qNSCs, aunque los flujos de Ca^{2+} en estas últimas muestran mayores frecuencias y amplitudes. En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha mostrado que la modulación de los flujos de Ca^{2+} son un mecanismo clave para activar las NSCs (Gengatharan et al., 2021).

- **Papel de la microglía**

Durante la primera semana posnatal, la microglía representa una población significativa dentro de la SEZ y muestra una capacidad proliferativa mayor que la microglía de otras regiones no neurogénicas (Marshall et al., 2014, Marshall et al., 2008). A medida que se avanza en el desarrollo posnatal, el porcentaje de microglía disminuye y adquiere una forma más ramificada y semi-ameboide, aunque sigue siendo más activa que la microglía de otras regiones cerebrales (Shigemoto-Mogami et al., 2014, Goings et al., 2006, Ribeiro Xavier et al., 2015). Sin embargo, aunque muestra una mayor actividad, tiene una menor respuesta a lesiones (Goings et al., 2006).

El papel de la microglía en la neurogénesis no sólo está asociada al aclaramiento celular, sino que participa en la modulación de los progenitores neurales (Al-Onaizi et al., 2020). En el cerebro adulto, la microglía se encuentran uniformemente distribuida a lo largo de la pared de los ventrículos y en contacto con las células B1, las células C, el lecho vascular, las cadenas de neuroblastos migrando, y el bulbo olfatorio (Gonzalez-Perez et al., 2012). La microglía de la SEZ presenta unas características que difieren de la microglía del resto del cerebro. En cuanto a su morfología, la microglía de la SEZ se caracteriza por un gran soma con pequeñas prolongaciones celulares y expresa menos marcadores como CD68 o Iba1. Asimismo, la microglía localizada en la SEZ no es igual a la residente en el bulbo olfatorio. Mientras que en la SEZ la microglía no expresa TREM2, la del bulbo olfatorio sí, sugiriendo una pérdida de su capacidad fagocítica en la SEZ (Takahashi et al., 2015). La reducción de la microglía en la SEZ provoca una acumulación de los neuroblastos generados en este área, disminuyendo el número de ellos que acceden a la RMS y finalmente al bulbo olfativo. De modo que se ha sugerido que la microglía a través de la secreción de IL-4, IL-6 e IL-10 regula la migración de los neuroblastos generados (Ribeiro Xavier et al., 2015).

Otros estudios *in vitro* han reportado que la microglía, a través de la secreción de IL-1 β y IFN γ , incrementa el número de neuroblastos generados, mientras que a través de la secreción de IL-1 β y IL-6 promueve la formación de oligodendrocitos (Shigemoto-Mogami et

al., 2014). Además, también produce PEDF que a través de su vía no canónica modula la activación transcripcional de la vía de Notch promoviendo la autorrenovación de las células madre (Ramirez-Castillejo et al., 2006, Andreu-Agullo et al., 2009).

Cabe destacar, que la microglía puede liberar distintos tipos de citoquinas, las cuales dependiendo del entorno y de su concentración pueden potenciar o inhibir la neurogénesis. Por ejemplo, en los cultivos de progenitores neurales, altas concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ inducen apoptosis, mientras que bajas concentraciones de dicha citoquina promueve e incrementa la proliferación celular (Bernardino et al., 2008). Además, $\text{TNF}\alpha$ puede inducir la activación de las pNSCs o potenciar el retorno hacia la quiescencia a través de la activación de los receptores TNFR2 y TNFR1 , respectivamente (Belenguer et al., 2021b).

- **Influencia de los neurotransmisores**

Al ser una zona de generación de nuevas neuronas, la SEZ está expuesta a una secreción tónica de neurotransmisores, uno de los principales sistemas de regulación de los flujos de calcio intracelulares. A su vez, recibe proyecciones de neuronas de regiones tanto adyacentes como lejanas. Por ello, numerosos estudios se han centrado en el papel de los distintos neurotransmisores sobre la neurogénesis.

Atendiendo a GABA, el neurotransmisor inhibitorio por excelencia, se ha observado que éste induce una retroalimentación negativa en la SEZ, controlando los niveles de neurogénesis. El neurotransmisor GABA es producido por las células A y actúa sobre los receptores GABA_A presentes en las NSCs (Bolteus and Bordey, 2004, Liu et al., 2005, Wang et al., 2003). De esta manera, inhibe la proliferación de las NSCs y reduce la velocidad de migración de las células A (Liu et al., 2005). No obstante, las NSCs y células C expresan el inhibidor de la unión a diazepam (DBI) que promueve la proliferación celular mediante la reducción de la señalización de GABA (Alfonso et al., 2012).

En cuanto al neurotransmisor excitatorio glutamato, estudios de inmunotinción han mostrado que las NSCs son una fuente de éste (Platel et al., 2010). En cultivos de progenitores neurales se ha observado que altas concentraciones de glutamato extracelular potencian la proliferación de estos (Brazel et al., 2005). Asimismo, estudios *in vivo* e *in vitro* señalan al receptor mGlu5 como uno de los responsables de la modulación de la neurogénesis inducida por glutamato. De hecho, en ratones que carecen del receptor mGlu5 se ha observado una disminución del número de progenitores neurales que proliferan en la SEZ. Asimismo, el tratamiento con antagonistas del receptor mGlu5 induce el mismo efecto *in vitro* (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005). En concordancia, se ha observado la disminución de la proliferación de neuroblastos al bloquear la señalización de glutamato en el cerebro (Berg et al., 2013), así como la muerte de estos tras la delección de los receptores de NMDA (Platel et al., 2010). Referente a los transportadores de glutamato, tanto los transportadores VGLUT1-3 como los EAAT1-3 se expresan en los progenitores neurales de la SEZ, cuya expresión aumenta a lo largo de la progresión en el linaje. Además, la inhibición de la expresión de VGLUT incrementa la diferenciación neural (Sanchez-Mendoza et al., 2017).

El sistema dopaminérgico, también juega un papel importante en la modulación de la neurogénesis adulta (Mishra et al., 2018). Se tiene conocimiento de que numerosas neuritas de las neuronas dopaminérgicas TH-positivas de la sustancia nigra contactan directamente con los progenitores de la SEZ, siendo este contacto mayoritario con las células C (Hoglinger et al., 2004, Freundlieb et al., 2006). Aunque se desconoce sobre qué células actúa la dopamina, ya que tanto las NSCs como las células C y A expresan los distintos receptores dopaminérgicos. No obstante, el receptor D3 es el más abundante en la SEZ adulta (Diaz et al., 1997). Además, se ha comprobado que la eliminación de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio de ratón por la inyección de neurotoxinas reduce la neurogénesis y la proliferación de los progenitores neurales (Baker et al., 2004, Hoglinger et al., 2004, Winner et al., 2009, L'Episcopo et al., 2012). De igual modo, en modelos animales de la enfermedad de Parkinson se produce una depleción de la proliferación en la SEZ. Esto coincide con lo observado en cerebros de pacientes con Parkinson, donde se ha observado una disminución de la proliferación celular, y de la generación de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio (Hoglinger et al., 2004, O'Keefe et al., 2009).

En un estudio reciente se ha señalado que aunque los receptores D1, D2 y D3 se expresan en neuroesferas derivadas de progenitores de la SEZ, sólo la activación de los receptores D2 y D3 incrementa el número de neuroesferas en el cultivo. El aumento en la proliferación celular es debido a un aumento en la expresión del receptor de angiotensina II (AT2). Si bien, el aumento de AT2 conlleva a una activación del receptor D1 que induce la activación del receptor AT1 promoviendo la inhibición del receptor D2 y reduciendo la proliferación celular (Garcia-Garrote et al., 2021). No obstante, la administración de haloperidol, un antagonista de los receptores de dopamina D2 muestra un aumento de la proliferación celular (Kippin et al., 2005). Estos resultados contradictorios sugieren los efectos opuestos que ejerce la dopamina al actuar sobre una NSC o una célula de amplificación (Berg et al., 2013).

La serotonina (5-HT) también parece estar implicada en el proceso de neurogénesis. Las NSCs y células E1 en las estructuras de *pinwheels* contactan con los axones de neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal de rafe. Estas neuronas extienden sus proyecciones dentro del ventrículo y liberan 5-HT, induciendo la proliferación celular a través de la activación del receptor 5-HT_{2C} presente en las células B1 (Tong et al., 2014a).

Por último, cabe destacar el papel de los nucleótidos sobre la neurogénesis adulta. Estos neurotransmisores a través del sistema purinérgico modulan la proliferación y diferenciación de las NSCs así como la migración de las nuevas células generadas (Burnstock and Ulrich, 2011, Cheung et al., 2003, Gampe et al., 2015a, Grimm et al., 2009, Lin et al., 2007, Messemer et al., 2013).

4.4 El sistema purinérgico

El sistema purinérgico incluye todos los componentes implicados en las diferentes etapas de la señalización mediada por nucleótidos: los receptores que median las acciones extracelulares de nucleótidos y nucleósidos, las enzimas responsables del metabolismo

extracelular de los nucleótidos, los transportadores de la membrana plasmática para la recuperación del producto final de la hidrólisis, la adenosina, y los transportadores vesiculares de nucleótidos, esenciales para su almacenamiento en vesículas y posterior liberación al medio extracelular (Burnstock, 1976, Burnstock, 1978, Volonte and D'Ambrosi, 2009) (Figura 7). A lo largo de varias décadas numerosos grupos de investigación se han centrado en la caracterización de estas etapas, así como de las proteínas implicadas hasta lograr convencer a la comunidad científica de que la moneda energética de la célula el ATP y otros precursores de los ácidos nucleicos se liberan al medio extracelular y actúan como mensajeros extracelulares regulando prácticamente todas las funciones de los seres vivos.

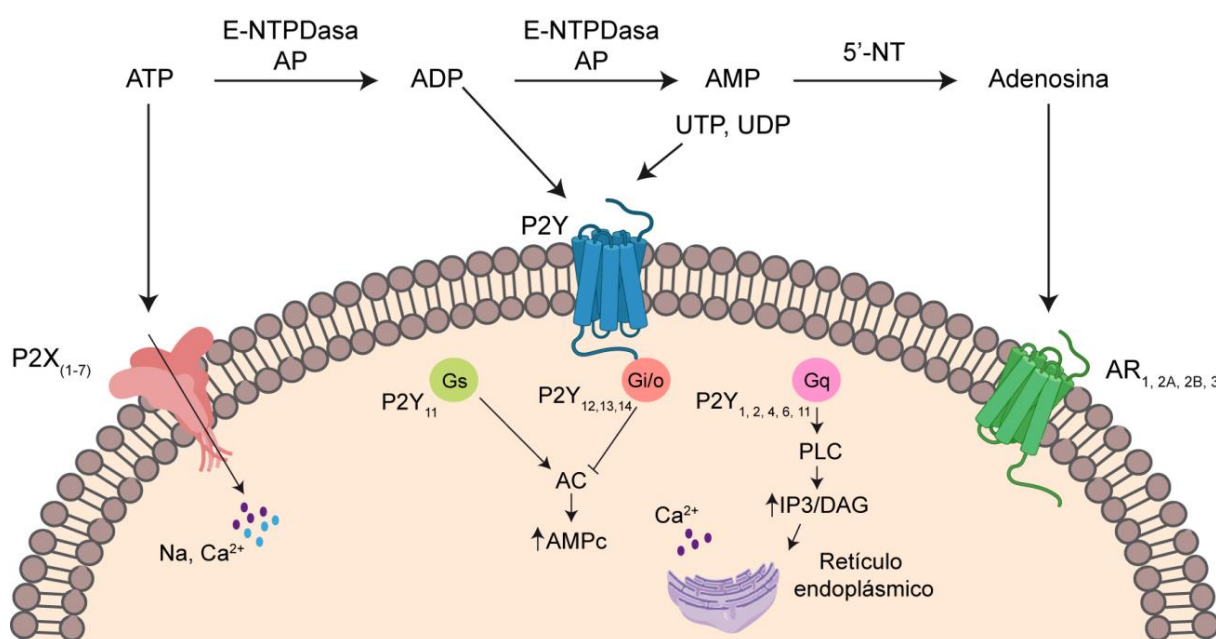


Figura 7. Esquema representativo del sistema purinérgico. El ATP es liberado al espacio extracelular y activa a los receptores de nucleótidos que se dividen en receptores metabotrópicos P2Y y receptores ionotrópicos P2X. El ATP en el espacio extracelular es metabolizado por las distintas ectonucleotidasas, generando diversos productos de su metabolismo que también pueden activar la señalización purinérgica, como la adenosina que activa los receptores de adenosina (AR).

En el sistema nervioso los nucleótidos son neurotransmisores, que se coalmacen con las aminas y los neurotransmisores clásicos, glutamato y GABA, en vesículas sinápticas y se liberan por un mecanismo exocitótico (Sawada et al., 2008, Sakamoto et al., 2014) Aunque cualquier daño de la membrana puede desencadenar su salida debido al gradiente de concentraciones que existe entre el medio intracelular de cualquier tipo celular y el medio externo. Además, como sucede con otros neurotransmisores los nucleótidos también se pueden liberar al medio extracelular mediante mecanismos no exocitóticos como los maxicanales de aniones (Sabirov and Okada, 2005, Sabirov and Okada, 2009, Sabirov et al., 2001, Sabirov and Okada, 2004, Lader et al., 2000, Nilius and Droogmans, 2003), los hemicanales de conexinas y panexina (Scemes et al., 2009, Bao et al., 2004, Muller et al., 2002) o el receptor P2X7 (Lazarowski et al., 2011) (Figura 8).

A continuación se describe brevemente algunos componentes del complejo puzzle purinérgico, especialmente aquellos que van a ser objeto de estudio en este trabajo.

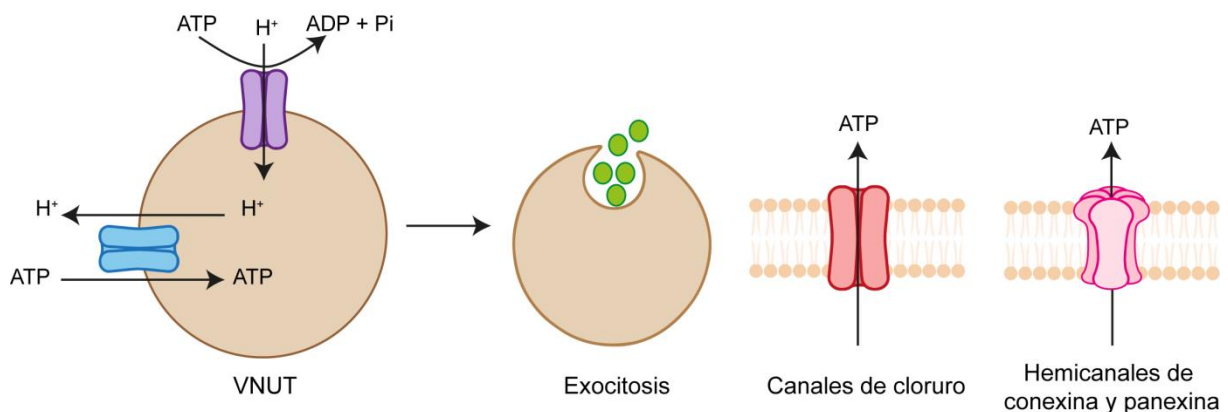


Figura 8. Mecanismo de liberación de ATP. El transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) es el encargado de almacenar el ATP en vesículas de secreción. Después, el ATP puede ser liberado al espacio extracelular a través de los maxi-canales de aniones como el canal cloruro o de los hemicanales de conexinas y panexinas.

4.4.1 Receptores de adenosina P1

Los receptores P1 o receptores de adenosina son receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a una proteína G. Dichos receptores presentan un C-terminal de entre 32 y 120 residuos, y un N-terminal corto de entre 7 y 13 residuos. Se han clonado e identificado 4 subtipos hasta la fecha: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 (Fredholm et al., 2005, Olah and Stiles, 2000). Principalmente, los receptores P1 son activados por adenosina y están acoplados a la adenilato ciclasa. Mientras que los receptores A_{2A} y A_{2B} activan la adenilato ciclasa a través de una proteína G_s , los receptores A_1 y A_3 la inhiben a través de la subunidad α de la proteína G_i/o (Reshkin et al., 2000). Entre todos los efectos fisiológicos de los receptores P1 destacan la modulación de los sistemas inmune, nervioso y cardiovascular (Ledent et al., 1997, Sun et al., 2001).

4.4.2 Receptores de nucleótidos P2

Atendiendo a la farmacología, así como a su estructura, los receptores P2 se clasifican en dos grandes subtipos: los receptores ionotrópicos P2X y los receptores metabotrópicos P2Y (Burnstock and Kennedy, 1985). Sin embargo, la caracterización de los receptores de nucleótidos es complicada, debido a la falta de agonistas y antagonistas específicos. Ambos subtipos de receptores son prácticamente ubicuos en los tejidos de mamíferos, aunque destaca su importante presencia en los sistemas nervioso, inmune y cardiovascular. Esta presencia ubicua hace también difícil la caracterización, ya que el perfil farmacológico observado no corresponde al de un solo tipo de receptor P2. Asimismo, la formación de intermediarios por las enzimas de degradación puede alterar ese perfil, al actuar los productos sobre otros receptores en el mismo tejido.

4.4.2.1 Receptores ionotrópicos P2X

Los receptores P2X son canales iónicos activados por ATP extracelular que permiten la entrada de cationes de pequeño tamaño como Na^+ o Ca^{2+} y la salida de K^+ , induciendo la despolarización de la membrana (Coddou et al., 2011). A diferencia de los receptores P2Y, los receptores P2X, a excepción del receptor P2X7, se desensibilizan rápidamente en presencia del agonista (Roberts et al., 2006). Se han identificado y clonado 7 subunidades distintas, desde P2X1 a P2X7, de acuerdo al orden histórico de clonaje (Tabla 1). Todas las subunidades se expresan en células neurales aunque su expresión es heterogénea en las diferentes regiones del cerebro y los tipos celulares. Dichas subunidades se ensamblan formando trímeros para dar lugar a un receptor funcional. Por lo tanto, los receptores P2X funcionales se organizan como homo o heterotrímeros, exhibiendo diferentes propiedades farmacológicas (Nicke et al., 1998, Aschrafi et al., 2004, Nagaya et al., 2005).

Tabla 1. Receptores ionotrópicos presentes en el Sistema Nervioso y sus principales agonistas y antagonistas. Información obtenida de (Burnstock, 2018).

Tipo	Principales agonistas	Principales antagonistas
P2X1	BzATP > ATP = 2MeSATP $\geq$ α,β -meATP = L- β,γ -meATP; PAPET-ATP	NF864 > NF449 > IP ₅ I $\geq$ TNP-ATP > RO 0437626 > NF279, NF023, RO1, MRS2159
P2X2	ATP $\geq$ ATP γ S $\geq$ 2MeSATP >> α,β -meATP; β,γ -CF ₂ ATP	PSB-1011 > RB2, isoPPADS > PPADS > Suramina, NF770, NF778, Aminoglicosido
P2X3	2-MeSATP $\geq$ ATP $\geq$ Ap4A $\geq$ α,β -meATP; PAPET-ATP; BzATP	TNP-ATP , AF353, A317491, RO3, isoPPADS > NF110 > PPADS, Ip5I, rojo fenol, RN-1838, sinorfina
P2X4	ATP >> α,β -meATP >> CTP, 2MeSATP , vermentina	5-BDBD >> TNP-ATP, PPADS > BBG, paroxetina, fenoltaleína, CO donar (CORM 2), 5MPTP
P2X5	ATP = 2MeSATP = ATP γ S >> α,β -meATP > AP ₄ A	BBG > PPADS, Suramina
P2X6	Sólo forma heterodímeros	
P2X7	BzATP > ATP $\geq$ 2-MeSATP >> α,β -meATP	KN62, BBG , KN04, MRS2427, O-ATP, RN-6189, Perazina, AZ10606120, A740003, A-438079 , A-804598, GSK-1370319, Comp 31 (GSK), AZD-9056, CE-224,535, JNJ-47965567, JNJ- 42253432, decavanadato, AZ11657312

Los receptores P2X están formados por dos dominios transmembrana, cuyos extremos carboxilo y aminos se encuentran en el lado intracelular, y un dominio extracelular. Mientras que el dominio N-terminal está mucho más conservado y tiene una longitud variable de 24-31 aminoácidos (aas), el dominio C-terminal presenta una gran diversidad tanto en longitud como en secuencia ya que va desde los 27 aas del P2X6 a los 239 aas del P2X7 (North, 2002). Además, el dominio N-terminal posee residuos implicados en la respuesta al agonista y el C-

terminal tiene un motivo que participa en el transporte del receptor a la membrana, así como en la transducción intracelular de señales. Los dominios transmembrana están separados por una larga región extracelular donde se encuentran los residuos más conservados de entre todos los subtipos de receptores P2X. Tanto el dominio extracelular como el dominio transmembrana participan en la unión del ligando, el cual genera un cambio conformacional que estabiliza la alta afinidad por el ATP (Stojilkovic et al., 2005).

El conocimiento de la estructura tridimensional de las subunidades P2X₄ supuso un gran avance en el estudio de estos canales iónicos, los residuos implicados en el reconocimiento del ligando y los cambios que se producen para la activación y apertura del canal (Kawate et al., 2009). Se descubrió que las subunidades presentan un plegamiento que se asemeja al cuerpo de un delfín (Figura 9) (Kawate et al., 2009).

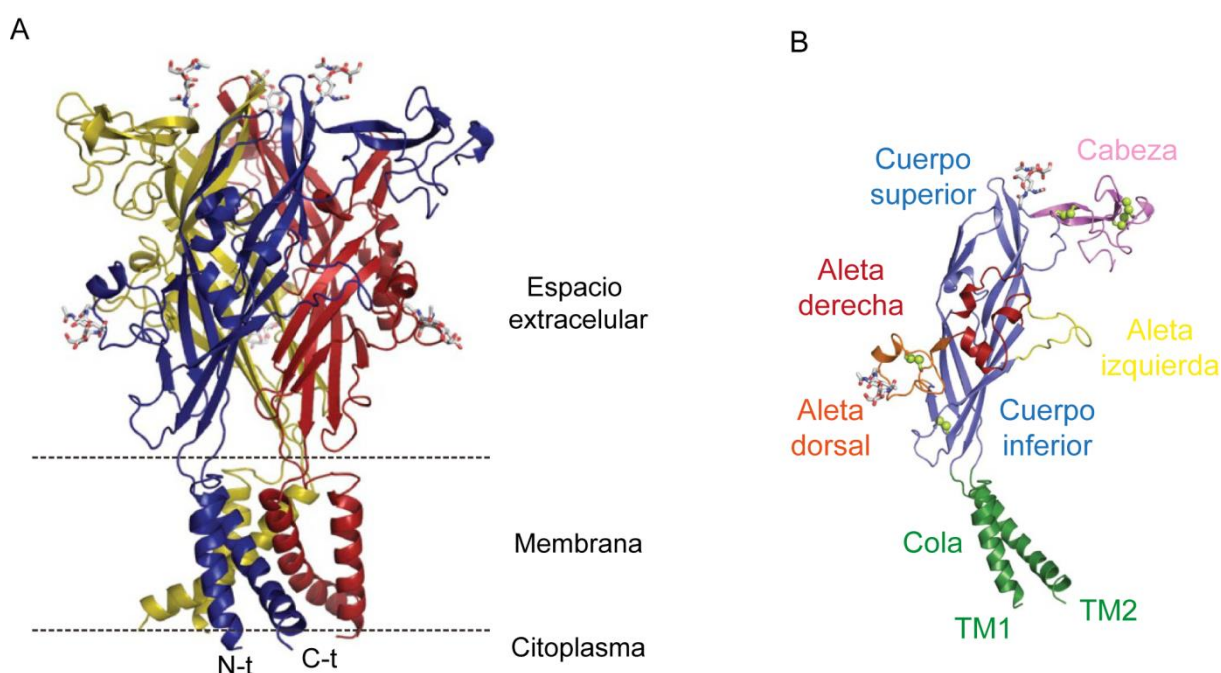


Figura 9. Estructura de los receptores P2X. (A) Vista del receptor trimerizado P2X₄ del pez cebra. Los receptores P2X se ensamblan formando trímeros. (B) Vista del plegamiento de una subunidad similar a la anatomía de un delfín. La figura es una adaptación de (Kawate et al., 2009).

La principal consecuencia de la activación de los receptores P2X es una despolarización de la membrana que desemboca en la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Como consecuencia de esta entrada de Ca^{2+} tanto por los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje como de los receptores P2X, se genera una acumulación de Ca^{2+} en el citoplasma. Este aumento del calcio intracelular activa diversas quinasas dependientes de calcio como la calcio-calmodulina quinasa II (CAMKII) o la proteína quinasa C (PKC) y modula distintas cascadas de señalización como la vía de las MAP quinasas (MAPK) o la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK). Además, la activación de los receptores P2X puede inducir la liberación de neurotransmisores como glutamato, acetilcolina, GABA e incluso de ATP (Gomez-Villafuertes et al., 2001, Diaz-Hernandez et al., 2006, Leon et al., 2006, Ortega et al., 2011b, Ortega et al., 2010).

4.4.2.2 Receptores metabotrópicos P2Y

Los receptores P2Y también pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana (GPCRs). El dominio amino terminal presenta una longitud de entre 21 y 51 aas, con residuos implicados en glicosilación, esenciales para la modificación postraduccional de la proteína y su correcta localización en la membrana plasmática. Mientras que el dominio carboxilo terminal posee una longitud variable (16 y 217 aas) y varios residuos susceptibles de fosforilación por proteínas quinasas (Erb et al., 2006, Jacobson et al., 2002). A diferencia de los receptores P2X, los receptores metabotrópicos son activados por nucleótidos de purinas y/o pirimidinas e incluso por nucleótidos difosfato (Tabla 2). Actualmente, se han clonado y caracterizado ocho subtipos en mamíferos: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ (Abbracchio et al., 2003, Abbracchio et al., 2006, Jacobson et al., 2020).

Tabla 2. Receptores ionotrópicos presentes en el Sistema Nervioso y sus principales agonistas y antagonistas. Información obtenida de (Burnstock, 2018).

Tipo	Agonistas principales	Antagonistas principales
P2Y ₁	MRS2365 > 2MeSADP > ADP = ADPβS	MRS2500 > MRS2279 > MRS2179 , PIT, A3P5P
P2Y ₂	PSB1114 > UTP = MRS2698 ≥ ATP > INS37217 > Ap4A > ATPγS	AR-C126313 > Suramina > RB2, PSB-716, MRS2576, PSB-0402, AR-C118925
P2Y ₄	UTP =MRS4062 > UTPγS (humano) UTP=ATP (rata, ratón)	ATP (humano) > Reactive Blue 2 > Suramina, MRS2577, PPADS
P2Y ₆	5-OMe-UDP(a-B)>MRS2693 > PSB0474 > UDP > UTP> >ATP	MRS2578 > Reactive Blue 2, PPADS, MRS2567, MRS2575 (humano)
P2Y ₁₁	ATPγS = BzATP > NF546 > ARC67085 > ATP (humano)	NF157 > Suramina > RB2, 5'-AMPS, NF340, AMP-α-5
P2Y ₁₂	2MeSADP > ADP > ATP	AR-C69931MX > AZD6140 (Ticagrelor), INS50589 > RB2 > 2-MeSAMP AR-C66096, CT50547, PSB- 0413, Carba-nucleosides, MRS2395, AR-C67085, [3H]PSB- 0413; clopidogrel, AZD1283; ACT-246475
P2Y ₁₃	ADP = 2MeSADP > 2MeSATP, ATP	AR-C69931MX > AR-C67085 > MRS2211 , 2MeSAMP
P2Y ₁₄	MRS2690 > UDP > UDP glucosa	PPTN

En función del ligando responsable de la activación, se pueden distinguir tres grupos. El primero de ellos lo forman los receptores activados por nucleótidos de adenina como es el caso de los receptores P2Y₁, ₁₁, ₁₂, ₁₃. Mientras que los receptores P2Y₁, ₁₂ y ₁₃ son selectivos para nucleótidos difosfato como el ADP y análogos sintéticos (2MeSADP), el receptor P2Y₁₁, identificado únicamente en humanos, es selectivo para ATP. El segundo grupo está formado por los receptores que son activados preferentemente por nucleótidos de uracilo (UTP y

UDP) como los receptores P2Y_{2,4}, y el receptor P2Y₆ específico de nucleótidos de pirimidinas difosfato (UDP). Además, los receptores P2Y₂ y P2Y₄ de roedores presentan una selectividad mixta, activándose también con ATP. El receptor P2Y₁₄ pertenece al último grupo, cuya activación es inducida solo por azúcares activados como UDP-glucosa, UDP-galactosa o UDP-glucurónico (Abbracchio et al., 2006).

Los receptores P2Y también se clasifican en función de la proteína G a la que están acoplados. Los receptores P2Y_{1,2,4,6,11} están acoplados a una proteína Gq/G₁₁, a través de la cual activan la vía de la fosfolipasa C (PLC)/Inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e inducen la liberación de calcio intracelular del retículo endoplasmático (Verkhatsky, 2005). Mientras que los receptores P2Y_{12,13,14} activan una proteína Gi/o a través de la cual inhiben la adenilato ciclasa, disminuyendo los niveles de AMP cíclico (Abbracchio et al., 2006). Esta clasificación fue corroborada cuando se conoció la estructura tridimensional de los receptores P2Y₁₂ y los receptores P2Y₁, ambos selectivos para ADP (Figura 10).

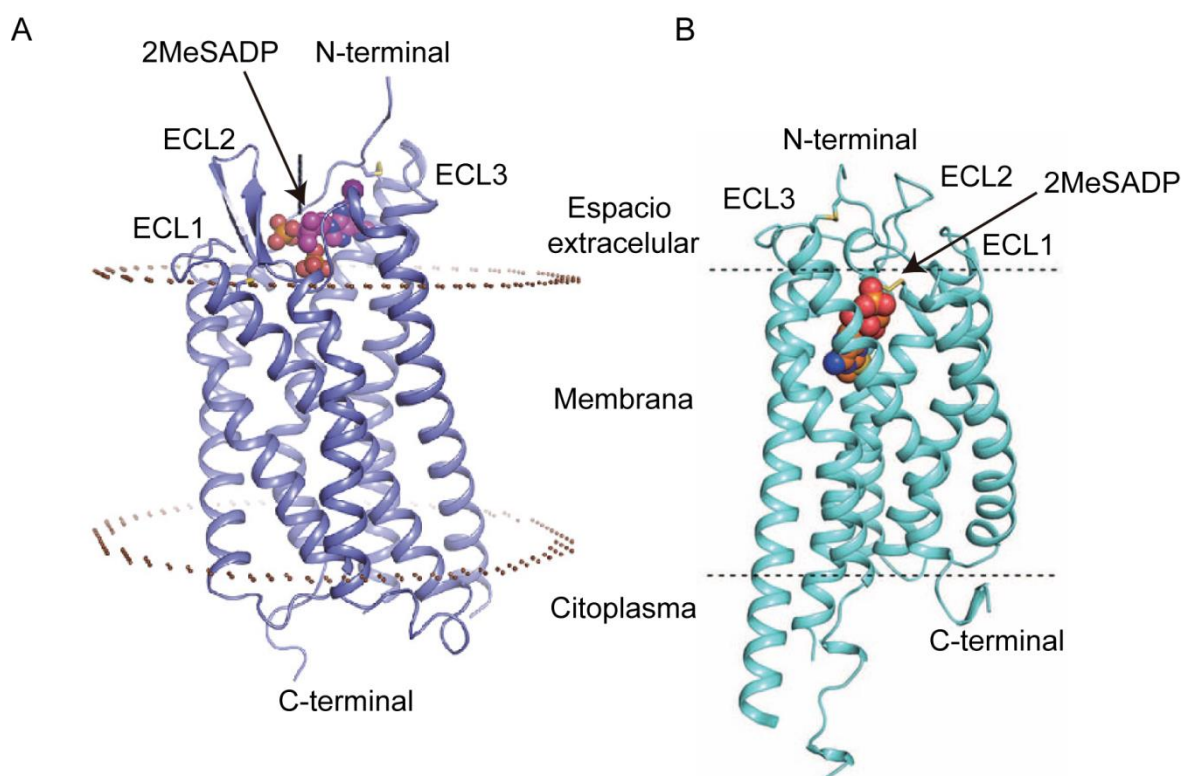


Figura 10. Estructura tridimensional de los receptores P2Y₁ (A) y P2Y₁₂ (B) y la zona de unión del ligando. Los receptores P2Y están compuestos por 7 dominios transmembrana con el dominio C-terminal y N-terminal en el citoplasma y en el espacio extracelular, respectivamente. Figura adaptada de (Zhang et al., 2015, Zhang et al., 2014).

Este hecho también permitió identificar los residuos implicados en el reconocimiento del ligando y las semejanzas y diferencias que existen entre ambos receptores. Se dispone de varios modelos estructurales con el agonista sintético, 2MeSADP y con diferentes antagonistas, competitivos y no competitivos (Jacobson et al., 2020). Así se ha demostrado que en el receptor P2Y₁, el bolsillo de unión al ligando está delimitado por el extremo N-terminal, el segundo bucle extracelular (ECL2), y los dominios transmembrana 6 y 7 y está

expuesto al medio extracelular. En el receptor P2Y₁₂ el bolsillo de unión al ligando está situado un poco más profundo, contactando también con los transmembrana 3 y 4 (Zhang et al., 2015, Zhang et al., 2014).

Los receptores P2Y pueden formar homo o heterodímeros con otros receptores P2Y o con otros receptores como los receptores de adenosina A1. La formación de dichos dímeros puede modificar las propiedades farmacológicas, la señalización y la internalización de los mismos (Carrasquero et al., 2005, D'Ambrosi et al., 2007, Choi et al., 2008, Ecke et al., 2008).

La proliferación, apoptosis y diferenciación celular son algunos de los procesos en los que participan los receptores P2Y en diversos tejidos y tipos celulares. Esta modulación la llevan a cabo a través de la activación de la vía de las MAPKs, a las que pertenecen las proteínas quinasas activadas por estrés o quinasas del extremo C-terminal de c-jun (SAPK/JNK), proteínas quinasas del grupo de la p38 o proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) (Weisman et al., 2012, Abbracchio et al., 2006). Mientras que JNK y p38 median apoptosis, las proteínas ERKs están implicadas en procesos de diferenciación y supervivencia celular.

4.4.3 El transportador vesicular de nucleótidos, VNUT

En las últimas décadas, se ha reconocido la presencia del ATP y de otros nucleótidos en vesículas de secreción. En la década de los setenta, se determinó que el ATP era transportado y co-almacenado con serotonina y catecolaminas en los gránulos de las células cromafines. Además, esta acumulación de ATP y de otros nucleótidos también se observó en los gránulos densos de las plaquetas, en los gránulos secretorios de las células β y en las glándulas salivares de rata (Lazarowski et al., 2011). Sin embargo, se desconocía el mecanismo molecular que permitía la entrada del ATP al interior de las vesículas secretoras.

En 2008, Moriyama y col. examinando las distintas propiedades de los transportadores huérfanos de la familia SCL17 descubrieron el transportador SLC17A9, después renombrado como VNUT (del inglés, Vesicular Nucleotide Transporter) (Sawada et al., 2008). Los transportadores de la familia SCL17 (SLC, del inglés Solute Carrier) son un grupo de proteínas que median el transporte de aniones orgánicos, entre las que se incluyen las tres isoformas del transportador vesicular de glutamato VGLUT1 (SLC17A7), VGLUT2 (SLC17A6) y VGLUT3 (SLC17A8) (Reimer, 2013).

El transportador SLC17A9 compartía las características farmacológicas y bioquímicas del transporte de ATP y se expresaba en las células cromafines (Sawada et al., 2008). Estudios en células PC12, similares a las células cromafines, señalaron una fuerte inmunorreactividad del transportador SLC17A9 que además co-localizaba con la sinaptotagmina, un marcador vesicular. Además, el silenciamiento de SLC17A9 con un pequeño ARN de interferencia disminuía el almacenamiento y la liberación de ATP en las células PC12. Dichos resultados sugerían el papel de SLC17A9 como transportador en las vesículas sinápticas y las terminaciones nerviosas. De acuerdo con estos resultados, un estudio de hibridación in situ

señaló altos niveles de expresión del ARN mensajero de SLC179A en el cerebro de ratón, siendo la expresión especialmente alta en el hipocampo, el cual muestra una neurotransmisión purinérgica (Sreedharan et al., 2010).

La generación de ratones *knockout* para VNUT ($Vnut^{-/-}$) ha proporcionado los datos necesarios para definir a VNUT como el transportador vesicular de ATP. En neuronas de hipocampo, así como en células cromafines, el almacenamiento vesicular del ATP, así como la liberación de ATP evocada por la despolarización desaparecía en ausencia de la expresión de VNUT (Sakamoto et al., 2014). Un efecto similar ocurría en las neuronas del asta dorsal, donde la secreción de ATP desaparecía en los ratones $VNUT^{-/-}$ (Masuda et al., 2016). Atendiendo a estos resultados, el transportador SLC179A fue renombrando como transportador vesicular de nucleótidos VNUT, responsable del almacenamiento del ATP y de otros nucleótidos en las vesículas sinápticas y de secreción.

El transportador VNUT permite el transporte de ATP a expensas del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y no del gradiente de pH (ΔpH). Además, puede transportar distintos nucleótidos con el siguiente orden de eficacia: ATP > UTP > GTP > ITP, ADP >> AMP. La captación de nucleótidos por parte de VNUT es dependiente del anión cloruro. En su ausencia no se ve ninguna captación de nucleótidos ni de cationes divalentes. Esta activación dependiente de Cl^- se debe a la presencia de un sitio de unión específica en VNUT, ya que no se produce ningún movimiento de Cl^- durante la activación del transportador (Juge et al., 2010).

La expresión de VNUT no se reduce al cerebro o a los tejidos neuroendocrinos. De hecho, mediante estudios de inmunorreactividad y de expresión de ARN, se ha encontrado una amplia expresión de este transportador en queratinocitos, células sanguíneas y epiteliales, en el estómago, bazo, hígado, intestino, músculo esquelético, tiroides, así como en los pulmones (Sreedharan et al., 2010, Tokunaga et al., 2010, Iwatsuki et al., 2009, Mihara et al., 2011).

4.4.4 Metabolismo de los nucleótidos

Una vez en el espacio extracelular los nucleótidos van a ser hidrolizados rápidamente por una serie de ectonucleotidasas que se encuentran en la superficie celular (Plesner, 1995). Esta hidrólisis puede, terminar la señalización purinérgica, o empezar una señalización específica con los productos que se generan. Existen cuatro familias de ectonucleotidasas principales que incluyen las enzimas ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasas (ENTPDasas), la ecto-5'-nucleotidasa (5'-NT), las ecto-nucleotidasas pirofosfatasa/fosfodiesterasas (ENPPs) y la fosfatasa alcalina (AP) (Zimmermann et al., 2012). Las cuatro familias de ectonucleotidasas comparten características estructurales y se encuentran ancladas a la membrana plasmática, aunque existen isoformas solubles denominadas exonucleotidasas. Entre todas las ectonucleotidasas que participan en el metabolismo de los nucleótidos, la ENTPDasa y la 5'-NT son las enzimas más importantes en la señalización purinérgica.

- **Las enzimas ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasas.**

Las enzimas E-NTPDasa se expresan en prácticamente todos los tejidos e hidrolizan los nucleótidos trifosfato y difosfato produciendo nucleósidos monofosfato (AMP, UMP) como producto final de la reacción. Estas enzimas requieren concentraciones milimolares de cationes de Ca^{2+} y Mg^{2+} y un pH en el espacio extracelular entre 7 y 8 para llevar a cabo su función (Kukulski et al., 2011, Yegutkin, 2008). En mamíferos se han identificado 8 miembros de esta familia y cuatro de ellos se encuentran en la superficie celular (NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3, and NTPDase8). Mientras que las 4 enzimas restantes (NTPDase4-7) se localizan en orgánulos intracelulares y presentan una mayor restricción por el sustrato (Knowles, 2011, Robson et al., 2006). Todas las enzimas de esta familia poseen 5 dominios conservados esenciales para la actividad catalítica (Handa and Guidotti, 1996, Vasconcelos et al., 1996, Zimmermann, 2000).

- **La enzima ecto-5'-nucleotidasa**

La 5'-NT es la principal enzima responsable de la producción de adenosina extracelular a partir de AMP (Zimmermann, 1992, Zimmermann, 1996). Se trata de una enzima anclada a la membrana por glicosilfosfatidilinositol formada por dos subunidades idénticas que hidroliza tanto ribo- como deoxiribo-nucleósidos 5'-monofosfatos. Además, posee un sitio de unión para AMP en el dominio carboxilo terminal. Si bien se ha descrito una forma soluble de esta enzima. El ATP y ADP actúan como inhibidores competitivos de esta enzima cuando se encuentran a bajas concentraciones, en el rango micromolar (Antonioli et al., 2016, Naito and Lowenstein, 1981).

- **Las enzimas ecto-nucleotidasas fosfatasa/fosfodiesterasas**

Las enzimas ENPPs catalizan la hidrólisis de nucleósidos tri- y difosfato, dinucleósidos polifosfato, ADP ribosa y NAD^+ . Sin embargo, no hidroliza AMP. Además, también pueden hidrolizar nucleótidos de purina, pirimidina y UDP-azúcares. De acuerdo a su orden de clonación, existen siete tipos de enzimas ENPP, de las que solo tres hidrolizan nucleótidos, ENPP1, 2 y 3 (Stefan et al., 2006). Estas últimas son clasificadas como ecto-nucleotidasas pirofosfatas/fosfodiesterasas I alcalinas, constituidas por un único dominio intracelular, un dominio N-terminal intracelular y un dominio C-terminal largo que contiene el sitio activo (Abbracchio et al., 2006).

- **La fosfatasa alcalina**

Por último, la AP es una enzima encargada de la hidrólisis de nucleósidos tri, di- y monofosfato, así como pirofosfatos (Zimmermann, 1996, Zimmermann, 2000).

La adenosina, producto final de la degradación extracelular de los nucleótidos se internaliza por transportadores de membrana, las proteínas SLC28 y SLC29, que se corresponden con los transportadores de nucleósidos acoplados a un gradiente de iones y de difusión facilitada, respectivamente. Este paso es fundamental para recuperar los niveles intracelulares de nucleótidos, y es un proceso que está muy regulado, sobre todo en tejidos

neurales. La actividad de los transportadores de difusión facilitada se regula por procesos de fosforilación-defosforilación como se ha descrito para otros transportadores de neurotransmisores como los transportadores de glicina (Sen et al., 1998, Delicado et al., 1991).

4.4.5 El sistema purinérgico en la neurogénesis y el mantenimiento de la homeostasis en el sistema nervioso

El sistema purinérgico es uno de los sistemas de señalización que primero se expresan durante el desarrollo embrionario. De hecho, la inhibición de la señalización purinérgica durante esta etapa del desarrollo afecta tanto a la correcta proliferación de los progenitores neurales como a su diferenciación neuronal (Goldman et al., 1992, Lin et al., 2007). Numerosos estudios han destacado el papel que tienen los receptores purinérgicos sobre el correcto desarrollo embrionario. En este sentido, cabe destacar la acción del receptor P2Y₁ en la propagación de ondas de calcio de la RG, potenciando la proliferación celular y regulando el mantenimiento de la población de estas células madre (Weissman et al., 2004). Asimismo, en progenitores aislados de ratón se ha descrito la expresión de los receptores P2Y_{1, 2 y 4}, cuya activación por ATP potenciaba la proliferación de los mismos, mientras que su inhibición bloqueaba la expansión de las neuroesferas (Lin et al., 2007). Además, los propios progenitores eran capaces de secretar ATP de forma esporádica. Otro de los receptores más interesantes es el P2X7, cuya expresión está regulada negativamente durante la diferenciación neuronal de las células madre embrionarias. De hecho la inhibición de su actividad favorece la diferenciación hacia neuroblasto (Young et al., 2011). De igual manera, la inhibición de la traducción del receptor P2X3 genera defectos en la formación del circuito craneofacial y sensorial (Kucenas et al., 2009). Estos resultados ponen de manifiesto el papel que ejercen estos receptores sobre la generación de nervios sensoriales y motoneuronas craneofaciales (Kucenas et al., 2009). Los receptores P2Y₁ junto con los receptores P2Y₁₃ también parecen estar implicados en la diferenciación de neuronas de otras zonas de cerebro como las neuronas hipocámpales, actuando de manera coordinada con los receptores inotrópicos P2X7 (del Puerto et al., 2012, Gomez-Villafuertes et al., 2009). En estos estudios también se mostró que esta interacción parece estar regulada por otro componente purinérgico, la fosfatasa alcalina específica de tejido (TNAP), cuya actividad regula los niveles extracelulares de ATP en las inmediaciones neuronales controlando la formación del cono de crecimiento axonal (Diez-Zaera et al., 2011). Estudios recientes de nuestro grupo han verificado que el receptor P2X7 podría jugar un papel notable en el desarrollo del cerebro murino al expresarse de forma significativa en los órganos circumventriculares durante el desarrollo embrionario. Estos órganos albergan empalizadas de RG que sirven tanto como generadores de nuevas neuronas como organizadores secundarios del desarrollo por medio de la creación de gradientes de señalización. Estos estudios llevaron además a la identificación de un nuevo órgano cerebral durante el desarrollo del SNC, el órgano post arcuato (Ortega et al., 2021).

Sin embargo, la acción del sistema purinérgico no queda relegada al desarrollo embrionario, sino que continúa tanto en el período posnatal como en el estadio adulto. En trabajos recientes de nuestro grupo se ha prestado especial atención a otro componente purinérgico, el transportador vesicular de nucleótidos, VNUT, en el desarrollo posnatal del cerebelo. Este transportador se expresa mayoritariamente en la corteza cerebelosa. Además, VNUT se ha detectado en los progenitores de neuronas granulares y en neuronas inmaduras, lo que sugiere un papel del transportador en el desarrollo y maduración de este tipo neuronal (Menendez-Mendez et al., 2017). De hecho, la sobreexpresión de VNUT en la línea celular N2a diferenciada con ácido retinoico, disminuye la neuritogénesis (Menendez-Mendez et al., 2015).

La señalización purinérgica en el cerebelo se mantiene hasta el estadio adulto. Todos los tipos celulares presentes en la corteza cerebelosa expresan receptores purinérgicos, receptores de nucleótidos y receptores de adenosina (Courjaret et al., 2012, Deitmer et al., 2006, Rudolph et al., 2016), y su activación podría ser vital para el mantenimiento de la función neuronal en situaciones de daño cerebral como en condiciones de estrés oxidativo, o estrés genotóxico. Nuestro grupo, utilizando cultivos primarios de neuronas granulares, la población más abundante de la corteza cerebelosa, y de astrocitos cerebelosos, ha demostrado que la estimulación de los receptores P2Y₁₃ y los receptores P2X7 activa una serie de cascadas de señalización intracelular que induce la expresión de genes neuroprotectores como son la hemooxigenasa 1 (Espada et al., 2010) y las proteínas fosfatasas de especificidad dual, DUSP1, DUSP2 y DUSP6 (Miras-Portugal et al., 2019b, Perez-Sen et al., 2019, Perez-Sen et al., 2015). Estas proteínas fosfatasas parece jugar un papel esencial en el control de la duración y la magnitud de la activación de las proteínas MAP quinasas en los diferentes compartimentos intracelulares (Queipo et al., 2017). La inducción de las actividades fosfatasas llevada a cabo tras la estimulación de los receptores nucleotídicos P2Y₁₃ y P2X7 impide la sobreactivación de las MAP quinasas, p38 y ERKs, que se origina por la aplicación de estímulos dañinos como el tratamiento con peróxido de hidrógeno, agentes genotóxicos como el cisplatino, o la excitotoxicidad inducida por concentraciones elevadas de glutamato (Ortega et al., 2011b, Ortega et al., 2010, Perez-Sen et al., 2019). Estos estudios también revelaron que los nucleótidos podrían actuar como agentes neuroprotectores cuando se produjera una depleción de factores neurotróficos (Ortega et al., 2010). Además, en los astrocitos cerebelosos, la activación de los receptores P2Y₂/P2Y₄ potencia la señalización por calcio, activa las proteínas ERKs y estimula la migración celular. Mientras, que el tratamiento con prostaglandina E₂ (PGE₂) o con agonistas del receptor EP3 reduce los efectos producidos tras la activación de los receptores P2Y₂/P2Y₄, mediante la transactivación del receptor de EGF (Paniagua-Herranz et al., 2017).

Otra de las áreas donde la señalización purinérgica está muy presente en el cerebro adulto, son, precisamente, los dos principales nichos neurogénicos (SGZ y SEZ). Sin embargo, esta tesis se centrará en su acción en la SEZ.

4.4.6 El sistema purinérgico en la SEZ adulta

La señalización purinérgica también podría estar participando en el manteniendo del proceso de neurogénesis en la SEZ en el adulto. De hecho, la enzima NTPDase2 está fuertemente expresada en los progenitores de dicho nicho, así como en la vía migratoria rostral (Braun et al., 2003). Su delección en ratones resulta en un aumento de la proliferación de los progenitores neuronales. Además, pone de manifiesto el papel de la enzima NTPDase2 como regulador homeostático de la proliferación y expansión de los progenitores neurales mediada por los nucleótidos en condiciones basales (Gampe et al., 2015b).

Asimismo, en neuroesferas aisladas de la SEZ de ratón adulto, se ha detectado ARN mensajero de todos los receptores P2Y salvo del P2Y₄ (Grimm et al., 2009, Mishra et al., 2006). A tenor de estos resultados, se observó que la estimulación con ATP, ADP y UTP de los receptores P2Y₁ y P2Y₂ en cultivos de neuroesferas de la SEZ de ratón, generaba un aumento de la concentración de calcio intracelular, potenciando la proliferación de los progenitores neurales de manera sinérgica con los factores de crecimiento. Mientras que la aplicación de MRS2179, un antagonista del receptor P2Y₁, atenuaba la proliferación de las neuroesferas inducida por los factores de crecimiento. Lo mismo ocurría en ratones KO para el receptor P2Y₁ (Mishra et al., 2006). Igualmente, la estimulación intracerebroventricular con ATP potenciaba la proliferación de las NSCs en la SEZ de ratón (Boccazzi et al., 2014). Mientras que el incremento en el número de NSCs y progenitores neurales inducido por la estimulación intracerebroventricular con ATP, se veía inhibido cuando se pre-trataba intracerebroventricularmente con un antagonista del receptor P2Y₁ (Suyama et al., 2012). Pero no solo los receptores P2Y modulan la neurogénesis, sino que el tratamiento de las NSCs con agonistas purinérgicos como ATP, UDP y ADP β S potencia la migración celular, así como diversos procesos que dirigen a las nuevas neuronas a sus sitios de destino. Probablemente, esta modulación es llevada a cabo por los receptores P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₁₃ (Grimm et al., 2009).

Atendiendo a los receptores P2X, se ha demostrado que el receptor P2X₇ regula la neurogénesis en condiciones patológicas, es decir cuando las células madre presentan una proliferación descontrolada. Dicho receptor se expresa en las células madre de la SEZ y en las células endimarias (Genzen et al., 2009, Messemer et al., 2013). Por ello, se ha sugerido que este receptor controla el balance en el número de neuronas, promoviendo la apoptosis y necrosis de las NSCs (Delarasse et al., 2009, Ulrich and Illes, 2014).

Todos estos hallazgos indican que el sistema purinérgico podría ser una diana farmacológica para modular la neurogénesis adulta en la SEZ. Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de estos estudios se ha realizado en el modelo de cultivo de neuroesferas, o sobre poblaciones celulares. Por tanto, todavía queda mucho por conocer sobre el efecto que ejerce la señalización purinérgica sobre los diferentes tipos celulares generados durante la progresión del linaje neural.

5. OBJETIVOS

En base a los antecedentes previamente indicados, en el presente trabajo se pretende responder a las cuestiones que siguen vigentes respecto a la biología celular de las NSCs. En concreto: I) ¿Dependen las NSCs de su nicho local o de programas intrínsecos para progresar en el linaje?, o ¿es una suma de ambos? II) ¿Puede una NSCs dar lugar a todos los tipos celulares, o presenta restricciones en la elección de su destino celular? III) ¿Cuáles son las vías de señalización, en concreto las directamente relacionadas con la señalización purinérgica, implicadas en la regulación del proceso de neurogénesis? Para abordar estas cuestiones, nos hemos centrado en el estudio del comportamiento de las NSCs en dos estadios y nichos neurogénicos distintos: el cerebelo posnatal y la zona subependimaria adulta. Asimismo, hemos analizado el papel del sistema purinérgico en la modulación de la neurogénesis posnatal y adulta. En cuanto al cerebelo posnatal y considerando la fuerte expresión de VNUT, hemos analizado el efecto de la modulación del transportador sobre la dinámica de los progenitores neurales cerebelosos. Mientras, que en la zona subependimaria adulta nos hemos centrado en esclarecer el papel de los receptores de nucleótidos de tipo metabotrópico.

Así, los objetivos fijados en el presente trabajo de investigación han sido:

1. Consolidar un método de cultivo seguido de la video-microscopía de time-lapse que permita analizar, de forma simultánea, los tres nichos proliferativos contenidos en el cerebelo posnatal.
2. Estudiar el papel del transportador vesicular de nucleótidos VNUT sobre estos nichos.
3. Determinar los principales receptores de nucleótidos selectivos para ADP presentes en las poblaciones del linaje neural contenidas en la zona subependimaria adulta, mediante el estudio de su expresión, distribución específica y funcionalidad.
4. Análisis de la modulación *in vitro* del receptor P2Y₁₃ sobre la neurogénesis de la zona subependimaria adulta.
5. Estudio del papel modulador del receptor P2Y₁₃ *in vivo*.



6. MATERIALES y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 Animales de experimentación

Los estudios se han realizado con ratones C57BL/6 proporcionados por el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM) y de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Los animales estaban estabulados con comida y agua *ad libitum*, temperatura controlada y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Para el estudio de los progenitores neurales de cerebelo se utilizaron ratones C57BL/6 de diferentes edades, recién nacidos (P0) y de 5 días posnatal (P5), 7 días posnatal (P7) y 15 días posnatal (P15). Para la realización de los cultivos de progenitores neurales de la zona subependimaria adulta se utilizaron de animales de entre 8 y 12 semanas.

En todo momento la manipulación de los animales se realizó siguiendo la normativa internacional para el manejo de animales de experimentación de laboratorio (ICLAS y la normativa vigente en nuestro país (2010/63/EU; RD53/2013)). Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal de la UCM así como por el órgano habilitado de la Comunidad de Madrid (PROEX 286/15 y PROEX 178.5/2020).

6.1.2 Líneas Celulares

En este trabajo se ha utilizado la línea celular de neuroblastoma de ratón Neuro2a (N2a), establecida a partir del tumor espontáneo de un ratón albino de la cepa A (Klebe, 1969).

6.2 Equipos

A continuación se detalla los equipos que se han utilizado para el desarrollo de este trabajo (Tabla 3).

Tabla 3. Relación de los instrumentos utilizados

Categoría	Instrumento	Modelo/Casa comercial
Uso general	Autoclave	Presoclave – II/P Selecta
	Agitadores magnéticos	Bunsen y Agimatic-S/Selecta
	Agitadores orbitales	Rocker 3D/IKA y Polymax 1040/Heidolph
	Baño termostatzado	LAUDA Scientific
	Balanzas electrónicas de precisión	ER-60A/A&D y FX-2000
	Termobloques	Thermomixer comfort y Compact/Eppendorf
	Microcentrífuga	5414 R/Eppendorf
	Centrífuga	5702 R/Eppendorf
	Micropipetas	Eppendorf y Gilson
	Puntas de pipeta (10 µL - 5000 µL)	Diamond/Gilson
	Sistema de aspiración	Vacunsafe/Integra
	pHmetro	pH METER GLP-21/Crison
	Sistema de purificación de agua	Elix 3 y Advantage Mili-Q/Millipore
	Neveras y congeladores	Liebherr

	Ultracongelador	Evolution/Froilabo
	Microscopio confocal	TCS SPE/Leica
	Microscopio de contraste de fases invertido	Nikon TE-2000
Cultivos celulares	Placas de cultivo 6 well	Falcon BDScience
	Placas de cultivo 24 well	Jet Biofil
	Cubreobjetos de vidrio	Thermo Fisher Scientific
	Cubreobjetos de plástico	Sarstedt
	Cubreobjetos con guía	Eppendorf
	Filtros estériles	Acrocap y Acrodisc/Pall
	Jeringas estériles	Falcon BDScience
	Pipetas estériles	Biofil
	Campana de flujo laminar vertical	Angelantoni Life Science
	Incubador	Galaxi 48R/New Brunswick Scientific
	Pipetas Pasteur de vidrio de punta fina	Brand y Corning
	Tubos cónicos de centrifuga (15-50 mL)	Jet Biofil y Axygen
	Tubos de microcentrífuga (0,5-2 mL)	Axygen
	Cámara de Neubauer	Brand
Videomicroscopía de time-lapse	Microscopio de campo claro/contraste de fase/fluorescencia	Nikon TE-2000
	Objetivos CFI PLAN FLUOR DLLL 10X	Nikon
	Objetivo CFI SUPER PLAN FLUOR ELWD AMD 20X	Nikon
	Fluorescencia LED pE-300	Cool LED
	Sistema de termostatación 310M-201	OKO-Lab
	Sistema de incubación (CO ₂) OKO touch	OKO-Lab
	Sistema motorizado Pro-ScanII	Prior
	Cámara para microscopio de alta precisión versión 4.2 Andor zyla USB3	ANDOR Zyla
Expresión génica	Software: NIS-Elements AR4.5	Nikon
	Puntas de pipetas con filtro (10-1000 µL)	DeckWorks/Corning
	NanoDrop One	Thermo Fisher
	Microplacas de 96 pocillos	Axygen
Western Blot	Termociclador de PCR a tiempo real	Step One Plus/Applied Biosystems
	Espectrofotómetro	Biophotometer Plus/Eppendorf
	Equipo de electroforesis	Mini-Protean/Bio-Rad
	Equipo de transferencia	Mini-Trans-Blot/Bio-Rad
Inmunofluorescencia	Detector de quimioluminiscencia	Las 500/GE Healthcare
	Criostato CM1950	Leica
	Vibratomo	VT1000 S/Leica
	Microscopio confocal TCS SPE	Leica
Microfluorimetría de calcio	Objetivo Nikon 20X	Nikon
	Microscopio de fluorescencia Nikon TE-200	Nikon
	Objetivo Nikon 20X	Nikon
	Cámara ORCA-ER C 47 42-80	Hamamatsu

Inyección estereotáxica	Software: MetaFluor 6.2r	Universal Imaging Corp
	Equipo estereotáxico digital	RWD life science
	Bomba de perfusión	KDS-310-PLUS/Kd scientific
	Micromotor rotatorio	K.1070/Foredom
	Jeringa Hamilton	7000 series Neuros syringes/Hamilton
	Lámpara	MEB115/Leica SD6

6.3 Reactivos y productos químicos

Las soluciones y medios empleados se prepararon con sales inorgánicas de Merk y Sigma de grado analítico (pro anal.) disueltas en agua desionizada de alta calidad y pureza. En la **Tabla 4** se detallan los reactivos y compuestos utilizados en cada uno de los procedimientos experimentales realizados, así como la casa comercial que los suministra.

Tabla 4. Relación de los diferentes reactivos y compuestos utilizados.

Categoría y uso	Reactivo	Casa comercial
Cultivo progenitores cerebelo		
Medio de cultivo	Neurobasal, suplemento B27, glutamina, antibióticos/antimicóticos, azul tripán	Gibco Sigma-Aldrich
Solución de disociación	Kit de digestión enzimática con papaína	Worthington
	Poli-L-lisina de alto peso molecular (MW>300000)	Biochrom AG
Cultivo progenitores SEZ		
Solución de disociación	Tripsina y hialuronidasa en polvo	Sigma-Aldrich
	Poli-D-Lisina	Sigma
Medio de cultivo	Solución 1: HBSS 10x, HEPES, D-(+)-glucosa	Gibco Sigma-Aldrich
	Solución 2: HBSS 10, D-(+)-sacarosa	Gibco Sigma-Aldrich
	Solución 3: HEPES, EBSS 1X, BSA	Gibco Sigma-Aldrich
	Penicilina-estreptomicina, glutaMAX, suplemento B27, HEPES, Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM/F12)	Gibco
Cultivo línea celular N2a		
Medio de cultivo	DMEM Tripsina	Gibco Thermo Fisher Scientific
Transfección	Lipofectamina™ 3000	Thermo Fisher Scientific
Farmacología		
Agonistas y antagonistas purinérgicos Inhibidores	2MeSADP, MRS221	Tocris
	Clodronato	Sigma-Aldrich

Estudios de expresión génica	Ultra-Turrax T8	IKA
Homogeneizador tejido	Speedtools Total RNA Extraction Kit	Biotoools
Extracción y purificación de ARN	β -mercaptoetanol	Calbiochem
RT-PCR	Etanol	Merck
Q-PCR	Reactivos para la retrotranscripción y enzima M-MLV	Invitrogen
	Lumino Ct QPCR Ready Mix	Sigma-Aldrich
	Sondas Taqman Gene Expresión Assay	Thermo Fisher
	Sondas de Universal ProbeLibrary	Scientific
		Roche Life Science
Inmunotransferencia		
Extracción de proteínas y determinación de concentración	β -glicerol fosfato, EDTA, EGTA, MOPS, NaF, Ortovanadato, PMSF, Tris-HCl, NaCl	Sigma-Aldrich
	Cóctel inhibidor de proteasas Complete	Roche
	Reactivo de Bradford	Bio-Rad
Electroforesis y transferencia	Bis-acrilamida, azul de bromofenol, β -mercaptoetanol, persulfato amónico, glicina, SDS, TEMED	BioRad
	Patrón de peso molecular Spectra	Thermo Fisher
	Multicolor Broad Range protein ladder	Macron
	Metanol	GE Healthcare
	Membranas PVDF	
Bloqueo y lavados	Albúmina de suero bovino (BSA), Trizma, Tween-20	Sigma-Aldrich
Anticuerpos primarios	Anti-P2Y _{1/13}	Alomone Labs
	Anti-VNUT	MBL
	Anti-GAPDH	Merck-Millipore
	Anti- α -tubulina	Sigma-Aldrich
Anticuerpos secundarios	Anti-IgG de ratón-HRP, anti-IgG de conejo-HRP	Dako
Inmunocitofluorescencia e inmunohistofluorescencia		
Inclusión de tejidos	Tissue-Tek, O.C.T. (Optimal Cutting Temperature médium)	Sigma-Aldrich
Fijación y bloqueo	p-formaldehído, suero fetal bovino, BSA, Triton X-100	Sakura
Anticuerpos primarios	Anti SOX2 (<i>in vitro</i>)	Abcam
	Anti SOX2 (<i>in vivo</i>)	ABclonal
	Anti VNUT (biotinilado)	MBL
	Anti GFAP	Sigma-Aldrich
	Anti β III Tubulina	Sigma-Aldrich
	Anti Dcx	Millipore
	Anti VGLUT1	Synaptic Systems
	Anti VGAT (biotinilado)	Synaptic Systems
	Anti Sinaptofisina	Sigma-Aldrich
	Anti Sinaptobrevina	Sigma-Aldrich
	Anti LAMP-1	Sigma-Aldrich
	Anti nestina	Santa Cruz
	Anti O4	Merck Millipore

Biotina/estreptavidina	Anti ki67 Anti Mash1 Anti GFP	Fisher Scientific BD Biosciences AvesLab
	Anticuerpos biotinilados anti-IgG de conejo y de ratón Estreptavidina 488, 594, 647	Thermo Fisher Scientific
	Alexa 488 anti-IgG de conejo y de ratón Alexa 594 anti-IgG de conejo y de ratón Alexa 647 anti-IgG de conejo y de ratón Anti 488 anti-IgG2b de ratón Anti 649 anti-IgG1 de ratón	Thermo Fisher Scientific
	DAPI	Thermo Fisher Scientific
Montaje	Medio de montaje Aqua Poly-mount	PolySciences
Microfluorimetría de calcio Sonda fluorescente de calcio	Fura-2-AM	Molecular Probes
Electrofisiología Fármacos	GABA, serotonina, glutamato y MK-801	Sigma-Aldrich
Perfusión Anestésicos	Anesketin (ketamina) Xylasol (xilacina)	Dechra Laboratorios Karizoo
Inyección estereotáxica Solución Sleep	Fentanilo Dormicum (midazolam) Dormitor (Hidrocloreto de medetomidina)	Dechra Normon Fatro
Solución Awake	Buprenorfina Hidrocloreto de atipamezon Flumazenilo	Pharma Karizoo Fresenius Kabi

Tabla 5. Relación de soluciones utilizadas en el cultivo de los progenitores neurales de cerebelo posnatal de ratón. Previo a la realización del cultivo de los progenitores de cerebelo hay que reconstituir los distintos viales del Kit de digestión enzimática con papaína que se utilizarán en cada paso.

Soluciones	Composición
Inhibidor albúmina-ovomucoide	Añadir 32 mL de EBSS al vial 4 y mantenerlo a -20 °C en alícuotas de 4 mL.
Solución de ADNasa	Añadir al vial 3 500 µL de EBSS y 5 µL APV (5 mM).
Solución de papaína	Añadir al vial 2, 5 mL de EBSS y 50 µL APV (5 mM) e incubar durante 15 min en un incubador de atmósfera controlada de CO ₂ al 5%, saturada de humedad y temperatura constante a 37°C. Después, añadir 250 µL del vial 3 reconstituido.
Medio de cultivo	Neurobasal suplementado con 2% de B-27, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomycin, anfotericina 0,25 µg/mL y glutamina 0,5 mM.

Tabla 6. Relación de soluciones utilizadas en el cultivo de los progenitores de la zona subependimaria

Soluciones	Composición
Solución 1 (HBSS-glucosa)	6 mL de D-(+)-glucosa al 45% (w/v), 7,5 mL de HEPES 1M, 50 mL de HBSS 10X en agua pura filtrada hasta un volumen final de 500 mL (pH 7,5).
Solución 2 (sacarosa-HBSS)	154 g de D-(+)-sacarosa, 25 mL HBSS 10X en agua pura filtrada hasta un volumen final de 500 mL (pH 7,5).
Solución 3 (BSA-EBSS-HEPES)	10 mL de HEPES, BSA al 4% (w/v) en EBSS hasta un volumen final de 500 mL (pH 7,5).
Medio de cultivo	DMEM-F12 suplementado con B27 al 2%, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomycin y glutamina 0.5 mM.

Tabla 7. Relación de soluciones utilizadas para la realización de los distintos procedimientos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

Solución	Composición
Master mix (Retrotranscripción ARN)	23 µL tampón de la transcriptasa reversa M-MLV 5X, 1 µL de ARNase out™ (40U), 2 µL de transcriptasa reversa M-MLV 400 UI, 4 µL de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM y de DTT 0,1 M y 5 µL de agua libre de endonucleasas.
Tampón de lisis para extracción de proteínas de tejido	Tris-HCL 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, 1% NP40 X-100, inhibidor de proteasas de Roche 1x y ortovanadato 1 mM.
Tampón de lisis para extracción de proteínas de cultivos	MOPS (ácido Morfolino-Propano-Sulfónico) 20 mM, β-glicerolfosfato 40 mM, NaF 50 mM, EDTA 5mM, ortovanadato 1 mM, 0,5% (v/v) Triton X-100, EGTA (Ácido Etilenglicol-bis(2-Aminoetiléter)-N,N,N'-Tetraacético) 2 mM, cóctel inhibidor de proteasas y 0,2 mg/mL de PMSF (Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo).
Tampón de carga 4X	Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol al 50% (v/v), azul de bromofenol al 8% (p/v), β-mercaptoetanol al 5% (v/v).
Tampón de electroforesis	Tris 2 5mM, glicina 200 mM, 0,1% SDS, pH 8,3.
Tampón de transferencia	Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v), pH 8,3.
Solución anestésica para perfusión	1 mL de Ketamina al 10% (100 mg/kg de peso corporal), 0,25 mL de hidrocloreuro de Xilacina al 2% (mg/kg de peso corporal) y 2,5 mL de suero salino.
Solución de almacenamiento de secciones histológicas	30 mL de glicerol, 30 mL de etilenglicol y 10 mL de tampón fosfato 10X en agua pura filtrada (V. final = 100 mL).
Tampón fosfato 10X	6,5 g de NaH ₂ PO ₄ en agua pura filtrada hasta 50 mL (pH 7,4)
Locke de perfusión	NaCl 140 mM, KCl 4,7 mM, CaCl ₂ 2,5 mM, MgSO ₄ 1,2 mM, KH ₂ PO ₄ 1,2 mM, Glucosa 5,5 mM, HEPES 10 Mm (pH 7,4).
Solución sleep	Fentanilo 5 µg/mL, midazolam 0,5 mg/mL e hidrocloreuro de medetomidina 1 mg/mL en suero salino hasta un volumen final de 5 mL.
Solución awake	Buprenorfina 0,3 mg/mL, hidrocloreuro de atipamezol 0,25 mg/mL y flumazenilo 50 µg/mL en suero salino hasta un volumen final de 5 mL.

6.4 Métodos

6.4.1 Obtención y cultivo de progenitores neurales de cerebelo posnatal de ratón

Para el aislamiento y obtención de progenitores neurales de cerebelo posnatal se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 a día posnatal 0 (P0) o P5. Los ratones se sacrificaron por decapitación y la cabeza se colocó en una placa Petri de 60 mm de diámetro con medio Neurobasal (NB) frío. Para localizar la parte posterior del cráneo se sujetó la cabeza con unas pinzas de 13 cm. A continuación, se insertó a través del *foramen magnum* unas microtijeras de disección y se realizó un corte hacia los ojos. Tras ello, se separó la piel de la cabeza con unas pinzas curvas y se levantó el cráneo, dejando el cerebro visible. Seguidamente, se separó el cerebelo del resto del cerebro y se retiraron las meninges con agujas hipodérmicas 30G. Los cerebelos se depositaron en una placa de 35 mm con EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*) frío.

Tras la extracción de todos los cerebelos, se cambió el medio EBSS por la solución de papaína (Tabla 5) y se disgregaron mecánicamente con un bisturí. A continuación se mantuvieron durante 45 minutos en un incubador de atmósfera controlada de CO₂ al 5%, saturada de humedad y temperatura constante a 37°C, para favorecer la digestión enzimática del tejido. Tras la disociación enzimática se recogieron los fragmentos con una pipeta Pasteur siliconizada y se transfirieron a un tubo cónico de centrífuga de 15 mL. La completa disgregación del tejido se obtuvo realizando 10-15 pases subiendo y bajando con una pipeta Pasteur siliconizada. Tras ello, se centrifugó a 37°C la mezcla homogénea durante 5 min a 200 *g* y el sedimento obtenido se resuspendió en una solución que contenía 2,7 mL de EBSS, 300 µL de vial 4, 150 µL de la solución de ADNasa (vial 3) y 30 µL de APV (5mM). Para ello se pipeteó la mezcla subiendo y bajando varias veces con la pipeta Pasteur siliconizada. Posteriormente, se transfirió lentamente a otro tubo de 15 mL que contenía la solución de inhibición (vial 4), formando así un gradiente de densidad que debe ser claramente visible. Seguidamente, se centrifugó a 37°C durante 5 min a 200 *g* y se resuspendió el sedimento en 2 mL de medio NB. Después, se realizó el conteo del número de células aisladas en una cámara de Neubauer utilizando el colorante vital azul tripán. Las células viables eran aquellas que no incluían el colorante. La densidad celular (N° células/mL) se calculó siguiendo esta ecuación:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/mL} = \text{N}^{\circ} \text{ células contadas} \times 10^4 \times \text{Factor de dilución.}$$

Los progenitores neurales de cerebelo se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm² en el medio de cultivo (Tabla 5) en una placa multiwells P24 tratada el día anterior con Poli-L-Lys (PLL) a 10 µg/mL disuelta en agua ultrapura estéril (Figura 11). Seguidamente se añadió el clodronato (100 nM) a los pocillos correspondientes. Para la realización de los experimentos de electrofisiología la siembra se realizó en cubreobjetos de vidrio previamente tratados con PLL. Tras 24 horas se cambió el medio por medio de cultivo fresco y se volvió a añadir el clodronato en los pocillos correspondientes. Los cultivos se

mantuvieron en un incubador de atmósfera controlada de CO₂ al 5%, saturada de humedad y temperatura constante a 37°C.

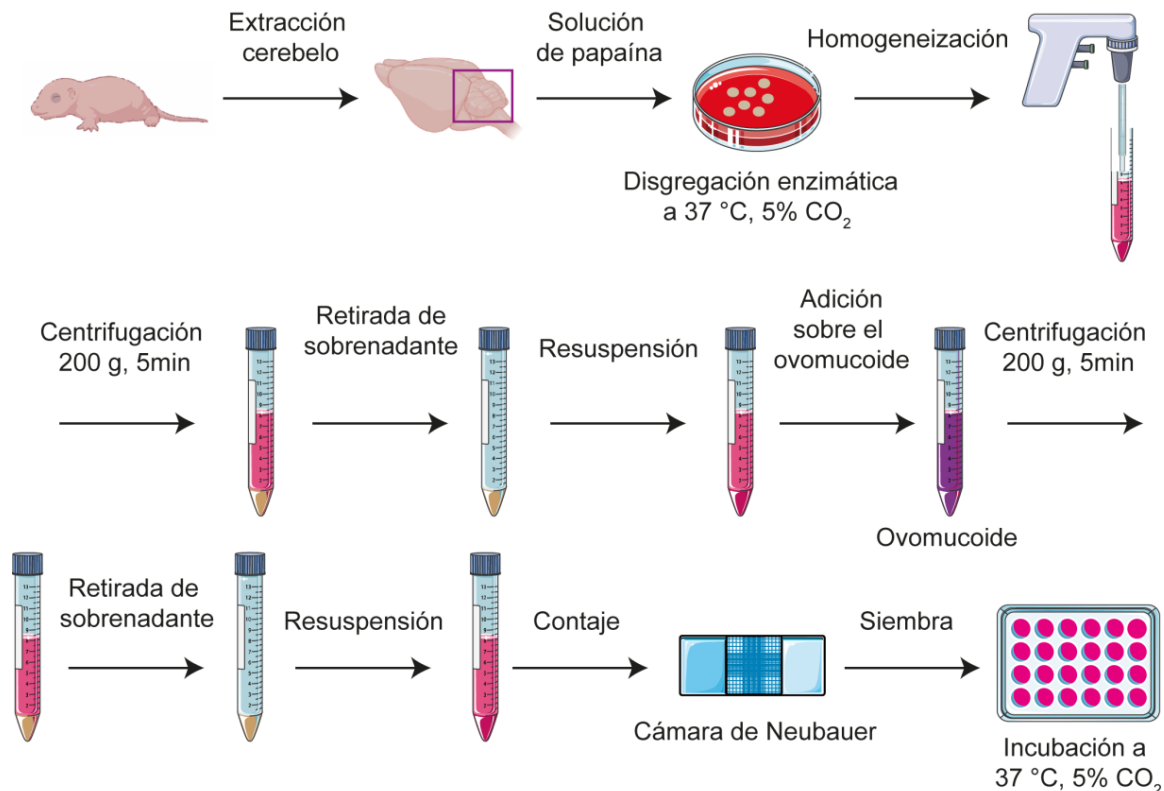


Figura 11. Representación esquemática de la obtención y siembra de los progenitores de cerebelo posnatal

6.4.2 Aislamiento de progenitores neurales de la zona subependimaria de cerebro de ratón adulto

Para el aislamiento y obtención de los progenitores neurales de la zona subependimaria se utilizaron ratones de 2-3 meses de edad de la cepa C57BL/6. Dichos ratones se sacrificaron por inhalación de CO₂ y posterior dislocación cervical y decapitación. Posteriormente se extrajeron los cerebros y se introdujeron en un tubo cónico de centrifuga de 50 mL con medio de disección frío (HBSS 1X y HEPES 1M). Tras ello, se realizó la extracción de la zona subependimaria en una placa Petri de 35 mm con medio de disección frío y con ayuda de una lupa Optika LAB-20 (Figura 12). Para ello a la altura del quiasma óptico se realizó un corte coronal y se separaron ambos hemisferios. Posteriormente, se abrieron los ventrículos con ayuda de unas pinzas de disección y con unas microtijeras se diseccionó la zona subependimaria y se depositó en un tubo cónico de centrifuga de 15 mL con medio de disección frío.

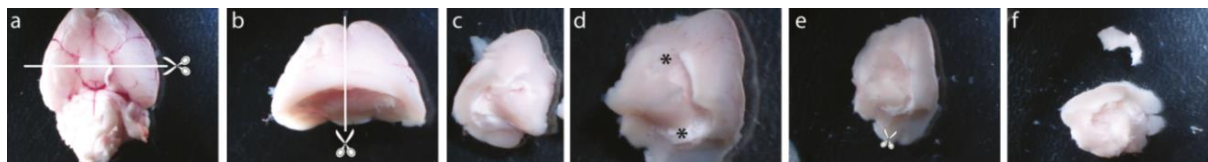


Figura 12. Aislamiento de la zona subependimaria. (a) Vista ventral del cerebro de ratón adulto. Se señala la zona de corte a la altura del quiasma óptico. (b) Vista dorsal del cerebro tras el corte. Se señala la zona de corte para separar los dos hemisferios. (c) Vista medial del hemisferio izquierdo. Con unas pinzas se abre el ventrículo de caudal a rostral. (d) Imagen de la pared lateral del ventrículo lateral delimitada con dos asteriscos. (e) Con una microtijeras se corta el perímetro de la SEZ y se separa de estriado. (f) Vista de la SEZ aislada. Imagen modificada de (Ortega et al., 2011a)

Tras el aislamiento de todo el tejido, se aspiró el medio de disección y se añadieron 5 mL de solución de disociación (3,4 mg de tripsina y 3,5 mg de hialuronidasa en 5 mL de solución 1, (Tabla 6) filtrada utilizando un filtro de 0,2 μm de diámetro de poro. Se procedió a la incubación del tejido a 37°C durante 14 min para su digestión enzimática. Tras ello, se dieron entre 8 y 10 pases subiendo y bajando con una pipeta de 5 mL y se realizó una segunda incubación durante 14 min adicionales a 37°C. Pasados los 14 min, se paró la digestión enzimática añadiendo 5 mL de solución 3 (Tabla 6) con una pipeta de 10 mL y se dieron 10 pases adicionales. El volumen resultante se pasó por un filtro de 70 μm de poro a un tubo cónico de centrifuga de 50 mL. A continuación, se traspasó el volumen filtrado a un tubo cónico de centrifuga de 15 mL y se centrifugó a 4°C durante 5 min a 300 g. Tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el sedimento obtenido en 10 mL de solución 2 fría (Tabla 6) y se centrifugó a 4°C durante 10 min a 700 g. Posteriormente, se resuspendió el sedimento en 1 mL de solución 3 fría y después se añadieron otros 12 mL de la misma solución. A continuación, se centrifugó a 4°C durante 7 min a 400 g. Finalmente, el sedimento obtenido se resuspendió en medio de cultivo. La suspensión celular resultante se sembró en una placa multiwell P24 tratada previamente con poli-D-Lys (PDL) en agua ultrapura estéril a 0,1 mg/mL. En función del procedimiento experimental a realizar la suspensión celular se sembró en gota 100 μL /pocillo sobre cubreobjetos de plástico o directamente sobre el fondo del pocillo (Figura 13).

Los cultivos se mantuvieron en un incubador de atmósfera controlada de CO_2 al 8%, saturada de humedad y temperatura constante a 37°C durante 2 horas. Transcurridas las 2 horas se añadieron 400 μL adicionales de medio de cultivo por pocillo y los agentes farmacológicos correspondientes (2MeSADP 1mM, MRS221 1mM y MRS2179 1 mM). Los cultivos se mantuvieron en las condiciones indicadas anteriormente y a las 24 horas se añadieron 500 μL de medio de cultivo y los agentes correspondientes.

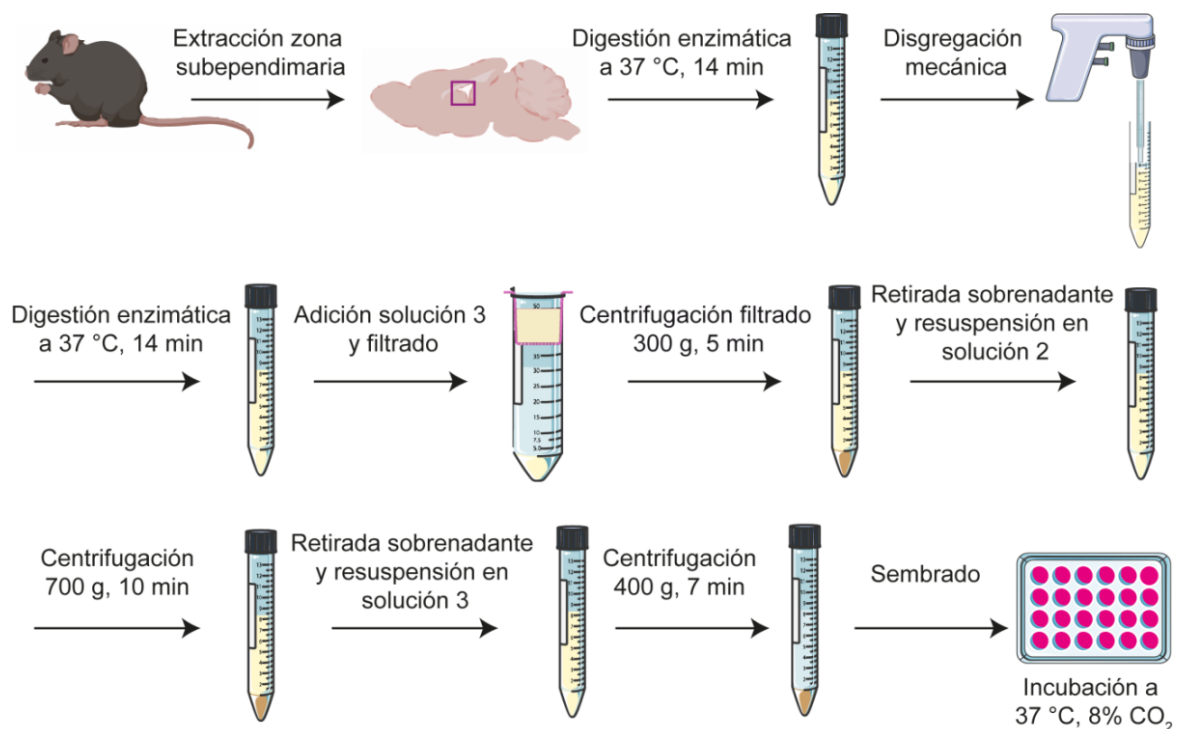


Figura 13. Representación esquemática de la obtención de progenitores de la zona subependimaria adulta

6.4.3 Cultivos de la línea celular de neuroblastoma de ratón N2a

Las células N2a se cultivaron en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) de alto contenido en glucosa (4500 mg/L glucosa) suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, GlutaMAX 1% y 10% de suero fetal bovino inactivado (FBSi) en un incubador de atmósfera controlada de CO₂ al 5%, saturada de humedad y una temperatura de 37°C. Después, se tripsinizaron y resembraron en botellas de 75 cm² de tampón ventilado en pases de 1:3-1:6 cada dos o tres días para su correcto mantenimiento.

6.4.4 Videomicroscopia de time-lapse y seguimiento del comportamiento celular

Primeramente, se realizó una marca en la base de la placa de cultivo con las células sembradas como punto de referencia (coordenadas x,y,z=0,0,0). A continuación, se colocó sobre la platina termostatzada a 37°C y 8% de CO₂ de del microscopio Nikon TE-200, y se esperó 20 min para que se estabilizara el sistema, evitando así alteraciones en el enfoque. Seguidamente se inició el software NIS-elements AR 4.5 de Nikon y, dentro de este, el módulo de timelapse (ND-acquisition) y se seleccionaron las condiciones del experimento, la duración, los ciclos de adquisición de las imágenes, etc. Tanto para la monitorización del comportamiento de los progenitores neurales del cerebelo como de la zona subependimaria la duración fue de 4-5 días y se usaron ciclos de 5 min. Después, se buscó la marca previamente realizada cuyas coordenadas se definieron como el punto de referencia

(posición 1). A partir de ahí, se seleccionaron las distintas posiciones (coordenadas x e y) y se ajustó el foco (coordenada z). De cada pocillo se eligieron entre 10 y 15 campos distintos. A continuación, se determinó el tipo de adquisición (longitudes de onda) y el tiempo de exposición, que fueron campo claro y 10-50 ms, respectivamente.

Una vez elegidos todos los parámetros se inició el experimento, que se re-enfocó cada día para evitar la pérdida de foco y por lo tanto de calidad de video, lo que podría impedir un correcto seguimiento de las células en cultivo. Al finalizar el experimento, se realizó una inmunocitofluorescencia.

6.4.4.1 Procesamiento de los datos

Antes de comenzar con el seguimiento de las células individuales, se procesaron las imágenes obtenidas siguiendo las instrucciones del manual de usuario del software (<https://bsse.ethz.ch/csd/software/ttt-and-qtfy.html>).

En primer lugar se renombró el canal de las imágenes obtenidas, cambiándolo de c1 a c0 para campo claro. Para las imágenes de fluorescencia se cambió c1 por c2 para FICT, por c3 para CY3 y por c4 para CY5. Después, se convirtieron las imágenes renombradas al formato PNG. Por último, se definieron los marcadores para la posición (xy), el tiempo (t) y el canal (c), mediante el software tTt Converter tool.

6.4.4.2 Seguimiento de célula única.

El análisis de las imágenes se realizó con el software tTt, a través del cual se llevó a cabo el seguimiento de las células de interés en la posición seleccionada. Este software es de libre acceso (<https://bsse.ethz.ch/csd/software/ttt-and-qtfy.html>).

Primeramente se seleccionó la posición a analizar y se cargaron todas las imágenes de la posición, abriéndose así una pantalla que mostraba todas las imágenes obtenidas durante el experimento. Seguidamente se comenzó el seguimiento de célula única presionando la tecla F2, se situó el puntero del ratón sobre la célula que se quería seguir y se presionó la tecla 0. Durante la progresión del experimento se registraron los diferentes eventos que sufría la célula, pulsando las opciones de división celular, apoptosis o pérdida de la célula que se muestran en la ventana de edición celular. Estos eventos aparecerán en el árbol de linaje. El procedimiento se repitió para todas las posiciones del experimento.

Una vez finalizado el seguimiento del experimento se procedió al exportado de los datos mediante la opción “*Export menu*”. De cada célula analizada se exportó el árbol del linaje (*Export tree*), los datos de duración de ciclo celular y migración (*Cell speed*), así como, la película a través de la pantalla “*Movie Window*”. Las películas se ensamblaron con el programa ImageJ.

6.4.5 Estudios de expresión génica

Los estudios de expresión génica se realizaron a través de la técnica de transcripción inversa, seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real, permitiendo la cuantificación relativa de los transcritos expresados.

6.4.5.1 Extracción ARN

La obtención de ARN total de las muestras se realizó siguiendo el protocolo indicado por el fabricante del *kit* comercial “*SpeedTool Total RNA Extraction kit*”. Dicho *kit* se basa en la adsorción del ARN a una columna de gel de sílice en presencia de agentes caotrópicos.

La extracción de ARN a partir de los cultivos de progenitores neurales del cerebelo precisó aunar varios pocillos para obtener una cantidad de ARN detectable y de elevado grado de pureza, ya que estos cultivos se siembran a muy baja densidad. Para la realización del procedimiento, se aspiró el medio de cultivo de las placas y se añadieron 350 µL de tampón de lisis con β-mercaptoetanol divididos entre el número de pocillos que se iban a aunar. Con la ayuda de raspadores celulares estériles se lisaron las células. Todo el procedimiento de extracción de ARN se realizó en condiciones libres de ARNasas.

Los lisados obtenidos se transfirieron a tubos de 1,5 mL libres de ARNasas y se homogeneizó mediante el empleo del vórtex. Tras ello, el lisado celular se transfirió a una columna de filtrado sobre un tubo colector de 2 mL y se centrifugó durante 1 min a 11.000 *g*. De esta manera se consigue reducir la viscosidad del lisado y se obtiene una mayor clarificación del mismo. Tras la centrifugación, se retiró la columna y se añadieron al lisado 350 µL de etanol al 70% pipeteando arriba y abajo hasta conseguir una apariencia homogénea. La mezcla se cargó en una columna de unión del ARN sobre un tubo colector de 2 mL y se centrifugó durante 30 segundos a 11.000 *g*, induciendo la unión del ARN a la membrana de sílice. Se desechó el tubo colector y la columna se introdujo en un nuevo tubo, se añadieron 350 µL de tampón DBR, y se centrifugó durante 1 min a 11.000 *g* para producir el desalado de la membrana de sílice. Después, se llevó a cabo la digestión del ADN, para ello se preparó en otro tubo estéril de 1,5 mL la mezcla ADNasa-tampón ADNasa con 10 µL de ADNasa y 90 µL de tampón de ADNasa para cada muestra. Se añadieron 95 µL de mezcla ADNasa-tampón ADNasa y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Tras la digestión, se realizaron 3 lavados para aclarar la membrana de sílice. Para ello, se añadieron 200 µL de tampón de lavado WR1, el cual inactiva a la ADNasa y se centrifugó a 11.000 *g* durante 30 segundos. Para el segundo lavado se añadieron 600 µL de tampón de lavado WR2 y se centrifugó durante 30 segundos a 11.000 *g*. El último lavado se realizó añadiendo 250 µL de tampón WR2 y se centrifugó a 11.000 *g* durante 2 min. Por último la columna se colocó en un nuevo tubo colector de 1,5 mL y se añadieron 30 µL de agua libre de ARNasa y se centrifugó durante 1 min a 11.000 *g*, produciéndose la elución del ARN.

La obtención del ARN total de muestras de tejido se realizó homogeneizando el tejido con tampón de lisis en tubos de 1,5 mL, disgregándolo mecánicamente con uno homogeneizador de tejido. Después se siguió con el mismo protocolo utilizado con los cultivos celulares.

6.4.5.2 Determinación de la concentración y grado de pureza del ARN extraído

La concentración del ARN de las distintas muestras se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm con ayuda de un dispositivo NanoDrop. El grado de pureza se calcula a partir del cociente entre el valor de la absorbancia de la muestra a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}). Un valor igual o muy próximo a 2 de dicho cociente indica que la solución de ARN tiene un nivel de pureza óptimo.

6.4.5.3 Retrotranscripción del ARN

Tras la cuantificación del ARN purificado, se tomó 1 µg del mismo y se añadió agua libre de endonucleasas hasta hacer un volumen final de 70 µL. A continuación se añadieron 6 µL de *Random Primers* a cada mezcla, obteniendo un volumen final de 76 µL. Dicha mezcla se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 39 µL de la master mix (Tabla 7), y se incubó durante 1 hora y 30 minutos en un termobloque a 37°C. Posteriormente, se paró la reacción mediante la inactivación de la transcriptasa reversa por choque térmico en un termobloque a 70°C durante 15 min.

6.4.5.4 PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real se basa en la relación directa que existe entre la cantidad de ADN molde inicial y el producto amplificado a partir del mismo, lo que permite la cuantificación de genes en una muestra de ADN. El proceso de amplificación se siguió mediante el uso de sondas de hibridación TagMan MGB, las cuales están unidas a moléculas fluorescentes que permiten la detección y cuantificación de los productos que se van obteniendo en la reacción. Para la cuantificación de los genes bajo estudio se utilizaron sondas fluorescentes de Roche marcadas con el fluoróforo FAM en el extremo 5' y en el 3' con NFQ-MGB. Los oligonucleótidos cebadores empleados para *Atoh1*, *Neurod1*, *Cntn2*, *Ptfa1* y *Neurog1* fueron:

Tabla 8. Secuencia de parejas de oligonucleótidos cebadores empleados en los experimentos de PCR cuantitativa

Gen	Sentido (forward)	Antisentido (reverse)
<i>Atoh1</i>	TGCGATCTCCGAGTGAGAG	TCTCTTCTGCAAGGTCTGATTTT
<i>Nuerod1</i>	CGCAGAAGGCAAGGTGTC	TTTGGTCATGTTTCCAATTCC
<i>Cntn2</i>	CCCTTCCCGCACTCTAGG	GTTTCAGGCAAAGGCAGAGT
<i>Ptfa1</i>	CACCGACCAGTCCTCTCG	GAACTCTACTTCTGCTTGCTCGT
<i>Neurog1</i>	GAACTGAGTCCTGGGGTTC	CAGAGAGTGGTGATGCCACA

A medida que avanza el número de ciclos de la PCR se incrementa el número de copias de producto generado, de tal manera que la intensidad de la fluorescencia emitida aumenta proporcionalmente a la cantidad de amplicón sintetizado. Este aumento de fluorescencia es detectado por el termociclador que lo representa frente al número de ciclos de la reacción.

Cuando el valor de fluorescencia es superior al de la fluorescencia basal, se alcanza el ciclo umbral o Ct (del inglés *Cycle threshold*).

Para la realización de la Q-PCR se utilizó el kit de amplificación *LuminoCt qPCR Ready Mix* utilizando placas de 96 pocillos, las cuales se analizaron en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System. Para cada muestra se preparó la siguiente mezcla: 12,5 µL de LuminoCt Ready Mix, 2,5 µL de tARN (30 ng/mL) y 0,25 µL de ROX. Además, cuando se utilizaron sondas fluorescentes Taqman se añadieron 1,25 µL de dicha sonda y 3,5 µL de agua ultra pura. Por el contrario, cuando se utilizaron sondas fluorescentes de Roche se añadieron 1,25 µL del oligo 5' y del oligo 3', así como 0,5 µL de sonda y 1,75 µL de agua ultra pura. Para cada muestra se utilizaron 5 µL de ADNc molde por pocillo sobre los que se añadieron 20 µL de la mezcla anterior. La reacción se desarrolló en una fase de activación de la polimerasa durante 20 ciclos a 95°C, seguida de una fase de desnaturalización durante 1 segundo a 95°C y una fase de hibridación y elongación durante 20 segundos a 60°C.

La cuantificación de la expresión de cada transcrito se llevó a cabo por el método 2 delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando la expresión del gen GAPDH como control interno de amplificación, utilizándose las siguientes ecuaciones:

$$\Delta Ct1 = Ct (Gen tratadas) - Ct (GAPDH)$$

$$\Delta Ct2 = Ct (Gen control) - Ct (GAPDH)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct1 (tratadas) - \Delta Ct2 (control)$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

El resultado de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ indica el cambio expresado en número de veces del gen de interés en las células tratadas con respecto a las células control.

6.4.6 Inmunotransferencia

6.4.6.1 Extracción de proteínas totales

Para la extracción de las proteínas totales de la zona subependimaria de ratón adulto se procedió primero al sacrificio de los animales por medio de inhalación de CO₂ y posterior dislocación cervical y decapitación. Tras ello, se diseccionó el tejido en PBS frío separando la zona dorsal de la ventral y depositándolas en tubos *ependorf* de 2 mL. Seguidamente se congelaron los tejidos en nieve carbónica, almacenándose hasta su uso a -80°C. En el caso de la extracción de proteínas totales de cerebelo de ratón P0 y P5 el sacrificio se realizó por decapitación y se extrajeron los cerebelos, que se almacenaron también en tubos *ependorf* de 2mL a -80°C.

Para la extracción de proteínas se incubaron los tejidos con 400 µL de tampón de lisis (Tabla 7) durante 1-2 horas en la noria a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifugó a 13.800 g durante 15 min a 4°C.

Para la extracción de proteínas de los cultivos celulares se aspiró el medio de las placas/pocillos y se añadió tampón de lisis frío (Tabla 7) utilizando raspadores celulares

estériles se recogieron los lisados celulares en frío, se transfirieron a un tubo de 1,5 mL y se centrifugaron a 16.000 g durante 10 minutos a 4°C.

Tras la centrifugación de los lisados de cultivos celulares y de tejido, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron en tubos de 1,5 mL. Tras ello, se cuantificó la concentración de proteína total mediante el método de Bradford. Dicho método colorimétrico se basa en el cambio de absorbancia del colorante Azul de Coomassie de 465 nm a 595 nm por desprotonación de sus grupos ionizables cuando se produce su unión a proteínas. Por lo tanto, la cantidad de proteína es directamente proporcional al incremento de la absorbancia a 595 nm. Interpolando los valores de absorbancia obtenidos a 595 nm en una recta de patrón de BSA se obtiene la concentración de proteína de las muestras.

6.4.6.2 Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de membranas

El extracto de proteína obtenido previamente se mezcló con tampón de carga 4X (Tabla 7). El volumen de tampón de carga se estimó en cada muestra para que quedase a una concentración final de 1X. Una vez preparadas las muestras, se cargaron en geles de poliacrilamida al 12% (p/v). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 130 voltios en tampón de electroforesis (Tabla 7) en el sistema mini-Protean 3 en frío.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PDVF). Dichas membranas se habían incubado previamente durante 30 segundos en metanol, seguidos de 5 minutos en agua destilada y 30 minutos en tampón de transferencia (Tabla 7). La transferencia se realizó en un sistema mini-Trans Blot en condiciones de amperaje constante (240 mA) durante 80 minutos en frío.

Tras la transferencia, las membranas se bloquearon en solución de bloqueo (TBS-Tween-20 al 0,1% (v/v) con leche desnatada deshidratada al 5% (v/v) o BSA al 3% (v/v)) durante 1 hora en un agitador orbital a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios en la solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados y sus concentraciones se encuentran referidos en la Tabla 9. Tras la incubación, se eliminó el exceso de anticuerpos de las membranas con 3 lavados con tampón TBS-Tween al 0,1% (v/v). A continuación, se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (anti-IgG HRP de ratón o conejo con una dilución de 1/5000 y 1/1000 respectivamente). El exceso de anticuerpos secundarios se eliminó con 3 lavados de TBS-Tween al 0,1 % (v/v). El revelado de las membranas se realizó mediante la incubación de las mismas en líquido de revelado, el cual contiene luminol, durante 1 minuto a temperatura ambiente. El luminol es oxidado por la peroxidasa, emitiendo una señal luminiscente que se registra. Dicha señal se registró con el sistema ImageQuant LAS 500 TL v8.1.

Mediante el programa ImageQuant TL se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas detectadas, las cuales se estandarizaron respecto a las proteínas de expresión constitutiva, glicerol fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y α -tubulina.

Tabla 9. Anticuerpos primarios y sus correspondientes diluciones utilizados en los ensayos de Western blot

Anticuerpo primario	Dilución	Generado	Nº de catálogo
Anti P2Y ₁	1/100	Conejo	Cat# APR-017
Anti P2Y ₁₃	1/100	Conejo	Cat# APR-009
Anti VNUT	1/500	Conejo	Cat# BMP079
Anti GAPDH	1/1000	Conejo	Cat# G9545-20
Anti α -Tubulina	1/10000	Ratón	Cat# T5168

6.4.7. Inmunocitofluorescencia

Para los estudios de inmunocitofluorescencia se retiró el medio de los pocillos y las células sembradas en cubreobjetos o en el fondo del pocillo se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% preparado en PBS durante 10 min. Después se hicieron 3 lavados con PBS y se incubaron con la solución de bloqueo (PBS, 2% BSA, 0,2% Triton X-100 (v/v)) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados y sus concentraciones se encuentran en la **Tabla 10**. Después, se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron las células con los anticuerpos secundarios y DAPI preparados en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se efectuaron 3 lavados con PBS. Los cubreobjetos se montaron sobre los portaobjetos utilizando un medio de montaje PolySciences®. Hasta el momento de uso, las preparaciones se almacenaron en oscuridad a 4°C. Las imágenes de fluorescencia se tomaron con el microscopio Nikon TE-2000 controlado por el software NIS-Elements AR 4.5 de Nikon. El procesamiento de las imágenes se realizó con el programa Image J.

Tabla 10. Anticuerpos primarios y sus diluciones utilizados en los ensayos de inmucitofluorescencia e inmunohistofluorescencia.

Anticuerpo primario	Dilución	Generado	Nº de catálogo
Anti P2Y ₁₃ (biotinilado)	1/100	Conejo	Cat# APR-009
Anti P2Y ₁ (biotinilado)	1/100	Conejo	Cat# APR-017
Anti SOX2 <i>in vitro</i>	1/100	Conejo	Cat# ab137385
Anti SOX2 <i>in vivo</i>	1/100	Conejo	Cat# A0561
Anti VNUT(biotinilado)	1/100	Conejo	Cat# BMP079
Anti GFAP	1/200	Ratón	Cat# G3893
Anti β III-Tubulina	1/800	Ratón	Cat# T8660
Anti DCX	1/400	Guinea pig	Cat# AB2253
Anti Ascl1 (biotinilado)	1/100	Ratón	Cat# 556604

Anti VGLUT1	1/500	Conejo	Cat# 135302
Anti VGAT (biotinilado)	1/500	Ratón	Cat# 131011
Anti Sinaptofisina	1/200	Ratón	Cat# S5768
Anti Sinaptobrevina	1/100	Ratón	Cat# S5312
Anti LAMP-1 (biotinilado)	1/100	Ratón	Cat# L1418
Anti nestina	1/200	Ratón	Cat# MAB353
Anti O4	1/400	Ratón	Cat# MBS832589
Anti ki67	1/100	Conejo	Cat# RM-9106-S
Anti GFP	1/400	Pollo	Cat# GFP-1020

6.4.8 Inmunohistofluorescencia

5.4.8.1 Obtención de secciones histológicas

Para la obtención de las secciones histológicas de cerebro, los ratones se sometieron a perfusión transcardiaca. Los ratones fueron sometidos a un plano anestésico profundo mediante la inyección intraperitoneal de 300 μ L de una mezcla anestésica (Tabla 7). Después se perfundieron con 100 mL de PFA al 4% durante 20 min, y a continuación se extrajo el cerebro. En cuanto a los ensayos de inmunohistofluorescencia para la proteína Ascl1, el procesamiento de los cerebros fue distinto. Los cerebros fueron perfundidos con 25 mL de PFA al 2%, evitando así el enmascaramiento del epítipo que reconoce Ascl1.

Los cerebros destinados a ser cortados en criostato se incubaron en una solución de sacarosa al 30% en PBS durante 48 horas a 4°C. De esta manera se evita la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación posterior. Tras este proceso, se embebieron en OCT (*Optimal Cutting Temperature*) mediante congelación rápida en nieve carbónica y se mantuvo el tejido a -80°C hasta su utilización. Para su uso se atemperaron los bloques de tejido durante 10 min en el criostato. Posteriormente, se obtuvieron las secciones histológicas de 20 μ m de grosor y se colocaron sobre portaobjetos que se almacenaron a -20°C. En cuanto a la inmunohistofluorescencia de Ascl1, los cerebros fueron equilibrados en sacarosa al 20% y las secciones utilizadas fueron de 25 μ m de grosor.

Los cerebros que iban a ser cortados en vibratomo se incluyeron en agarosa al 4% (w/v) en PBS y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización. Posteriormente, se cortaron secciones de 70 μ m de grosor las cuales se almacenaron en flotación en PBS a 4°C hasta su utilización. Si las secciones se tuvieran que almacenar durante un tiempo más prolongado se guardarían en solución de almacenamiento a -20°C (Tabla 7).

6.4.8.2 Inmunohistofluorescencia

Para los estudios de inmunohistofluorescencia las secciones histológicas adheridas a los portaobjetos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (PBS, 1% BSA, 5% FBS, 0,2% Triton X-100 (v/v)). Después, se incubaron con los anticuerpos

primarios preparados en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. El exceso de anticuerpo primario se eliminó realizando 3 lavados con PBS-3% BSA (v/v), y se incubaron con los anticuerpos secundarios y DAPI preparados en PBS, 1% BSA, 0,2% Triton X-100 (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se montaron con el líquido de montaje PolySciences®. En las secciones utilizadas para la detección de Ascl1 se siguió el mismo protocolo, pero usando una solución de bloqueo compuesta por PBS, 10% NGS, 1% Triton X-100 (v/v). La incubación de los anticuerpos primarios y secundarios se realizó con una solución compuesta por: PBS 10% NGS, 0,2% Triton X-100 (v/v).

En el caso de las secciones en flotación se realizó la incubación de las mismas durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo compuesta por: PBS, 2% BSA, 0,5% Triton X-100 (v/v). Tras ello, se incubaron con los anticuerpos primarios preparados en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. El exceso de anticuerpo primario se eliminó realizando 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS, y se incubaron con los anticuerpos secundarios y DAPI preparados en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y se montaron las secciones en portaobjetos con líquido de montaje PolySciences®. Todos los pasos se realizaron en agitación orbital.

6.4.8.3 Sistema biotina-estreptavidina

En determinados casos la realización de técnicas de inmunohistofluorescencia e inmucitofluorescencia requirió amplificar la señal del anticuerpos primario. Para ello, se usó el sistema biotina-estreptavidina, el cual se basa en la alta afinidad que presenta la estreptavidina por la biotina presente en el anticuerpo secundario biotinilado.

El protocolo es el mismo que el indicado anteriormente. Sin embargo, tras el lavado del anticuerpo primario, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado preparado en solución de bloqueo a una dilución 1/500 durante 1 hora. Tras ello, se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron las muestras con estreptavidina fluorescente preparada en PBS-2% BSA, 0,5% Triton X-100 (v/v) a una dilución 1/500 durante 1 hora. En este caso, el DAPI se incubó junto con la estreptavidina. Posteriormente, se lavó el exceso de estreptavidina mediante 3 lavados con PBS y se montaron las muestras.

Las imágenes de fluorescencia se tomaron en todos los casos con el microscopio confocal de Leica modelo TCS SPE, controlado por el software Leica LAS AF versión 2.5.1.5757. El procesamiento de las imágenes se realizó mediante el programa ImageJ.

6.4.9 Determinación microfluorimétrica de la concentración de calcio libre intracelular

La medida de la concentración de calcio libre intracelular se realizó mediante una técnica basada en el uso de la sonda fluorescente de calcio Fura-2 en su forma derivada acetoximetil éster, Fura-2 AM, que debido a su naturaleza hidrofóbica es capaz de atravesar la membrana plasmática. En el citosol, por la acción de esterasas inespecíficas, el enlace éster es

hidrolizado quedando el Fura-2 retenido intracelularmente en su forma ácida capaz de unir calcio. La formación del complejo Fura- Ca^{2+} produce una emisión de fluorescencia con un máximo a 510 nm, produciéndose simultáneamente un desplazamiento en su espectro de excitación, cuyo máximo pasa de 380 a 340 nm.

Las células sembradas 24-48 horas antes en cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro se lavaron con la solución Locke de perfusión (Tabla 7) para eliminar los restos del medio de cultivo, y posteriormente se incubaron con 7,5 μM de Fura-2 AM, durante 45 minutos a 37°C, en una solución de Locke de perfusión suplementado con BSA 200 mg/mL.

Transcurridos 45 minutos, se lavaron los cubreobjetos con Locke y se situaron utilizando grasa de vacío hidrofóbica en la parte inferior de una cámara de perfusión. Ésta se colocó en la platina del microscopio de fluorescencia Nikon TE-200 y se conectó mediante cánulas de silicona la entrada y salida de las soluciones de perfusión. El tubo de entrada de la perfusión se acopló a un dispositivo de termostatación para atemperar las soluciones de perfusión a 37°C. El flujo de entrada se mantuvo a aproximadamente 1,5 mL/min por diferencia de presión hidrostática. Tras atravesar la cámara, el medio perfundido se aspiró de manera continua mediante una bomba de vacío, evitando así que se acumule cualquier sustancia procedente de las células durante la perfusión o cualquier producto de degradación de los compuestos aplicados.

Las células se iluminaron alternativamente mediante un monocromador con unas longitudes de onda de 340 nm y 380 nm, las cuales se corresponden con los máximos de excitación de unas soluciones de Fura-2 ácido saturada y libre de calcio, respectivamente (Figura 13). El haz de luz monocromada es reflejada hacia el objetivo mediante un espejo dicróico que transmite las longitudes de onda superiores a 430 nm y refleja las longitudes de onda inferiores. La fluorescencia emitida por el complejo Fura-2- Ca^{2+} a 510 nm atraviesa el espejo dicróico y es conducida hacia la cámara digital ORCA-ER C 47 42-80 (Hamamatsu) después de atravesar un filtro interferencial de emisión centrado a 510 nm. Los registros de fluorescencia se expresaron como el cociente entre los valores de fluorescencia obtenidos a 340 nm y 380 nm en función del tiempo de una región elíptica situada sobre cada célula analizada, de forma que la ratio F_{340}/F_{380} aumenta cuando se incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular libre. Antes de calcular las ratios, se restaron para cada longitud de onda los valores basales de fluorescencia cuantificados una zona sin células del cubreobjeto.

Las estimulaciones con el agonista eran de 30 segundos, y las pre-incubaciones con el antagonista de 5 minutos. Entre estimulaciones se lavaron los cubreobjetos con Locke de perfusión durante 5 min.

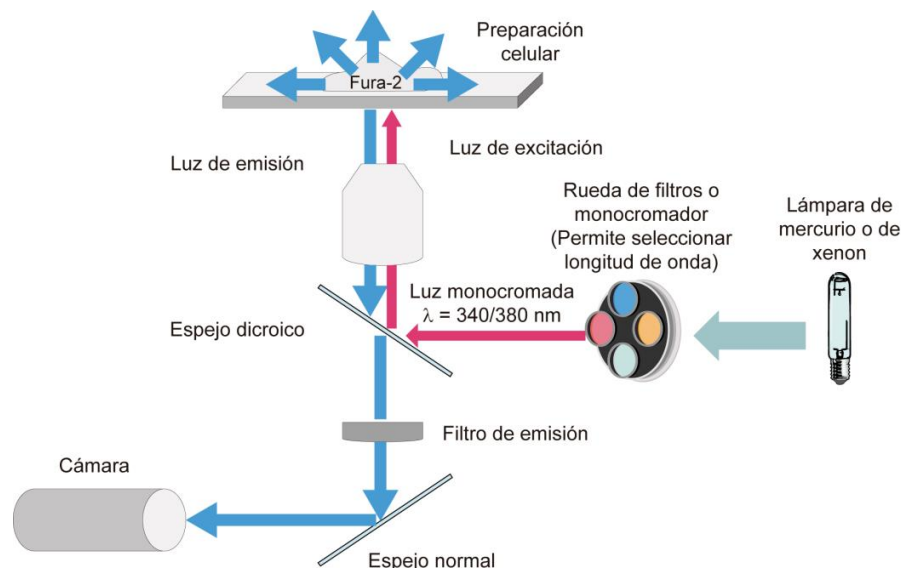


Figura 14. Funcionamiento del equipo para las mediciones del calcio intracelular.

6.4.10 Electrofisiología

La técnica de *patch-clamp* también conocida como técnica de fijación de voltaje en parches de membrana, es una técnica que permite el estudio de las propiedades eléctricas de las células. En el presente trabajo se utilizó la configuración de célula completa en la cual se mantiene el potencial de toda la membrana de la célula y se registra la corriente iónica producida por la actividad de todos los canales presentes en la membrana celular. Estos experimentos de electrofisiología fueron realizados por el doctor Luis Alcides Olivos Oré y la doctora Marina Arribas, bajo la dirección del profesor Antonio Rodríguez Artalejo, pertenecientes al Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Brevemente, para el registro de las corrientes iónicas se fijó el voltaje en -60 mV . Además, dichas corrientes se filtraron a 3 kHz y muestrearon a 10 kHz . El potencial de fijación (V_h) fue de -80 mV . La resistencia en serie ($<20 \text{ M}\Omega$) se compensó en un 80% y se controló junto a la capacitancia de la membrana celular durante todo el experimento. Los experimentos de *patch-clamp* se realizaron a temperatura ambiente ($22\text{-}24^\circ\text{C}$).

Las corrientes voltaje dependiente se indujeron mediante despolarizaciones de 100 ms a $+10 \text{ mV}$. Los fármacos se aplicaron directamente en las células a través de un sistema de eyección de fármacos a presión neumática (PDES-02DX, NPI Electronic GmbH, Alemania) mediante una pipeta con una abertura de entre $3\text{-}5 \mu\text{m}$ colocada cerca de la célula ($5\text{-}10 \mu\text{m}$). Los fármacos se disolvieron en agua y se aplicaron durante el tiempo indicado en la figura. El MK-801 se perfundió 2 minutos antes y durante las grabaciones especificadas.

6.4.11 Sobreexpresión de VNUT en la línea N2a

Las células N2a se sembraron en una placa de 6 pocillos a una densidad de 80.000 células/cm² y 24 horas después se procedió a la transfección con Lipofectamina 3000, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó la mezcla de transfección de Lipofectamina y DMEM y se mantuvo durante 5 min. Pasados los 5 min, se añadió la mezcla de transfección sobre los plásmidos disueltos en DMEM y se dejó incubando durante 20 min a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió la mezcla sobre las células y se incubaron a 37°C durante 6 horas en una atmósfera controlada de CO₂ al 5%, saturada de humedad. Posteriormente se retiró el medio de transfección y se añadió medio de cultivo fresco completo. Como control de transfección se utilizaron 4 µg de un plásmido codificante para la proteína GFP (pCAG-GFP).

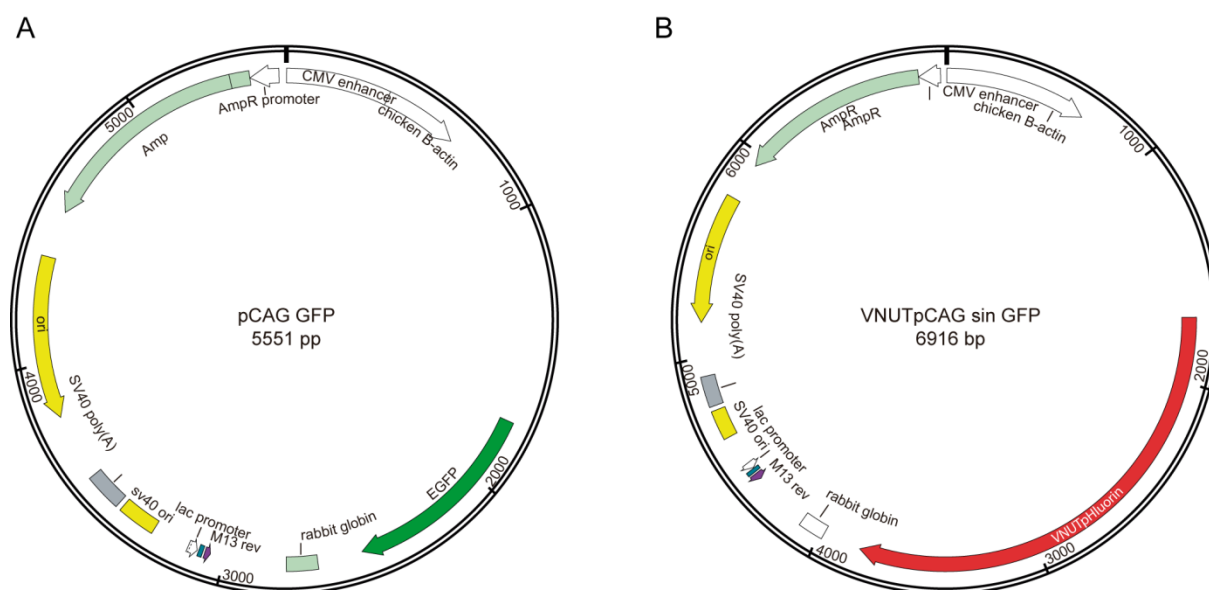


Figura 15. Plásmidos utilizados para la sobreexpresión de VNUT en la línea N2a. (A) Plásmido utilizado como control de transfección. La expresión de este plásmido induce la expresión de la proteína verde fluorescente GFP. (B) Plásmido utilizado para la sobreexpresión de VNUT.

Para la sobreexpresión del transportador VNUT se realizó una co-transfección con 2 µg de un plásmido de sobreexpresión de VNUT (VNUTpCAG) y 2 µg del plásmido control (pCAG-GFP) (Figura 15). La expresión de la proteína fluorescente GFP permite identificar las células transfectadas mediante microscopía de fluorescencia.

6.4.12 Inyecciones de vectores virales

6.4.12.1 Producción de lentivirus

En el presente trabajo se utilizaron dos lentivirus para el estudio de la expresión del receptor P2Y₁₃: un lentivirus control y un lentivirus que induce la sobreexpresión de la proteína P2Y₁₃ en las células que transduce (Figura 16). Ambos vectores tienen asociado la expresión de la proteína fluorescente GFP para poder identificar las células transducidas. Estas construcciones virales se llevaron a cabo en un laboratorio de bioseguridad nivel 2 en

colaboración con el grupo de investigación del doctor Sergio Gascón Jiménez, perteneciente al Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo del Instituto Cajal.

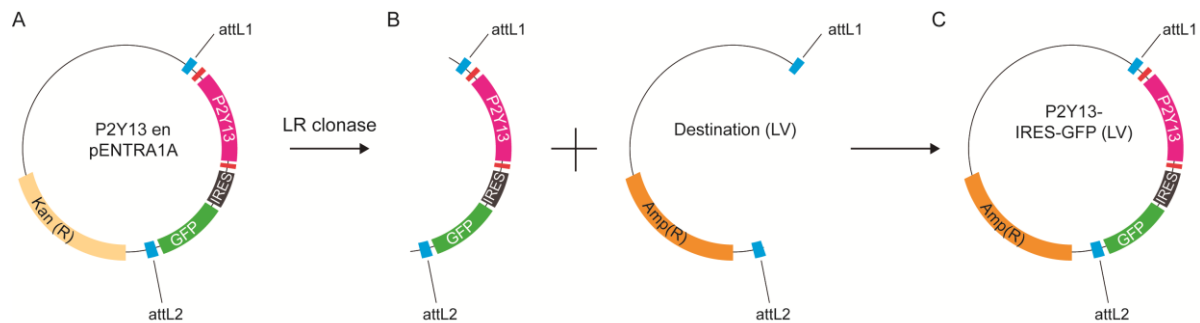


Figura 16. Construcción del vector viral para la sobreexpresión del receptor P2Y₁₃. (A) A partir de un plásmido de sobreexpresión del receptor P2Y₁₃ se corta con enzimas de restricción las secuencias que flanquean al gen P2Y₁₃ y las secuencia IRES-GFP. (B) La secuencia cortada se clona en un lentivirus sin color. (C) Vector viral de sobreexpresión del receptor P2Y₁₃ final.

6.4.12.2 Inyección estereotáxica

La inyección estereotáxica se realizó en un laboratorio de bioseguridad nivel 2 en colaboración con el grupo de investigación del doctor Sergio Gascón Jiménez (Figura 17). Los ratones de dos meses de edad fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de 10 μ L de mezcla anestésica (solución sleep) por gramo de peso (Tabla 7). Una vez anestesiados, los ratones se colocaron en el aparato estereotáxico y se aplicó pomada (Siccasan gel) en los ojos para evitar lesiones. Después, se desinfectó la cabeza con etanol al 70% y se realizó una incisión con un bisturí a lo largo de la sutura craneal sagital. Tras separar la piel se añadió suero salino con una jeringa y se limpió la zona con un bastoncillo. Se marcó el bregma, punto al que se le asignan las coordenadas de referencia (0, 0). Posteriormente, se localizó la zona subependimaria en ambos hemisferios utilizando las siguientes coordenadas estereotáxicas relativas a Bregma: 0,7 mm antero-posterior, 1,2 mm o -1,2 mm medial-lateral y -1,6—2,1 mm dorso-ventral. Con ayuda de un micromotor rotatorio se realizó una craneotomía en ambos puntos, manteniendo las meninges intactas. Seguidamente, se limpió la zona con suero salino. Una vez realizadas las dos incisiones, se inyectó 1 μ L de disolución de virus en ambos hemisferios desde la coordenada -1,6 mm hasta -2,1 mm dorso-ventral. Tras la administración se mantuvo la jeringa en la misma posición durante 5 minutos para permitir que la solución con el virus difundiera correctamente. Por último se lavó bien la zona con suero salino y se suturó la piel con un hilo de sutura de 6-0. Para despertar a los ratones, se les inyectó intraperitonealmente (10 μ L/gramo peso ratón) una solución awake (Tabla 7). Los ratones intervenidos se mantuvieron en jaulas individualmente durante 14 días con agua y comida *ad libitum*, en un ambiente con temperatura controlada y con ciclos de luz-oscuridad de 12 h.

Pasados 14 días de las infecciones virales se procedió a la obtención de las secciones histológicas de cerebro siguiendo el mismo procedimiento que se detalla en el apartado 8 de Métodos.

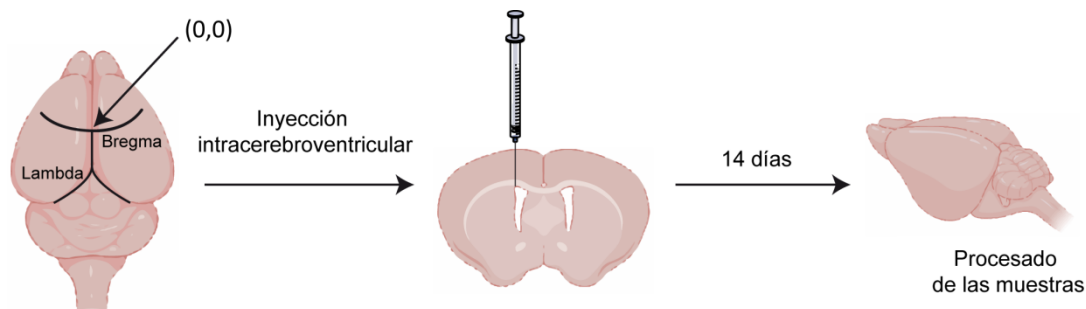


Figura 17. Protocolo inyección viral en la SEZ de ratón adulto.

6.4.14. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 6. Los datos obtenidos se representaron como la media aritmética $\pm$ el error estándar de la media (SEM) de experimentos independientes repetidos un mínimo de tres veces. Los test utilizados fueron el análisis de la varianza ANOVA seguido del método de Tukey para la comparación de las medias de grupos de valores o de las medias de los grupos con respecto a la media de uno, respectivamente. Para comparar una variable en dos grupos se utilizó una t de Student no pareada. Se estableció la significancia estadística a partir de un valor $p < 0,05$ (*). Los niveles superiores a 0,05 se tomaron como no significativos. En cada figura de resultados se detalla el test utilizado y la significancia estadística.

7. RESULTADOS

7.1 La señalización purinérgica como modulador de la neurogénesis posnatal cerebelosa

7.1.1 Los progenitores neurales aislados del cerebelo mantienen su comportamiento neurogénico en ausencia de factores tróficos

Como hemos indicado anteriormente, el cerebelo posnatal es un área de intensa actividad neurogénica en la que coexisten simultáneamente tres nichos proliferativos: la capa granular externa, la capa de las neuronas de Purkinje y la futura materia blanca. A pesar de la gran cantidad de esfuerzo dedicado al estudio del desarrollo del cerebelo a lo largo de los años, todavía existen muchos interrogantes acerca del comportamiento de los progenitores neurales localizados en esta región. De modo que, uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar el comportamiento de dichos progenitores en ausencia de las señales del nicho. Para ello, se desarrolló un sistema de cultivo combinando y adaptando las condiciones previamente empleadas para el cultivo de neuronas granulares de cerebelo posnatal Pons y cols. (2001), con el método de cultivo que nos había permitido aislar y monitorizar, por medio de videomicroscopía de time-lapse, el comportamiento de las NSCs adultas de la zona subependimaria (Costa et al., 2011, Ortega et al., 2011a, Ortega et al., 2013a, Gomez-Villafuertes et al., 2017, Paniagua-Herranz et al., 2020). Utilizando esta aproximación, se consiguió aislar y cultivar las NSCs del cerebelo posnatal en condiciones adherentes, a baja densidad y en ausencia de factores tróficos (Figura 18).

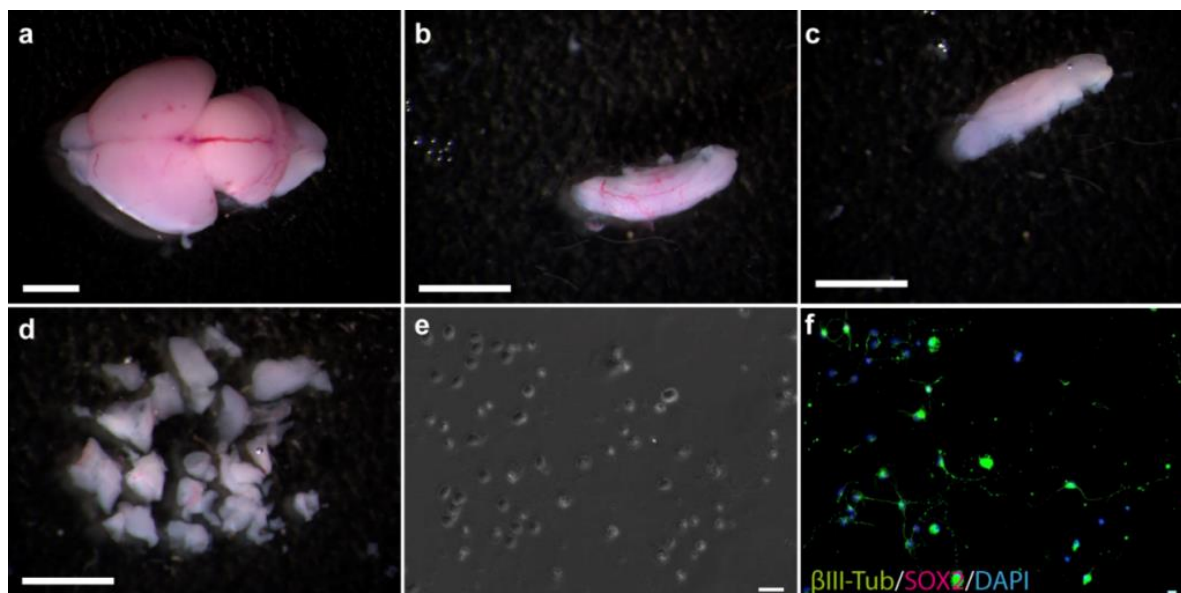


Figura 18. Preparación de cultivo de progenitores neurales de los cerebelos posnatales. (A) Imagen de un cerebro de ratón tras la extracción. (B) Imagen del cerebelo tras la disección. (C) Apariencia del cerebelo tras retirar las meninges. (D) Imagen del cerebelo tras la disección mecánica en pequeños fragmentos de 1 mm aproximadamente. (E) Imagen representativa del cultivo. (F) Inmunocitofluorescencia para la identificación de la progenie donde se muestra el marcaje de β III-tubulina (verde), SOX2 (magenta). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 5 mm (A-D) y 30 μ m (E y F) (Menendez-Mendez et al., 2021)

Primeramente, se aislaron los progenitores de cerebelo a día posnatal 0 (P0) y se sembraron siguiendo las especificaciones previamente indicadas en el apartado de Métodos. A las 12 horas de la siembra del cultivo se estimó el porcentaje de los tipos celulares aislados mediante ensayos de inmunocitofluorescencia. Como se muestra en la **Figura 19** la mayoría pertenecían al linaje neuronal ya que presentaban un marcaje positivo para β III-tubulina ($65,4\% \pm 0,69\%$). Asimismo, se detectó una población menor de células SOX2 positivas ($17,72\% \pm 1,81\%$), y de células de naturaleza astrogial GFAP positivas ($1,88\% \pm 0,4\%$). Además, se consiguió aislar una población de células GFAP/SOX2 positivas ($13,30\% \pm 2,47\%$). El porcentaje restante ($<2\%$) que no presentó marcaje específico para ninguno de los marcadores analizados podría corresponder a células oligodendrogiales. El alto porcentaje de células de linaje neuronal es consistente con el aislamiento de un entorno celular pro-neurogénico como es el caso del cerebelo posnatal, mientras que la población celular positiva para GFAP/SOX2 y SOX2 podría ser consistente con el aislamiento en este cultivo de NSCs así como de progenitores intermedios, respectivamente (Ming and Song, 2011, Zhao et al., 2008).

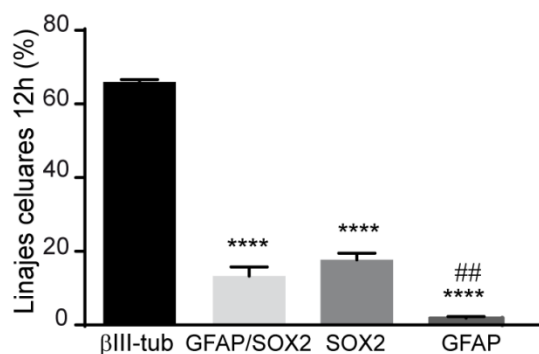


Figura 19. Poblaciones celulares identificadas en los cultivos de progenitores neurales de cerebelo aislados a día P0. Cuantificación de las poblaciones celulares detectadas a las 12 horas del cultivo, siendo los neuroblastos identificados con el marcador β III-tubulina, las NSCs y los progenitores intermedios con GFAP/SOX2 o SOX2 y los astrocitos parenquimales con el marcador GFAP. Los datos mostrados representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes (**p < 0,01, ****p < 0,0001 Análisis de la varianza (ANOVA) con el método de comparación múltiple de Tukey).

Una vez comprobado que la adaptación del protocolo empleado permitía aislar los diferentes tipos celulares del linaje neural, así como co-cultivarlos, se procedió a monitorizar su comportamiento *in vitro* durante 4-5 días mediante la videomicroscopía de time-lapse, obteniendo fotos del cultivo en contraste de fases cada 5 min. Como hemos indicado previamente, esta técnica, en combinación con la inmunocitofluorescencia posterior al experimento de videomicroscopía, permite monitorizar el comportamiento a nivel de célula única, y obtener una serie de parámetros clave para comprender su biología celular. Entre ellos destacan la identificación de la progenie generada por la célula fundadora del clon, el tipo de división (simétrica/asimétrica), el número de rondas de divisiones por clon, la duración del ciclo celular, el número de clones y la migración y supervivencia celular.

El seguimiento de las células individuales, y sus clones derivados reveló que los progenitores neurales del cerebelo eran capaces de proliferar en ausencia de señales tróficas. Se analizaron un total de 816 clones de diferentes cultivos y la mayoría de ellos experimentaban divisiones simétricas a través de las cuales generaban neuroblastos β III-tubulina positivos (**Figura 20**).

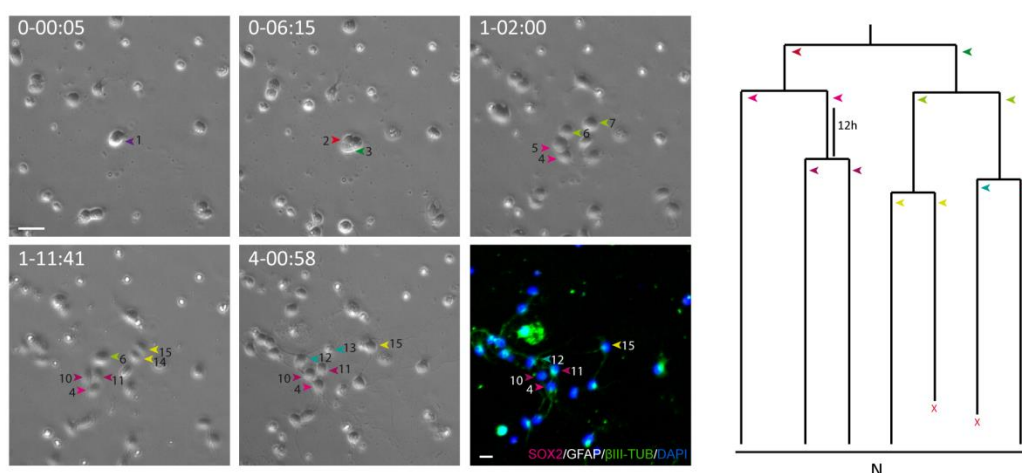


Figura 20. La mayoría de los progenitores neurales de cerebelo presentan divisiones simétricas. Ejemplo de árbol simétrico generando progenie neuronal (N, neuroblasto; X, célula muerta). Las imágenes en contraste de fases muestran la progresión del linaje obtenidas mediante videomicroscopía de time-lapse (día-hora:minuto). La última imagen corresponde con la inmunocitofluorescencia realizada al finalizar el cultivo, en la que se muestra SOX2 (magenta), GFAP (blanco) y β III-tubulina (verde). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las puntas de flecha marcan las células dentro del linaje. Escala: 30 μ m.

La generación de dichas células se produjo tras una serie de divisiones celulares que variaban entre una y cinco rondas de división previa a la diferenciación neuronal (Figura 21A-B). Es de suponer que, en función de la etapa de la progresión del linaje en la que se encuentre la célula estudiada, el número de divisiones variará antes de generar los neuroblastos postmitóticos.

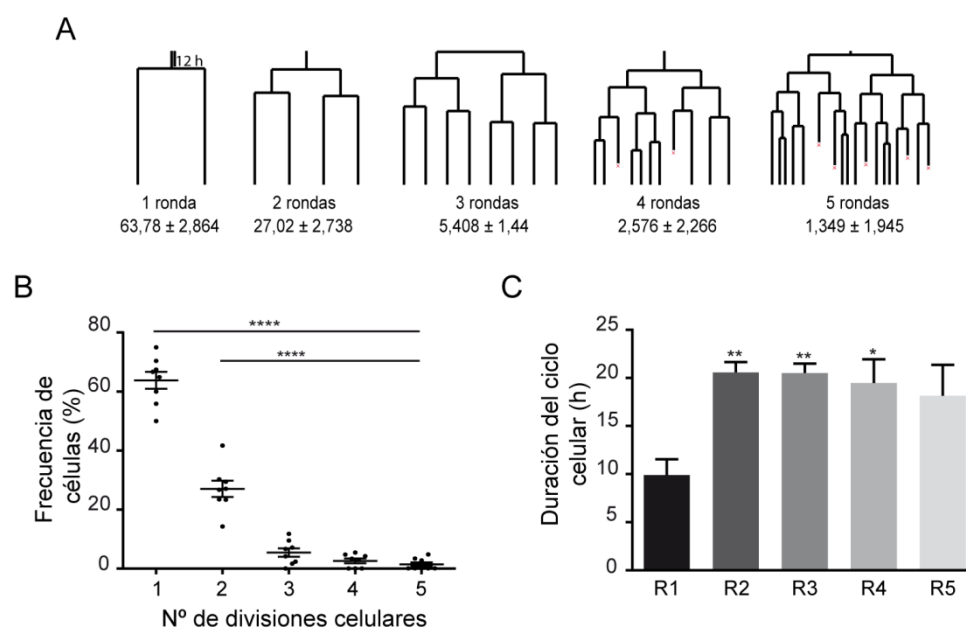


Figura 21. Dinámica de los diferentes árboles de linaje monitorizados en los cultivos de progenitores cerebelosos aislados a P0. (A) Ejemplo de los tipos de árboles de linaje neurogénicos encontrados. Los valores debajo de cada árbol representan las proporciones relativas. (B) Proporciones relativas del porcentaje del número de rondas de divisiones monitorizadas durante los experimentos de time-lapse. (C) Duración media del ciclo celular en cada ronda de división (R). Los datos mostrados representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes (* p < 0,05, ** p < 0,01, **** p < 0,0001 ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey).

Cuando se analizó la distribución de los árboles neurogénicos en función de su capacidad proliferativa, se vio que la mayoría de los clones analizados mostraron entre una y dos rondas de división ($63,78\% \pm 2,86\%$ y $27,02\% \pm 2,74\%$, respectivamente), mientras que el porcentaje de progenitores que dividían entre tres y cinco veces era exponencialmente menor (Figura 21B). Se observó, además, que estos clones mostraban un ciclo celular rápido. Concretamente, la primera ronda de división era significativamente más corta ($9,91 \pm 2,25$ h), en comparación con las demás rondas de división, las cuales mostraban una duración similar ($20,70 \pm 0,91$ h) (Figura 21C).

Notablemente, los experimentos de videomicroscopía de timelapse permitieron la visualización directa de una división asimétrica en progenitores neurales aislados de cerebelo posnatal P0 (Figura 22A).

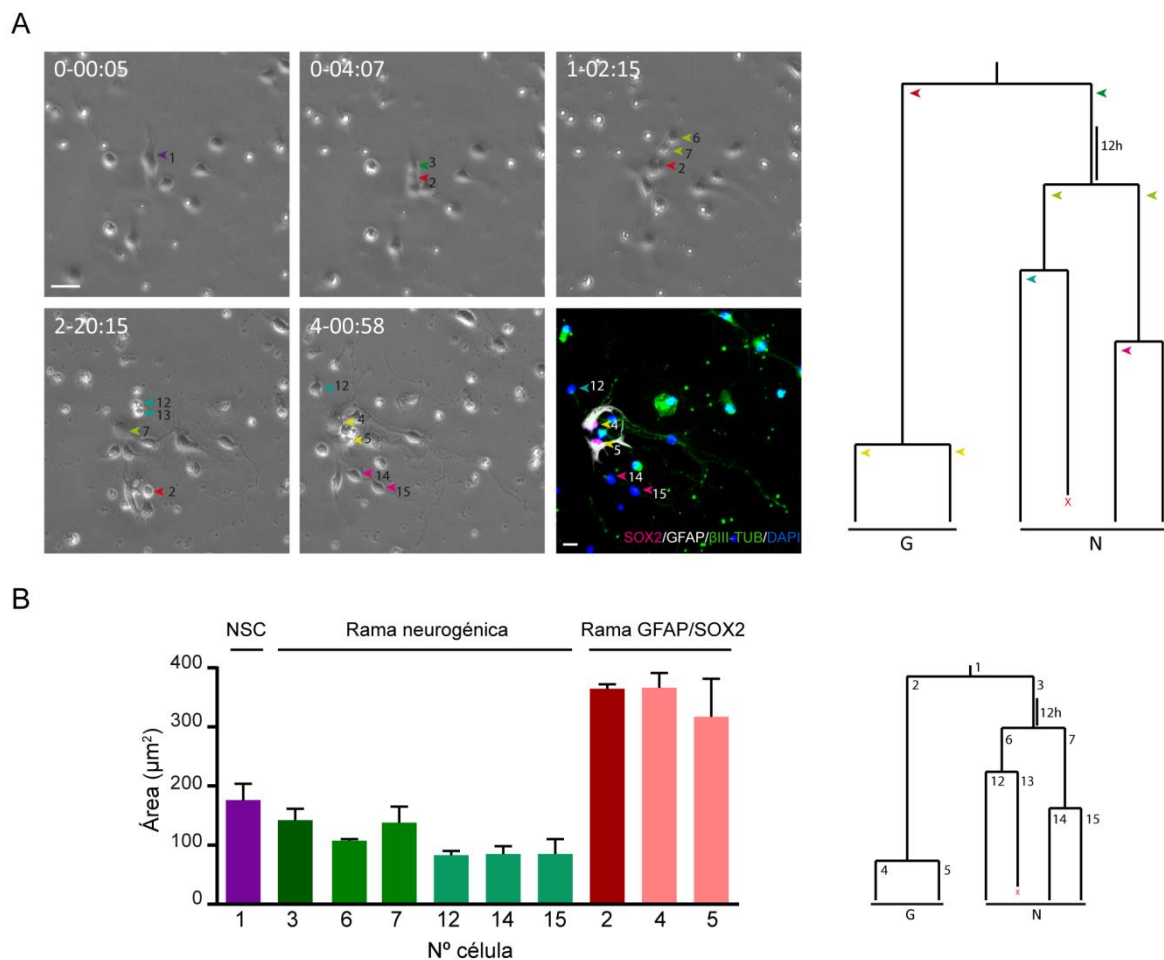


Figura 22. Los progenitores neurales aislados del cerebelo a día P0 presentan divisiones asimétricas. (A) Árbol asimétrico que genera neuroblastos y NSCs (N, neuroblasto; G, células GFAP/SOX2 positivas; X, célula muerta). Las imágenes en contraste de fases muestran la progresión del linaje obtenida mediante videomicroscopía de time-lapse (día-hora:minuto). La última imagen corresponde con la inmunocitofluorescencia realizada al finalizar el experimento, en la que se muestra SOX2 (magenta), GFAP (blanco) y β III-tubulina (verde). Los núcleos se marcaron con DAPI. Las puntas de flecha marcan las células analizadas dentro del linaje. Escala: 30 μ m. **(B)** Análisis del área celular del árbol asimétrico representado en (A) que genera tanto neuroblastos como NSCs GFAP/SOX2⁺. La célula fundadora así como las células de la rama GFAP/SOX2 muestran un tamaño mayor que las de la rama neurogénica (células 1, 2, 4 y 5). Las células de la rama neurogénica van disminuyendo de tamaño a medida que se avanza en la progresión en el linaje, siendo los neuroblastos la población más pequeña (células 12, 14 y 15, la célula 13 no se considera porque muere antes de finalizar el experimento).

En estas divisiones asimétricas un progenitor daba lugar a dos células hijas que adquirieron un destino celular distinto. Así, mientras que una de las células hijas generaba neuroblastos a través de divisiones simétricas, la otra generaba células de naturaleza astrogial GFAP positivas. Dichas células además resultaron positivas para SOX2 lo cual indicaba que no se trataban de astrocitos parenquimales sino de NSCs. Por lo tanto, se pudo observar en estos experimentos un proceso de autorrenovación de la célula madre neural fundadora.

El análisis detallado de estos clones asimétricos reveló interesantes diferencias en el crecimiento celular entre la progenie generada. De esta forma, la cuantificación del área celular de las células generadas reveló que en la rama neuronal las células presentaban un tamaño menor a medida que progresaban en el linaje hacia la formación de neuroblastos, mientras que las nuevas células generadas GFAP/SOX2 positivas exhibían un mayor tamaño, el cual concuerda con su identidad de célula madre neural (Figura 22B). Estas diferencias coincidirían con lo observado en la progresión del linaje de las NSCs presentes en otros nichos neurogénicos (Costa et al., 2011, Neumuller et al., 2008).

Posteriormente, se analizó por medio de inmunocitofluorescencia a tiempo final, la progenie generada en los árboles de linaje monitorizados durante los experimentos de videomicroscopía de time-lapse. Estos ensayos confirmaron que la mayoría de las células generadas eran células pertenecientes al linaje neuronal ya que eran exclusivamente β III-tubulina positivas ($89,59\% \pm 3,00\%$), siendo menor el porcentaje de árboles formados únicamente por células SOX2 positivas, o células SOX2 y neuronas ($5,87\% \pm 2,69\%$). Asimismo, descendió el porcentaje de árboles que contenían exclusivamente células GFAP/SOX2 positivas o células GFAP/SOX2 ($4,53\% \pm 2,03\%$) (Figura 23). Es importante dejar constancia que, aunque se sabe que la glía de Bergmann también expresa como marcadores GFAP y SOX2 (Mercurio et al., 2019), su contribución en estos experimentos quedaría restringida a los clones que contuvieran exclusivamente células GFAP y SOX2, siendo los clones asimétricos (GFAP/SOX2 y neuronas) consistentes con la presencia de una población de NSCs cerebelares posnatales.

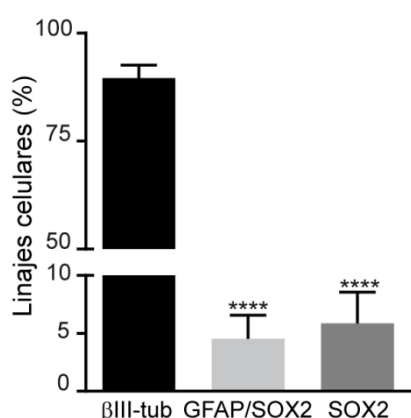


Figura 23. Linajes celulares identificados en los cultivos de progenitores neurales cerebelosos P0 al finalizar los experimentos de videomicroscopía de time-lapse. Distribución relativa de los linajes neurales dentro de los árboles de linaje monitorizados durante el cultivo. β III-tubulina hace referencia a árboles neurogénicos simétricos conteniendo únicamente neuronas. GFAP/SOX2 hace referencia a árboles conteniendo NSCs y neuronas o únicamente NSCs. Por último SOX2 hace referencia a árboles que contienen neuronas y células SOX2 positivas o únicamente células positivas para SOX2. Los datos mostrados representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes (**** $p < 0,0001$ ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey).

Por último, la comparación de dichas estimaciones a tiempo final con las obtenidas a las 12 horas de la siembra del cultivo permitió observar una reducción tanto en el porcentaje de células SOX2 positivas como en el de células GFAP/SOX2, mientras que el porcentaje de

neuroblastos β III-tubulina positivos a tiempo final experimentó un crecimiento significativo (Figura 24). La variación en la proporción de las distintas poblaciones celulares a tiempo final junto con la capacidad proliferativa observada en los progenitores neurales sugiere que la activación de los mismos induce su salida del ciclo celular para la generación, en su mayoría, de nuevas neuronas.

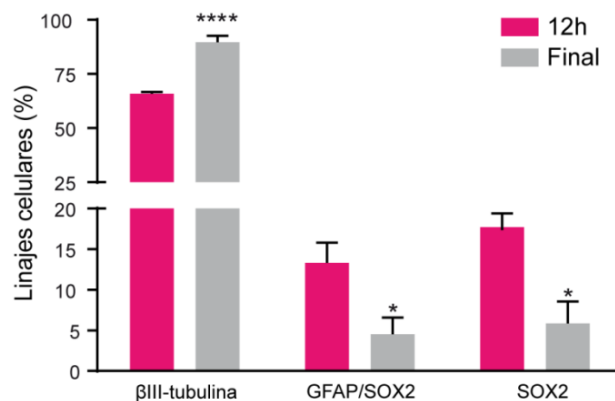


Figura 24. Comparación de las poblaciones celulares observadas a las 12 horas de la siembra del cultivo y al finalizar el experimento. Las proporciones de los linajes celulares generados al finalizar los experimentos de time-lapse (4-5 días) son los siguientes: marcaje β III-tubulina solo generan neuroblastos, marcaje GFAP/SOX2 incluye aquellos linajes que generan tanto neuroblastos como células madre neurales o sólo NSCs. Marcaje SOX2 a aquellos linajes que generan células SOX2 positivas y neuroblastos o solo SOX2. Los valores representan la media $\pm$ SEM de cinco experimentos independientes (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey).

7.1.2 Los progenitores neurales cerebelosos pierden su capacidad neurogénica a lo largo del desarrollo cerebelar

Como se ha citado anteriormente, el desarrollo del cerebelo es particularmente intenso en la etapa posnatal, sufriendo numerosos cambios tanto morfológicos como moleculares. A lo largo de este proceso, los progenitores neurales generan las poblaciones celulares que van a residir en las distintas capas de la corteza cerebelosa adulta. Por lo tanto, tras verificar que los progenitores neurales aislados del cerebelo a P0 mantenían el potencial neurogénico en ausencia de factores tróficos, se evaluó si dicho potencial se mantenía en el tiempo según progresa el desarrollo cerebeloso.

Con este fin, se llevó a cabo el aislamiento de los progenitores neurales a partir de cerebelos de ratones en el día posnatal 5 (P5), siguiendo el mismo procedimiento previamente descrito para P0. Coincidiendo con las estimaciones obtenidas a las 12 horas de la siembra de los cultivos de P0, la mayoría de las células aisladas en las preparaciones a día P5 eran neuroblastos β III-tubulina positivos ($84,61\% \pm 1,7\%$), siendo, en cambio, los porcentajes de células SOX2 positivas y GFAP/SOX2 positivas ($10,3\% \pm 1,1\%$ y $4,5\% \pm 0,77\%$, respectivamente) significativamente menores (Figura 25).

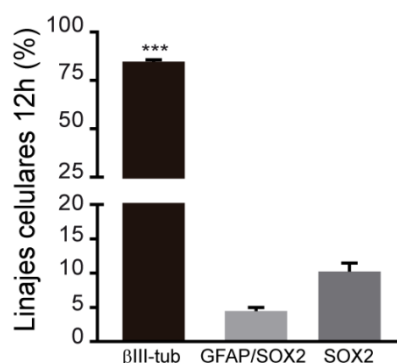


Figura 25. Poblaciones celulares detectadas a las 12 horas en el cultivo de progenitores neurales cerebelosos aislados a día P5. El diagrama muestra la cuantificación de las poblaciones celulares, siendo los neuroblastos identificados con el marcador β III-tubulina y las NSCs y los progenitores intermedios con GFAP/SOX2. Los datos mostrados representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes (** $p < 0,001$ ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey).

La monitorización de las células individuales reveló que los progenitores neurales aislados a día P5 también mantenían tanto su naturaleza neurogénica como su capacidad proliferativa en ausencia de factores tróficos. Sin embargo, los datos indicaron claramente que esta era más limitada en comparación con los progenitores aislados a día P0. Así, mientras que los progenitores (P0) podían dividir hasta en cinco ocasiones, los progenitores aislados a día P5 experimentaban únicamente un máximo de cuatro rondas simétricas de división. De todos los árboles de linaje monitorizados ($n=760$), la gran mayoría de ellos sólo dividía una vez ($89,02\% \pm 3,11\%$), siendo el número de clones que dividía dos, tres o cuatro veces significativamente inferior ($8,74\% \pm 6,36\%$, $1,67\% \pm 0,68\%$ y $0,57\% \pm 0,37\%$, respectivamente) (Figura 26A-B).

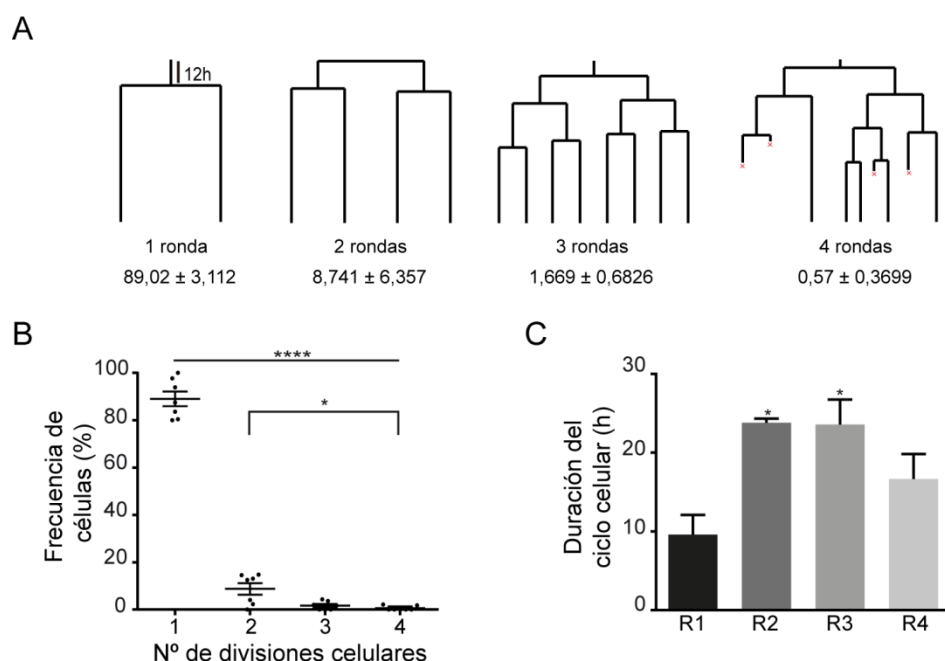


Figura 26. Dinámica de los diferentes árboles monitorizados en los cultivos de progenitores neurales cerebelosos aislados a P5. (A) Tipos de árboles de linaje neurogénicos analizados. Los valores debajo de cada árbol representan las proporciones relativas. (B) Proporciones relativas del porcentaje del número de rondas de divisiones monitorizadas durante los experimentos de time-lapse. (C) Duración media del ciclo celular en cada ronda de división. Los datos mostrados representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ ANOVA con prueba de comparación múltiple de Tukey).

A pesar de las diferencias encontradas en cuanto al número de rondas de división, y por tanto una menor capacidad proliferativa, la duración del ciclo celular de las distintas rondas

mostraba un patrón similar al observado en los progenitores aislados a día P0, siendo el ciclo celular de la primera ronda de división más rápido ($9,61 \text{ h} \pm 2,51 \text{ h}$) que el de las posteriores rondas ($23 \text{ h} \pm 0,81 \text{ h}$) (Figura 26C). Cabe destacar que tras el seguimiento de 760 clones no se detectó en los cultivos de P5 ninguna célula que experimentase divisiones asimétricas. Todos los clones presentaron divisiones simétricas (Figura 26 y 27).

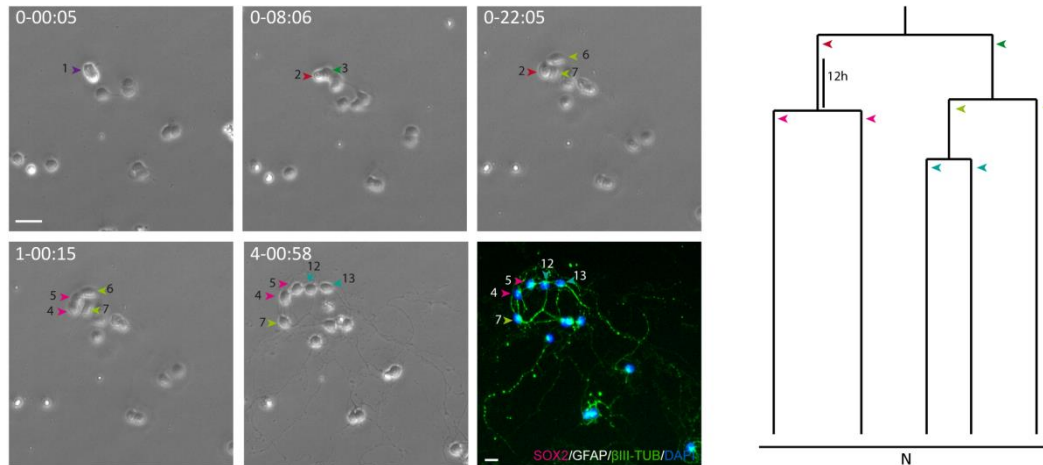


Figura 27. Los progenitores neurales cerebelosos aislados a P5 sólo generan árboles simétricos. Ejemplo de árbol simétrico generando progenie neuronal de forma simétrica. (N, neuroblasto; X, célula muerta). Las imágenes en contraste de fases muestran la progresión del linaje obtenida mediante videomicroscopía de time-lapse (día-hora:minuto). La última imagen corresponde con la inmunocitofluorescencia realizada al finalizar el cultivo, en la que se muestra SOX2 (magenta), GFAP (blanco) y β III-tubulina (verde). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las puntas de flecha marcan las células dentro del linaje. Escala: 30 μm .

De modo que, los ensayos de inmunocitofluorescencia a tiempo final mostraron una reducción en el porcentaje de clones con células SOX2 positivas ($1\% \pm 0,5\%$) y GFAP/SOX2 ($2,25\% \pm 0,99\%$) positivas. Por ello, la mayoría de los clones obtenidos a tiempo final pertenecían al linaje neuronal ($96,75\% \pm 1,67\%$) (Figura 28). El porcentaje de estas últimas además no varió significativamente en comparación con el porcentaje estimado a las 12 horas de la siembra de cultivo (Figura 29). Estos resultados, junto con la ausencia de divisiones asimétricas, plantearon la posibilidad de que las NSCs aisladas a P5, además de ser inferiores en número, exhibieran un estado celular más asociado a la quiescencia.

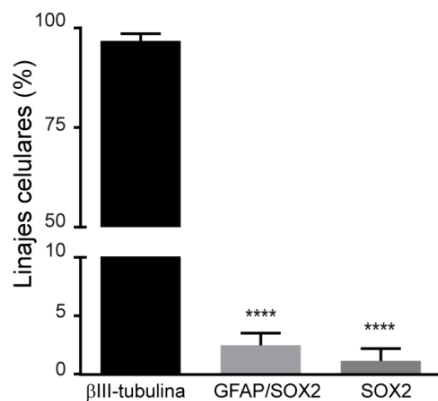


Figura 28. Linajes celulares obtenidos al finalizar los experimentos de videomicroscopía de time-lapse. Distribución relativa de los linajes neurales dentro de los árboles de linaje monitorizados durante el cultivo. β III-tubulina hace referencia a árboles neurogénicos simétricos conteniendo únicamente neuronas. GFAP/SOX2 hace referencia a árboles que sólo contienen NSCs. Por último SOX2 hace referencia a árboles que contienen células SOX2 positivas, ya que no se observaron divisiones asimétricas a día P5. Los datos mostrados representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes (**** $p < 0,0001$ ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey).

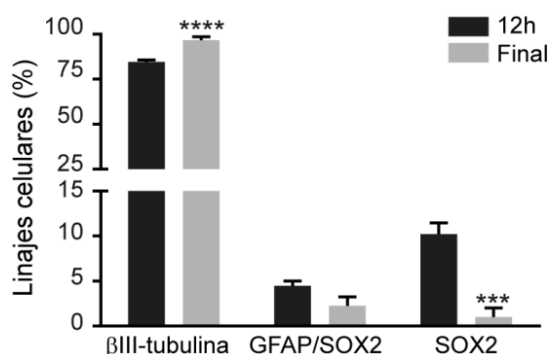


Figura 29. Comparación de las poblaciones celulares obtenidas a las 12 h de la siembra de cultivo y al finalizar el experimento. Las proporciones de los linajes celulares generados al finalizar los experimentos de time-lapse (4-5 días) son los siguientes: marcaje βIII-tubulina solo contienen neuroblastos, marcaje GFAP/SOX2 incluye aquellos linajes que contienen NSCs y el marcaje SOX2 a aquellos linajes que contienen células SOX2 positivas y neuroblastos o solo SOX2. Los valores representan la media $\pm$ SEM de cinco experimentos independientes (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey).

De hecho, cuando se compararon los resultados obtenidos de los cultivos de progenitores cerebelos aislados a día P0 y P5 (Figura 30A), se observó una clara diferencia en las poblaciones aisladas, siendo mayor el número de NSCs aisladas a día P0, mientras que a día P5 se aisló un porcentaje significativamente mayor de neuroblastos (Figura 30B).

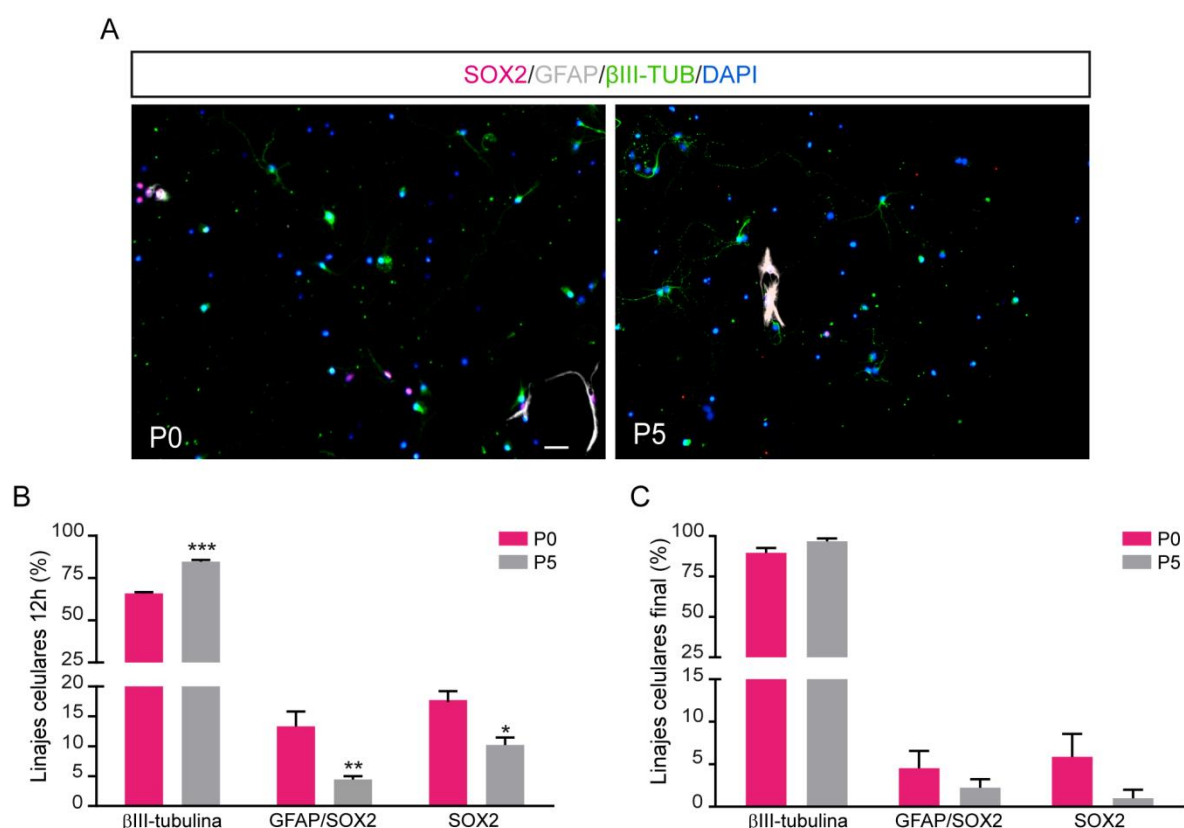


Figura 30. Comparación de los linajes obtenidos en los cultivos de progenitores neurales cerebelosos a P0 y P5. (A) Inmucitofluorescencias al finalizar el cultivo de las preparaciones de día P0 y P5 marcando SOX2 (magenta), GFAP (blanco), βIII-tubulina (verde) y DAPI (azul). **(B)** Comparación de las poblaciones celulares detectadas tras 12 horas de la realización del cultivo, definiendo los neuroblastos βIII-tubulina⁺, las NSCs GFAP/SOX2⁺ y células SOX2⁺. **(C)** Comparación de las poblaciones celulares al finalizar los experimentos. Los valores representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey). Escala: 30 μ m.

No obstante, en cuanto a las tres poblaciones analizadas a tiempo final, no se hallaron grandes diferencias de comportamiento entre los progenitores aislados a día P0 y los aislados a día P5 (Figura 30C), lo cual podría significar que en los cultivos de P0, las células GFAP/SOX2 podrían haber entrado en ciclo celular y por lo tanto en proliferación y diferenciación en mayor proporción que la población de NSCs aisladas a día P5. Es interesante hacer notar que los cambios observados también podrían haberse producido por diferencias en la muerte celular o en el porcentaje de células aisladas que comenzaban su progresión en el linaje. Sin embargo, la estimación del porcentaje de clones obtenidos así como su supervivencia mostró valores similares en ambos estadios (Figura 31B).

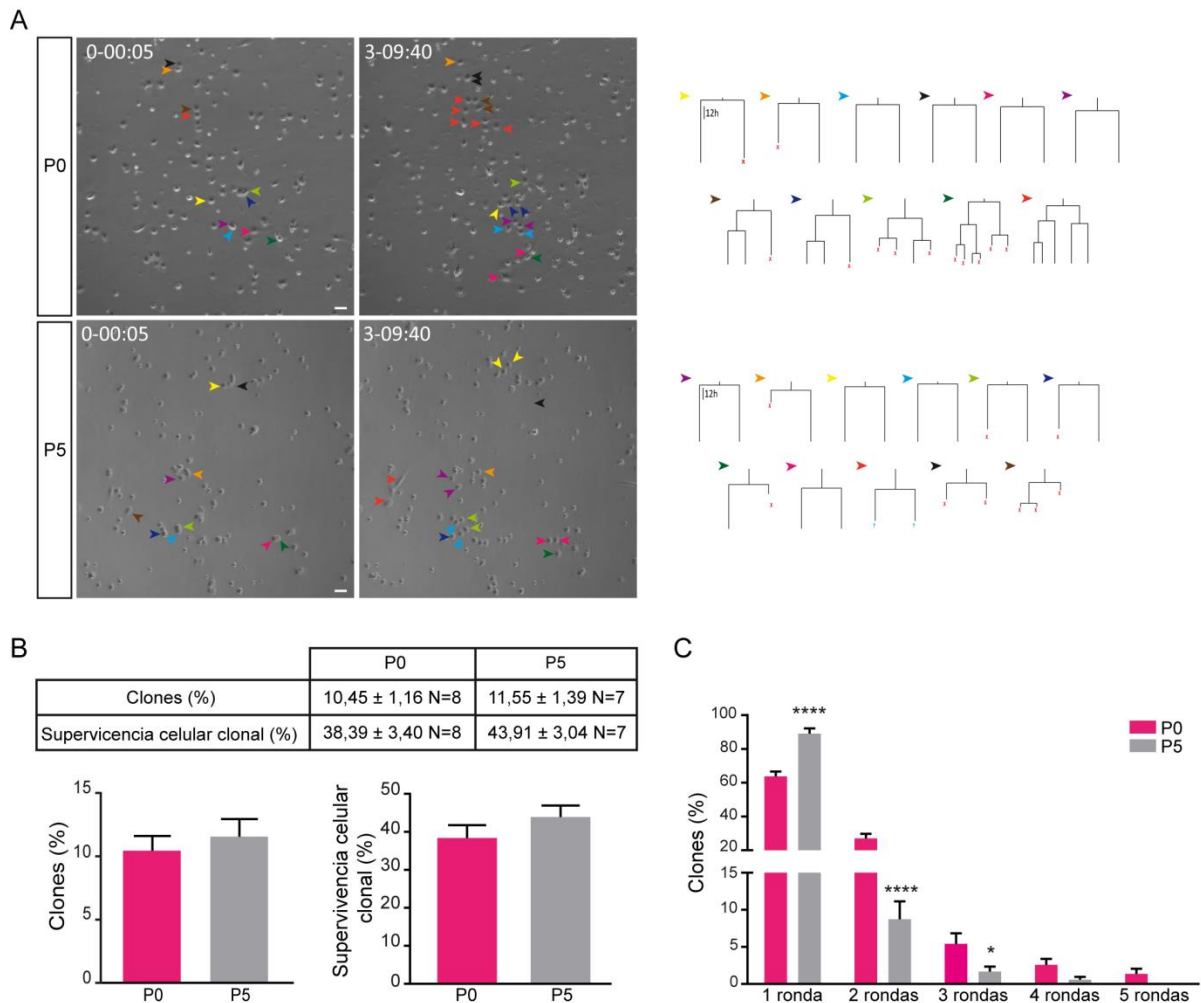


Figura 31. Comparación detallada de los cultivos de progenitores neurales cerebelosos de día P0 y P5. (A) Campos representativos y árboles generados en un experimento de time-lapse de día P0 (panel de arriba) y de día P5 (panel de abajo). Las imágenes en contraste de fase representan los diferentes árboles obtenidos por videomicroscopía de time-lapse a diferentes tiempos (día-horas:minutos). A la derecha se representan los árboles analizados señalados con las puntas de flecha. **(B)** Comparación de las células que generan clones así como de la supervivencia celular entre las preparaciones a P0 y P5 al finalizar el experimento. Los valores representan la media ± SEM de 8 experimentos independientes, test de t de Student no pareada. **(C)** Frecuencia relativa del número de rondas de división en las preparaciones de P0 y P5. Los valores representan la media ± SEM de 5 experimentos independientes (*p < 0,05, ****p < 0,0001 ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey). Escala: 30 µm.

Por el contrario, sí que se observó una mayor complejidad de los clones en las preparaciones a P0 durante la progresión en el linaje (Figura 31A), ya que experimentan más rondas de división antes de diferenciarse en neuroblastos, lo que sería consistente con un mayor porcentaje de NSCs (con tendencia a generar arboles más complejos) entrando en diferenciación (Figura 31C). En resumen, las diferencias observadas podrían estar indicando una pérdida del potencial neurogénico y una mayor tendencia a la quiescencia, por parte de las NSCs, a medida que se avanza en el desarrollo posnatal del cerebelo.

7.1.3 Los progenitores y NSCs aislados del cerebelo dan lugar a todas las poblaciones celulares generadas durante el desarrollo posnatal del mismo.

Durante el desarrollo posnatal del cerebelo se generan distintas poblaciones celulares en los tres nichos proliferativos. Concretamente, los progenitores de la capa granular externa, procedentes del labio rómbico, generan las neuronas glutamatérgicas, principalmente las neuronas granulares de cerebelo, mientras que los progenitores de la capa de células de Purkinje, originan células astrogliales. Además, en la capa de futura materia blanca se encuentran los progenitores que dan lugar a las interneuronas GABAérgicas, astrocitos parenquimales y, presumiblemente, una pequeña población de oligodendrocitos (Leto et al., 2016).

Un cultivo válido para el estudio del comportamiento de los progenitores neurales presentes en los tres nichos neurogénicos cerebelosos deberá, por tanto, ser capaz de monitorizar la producción de todas las poblaciones celulares anteriormente mencionadas. Así pues, habiendo corroborado en los experimentos anteriores que los progenitores aislados del cerebelo mantenían la capacidad neurogénica en ausencia de factores tróficos, se evaluó la capacidad de los mismos para generar las distintas poblaciones celulares que se originan durante el desarrollo posnatal del cerebelo. Para ello se analizaron tanto los linajes neuronales glutamatérgicos y GABAérgicos, como astrogliales y oligodendrogliales en las preparaciones aisladas a día P0 a través de la videomicroscopía de time-lapse seguida de inmunocitofluorescencia.

El análisis del linaje glutamatérgico se realizó mediante la detección por inmunocitofluorescencia del transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1) (Figura 32). Este linaje supuso la mayor población observada en el cultivo ($89,3\% \pm 0,92\%$) tras el análisis de 410 árboles (Figura 34A).

Además, el seguimiento de célula única evidenció que la mayoría de las neuronas glutamatérgicas generadas en el cultivo derivaban de clones simétricos neuronales que experimentaban entre cuatro y cinco rondas de división (Figura 32A y 34B). También se detectaron divisiones asimétricas dentro del linaje glutamatérgicas, en la que un progenitor fue capaz de generar células astrogliales GFAP positivas y neuronas VGLUT1 positivas, siendo la primera visualización directa de una división asimétrica dentro de este linaje (Figura 32B).

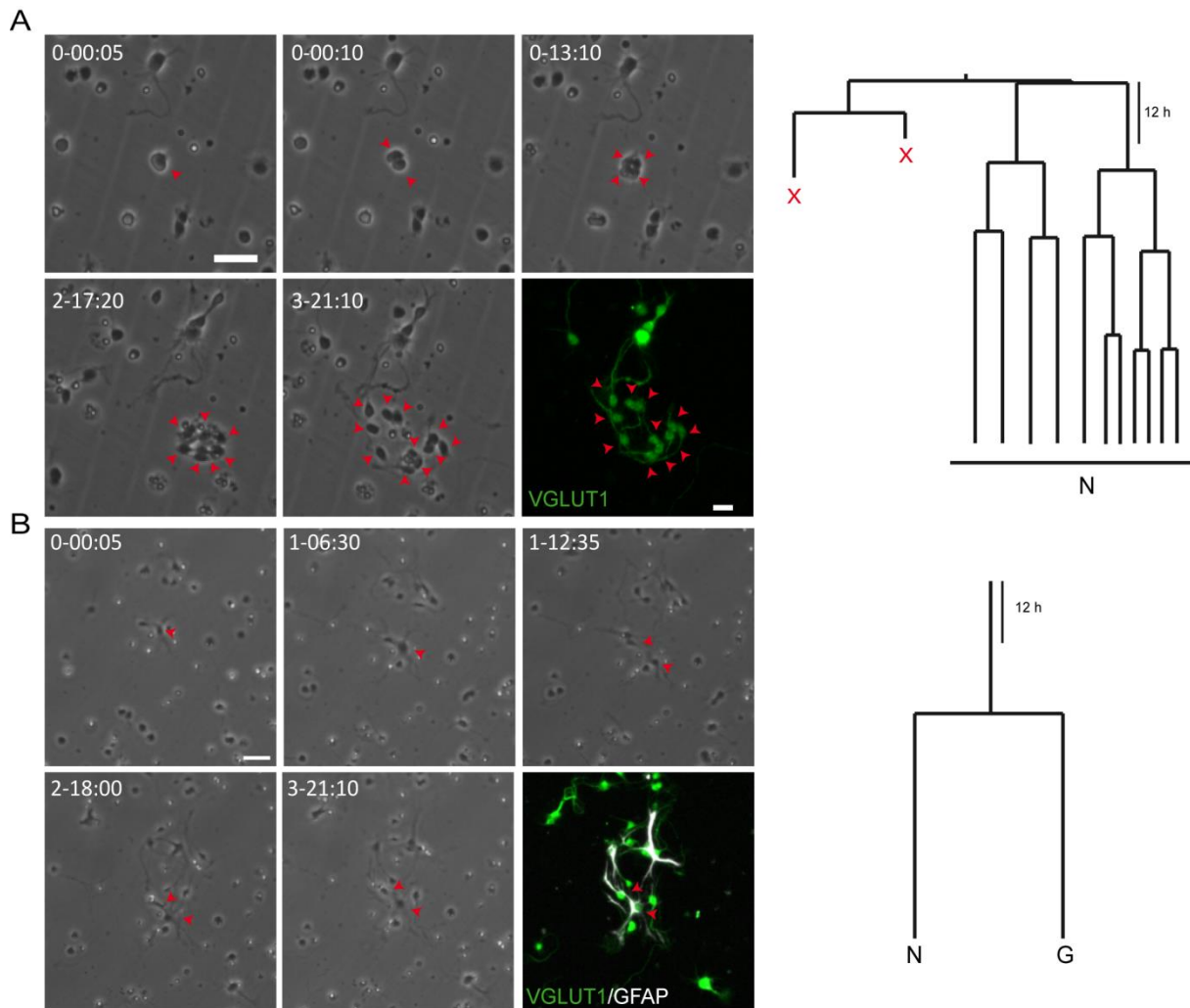


Figura 32. Los progenitores neurales aislados de P0 generan neuronas glutamatérgicas a través de divisiones simétricas y asimétricas. (A) Linaje simétrico que genera neuronas glutamatérgicas (N, neurona; X, célula muerta). **(B)** Linaje asimétrico que genera tanto progenie neuronal glutamatérgica como astrogial (N, neuronas; G, GFAP astrogial). Ambas representaciones se describen con imágenes en contraste de fase obtenidas a través de la videomicroscopía de time-lapse a diferentes tiempos (día-hora:minuto). La imagen final corresponde a una inmunocitofluorescencia para VGLUT1 (verde) y GFAP (blanco). Escala: 30 μm

Por otro lado, también pudo observarse en el cultivo la producción de interneuronas GABAérgicas, identificadas por medio del marcaje positivo para el transportador vesicular de GABA (VGAT) (Figura 33). La producción de este tipo neuronal fue significativamente inferior ($5,6\% \pm 0,73\%$) (Figura 17A). El porcentaje de las poblaciones glutamatérgicas y las GABAérgicas detectados coinciden, de hecho, con los porcentajes de estas poblaciones neuronales presentes en el cerebelo *in vivo* (White and Sillitoe, 2013, Lackey et al., 2018). La generación de las interneuronas GABAérgicas se originó a través de divisiones simétricas neurogénicas (Figura 33A) con un máximo de dos y tres rondas de división (Figura 34B). Contrariamente a lo observado en el linaje glutamatérgico, no se visualizaron divisiones asimétricas en el linaje GABAérgico. Si bien, se definieron dos tipos de neuronas GABAérgicas. Por un lado, se detectó una población de neuronas VGAT positivas con una morfología estrellada (Figura 33A), generadas tras una, dos o tres rondas de división simétrica. Por otro lado, se observó una población de neuroblastos también VGAT positivos

que no dividían a lo largo del experimento, sino que se diferenciaban exhibiendo neuritas más elaboradas (Figura 33B).

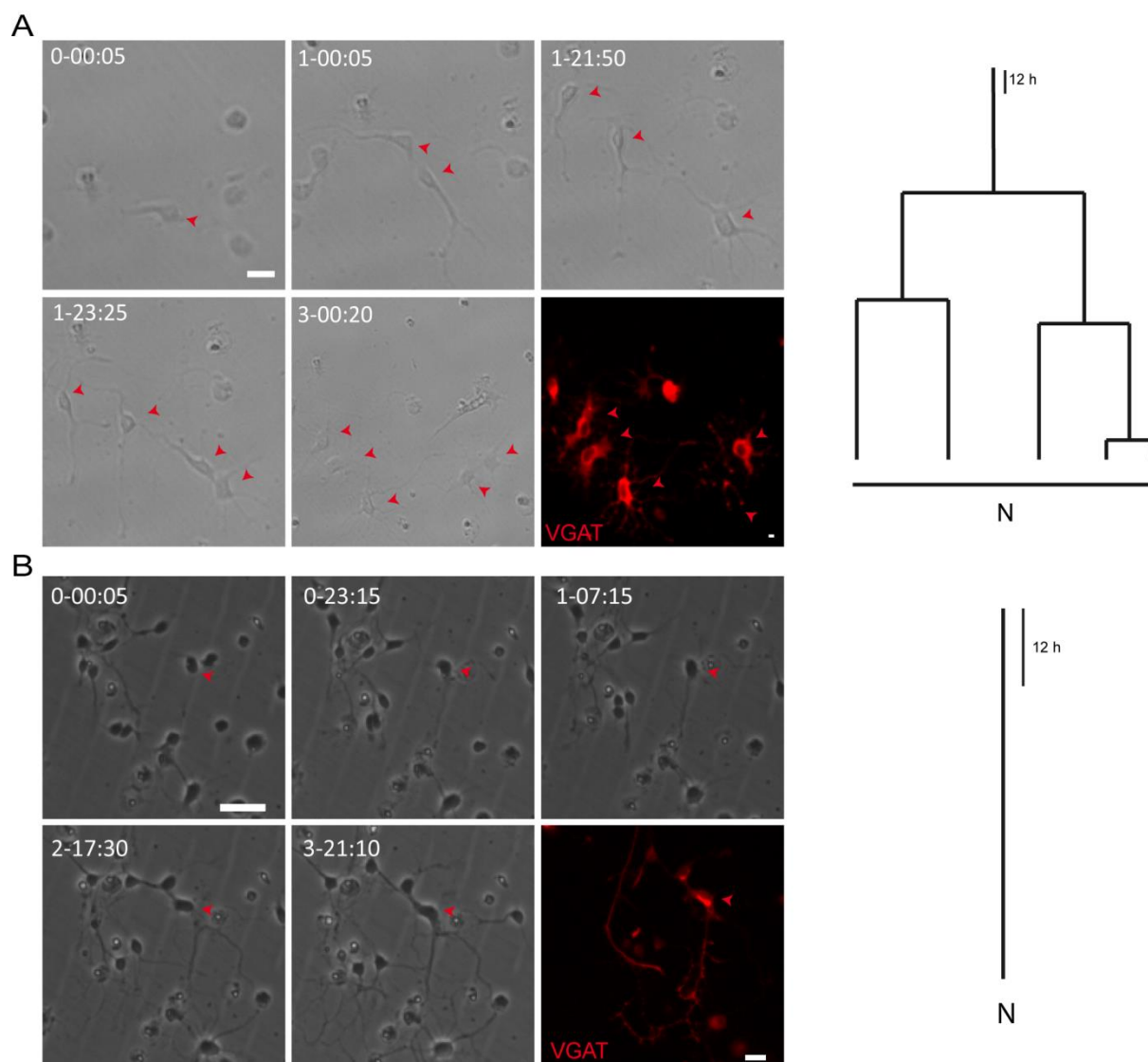


Figura 33. Las células aisladas a P0 generan neuronas GABAérgicas. (A) Linaje simétrico que genera progenie GABAérgica (N, neurona). **(B)** Representación de un neuroblasto GABAérgico que diferencia a lo largo del experimento. Ambas representaciones se describen con imágenes en contraste de fase obtenidas a través de la videomicroscopía de time-lapse a diferentes tiempos (día-hora:minuto). La imagen final corresponde a una inmunocitofluorescencia para VGAT (rojo). Escala: 30 μ m.

La ausencia de divisiones asimétricas en el linaje GABAérgico, así como el menor número de rondas de división que experimentaban en comparación con el linaje glutamatérgico, señaló una diferencia de comportamiento entre los progenitores que daban lugar al linaje GABAérgico y al linaje glutamatérgico.

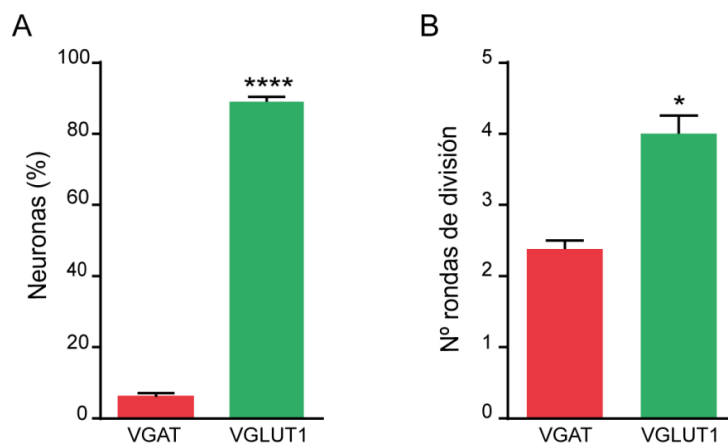


Figura 34. Proporciones relativas del linaje glutamatergico y GABAérgico. (A) Proporciones relativas de las neuronas glutamatergicas (VGLUT1) y GABAérgicas (VGAT) al finalizar los experimentos. **(B)** Número de rondas de división en los linajes glutamatergicos y GABAérgicos. Los valores representan la media $\pm$ SEM de 8 experimentos independientes (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, test de t de Student no pareada).

Para confirmar con mayor seguridad la existencia de estas poblaciones neuronales en el cultivo, así como la funcionalidad y conectividad de las neuronas generadas, se llevaron a cabo estudios de *patch-clamp* como se detalla en Métodos. En primer lugar, se diferenció entre neurona GABAérgica y glutamatergica atendiendo a criterios morfológicos. De manera que, las neuronas glutamatergicas se caracterizaban por presentar un soma ovoide y procesos bipolares (Figura 35A), mientras que las GABAérgicas presentaban un soma poligonal y procesos multipolares citoplasmáticos (Figura 36A), análogamente a lo que habíamos observado en los experimentos de inmunocitofluorescencia tras la videomicroscopía de timelapse.

Tras la caracterización morfológica, se analizó el comportamiento eléctrico de ambos tipos neuronales tras la aplicación de un pulso despolarizante (+10 mV; 100 ms). Como se muestra en la Figura 35 la aplicación de un pulso despolarizante generó corrientes de entrada de inactivación rápida seguidas de corrientes de salida en ambos tipos neuronales, si bien diferían en la amplitud. Las corrientes de entrada registradas en las células multipolares eran de mayor magnitud ($717,3 \pm 230,0$ pA, $n=10$) que las observadas en las células bipolares ($351,7 \pm 63,9$ pA, $n=19$). Sin embargo, las amplitudes de las corrientes de salida no eran tan diferentes. Los valores obtenidos en las células multipolares fueron $51,72 \pm 6,1$ (n= 15) y los de las células bipolares $59,9 \pm 7,4$ pC ($n= 23$). Por consiguiente, las neuronas glutamatergicas así como GABAérgicas generadas por los progenitores neurales de cerebelo aislados a día P0 eran capaces de disparar potenciales de acción de pequeña amplitud tras la aplicación de un pulso despolarizante desde un potencial fijo de membrana de -60 mV ($n=5$).

A continuación, se estudió la respuesta de ambos tipos neuronales a la aplicación de los neurotransmisores GABA (100 μ M) y glutamato (1 mM) (Figura 35C y Figura 36B). Tanto las neuronas bipolares glutamatergicas como las multipolares GABAérgicas analizadas respondieron a los dos neurotransmisores. Las corrientes iónicas inducidas por estimulaciones con GABA eran de mayor amplitud ($922,2 \pm 210,3$ pA, $n = 9$ y $391,9 \pm 79,6$ pA,

n = 8 en neuronas bipolares y multipolares, respectivamente) que las evocadas por glutamato ($178,1 \pm 52,2$ pA, n = 15 y $218,6 \pm 65,2$ pA, n = 11).

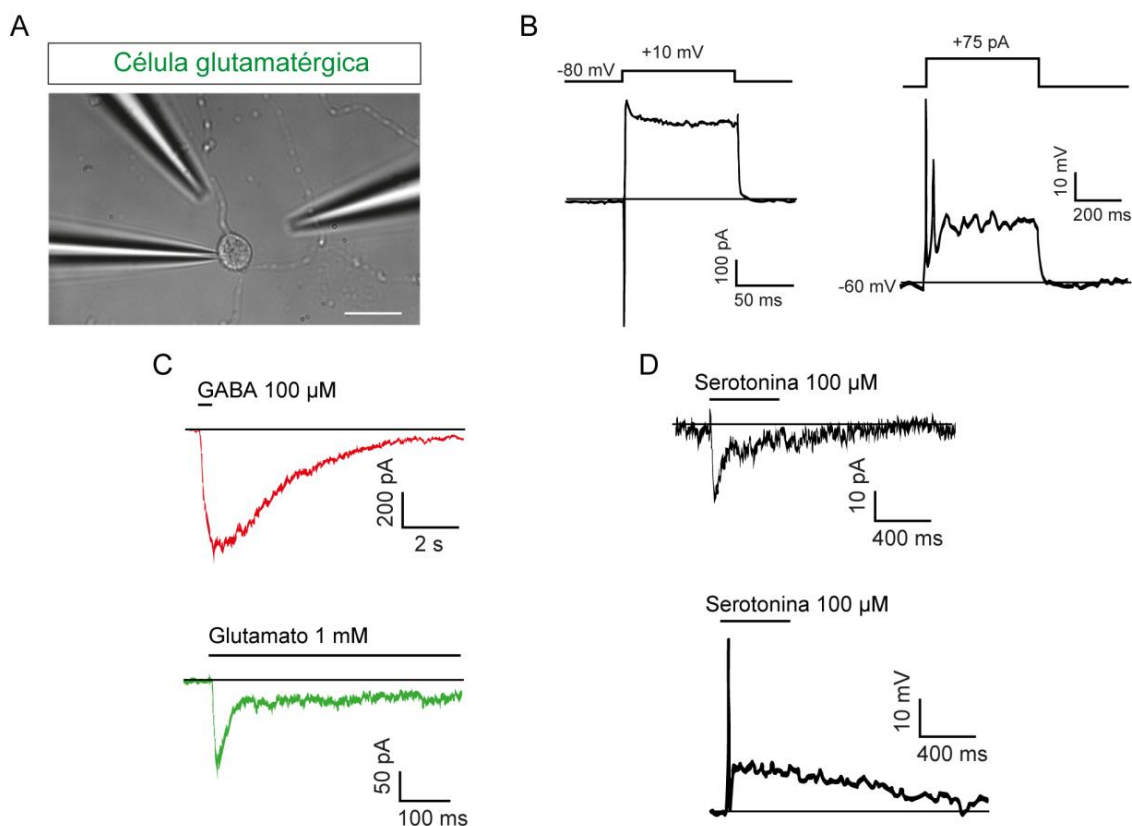


Figura 35. Caracterización electrofisiológica de las neuronas glutamatergicas a día 7 *in vitro*, obtenidas a partir del cultivo de progenitores cerebelosos aislados a día P0. **(A)** Imagen de una célula bipolar (neurona glutamatergica) con la pipeta de *patch-clamp* colocada en el soma de la célula. Las otras dos pipetas se usan para aplicar los agonistas (glutamato y GABA). Escala: 20 μ m. **(B)** Registros de corriente y tensión de la célula adyacente. A la izquierda se muestran las corrientes de entrada y de salida inducidas por un pulso de 100 ms a 10 mV desde una V_h de -80 mV. El registro de la derecha representa cambios de voltaje similares a los potenciales de acción evocados por una inyección de corriente de 75 pA de una V_{comm} de 60 mV. Los registros obtenidos son representativos de cinco células de dos cultivos independientes. **(C)** Corrientes generadas en respuesta a la estimulación con GABA (100 μ M) y glutamato (1 mM). **(D)** Respuestas de corriente (arriba) y voltaje (abajo) tras la estimulación con serotonina (100 μ M) aplicada en la misma célula. Las barras negras horizontales representan el tiempo de estimulación con las diferentes drogas. Los resultados obtenidos son representativos de 15 células estimuladas con glutamato, 9 con GABA y 10 con serotonina.

Durante el desarrollo posnatal temprano del cerebelo, las neuronas glutamatergicas también expresan el receptor ionotrópico de serotonina 5-HT₃ (Oostland et al., 2011). Por esa razón, se registraron las corrientes inducidas por estimulaciones con serotonina (100 μ M) en los dos tipos neuronales (Figura 35D y Figura 36B). Así, se registraron corrientes iónicas en el 83% de las neuronas bipolares analizadas de pequeña magnitud ($16,8 \pm 3,3$ pA; n = 10). Dichas corrientes eran capaces de generar un potencial de acción voltaje similar al potencial de acción en los registros de pinzas amperimétricas (Figura 35D). Sin embargo, como se muestra en la Figura 36B, no se detectaron corrientes inducidas por serotonina en las neuronas multipolares analizadas (n=7).

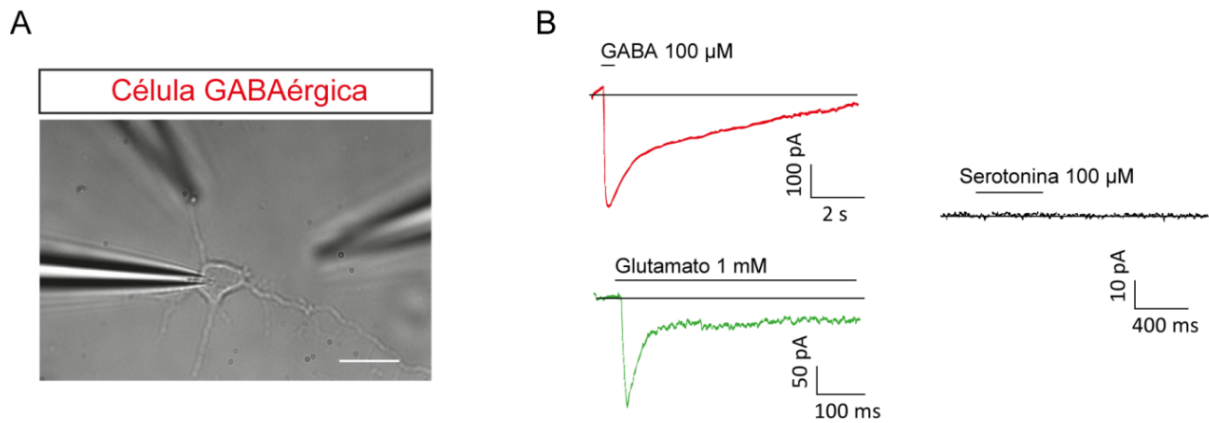


Figura 36. Caracterización electrofisiológica de las neuronas GABAérgicas a día 7 *in vitro*, obtenidas a partir del cultivo de progenitores cerebelosos aislados a día P0. (A) Imagen de una célula multipolar y los demás elementos para el registro como se especifica en la Figura 35. Escala: 20 µm. (B) Corrientes en respuesta a GABA, glutamato y 5-HT en la célula de la imagen. Las barras negras horizontales representan el tiempo de estimulación con las diferentes agonistas. La serotonina no desencadena ninguna corriente. Los resultados son representativos para 11 células estimuladas con glutamato y 8 con GABA.

Finalmente, se analizó si la estimulación de las neuronas bipolares glutamatérgicas con serotonina generaba corrientes iónicas en la célula vecina. Como se muestra en la **Figura 37**, la aplicación de serotonina en una célula bipolar indujo una serie de corrientes iónicas de pequeña amplitud en la célula adyacente, muy similares a las generadas sinápticamente. La amplitud de dichas corrientes se redujo por la presencia de un antagonista del receptor de NMDA, el compuesto MK-801 (1 µM). Este hecho indicó que dichas corrientes estaban mediadas por el glutamato liberado tras la estimulación de la célula con serotonina (n = 4).

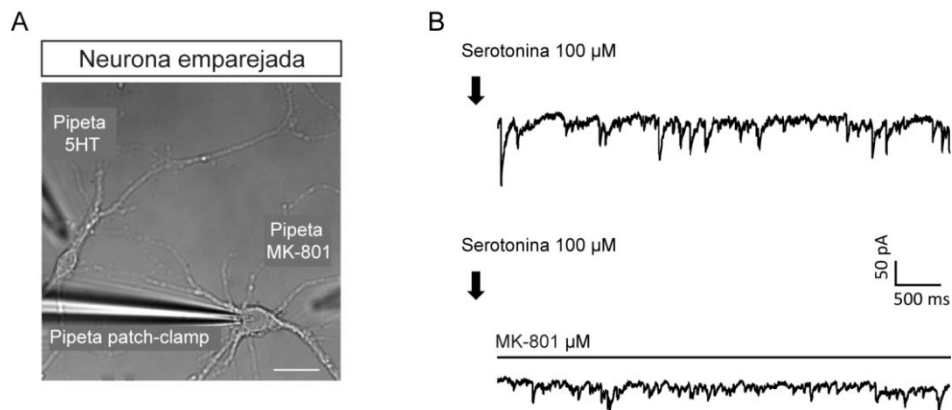


Figura 37. Caracterización electrofisiológica a día 7 de las preparaciones de cerebelo a día P0. (A) Imagen de una célula bipolar y una multipolar. Se indica la localización de la pipeta de *patch-clamp* y de las dos pipetas para la aplicación de 5-HT y MK-801. Escala: 20 µm. (B) El panel muestra que la aplicación de 5-HT en la célula bipolar no registrada evoca corrientes similares a las generadas sinápticamente en la neurona multipolar parcheada. El registro inferior muestra que la actividad serotoninérgica es sensible a MK-801 (1 µM), un antagonista del receptor NMDA (n = 4).

Otro hecho importante es que, además de las poblaciones de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, las preparaciones de progenitores neurales aislados a día P0, permitieron monitorizar la generación de células astrogiales GFAP positivas (presumiblemente astrocitos

parenquimales), a través de divisiones simétricas (Figura 38A). En su mayoría dichos clones simétricos no expresaban SOX2, lo cual sugirió la presencia de dos poblaciones GFAP positivas. Una población de NSCs GFAP/SOX2 positivas capaz de generar neuronas y copias de sí mismas a través de divisiones asimétricas, y una población de astrocitos parenquimales GFAP positivos pero SOX2 negativos.

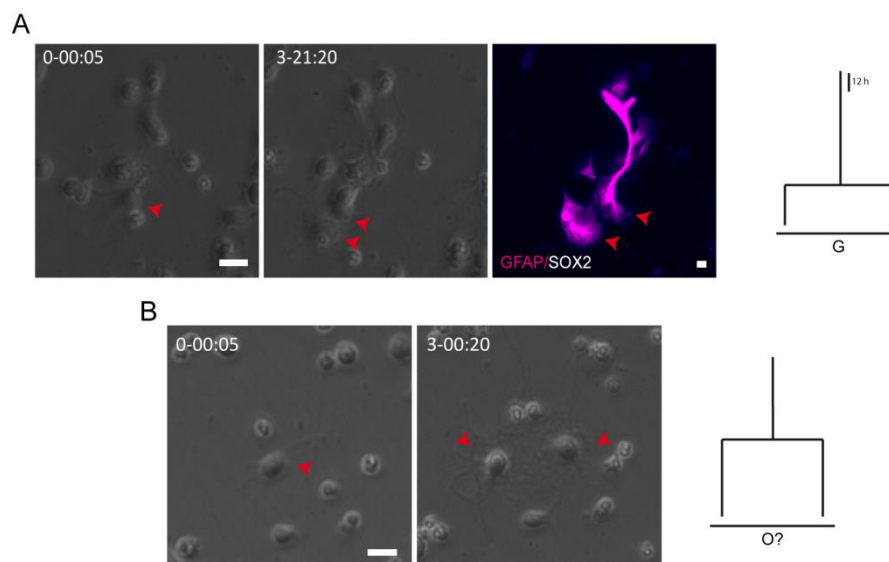


Figura 38. Los progenitores neurales cerebelosos aislados a día P0 son capaces de generar células astrogliales y, presumiblemente, oligodendrogliales. (A) Ejemplo de un linaje simétrico que genera dos células GFAP positivas (G: células GFAP positiva). La ausencia de marcaje para SOX2 sugiere que las células generadas son astrogliales. (B) Ejemplo de un linaje simétrico que genera dos células con una morfología que recuerda al linaje oligodendroglial. Todos los linajes se describen con imágenes en contraste de fase obtenidas a través de la video microscopía de time-lapse a diferentes tiempos (día-hora:minuto). La última foto corresponde a la inmunocitofluorescencia para GFAP (magenta) y SOX2 (blanco). Escala: 30 μ m.

Por último, se observó la generación de células con una morfología similar a la de los oligodendrocitos mediante divisiones simétricas, aunque su identificación se basó, en esta ronda de experimentos en criterios morfológicos y no en marcadores específicos (Figura 38B). La generación de oligodendrocitos O4 positivos si fue detectada en otra serie de experimentos que mostraremos más adelante. Por lo tanto, considerando todos estos experimentos en conjunto, esta preparación celular permitió aislar las poblaciones neurales generadas en los tres nichos proliferativos presentes en el cerebelo posnatal.

7.1.4 VNUT se expresa en el cerebelo posnatal y co-localiza con las NSCs del cerebelo

El aislamiento de los progenitores cerebelosos de las señales extrínsecas que se producen durante del desarrollo del cerebelo, constituía un perfecto escenario para el estudio del efecto de factores individuales sobre el comportamiento de las NSCs. De hecho, la acción moduladora de los neurotransmisores sobre el balance entre quiescencia y activación de las NSCs es una de las líneas de investigación más prometedora para la modulación farmacológica de la neurogénesis (Berg et al., 2013). Por ello, y debido a nuestra experiencia en el campo de la neurotransmisión purinérgica, decidimos realizar el estudio sobre el papel del transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) como potencial modulador de la

neurogénesis en las etapas tempranas del desarrollo del cerebelo. Este transportador es el responsable del almacenamiento de los nucleótidos en vesículas de secreción, iniciando así la neurotransmisión purinérgica (Miras-Portugal et al., 2019a, Sawada et al., 2008, Alfonso et al., 2012).

Estudios anteriores del grupo habían revelado la potencial relevancia de VNUT en el desarrollo del cerebelo (Menendez-Mendez et al., 2015, Menendez-Mendez et al., 2017). De acuerdo a estos resultados, se analizaron los niveles de proteína del transportador VNUT en extractos de cerebelo a distintos estadios del desarrollo posnatal del cerebelo (P0, P5 y P15) y en el estadio adulto. Los ensayos de *Western Blot* mostraron la presencia del transportador VNUT en todas las etapas del desarrollo posnatal del cerebelo y en el estadio adulto (Figura 39A-B). Si bien, los mayores niveles de proteína se obtuvieron también en el día posnatal P0, los cuales se mantuvieron hasta el día P5. A partir del día P15 se producía una disminución de los mismos que se mantuvo hasta el estadio adulto. Tras determinar los niveles del transportador VNUT en el cerebelo en formación, se analizó su distribución en las distintas etapas del desarrollo posnatal mediante estudios de inmunohistofluorescencia en secciones de tejido cerebeloso.

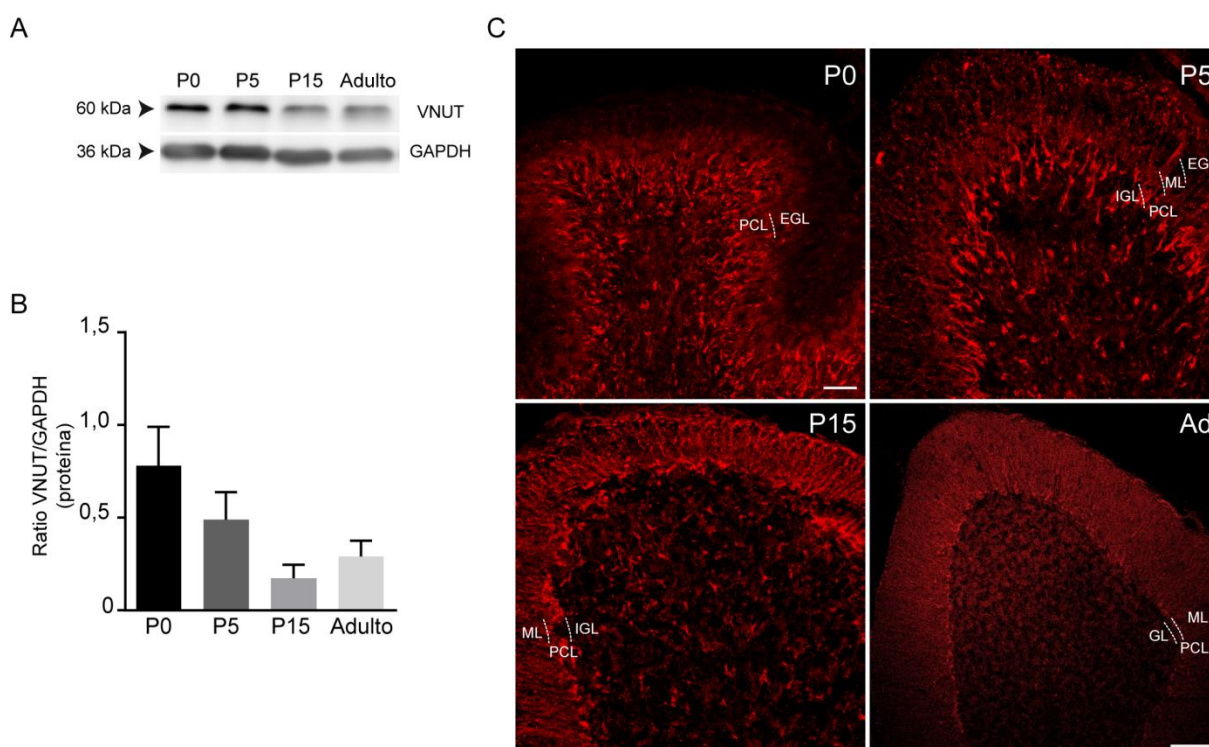


Figura 39. Presencia de VNUT en el desarrollo posnatal del cerebelo (A) Imagen representativa de la detección de VNUT en los experimentos de *Western Blot*. (B) Análisis de los niveles de proteína de VNUT en extractos de cerebelo a diferentes estadios. Los valores se normalizaron con respecto a los niveles de proteína de GAPDH. (C) Inmunohistofluorescencia de detección de VNUT en secciones de cerebelo de diferentes estadios del desarrollo posnatal y adulto. La línea de puntos indican las zonas de la corteza cerebelosa, EGL; capa granular externa, ML; capa molecular, PCL; capa de células de Purkinje, IGL; capa granular interna. Los valores representan la media $\pm$ SEM de seis experimentos independientes (ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey). Escala: 30 μ m (P0, P5 y P15) y 50 μ m (Adulto).

Coincidiendo con lo observado en los resultados obtenidos en los experimentos de *Western Blot*, el transportador VNUT se detectó desde los estadios más tempranos del desarrollo posnatal del cerebelo (P0 P5 y P15) hasta el estadio adulto. Si bien, su distribución fue detectada en los tres nichos neurogénicos, su presencia fue siempre más intensa en la capa de las células de Purkinje (Figura 39C).

Una de las mayores controversias respecto al estudio de los diferentes componentes de la señalización purinérgica en general, y al transportador VNUT en particular, al ser el miembro identificado más recientemente (Sawada et al., 2008), es la falta de herramientas específicas para su detección. Para solventar cualquier duda, se confirmó la especificidad del marcaje obtenido por dos vías independientes. Primeramente, analizamos la especificidad de los anticuerpos frente a VNUT en experimentos de sobreexpresión del transportador en la línea celular murina de neuroblastoma N2a. Las células se transfectaron con un plásmido control que codificaba para la proteína fluorescente verde (GFP) o bien se co-transfectaron con un plásmido que codificaba para GFP y otro para VNUT (sobreexpresión). Como se puede ver en la Figura 40 el anticuerpo reconoció de forma específica la proteína VNUT pudiendo visualizar la sobreexpresión de VNUT en los experimentos de *Western Blot* e inmunocitofluorescencia.

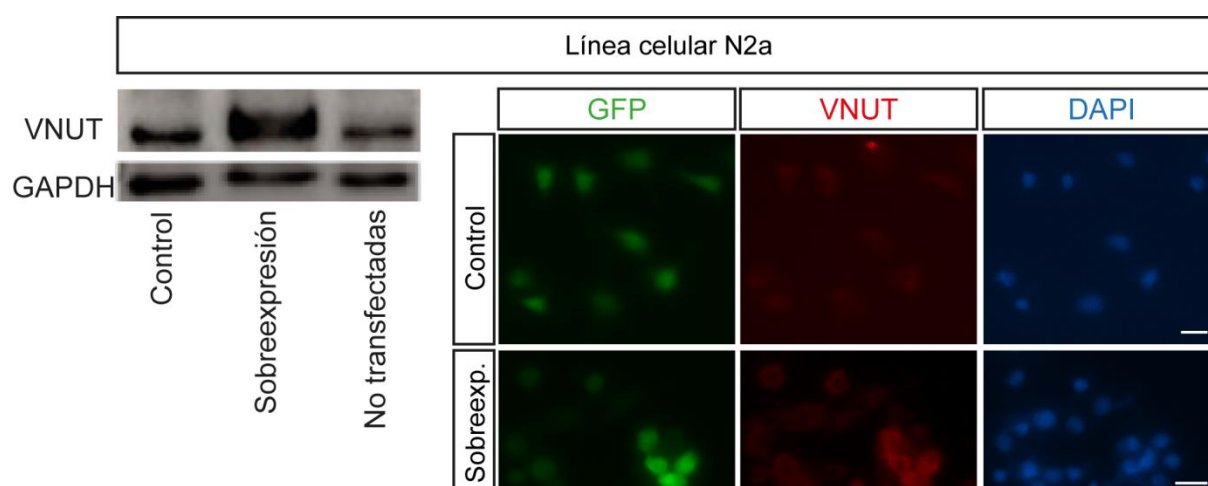


Figura 40. Especificidad del anticuerpo de VNUT. Experimentos de sobreexpresión en la línea celular N2a transfectadas con plásmidos de sobreexpresión (GFP y VNUT) o control (GFP). Se muestra como el anticuerpo reconoce VNUT tanto en los ensayos de *Western Blot* (izquierda) como en los de inmunocitofluorescencia (derecha). Escala: 50 μ m.

Por otro lado, se chequeó la especificidad de marcaje de VNUT analizando su co-localización con la maquinaria celular asociada principalmente a sus funciones conocidas, es decir, la maquinaria vesicular exocitótica y la función lisosomal (Menendez-Mendez et al., 2017, Shin et al., 2012). Así, se confirmó la presencia de VNUT en vesículas sinápticas a través de ensayos de inmunohistofluorescencia. Para ello, se realizó una doble tinción con VNUT y las proteínas vesiculares sinaptofisina y sinaptobrevina en secciones de cerebelo P0. Además, también se detectó la presencia de VNUT en lisosomas al co-localizar con el marcador lisosomal LAMP-1 (Figura 41).

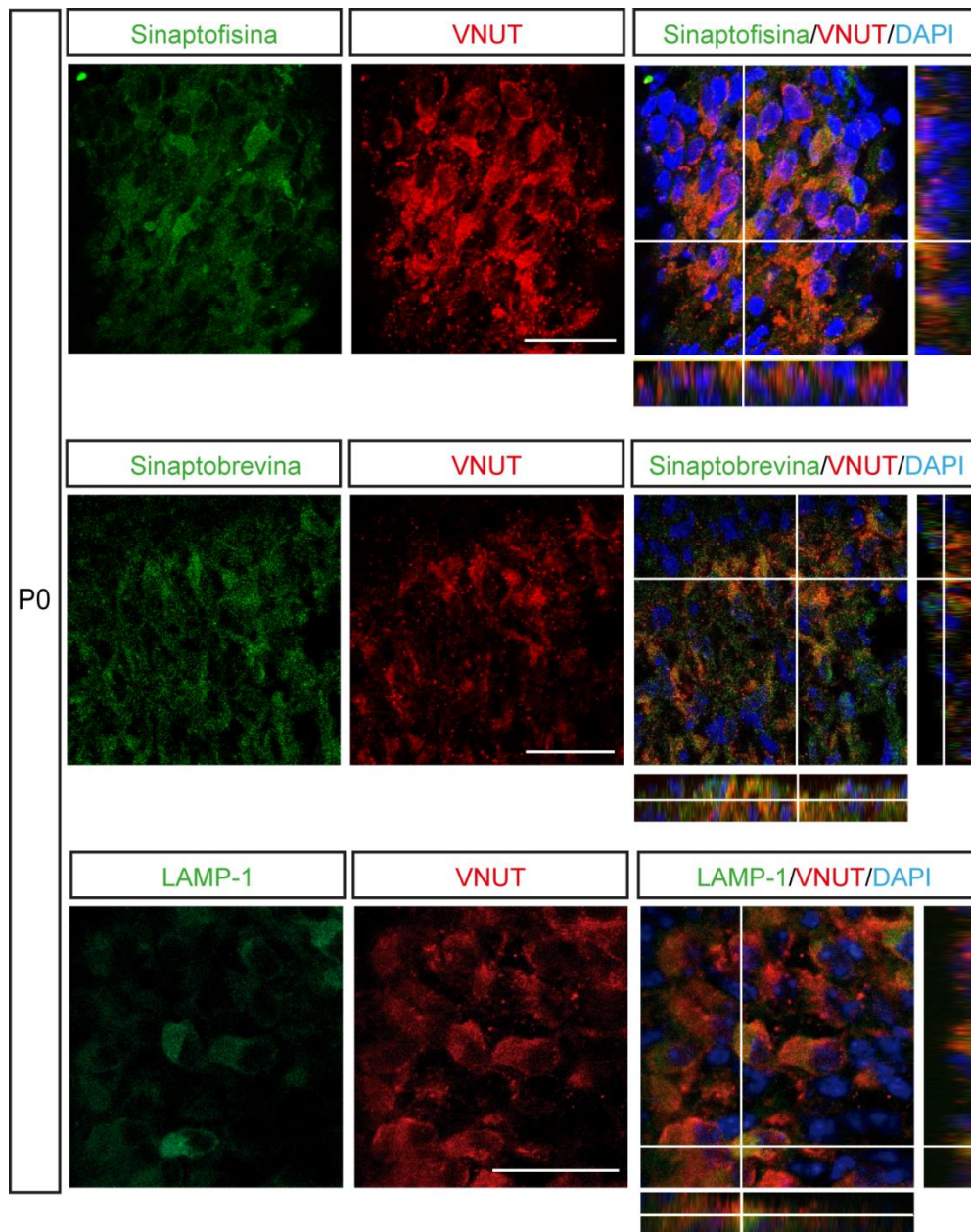


Figura 41. VNUT co-localiza con marcadores vesiculares y lisosomales. Co-localización de VNUT (rojo) con sinaptofisina, sinaptobrevina y LAMP-1 (verde) en secciones de cerebelo P0. El panel de la derecha muestra la proyección ortogonal, señalando la co-localización de VNUT con sinaptobrevina, sinaptofisina y LAMP-1. Escala: 30 μ m.

Es importante destacar que la expresión de VNUT en el cerebelo precedía a la de otros transportadores vesiculares de neurotransmisores como VGLUT1. Además, el pico de expresión de VNUT coincidía con la etapa de máxima expresión de la nestina, un marcador de células madres neurales durante el desarrollo del sistema nervioso central (Lendahl et al., 1990, Menendez-Mendez et al., 2017). Adicionalmente, se observó una interesante co-localización de VNUT y Nestina durante las primeras etapas del desarrollo posnatal, sugiriendo un posible papel del transportador VNUT en la generación y diferenciación neuronal durante el desarrollo posnatal del cerebelo (Figura 42).

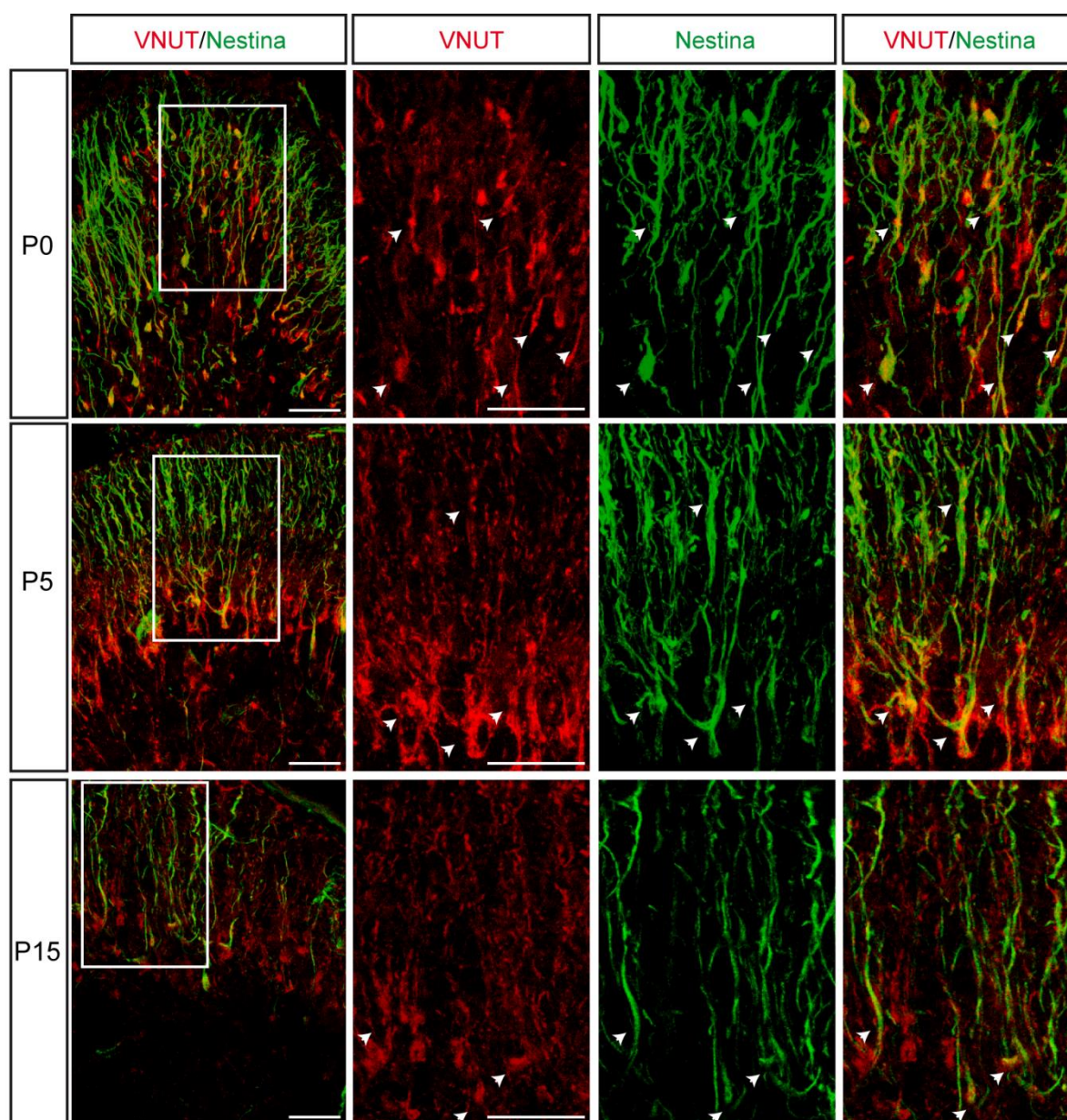


Figura 42. VNUT co-localiza con el marcador de NSCs nestina, a lo largo del desarrollo del cerebelo posnatal. Imágenes de inmunohistofluorescencia que muestran la co-localización de VNUT (rojo) con nestina (verde) en secciones de tejido del cerebelo en desarrollo (P0, P5 y P15). Las imágenes de la derecha son magnificaciones de los recuadros en los que las puntas de flecha muestran las células donde co-localiza VNUT con nestina. Escala: 30 μ m.

Para confirmar la presencia de VNUT en las NSCs posnatales de cerebelo se analizó la co-expresión de VNUT con otro marcador de NSCs, SOX2, a lo largo de las distintas etapas del desarrollo posnatal cerebelar. Los ensayos de inmunohistofluorescencia mostraron la presencia de una población de células SOX2 positivas en los tres nichos proliferativos, la cual se mantenía hasta el estadio adulto. Curiosamente, el transportador VNUT aparte de estar presente en los tres nichos proliferativos, co-localizaba con esta población SOX2 positiva desde P0 hasta el estadio adulto (Figura 43). Si bien la co-localización de ambos marcadores presentó una mayor intensidad en la capa de las células de Purkinje.

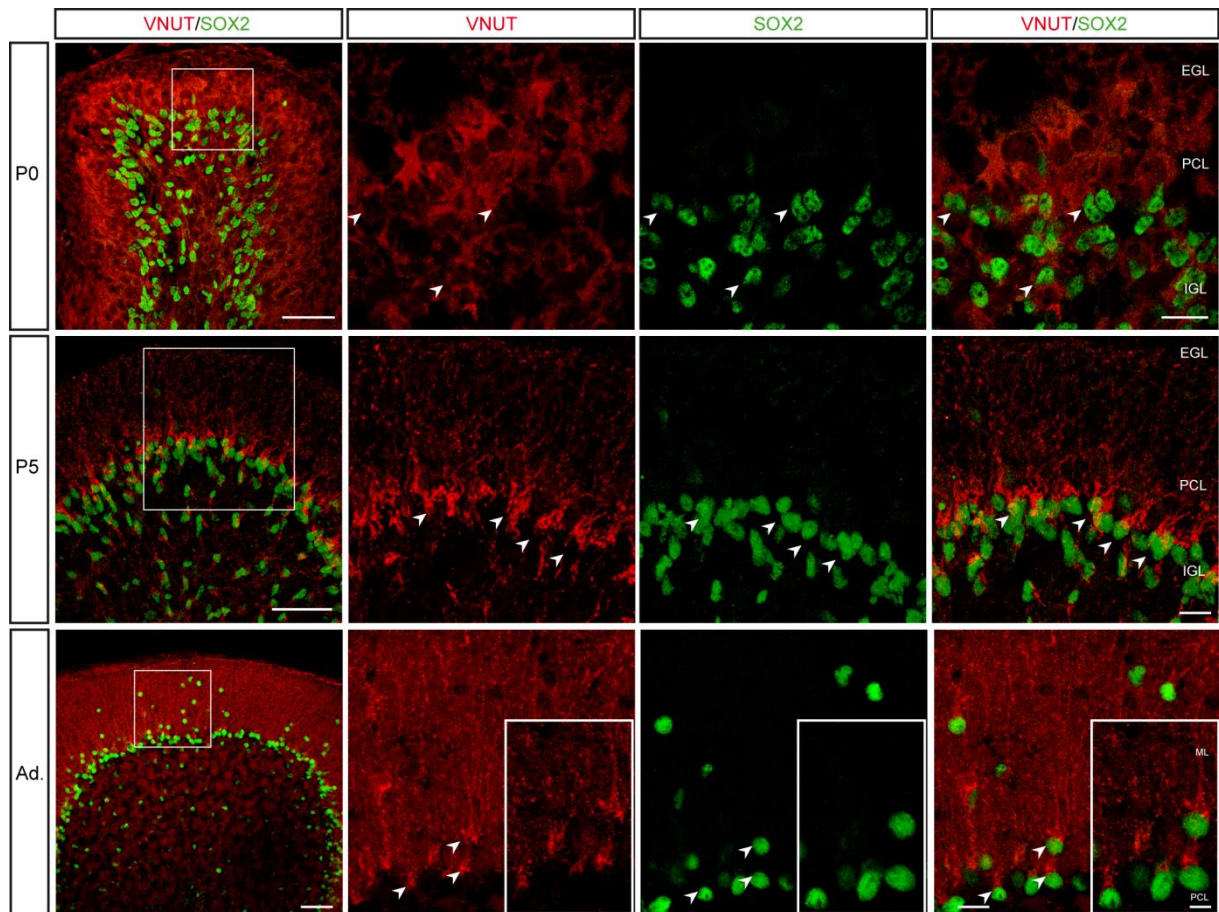


Figura 43. VNUT co-localiza con el marcador de NSCs SOX2. Imágenes de inmunohistofluorescencia que muestran la co-localización de VNUT (rojo) con SOX2 (verde) en secciones de tejido del cerebelo en desarrollo (P0 y P5) y adulto. Las imágenes de la derecha son magnificaciones de los recuadros en los que las puntas de flecha muestran las células donde co-localiza VNUT con SOX2. ML; capa molecular, PCL; capa de células de Purkinje, IGL; capa granular interna. Escala: 50 μ m.

Tras confirmar la co-localización de VNUT con el marcador de NSCs SOX2 y atendiendo a la morfología similar a la glía radial que presentaban VNUT a partir del día P5, se analizó su co-localización con la proteína GFAP. Para ello, se realizó una inmunohistofluorescencia triple con VNUT, SOX2 y GFAP en secciones de tejido cerebeloso P0. La proteína GFAP y el transportador VNUT presentaron un marcaje similar y además co-localizaban con el marcador SOX2. Este patrón de expresión reveló la presencia del transportador VNUT tanto en la Glia de Bergmann como en las NSCs del cerebelo. También se observó una población de progenitores neurales VNUT/SOX2 positivos y GFAP negativos (Figura 44A). Además, este patrón de expresión se mantuvo en etapas más tardías del desarrollo posnatal (Figura 44B).

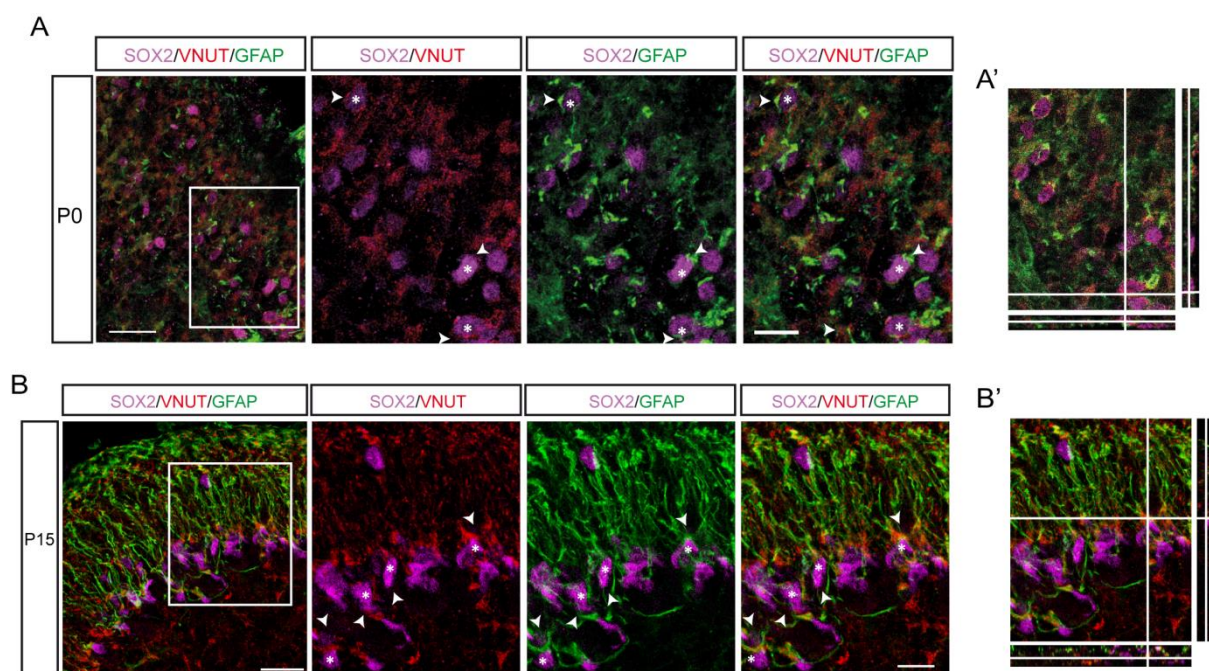


Figura 44. VNUT se expresa en las NSCs cerebelosas. (A y B) Imágenes de inmunohistofluorescencia de secciones cerebelosas P0 (A) y P15 (B) donde se muestra VNUT (Rojo), SOX2 (magenta) y GFAP (verde). Las imágenes de la derecha son magnificaciones del recuadro blanco donde las puntas de flecha señalan las células donde se da la co-localización de VNUT, SOX2 y GFAP. **(A' y B')** Análisis de proyección ortogonal que resalta la co-localización de VNUT, SOX2 y GFAP. Escala: 30 µm y 15 µm en las imágenes de mayor magnificación.

Todas estas poblaciones observadas *in vivo* pudieron ser observadas también *in vitro* en nuestro modelo de cultivo de progenitores de P0. Asimismo, detectamos valores de proporciones relativas de las poblaciones de NSCs Nestina/VNUT/SOX2 positivas semejantes a las de poblaciones GFAP/SOX2 positivas (Figura 45).

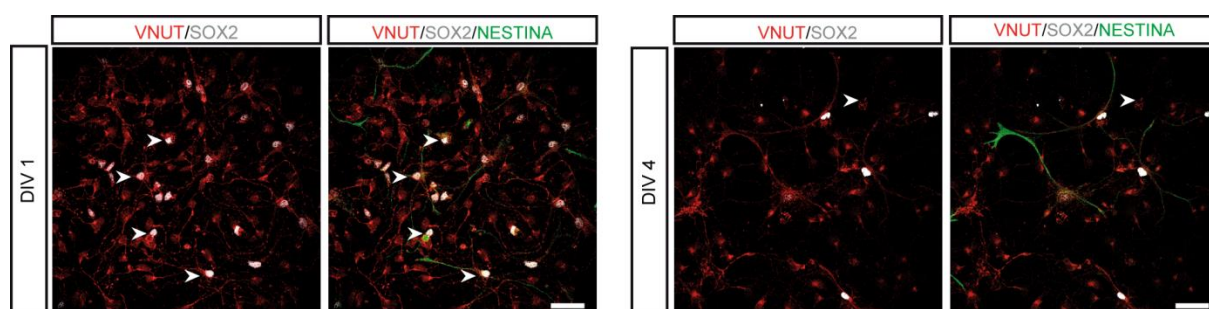


Figura 45. Expresión de VNUT en las preparaciones de progenitores de cerebelo aislados a día P0. Imágenes representativas donde se confirma la co-localización de VNUT (rojo) con los marcadores de NSCs SOX2 (blanco) y nestina (verde) en las preparaciones de progenitores P0 recién sembradas (DIV 0). En el panel de la derecha se muestra la disminución de dicha población a medida que progresa el cultivo al cuarto día *in vitro* (DIV 4). Escala: 30 µm.

Llegados a este punto, es importante dejar claro que la expresión de VNUT no está restringida a la población de NSCs cerebelosas posnatales si no que su expresión aparece en todas las poblaciones del linaje neural en el cerebelo (Figura 46). Así, los ensayos de inmunocitofluorescencia evidenciaron la presencia de dicho transportador en los linajes

neuronaes, astrogliaes y oligodendrogliales al co-localizar con los marcadores β III-tubulina, GFAP y O4, respectivamente.

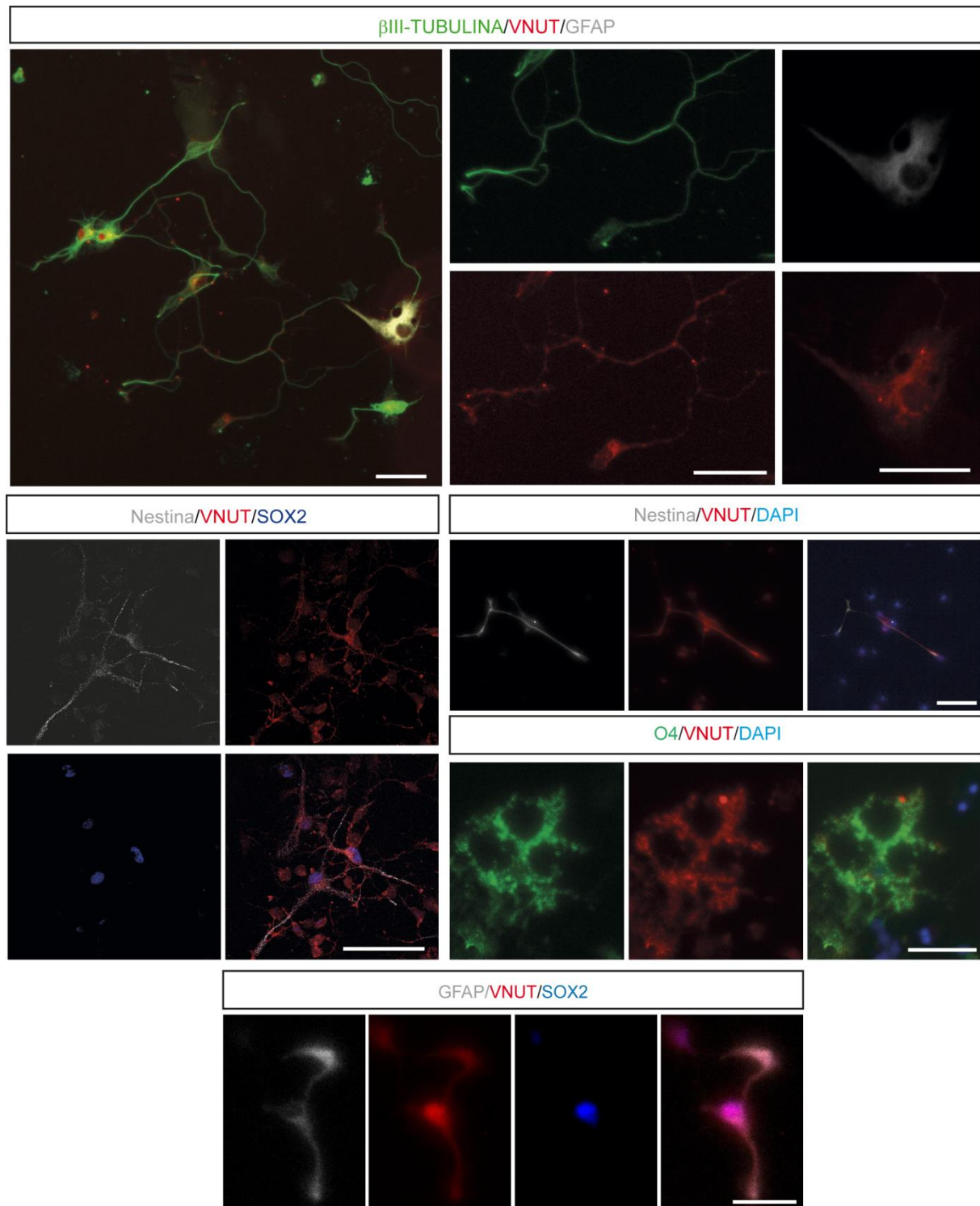


Figura 46. Expresión de VNUT en las distintas poblaciones celulares del cerebelo. Imágenes de inmunocitofluorescencia que muestran la expresión de VNUT en los cultivos celulares de progenitores cerebelosos. El panel superior a la izquierda muestra una vista general de las preparaciones de cerebelo P0. VNUT co-localiza con neuronas (β III-tubulina⁺), astrocitos (GFAP⁺), NSCs (nestina⁺, nestina/SOX2⁺, GFAP/SOX2⁺) y oligodendrocitos (O4⁺). Escala: 50 μ m.

7.1.5 La inhibición del transportador VNUT induce cambios en el comportamiento de los progenitores neurales cerebelosos aislados a P0, pero no a P5

El patrón de expresión del transportador VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo junto con su presencia en las NSCs, nos llevó a preguntarnos si podría modular el comportamiento de los progenitores cerebelosos y, por tanto, influir sobre el desarrollo posnatal del cerebelo. Además, como se ha mencionado anteriormente, el modelo de cultivo y la monitorización de los progenitores de cerebelo en ausencia de las señales extrínsecas procedentes del nicho neurogénico es un escenario perfecto para su estudio. En consecuencia, se analizó el efecto de la modulación de la actividad del transportador VNUT en estas preparaciones celulares. Para ello, se realizaron cultivos de progenitores cerebelosos a P0 y P5 en presencia y ausencia de clodronato (100 nM), un inhibidor selectivo del transportador VNUT (Moriyama et al., 2017, Kato et al., 2017) y se monitorizaron mediante videomicroscopía de time-lapse. El seguimiento de las células individuales en los cultivos aislados a P0, mostró que en los cultivos tratados con clodronato se había producido un incremento en el número de clones neurogénicos (Figura 47, 48A). El aumento observado en el número de clones en presencia de clodronato podría ser debido a un incremento en la viabilidad celular o en la supervivencia celular. Sin embargo, no se detectaron cambios en ambos parámetros en comparación con los resultados obtenidos en los cultivos monitorizados en ausencia del inhibidor (Figura 48C,D,E).

Análogamente, parámetros como la proliferación celular (Figura 48), la duración de ciclo y migración celular no se vieron alterados en presencia de clodronato (Figura 49A,B,C).



Figura 47. Biblioteca de árboles de linaje de 1 a 5 rondas de división originados en las preparaciones de progenitores neurales cerebelosos aislados a P0 mantenidos en condiciones controles y en presencia de clodronato 100 nM. En cada caso, la identidad de la progenie fue determinada por ensayos de inmunocitofluorescencia al finalizar el experimento.

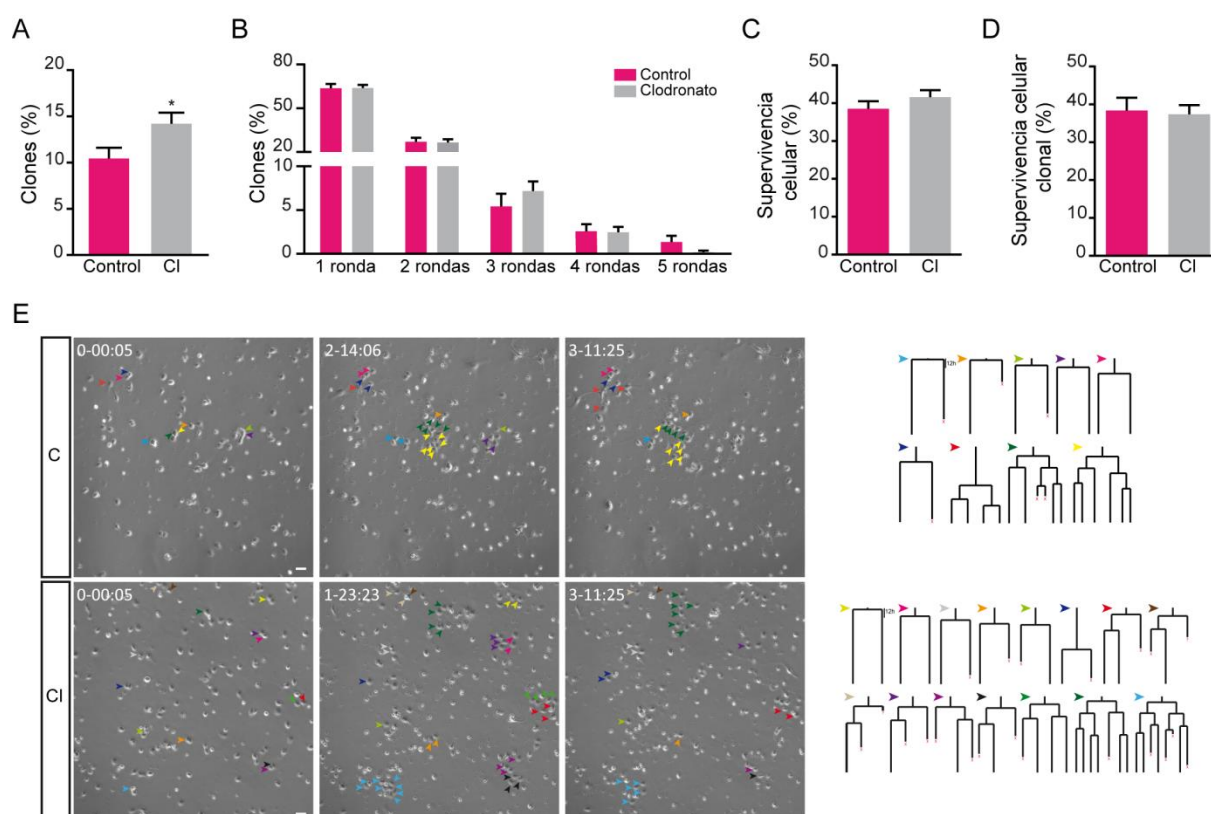


Figura 48. Efecto de la inhibición del transportador VNUT sobre el comportamiento de los progenitores neurales cerebelosos. Porcentaje de clones (A), número de rondas de división de los clones (B), supervivencia celular al finalizar el experimento (C) y supervivencia de los árboles analizados (D) de los clones monitorizados en condiciones control y en presencia de clodronato (CI). Los valores que se muestran en los paneles A, C y D representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes (* $p < 0,05$, test t de Student no pareada). Los valores mostrados en el panel B representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey). (E) Imágenes representativas de los experimentos de time-lapse en presencia (CI) y ausencia (C) de clodronato 100 nM a diferentes tiempos (día-hora:minuto). Las puntas de flecha señalan las células de los diferentes clones. A la derecha de las imágenes de time-lapse se representan los árboles analizados señalados con las puntas de flecha. Escala: 30 μ m.

Por el contrario, al analizar los linajes celulares obtenidos a tiempo final mediante inmunocitofluorescencia, se observó que el porcentaje de células GFAP/SOX2 positivas en los cultivos tratados con clodronato era significativamente inferior al porcentaje cuantificado en la condición control (Figura 49D). Esta disminución del porcentaje de células GFAP/SOX2 positivas junto con el aumento de clones neurogénicos, sugería que la inhibición del transportador VNUT estaría activando a las NSCs, forzando su salida del ciclo celular y dirigiéndose hacia la diferenciación neuronal. Notablemente, esta disminución en el porcentaje de células GFAP/SOX2 positivas se vio acompañada de una ausencia total de divisiones asimétricas en presencia de clodronato. La ausencia de este tipo de divisiones sugiere que la inhibición de VNUT reducía la capacidad de las NSCs para experimentar el proceso de autorrenovación, y generar copias de sí mismas. Por ende, el clodronato estaría potenciando la activación y la diferenciación de las células hacia el linaje neuronal, reduciendo su capacidad de autorrenovación y produciendo una disminución de las reservas de NSCs presentes en cultivo.

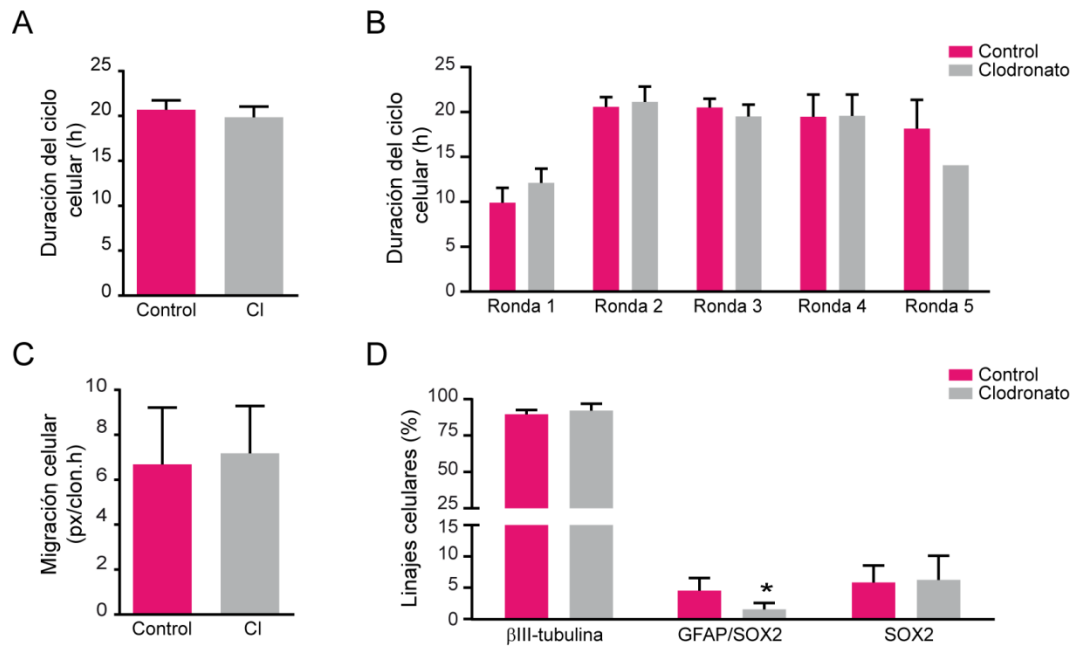


Figura 49. Efecto de la inhibición del transportador VNUT sobre el comportamiento de las NSCs cerebelosas. (A) Promedio de la duración del ciclo celular. (B) Duración del ciclo celular en función de las rondas de división. (C) Migración celular de los árboles analizados. (D) Proporciones de las poblaciones celulares en presencia y ausencia de clodronato 100 nM. Los valores representan la median $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes, test de t de Student para (A y C) y * $p < 0,05$ ANOVA con prueba de comparación múltiple de Tukey para (B y D).

El efecto de la inhibición de VNUT sobre la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal se corroboró mediante experimentos de PCR cuantitativa en los que se observó el incremento de los niveles de de ARNm de genes asociados a la diferenciación neuronal tanto en el linaje glutamatérgico como GABAérgico (Figura 50). En concreto, el clodronato promovió un importante incremento en el ARN mensajero de *Atoh1* (Figura 50), gen principal involucrado en la diferenciación hacia precursores de neuronas granulares (Ben-Arie et al., 1997, Machold and Fishell, 2005, Wang et al., 2005). Conforme al aumento de expresión de *Atoh1*, también se detectó un pequeño incremento en la expresión de *NeuroD1*, factor de transcripción activado por *Atoh1* (Miyata et al., 1999), así como del gen *Cntn2*. Este último es un marcador de neuronas granulares posmitóticas. Con respecto al linaje de interneuronas GABAérgicas, la inhibición de VNUT aumentó los niveles del ARN mensajero de los genes *Ptf1a* así como de su factor de transcripción diana *Neurog1*. Ambos genes están implicados en la especificación hacia el fenotipo GABAérgico (Yamada et al., 2014). Dichos resultados confirmaban que el clodronato estaría induciendo la salida de ciclo de las NSCs hacia el linaje neuronal, disminuyendo así el porcentaje de células GFAP/SOX2 positivas y aumentando el porcentaje de clones a tiempo final. Así pues, VNUT podría estar modulando el balance entre quiescencia/activación así como la autorrenovación de las NSCs del cerebelo.

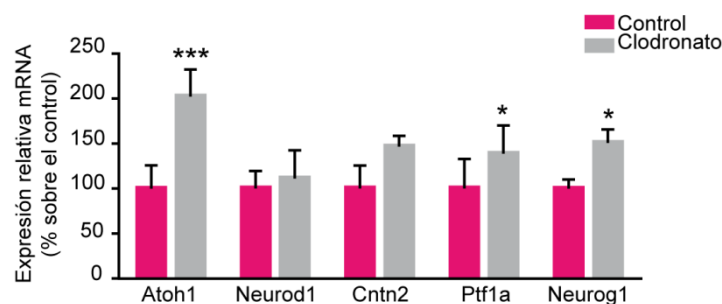


Figura 50. La inhibición de VNUT potencia la expresión de genes implicados diferenciación neuronal. Análisis de los niveles de ARN mensajero por PCR cuantitativa de genes asociados al linaje glutamatérgico (*Atoh1*, *Neurod1* y *Cntn2*) y GABAérgico (*Ptf1a* y *Neurog1*) tras 20 horas en presencia y ausencia de clodronato. Los valores representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey).

Como se ha puntualizado anteriormente, el transportador VNUT mostraba un pico de expresión a día P0, el cual decaía con el tiempo. Además, en el estadio P5 los progenitores revelaron una menor capacidad neurogénica acompañada de una disminución del porcentaje de células GFAP/SOX2 positivas aisladas, así como ausencia de divisiones asimétricas. Estos resultados podrían sugerir que la regulación del transportador VNUT tendría un menor impacto sobre los progenitores neurales a estadios posteriores del desarrollo posnatal del cerebelo. Por ello, se estudió la ventana temporal del efecto de la modulación del transportador VNUT sobre la neurogénesis.

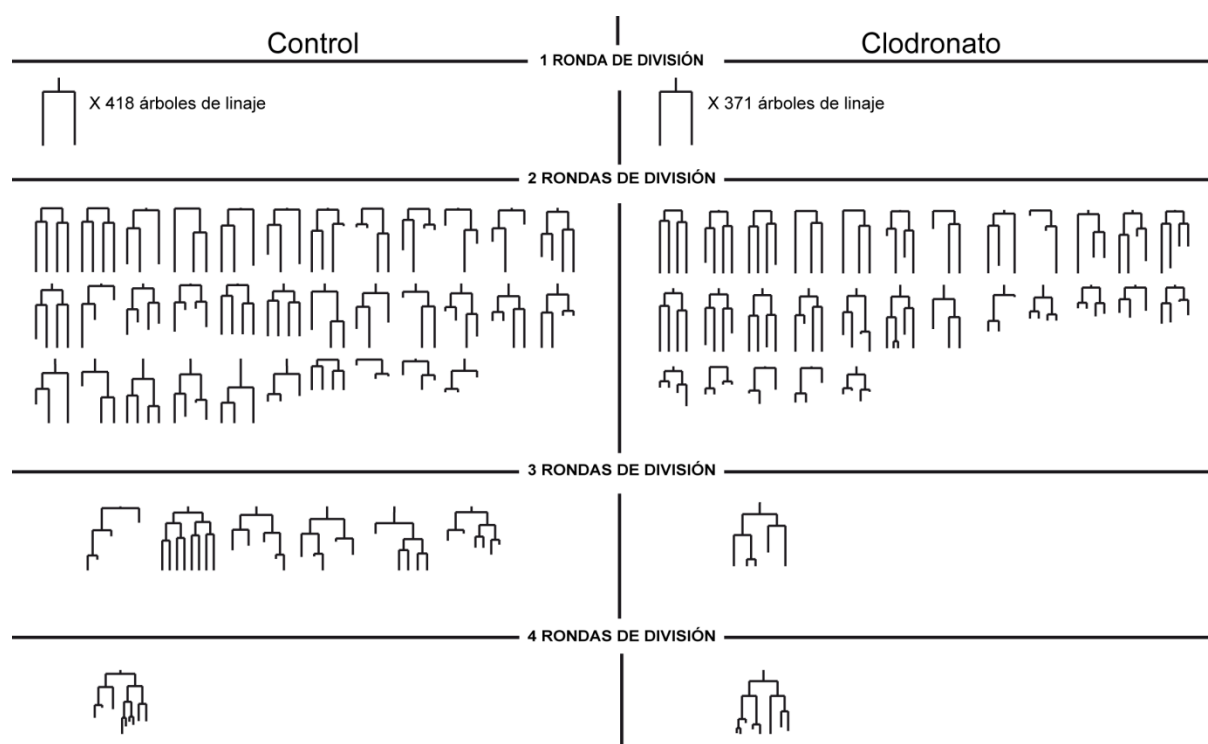


Figura 51. Biblioteca de árboles de linaje de 1 a 4 rondas de división originados en las preparaciones de progenitores neurales cerebelosos aislados a P5 en condición control (panel izquierdo) o en presencia de clodronato 100 nM (panel derecho). En cada caso, la identidad de la progenie fue determinada por ensayos de inmunocitofluorescencia al finalizar el experimento.

Así, el seguimiento de las células individuales en los cultivos de progenitores de cerebelo a día P5 no evidenció ningún efecto del condronato sobre la proliferación celular (Figura 51). De tal manera que el porcentaje de clones generados era similar (Figura 52A), así como, la frecuencia de clones de distintas rondas de división (Figura 52B). Además, los ensayos de inmunocitofluorescencia a tiempo final, tampoco mostraron variaciones en las poblaciones obtenidas en presencia y ausencia de clodronato (Figura 52C).

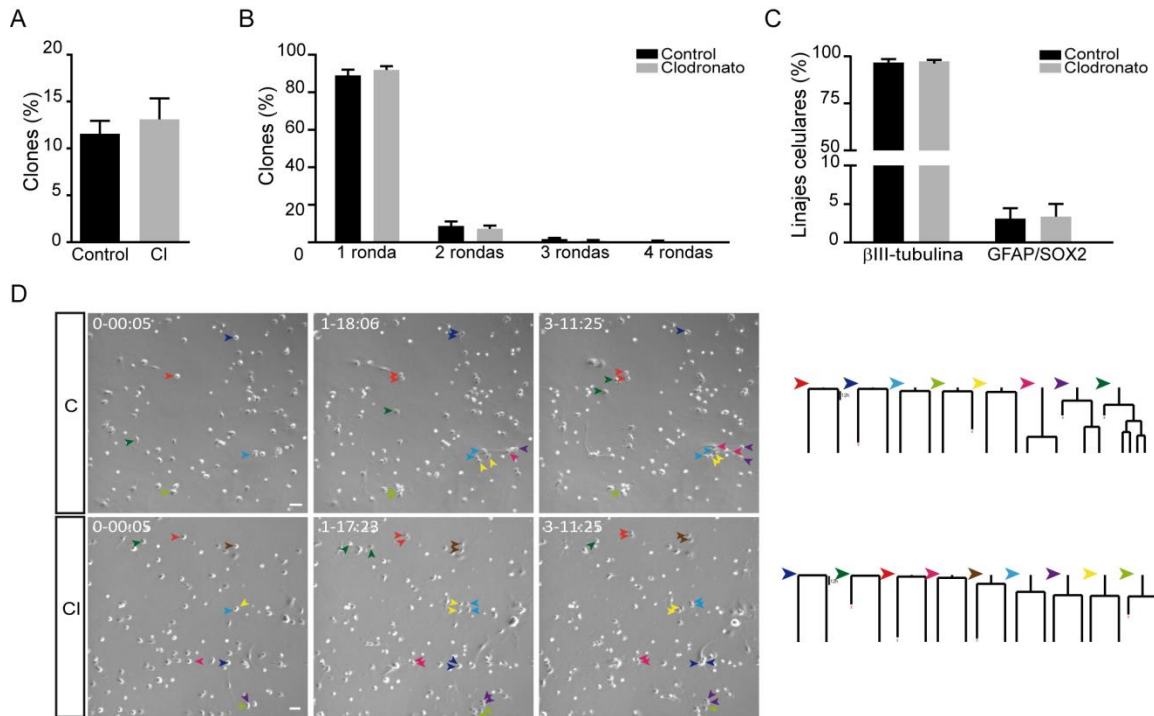


Figura 52. Efecto de la inhibición del transportador VNUT sobre el comportamiento de los progenitores neurales cerebelosos aislados a P5. Porcentaje de clones generados (A), clones que experimentan de 1 a 4 rondas de división (B) y poblaciones celulares (C) de los clones analizados en ausencia (control) y presencia de clodronato 100 nM (CI). (D) Imágenes representativas de los experimentos de time-lapse en presencia (CI) y ausencia (C) de clodronato a diferentes tiempos (día-hora:minuto). Las puntas de flecha señalan las células de los diferentes clones. A la derecha de las imágenes de time-lapse se representan los árboles analizados en presencia y ausencia de clodronato. Los valores representan la median $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes, con test de t de Student no pareada para (A) y ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey para (By C). Escala: 30 μ m.

Además, tampoco se observaron cambios en la supervivencia y migración celular y en la duración del ciclo celular en los cultivos tratados con clodronato (Figura 53). De tal modo que la regulación de VNUT parecía tener un impacto menor en los cultivos de día P5. Estos resultados junto con el descenso de la expresión de VNUT y de las células madre aisladas en el cultivo, a medida que se avanza en el desarrollo, sugería la existencia de una ventana de actuación limitada en el tiempo. De esta forma la modulación de VNUT influiría en el proceso de neurogénesis principalmente en las etapas iniciales del desarrollo posnatal cerebeloso, perdiendo dicha capacidad a medida que se avanza en el desarrollo.

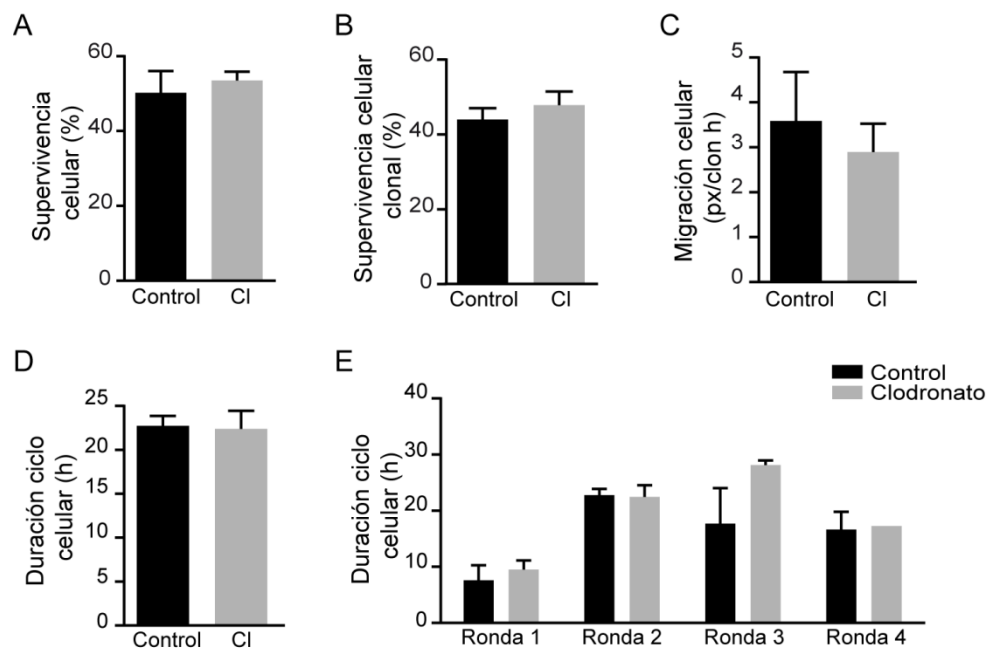


Figura 53. Efecto de la inhibición del transportador VNUT sobre el comportamiento de los progenitores neurales cerebelosos aislados a P5. **(A)** Supervivencia celular al finalizar el experimento. **(B)** Supervivencia de los árboles analizados. **(C)** Migración celular de los árboles analizados. **(D)** Promedio de la duración del ciclo celular. **(E)** Duración del ciclo celular en función de las rondas de división. Los valores representan la median $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes, test de t de Student no pareada para (A, B, C y D) y ANOVA con prueba de comparación múltiple de Tukey para (E).

7.2 La señalización purinérgica como modulador de la neurogénesis de la SEZ adulta

7.2.1 Evaluación de la expresión de los receptores purinérgicos de tipo metabotrópico en la SEZ adulta

En la primera parte de esta tesis, se había comprobado la influencia del transportador vesicular de nucleótidos, encargado de iniciar la señalización purinérgica, sobre el comportamiento de los progenitores neurales aislados del cerebelo. La inhibición del transportador reducía la población de NSCs *in vitro*, potenciando su progresión hacia la neurogénesis. Continuando con estos resultados nos planteamos evaluar el posible papel de la señalización purinérgica sobre otros nichos neurogénicos. Por ello, la segunda parte de la tesis se centró en estudiar la acción moduladora de los nucleótidos extracelulares sobre la neurogénesis en la zona subependimaria (SEZ) adulta de ratón. La acción de la señalización purinérgica sobre la SEZ había sido analizada a nivel de poblaciones celulares en diversos estudios *in vivo* e *in vitro*, donde se había reportado la modulación ejercida por los receptores purinérgicos, principalmente de tipo metabotrópico, sobre la neurogénesis de la SEZ adulta (Grimm et al., 2009, Mishra et al., 2006, Boccazzi et al., 2014, Suyama et al., 2012). Aquí nos planteamos estudiar cual era la distribución específica, así como el potencial papel modulador, de la señalización purinérgica a lo largo de las diferentes etapas del linaje neural derivado de las NSCs. Así, como primera aproximación, se evaluó mediante estudios de PCR cuantitativa los niveles de ARN mensajero de los receptores purinérgicos en la SEZ de ratones adultos de dos meses de edad. Para estos estudios se dejó a un lado el receptor P2Y₁₂ ya que su expresión y función está más restringida. Localizándose principalmente en microglía (Jacobson et al., 2020, Tozaki-Saitoh et al., 2008), así como en células endoteliales (Simon et al., 2001), plaquetas (Abbracchio et al., 2006) y oligodendrocitos (Amadio et al., 2010).

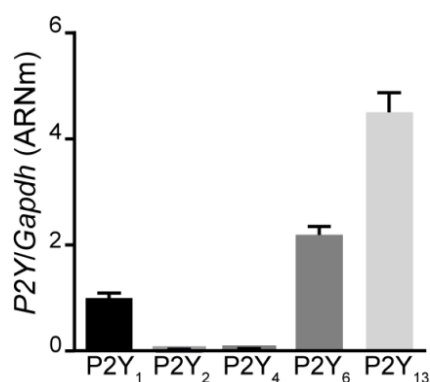


Figura 54. Detección de los niveles de ARNm de los receptores de nucleótidos de tipo metabotrópico en la zona subependimaria de cerebro de ratón adulto. Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARN mensajero en lisados de tejido de la SEZ de cerebro de ratón de 2 meses de edad. Los valores se normalizaron con respecto a la cantidad de transcrito de *Gapdh*. Los valores representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

Entre todos los receptores analizados, los que mostraron una mayor expresión fueron los receptores P2Y₁, P2Y₆ y P2Y₁₃ (Figura 54). Particularmente interesante para nuestra investigación fue la importante expresión tanto del receptor P2Y₁ como P2Y₁₃ en este nicho neurogénico. El receptor P2Y₁ había sido descrito como modulador sobre el mantenimiento de la condición de célula madre por parte de la glia radial en la corteza embrionaria

(Weissman et al., 2004). Igualmente se había observado su efecto sobre la proliferación de los progenitores neurales (Mishra et al., 2006, Boccazzi et al., 2014, Suyama et al., 2012). Con respecto al receptor P2Y₁₃, estudios realizados en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, otro de los principales nichos neurogénicos adultos, habían revelado que la señalización mediada por el receptor atenuaba la neurogénesis hipocampal (Stefani et al., 2018). Asimismo, nuestro grupo de investigación había estudiado en profundidad el papel del receptor P2Y₁₃ en el sistema nervioso, observando su participación en la diferenciación de las neuronas hipocampales (del Puerto et al., 2012), y ejerciendo un papel neuroprotector en neuronas granulares y astrocitos de cerebelo de rata frente a estímulos pro-apoptóticos (Ortega et al., 2011b, Perez-Sen et al., 2015). En consecuencia, la presente tesis se centró en los receptores P2Y₁ y P2Y₁₃ para los estudios posteriores.

Atendiendo al receptor P2Y₁, los ensayos de PCR cuantitativa mostraron que el receptor se expresaba tanto en la región dorsal como ventral. Si bien, la expresión era significativamente mayor en la región ventral (Figura 55A). Además, mediante estudios de *Western blot* se analizaron los niveles de proteína del receptor P2Y₁ en ambas regiones. Dichos estudios corroboraron la presencia del receptor tanto en la zona ventral como dorsal. Asimismo, coincidiendo con lo observado en los estudios de PCR cuantitativa, se detectaron mayores niveles de proteína en la zona ventral (Figura 55B-C).

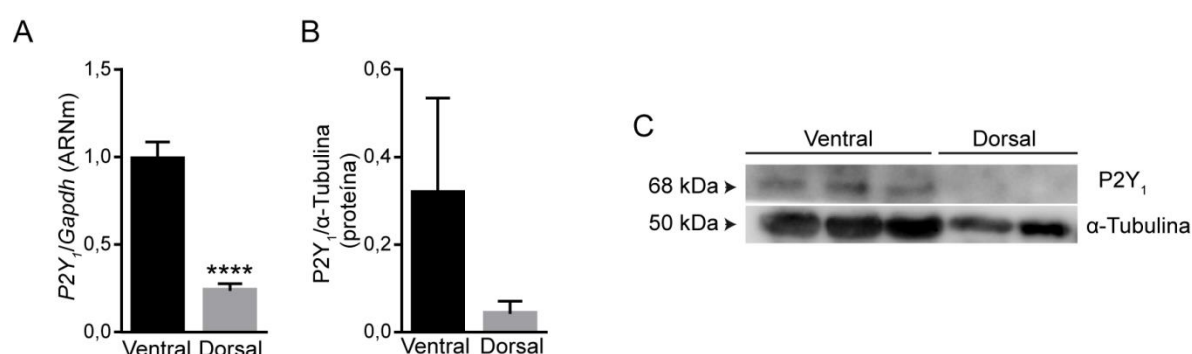


Figura 55. Presencia del receptor P2Y₁ en la SEZ del cerebro de ratón adulto. (A) Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARN mensajero del receptor P2Y₁ en lisados de tejido de la parte ventral y dorsal de la SEZ de cerebro de ratón de 2 meses de edad. Los valores se normalizaron con respecto a la cantidad de transcrito de *Gapdh*. (B) Análisis mediante *Western Blot* de los niveles de proteína del receptor P2Y₁ de lisados de tejido en relación a la α-tubulina. (C) Imagen representativa de la detección de la proteína P2Y₁ en los experimentos de *Western Blot* realizados con los lisados de tejido. La proteína α-tubulina se utilizó como control de carga. Los valores representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes (****p < 0,0001, test de t de Student no pareado).

Una vez detectada la expresión del receptor P2Y₁ en ambas regiones de la SEZ, se evaluó su presencia en las diferentes poblaciones celulares presentes en este nicho neurogénico. Para ello, se analizó mediante ensayos de inmunohistofluorescencia la presencia del receptor P2Y₁ en secciones sagitales de tejido de cerebro de ratón adulto. Como se aprecia en la Figura 56 el marcaje obtenido con el anticuerpo frente al receptor P2Y₁ se distribuía en ambas regiones de la SEZ. Asimismo, se corroboró su co-localización con la proteína βIII-

Tubulina, marcador de poblaciones neuronales, y con la proteína GFAP, marcador de poblaciones astrogliales.

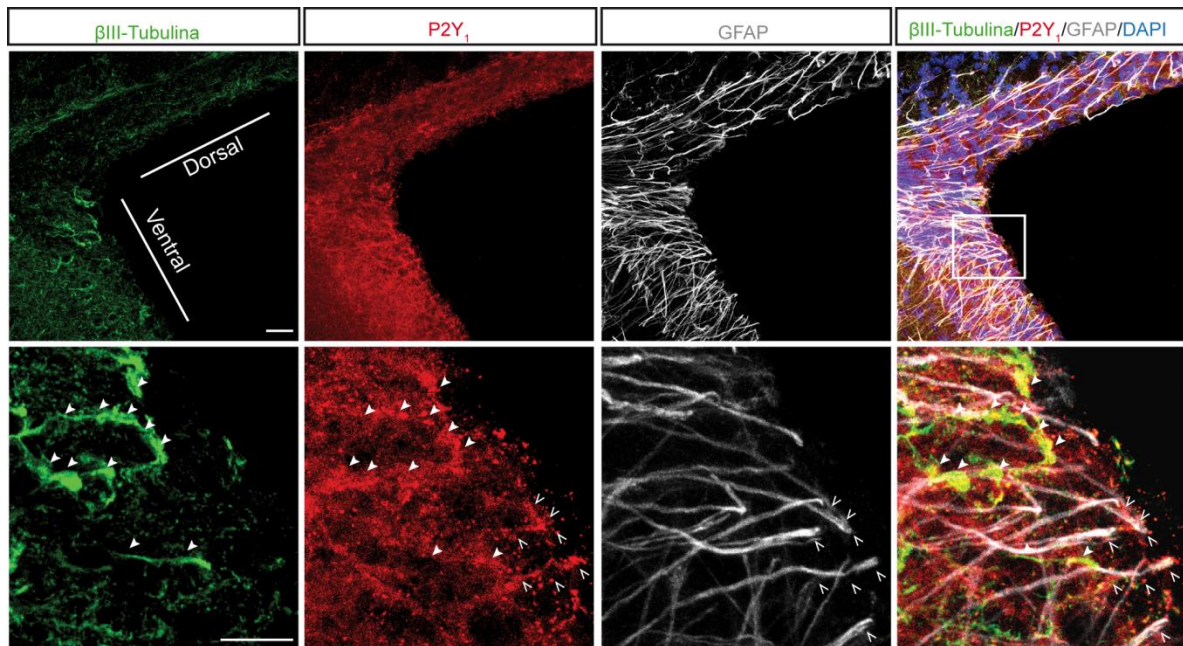


Figura 56. El receptor $P2Y_1$ está presente en poblaciones neuronales y astrogliales de la SEZ adulta. En el panel superior se muestran imágenes de inmunohistofluorescencia de una sección de la zona subependimaria de ratón adulto, donde se muestra β III-Tubulina (verde), $P2Y_1$ (rojo) y GFAP (gris). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). El panel inferior es una magnificación del recuadro blanco, donde se indica con las puntas de flecha rellenas la co-localización del receptor $P2Y_1$ con β III-Tubulina, mientras que las puntas de flecha sin rellenas marcan la co-localización de $P2Y_1$ con GFAP. Escala: 30 μ m y 15 μ m en las imágenes de mayor magnificación.

Tras verificar la distribución *in vivo* del receptor $P2Y_1$, se analizó su expresión en los cultivos de progenitores neurales aislados de la SEZ adulta. Los progenitores de la SEZ adulta se sembraron a baja densidad y en ausencia de factores tróficos como se detalla en el apartado de Métodos. Después, mediante estudios de inmunocitofluorescencia a día 1 y 2 de cultivo, se analizó la presencia del receptor $P2Y_1$ en las distintas poblaciones del linaje neural derivadas de las NSCs. Las preparaciones de progenitores neurales permitieron analizar la expresión del receptor a lo largo de la progresión del linaje, a través de su co-localización con diversos marcadores celulares. De manera que el receptor $P2Y_1$ se detectó en todas las células pertenecientes al linaje neuronal y astrogliar, al co-localizar con la proteína GFAP, marcador de los astrocitos parenquimales y las células madre neurales (NSCs), con la proteína *Ascl1*, el marcador de progenitores intermedios o TAPs y con la proteína β III-Tubulina, marcador de neuroblastos (Figura 57).

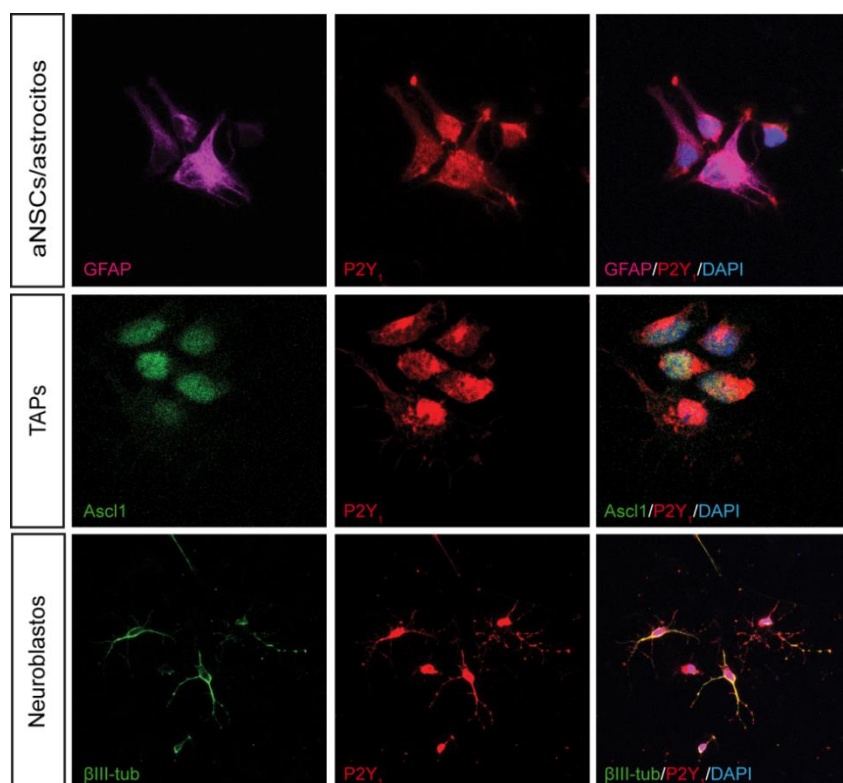


Figura 57. El receptor P2Y₁ se expresa en los progenitores neurales de la SEZ adulta y en las distintas células de la progresión en el linaje neural. Imágenes de inmunocitofluorescencia que muestran la presencia del receptor P2Y₁ en los cultivos de progenitores neurales de la SEZ adulta. El marcaje obtenido para el receptor P2Y₁ se localiza en astrocitos y NSCs (GFAP⁺), células de amplificación o TAPs (Ascl1⁺) y en neuroblastos (βIII-Tubulina⁺). Escala: 25 μm.

Continuando con la caracterización de los receptores de ADP en la SEZ, se analizó la expresión del receptor metabotrópico P2Y₁₃. En primer lugar, se cuantificaron los niveles de ARN mensajero en la región dorsal y ventral de la SEZ de ratón adulto, siguiendo el mismo procedimiento utilizado para el receptor P2Y₁. Los niveles de ARN mensajero codificante para el receptor P2Y₁₃ eran similares en ambas regiones de la SEZ (Figura 58A). No obstante, los niveles de proteína del receptor P2Y₁₃, detectados en los ensayos *Western Blot*, eran significativamente mayores en la región ventral que en la dorsal (Figura 58B-C).

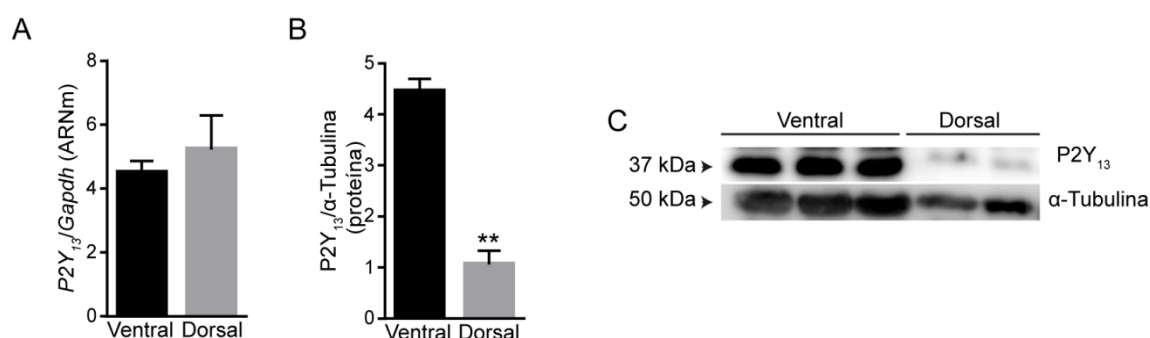


Figura 58. Presencia del receptor P2Y₁₃ se expresa en SEZ de cerebro de ratón adulto. **(A)** Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARN mensajero del receptor P2Y₁₃ en lisados de tejido. Los valores se normalizaron con respecto a la cantidad de transcrito de *Gapdh*. **(B)** Análisis mediante *Western Blot* de los niveles de proteína del receptor P2Y₁₃ en extractos de tejido en relación a la α-tubulina. **(C)** Imagen representativa de los resultados obtenidos de *Western Blot* de los lisados de tejido detectándose la expresión de P2Y₁₃. La proteína α-tubulina se utilizó como control de carga. Los valores representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes (**p < 0,01, test de t de Student no pareado)

A continuación, se analizó la distribución del receptor $P2Y_{13}$ en las distintas poblaciones celulares de la SEZ. Mediante estudios de inmunohistofluorescencia de secciones sagitales de cerebro de ratón adulto, se comprobó que el receptor $P2Y_{13}$ estaba presente tanto en la región ventral como en la dorsal (Figura 59A). Además, la triple tinción con GFAP y β III-Tubulina reveló que el receptor $P2Y_{13}$ se distribuía mayoritariamente en las células de naturaleza astrogliar, debido a su co-localización mayoritaria con la proteína GFAP (Figura 59C). Mientras que la co-localización con el marcador de poblaciones neuronales β III-tubulina fue mucho más escasa (Figura 59B).

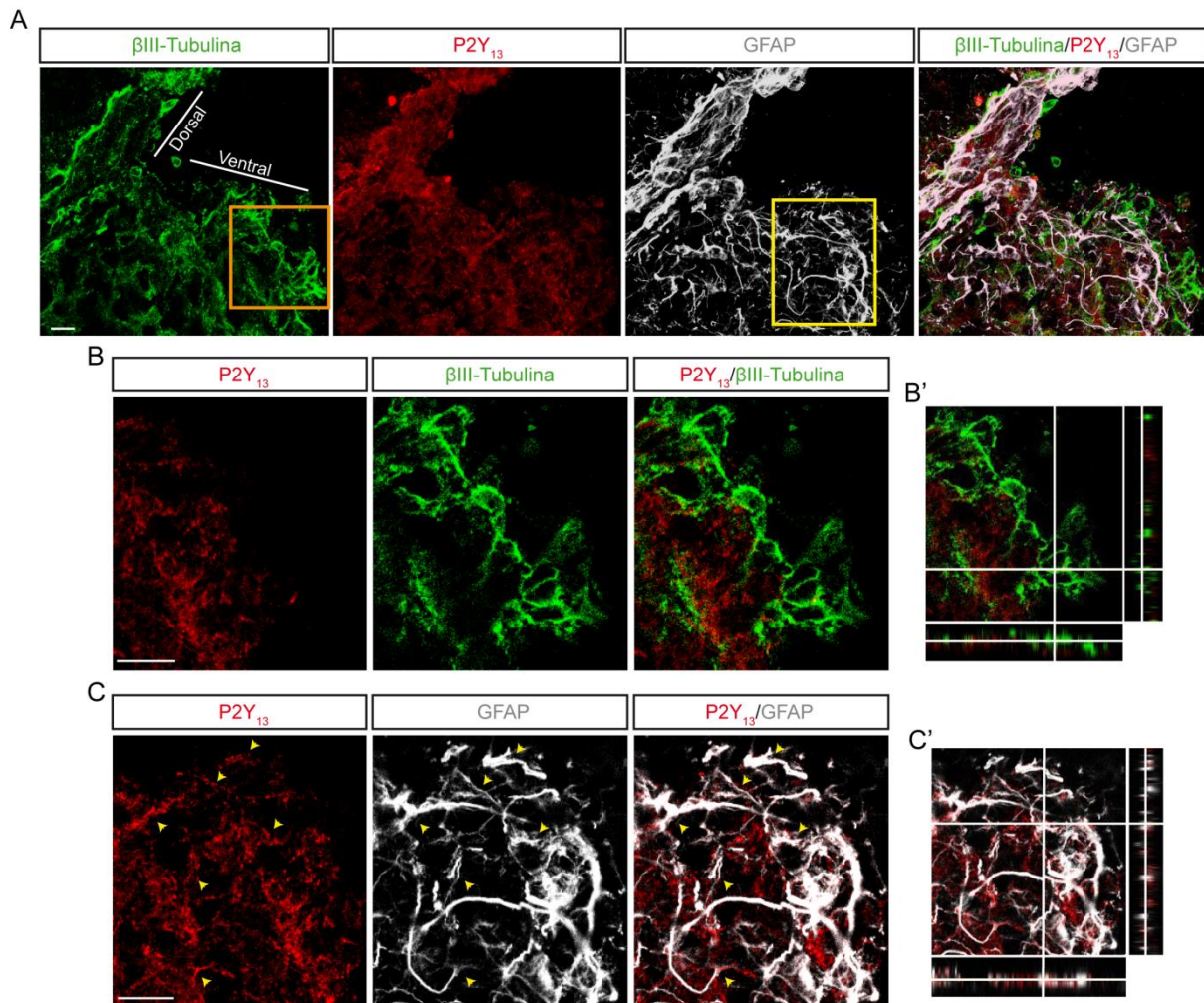


Figura 59. El receptor $P2Y_{13}$ se expresa en poblaciones astrogliales pero no neuronales de la zona subependimaria adulta. (A) Imágenes de inmunohistofluorescencia de una sección de la zona subependimaria de ratón adulto donde se muestra el marcaje para β III-Tubulina (verde), $P2Y_{13}$ (rojo) y GFAP (gris). (B) Magnificación del recuadro naranja donde se muestra la ausencia de co-localización del marcaje obtenido para el receptor $P2Y_{13}$ y β III-Tubulina. (B') Análisis de proyección ortogonal. (C) Magnificación del recuadro amarillo. Las puntas de flecha amarillas señalan la co-localización obtenida para el $P2Y_{13}$ y GFAP. (C') Análisis de proyección ortogonal que resalta la co-localización de ambos marcadores. Escala: 30 μ m.

Continuando con el estudio de la presencia del receptor $P2Y_{13}$ se analizó su distribución en la población de células de amplificación o TAPS. Los ensayos de inmunohistofluorescencia revelaron que el receptor $P2Y_{13}$ tampoco parecía estar presente en las células de amplificación, al no co-localizar con el marcaje $Ascl1^+$ (Figura 60).

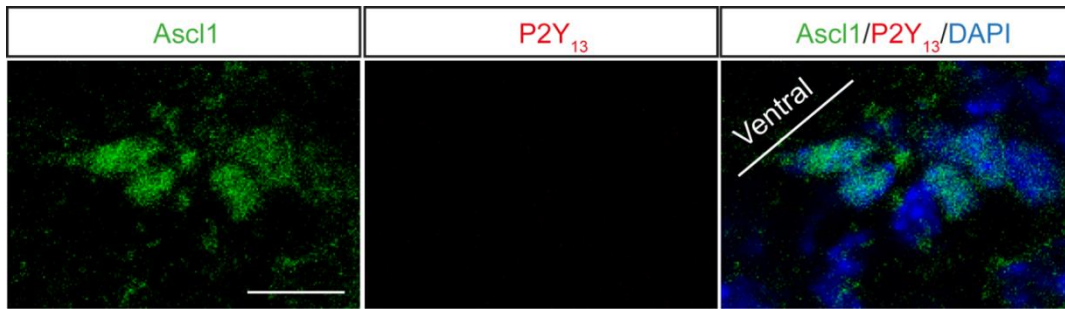


Figura 60. El receptor P2Y₁₃ no se expresa en la población de células de amplificación o TAPS de la SEZ adulta. Imágenes de inmunohistofluorescencia de una sección de la región ventral de la SEZ de ratón adulto donde se marca P2Y₁₃ (rojo) y Ascl1 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μ m.

Atendiendo a las células de naturaleza astrogial, en la SEZ podemos identificar dos poblaciones distintas. Una población de astrocitos parenquimales caracterizados por ser GFAP⁺ y SOX2⁻, y adicionalmente, una población de NSCs que se caracteriza por el doble marcaje de GFAP/SOX2⁺. Con el fin de determinar si el receptor P2Y₁₃ estaba presente en ambas poblaciones o por el contrario mostraba preferencia por alguna de ellas, se analizó su distribución junto con los marcadores GFAP y SOX2. La triple tinción con P2Y₁₃, GFAP, SOX2 reveló que el receptor P2Y₁₃ se expresaba en ambas poblaciones astrogiales de la SEZ (Figura 61).

A

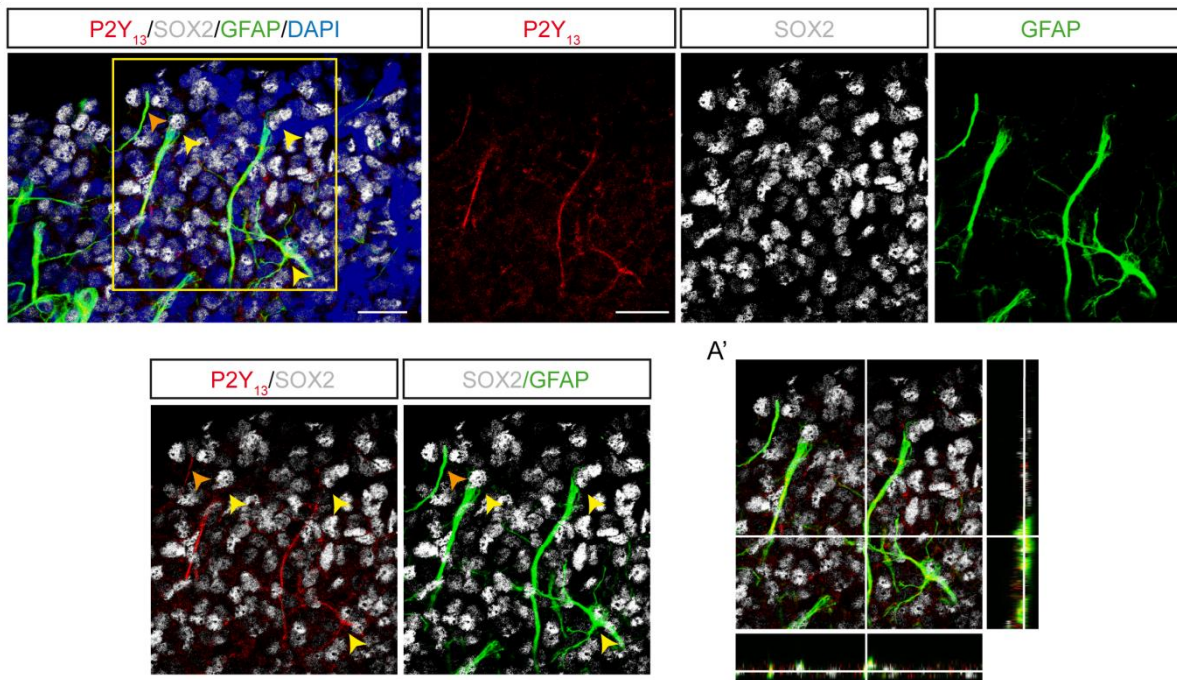


Figura 61. El receptor P2Y₁₃ se expresa en las NSCs y en los astrocitos parenquimales de la zona subependimaria adulta. (A) Imágenes de inmunohistofluorescencia de una sección de la zona subependimaria de ratón adulto donde se muestra GFAP (verde), P2Y₁₃ (rojo) y SOX2 (gris). Las imágenes de la derecha son una magnificación del recuadro amarillo. Las puntas de flecha amarillas marcan la co-localización de P2Y₁₃, SOX2 y GFAP, y la naranja la co-localización de P2Y₁₃ y GFAP. (B') Análisis de proyección ortogonal que resalta la co-localización de P2Y₁₃, SOX2 y GFAP. Escala: 30 μ m.

Tras confirmar la expresión y distribución *in vivo* del receptor P2Y₁₃, se continuó con su caracterización analizando su presencia en las preparaciones de progenitores neurales aislados de la SEZ. Tras mantener las preparaciones durante 1 y 2 días de cultivo *in vitro* se llevaron a cabo ensayos de inmunocitofluorescencia. Coincidiendo con lo observado *in vivo*, el receptor P2Y₁₃ solo se detectó en células de naturaleza astrogial, GFAP⁺. Sin embargo, la expresión del receptor se perdía a lo largo de la progresión en el linaje ya que no se detectó ni en las células denominadas TAPs o células de amplificación Ascl1⁺, ni en los neuroblastos βIII-Tubulina⁺ (Figura 62).

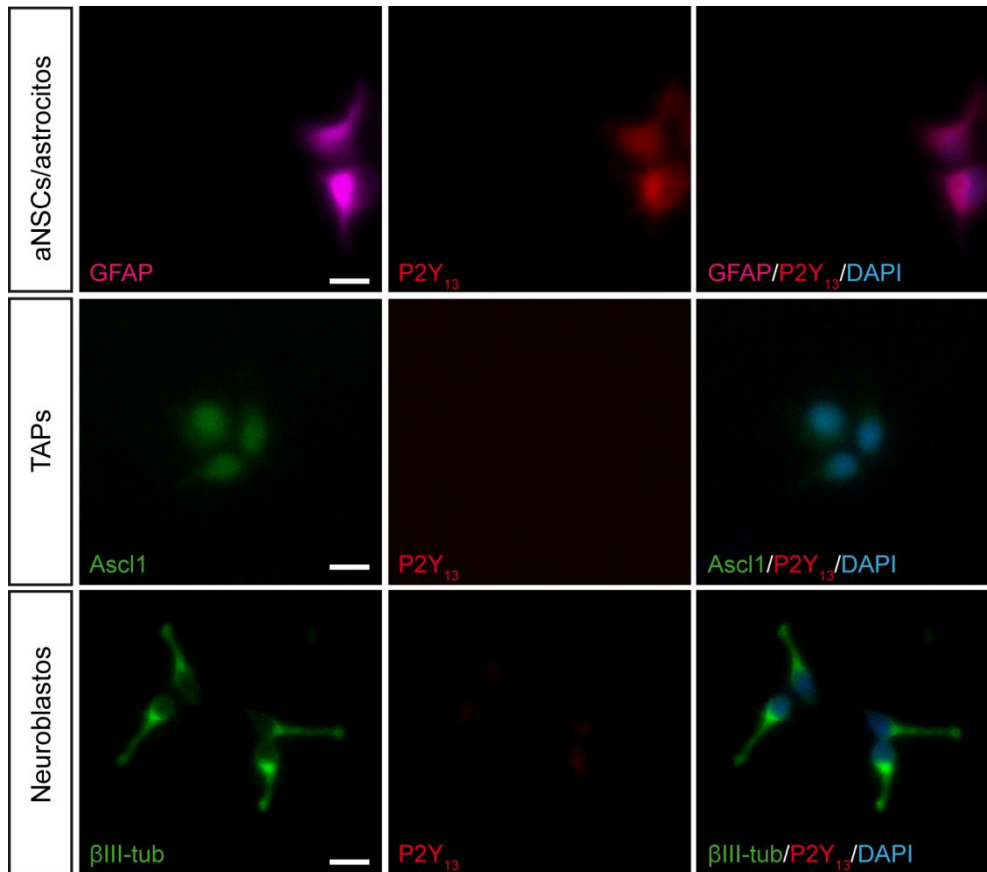


Figura 62. El receptor P2Y₁₃ sólo se expresa en las células de naturaleza astrogial. Imágenes de inmunocitofluorescencia que muestran la expresión del receptor P2Y₁₃ en las preparaciones de progenitores neurales de la SEZ. El marcate para el receptor P2Y₁₃ sólo se localiza en astrocitos y NSCs (GFAP⁺). Escala: 30 μm.

Por tanto, los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* confirmaron que tanto el receptor P2Y₁ como el P2Y₁₃ se expresaban en la SEZ adulta. Si bien, siguiendo un patrón de distribución distinto. Mientras el receptor P2Y₁ se expresaba en todas las células de la progresión en el linaje, el receptor P2Y₁₃ sólo se expresaba en los astrocitos parenquimales y en las NSCs.

7.2.2 El receptor P2Y₁₃ es funcional en las NSCs aisladas de la SEZ

Dado que tanto el receptor P2Y₁ como el receptor P2Y₁₃ se expresaban en la SEZ, se procedió a analizar si, más allá de dicha expresión, estos receptores se encontraban funcionales en los progenitores neurales derivados de la SEZ adulta. Considerando que la activación de ambos receptores induce la movilización de calcio intracelular (Abbracchio et al., 2006, Carrasquero et al., 2005, Perez-Sen et al., 2015), se realizaron estudios de microfluorimetría de calcio en las preparaciones de progenitores neurales a día 1 y 2 de cultivo *in vitro* como se recoge en el apartado de Métodos. Como agonista de ambos receptores se utilizó el compuesto farmacológico 2MeSADP, análogo del ADP. Tras la administración de 2MeSADP 10 μ M, se registraron señales de calcio intracelular en las preparaciones de progenitores neurales. De manera que el compuesto 2MeSADP inducía un aumento de la concentración de calcio libre intracelular (Figura 63).

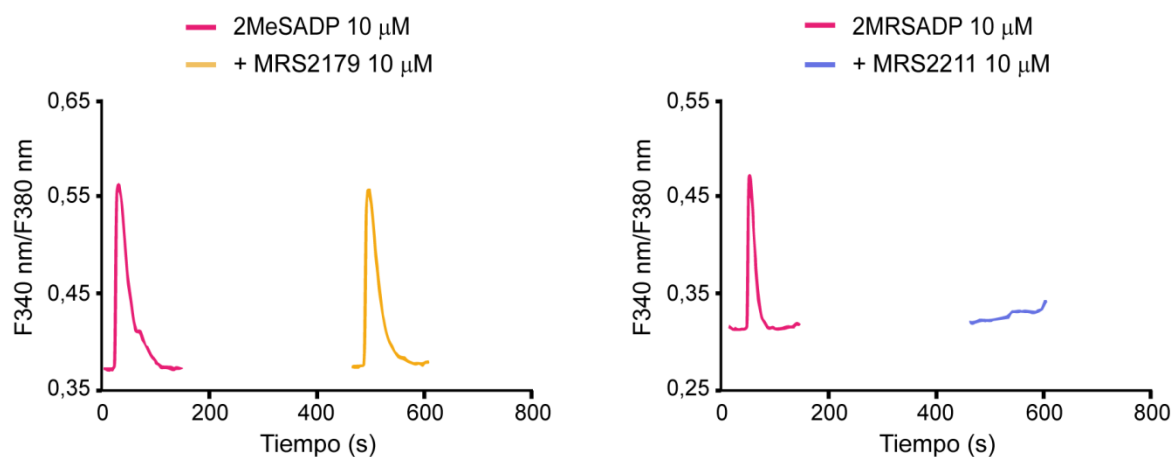


Figura 63. La activación del receptor P2Y₁₃ induce la movilización de calcio intracelular en las preparaciones de progenitores neurales aislados de la SEZ de ratón adulto. Perfil de las respuestas de calcio representativas (fucsia) inducidas tras la estimulación del receptor P2Y₁ (izquierda) o P2Y₁₃ (derecha) con 2MeSADP 10 μ M en células aisladas de la SEZ a día 1 de cultivo *in vitro*. En el panel izquierdo se muestra la segunda respuesta de calcio (naranja) tras la pre-incubación con el compuesto MRS2179, antagonista del receptor P2Y₁. En el panel derecho se muestra la inhibición de la segunda respuesta de calcio (azul) tras la pre-incubación con el compuesto MRS2211, antagonista del receptor P2Y₁₃.

Puesto que el 2MeSADP es un agonista que no discrimina entre los diferentes subtipos de los receptores de ADP, y con el fin de dilucidar cuál de los receptores era el responsable de las respuestas de calcio registradas, se realizaron ensayos de microfluorimetría de calcio en presencia de antagonistas específicos de los receptores P2Y₁ y P2Y₁₃. De modo que, se analizó la actividad y funcionalidad del receptor P2Y₁ en presencia del compuesto MRS2179, mientras que para el análisis del receptor P2Y₁₃ se usó el compuesto MRS2211. Para ello, tras la primera estimulación con 2MeSADP se pre-incubaron los cubreobjetos durante 5 minutos con MRS2179 10 μ M o MRS221 10 μ M. Seguidamente se estimularon de nuevo con el agonista. Como puede verse en la Figura 63, la pre-incubación de los cultivos durante 5 minutos con MRS2179 10 μ M, antagonista específico del receptor P2Y₁, seguida de la estimulación con 2MeSADP no modificó la movilización de calcio inducida por el agonista.

Sin embargo, la pre-incubación con el antagonista del receptor $P2Y_{13}$, el compuesto MRS2211, inhibió la movilización de calcio inducida por 2MeSADP. Este hecho, indicaba que el receptor $P2Y_{13}$ era el responsable de la movilización de calcio y que era por tanto funcional en las células aisladas de la SEZ de ratón.

Seguidamente, se analizó la identidad de las células que respondían a las estimulaciones con el agonista 2MeSADP. Para ello, se realizaron inmucitofluorescencias de los cubreobjetos empleados en los experimentos de microfluorimetría de calcio. Dichos cubreobjetos tienen grabadas una serie de guías, a modo de coordenadas de referencia, que permitieron localizar las células de interés. Así, coincidiendo con la expresión predominante *in vivo* e *in vitro* del receptor $P2Y_{13}$ tanto en astrocitos parenquimales como NSCs, se confirmó que las células que respondían a estimulaciones con el agonista 2MeSADP eran GFAP positivas. Y que además, en todas las células las respuestas eran sensibles a la inhibición por MRS2211.

Con el fin de determinar si estas células eran astrocitos parenquimales o NSCs, se realizó una inmucitofluorescencia con el marcador de NSCs SOX2. La doble tinción con GFAP y SOX2 reveló que todas las células de naturaleza astrogial que habían mostrado movilización de calcio en respuesta a 2MeSADP, siendo esta además sensible a la inhibición por el antagonista MRS2211, eran también SOX2 positivas (Figura 64). De modo que el receptor $P2Y_{13}$ mediaba movilizaciones de calcio únicamente en las NSCs.

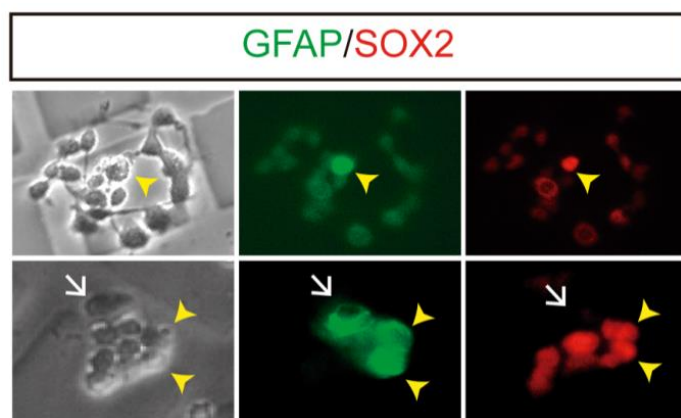


Figura 64. El receptor $P2Y_{13}$ induce la movilización de calcio intracelular en las NSCs aisladas de la SEZ. Imágenes de campo claro e inmucitofluorescencia de células aisladas de la zona subependimaria sometidas a ensayos de microfluorimetría de calcio. Las puntas de flecha amarilla señalan aquellas células que presentan respuestas de calcio y que además son NSCs GFAP/SOX2⁺. La flecha blanca señala un astrocito el cual no presenta respuesta de calcio tras la estimulación con 2MeSADP.

Tras los estudios anteriores de microfluorimetría de calcio, decidimos ahondar en la caracterización de la presencia y funcionalidad del receptor $P2Y_{13}$ en las NSCs adultas, analizando también el comportamiento eléctrico de las mismas. Mediante experimentos de *patch-clamp* se evaluó el efecto de la activación del receptor $P2Y_{13}$ sobre la actividad de los canales de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ voltaje dependiente.

Inicialmente, se estudió el comportamiento eléctrico de las NSCs empleando pulsos despolarizantes de 10 mV durante 100 ms. La selección de las células se realizó atendiendo a criterios morfológicos, analizando aquellas células que presentaban un mayor tamaño y crecimiento, característica distintiva de las NSCs (Costa et al., 2011). En estas condiciones de estudio, sólo se registraron corrientes de potasio de $42,14 \pm 7,38$ pC.

Seguidamente, tras comprobar el comportamiento eléctrico de las NSCs, se analizó si las corrientes de potasio registradas eran sensibles a la administración de 2MeSADP. Los registros mostraron una disminución en las corrientes de salida tras la administración durante dos minutos de 2MeSADP 10 μ M, siendo la carga de las corrientes de salida de $20,64 \pm 6,19$ pC (Figura 65).

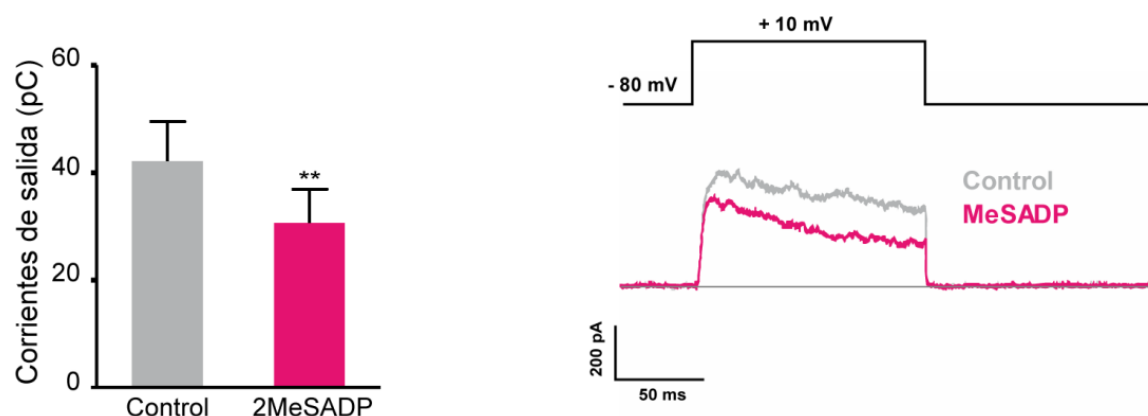


Figura 65. Las corrientes de potasio registradas en las NSCs tras la administración de pulsos despolarizantes son sensibles a la administración de 2MeSADP. El diagrama de la izquierda muestra la carga de las corrientes de K^+ antes (control) y después de la administración de 2MeSADP. En el panel derecho se muestra un registro representativo de las corrientes de salida de potasio generadas tras la administración de un pulso despolarizante en la condición control y tras la administración de 2MeSADP. Los valores representan la media $\pm$ SEM de $n = 14$ células (** $p < 0,01$ con test de t de Student pareado).

Tras verificar el efecto del 2MeSADP sobre el comportamiento eléctrico de las NSCs, se estudió si las variaciones registradas estaban mediadas por los receptores P2Y o si eran inducidas por una acción directa sobre los canales de K^+ voltaje dependiente. Debido a lo cual, se analizaron las corrientes de potasio en presencia de los antagonistas de los receptores P2Y₁ y P2Y₁₃, los compuestos MRS2179 y MRS2211, respectivamente. Como se muestra en la Figura 66 el efecto modulador del 2MeSADP se revirtió por la administración del antagonista del receptor P2Y₁₃, MRS2211. La carga de las corrientes registradas en presencia del antagonista eran similares a las obtenidas con estimulaciones controles, $44,86 \pm 3,14$ pC. Por el contrario, no se modificó por la administración del MRS2179, antagonista específico del receptor P2Y₁. Dichos resultados indicaban, que los cambios en las corrientes de salida generados tras la administración de 2MeSADP estaban mediados por el receptor P2Y₁₃.

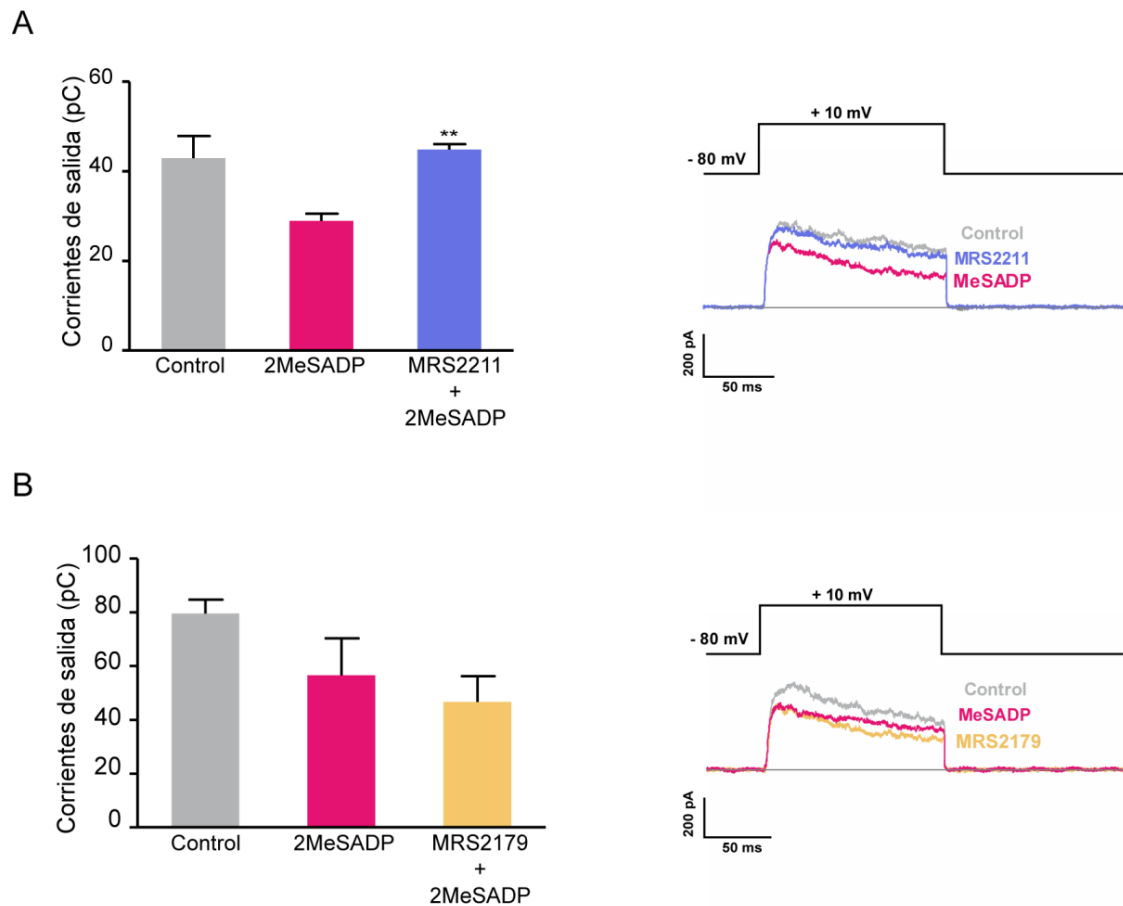


Figura 66. El efecto del 2MeSADP sobre las corrientes de K^+ es sensible a la administración de MRS2211. **(A)** Efecto del antagonista del receptor $P2Y_{13}$, MRS2211, sobre las corrientes de K^+ dependientes de voltaje en las células aisladas de la SEZ. El diagrama de la izquierda muestra la carga de las corrientes de K^+ antes (control) y después de la administración de 2MeSADP y MRS2211. En el panel de la derecha se muestra un registro representativo donde el MRS2211 revierte el efecto del 2MeSADP sobre las corrientes de K^+ provocadas tras la administración de un pulso despolarizante. **(B)** Efecto del antagonista del receptor $P2Y_1$, MRS2179, sobre las corrientes de K^+ dependientes de voltaje en las células aisladas de la SEZ. El diagrama de la izquierda muestra la carga de las corrientes de K^+ antes (control) y después de la administración de 2MeSADP y MRS2179. En el panel de la derecha se muestra un registro representativo donde el MRS2179 no revierte el efecto del 2MeSADP sobre las corrientes de K^+ provocadas tras la administración de un pulso despolarizante. Los valores representan la media $\pm$ SEM de $n = 4$ células para MRS2211 y para MRS2179 (** $p < 0,01$ con test de t de Student pareado).

7.2.3 El receptor $P2Y_{13}$ se expresa predominantemente en las NSCs en estado primed

Como se mencionó anteriormente, las NSCs pueden encontrarse en estado quiescente, *primed* o activado (Llorens-Bobadilla et al., 2015, Xie et al., 2020, Belenguer et al., 2021b). Dichos estados se caracterizan por la presencia de distintos patrones de expresión génica y proteica de determinados marcadores, que permiten el aislamiento de cada población (Dulken et al., 2017, Llorens-Bobadilla et al., 2015, Xie et al., 2020, Belenguer et al., 2021a, Belenguer et al., 2021b). Los estudios anteriores habían puesto de manifiesto la presencia y funcionalidad del receptor $P2Y_{13}$ en las NSCs. Con el fin de identificar la población de células madre que expresaba los receptores $P2Y_{13}$ funcionales, se realizó la separación de las diferentes poblaciones del linaje neural de la SEZ mediante experimentos de citometría de

flujo con marcadores específicos, y la secuenciación del ARNm de las poblaciones aisladas. Estos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Isabel Fariñas, del Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física, de la Universidad de Valencia. Como se aprecia en la **Figura 67** el ARNm del receptor P2Y₁₃ se detectó mayoritariamente en la población de células NSCs en estado primed.

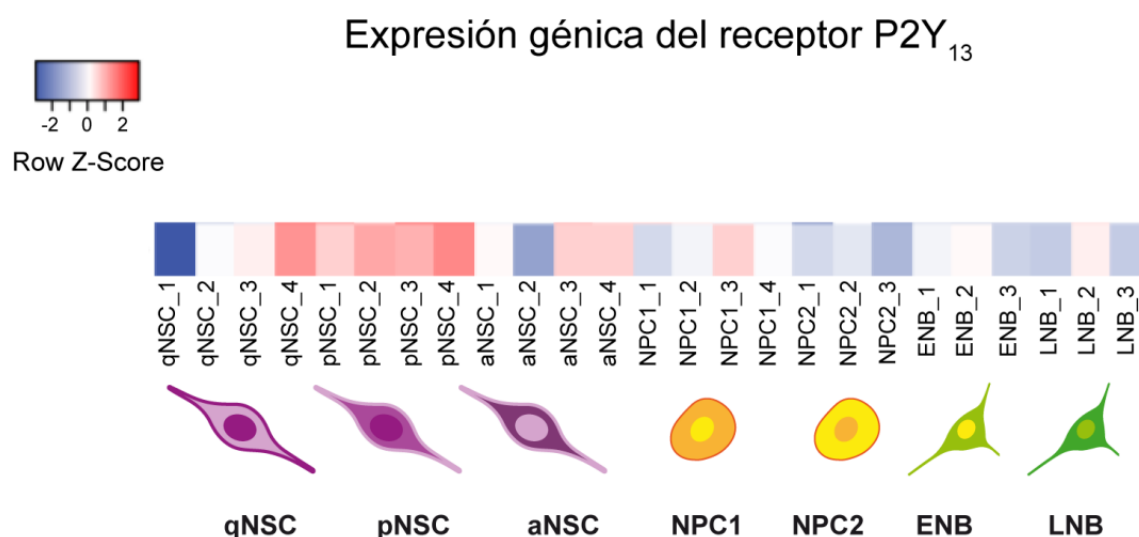


Figura 67. El receptor P2Y₁₃ se expresa mayoritariamente en las NSCs en estado *primed*. Mapa de calor que muestra los niveles de expresión del receptor P2Y₁₃ a lo largo del linaje de la SEZ. Siendo: qNSC (quiescente), pNSCs (primed), aNSC (activada), NCP (progenitor neural), ENB (neuroblasto temprano) y LNB (neuroblasto tardío).

7.2.4 La activación del receptor P2Y₁₃ promueve la activación y progresión en el linaje de las NSCs aisladas de las SEZ adulta

La expresión predominante del receptor P2Y₁₃ en la región ventral de la SEZ y su funcionalidad en las NSCs, sugería que podría desempeñar un papel modulador en la neurogénesis adulta de la SEZ. Como primera aproximación se evaluó el efecto de la activación del receptor P2Y₁₃ sobre la formación de nuevas neuronas. Para ello, se realizaron cultivos de progenitores neurales en ausencia y presencia del agonista 2MeSADP y se cuantificó el porcentaje de neuroblastos en ambas condiciones a los 6 DIV. Los estudios de inmunocitofluorescencia con el marcador β III-tubulina mostraron que no existían diferencias significativas en el número de neuroblastos entre los cultivos tratados y no tratados con 2MeSADP (**Figura 68**).

Como la expresión del receptor P2Y₁₃ quedaba restringida principalmente a las NSCs *primed*, la ausencia de efecto sobre la neurogénesis global podría deberse al hecho de que en estos cultivos se aísla la totalidad de las células presentes en el linaje neural derivada de este nicho neurogénico. En este sentido la población de NSCs, sobre la que se centraría el potencial papel modulador del receptor P2Y₁₃, podría representar un porcentaje relativamente bajo, del número total de células aisladas en el cultivo. Así, el efecto del receptor P2Y₁₃ podría verse enmascarado por el resto de poblaciones presentes en la preparación.

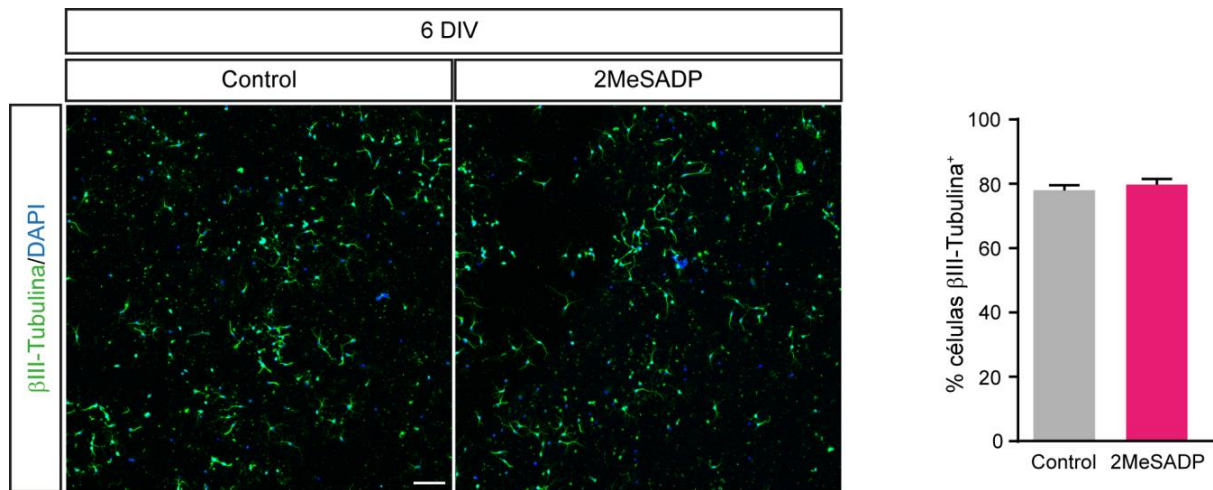


Figura 68. Efecto de la activación del receptor $P2Y_{13}$ sobre el porcentaje de neuroblastos generados a día 6 de cultivo *in vitro*. Imágenes de inmunocitofluorescencia de las preparaciones de progenitores neurales de la SEZ adulta a día 6 de cultivo *in vitro* (DIV) donde se muestra la β III-tubulina (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). El diagrama de la derecha muestra el porcentaje de células β III-tubulina⁺ obtenidas en presencia y ausencia de 2MeSADP 10 μ M. Escala: 100 μ m.

Con el fin de dilucidar esta incógnita, se cuantificó el número real de NSCs aisladas en el cultivo. Los ensayos de inmunocitofluorescencia para la detección del doble marcaje para GFAP y SOX2 a día 1 de cultivo *in vitro*, mostraron que el porcentaje de NSCs aisladas representaba el $16,51\% \pm 1,77\%$. Además, dicho porcentaje se reducía considerablemente a día 2 de cultivo *in vitro* ($5,95\% \pm 1,34\%$) (Figura 69).

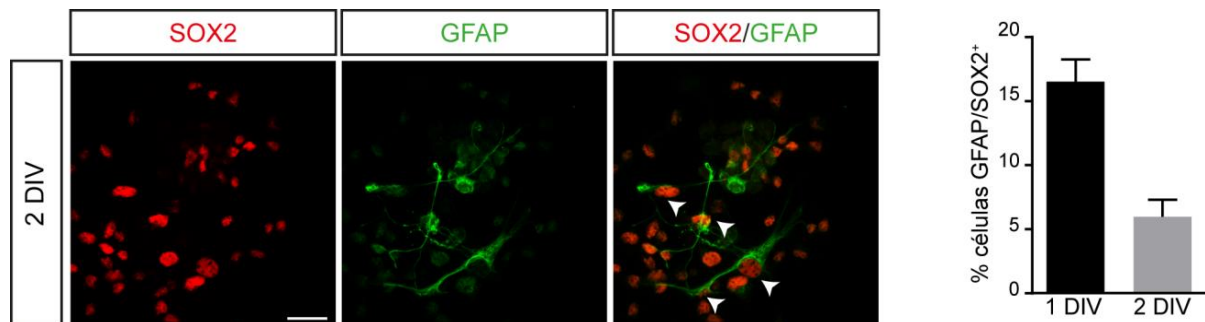


Figura 69. Porcentaje de la población de NSCs aisladas en las preparaciones de progenitores de la SEZ adulta. Imágenes de inmunocitofluorescencia representativas de las NSCs en las preparaciones de progenitores neurales de la SEZ adulta a día 2 de cultivo *in vitro* (DIV) donde se muestra SOX2 (rojo) y GFAP (verde). El diagrama de la derecha representa las cuantificaciones de la población de NSCs a día 1 y 2 DIV. Escala: 30 μ m.

Considerando estos bajos porcentajes, para evitar el enmascaramiento del efecto de la activación del receptor $P2Y_{13}$ al observar el cultivo en su conjunto y a tiempo final, se requería monitorizar el comportamiento de las células individuales a lo largo de los días en cultivo. Para ello, se monitorizaron los cultivos de progenitores neurales de la SEZ en presencia y ausencia de 2MeSADP 10 μ M mediante la videomicroscopía de time-lapse durante 5 días *in vitro*, y se analizaron los árboles de linaje generados (Figuras 70 y 71).

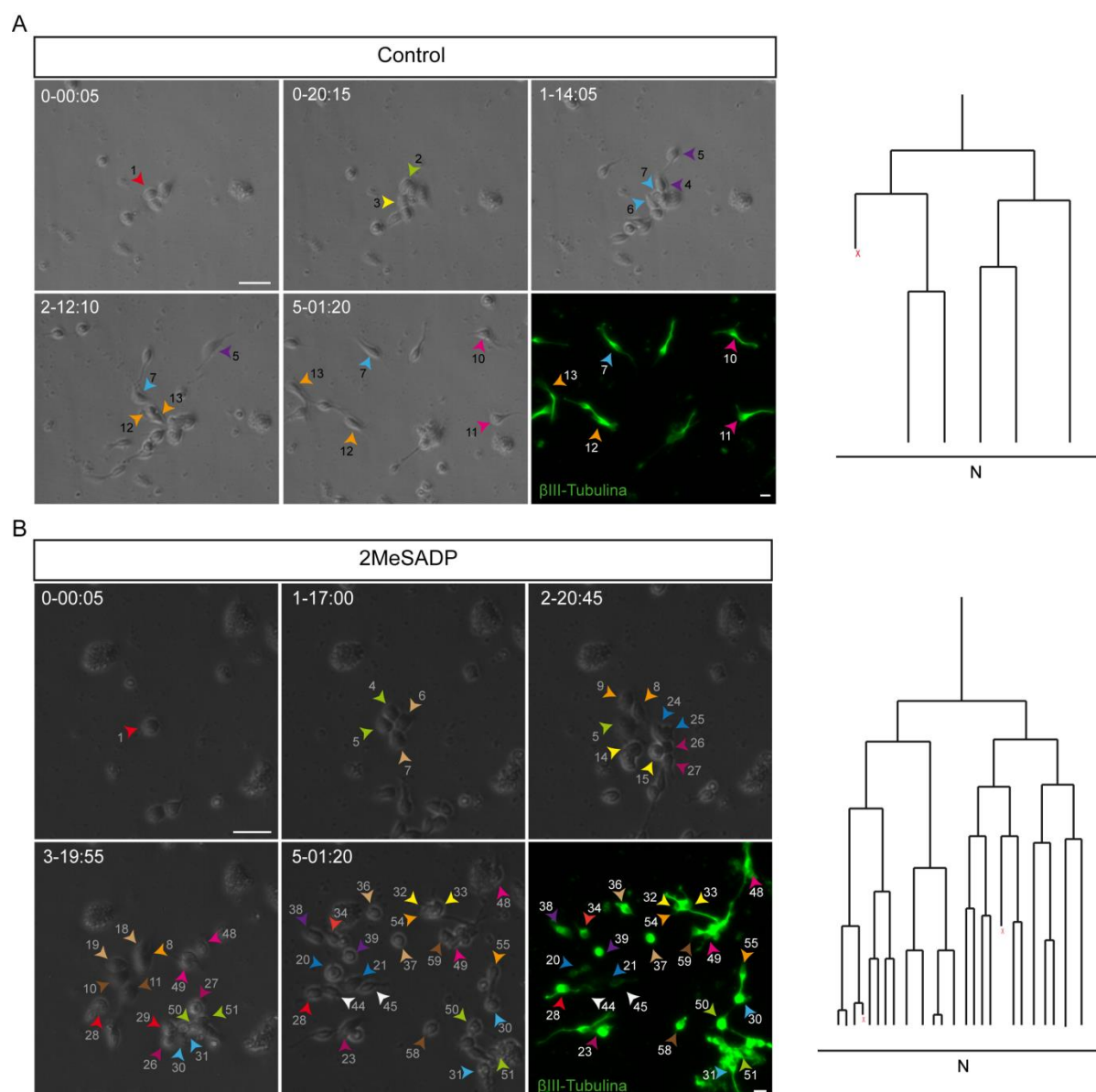


Figura 70. El tratamiento con 2MeSADP induce un aumento en el número de clones complejos de 4 y 5 rondas de división. **(A)** Clon representativo de 3 rondas de división observado en condiciones controles tras 6 días de cultivo *in vitro*. A la derecha se muestra el árbol simétrico analizado en el cultivo cuya progenie es neuronal (N, neuroblasto; X, célula muerta). **(B)** Clon representativo de 5 rondas de división obtenido en presencia de 2MeSADP 10 μ M tras 6 DIV. A la derecha se muestra el árbol simétrico analizado en el cultivo cuya progenie es neuronal (N, neuroblasto; X, célula muerta). En **(A)** y **(B)** las imágenes en contraste de fase muestran la progresión del linaje obtenida mediante videomicroscopía de time-lapse (día-hora:minuto). La última imagen corresponde con la inmunocitofluorescencia realizada al finalizar el experimento, en la que se muestra β III-tubulina (verde). Las puntas de flecha marcan las células dentro del linaje. Escala: 30 μ m.

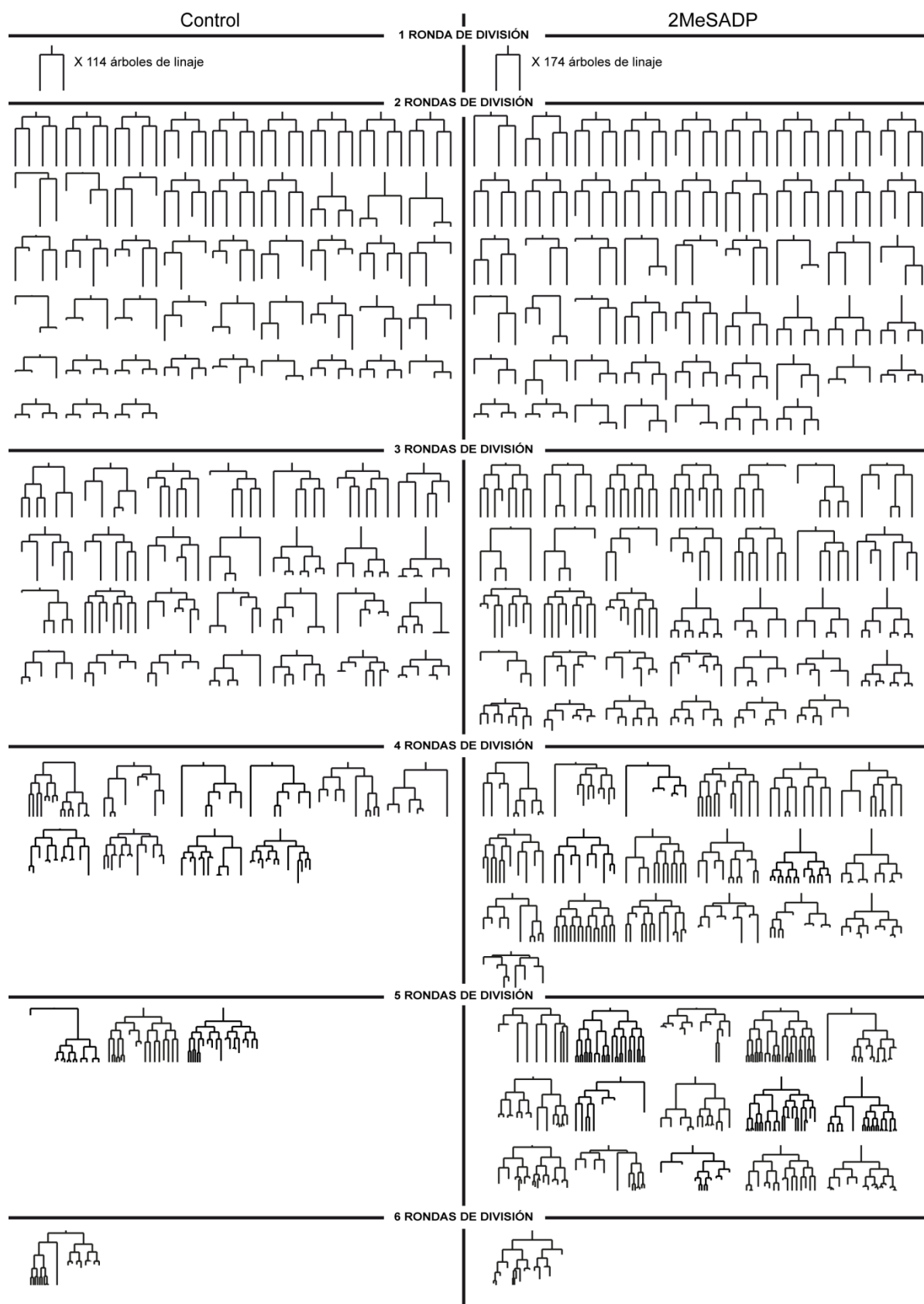


Figura 71. Biblioteca de árboles de linaje de 1 a 6 rondas de división monitorizados en las preparaciones de progenitores neurales de la SEZ en condición control (panel izquierdo) y presencia de 2MeSADP 10 μ M (panel derecho) mediante videomicroscopía de time-lapse. En cada caso, la identidad de la progenie fue determinada por ensayos de inmunocitofluorescencia al finalizar el experimento.

Mediante el seguimiento de las células individuales se cuantificaron diferentes parámetros como el número de rondas de divisiones por clon, la duración del ciclo celular, el número de clones o la migración y supervivencia celular, que reflejaron el comportamiento de las células estudiadas. Además, la inmunocitofluorescencia al finalizar el experimento de videomicroscopía permitió analizar la progenie generada (Figura 70).

El tratamiento de los cultivos de progenitores con el agonista 2MeSADP no evidenció grandes cambios en los parámetros previamente señalados. En primer lugar, el tratamiento con el agonista 2MeSADP generó un ligero incremento en el número de rondas de división por clon (3,02 $\pm$ 0,13) en comparación con los cultivos no tratados (2,60 $\pm$ 0,13) (Figura 72A). Además, este incremento se vio acompañado de una pequeña disminución en la duración del ciclo celular (Figura 72B) en las células tratadas con 2MeSADP en comparación con las células controles (15,84 $\pm$ 1,80 y 17,81 $\pm$ 1,36, respectivamente). Es decir, en los cultivos tratados con 2MeSADP, las células tendía a dividir más veces y además mostraban un ciclo de división más corto que las células de la condición control. No obstante, en cuanto a la supervivencia (Figura 72C) y migración celular (Figura 72D) no se detectaron cambios entre las células tratadas y no tratadas con el agonista.

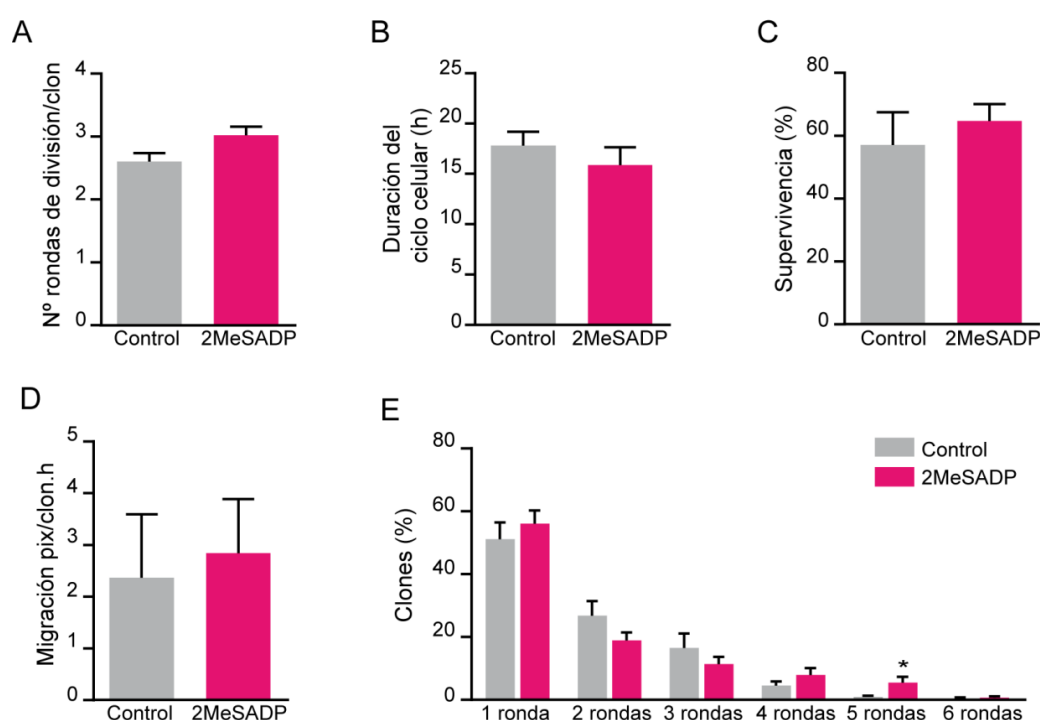


Figura 72. Efecto del 2MeSADP sobre el comportamiento de los progenitores neurales aislados de la SEZ adulta. (A) Número de rondas de división por clon observadas durante todo el experimento. (B) Promedio de la duración del ciclo celular. (C) Porcentaje de supervivencia de las células que dividen. (D) Promedio de la migración celular de las células que dividen. (E) Porcentaje de los clones generados. Todos los diagramas presentan los resultados obtenidos en los cultivos en presencia y ausencia de 2MeSADP 10 μ M. Los datos mostrados representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes, con test de t de Student no pareado para (A,B,C y D) y *p < 0,05, ANOVA con método de comparación múltiple de Tukey para (E).

Atendiendo a la complejidad de los clones generados en el cultivo, en presencia de 2MeSADP se observó un incremento significativo del número de clones que mostraban una

mayor complejidad (Figura 72E). Estos clones complejos se caracterizan por experimentar entre 4 o más rondas de división. Atendiendo a los clones de 4 rondas de división se observó un aumento de los mismos en las preparaciones tratadas con 2MeSADP en comparación con la condición control ($7,88\% \pm 2,23\%$ y $4,50\% \pm 1,25\%$, respectivamente). De igual modo, el porcentaje de clones de 5 rondas de división fue significativamente mayor en presencia de 2MeSADP que en la condición control ($5,43\% \pm 1,77\%$ y $0,81\% \pm 0,50\%$, respectivamente).

El incremento de los clones complejos junto con el aumento del número de rondas de división por clon podría estar apuntando a una potenciación de la proliferación celular inducida por el 2MeSADP. Sin embargo, no se observó un aumento de clones complejos en detrimento de los clones de 1, 2 o 3 rondas de división (Figura 72). Asimismo, atendiendo a la bibliografía, está descrito que la generación de clones complejos es consecuencia de la activación de las NSCs (Costa et al., 2011, Ortega et al., 2011a, Ponti et al., 2013). Teniendo en cuenta que el receptor $P2Y_{13}$ es funcional en esta población de la SEZ, y que a tiempo final no se produce un aumento significativo de los neuroblastos, todo indica que en presencia de 2MeSADP no se está potenciando la proliferación celular sino que se estaría activando a las NSCs presentes en el cultivo, promoviendo su entrada en el ciclo celular y progresión en el linaje.

7.2.5 La modulación del receptor $P2Y_{13}$ induce cambios en el comportamiento de las NSCs aisladas de la SEZ adulta: balance entre quiescencia y activación

A continuación, para corroborar, que los efectos inducidos por el 2MeSADP sobre el comportamiento de los progenitores neurales de la SEZ eran dependientes del receptor $P2Y_{13}$, se monitorizó su comportamiento en presencia de su antagonista específico MRS2211. Para ello, las preparaciones se incubaron con MRS2211 $10\ \mu\text{M}$ durante 5 minutos, tras los cuales se adicionó el 2MeSADP. El seguimiento de célula única y su posterior análisis reveló que el antagonista MRS2211 revertía los efectos inducidos por el 2MeSADP. De hecho, en presencia del antagonista MRS2211 se produjo una disminución del número de rondas de división por clon ($2,24 \pm 0,073$) en comparación con los cultivos tratados con 2MeSADP ($3,02 \pm 0,13$) (Figura 73A). Este descenso se vio acompañado de un aumento en la duración del ciclo celular en las células tratadas con MRS2211 en comparación con las tratadas con 2MeSADP ($24,71 \pm 1,29$ y $17,81 \pm 1,36$, respectivamente) (Figura 73B). Además, en presencia de MRS2211 se redujo el porcentaje de clones complejos de 4 rondas de división ($0,49\% \pm 0,49\%$) en comparación con los cultivos tratados con el agonista ($7,88\% \pm 2,23\%$) (Figura 73D), y no se detectaron clones complejos de 5 y 6 rondas de división.

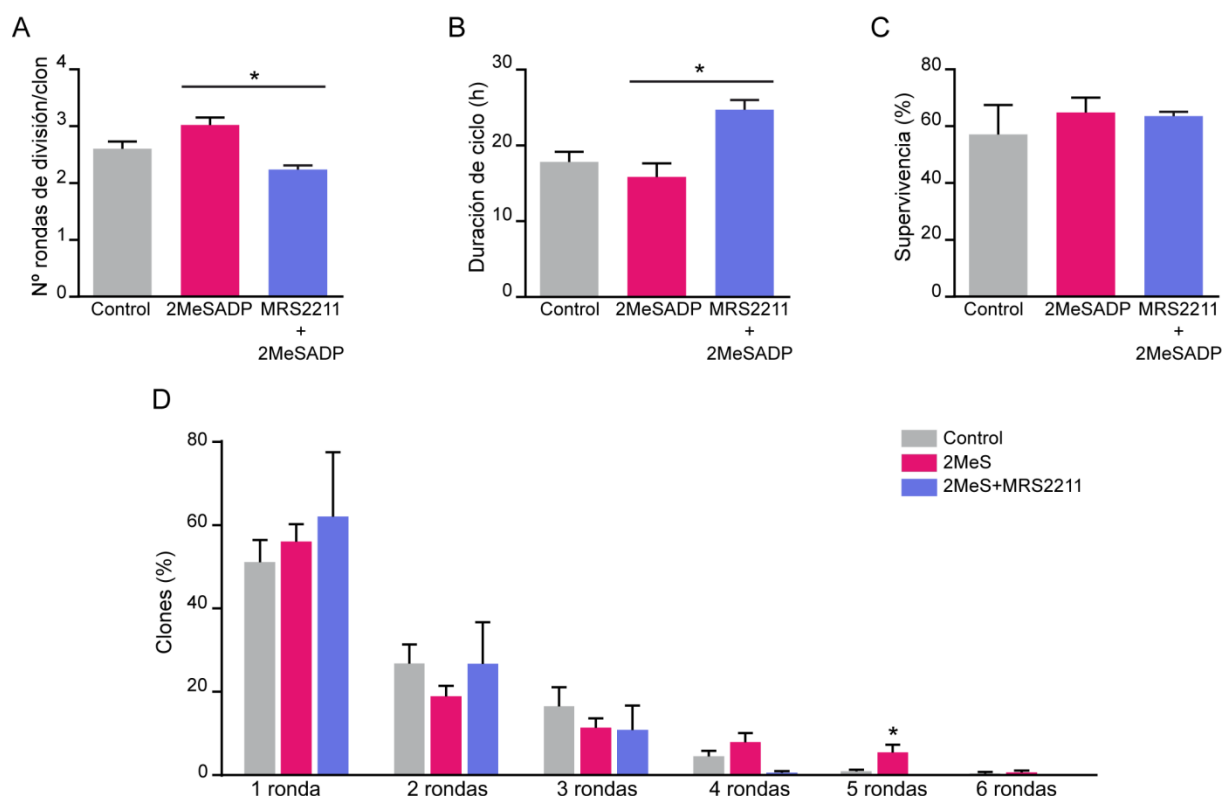


Figura 73. La modulación del receptor $P2Y_{13}$ con el antagonista MRS2211 revierte los efectos del 2MeSADP sobre el comportamiento de los progenitores neurales aislados de la SEZ adulta. **(A)** Número de rondas de división por clon durante los experimentos de time-lapse. **(B)** Promedio de la duración del ciclo celular. **(C)** Porcentaje de supervivencia de las células que dividen. **(D)** Porcentaje de los clones generados. Todos los diagramas representan los resultados obtenidos en presencia y ausencia de 2MeSADP (10 μ M), así como, los obtenidos en los cultivos pre-incubados durante 5 minutos con MRS2211 (10 μ M). Los datos mostrados representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes, (* $p < 0,05$, ANOVA con test de comparación múltiple Tukey)

Atendiendo a estos resultados, cabría pensar que la disminución en el número de rondas de división por clon y en el porcentaje de clones complejos observado en presencia de MRS2211 podría ser debido a una pérdida en la viabilidad celular. Sin embargo, los cultivos tratados con MRS2211 no mostraron un porcentaje de supervivencia inferior al observado en los cultivos monitorizados en presencia y ausencia de 2MeSADP (Figura 73C).

Así pues, el efecto del 2MeSADP sobre el comportamiento de las NSCs estaba mediado por el receptor $P2Y_{13}$ el cual parece desencadenar la entrada en el ciclo celular, por parte de las NSCs, iniciando así su progresión en el linaje, y generando además clones complejos de 4 y 5 rondas de división. Mientras que la acción inhibitoria del compuesto MRS2211 se manifestaba con un descenso en el número de clones complejos generados por el agonista (Figura 74).

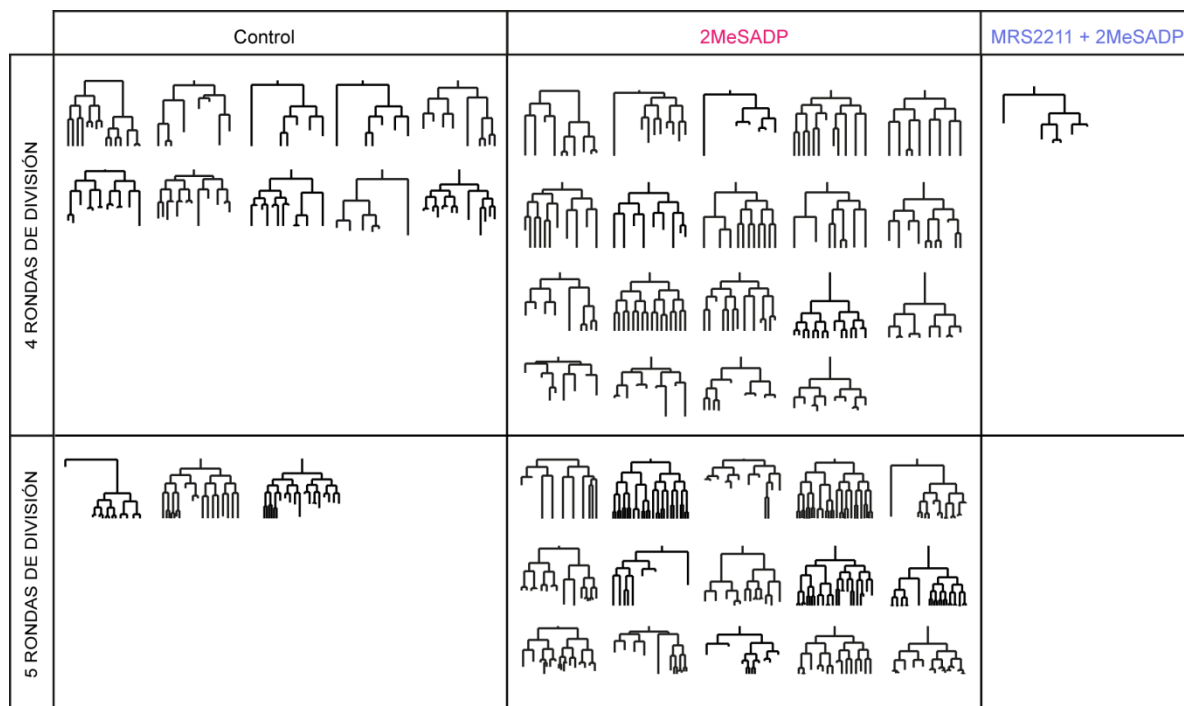


Figura 74. La activación del receptor $P2Y_{13}$ induce el aumento de los clones complejos de 4 y 5 rondas de activación. Biblioteca de árboles de linaje de 4 y 5 rondas de división originados en las preparaciones de progenitores neurales de la SEZ en condición control, en presencia de 2MeSADP 10 μ M y pre-incubadas con MRS2211 10 μ M. En cada caso, la identidad de la progenie fue determinada por ensayos de inmunocitofluorescencia al finalizar el experimento.

El conjunto de los resultados apuntaba a que la activación del receptor $P2Y_{13}$ podría estar regulando el balance entre quiescencia/activación de las NSCs de la SEZ adulta.

7.2.6 Efecto del receptor $P2Y_{13}$ sobre el modo de división de las NSCs: balance entre autorrenovación y diferenciación

Como se apuntó anteriormente, una de las características distintivas de las NSCs es su capacidad de hacer copias de sí mismas a través de divisiones asimétricas (Figura 75). Este proceso se conoce como autorrenovación. Dado que, la activación del receptor $P2Y_{13}$ induce cambios en el comportamiento de las NSCs aisladas de la SEZ adulta, se estudió si, esos cambios en el balance entre activación y quiescencia, también afectaba a la capacidad de autorrenovación.

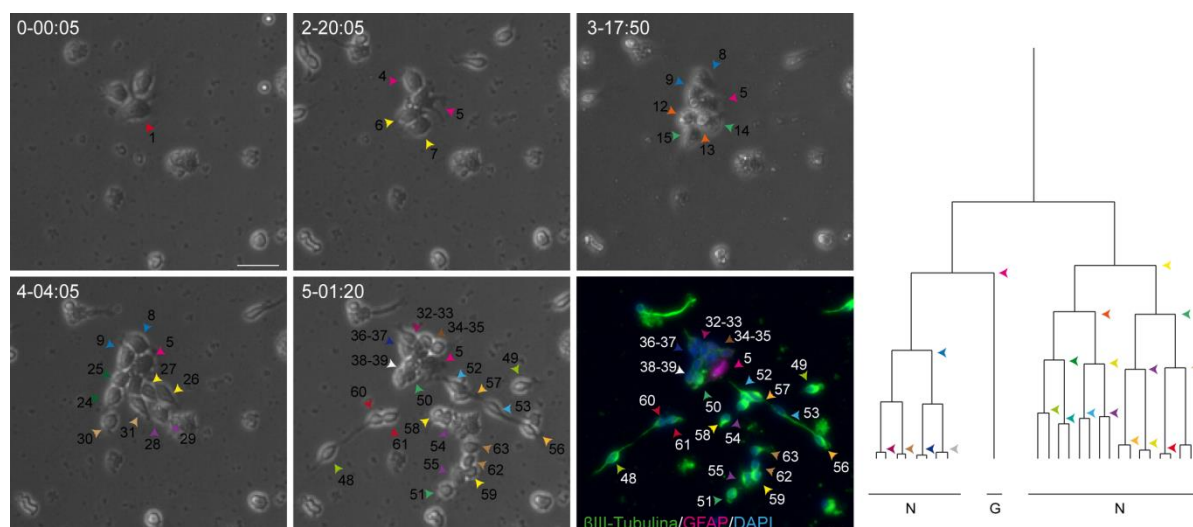


Figura 75. Las NSCs dividen asimétricamente para dar copias de sí mismas. Clon representativo asimétrico de 5 rondas de división obtenido tras 6 días de cultivo *in vitro*. A la derecha se muestra el árbol asimétrico analizado en el cultivo cuya progenie es neuronal y astrogial (N, neuroblasto; G, célula astrogial). Las imágenes en contraste de fase muestran la progresión del linaje obtenida mediante videomicroscopía de time-lapse (día-hora:minuto). La última imagen corresponde con la inmunocitofluorescencia realizada al finalizar el experimento, en la que se muestra β III-tubulina (verde) y GFAP (magenta). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las puntas de flecha marcan las células dentro del linaje. Escala: 30 μ m.

Para ello, se analizaron las inmunocitofluorescencias realizadas al finalizar los experimentos de videomicroscopía de time-lapse. De esta manera, se determinó la progenie generada de cada clon analizado. Seguidamente, se cuantificó el porcentaje de clones simétricos neuronales, aquellos que sólo generaban neuroblastos β III-Tubulina⁺, y de clones asimétricos, donde una célula madre fundadora generaba nuevas NSCs GFAP/SOX2⁺ y neuroblastos β III-Tubulina⁺.

En las preparaciones de progenitores donde no se había llevado a cabo ningún tratamiento (control), el porcentaje de clones simétricos fue 79% frente a 21% de clones asimétricos. Sin embargo, en los cultivos tratados con 2MeSADP 10 μ M se observó un incremento en el porcentaje de clones simétricos (89%), acompañados de una disminución en el porcentaje de clones asimétricos (11%). Por consiguiente, la capacidad de autorrenovación de las NSCs parecía verse comprometida en presencia del agonista (Figura 76).

Estos resultados sugerían que a través de la activación del receptor P2Y₁₃, el compuesto 2MeSADP inducía la activación de las NSCs, las cuales entraban en el ciclo celular, generando clones complejos de 4 y 5 rondas de división mediante divisiones simétricas, predominantemente, lo que indicaría que, además de potenciar la activación y entrada en ciclo de las NSCs, el 2MeSADP estaría promoviendo su diferenciación hacia neuronas, en detrimento de su capacidad de autorrenovación.

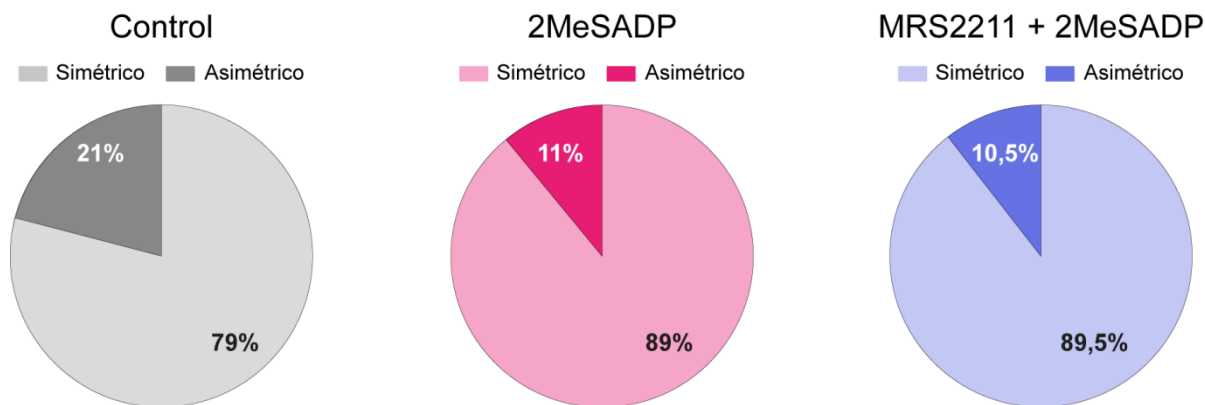


Figura 76. La modulación del receptor $P2Y_{13}$ disminuye la formación de clones asimétricos en los cultivos de progenitores neurales aislados de la SEZ. Los tres diagramas muestran el porcentaje de árboles simétricos y asimétricos en cada tratamiento. Se considera árbol simétrico aquel que genera sólo neuroblastos β III-tubulina⁺, y asimétrico aquel que genera por un lado neuroblastos y por otro NSCs GFAP/SOX2⁺.

El hecho de una menor autorrenovación de las NSCs y una mayor activación de las mismas en presencia de 2MeSADP, implicaría una disminución en la población de NSCs al finalizar el experimento. Es por ello, que para verificar esta hipótesis se analizó la proporción de NSCs GFAP/SOX2⁺ en cultivo a día 1 y 4 de cultivo *in vitro*.

Primeramente, los ensayos de inmunocitofluorescencia mostraron que a día 1 de cultivo *in vitro* el porcentaje de células GFAP/SOX2⁺ difería entre los cultivos tratados y no tratados con 2MeSADP. Mientras que en los cultivos sin tratar el porcentaje era de $16,51\% \pm 1,77\%$, en los tratados con 2MeSADP era de $12,95\% \pm 2,06\%$ (Figura 77). Este hallazgo confirmaría una mayor activación de las células madre tras la activación del receptor $P2Y_{13}$. De manera que a día 1 de cultivo *in vitro* la población de células GFAP/SOX2⁺ sería menor porque ya habrían entrado en el ciclo celular, progresando en el linaje y perdiendo así su naturaleza de célula madre neural. Sin embargo, a día 4 de cultivo *in vitro*, aunque el porcentaje de NSCs era menor en las preparaciones tratadas que en las no tratadas ($10,46\% \pm 1,49\%$ y $11,88\% \pm 1,15\%$, respectivamente), la diferencia no fue tan reseñable como a día 1 de cultivo *in vitro*.

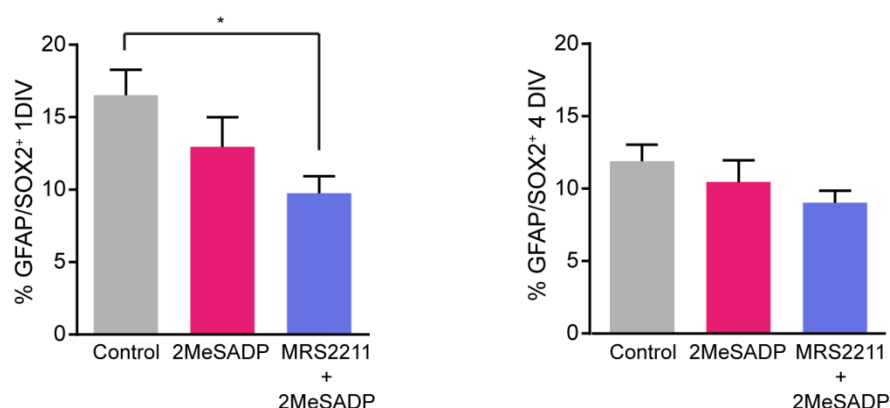


Figura 77. Efecto de la activación o el bloqueo del receptor $P2Y_{13}$ sobre la población de NSCs GFAP/SOX2⁺ presente en los cultivos de progenitores neurales a día 1 y 4 de cultivo *in vitro*. Los diagramas de barra muestran el porcentaje de NSCs con respecto al total de células de las preparaciones de progenitores neurales a día 1 (izquierda) y 4 (derecha) de cultivo *in vitro*. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$, ANOVA con método de comparación múltiple de Tukey).

En todos estos experimentos se produjo un hecho destacable y, a primera vista contradictorio, respecto al hilo argumental mantenido hasta ahora, en los cultivos que se llevaron a cabo en presencia del antagonista del receptor P2Y₁₃ MRS2211. Paradójicamente, el MRS2211 realizaba un efecto semejante al del agonista 2MeSADP en cuanto al porcentaje de clones asimétricos observados (10,5% de asimetría) (Figura 76) y mostraba, además, un menor porcentaje de células GFAP/SOX2 detectadas a día 1 de los experimentos (9,75% ± 1,17%), que se mantenía prácticamente inalterada a día 4 (9,02% ± 0,83%) (Figura 77). Para clarificar estos resultados aparentemente contradictorios, hay que tener en cuenta la dinámica de comportamiento de los árboles del linaje neural derivados de una NSCs adulta (Costa et al., 2011). En los árboles iniciados por NSCs astrogliales, durante los primeros 1-2 días de cultivo, las células NSCs fundadoras que entran en ciclo de activación generan tras la primera y segunda ronda de división, células conocidas como “fast-dividing astroglia”, aun positivas para GFAP pero con ciclo celular rápido, antes de generar los TAPS (Figura 79C). Asimismo, hay que considerar que el efecto del receptor P2Y₁₃ actúa predominantemente sobre las NSCs *primed* (presumiblemente la ronda inicial del árbol del linaje), las cuales representan un bajo porcentaje en el cultivo.

Por lo tanto, para esclarecer dichas cuestiones, se llevó a cabo la monitorización de los cultivos de los progenitores neurales durante 3 días *in vitro*, tratando de evitar cualquier pérdida de información no asociada a las poblaciones bajo estudio. Seguidamente, se realizaron inmunocitofluorescencias a tiempo final y se estimaron las proporciones de NSCs GFAP/SOX2⁺ en las distintas condiciones de cultivo. Asimismo, se diferenció entre las tres poblaciones distintas de células madre. El primer grupo estaba formado por las células madre neurales iniciales totales que incluye tanto las quiescentes como las NSCs activas y que por tanto dividían a lo largo del cultivo. Con el propósito de asegurar que era una célula madre neural, solo se cuantificaron aquellas células fundadoras que generaban clones asimétricos. El segundo grupo estaba formado por las NSCs quiescentes caracterizadas por no dividir durante la progresión del cultivo. Por último, el tercer grupo incluía las NSCs procedentes de clones asimétricos y por tanto de la autorrenovación de una célula madre fundadora.

Según lo observado hasta ahora, se confirmó que una vez iniciada la entrada en el ciclo celular, los clones bajo la estimulación del 2MeSADP, tendían a producir principalmente neuronas de forma simétrica, disminuyendo las autorrenovaciones y la cantidad de células GFAP/SOX2⁺ que se observan dentro de los clones. Ahora bien, aunque el porcentaje de asimetría en los experimentos en presencia del MRS2211 es semejante, el efecto no correspondería con el mismo mecanismo de acción. Como se puede ver en la Figura 78 la baja presencia de células GFAP/SOX2⁺ inicial en presencia del antagonista no se debe, de hecho, a una mayor y más rápida diferenciación potenciada por la disminución de la autorrenovación (como es el caso del 2MeSADP) sino a que las NSCs, con el receptor inactivo, tenderían a quedar quiescentes y a no entrar directamente en ciclo celular, como se desprende de que prácticamente el porcentaje inicial de células GFAP/SOX2⁺ en MRS2211

coincide con el porcentaje de células quiescentes que no dividen durante el cultivo (0,39% vs 0,30%).

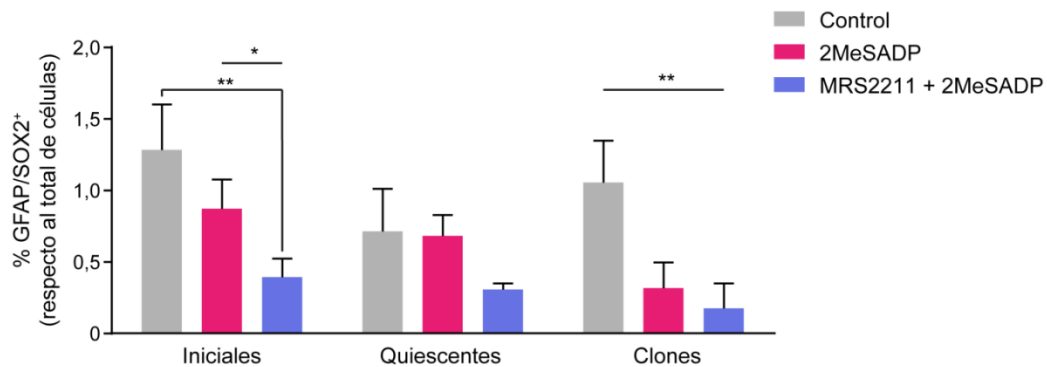


Figura 78. Efecto de la activación o el bloqueo del receptor $P2Y_{13}$ sobre la población de NSCs GFAP/SOX2⁺ iniciales, quiescentes y generadas en clones, monitorizadas mediante videomicroscopía de time-lapse a los 3 días de cultivo *in vitro*. Comparación del porcentaje de células GFAP/SOX2⁺ respecto al número de células totales iniciales tras la modulación del receptor $P2Y_{13}$. Se caracterizan como células iniciales la suma de las NSCs que dividen y las que se mantienen en estado quiescente. El término quiescentes representan las NSCs que no dividen durante el experimento. Mientras que el término clones abarca las células GFAP/SOX2⁺ generadas tras divisiones asimétricas. Los valores representan la media $\pm$ SEM de 2 experimentos independientes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA con el método de comparación múltiple de Tukey).

Este efecto se vería reforzado por los resultados obtenidos tras realizar el análisis de la duración de ciclo de los clones complejos. Se observó una disminución significativa de dicho parámetro tanto en las primeras rondas de división (Figura 79B) como en el cómputo global de rondas de división en presencia de 2MeSADP (Figura 79A).

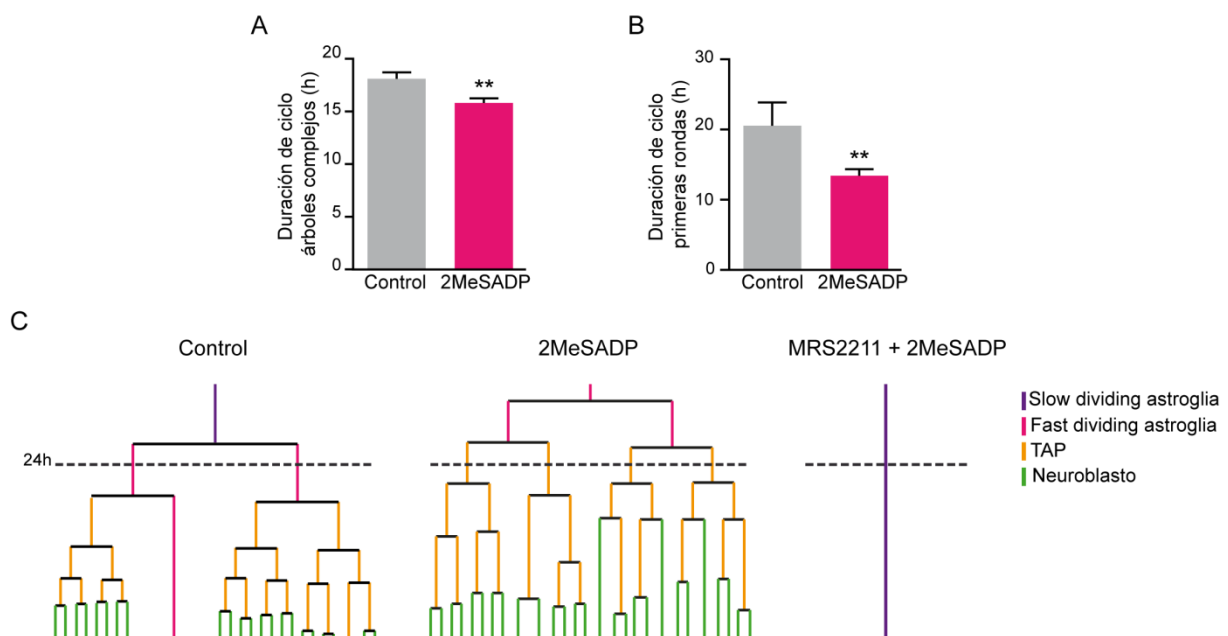


Figura 79. Efecto de la activación del receptor $P2Y_{13}$ sobre la duración del ciclo celular de los clones complejos. **(A)** Duración de ciclo media de los árboles complejos generados en presencia y ausencia de 2MeSADP 10 μ M. **(B)** Duración de ciclo de las primeras rondas de división de los árboles complejos generados en presencia y ausencia de 2MeSADP. **(C)** Modelización teórica de la modulación del receptor $P2Y_{13}$. Los datos mostrados representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes, (** $p < 0,01$ con test de t de Student no pareado).

Por lo tanto, esto confirmaría que, como hemos explicado antes, en los cultivos estimulados con 2MeSADP, la disminución del porcentaje de células GFAP/SOX2⁺ a día 1 se debió a una mayor activación de las NSCs. Sin embargo, la disminución de dicho porcentaje observado en presencia del antagonista MRS2211, indicaría que la reversión del efecto del 2MeSADP se produciría por el mantenimiento de las mismas en estado quiescente. De esta manera se explica el bajo porcentaje de células GFAP/SOX2⁺ aisladas en el cultivo a día 1 y la disminución en la proporción de clones complejos de 4 y 5 rondas de división.

Por consiguiente, la activación del receptor P2Y₁₃ en las NSCs induciría su entrada al ciclo celular generando clones simétricos complejos y disminuyendo la capacidad de autorrenovación. Sin embargo, la inhibición del receptor P2Y₁₃ no solo revierte la acción del 2MeSADP en cuanto al comportamiento de las NSCs, sino que además las mantiene en estado quiescente, reduciendo así el porcentaje de clones asimétricos y la formación de clones complejos de 4 y 5 rondas de división.

7.2.7 La sobreexpresión *in vivo* del receptor P2Y₁₃ en la SEZ adulta modula el comportamiento de las NSCs

Los resultados previamente mostrados habían señalado que el receptor P2Y₁₃ se expresaba predominantemente en la región ventral de la SEZ. Además, los estudios *in vitro* revelaron que este receptor, aunque se expresaba en las células de naturaleza astrogliar, era funcional principalmente en las NSCs. Asimismo, la modulación del receptor P2Y₁₃ afectaba al comportamiento de las NSCs *in vitro*. De manera que nuestro siguiente paso se enfocó a comprobar el papel del receptor P2Y₁₃ *in vivo*.

Con este fin y gracias a una colaboración con el laboratorio del doctor Sergio Gascón se diseñó un vector viral de sobreexpresión del receptor P2Y₁₃ como se detalla en el apartado de Métodos. Los lentivirus se administraron en la SEZ de ratones adultos de 2 meses de edad mediante cirugía estereotáxica, como se describe en Métodos. Pasados 14 días desde las inyecciones se realizaron las secciones sagitales de los cerebros para su análisis.

Inicialmente, se comprobó la funcionalidad de las construcciones virales. Por medio de experimentos de inmunohistofluorescencia se comprobó como las células transducidas con los vectores de sobreexpresión mostraban, efectivamente un incremento de la expresión del receptor P2Y₁₃, en comparación con los vectores control (Figura 80).

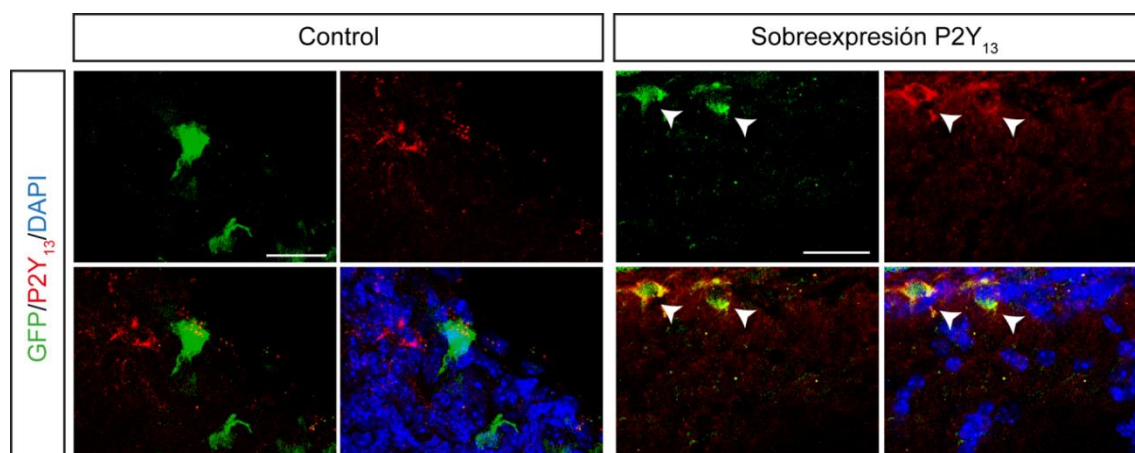


Figura 80. Los lentivirus control y de sobreexpresión transducen las células de la SEZ adulta y median la expresión de la proteína GFP o GFP/P2Y₁₃. Imágenes de inmunohistofluorescencia de secciones sagitales de cerebros transducidos con el lentivirus control (panel izquierda) y el lentivirus de sobreexpresión del receptor P2Y₁₃ (panel derecha), donde se muestra GFP (verde) y P2Y₁₃ (rojo). Los núcleos se tiñen con DAPI (azul). Las puntas de flecha señalan la sobreexpresión del receptor P2Y₁₃ en las células infectadas con el virus de sobreexpresión. Escala: 30 μ m.

Tras demostrar la eficacia de los vectores diseñados, se analizó si la sobreexpresión del receptor inducía cambios en la distribución de las células transducidas, así como en los porcentajes de las distintas poblaciones del linaje neural presentes tanto en la SEZ como en la vía migratoria rostral (RMS) mediante estudios de inmunohistofluorescencia. Estos ensayos mostraron que la proporción de células GFP positivas por área fue mayor en la zona ventral de los cerebros inyectados con el virus control que en los cerebros inyectados con el virus de sobreexpresión (Figura 81).

Como se ha comentado previamente, la SEZ representa un nicho germinal de formación de nuevas neuronas que migran hacia el bulbo olfatorio a través de la vía migratoria rostral. Además, en los ensayos realizados *in vitro*, se había señalado que la activación del receptor P2Y₁₃ inducía la entrada a ciclo y diferenciación de las NSCs, generando clones complejos simétricos neurogénicos y disminuyendo el porcentaje de divisiones de autorrenovación dentro de los árboles de linaje. Teniendo en cuenta todo esto, la disminución en el número de célula GFP positivas en la región ventral podría estar indicando una mayor activación de las NSCs debido a la sobreexpresión del receptor P2Y₁₃. De modo que al ser activadas progresarían en el linaje, abandonando la zona ventral y dirigiéndose hacia la vía migratoria rostral. En este sentido, el análisis de las células GFP distribuidas tanto en la zona ventral como en el RMS reveló diferencias significativas tras 14 días post-inyección. En concreto, los estudios de inmunohistofluorescencia mostraron que, aunque tanto en los cerebros transducidos con el virus control como con el virus de sobreexpresión, había una mayor presencia de células infectadas en la vía migratoria rostral que en la región ventral (Figura 81A), estas diferencias eran significativamente mayores en los cerebros transducidos con los vectores de sobreexpresión en comparación con el virus control (6,57% y 2,1%, respectivamente) (Figura 81B-C). Estos resultados irían en la línea de un mayor número de

células madre entrando en el ciclo de diferenciación neuronal y abandonando por tanto la SEZ para dirigirse hacia el RMS.

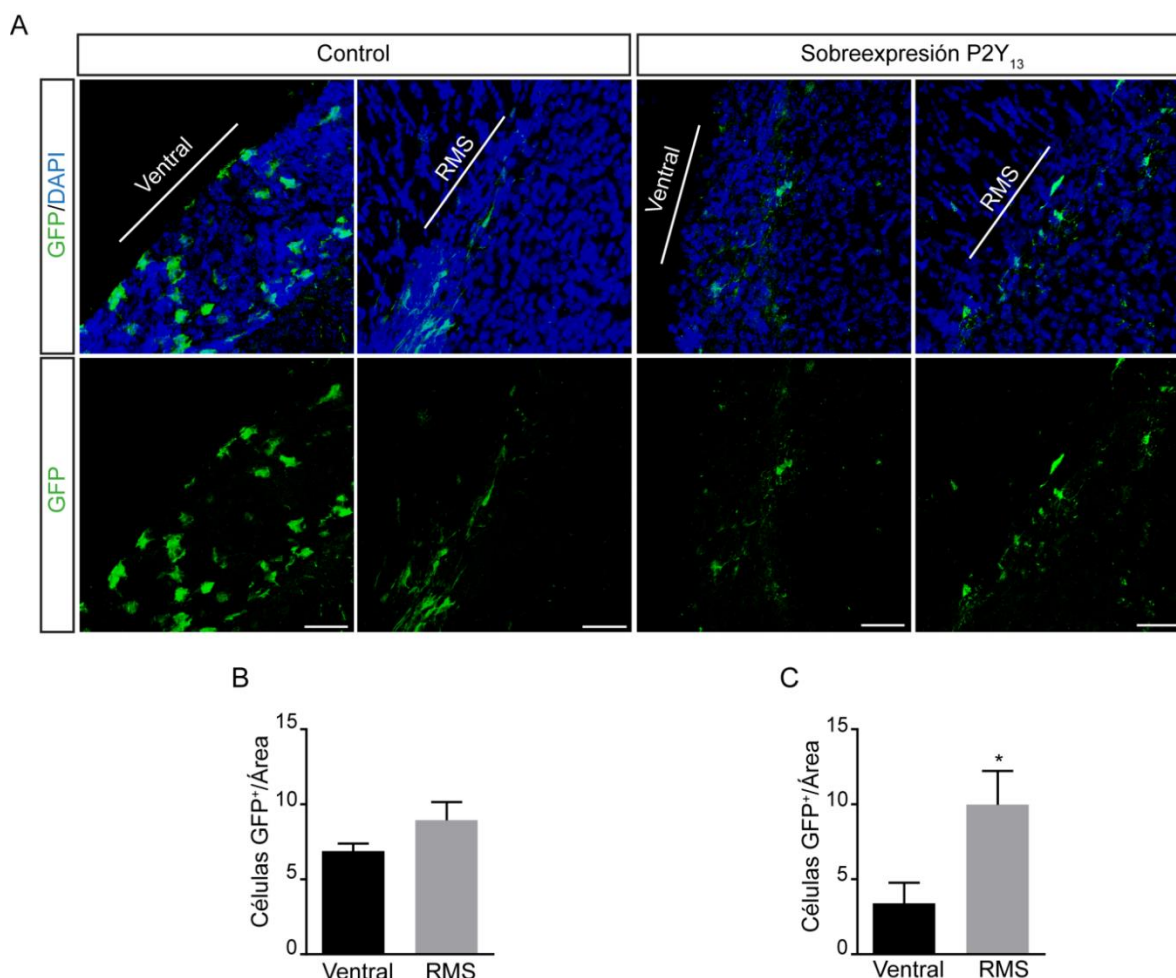
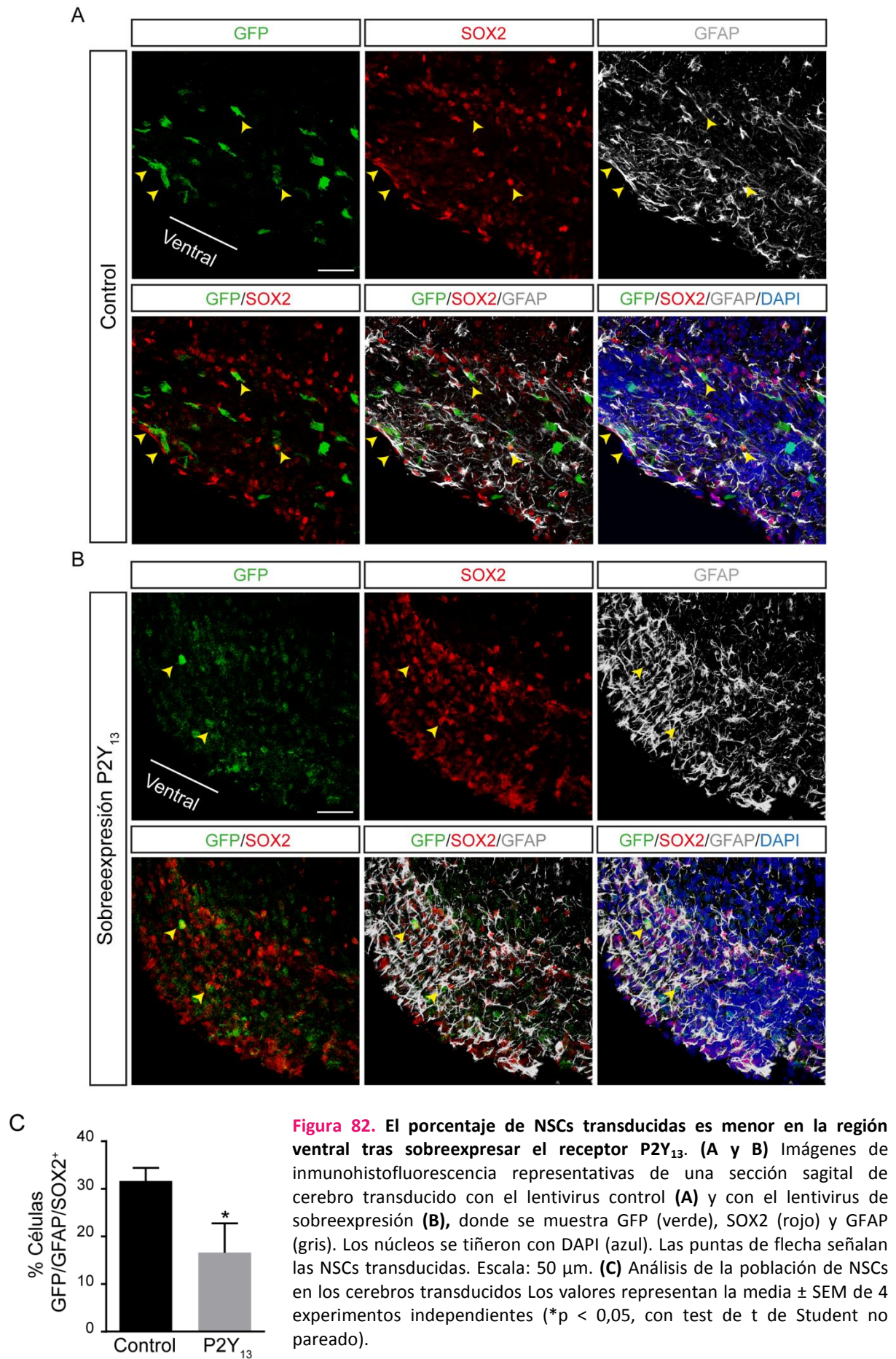


Figura 81. Análisis del porcentaje de células transducidas en la región ventral y en la vía migratoria rostral. (A) Imágenes de inmunohistofluorescencia de la región ventral y la vía migratoria rostral (RMS) de los cerebros transducidos con el vector control (panel izquierdo) y con el de sobreexpresión (panel derecho), donde se muestra GFP (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 50 μ M. (B-C) Diagrama de la cuantificación de las células infectadas GFP⁺ por área en cada región de cerebros transducidos con el vector control (B) y con el de sobreexpresión del receptor P2Y₁₃ (C).

Para probar de una forma más robusta esta hipótesis centrada en la activación de las NSCs, su diferenciación y menor autorrenovación y la salida de las poblaciones neuronales generadas hacia el RMS, se analizó si la sobreexpresión del receptor P2Y₁₃ afectaba a la población de NSCs en la zona ventral. Para ello se cuantificó el porcentaje de NSCs transducidas que permanecían en la región ventral de los cerebros inyectados en ambas condiciones a los 14 post-inyección. Así, los ensayos de inmunohistofluorescencia empleando la triple tinción con GFP, GFAP y SOX2 revelaron que el porcentaje de NSCs transducidas era significativamente menor en la región ventral de los cerebros inyectados con el lentivirus de sobreexpresión ($16,59\% \pm 6,150\%$) que en los cerebros inyectados con el virus control ($31,62\% \pm 2,817\%$) (Figura 82C).



Por consiguiente, estos resultados apoyarían nuestra hipótesis. La sobreexpresión del receptor $P2Y_{13}$ estaría provocando la activación y diferenciación de las NSCs residentes. Además, el menor número de células GFAP/GFP/SOX2⁺ detectadas en la SEZ tras 14 días iría en consonancia con una menor tasa de divisiones de autorrenovación de las NSCs.

8. Discusión

8.1 La señalización purinérgica como modulador de la neurogénesis posnatal cerebelosa

El cerebelo es, posiblemente, una de las áreas más ampliamente estudiadas dentro del sistema nervioso central. Sin embargo, como hemos citado anteriormente, a pesar del gran número de estudios dedicados a esclarecer las claves de su desarrollo posnatal, existen aún numerosos interrogantes sobre el comportamiento y modulación de la actividad de los progenitores neurales que pueblan este órgano durante los primeros días de vida del individuo. Entre estos interrogantes, uno de los que aún planteaban un mayor desafío al inicio de esta tesis, era saber si existe una genuina población de NSCs, en el sentido estricto, en el cerebelo posnatal, ya que numerosas hipótesis se decantaban más por la presencia de progenitores comprometidos con la generación de una población o linaje neural específico. No obstante, la potencial identificación, a nivel de célula única, de la presencia de esta población de NSCs en el cerebelo en desarrollo, conducía inexorablemente a la aparición de nuevas e interesantes incógnitas, destacándose entre ellas: i) ¿Están estas NSCs distribuidas por igual a lo largo de los tres nichos proliferativos, la capa granular externa, la capa celular de las Purkinje y la futura materia blanca, presentes en el cerebelo posnatal. ii) ¿Cuál es el comportamiento de estas NSCs cerebelares a la hora de dar lugar a su correspondiente progenie?, iii) ¿son también capaces de generar procesos de autorrenovación? y, en caso afirmativo, iv) ¿lo hacen a través de divisiones simétricas o asimétricas? Otra importante cuestión se referiría a la potencialidad de las NSC posnatales cerebelares. Es decir, v) ¿es una NSCs cerebelar capaz de dar lugar a los tres linajes neurales (astrocitos, oligodendrocitos y neuronas) y por lo tanto son multipotentes? O ¿Son por el contrario bipotentes o unipotentes? Por último, pero no por ello menos importante, está la importante cuestión que incide en el hecho de vi) ¿hasta qué punto las células madre neurales localizadas en el cerebelo posnatal son dependientes de las señales de su nicho neurogénico a la hora de generar sus correspondientes linajes neurales? Por lo tanto, era esencial diseñar un sistema de cultivo que permitiera analizar el comportamiento celular de los progenitores neurales, a nivel de célula única, y en ausencia de factores tróficos. Igualmente, era crucial que dicho método permitiera identificar el modo de división, así como la progenie generada.

Por tanto, nuestro primer objetivo se centró en establecer un método de cultivo de los progenitores neurales cerebelosos presentes durante el desarrollo posnatal, en aislamiento de las señales existentes en su correspondiente nicho neurogénico. Para ello adaptamos y combinamos las condiciones utilizadas para el cultivo de los progenitores de la zona subependimaria adulta murina (Costa et al., 2011, Ortega et al., 2011a) con aquellas utilizadas en los cultivos enriquecidos en neuronas granulares de cerebelo (Hervas et al., 2003). Además, según nuestro conocimiento, esta preparación celular, es la única viable hasta la fecha que permite la monitorización, de forma simultánea, de las poblaciones celulares presentes en los tres nichos neurogénicos del cerebelo posnatal (PCL, EGL y PWM) así como el seguimiento de los linajes celulares generados (Figura 83). Se ha podido monitorizar los árboles de linaje que dan lugar a las neuronas glutamatérgicas, principal

población generada en la EGL (Hallonet et al., 1990, Alvarez Otero et al., 1993), así como las interneuronas GABAérgicas, astrocitos parenquimales y oligodendrocitos generados en la PWM (Leto et al., 2012, Parmigiani et al., 2015). Asimismo, se pudo seguir y caracterizar la generación de precursores astrogliales, una población asociada a la PCL (Buffo and Rossi 2013, Sudarov et al 2011). Uno de los hechos más destacados que se observaron durante la monitorización de estos cultivos es que los progenitores neurales aislados mantuvieron su potencial neurogénico, como se desprende de la producción predominante de árboles simétricos neurogénicos (β III-tubulina positivos). Por lo tanto, se comportaron de un modo semejante a su comportamiento *in vivo*, siendo las neuronas la principal población neural generada en el cerebelo posnatal (Leto et al., 2016). Además, como comentaremos más adelante pudimos identificar las características distintivas de los árboles de linaje generados.

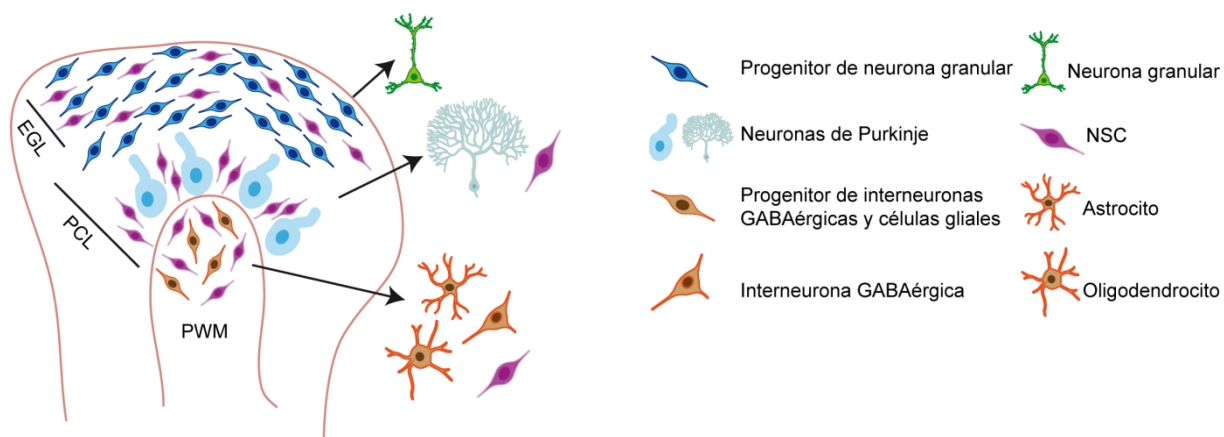


Figura 83. Esquema representativo de los tres nichos proliferativos del cerebelo posnatal analizados mediante el cultivo de progenitores neuronales aislados a P0 y P5.

Siguiendo con el comportamiento observado en aislamiento de las señales del nicho, los progenitores en cultivo fueron capaces de generar neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas. Aún más relevante fue el hecho de que lo hicieron en proporciones similares a las reportadas *in vivo* (Lackey et al., 2018, White and Sillitoe, 2013), con un 90% de las neuronas generadas pertenecientes al linaje glutamatérgico. Las neuronas pertenecientes a ambos linajes fueron identificadas no sólo por la expresión de transportadores vesiculares específicos (VGLUT1 y VGAT) sino también por diferencias morfológicas y por características funcionales. En este sentido, experimentos de electrofisiología por medio de la técnica de *patch-clamp* permitieron observar distintos patrones de respuesta a la estimulación exógena con glutamato o GABA. Así, las células con un soma redondeado u ovoide, neuritas bipolares y positivas para el marcaje de VGLUT1, tenían respuestas eléctricas más robustas a GABA que a glutamato, y además respondían a serotonina, de acuerdo con la caracterización de las neuronas glutamatérgicas descrita en el cerebelo posnatal temprano (Oostland et al., 2011). Por el contrario, las células con soma poligonal y múltiples neuritas, positivas para VGAT, exhibieron respuestas más robustas a glutamato que a GABA, y no respondieron en absoluto a serotonina. Además, pudimos comprobar el establecimiento de sinapsis funcionales entre ambos tipos de neuronas en cultivo.

Estos hechos indican que los progenitores neurales cerebelares tempranos podrían desarrollar una parte considerable de su progresión de linaje de forma autónoma, en ausencia de las señales presentes en su correspondiente nicho, de manera análoga a lo descrito previamente en otros nichos neurogénicos como la corteza en desarrollo (Shen et al., 2006, Temple, 1989) o la SEZ adulta (Costa et al., 2011, Ortega et al., 2011a). No obstante, esto no significa que la señalización local no sea importante en la modulación de aspectos cruciales como el tiempo y modo en el que las distintas poblaciones se generan.

Son muchos los estudios que, hasta la fecha, se han centrado en desentrañar como las NSCs realizan la progresión del linaje en el cerebelo posnatal. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han sido enfocados en un único nicho proliferativo (EGL. PCL. PWM) y en presencia de señales extrínsecas como Shh, BMP o FGF (Leto et al., 2016, Parmigiani et al., 2015, Okano-Uchida et al., 2004, Nakashima et al., 2015, Yang et al., 2015) las cuales de por sí afectan al comportamiento de los progenitores neurales. Además, la mayoría de estos estudios no han sido llevados a cabo en aislamiento de las condiciones del nicho o bien se han desarrollado bajo las condiciones de cultivo clásico de neuroesferas, las cuales pueden alterar el destino celular de las NSCs (Lee et al., 2005, Klein et al., 2005, Alcock et al., 2007, Alcock and Sottile, 2009, Silbereis et al., 2010, Pastrana et al., 2011, Doetsch et al., 2002). Creemos que nuestros datos, en contraposición con estos estudios previos, pueden contribuir a dar una imagen global del programa celular intrínseco que conduce a la generación de los distintos tipos celulares. De hecho, hemos podido observar que las neuronas glutamatérgicas se generan, predominantemente, a través de divisiones simétricas, con un máximo de 5 rondas de división. Este comportamiento es consistente con lo observado en estudios previos en los que, a pesar de la presencia en el medio de Shh, sólo se pudo observar un máximo de una o dos rondas de división previa a la diferenciación, probablemente por haber sido llevados a cabo en etapas posteriores del desarrollo cerebelar (Nakashima et al., 2015). Esta disminución de la capacidad proliferativa según avanza el desarrollo, estaría también de acuerdo con lo que hemos observado en la progresión del linaje de los progenitores aislados a día P5. Con respecto al linaje GABAérgico, también hemos podido describir la dinámica de los progenitores de las interneuronas. En este sentido, los progenitores neurales aislados del nicho son capaces de generar interneuronas GABAérgicas a través de divisiones simétricas de entre dos y tres rondas máximas de división. Además, se ha mostrado la producción de astrocitos parenquimales GFAP⁺ y células con una morfología que recuerda a los oligodendrocitos. Ambas poblaciones celulares se generaron a través de divisiones simétricas de una o dos rondas de división. La generación de interneuronas GABAérgicas, astrocitos parenquimales y oligodendrocitos concuerda con las poblaciones generadas en la PWM en el cerebelo posnatal (Leto et al., 2012).

Entre todas las poblaciones detectadas en el cultivo, la que presenta un mayor potencial e interés en el desarrollo posnatal del cerebelo es la población de NSCs GFAP/SOX2⁺. Nosotros hemos observado que esta población de NSCs es capaz de generar árboles de linaje

asimétricos, con una “rama” del árbol que da lugar a neuronas y la otra que genera nuevas células GFAP/SOX2⁺, lo que sería un proceso de autorrenovación. Esta población de NSCs se distribuye en los tres nichos neurogénicos del cerebelo a día posnatal 0, mostrando una mayor intensidad en la PCL, y aunque en una menor proporción, su presencia se mantiene hasta el estadio adulto. Esta población se correlaciona probablemente con la potencial población de NSCs descrita previamente (Alcock and Sottile, 2009, Alcock et al., 2007) y podrían explicar la presencia de progenitores astrogliales generadores de neuronas granulares de cerebelo así como la presencia de GPCs que darían lugar a células astrogliales, respectivamente (Silbereis et al., 2010, Okano-Uchida et al., 2004). De hecho, en nuestras preparaciones celulares se ha monitorizado la generación de neuronas glutamatérgicas y células GFAP positivas mediante divisiones asimétricas. Además, muy probablemente esta población de células GFAP/SOX2 representa las NSCs aisladas como neuroesferas en extractos de cerebelo completo (Lee et al., 2005, Klein et al., 2005). Es importante destacar que, aunque la expresión de los marcadores GFAP/SOX2 está asociada también a la glia de Bergmann (Mercurio et al., 2019), la capacidad de generar estos árboles asimétricos conteniendo tanto neuronas como células GFAP/SOX2, confirma la naturaleza de NSCs de esta población celular.

Por otro lado, esta capacidad de experimentar divisiones asimétricas, así como la presencia de esta población de NSCs en la PWM podría correlacionar con los progenitores bipotentes descritos en esta área (Fleming et al., 2013, Parmigiani et al., 2015). No obstante, en nuestras preparaciones celulares no se han observado divisiones asimétricas capaces de generar células GFAP⁺ y neuronas GABAérgicas. La ausencia de este tipo de divisiones asimétricas podría explicarse por el escaso número de células GFAP/SOX2⁺ presentes en la PWM, hecho que es consistente con la naturaleza de nuestras preparaciones, en las que aislamos la totalidad del cerebelo posnatal, lo que podría resultar en una dilución de las poblaciones minoritarias. Asimismo, la ausencia de señales extrínsecas necesarias podría también ser las responsable de no observar este tipo de divisiones asimétricas. De hecho, los experimentos que sugieren la bipotencialidad de los progenitores se realizaron con el nicho intacto o en presencia de los mitógenos EGF y FGF (Parmigiani et al., 2015).

Una importante incógnita que queda por aclarar es si esta población de NSCs incluye diferentes subtipos de progenitores con distintas capacidades intrínsecas de diferenciación, o si bien es una única población cuyo destino celular están regulado por las influencias del nicho donde están localizadas. Varias evidencias apoyan el hecho de catalogar a esta población celular (GFAP/SOX2) como una población de NSCs genuina presente en el cerebelo posnatal. Primero, de acuerdo con lo descrito en la neurogénesis embrionaria y en los nichos neurogénicos adultos, estas células presentan una morfología radial y expresan tanto el marcador astrogliar GFAP como los marcadores de célula madre SOX2 y nestina (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009, Suh et al., 2009). Segundo, son capaces de producir divisiones asimétricas para generar neuroblastos y nuevas copias de células GFAP/SOX2 y por tanto de autorrenovarse, característica propia de las NSCs (Bonaguidi et al., 2011, Temple, 1989,

Costa et al., 2011, Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Tercero, mientras realizan estas divisiones asimétricas, presentan diferencias de tamaño a lo largo de la progresión del linaje. En este sentido las NSCs exhiben un aumento en su tamaño previo a su división, tamaño que permanece significativamente mayor en la rama que promueve la autorrenovación. Por el contrario, en la rama neurogénica se produce una disminución progresiva del tamaño celular hasta la generación de los neuroblastos, las células que exhiben el menor tamaño. Dicha característica es uno de los sellos de identidad de las NSCs en la SEZ adulta, así como en la generación de neuroblastos en *Drosophila* (Neumuller et al., 2008, Costa et al., 2011, Ortega and Costa, 2016, Ortega et al., 2013a). Cuarto y, por último, los progenitores neurales cerebelosos presentan una velocidad de división relativamente rápida que concuerda con lo observado en los nichos embrionarios, pero difiere de lo apreciado en las regiones neurogénicas adultas (Costa et al., 2011, Doetsch et al., 2002, Pastrana et al., 2009, Suh et al., 2007). La diferencia en torno a la velocidad de división sugiere un ritmo distinto en la generación de neuronas entre el estadio embrionario y adulto. Así, mientras que, en la etapa embrionaria, las NSCs contribuirían a la formación de una nueva región en un periodo relativamente corto de tiempo, como ocurre en el cerebelo posnatal, en la etapa adulta las NSCs generan nuevas neuronas en un flujo constante para mantener las áreas pre-establecidas.

Curiosamente la población de NSCs GFAP/SOX2⁺ fue considerablemente inferior en las preparaciones de progenitores neurales aislados a día posnatal 5, manteniéndose incluso estable a lo largo del experimento de videomicroscopía de time-lapse. Este hecho, junto con la ausencia de divisiones asimétricas y por lo tanto de autorrenovación de las NSCs, insinúa la adquisición de un carácter quiescente. De hecho, esta población se mantiene durante toda la vida del murino, induciendo la neurogénesis en la corteza cerebelosa adulta (Ahlfeld et al., 2017). Por consiguiente, estas evidencias apuntarían a que, al menos una fracción de NSCs del cerebelo posnatal pasaría a un estado quiescente, reanudando su ciclo celular en el estadio adulto según los requerimientos del entorno. Este hecho coincidiría con lo observado en la zona subventricular embrionaria (Furutachi et al., 2015, Fuentealba et al., 2015). Además de la población de NSCs, en nuestras preparaciones celulares también se aisló una población de células SOX2⁺, que podría ser consistente con la presencia de progenitores intermedios (SOX2⁺), situación análoga a la descrita en el telencéfalo en desarrollo (Hutton and Pevny, 2011). Pese a todo, no hemos conseguido establecer un vínculo secuencial directo entre estas dos poblaciones en nuestros experimentos, por lo que este es un punto aún queda por aclarar.

En conjunto, consideramos que la preparación celular desarrollada en este trabajo constituye, precisamente por su aislamiento del nicho, una herramienta útil para monitorizar cómo afectan al comportamiento de las NSCs, de manera individual, las diversas señales extrínsecas presentes en los nichos neurogénicos del cerebelo posnatal. Para probar este precepto, elegimos estudiar primero el papel de un componente esencial de la neurotransmisión purinérgica, el transportador VNUT, principal responsable del tono

purinérgico en el espacio extracelular (Miras-Portugal et al., 2019a, Sawada et al., 2008). Hemos podido comprobar que VNUT alcanza su máxima expresión en los primeros días posnatales, distribuyéndose en el cerebelo en desarrollo antes que otros transportados de neurotransmisores (VGLUT1) y co-localizando, además, con la población de NSCs. La expresión de VNUT demostró ser específica, al encontrarse asociada a la maquinaria celular relacionada principalmente a sus funciones conocidas, la maquinaria vesicular exocitótica y la función lisosomal (Menendez-Mendez et al., 2017, Shin et al., 2012). Estos hechos ponen de manifiesto el potencial papel relevante del sistema purinérgico en los primeros estadios del desarrollo del cerebelo. En el presente trabajo, se ha demostrado como la modulación de VNUT repercute en el comportamiento de las NSCs alterando la progresión del linaje. Concretamente, hemos observado que la inhibición de VNUT resulta en un descenso del número de células GFAP/SOX2⁺ acompañado del aumento del número de árboles del linaje simétricos y suprimiendo la autorrenovación. Además, la inhibición de VNUT vino acompañada de un incremento en la expresión de genes involucrados en la diferenciación de los linajes glutamatérgicos y GABAérgicos (Leto et al., 2016). Este efecto sugiere que la modulación de la señalización purinérgica tiene un impacto sobre el balance entre quiescencia y salida del ciclo celular, así como de la capacidad de autorrenovación de las NSCs (Figura 84).

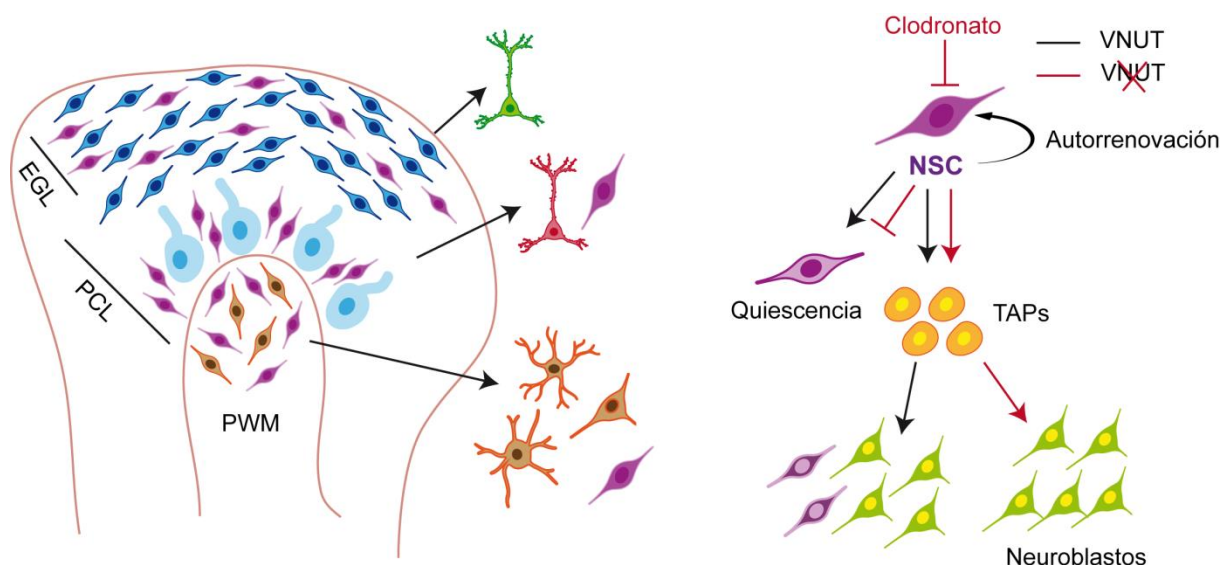


Figura 84. Implicación del transportador VNUT en la neurogénesis del cerebelo posnatal. Esquema representativo que muestra como la inhibición de VNUT induce la activación de las NSCs, generando el aumento de árboles simétricos neurogénicos y suprimiendo la autorrenovación de las mismas.

El mecanismo preciso por el cual VNUT modula el comportamiento de las NSCs queda aún por determinar. Una potencial explicación puede derivar precisamente de la presencia específica de VNUT tanto en las vesículas exocitóticas como en los lisosomas en el cerebelo posnatal (P0). En trabajos anteriores de nuestro grupo habíamos observado como VNUT participa activamente en el almacenamiento y liberación de ATP en las neuronas granulares de cerebelo (Menendez-Mendez et al., 2017). Además, pudimos comprobar como parece tener un papel esencial en la diferenciación neuronal y neuritogénesis (Menendez-Mendez

et al., 2015). Esto correlacionaría con el importante papel de los neurotransmisores en general, y de la neurotransmisión purinérgica en particular, en la modulación de la progresión del linaje y la quiescencia por parte de las NSCs. Como es el caso de las ondas espontáneas de calcio propagadas por el receptor P2Y₁ en respuesta a la liberación tónica de ATP que regulan la proliferación y el mantenimiento de la glía radia en la zona ventricular de la corteza en desarrollo (Weissman et al., 2004). Asimismo, la liberación tónica del neurotransmisor GABA en la SGZ adulta mantiene a las NSCs en estado quiescente, y la inhibición de la señal por la delección de los receptores de GABA causa la rápida salida de ese estado de quiescencia (Song et al., 2012). Otro posible mecanismo de actuación vendría asociado a la regulación de la función lisosomal, cuyo papel en la modulación del balance entre activación y quiescencia de las NSCs durante el envejecimiento ha sido también descrita previamente (Leeman et al., 2018). Por tanto, VNUT podría estar actuando vía regulación de la neurotransmisión purinérgica, vía regulación de la actividad lisosomal, o bien a través de una regulación conjunta de ambos mecanismos. Futuros experimentos ayudaran a clarificar esta importante cuestión.

Como conclusión de este primer bloque de discusión, podemos resaltar que la preparación de progenitores neurales puesta a punto en este trabajo permite el seguimiento de las NSCs aisladas del cerebelo posnatal y es un modelo que permite estudiar los mecanismos moleculares y celulares que gobiernan la generación de las distintas poblaciones celulares cerebelosas. En este sentido, hemos podido corroborar esta afirmación con una primera aproximación del papel de VNUT en la modulación de las etapas tempranas del cerebelo posnatal.

8.2 La señalización purinérgica como modulador de la neurogénesis de la SEZ adulta

En el segundo bloque de esta tesis doctoral nos enfocamos en el estudio de uno de los dos nichos neurogénicos principales que se mantienen activos a lo largo de toda la vida en el cerebro de los mamíferos, la SEZ (Gage, Alvarez-Buylla and Lim, Nottebohm, Ming and Song, Obernier and Alvarez-Buylla). El estudio del comportamiento de las NSCs en esta área ya había sido ampliamente descrito, a nivel de célula única, tanto en estudios *in vitro* (Costa et al., 2011, Ortega et al., Ortega et al., Ortega et al., Paniagua-Herranz et al., Gomez-Villafuertes et al.) como *in vivo* (Calzolari et al., Ponti et al.). Por lo tanto, nos centramos en el estudio del papel de la neurotransmisión purinérgica sobre la progresión en el linaje de las NSCs.

Nuestros resultados han mostrado, por medio del análisis de los niveles de ARN mensajero en la SEZ de cerebro de ratón adulto, la presencia de todos los receptores P2Y, coincidiendo con lo observado en neuroesferas aisladas de la zona subependimaria de ratón (Grimm et al., Mishra et al.). Uno de los resultados más interesantes ha sido la detección del receptor P2Y₁₃ a nivel de ARNm y de proteínas. Los niveles de expresión fueron significativamente mayores en la región ventral, una zona con mayor presencia de progenitores neurogénicos,

que, en la dorsal, con mayor tendencia a la generación del linaje oligodendroglial (Colak et al., Ortega et al.), sugiriendo un mayor papel de este receptor en la neurogénesis, en contraposición con la oligodendrogénesis. Además, la expresión del receptor está ligada a células de naturaleza astrogial, tanto astrocitos parenquimales (GFAP) como células GFAP y SOX2, una combinación de marcaje asociada a las NSCs (Kriegstein and Alvarez-Buylla, Obernier and Alvarez-Buylla). Estos resultados son particularmente relevantes a la hora de establecer la distribución de los receptores P2Y en general, y del P2Y₁₃ en particular, a lo largo de las diferentes etapas (NSCs-TAPs-Neuroblasto) del linaje neurogénico. Esta información era mucho más difusa hasta la fecha debido a que la amplia mayoría de los estudios enfocados al estudio de los receptores P2Y en la SEZ se han realizado a nivel poblacional en un entorno intacto *in vivo* o, utilizando el cultivo clásico de neuroesferas (Grimm et al., Mishra et al., Ali et al.), sin prestar atención a su distribución y papel específicos en la progresión del linaje dependiente de las NSCs.

Además, los resultados obtenidos demuestran que el receptor P2Y₁₃ es plenamente funcional en las NSCs adultas, induciendo una movilización de calcio en respuesta a estimulaciones con el agonista 2MeSADP en las células GFAP/SOX2⁺, como se había visto previamente en poblaciones neurales, como las neuronas granulares o los astrocitos cerebelosos (Perez-Sen et al.). La movilización de calcio resultó completamente inhibida en presencia del antagonista específico MRS2211. La estimulación con el agonista 2MeSADP resultó también en una modulación de las corrientes de K⁺ en las NSCs, modulación que fue sensible también al antagonista. La presencia de este tipo de corrientes ya habían sido descritas en progenitores derivados de cultivos de neuroesferas de la zona subependimaria de ratón adulto, y atribuidas a canales Kv (voltaje dependiente) y Kir (rectificadores internos) (Yasuda et al.). En cuanto a su modulación, ya había sido descrito su modulación por las proteínas G (Gi/Go) activadas por receptores P2Y metabotrópicos (Shrestha et al.) sobre todo el P2Y₁, P2Y₄ y el P2Y₆ (Coppi et al., Filippov et al.). La presencia y funcionalidad del receptor P2Y₁₃ en las NSCs adultas y, sobre todo en la de la zona ventral, sugiere como se ha indicado previamente, un papel en la regulación del proceso de neurogénesis. De hecho, el receptor P2Y₁₃ ha sido propuesto como modulador de la neurogénesis en la zona subgranular del hipocampo (Stefani et al.). Además, la señalización celular dependiente de calcio intracelular está implicada en la proliferación y diferenciación de las NSCs (Kawano et al., Heo and Han). Recientemente se ha observado que la dinámica intracelular de los niveles de calcio es un factor clave en la transición entre NSCs adultas activadas y quiescentes (Gengatharan et al.). Asimismo, estudios previos de nuestro grupo de investigación habían puesto de relevancia la conexión existente entre el receptor P2Y₁₃ y el linaje neurogénico, describiendo su implicación en la diferenciación y maduración de las neuronas hipocampales, actuando de manera coordinada con el receptor P2Y₁ y con el receptor ionotrópico P2X7 (del Puerto et al., Gomez-Villafuertes et al.). Además, los receptores P2Y₁₃ y P2X7 también ejercen un papel neuroprotector en neuronas granulares y astrocitos de cerebelo de rata frente a estímulos pro-apoptóticos (Ortega et al.).

Dentro de la población de NSCs, se han identificado tres subpoblaciones (quiescentes, *primed* y activadas) caracterizadas por la expresión de distintos marcadores moleculares y por mostrar un comportamiento diferente (Llorens-Bobadilla et al., Dulken et al., Xie et al., Codega et al., Daynac et al., Mich et al., Belenguer et al., Belenguer et al.). No obstante, no existen marcadores específicos de cada subpoblación, ya que son comúnmente caracterizadas por la combinación de varios. Nuestros resultados, nos permiten proponer al receptor P2Y₁₃ como un posible marcador molecular de las NSCs *primed*, población celular en la que parece expresarse de forma predominante. Esta distribución del receptor P2Y₁₃ en las NSCs *primed*, así como su funcionalidad en las mismas es otra de las evidencias que apoyan su papel en la modulación de la progresión del linaje neurogénico. Si bien la activación del receptor P2Y₁₃ no promueve un aumento de los neuroblastos generados a tiempo final. Esto podría ser consecuencia del bajo porcentaje de NSCs aisladas en la preparación de los cultivos (Ortega et al.). Sin embargo, al analizar el papel del receptor P2Y₁₃ a nivel de célula única mediante los estudios de videomicroscopía de time-lapse se ha observado un aumento de los clones complejos de 4 y 5 rondas de división, los cuales son típicamente generados por las NSCs (Costa et al., Ortega et al., Ponti et al.). El aumento del número de clones complejos no se produce en detrimento de los clones de 1, 2 y 3 rondas, lo cual, junto con la ausencia de variaciones de los neuroblastos generados a tiempo final, dan cuenta de que la señalización activada por el receptor P2Y₁₃ no potencia la proliferación celular. Ahora bien, el aumento en la generación de clones complejos de 4 y 5 rondas de división junto con que las NSCs son las únicas células en el cultivo que responde al 2MeSADP, señalan al receptor P2Y₁₃ como un activador de esta población. Esta hipótesis es corroborada al comprobar la reversión de los efectos del 2MeSADP sobre los clones complejos, en las preparaciones tratadas con el antagonista MRS2211. Estos resultados revelan la importancia de la señalización mediada por nucleótidos, especialmente ADP en la modulación de la neurogénesis adulta, como se había descrito en la neurogénesis embrionaria (Weissman et al., Weissman et al.). Otros estudios previos llevados a cabo en adulto, sin embargo, apuntaban que el efecto mediado por el ADP en la SEZ estaba mediado por los receptores P2Y₁ y P2Y₂ potenciando la proliferación de los progenitores neurales, ya que la inhibición del receptor P2Y₁ atenuaba dicha proliferación (Grimm et al., Mishra et al.). Es importante subrayar en este punto que, en estos estudios, no se consideró la posible participación del receptor P2Y₁₃ en la SEZ. En estos estudios se utilizaron agonistas y antagonistas no selectivos para los diferentes subtipos, pudiendo estar activando varios receptores simultáneamente (en especial al P2Y₁ y P2Y₁₃). Además, se han llevado a cabo a nivel de poblaciones en un nicho intacto lo que dificulta la interpretación de los resultados a nivel de los diferentes estadios del linaje neurogénico. De hecho, uno de los problemas que radica en este tipo de procedimientos es que las conclusiones obtenidas se basan en lo observado a tiempo final, perdiéndose todos los eventos que pueden estar ocurriendo durante la progresión en el linaje (Schroeder, Ortega and Costa). Así, la activación de las NSCs *primed* y su entrada en ciclo, puede muy bien confundirse, si se observa la citoarquitectura de la SEZ en su conjunto, como un incremento pasajero en la capacidad

proliferativa. Por otra parte, la mayoría de los estudios refuerzan los resultados observados *in vivo* con estudios *in vitro* realizados con cultivos de neuroesferas (Reynolds and Rietze). Estos estudios plantean dos problemas principales. El primero es que no está asegurada la clonalidad, y las NSCs quiescentes no son detectadas. El segundo problema es que este tipo de cultivo se realiza en presencia de altas concentraciones de mitógenos, lo que altera enormemente el comportamiento de las NSCs, potenciando la gliogénesis en detrimento de la neurogénesis (Doetsch et al., Costa et al.). Por último, no podemos olvidar la posibilidad de que, en un entorno de nicho neurogénico intacto, existan señalizaciones de varios receptores P2Y, modulándose entre sí, que ayuden a dar forma a la respuesta general mediada por los nucleótidos, sobre el proceso de la neurogénesis adulta, como hemos observado previamente en otras áreas cerebrales como el cerebelo (Ortega et al 2010 2011). De hecho, tenemos datos preliminares no incluidos en este trabajo que indican la participación de otros receptores P2Y en otros pasos de la progresión del linaje neural, lo que reforzaría esta hipótesis.

Inequívocamente, nuestros datos ponen de relevancia la existencia de un papel modulador de la neurotransmisión mediada por nucleótidos en la progresión de linaje de las NSCs, coincidiendo con lo observado en otros neurotransmisores como el glutamato (Berg et al., 2013 & Simon 2013), el GABA (Giachino et al., Song et al., Yeh et al.) la dopamina (Baker et al., 2004, Hoglinger et al., L'Episcopo et al., Winner et al.) o la serotonina (Tong et al.). Interesantemente, los nucleótidos extracelulares, preferentemente el ADP, a través del receptor P2Y₁₃ ejerce una acción contraria a la observada para el neurotransmisor GABA en la SGZ. Mientras que la activación de P2Y₁₃ promueve la activación de las NSCs, la liberación de GABA potencia la quiescencia (Giachino et al., Song et al., Yeh et al.).

No obstante, el receptor P2Y₁₃ no sólo modula el balance entre quiescencia y activación, sino que afecta también a la capacidad de autorrenovación de las NSCs, al reducirse el porcentaje de clones asimétricos en presencia del agonista 2MeSADP. De modo que la activación del receptor P2Y₁₃ en las NSCs *primed* acelera su activación y diferenciación hacia clones simétricos neurogénicos, disminuyendo los procesos de autorrenovación. Debido a lo cual, observamos una mayor velocidad de ciclo celular en los clones complejos, así como una disminución en las células GFAP/SOX2⁺ en presencia del agonista 2MeSADP a día 1 de cultivo *in vitro*. Nos ha llamado la atención los resultados obtenidos en presencia del antagonista MRS2211, paradójicamente son similares a los obtenidos únicamente con el agonista 2MeSADP en cuanto a los clones asimétricos generados. Incluso, presenta un menor porcentaje de células GFAP/SOX2 a día 1 de cultivo *in vitro*. Estos resultados parecen deberse, sin embargo, a la prevención de la activación de las NSCs. De manera que, en presencia del antagonista MRS2211, no se produce la activación de las NSCs, lo cual imposibilita la generación de las “fast-dividing astroglia” desencadenando un menor porcentaje de NSCs a día 1 de cultivo *in vitro*, así como, la generación de clones asimétricos. No obstante, existe un escaso número de células que escaparían al efecto farmacológico del antagonista, probablemente por corresponder con el porcentaje más tardío de las NSCs

activadas (Costa et al., Belenguer et al., Belenguer et al.), que presentan menor expresión del receptor $P2Y_{13}$. Nosotros proponemos que estas células serían las que generan ese porcentaje de asimetría observado en presencia del antagonista. De hecho, los clones asimétricos corresponden a clones de menores rondas de activación lo que estaría asociado a las NSCs activadas/fast dividing astroglia. Estos datos ponen de relevancia el hecho de que, en ausencia de la resolución temporal y capacidad de análisis de los diferentes estadios del linaje neural que nos proporciona la técnica de la videomicroscopía de time-lapse a nivel de célula única, se enmascararían los resultados llevando a interpretaciones incorrectas (Schroeder).

Por último, hemos analizado el papel de receptor $P2Y_{13}$ *in vivo*, sobreexpresando el receptor en la región ventral de la SEZ mediante el uso de lentivirus. De manera que al igual que lo reportado *in vitro*, la sobreexpresión del receptor $P2Y_{13}$ provoca la activación y diferenciación de las NSCs localizadas en la región ventral.

En términos generales, los resultados presentados en el presente trabajo apuntan al receptor $P2Y_{13}$ como diana para regular el balance entre quiescencia/activación de las NSCs. De manera que su activación potencia la activación de las NSCs generando nuevas neuronas, mientras que su inhibición mantiene las NSCs en estado quiescente (Figura 85).

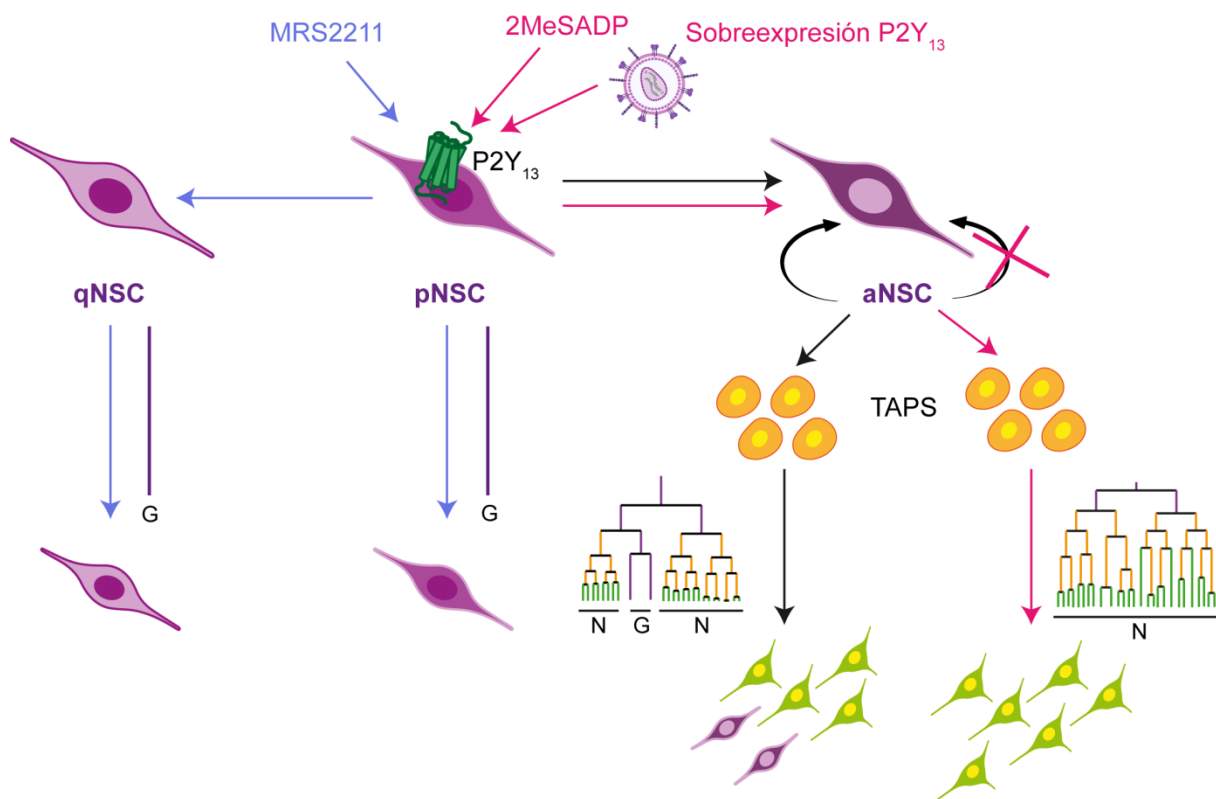


Figura 85. Efecto de la modulación del receptor $P2Y_{13}$ sobre la neurogénesis de la SEZ de ratón adulto. Esquema representativo que muestra como la estimulación del receptor $P2Y_{13}$ con 2MeSADP en los cultivos de progenitores neurales de la SEZ, así como la sobreexpresión del receptor $P2Y_{13}$ en la región ventral de la SEZ, potencia la activación de la NSCs y su progresión en el linaje hacia la formación de clones simétricos neuronales terminales. Mientras que el antagonismo del receptor con MRS2211 promueve la quiescencia en las NSCs.

La regulación del balance entre quiescencia/activación puede suponer una estrategia para paliar situaciones patológicas. Así, una quiescencia insuficiente puede potenciar la formación de tumores o la pérdida del *pool* de NSCs (Urban and Cheung). Contrariamente, una excesiva quiescencia puede inducir una pérdida de homeostasis en los tejidos, tras la reducción de la generación de nuevas células (Cheung and Rando). Esto es lo que ocurre en el envejecimiento, donde se ha observado que existe una amplia fracción de NSCs que se encuentran en estado quiescente debido a la expresión en el nicho de diversos factores de transcripción pro-inflamatorios que potencian la quiescencia (Baruch et al., Villeda et al., Kalamakis et al., Belenguer et al.). Asimismo, presentan una pérdida de capacidad de regeneración y una mayor resistencia a la activación, incluso tras una lesión. Esto difiere de lo observado en cerebros jóvenes donde en situaciones patológicas derivadas de una lesión o de una infección, se induce un aumento de la neurogénesis (Basak et al., Doetsch et al.). No obstante, aunque las NSCs de cerebros envejecidos no se activan tras una lesión, una vez activadas presentan las mismas características que las NSCs de cerebros jóvenes en cuanto a su capacidad proliferativa y de diferenciación celular (Kalamakis et al.). Por lo tanto, en situaciones de envejecimiento el receptor P2Y₁₃ se presenta como una herramienta muy prometedora para forzar la activación de las NSCs en situaciones de muerte neuronal, sin producir la pérdida de todo el *pool* de NSCs, ya que sólo actúa sobre las NSCs *primed*.

9. CONCLUSIONES

1. El método de cultivo desarrollado para el aislamiento de progenitores neurales del cerebelo posnatal, seguido de su monitorización por videomicroscopía de time-lapse, permite monitorizar el comportamiento de las NSCs en ausencia de señales procedentes del nicho.
2. Las NSCs aisladas de los estadios P0 y P5 mantienen su naturaleza neurogénica.
3. Este método de cultivo es también idóneo para analizar el efecto de señales extrínsecas sobre el proceso de la neurogénesis en las etapas posnatales del desarrollo cerebeloso.
4. La modulación de la actividad de VNUT en los primeros estadios posnatales, afecta a los árboles de linaje, regulando el balance quiescencia/activación de las NSCs.
5. Presencia de receptores P2Y₁₃ funcionales en la zona subependimaria adulta. Su expresión parece estar restringida a la población de NSCs en estado “*primed*” localizadas en la zona ventral. La estimulación del receptor P2Y₁₃ promueve la entrada en ciclo de las NSCs generando clones simétricos neurogénicos complejos en detrimento de las divisiones de autorrenovación.
6. La sobreexpresión del receptor P2Y₁₃ en la región ventral de la SEZ adulta activa las NSCs, disminuyendo el porcentaje de células GFAP/SOX2 en la zona ventral y aumentando el porcentaje de células transducidas en la vía migratoria rostral.

10. BIBLIOGRAFIA

1970. Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee. *Anat Rec*, 166, 257-61.
- ABBOTT, L. C. & NIGUSSIE, F. 2020. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat Histol Embryol*, 49, 3-16.
- ABBRACCHIO, M. P., BOEYNAEMS, J. M., BARNARD, E. A., BOYER, J. L., KENNEDY, C., MIRAS-PORTUGAL, M. T., KING, B. F., GACHET, C., JACOBSON, K. A., WEISMAN, G. A. & BURNSTOCK, G. 2003. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci*, 24, 52-5.
- ABBRACCHIO, M. P., BURNSTOCK, G., BOEYNAEMS, J. M., BARNARD, E. A., BOYER, J. L., KENNEDY, C., KNIGHT, G. E., FUMAGALLI, M., GACHET, C., JACOBSON, K. A. & WEISMAN, G. A. 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev*, 58, 281-341.
- ABLES, J. L., DECAROLIS, N. A., JOHNSON, M. A., RIVERA, P. D., GAO, Z., COOPER, D. C., RADTKE, F., HSIEH, J. & EISCH, A. J. 2010. Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *J Neurosci*, 30, 10484-92.
- AHLFELD, J., FILSER, S., SCHMIDT, F., WEFERS, A. K., MERK, D. J., GLASS, R., HERMS, J. & SCHULLER, U. 2017. Neurogenesis from Sox2 expressing cells in the adult cerebellar cortex. *Sci Rep*, 7, 6137.
- AKIBA, Y., SASAKI, H., HUERTA, P. T., ESTEVEZ, A. G., BAKER, H. & CAVE, J. W. 2009. gamma-Aminobutyric acid-mediated regulation of the activity-dependent olfactory bulb dopaminergic phenotype. *J Neurosci Res*, 87, 2211-21.
- AL-ONAIZI, M., AL-KHALIFAH, A., QASEM, D. & ELALI, A. 2020. Role of Microglia in Modulating Adult Neurogenesis in Health and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci*, 21.
- ALCOCK, J., SCOTTING, P. & SOTTILE, V. 2007. Bergmann glia as putative stem cells of the mature cerebellum. *Med Hypotheses*, 69, 341-5.
- ALCOCK, J. & SOTTILE, V. 2009. Dynamic distribution and stem cell characteristics of Sox1-expressing cells in the cerebellar cortex. *Cell Res*, 19, 1324-33.
- ALFONSO, J., LE MAGUERESSE, C., ZUCCOTTI, A., KHODOSEVICH, K. & MONYER, H. 2012. Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell Stem Cell*, 10, 76-87.
- ALI, A. A. H., ABDEL-HAFIZ, L., TUNDO-LAVALLE, F., HASSAN, S. A. & VON GALL, C. 2021. P2Y₂ deficiency impacts adult neurogenesis and related forebrain functions. *FASEB J*, 35, e21546.
- ALTMAN, J. & BAYER, S. A. 1978. Prenatal development of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J Comp Neurol*, 179, 23-48.
- ALTMAN, J. & BAYER, S. A. 1997. *Development of the Cerebellar System: In Relation to Its Evolution, Structure, and Functions*, CRC-Press.
- ALTMAN, J. & DAS, G. D. 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol*, 126, 337-89.
- ALTMAN, J. & MCCRADY, B. 1972. The influence of nutrition on neural and behavioral development. IV. Effects of infantile undernutrition on the growth of the cerebellum. *Dev Psychobiol*, 5, 111-22.
- ALVAREZ-BUYLLA, A. & LIM, D. A. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41, 683-6.
- ALVAREZ OTERO, R., SOTELO, C. & ALVARADO-MALLART, R. M. 1993. Chick/quail chimeras with partial cerebellar grafts: an analysis of the origin and migration of cerebellar cells. *J Comp Neurol*, 333, 597-615.

- ALLEN, G. & COURCHESNE, E. 2003. Differential effects of developmental cerebellar abnormality on cognitive and motor functions in the cerebellum: an fMRI study of autism. *Am J Psychiatry*, 160, 262-73.
- AMADIO, S., MONTILLI, C., MAGLIOZZI, R., BERNARDI, G., REYNOLDS, R. & VOLONTE, C. 2010. P2Y12 receptor protein in cortical gray matter lesions in multiple sclerosis. *Cereb Cortex*, 20, 1263-73.
- ANDERSEN, J., URBAN, N., ACHIMASTOU, A., ITO, A., SIMIC, M., ULLOM, K., MARTYNOGA, B., LEBEL, M., GORITZ, C., FRISEN, J., NAKAFUKU, M. & GUILLEMOT, F. 2014. A transcriptional mechanism integrating inputs from extracellular signals to activate hippocampal stem cells. *Neuron*, 83, 1085-97.
- ANDREU-AGULLO, C., MORANTE-REDOLAT, J. M., DELGADO, A. C. & FARINAS, I. 2009. Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci*, 12, 1514-23.
- ANTHONY, T. E., KLEIN, C., FISHELL, G. & HEINTZ, N. 2004. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*, 41, 881-90.
- ANTONIOLI, L., YEGUTKIN, G. G., PACHER, P., BLANDIZZI, C. & HASKO, G. 2016. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends Cancer*, 2, 95-109.
- ARAI, Y., PULVERS, J. N., HAFFNER, C., SCHILLING, B., NUSSLEIN, I., CALEGARI, F. & HUTTNER, W. B. 2011. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun*, 2, 154.
- ARAUJO, A. P. B., CARPI-SANTOS, R. & GOMES, F. C. A. 2019. The Role of Astrocytes in the Development of the Cerebellum. *Cerebellum*, 18, 1017-1035.
- ASCHRAFI, A., SADTLER, S., NICULESCU, C., RETTINGER, J. & SCHMALZING, G. 2004. Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J Mol Biol*, 342, 333-43.
- BAKER, S. A., BAKER, K. A. & HAGG, T. 2004. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci*, 20, 575-9.
- BAO, L., LOCOVEI, S. & DAHL, G. 2004. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett*, 572, 65-8.
- BARUCH, K., DECZKOWSKA, A., DAVID, E., CASTELLANO, J. M., MILLER, O., KERTSER, A., BERKUTZKI, T., BARNETT-ITZHAKI, Z., BEZALEL, D., WYSS-CORAY, T., AMIT, I. & SCHWARTZ, M. 2014. Aging. Aging-induced type I interferon response at the choroid plexus negatively affects brain function. *Science*, 346, 89-93.
- BASAK, O., GIACHINO, C., FIORINI, E., MACDONALD, H. R. & TAYLOR, V. 2012. Neurogenic subventricular zone stem/progenitor cells are Notch1-dependent in their active but not quiescent state. *J Neurosci*, 32, 5654-66.
- BASAK, O., KRIEGER, T. G., MURARO, M. J., WIEBRANDS, K., STANGE, D. E., FRIAS-ALDEGUER, J., RIVRON, N. C., VAN DE WETERING, M., VAN ES, J. H., VAN OUDENAARDEN, A., SIMONS, B. D. & CLEVERS, H. 2018. Troy+ brain stem cells cycle through quiescence and regulate their number by sensing niche occupancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E610-E619.
- BATTISTE, J., HELMS, A. W., KIM, E. J., SAVAGE, T. K., LAGACE, D. C., MANDYAM, C. D., EISCH, A. J., MIYOSHI, G. & JOHNSON, J. E. 2007. Ascl1 defines sequentially generated lineage-restricted neuronal and oligodendrocyte precursor cells in the spinal cord. *Development*, 134, 285-93.
- BAUER, S. & PATTERSON, P. H. 2006. Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell self-renewal in the adult brain. *J Neurosci*, 26, 12089-99.
- BECKERVORDERSANDFORTH, R., TRIPATHI, P., NINKOVIC, J., BAYAM, E., LEPIER, A., STEMPFHUBER, B., KIRCHHOFF, F., HIRRLINGER, J., HASLINGER, A., LIE, D. C., BECKERS, J., YODER, B., IRMLER, M. & GOTZ, M. 2010. In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 7, 744-58.
- BECKINGHAUSEN, J. & SILLITOE, R. V. 2019. Insights into cerebellar development and connectivity. *Neurosci Lett*, 688, 2-13.

- BELENGUER, G., DUART-ABADIA, P., DOMINGO-MUELAS, A., MORANTE-REDOLAT, J. M. & FARINAS, I. 2021a. Cell population analysis of the adult murine subependymal neurogenic lineage by flow cytometry. *STAR Protoc*, 2, 100425.
- BELENGUER, G., DUART-ABADIA, P., JORDAN-PLA, A., DOMINGO-MUELAS, A., BLASCO-CHAMARRO, L., FERRON, S. R., MORANTE-REDOLAT, J. M. & FARINAS, I. 2021b. Adult Neural Stem Cells Are Alerted by Systemic Inflammation through TNF-alpha Receptor Signaling. *Cell Stem Cell*, 28, 285-299 e9.
- BEN-ARIE, N., BELLEN, H. J., ARMSTRONG, D. L., MCCALL, A. E., GORDADZE, P. R., GUO, Q., MATZUK, M. M. & ZOGHBI, H. Y. 1997. Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature*, 390, 169-72.
- BERG, D. A., BELNOUE, L., SONG, H. & SIMON, A. 2013. Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development*, 140, 2548-61.
- BERNARDINO, L., AGASSE, F., SILVA, B., FERREIRA, R., GRADE, S. & MALVA, J. O. 2008. Tumor necrosis factor-alpha modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures. *Stem Cells*, 26, 2361-71.
- BERNIER, P. J., BEDARD, A., VINET, J., LEVESQUE, M. & PARENT, A. 2002. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11464-9.
- BICKER, F., VASIC, V., HORTA, G., ORTEGA, F., NOLTE, H., KAVYANIFAR, A., KELLER, S., STANKOVIC, N. D., HARTER, P. N., BENEDITO, R., LUTZ, B., BAUERLE, T., HARTWIG, J., BAUMGART, J., KRUGER, M., RADYUSHKIN, K., ALBERI, L., BERNINGER, B. & SCHMIDT, M. H. 2017. Neurovascular EGFL7 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone and thereby affects olfactory perception. *Nat Commun*, 8, 15922.
- BLANK, U., KARLSSON, G. & KARLSSON, S. 2008. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*, 111, 492-503.
- BOCCAZZI, M., ROLANDO, C., ABBRACCHIO, M. P., BUFFO, A. & CERUTI, S. 2014. Purines regulate adult brain subventricular zone cell functions: contribution of reactive astrocytes. *Glia*, 62, 428-39.
- BOLTEUS, A. J. & BORDEY, A. 2004. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci*, 24, 7623-31.
- BONAGUIDI, M. A., WHEELER, M. A., SHAPIRO, J. S., STADEL, R. P., SUN, G. J., MING, G. L. & SONG, H. 2011. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145, 1142-55.
- BRAUN, N., SEVIGNY, J., MISHRA, S. K., ROBSON, S. C., BARTH, S. W., GERSTBERGER, R., HAMMER, K. & ZIMMERMANN, H. 2003. Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur J Neurosci*, 17, 1355-64.
- BRAZEL, C. Y., NUNEZ, J. L., YANG, Z. & LEVISON, S. W. 2005. Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. *Neuroscience*, 131, 55-65.
- BRILL, M. S., NINKOVIC, J., WINPENNY, E., HODGE, R. D., OZEN, I., YANG, R., LEPIER, A., GASCON, S., ERDELYI, F., SZABO, G., PARRAS, C., GUILLEMOT, F., FROTSCHER, M., BERNINGER, B., HEVNER, R. F., RAINETEAU, O. & GOTZ, M. 2009. Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci*, 12, 1524-33.
- BROOKER, S. M., GOBESKE, K. T., CHEN, J., PENG, C. Y. & KESSLER, J. A. 2017. Hippocampal bone morphogenetic protein signaling mediates behavioral effects of antidepressant treatment. *Mol Psychiatry*, 22, 910-919.
- BRUCKNER, G. & BIESOLD, D. 1981. Histochemistry of glycogen deposition in perinatal rat brain: importance of radial glial cells. *J Neurocytol*, 10, 749-57.
- BUFFO, A., RITE, I., TRIPATHI, P., LEPIER, A., COLAK, D., HORN, A. P., MORI, T. & GOTZ, M. 2008. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 3581-6.
- BURNSTOCK, G. 1976. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience*, 1, 239-48.

- BURNSTOCK, G. 2018. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci Adv*, 2, 2398212818817494.
- BURNSTOCK, G. & KENNEDY, C. 1985. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol*, 16, 433-40.
- BURNSTOCK, G. & ULRICH, H. 2011. Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. *Cell Mol Life Sci*, 68, 1369-94.
- BURNSTOCK, G. A. 1978. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormone: A Multidisciplinary Approach*, 107-118.
- BUTTS, T., HANZEL, M. & WINGATE, R. J. 2014. Transit amplification in the amniote cerebellum evolved via a heterochronic shift in NeuroD1 expression. *Development*, 141, 2791-5.
- CAJAL, S. R. 1899. *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados: estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos*, Moya.
- CALVO, C. F., FONTAINE, R. H., SOUEID, J., TAMMELA, T., MAKINEN, T., ALFARO-CERVELLO, C., BONNAUD, F., MIGUEZ, A., BENHAIM, L., XU, Y., BARALLOBRE, M. J., MOUTKINE, I., LYYTIKKA, J., TATLISUMAK, T., PYTOWSKI, B., ZALC, B., RICHARDSON, W., KESSARIS, N., GARCIA-VERDUGO, J. M., ALITALO, K., EICHMANN, A. & THOMAS, J. L. 2011. Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis. *Genes Dev*, 25, 831-44.
- CALZOLARI, F., MICHEL, J., BAUMGART, E. V., THEIS, F., GOTZ, M. & NINKOVIC, J. 2015. Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci*, 18, 490-2.
- CAMERON, R. S. & RAKIC, P. 1991. Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia*, 4, 124-37.
- CAMPBELL, K. & GOTZ, M. 2002. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci*, 25, 235-8.
- CARLEN, M., MELETIS, K., GORITZ, C., DARSALIA, V., EVERGREN, E., TANIGAKI, K., AMENDOLA, M., BARNABE-HEIDER, F., YEUNG, M. S., NALDINI, L., HONJO, T., KOKAIA, Z., SHUPLIAKOV, O., CASSIDY, R. M., LINDVALL, O. & FRISEN, J. 2009. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci*, 12, 259-67.
- CARRASQUERO, L. M., DELICADO, E. G., JIMENEZ, A. I., PEREZ-SEN, R. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2005. Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional P2Y(13)-like receptors. *Purinergic Signal*, 1, 153-9.
- CASPER, K. B. & MCCARTHY, K. D. 2006. GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS. *Mol Cell Neurosci*, 31, 676-84.
- CERMINARA, N. L., LANG, E. J., SILLITOE, R. V. & APPS, R. 2015. Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nat Rev Neurosci*, 16, 79-93.
- CODDOU, C., YAN, Z., OBSIL, T., HUIDOBRO-TORO, J. P. & STOJILKOVIC, S. S. 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev*, 63, 641-83.
- CODEGA, P., SILVA-VARGAS, V., PAUL, A., MALDONADO-SOTO, A. R., DELEO, A. M., PASTRANA, E. & DOETSCH, F. 2014. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron*, 82, 545-59.
- COLAK, D., MORI, T., BRILL, M. S., PFEIFER, A., FALK, S., DENG, C., MONTEIRO, R., MUMMERY, C., SOMMER, L. & GOTZ, M. 2008. Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J Neurosci*, 28, 434-46.
- COPPI, E., PEDATA, F. & GIBB, A. J. 2012. P2Y1 receptor modulation of Ca²⁺-activated K⁺ currents in medium-sized neurons from neonatal rat striatal slices. *J Neurophysiol*, 107, 1009-21.
- CORBIT, K. C., AANSTAD, P., SINGLA, V., NORMAN, A. R., STAINIER, D. Y. & REITER, J. F. 2005. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*, 437, 1018-21.
- COSTA, M. R., ORTEGA, F., BRILL, M. S., BECKERVORDER SANDFORTH, R., PETRONE, C., SCHROEDER, T., GOTZ, M. & BERNINGER, B. 2011. Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development*, 138, 1057-68.
- COURJARET, R., MIRAS-PORTUGAL, M. T. & DEITMER, J. W. 2012. Purinergic modulation of granule cells. *Cerebellum*, 11, 62-70.

- CHAKER, Z., CODEGA, P. & DOETSCH, F. 2016. A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 5, 640-658.
- CHEN, Y., KUMFOR, F., LANDIN-ROMERO, R., IRISH, M. & PIGUET, O. 2019. The Cerebellum in Frontotemporal Dementia: a Meta-Analysis of Neuroimaging Studies. *Neuropsychol Rev*, 29, 450-464.
- CHEUNG, K. K., RYTEN, M. & BURNSTOCK, G. 2003. Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development. *Dev Dyn*, 228, 254-66.
- CHEUNG, T. H. & RANDO, T. A. 2013. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 329-40.
- CHOI, B. H. & LAPHAM, L. W. 1978. Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study. *Brain Res*, 148, 295-311.
- CHOI, R. C., SIMON, J., TSIM, K. W. & BARNARD, E. A. 2008. Constitutive and agonist-induced dimerizations of the P2Y1 receptor: relationship to internalization and scaffolding. *J Biol Chem*, 283, 11050-63.
- CHUNG, S. H., KIM, C. T., JUNG, Y. H., LEE, N. S. & JEONG, Y. G. 2010. Early cerebellar granule cell migration in the mouse embryonic development. *Anat Cell Biol*, 43, 86-95.
- D'AMBROSI, N., IAFRATE, M., SABA, E., ROSA, P. & VOLONTE, C. 2007. Comparative analysis of P2Y4 and P2Y6 receptor architecture in native and transfected neuronal systems. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 1592-9.
- D'ANGELO, E. 2011. The cerebellar network: revisiting the critical issues. *J Physiol*, 589, 3421-2.
- DANZER, S. C., KOTLOSKI, R. J., WALTER, C., HUGHES, M. & MCNAMARA, J. O. 2008. Altered morphology of hippocampal dentate granule cell presynaptic and postsynaptic terminals following conditional deletion of TrkB. *Hippocampus*, 18, 668-78.
- DAVIS, A. A. & TEMPLE, S. 1994. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature*, 372, 263-6.
- DAYNAC, M., CHICHEPORTICHE, A., PINEDA, J. R., GAUTHIER, L. R., BOUSSIN, F. D. & MOUTHON, M. A. 2013. Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. *Stem Cell Res*, 11, 516-28.
- DE LUCA, A., CERRATO, V., FUCA, E., PARMIGIANI, E., BUFFO, A. & LETO, K. 2016. Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cell Mol Life Sci*, 73, 291-303.
- DEHAY, C. & KENNEDY, H. 2007. Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci*, 8, 438-50.
- DEITMER, J. W., BROCKHAUS, J. & CASEL, D. 2006. Modulation of synaptic activity in Purkinje neurons by ATP. *Cerebellum*, 5, 49-54.
- DEL PUERTO, A., DIAZ-HERNANDEZ, J. I., TAPIA, M., GOMEZ-VILLAFUERTE, R., BENITEZ, M. J., ZHANG, J., MIRAS-PORTUGAL, M. T., WANDOSELL, F., DIAZ-HERNANDEZ, M. & GARRIDO, J. J. 2012. Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation. *J Cell Sci*, 125, 176-88.
- DELARASSE, C., GONNORD, P., GALANTE, M., AUGER, R., DANIEL, H., MOTTA, I. & KANELLOPOULOS, J. M. 2009. Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J Neurochem*, 109, 846-57.
- DELGADO, R. N. & LIM, D. A. 2015. Embryonic Nkx2.1-expressing neural precursor cells contribute to the regional heterogeneity of adult V-SVZ neural stem cells. *Dev Biol*, 407, 265-74.
- DELICADO, E. G., SEN, R. P. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 1991. Effects of phorbol esters and secretagogues on nitrobenzylthioinosine binding to nucleoside transporters and nucleoside uptake in cultured chromaffin cells. *Biochem J*, 279 (Pt 3), 651-5.
- DESHPANDE, A., BERGAMI, M., GHANEM, A., CONZELMANN, K. K., LEPIER, A., GOTZ, M. & BERNINGER, B. 2013. Retrograde monosynaptic tracing reveals the temporal evolution of inputs onto new neurons in the adult dentate gyrus and olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E1152-61.
- DI GIORGI-GEREVINI, V., MELCHIORRI, D., BATTAGLIA, G., RICCI-VITIANI, L., CICERONI, C., BUSCETI, C. L., BIAGIONI, F., IACOVELLI, L., CANUDAS, A. M., PARATI, E., DE MARIA, R. & NICOLETTI, F.

2005. Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells. *Cell Death Differ*, 12, 1124-33.
- DIAZ-HERNANDEZ, M., SANCHEZ-NOGUEIRO, J. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2006. Role of CaMKII in the cross talk between ionotropic nucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Mol Neurosci*, 30, 177-80.
- DIAZ, J., RIDRAY, S., MIGNON, V., GRIFFON, N., SCHWARTZ, J. C. & SOKOLOFF, P. 1997. Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *J Neurosci*, 17, 4282-92.
- DIEZ-ZAERA, M., DIAZ-HERNANDEZ, J. I., HERNANDEZ-ALVAREZ, E., ZIMMERMANN, H., DIAZ-HERNANDEZ, M. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2011. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Mol Biol Cell*, 22, 1014-24.
- DOETSCH, F. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14895-900.
- DOETSCH, F., CAILLE, I., LIM, D. A., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 1999a. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97, 703-16.
- DOETSCH, F., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*, 17, 5046-61.
- DOETSCH, F., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 1999b. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11619-24.
- DOETSCH, F., PETREANU, L., CAILLE, I., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36, 1021-34.
- DORSKY, R. I., CHANG, W. S., RAPAPORT, D. H. & HARRIS, W. A. 1997. Regulation of neuronal diversity in the *Xenopus* retina by Delta signalling. *Nature*, 385, 67-70.
- DULKEN, B. W., LEEMAN, D. S., BOUTET, S. C., HEBESTREIT, K. & BRUNET, A. 2017. Single-Cell Transcriptomic Analysis Defines Heterogeneity and Transcriptional Dynamics in the Adult Neural Stem Cell Lineage. *Cell Rep*, 18, 777-790.
- DURAND, B., FERO, M. L., ROBERTS, J. M. & RAFF, M. C. 1998. p27Kip1 alters the response of cells to mitogen and is part of a cell-intrinsic timer that arrests the cell cycle and initiates differentiation. *Curr Biol*, 8, 431-40.
- ECKE, D., HANCK, T., TULAPURKAR, M. E., SCHAFER, R., KASSACK, M., STRICKER, R. & REISER, G. 2008. Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor. *Biochem J*, 409, 107-16.
- ELLIS, P., FAGAN, B. M., MAGNESS, S. T., HUTTON, S., TARANOVA, O., HAYASHI, S., MCMAHON, A., RAO, M. & PEVNY, L. 2004. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci*, 26, 148-65.
- EMBALABALA, R. J., BROCKMAN, A. A., JUREWICZ, A. R., KONG, J. A., RYAN, K., GUINTO, C. D., ALVAREZ-BUYLLA, A., CHIANG, C. & IHRIE, R. A. 2022. GLI3 Is Required for OLIG2+ Progeny Production in Adult Dorsal Neural Stem Cells. *Cells*, 11.
- ENGLUND, C., KOWALCZYK, T., DAZA, R. A., DAGAN, A., LAU, C., ROSE, M. F. & HEVNER, R. F. 2006. Unipolar brush cells of the cerebellum are produced in the rhombic lip and migrate through developing white matter. *J Neurosci*, 26, 9184-95.
- ERB, L., LIAO, Z., SEYE, C. I. & WEISMAN, G. A. 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch*, 452, 552-62.
- ESPADA, S., ORTEGA, F., MOLINA-JIJON, E., ROJO, A. I., PEREZ-SEN, R., PEDRAZA-CHAVERRI, J., MIRAS-PORTUGAL, M. T. & CUADRADO, A. 2010. The purinergic P2Y(13) receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radic Biol Med*, 49, 416-26.

- EVANS, J., SUMNERS, C., MOORE, J., HUENTELMAN, M. J., DENG, J., GELBAND, C. H. & SHAW, G. 2002. Characterization of mitotic neurons derived from adult rat hypothalamus and brain stem. *J Neurophysiol*, 87, 1076-85.
- FAIGLE, R. & SONG, H. 2013. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 2435-48.
- FILIPPOV, A. K., FERNANDEZ-FERNANDEZ, J. M., MARSH, S. J., SIMON, J., BARNARD, E. A. & BROWN, D. A. 2004. Activation and inhibition of neuronal G protein-gated inwardly rectifying K(+) channels by P2Y nucleotide receptors. *Mol Pharmacol*, 66, 468-77.
- FLEMING, J. T., HE, W., HAO, C., KETOVA, T., PAN, F. C., WRIGHT, C. C., LITINGTUNG, Y. & CHIANG, C. 2013. The Purkinje neuron acts as a central regulator of spatially and functionally distinct cerebellar precursors. *Dev Cell*, 27, 278-92.
- FREDHOLM, B. B., CHEN, J. F., CUNHA, R. A., SVENNINGSSON, P. & VAUGEOIS, J. M. 2005. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol*, 63, 191-270.
- FREUNDLIEB, N., FRANCOIS, C., TANDE, D., OERTEL, W. H., HIRSCH, E. C. & HOGLINGER, G. U. 2006. Dopaminergic substantia nigra neurons project topographically organized to the subventricular zone and stimulate precursor cell proliferation in aged primates. *J Neurosci*, 26, 2321-5.
- FUCHS, E., TUMBAR, T. & GUASCH, G. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116, 769-78.
- FUENTEALBA, L. C., ROMPANI, S. B., PARRAGUEZ, J. I., OBERNIER, K., ROMERO, R., CEPKO, C. L. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2015. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*, 161, 1644-55.
- FUKUDA, S., KATO, F., TOZUKA, Y., YAMAGUCHI, M., MIYAMOTO, Y. & HISATSUNE, T. 2003. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci*, 23, 9357-66.
- FURUTACHI, S., MIYA, H., WATANABE, T., KAWAI, H., YAMASAKI, N., HARADA, Y., IMAYOSHI, I., NELSON, M., NAKAYAMA, K. I., HIRABAYASHI, Y. & GOTOH, Y. 2015. Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat Neurosci*, 18, 657-65.
- GADISSEUX, J. F. & EVRARD, P. 1985. Glial-neuronal relationship in the developing central nervous system. A histochemical-electron microscope study of radial glial cell particulate glycogen in normal and reeler mice and the human fetus. *Dev Neurosci*, 7, 12-32.
- GAGE, F. H. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science*, 287, 1433-8.
- GAGE, F. H. 2002. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci*, 22, 612-3.
- GAIANO, N. & FISHELL, G. 2002. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu Rev Neurosci*, 25, 471-90.
- GAIANO, N., NYE, J. S. & FISHELL, G. 2000. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*, 26, 395-404.
- GALAS, L., BENARD, M., LEBON, A., KOMURO, Y., SCHAPMAN, D., VAUDRY, H., VAUDRY, D. & KOMURO, H. 2017. Postnatal Migration of Cerebellar Interneurons. *Brain Sci*, 7.
- GAMPE, K., HAVERKAMP, S., ROBSON, S. C., GACHET, C., HUSER, L., ACKER-PALMER, A. & ZIMMERMANN, H. 2015a. NTPDase2 and the P2Y1 receptor are not required for mammalian eye formation. *Purinergic Signal*, 11, 155-60.
- GAMPE, K., STEFANI, J., HAMMER, K., BRENDL, P., POTZSCH, A., ENIKOLOPOV, G., ENJOJI, K., ACKER-PALMER, A., ROBSON, S. C. & ZIMMERMANN, H. 2015b. NTPDase2 and purinergic signaling control progenitor cell proliferation in neurogenic niches of the adult mouse brain. *Stem Cells*, 33, 253-64.
- GAO, Z., URE, K., ABLES, J. L., LAGACE, D. C., NAVE, K. A., GOEBBELS, S., EISCH, A. J. & HSIEH, J. 2009. Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci*, 12, 1090-2.
- GARCIA-GARROTE, M., PARGA, J. A., LABANDEIRA, P. J., LABANDEIRA-GARCIA, J. L. & RODRIGUEZ-PALLARES, J. 2021. Dopamine regulates adult neurogenesis in the ventricular-subventricular zone via dopamine D3 angiotensin type 2 receptor interactions. *Stem Cells*, 39, 1778-1794.

- GARCIA, A. D., DOAN, N. B., IMURA, T., BUSH, T. G. & SOFRONIEW, M. V. 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*, 7, 1233-41.
- GEBARA, E., BONAGUIDI, M. A., BECKERVORDERSANDFORTH, R., SULTAN, S., UDRY, F., GIJS, P. J., LIE, D. C., MING, G. L., SONG, H. & TONI, N. 2016. Heterogeneity of Radial Glia-Like Cells in the Adult Hippocampus. *Stem Cells*, 34, 997-1010.
- GENGATHARAN, A., MALVAUT, S., MARYMONCHYK, A., GHAREGHANI, M., SNAPYAN, M., FISCHER-STERNJAK, J., NINKOVIC, J., GOTZ, M. & SAGHATELYAN, A. 2021. Adult neural stem cell activation in mice is regulated by the day/night cycle and intracellular calcium dynamics. *Cell*, 184, 709-722 e13.
- GENZEN, J. R., PLATEL, J. C., RUBIO, M. E. & BORDEY, A. 2009. Ependymal cells along the lateral ventricle express functional P2X(7) receptors. *Purinergic Signal*, 5, 299-307.
- GIACHINO, C., BARZ, M., TCHORZ, J. S., TOME, M., GASSMANN, M., BISCHOFBERGER, J., BETTLER, B. & TAYLOR, V. 2014. GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABAB receptors. *Development*, 141, 83-90.
- GIACHINO, C. & TAYLOR, V. 2014. Notching up neural stem cell homogeneity in homeostasis and disease. *Front Neurosci*, 8, 32.
- GOINGS, G. E., KOZLOWSKI, D. A. & SZELE, F. G. 2006. Differential activation of microglia in neurogenic versus non-neurogenic regions of the forebrain. *Glia*, 54, 329-42.
- GOLDMAN, S. A., ZAREMBA, A. & NIEDZWIECKI, D. 1992. In vitro neurogenesis by neuronal precursor cells derived from the adult songbird brain. *J Neurosci*, 12, 2532-41.
- GOMEZ-GAVIRO, M. V., SCOTT, C. E., SESAY, A. K., MATHEU, A., BOOTH, S., GALICHET, C. & LOVELL-BADGE, R. 2012. Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 1317-22.
- GOMEZ-VILLAFUERTES, R., DEL PUERTO, A., DIAZ-HERNANDEZ, M., BUSTILLO, D., DIAZ-HERNANDEZ, J. I., HUERTA, P. G., ARTALEJO, A. R., GARRIDO, J. J. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2009. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells. *FEBS J*, 276, 5307-25.
- GOMEZ-VILLAFUERTES, R., GUALIX, J. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2001. Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem*, 77, 84-93.
- GOMEZ-VILLAFUERTES, R., PANIAGUA-HERRANZ, L., GASCON, S., DE AGUSTIN-DURAN, D., FERRERAS, M. O., GIL-REDONDO, J. C., QUEIPO, M. J., MENENDEZ-MENDEZ, A., PEREZ-SEN, R., DELICADO, E. G., GUALIX, J., COSTA, M. R., SCHROEDER, T., MIRAS-PORTUGAL, M. T. & ORTEGA, F. 2017. Live Imaging Followed by Single Cell Tracking to Monitor Cell Biology and the Lineage Progression of Multiple Neural Populations. *J Vis Exp*.
- GONCALVES, J. T., SCHAFER, S. T. & GAGE, F. H. 2016. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, 167, 897-914.
- GONZALEZ-PEREZ, O., GUTIERREZ-FERNANDEZ, F., LOPEZ-VIRGEN, V., COLLAS-AGUILAR, J., QUINONES-HINOJOSA, A. & GARCIA-VERDUGO, J. M. 2012. Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience*, 226, 270-81.
- GOTTS, J. E. & CHESSELET, M. F. 2005. Vascular changes in the subventricular zone after distal cortical lesions. *Exp Neurol*, 194, 139-50.
- GOTZ, M. & HUTTNER, W. B. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 777-88.
- GOULD, E. & CAMERON, H. A. 1996. Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. *Dev Neurosci*, 18, 22-35.
- GRELAT, A., BENOIT, L., WAGNER, S., MOIGNEU, C., LLEDO, P. M. & ALONSO, M. 2018. Adult-born neurons boost odor-reward association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 2514-2519.
- GRIMALDI, P., PARRAS, C., GUILLEMOT, F., ROSSI, F. & WASSEF, M. 2009. Origins and control of the differentiation of inhibitory interneurons and glia in the cerebellum. *Dev Biol*, 328, 422-33.

- GRIMM, I., MESSEMER, N., STANKE, M., GACHET, C. & ZIMMERMANN, H. 2009. Coordinate pathways for nucleotide and EGF signaling in cultured adult neural progenitor cells. *J Cell Sci*, 122, 2524-33.
- GRITTI, A., BONFANTI, L., DOETSCH, F., CAILLE, I., ALVAREZ-BUYLLA, A., LIM, D. A., GALLI, R., VERDUGO, J. M., HERRERA, D. G. & VESCOVI, A. L. 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci*, 22, 437-45.
- GROVE, E. A., WILLIAMS, B. P., LI, D. Q., HAJIHOSSEINI, M., FRIEDRICH, A. & PRICE, J. 1993. Multiple restricted lineages in the embryonic rat cerebral cortex. *Development*, 117, 553-61.
- GUILLEMOT, F. 2007. Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Prog Neurobiol*, 83, 37-52.
- HACK, M. A., SAGHATELYAN, A., DE CHEVIGNY, A., PFEIFER, A., ASHERY-PADAN, R., LLEDO, P. M. & GOTZ, M. 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci*, 8, 865-72.
- HALDIPUR, P., DANG, D. & MILLEN, K. J. 2018. Embryology. *Handb Clin Neurol*, 154, 29-44.
- HALLONET, M. E., TEILLET, M. A. & LE DOUARIN, N. M. 1990. A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. *Development*, 108, 19-31.
- HANDA, M. & GUIDOTTI, G. 1996. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun*, 218, 916-23.
- HASHIMOTO, M. & HIBI, M. 2012. Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev Growth Differ*, 54, 373-89.
- HATAKEYAMA, J., BESSHO, Y., KATOH, K., OOKAWARA, S., FUJIOKA, M., GUILLEMOT, F. & KAGEYAMA, R. 2004. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development*, 131, 5539-50.
- HATAKEYAMA, J., TOMITA, K., INOUE, T. & KAGEYAMA, R. 2001. Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development*, 128, 1313-22.
- HATTEN, M. E. & HEINTZ, N. 1995. Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci*, 18, 385-408.
- HAUBENSAK, W., ATTARDO, A., DENK, W. & HUTTNER, W. B. 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 3196-201.
- HE, W., INGRAHAM, C., RISING, L., GODERIE, S. & TEMPLE, S. 2001. Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis. *J Neurosci*, 21, 8854-62.
- HEO, J. S. & HAN, H. J. 2006. ATP stimulates mouse embryonic stem cell proliferation via protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Stem Cells*, 24, 2637-48.
- HERVAS, C., PEREZ-SEN, R. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2003. Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*, 73, 384-99.
- HIBI, M. & SHIMIZU, T. 2012. Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev Neurobiol*, 72, 282-301.
- HIS, W. 1889. *Die Neuroblasten und deren Entstehung im Embryonalen Mark*.
- HOCHSTIM, C., DENEEN, B., LUKASZEWICZ, A., ZHOU, Q. & ANDERSON, D. J. 2008. Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell*, 133, 510-22.
- HOGLINGER, G. U., RIZK, P., MURIEL, M. P., DUYCKAERTS, C., OERTEL, W. H., CAILLE, I. & HIRSCH, E. C. 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci*, 7, 726-35.
- HORNER, P. J., POWER, A. E., KEMPERMANN, G., KUHN, H. G., PALMER, T. D., WINKLER, J., THAL, L. J. & GAGE, F. H. 2000. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 20, 2218-28.

- HOSHINO, M., NAKAMURA, S., MORI, K., KAWAUCHI, T., TERAOKA, M., NISHIMURA, Y. V., FUKUDA, A., FUSE, T., MATSUO, N., SONE, M., WATANABE, M., BITO, H., TERASHIMA, T., WRIGHT, C. V., KAWAGUCHI, Y., NAKAO, K. & NABESHIMA, Y. 2005. Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron*, 47, 201-13.
- HUANG, X., LIU, J., KETOVA, T., FLEMING, J. T., GROVER, V. K., COOPER, M. K., LITINGTUNG, Y. & CHIANG, C. 2010. Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8422-7.
- HUANGFU, D. & ANDERSON, K. V. 2005. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11325-30.
- HUTTON, S. R. & PEVNY, L. H. 2011. SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon. *Dev Biol*, 352, 40-7.
- IHRIG, R. A., SHAH, J. K., HARWELL, C. C., LEVINE, J. H., GUINTO, C. D., LEZAMETA, M., KRIEGSTEIN, A. R. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2011. Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron*, 71, 250-62.
- IMAYOSHI, I., SAKAMOTO, M., OHTSUKA, T., TAKAO, K., MIYAKAWA, T., YAMAGUCHI, M., MORI, K., IKEDA, T., ITOHARA, S. & KAGEYAMA, R. 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci*, 11, 1153-61.
- IMAYOSHI, I., SAKAMOTO, M., YAMAGUCHI, M., MORI, K. & KAGEYAMA, R. 2010. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci*, 30, 3489-98.
- ISO, T., KEDES, L. & HAMAMORI, Y. 2003. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol*, 194, 237-55.
- ITO, M. 2006. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol*, 78, 272-303.
- ITO, M., ITÔ, M. & ECCLES, J. 1984. *The Cerebellum and Neural Control*, Raven Press.
- IWATSUKI, K., ICHIKAWA, R., HIASA, M., MORIYAMA, Y., TORII, K. & UNEYAMA, H. 2009. Identification of the vesicular nucleotide transporter (VNUT) in taste cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 388, 1-5.
- JACOBSON, K. A., DELICADO, E. G., GACHET, C., KENNEDY, C., VON KUGELGEN, I., LI, B., MIRAS-PORTUGAL, M. T., NOVAK, I., SCHONEBERG, T., PEREZ-SEN, R., THOR, D., WU, B., YANG, Z. & MULLER, C. E. 2020. Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *Br J Pharmacol*, 177, 2413-2433.
- JACOBSON, K. A., JARVIS, M. F. & WILLIAMS, M. 2002. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem*, 45, 4057-93.
- JIN, K., SUN, Y., XIE, L., BATTEUR, S., MAO, X. O., SMELICK, C., LOGVINOVA, A. & GREENBERG, D. A. 2003. Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell*, 2, 175-83.
- JOHANSSON, C. B., MOMMA, S., CLARKE, D. L., RISLING, M., LENDAHL, U. & FRISEN, J. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 96, 25-34.
- JUGE, N., GRAY, J. A., OMOTE, H., MIYAJI, T., INOUE, T., HARA, C., UNEYAMA, H., EDWARDS, R. H., NICOLL, R. A. & MORIYAMA, Y. 2010. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron*, 68, 99-112.
- KALAMAKIS, G., BRUNE, D., RAVICHANDRAN, S., BOLZ, J., FAN, W., ZIEBELL, F., STIEHL, T., CATALA-MARTINEZ, F., KUPKE, J., ZHAO, S., LLORENS-BOBADILLA, E., BAUER, K., LIMPET, S., BERGER, B., CHRISTEN, U., SCHMEZER, P., MALLM, J. P., BERNINGER, B., ANDERS, S., DEL SOL, A., MARCINIAK-CZOCHRA, A. & MARTIN-VILLALBA, A. 2019. Quiescence Modulates Stem Cell Maintenance and Regenerative Capacity in the Aging Brain. *Cell*, 176, 1407-1419 e14.
- KATO, Y., HIASA, M., ICHIKAWA, R., HASUZAWA, N., KADOWAKI, A., IWATSUKI, K., SHIMA, K., ENDO, Y., KITAHARA, Y., INOUE, T., NOMURA, M., OMOTE, H., MORIYAMA, Y. & MIYAJI, T. 2017. Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E6297-E6305.

- KAWAGUCHI, D., FURUTACHI, S., KAWAI, H., HOZUMI, K. & GOTOH, Y. 2013. Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nat Commun*, 4, 1880.
- KAWANO, S., OTSU, K., KURUMA, A., SHOJI, S., YANAGIDA, E., MUTO, Y., YOSHIKAWA, F., HIRAYAMA, Y., MIKOSHIBA, K. & FURUICHI, T. 2006. ATP autocrine/paracrine signaling induces calcium oscillations and NFAT activation in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium*, 39, 313-24.
- KAWATE, T., MICHEL, J. C., BIRDSOON, W. T. & GOUAUX, E. 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature*, 460, 592-8.
- KELSCH, W., MOSLEY, C. P., LIN, C. W. & LOIS, C. 2007. Distinct mammalian precursors are committed to generate neurons with defined dendritic projection patterns. *PLoS Biol*, 5, e300.
- KEMPERMANN, G., KUHN, H. G. & GAGE, F. H. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386, 493-5.
- KERJAN, G., DOLAN, J., HAUMAITRE, C., SCHNEIDER-MAUNOURY, S., FUJISAWA, H., MITCHELL, K. J. & CHEDOTAL, A. 2005. The transmembrane semaphorin Sema6A controls cerebellar granule cell migration. *Nat Neurosci*, 8, 1516-24.
- KESSARIS, N., FOGARTY, M., IANNARELLI, P., GRIST, M., WEGNER, M. & RICHARDSON, W. D. 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci*, 9, 173-9.
- KHEIRBEK, M. A. & HEN, R. 2011. Dorsal vs ventral hippocampal neurogenesis: implications for cognition and mood. *Neuropsychopharmacology*, 36, 373-4.
- KIPPIN, T. E., KAPUR, S. & VAN DER KOOY, D. 2005. Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *J Neurosci*, 25, 5815-23.
- KLEBE, R. J. 1969. Neuroblastoma : Cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J Cell Biol*, 43, 69A.
- KLEIN, C., BUTT, S. J., MACHOLD, R. P., JOHNSON, J. E. & FISHELL, G. 2005. Cerebellum- and forebrain-derived stem cells possess intrinsic regional character. *Development*, 132, 4497-508.
- KNOWLES, A. F. 2011. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signal*, 7, 21-45.
- KOHWI, M., OSUMI, N., RUBENSTEIN, J. L. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2005. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 25, 6997-7003.
- KOHWI, M., PETRYNIAK, M. A., LONG, J. E., EKKER, M., OBATA, K., YANAGAWA, Y., RUBENSTEIN, J. L. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2007. A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci*, 27, 6878-91.
- KOKOVAY, E., WANG, Y., KUSEK, G., WURSTER, R., LEDERMAN, P., LOWRY, N., SHEN, Q. & TEMPLE, S. 2012. VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell Stem Cell*, 11, 220-30.
- KOPAN, R. & ILAGAN, M. X. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137, 216-33.
- KRIEGSTEIN, A. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-84.
- KRUSHEL, L. A., JOHNSTON, J. G., FISHELL, G., TIBSHIRANI, R. & VAN DER KOOY, D. 1993. Spatially localized neuronal cell lineages in the developing mammalian forebrain. *Neuroscience*, 53, 1035-47.
- KUCENAS, S., COX, J. A., SOTO, F., LAMORA, A. & VOIGT, M. M. 2009. Ectodermal P2X receptor function plays a pivotal role in craniofacial development of the zebrafish. *Purinergic Signal*, 5, 395-407.
- KUKULSKI, F., LEVESQUE, S. A. & SEVIGNY, J. 2011. Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. *Adv Pharmacol*, 61, 263-99.

- KUWABARA, T., HSIEH, J., MUOTRI, A., YEO, G., WARASHINA, M., LIE, D. C., MOORE, L., NAKASHIMA, K., ASASHIMA, M. & GAGE, F. H. 2009. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci*, 12, 1097-105.
- L'EPISCOPO, F., TIROLO, C., TESTA, N., CANIGLIA, S., MORALE, M. C., DELEIDI, M., SERAPIDE, M. F., PLUCHINO, S. & MARCHETTI, B. 2012. Plasticity of subventricular zone neuroprogenitors in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mouse model of Parkinson's disease involves cross talk between inflammatory and Wnt/beta-catenin signaling pathways: functional consequences for neuroprotection and repair. *J Neurosci*, 32, 2062-85.
- LACKEY, E. P., HECK, D. H. & SILLITOE, R. V. 2018. Recent advances in understanding the mechanisms of cerebellar granule cell development and function and their contribution to behavior. *F1000Res*, 7.
- LADER, A. S., XIAO, Y. F., O'RIORDAN, C. R., PRAT, A. G., JACKSON, G. R., JR. & CANTIELLO, H. F. 2000. cAMP activates an ATP-permeable pathway in neonatal rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C173-87.
- LAINE, J. & AXELRAD, H. 1994. The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J Comp Neurol*, 339, 159-73.
- LAVADO, A., LAGUTIN, O. V., CHOW, L. M., BAKER, S. J. & OLIVER, G. 2010. Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. *PLoS Biol*, 8.
- LAZAROWSKI, E. R., SESMA, J. I., SEMINARIO-VIDAL, L. & KREDA, S. M. 2011. Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release. *Adv Pharmacol*, 61, 221-61.
- LEDENT, C., VAUGEOIS, J. M., SCHIFFMANN, S. N., PEDRAZZINI, T., EL YACOUBI, M., VANDERHAEGHEN, J. J., COSTENTIN, J., HEATH, J. K., VASSART, G. & PARMENTIER, M. 1997. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*, 388, 674-8.
- LEE, A., KESSLER, J. D., READ, T. A., KAISER, C., CORBEIL, D., HUTTNER, W. B., JOHNSON, J. E. & WECHSLER-REYA, R. J. 2005. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci*, 8, 723-9.
- LEEMAN, D. S., HEBESTREIT, K., RUETZ, T., WEBB, A. E., MCKAY, A., POLLINA, E. A., DULKEN, B. W., ZHAO, X., YEO, R. W., HO, T. T., MAHMOUDI, S., DEVARAJAN, K., PASSEGUE, E., RANDO, T. A., FRYDMAN, J. & BRUNET, A. 2018. Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging. *Science*, 359, 1277-1283.
- LEHTINEN, M. K., ZAPPATERRA, M. W., CHEN, X., YANG, Y. J., HILL, A. D., LUN, M., MAYNARD, T., GONZALEZ, D., KIM, S., YE, P., D'ERCOLE, A. J., WONG, E. T., LAMANTIA, A. S. & WALSH, C. A. 2011. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron*, 69, 893-905.
- LENDahl, U., ZIMMERMAN, L. B. & MCKAY, R. D. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60, 585-95.
- LEON, D., HERVAS, C. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2006. P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci*, 23, 2999-3013.
- LETO, K., ARANCILLO, M., BECKER, E. B., BUFFO, A., CHIANG, C., DING, B., DOBYNS, W. B., DUSART, I., HALDIPUR, P., HATTEN, M. E., HOSHINO, M., JOYNER, A. L., KANO, M., KILPATRICK, D. L., KOIBUCHI, N., MARINO, S., MARTINEZ, S., MILLEN, K. J., MILLNER, T. O., MIYATA, T., PARMIGIANI, E., SCHILLING, K., SEKERKOVA, G., SILLITOE, R. V., SOTELO, C., UESAKA, N., WEFERS, A., WINGATE, R. J. & HAWKES, R. 2016. Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum*, 15, 789-828.
- LETO, K., CARLETTI, B., WILLIAMS, I. M., MAGRASSI, L. & ROSSI, F. 2006. Different types of cerebellar GABAergic interneurons originate from a common pool of multipotent progenitor cells. *J Neurosci*, 26, 11682-94.
- LETO, K., ROLANDO, C. & ROSSI, F. 2012. The genesis of cerebellar GABAergic neurons: fate potential and specification mechanisms. *Front Neuroanat*, 6, 6.

- LETO, K. & ROSSI, F. 2012. Specification and differentiation of cerebellar GABAergic neurons. *Cerebellum*, 11, 434-5.
- LI, W. L., CHU, M. W., WU, A., SUZUKI, Y., IMAYOSHI, I. & KOMIYAMA, T. 2018. Adult-born neurons facilitate olfactory bulb pattern separation during task engagement. *Elife*, 7.
- LICHT, T., EAVRI, R., GOSHEN, I., SHLOMAI, Y., MIZRAHI, A. & KESHET, E. 2010. VEGF is required for dendritogenesis of newly born olfactory bulb interneurons. *Development*, 137, 261-71.
- LIE, D. C., COLAMARINO, S. A., SONG, H. J., DESIRE, L., MIRA, H., CONSIGLIO, A., LEIN, E. S., JESSBERGER, S., LANSFORD, H., DEARIE, A. R. & GAGE, F. H. 2005. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 437, 1370-5.
- LIM, D. A., TRAMONTIN, A. D., TREVEJO, J. M., HERRERA, D. G., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28, 713-26.
- LIN, J. H., TAKANO, T., ARCUINO, G., WANG, X., HU, F., DARZYNKIEWICZ, Z., NUNES, M., GOLDMAN, S. A. & NEDERGAARD, M. 2007. Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev Biol*, 302, 356-66.
- LIU, X., WANG, Q., HAYDAR, T. F. & BORDEY, A. 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci*, 8, 1179-87.
- LIU, Z. & MARTIN, L. J. 2003. Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *J Comp Neurol*, 459, 368-91.
- LOIS, C. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264, 1145-8.
- LOIS, C., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 271, 978-81.
- LONG, J. E., SWAN, C., LIANG, W. S., COBOS, I., POTTER, G. B. & RUBENSTEIN, J. L. 2009. Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control striatal patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *J Comp Neurol*, 512, 556-72.
- LUSKIN, M. B. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11, 173-89.
- LUSKIN, M. B., PEARLMAN, A. L. & SANES, J. R. 1988. Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with a recombinant retrovirus. *Neuron*, 1, 635-47.
- LLEDO, P. M. & SAGHATELYAN, A. 2005. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci*, 28, 248-54.
- LLORENS-BOBADILLA, E., ZHAO, S., BASER, A., SAIZ-CASTRO, G., ZWADLO, K. & MARTIN-VILLALBA, A. 2015. Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell*, 17, 329-40.
- LLORENS-MARTIN, M., RABANO, A. & AVILA, J. 2015. The Ever-Changing Morphology of Hippocampal Granule Neurons in Physiology and Pathology. *Front Neurosci*, 9, 526.
- MACHOLD, R. & FISHELL, G. 2005. Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron*, 48, 17-24.
- MANI, N., KHAIBULLINA, A., KRUM, J. M. & ROSENSTEIN, J. M. 2010. Vascular endothelial growth factor enhances migration of astroglial cells in subventricular zone neurosphere cultures. *J Neurosci Res*, 88, 248-57.
- MARICICH, S. M. & HERRUP, K. 1999. Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *J Neurobiol*, 41, 281-94.
- MARSHALL, C. A., NOVITCH, B. G. & GOLDMAN, J. E. 2005. Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. *J Neurosci*, 25, 7289-98.
- MARSHALL, G. P., 2ND, DELEYROLLE, L. P., REYNOLDS, B. A., STEINDLER, D. A. & LAYWELL, E. D. 2014. Microglia from neurogenic and non-neurogenic regions display differential proliferative potential and neuroblast support. *Front Cell Neurosci*, 8, 180.

- MARSHALL, G. P., 2ND, DEMIR, M., STEINDLER, D. A. & LAYWELL, E. D. 2008. Subventricular zone microglia possess a unique capacity for massive in vitro expansion. *Glia*, 56, 1799-808.
- MASUDA, T., OZONO, Y., MIKURIYA, S., KOHRO, Y., TOZAKI-SAITOH, H., IWATSUKI, K., UNEYAMA, H., ICHIKAWA, R., SALTER, M. W., TSUDA, M. & INOUE, K. 2016. Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat Commun*, 7, 12529.
- MATHIS, L., BONNEROT, C., PUELLES, L. & NICOLAS, J. F. 1997. Retrospective clonal analysis of the cerebellum using genetic lacZ/lacZ mouse mosaics. *Development*, 124, 4089-104.
- MCCARTHY, M., TURNBULL, D. H., WALSH, C. A. & FISHELL, G. 2001. Telencephalic neural progenitors appear to be restricted to regional and glial fates before the onset of neurogenesis. *J Neurosci*, 21, 6772-81.
- MCKAY, B. E., ENGBERS, J. D., MEHAFFEY, W. H., GORDON, G. R., MOLINEUX, M. L., BAINS, J. S. & TURNER, R. W. 2007. Climbing fiber discharge regulates cerebellar functions by controlling the intrinsic characteristics of purkinje cell output. *J Neurophysiol*, 97, 2590-604.
- MENENDEZ-MENDEZ, A., DIAZ-HERNANDEZ, J. I. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2015. The vesicular nucleotide transporter (VNUT) is involved in the extracellular ATP effect on neuronal differentiation. *Purinergic Signal*, 11, 239-49.
- MENENDEZ-MENDEZ, A., DIAZ-HERNANDEZ, J. I., ORTEGA, F., GUALIX, J., GOMEZ-VILLAFUERTES, R. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2017. Specific Temporal Distribution and Subcellular Localization of a Functional Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) in Cerebellar Granule Neurons. *Front Pharmacol*, 8, 951.
- MENENDEZ-MENDEZ, A., PANIAGUA-HERRANZ, L., OLIVOS-ORE, L. A., GOMEZ-VILLAFUERTES, R., PEREZ-SEN, R., DELICADO, E. G., ARTALEJO, A. R. & ORTEGA, F. 2021. Combining low-density cell culture, single-cell tracking, and patch-clamp to monitor the behavior of postnatal murine cerebellar neural stem cells. *STAR Protoc*, 2, 100964.
- MENG, H., ZHANG, Z., ZHANG, R., LIU, X., WANG, L., ROBIN, A. M. & CHOPP, M. 2006. Biphasic effects of exogenous VEGF on VEGF expression of adult neural progenitors. *Neurosci Lett*, 393, 97-101.
- MENN, B., GARCIA-VERDUGO, J. M., YASCHINE, C., GONZALEZ-PEREZ, O., ROWITCH, D. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2006. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci*, 26, 7907-18.
- MERCIER, F. & DOUET, V. 2014. Bone morphogenetic protein-4 inhibits adult neurogenesis and is regulated by fractone-associated heparan sulfates in the subventricular zone. *J Chem Neuroanat*, 57-58, 54-61.
- MERCURIO, S., SERRA, L. & NICOLIS, S. K. 2019. More than just Stem Cells: Functional Roles of the Transcription Factor Sox2 in Differentiated Glia and Neurons. *Int J Mol Sci*, 20.
- MERKLE, F. T., FUENTEALBA, L. C., SANDERS, T. A., MAGNO, L., KESSARIS, N. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2014. Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nat Neurosci*, 17, 207-14.
- MERKLE, F. T., MIRZADEH, Z. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, 317, 381-4.
- MERKLE, F. T., TRAMONTIN, A. D., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2004. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17528-32.
- MESSEMER, N., KUNERT, C., GROHMANN, M., SOBOTTKA, H., NIEBER, K., ZIMMERMANN, H., FRANKE, H., NORENBURG, W., STRAUB, I., SCHAEFER, M., RIEDEL, T., ILLES, P. & RUBINI, P. 2013. P2X7 receptors at adult neural progenitor cells of the mouse subventricular zone. *Neuropharmacology*, 73, 122-37.
- MIALE, I. L. & SIDMAN, R. L. 1961. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol*, 4, 277-96.

- MICH, J. K., SIGNER, R. A., NAKADA, D., PINEDA, A., BURGESS, R. J., VUE, T. Y., JOHNSON, J. E. & MORRISON, S. J. 2014. Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *Elife*, 3, e02669.
- MIHARA, H., BOUDAKA, A., SUGIYAMA, T., MORIYAMA, Y. & TOMINAGA, M. 2011. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)-dependent calcium influx and ATP release in mouse oesophageal keratinocytes. *J Physiol*, 589, 3471-82.
- MING, G. L. & SONG, H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 28, 223-50.
- MING, G. L. & SONG, H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70, 687-702.
- MIONE, M. C., CAVANAGH, J. F., HARRIS, B. & PARNAVELAS, J. G. 1997. Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*, 17, 2018-29.
- MIRAS-PORTUGAL, M. T., MENENDEZ-MENDEZ, A., GOMEZ-VILLAFUERTES, R., ORTEGA, F., DELICADO, E. G., PEREZ-SEN, R. & GUALIX, J. 2019a. Physiopathological Role of the Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) in the Central Nervous System: Relevance of the Vesicular Nucleotide Release as a Potential Therapeutic Target. *Front Cell Neurosci*, 13, 224.
- MIRAS-PORTUGAL, M. T., QUEIPO, M. J., GIL-REDONDO, J. C., ORTEGA, F., GOMEZ-VILLAFUERTES, R., GUALIX, J., DELICADO, E. G. & PEREZ-SEN, R. 2019b. P2 receptor interaction and signalling cascades in neuroprotection. *Brain Res Bull*, 151, 74-83.
- MIRZADEH, Z., DOETSCH, F., SAWAMOTO, K., WICHTERLE, H. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2010. The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. *J Vis Exp*.
- MIRZADEH, Z., MERKLE, F. T., SORIANO-NAVARRO, M., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*, 3, 265-78.
- MISHRA, A., SINGH, S. & SHUKLA, S. 2018. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. *J Exp Neurosci*, 12, 1179069518779829.
- MISHRA, S. K., BRAUN, N., SHUKLA, V., FULLGRABE, M., SCHOMERUS, C., KORF, H. W., GACHET, C., IKEHARA, Y., SEVIGNY, J., ROBSON, S. C. & ZIMMERMANN, H. 2006. Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development*, 133, 675-84.
- MISSION, J. P., TAKAHASHI, T. & CAVINESS, V. S., JR. 1991. Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia*, 4, 138-48.
- MIYATA, T., KAWAGUCHI, A., SAITO, K., KAWANO, M., MUTO, T. & OGAWA, M. 2004. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development*, 131, 3133-45.
- MIYATA, T., MAEDA, T. & LEE, J. E. 1999. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev*, 13, 1647-52.
- MIYAZAWA, K., HIMI, T., GARCIA, V., YAMAGISHI, H., SATO, S. & ISHIZAKI, Y. 2000. A role for p27/Kip1 in the control of cerebellar granule cell precursor proliferation. *J Neurosci*, 20, 5756-63.
- MIZRAK, D., LEVITIN, H. M., DELGADO, A. C., CROTET, V., YUAN, J., CHAKER, Z., SILVA-VARGAS, V., SIMS, P. A. & DOETSCH, F. 2019. Single-Cell Analysis of Regional Differences in Adult V-SVZ Neural Stem Cell Lineages. *Cell Rep*, 26, 394-406 e5.
- MORENO-ESTELLES, M., GONZALEZ-GOMEZ, P., HORTIGUELA, R., DIAZ-MORENO, M., SAN EMETERIO, J., CARVALHO, A. L., FARINAS, I. & MIRA, H. 2012. Symmetric expansion of neural stem cells from the adult olfactory bulb is driven by astrocytes via WNT7A. *Stem Cells*, 30, 2796-809.
- MORIN, F., DINO, M. R. & MUGNAINI, E. 2001. Postnatal differentiation of unipolar brush cells and mossy fiber-unipolar brush cell synapses in rat cerebellum. *Neuroscience*, 104, 1127-39.
- MORIYAMA, Y., HIASA, M., SAKAMOTO, S., OMOTE, H. & NOMURA, M. 2017. Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signal*, 13, 387-404.

- MORRISON, S. J. & SPRADLING, A. C. 2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132, 598-611.
- MOTHERSILL, O., KNEE-ZASKA, C. & DONOHOE, G. 2016. Emotion and Theory of Mind in Schizophrenia-Investigating the Role of the Cerebellum. *Cerebellum*, 15, 357-68.
- MUGNAINI, E. & FLORIS, A. 1994. The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J Comp Neurol*, 339, 174-80.
- MULLER, D. J., HAND, G. M., ENGEL, A. & SOSINSKY, G. E. 2002. Conformational changes in surface structures of isolated connexin 26 gap junctions. *EMBO J*, 21, 3598-607.
- NAGAYA, N., TITTLE, R. K., SAAR, N., DELLAL, S. S. & HUME, R. I. 2005. An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. *J Biol Chem*, 280, 25982-93.
- NAIT-OUNESMAR, B., DECKER, L., LACHAPPELLE, F., AVELLANA-ADALID, V., BACHELIN, C. & BARON-VAN EVERCOOREN, A. 1999. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci*, 11, 4357-66.
- NAITO, Y. & LOWENSTEIN, J. M. 1981. 5'-Nucleotidase from rat heart. *Biochemistry*, 20, 5188-94.
- NAKASHIMA, K., UMESHIMA, H. & KENGAKU, M. 2015. Cerebellar granule cells are predominantly generated by terminal symmetric divisions of granule cell precursors. *Dev Dyn*, 244, 748-58.
- NEUMULLER, R. A., BETSCHINGER, J., FISCHER, A., BUSHATI, N., POERNBACHER, I., MECHTLER, K., COHEN, S. M. & KNOBLICH, J. A. 2008. Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the Drosophila ovarian stem cell lineage. *Nature*, 454, 241-5.
- NICKE, A., BAUMERT, H. G., RETTINGER, J., EICHELE, A., LAMBRECHT, G., MUTSCHLER, E. & SCHMALZING, G. 1998. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J*, 17, 3016-28.
- NILIUS, B. & DROOGMANS, G. 2003. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand*, 177, 119-47.
- NOCTOR, S. C., MARTINEZ-CERDENO, V., IVIC, L. & KRIEGSTEIN, A. R. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, 7, 136-44.
- NOCTOR, S. C., MARTINEZ-CERDENO, V. & KRIEGSTEIN, A. R. 2007. Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. *Arch Neurol*, 64, 639-42.
- NORTH, R. A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82, 1013-67.
- NOTTEBOHM, F. 2004. The road we travelled: discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons. *Ann N Y Acad Sci*, 1016, 628-58.
- O'KEEFFE, G. C., BARKER, R. A. & CALDWELL, M. A. 2009. Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle*, 8, 2888-94.
- OBERNIER, K. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2019. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development*, 146.
- OBERNIER, K., CEBRIAN-SILLA, A., THOMSON, M., PARRAGUEZ, J. I., ANDERSON, R., GUINTO, C., RODAS RODRIGUEZ, J., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2018. Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*, 22, 221-234 e8.
- OKANO-UCHIDA, T., HIMI, T., KOMIYA, Y. & ISHIZAKI, Y. 2004. Cerebellar granule cell precursors can differentiate into astroglial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1211-6.
- OLAH, M. E. & STILES, G. L. 2000. The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol Ther*, 85, 55-75.
- OOSTLAND, M., SELMEIJER, J. & VAN HOOFT, J. A. 2011. Transient expression of functional serotonin 5-HT3 receptors by glutamatergic granule cells in the early postnatal mouse cerebellum. *J Physiol*, 589, 4837-46.
- ORTEGA, F., BERNINGER, B. & COSTA, M. R. 2013a. Primary culture and live imaging of adult neural stem cells and their progeny. *Methods Mol Biol*, 1052, 1-11.
- ORTEGA, F. & COSTA, M. R. 2016. Live Imaging of Adult Neural Stem Cells in Rodents. *Front Neurosci*, 10, 78.

- ORTEGA, F., COSTA, M. R., SIMON-EBERT, T., SCHROEDER, T., GOTZ, M. & BERNINGER, B. 2011a. Using an adherent cell culture of the mouse subependymal zone to study the behavior of adult neural stem cells on a single-cell level. *Nat Protoc*, 6, 1847-59.
- ORTEGA, F., GASCON, S., MASSERDOTTI, G., DESHPANDE, A., SIMON, C., FISCHER, J., DIMOU, L., CHICHUNG LIE, D., SCHROEDER, T. & BERNINGER, B. 2013b. Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat Cell Biol*, 15, 602-13.
- ORTEGA, F., GOMEZ-VILLAFUERTES, R., BENITO-LEON, M., MARTINEZ DE LA TORRE, M., OLIVOS-ORE, L. A., ARRIBAS-BLAZQUEZ, M., GOMEZ-GAVIRO, M. V., AZCORRA, A., DESCO, M., ARTALEJO, A. R., PUELLES, L. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2021. Salient brain entities labelled in P2rx7-EGFP reporter mouse embryos include the septum, roof plate glial specializations and circumventricular ependymal organs. *Brain Struct Funct*, 226, 715-741.
- ORTEGA, F., PEREZ-SEN, R., DELICADO, E. G. & TERESA MIRAS-PORTUGAL, M. 2011b. ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y₁₃ and P2X₇ receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology*, 61, 1210-21.
- ORTEGA, F., PEREZ-SEN, R., MORENTE, V., DELICADO, E. G. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2010. P2X₇, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci*, 67, 1723-33.
- PAEZ-GONZALEZ, P., ABDI, K., LUCIANO, D., LIU, Y., SORIANO-NAVARRO, M., RAWLINS, E., BENNETT, V., GARCIA-VERDUGO, J. M. & KUO, C. T. 2011. Ank3-dependent SVZ niche assembly is required for the continued production of new neurons. *Neuron*, 71, 61-75.
- PAGANO, S. F., IMPAGNATIELLO, F., GIRELLI, M., COVA, L., GRIONI, E., ONOFRI, M., CAVALLARO, M., ETTERI, S., VITELLO, F., GIOMBINI, S., SOLERO, C. L. & PARATI, E. A. 2000. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells*, 18, 295-300.
- PALKOVITS, M., MAGYAR, P. & SZENTAGOTHAJ, J. 1971. Quantitative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. II. Cell numbers and densities in the granular layer. *Brain Res*, 32, 15-30.
- PANIAGUA-HERRANZ, L., GIL-REDONDO, J. C., QUEIPO, M. J., GONZALEZ-RAMOS, S., BOSCA, L., PEREZ-SEN, R., MIRAS-PORTUGAL, M. T. & DELICADO, E. G. 2017. Prostaglandin E₂ Impairs P2Y₂/P2Y₄ Receptor Signaling in Cerebellar Astrocytes via EP3 Receptors. *Front Pharmacol*, 8, 937.
- PANIAGUA-HERRANZ, L., MENENDEZ-MENDEZ, A., GOMEZ-VILLAFUERTES, R., OLIVOS-ORE, L. A., BISCAIA, M., GUALIX, J., PEREZ-SEN, R., DELICADO, E. G., ARTALEJO, A. R., MIRAS-PORTUGAL, M. T. & ORTEGA, F. 2020. Live Imaging Reveals Cerebellar Neural Stem Cell Dynamics and the Role of VNUT in Lineage Progression. *Stem Cell Reports*, 15, 1080-1094.
- PARMIGIANI, E., LETO, K., ROLANDO, C., FIGUERES-ONATE, M., LOPEZ-MASCARAQUE, L., BUFFO, A. & ROSSI, F. 2015. Heterogeneity and Bipotency of Astroglial-Like Cerebellar Progenitors along the Interneuron and Glial Lineages. *J Neurosci*, 35, 7388-402.
- PARNAVELAS, J. G., BARFIELD, J. A., FRANKE, E. & LUSKIN, M. B. 1991. Separate progenitor cells give rise to pyramidal and nonpyramidal neurons in the rat telencephalon. *Cereb Cortex*, 1, 463-8.
- PASCUAL, M., ABASOLO, I., MINGORANCE-LE MEUR, A., MARTINEZ, A., DEL RIO, J. A., WRIGHT, C. V., REAL, F. X. & SORIANO, E. 2007. Cerebellar GABAergic progenitors adopt an external granule cell-like phenotype in the absence of Ptf1a transcription factor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 5193-8.
- PASTRANA, E., CHENG, L. C. & DOETSCH, F. 2009. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 6387-92.
- PASTRANA, E., SILVA-VARGAS, V. & DOETSCH, F. 2011. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*, 8, 486-98.

- PEREZ-SEN, R., QUEIPO, M. J., GIL-REDONDO, J. C., ORTEGA, F., GOMEZ-VILLAFUERTE, R., MIRAS-PORTUGAL, M. T. & DELICADO, E. G. 2019. Dual-Specificity Phosphatase Regulation in Neurons and Glial Cells. *Int J Mol Sci*, 20.
- PEREZ-SEN, R., QUEIPO, M. J., MORENTE, V., ORTEGA, F., DELICADO, E. G. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2015. Neuroprotection Mediated by P2Y₁₃ Nucleotide Receptors in Neurons. *Comput Struct Biotechnol J*, 13, 160-8.
- PETRIK, D., MYOGA, M. H., GRADE, S., GERKAU, N. J., PUSCH, M., ROSE, C. R., GROTHE, B. & GOTZ, M. 2018. Epithelial Sodium Channel Regulates Adult Neural Stem Cell Proliferation in a Flow-Dependent Manner. *Cell Stem Cell*, 22, 865-878 e8.
- PLATEL, J. C., DAVE, K. A., GORDON, V., LACAR, B., RUBIO, M. E. & BORDEY, A. 2010. NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron*, 65, 859-72.
- PLESNER, L. 1995. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol*, 158, 141-214.
- PONTI, G., OBERNIER, K., GUINTO, C., JOSE, L., BONFANTI, L. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2013. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E1045-54.
- PRICE, J. & THURLOW, L. 1988. Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development*, 104, 473-82.
- QUEIPO, M. J., GIL-REDONDO, J. C., MORENTE, V., ORTEGA, F., MIRAS-PORTUGAL, M. T., DELICADO, E. G. & PEREZ-SEN, R. 2017. P2X₇ Nucleotide and EGF Receptors Exert Dual Modulation of the Dual-Specificity Phosphatase 6 (MKP-3) in Granule Neurons and Astrocytes, Contributing to Negative Feedback on ERK Signaling. *Front Mol Neurosci*, 10, 448.
- RAKIC, P. 1971. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol*, 141, 283-312.
- RAKIC, P. 1995. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci*, 18, 383-8.
- RAKIC, P. 2003. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia*, 43, 19-32.
- RAMIREZ-CASTILLEJO, C., SANCHEZ-SANCHEZ, F., ANDREU-AGULLO, C., FERRON, S. R., AROCA-AGUILAR, J. D., SANCHEZ, P., MIRA, H., ESCRIBANO, J. & FARINAS, I. 2006. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci*, 9, 331-9.
- REDMOND, S. A., FIGUERES-ONATE, M., OBERNIER, K., NASCIMENTO, M. A., PARRAGUEZ, J. I., LOPEZ-MASCARAQUE, L., FUENTEALBA, L. C. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2019. Development of Ependymal and Postnatal Neural Stem Cells and Their Origin from a Common Embryonic Progenitor. *Cell Rep*, 27, 429-441 e3.
- REID, C. B., LIANG, I. & WALSH, C. 1995. Systematic widespread clonal organization in cerebral cortex. *Neuron*, 15, 299-310.
- REIMER, R. J. 2013. SLC17: a functionally diverse family of organic anion transporters. *Mol Aspects Med*, 34, 350-9.
- RESHKIN, S. J., GUERRA, L., BAGORDA, A., DEBELLIS, L., CARDONE, R., LI, A. H., JACOBSON, K. A. & CASAVOLA, V. 2000. Activation of A(3) adenosine receptor induces calcium entry and chloride secretion in A(6) cells. *J Membr Biol*, 178, 103-13.
- REYNOLDS, B. A. & RIETZE, R. L. 2005. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nat Methods*, 2, 333-6.
- REYNOLDS, B. A. & WEISS, S. 1996. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol*, 175, 1-13.
- RIBEIRO XAVIER, A. L., KRESS, B. T., GOLDMAN, S. A., LACERDA DE MENEZES, J. R. & NEDERGAARD, M. 2015. A Distinct Population of Microglia Supports Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone. *J Neurosci*, 35, 11848-61.
- ROBERTS, J. A., VIAL, C., DIGBY, H. R., AGBOH, K. C., WEN, H., ATTERBURY-THOMAS, A. & EVANS, R. J. 2006. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch*, 452, 486-500.

- ROBSON, S. C., SEVIGNY, J. & ZIMMERMANN, H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*, 2, 409-30.
- ROHATGI, R., MILENKOVIC, L. & SCOTT, M. P. 2007. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*, 317, 372-6.
- ROOSTAEI, T., NAZERI, A., SAHRAIAN, M. A. & MINAGAR, A. 2014. The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy. *Neurol Clin*, 32, 859-69.
- RUDOLPH, R., JAHN, H. M., COURJARET, R., MESSEMER, N., KIRCHHOFF, F. & DEITMER, J. W. 2016. The inhibitory input to mouse cerebellar Purkinje cells is reciprocally modulated by Bergmann glial P2Y1 and AMPA receptor signaling. *Glia*, 64, 1265-80.
- SABIROV, R. Z., DUTTA, A. K. & OKADA, Y. 2001. Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J Gen Physiol*, 118, 251-66.
- SABIROV, R. Z. & OKADA, Y. 2004. Wide nanoscopic pore of maxi-anion channel suits its function as an ATP-conductive pathway. *Biophys J*, 87, 1672-85.
- SABIROV, R. Z. & OKADA, Y. 2005. ATP release via anion channels. *Purinergic Signal*, 1, 311-28.
- SABIROV, R. Z. & OKADA, Y. 2009. The maxi-anion channel: a classical channel playing novel roles through an unidentified molecular entity. *J Physiol Sci*, 59, 3-21.
- SAKAMOTO, S., MIYAJI, T., HIASA, M., ICHIKAWA, R., UEMATSU, A., IWATSUKI, K., SHIBATA, A., UNEYAMA, H., TAKAYANAGI, R., YAMAMOTO, A., OMOTE, H., NOMURA, M. & MORIYAMA, Y. 2014. Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Sci Rep*, 4, 6689.
- SALIH, S., NIZAMUDEEN, Z. A., DE MELO, N., CHAKRABARTI, L. & SOTTILE, V. 2022. Sox-positive cell population in the adult cerebellum increases upon tissue degeneration. *Exp Neurol*, 348, 113950.
- SANCHEZ-HUERTA, K., GARCIA-MARTINEZ, Y., VERGARA, P., SEGOVIA, J. & PACHECO-ROSADO, J. 2016. Thyroid hormones are essential to preserve non-proliferative cells of adult neurogenesis of the dentate gyrus. *Mol Cell Neurosci*, 76, 1-10.
- SANCHEZ-MENDOZA, E. H., BELLVER-LANDETE, V., ARCE, C., DOEPPNER, T. R., HERMANN, D. M. & OSET-GASQUE, M. J. 2017. Vesicular glutamate transporters play a role in neuronal differentiation of cultured SVZ-derived neural precursor cells. *PLoS One*, 12, e0177069.
- SAWADA, K., ECHIGO, N., JUGE, N., MIYAJI, T., OTSUKA, M., OMOTE, H., YAMAMOTO, A. & MORIYAMA, Y. 2008. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 5683-6.
- SAWAMOTO, K., WICHTERLE, H., GONZALEZ-PEREZ, O., CHOLFIN, J. A., YAMADA, M., SPASSKY, N., MURCIA, N. S., GARCIA-VERDUGO, J. M., MARIN, O., RUBENSTEIN, J. L., TESSIER-LAVIGNE, M., OKANO, H. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2006. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*, 311, 629-32.
- SCEMES, E., SPRAY, D. C. & MEDA, P. 2009. Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemichannels". *Pflugers Arch*, 457, 1207-26.
- SCHANZER, A., WACHS, F. P., WILHELM, D., ACKER, T., COOPER-KUHN, C., BECK, H., WINKLER, J., AIGNER, L., PLATE, K. H. & KUHN, H. G. 2004. Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol*, 14, 237-48.
- SCHMAHMANN, J. D. & PANDYA, D. N. 1997. The cerebrocerebellar system. *Int Rev Neurobiol*, 41, 31-60.
- SCHROEDER, T. 2008. Imaging stem-cell-driven regeneration in mammals. *Nature*, 453, 345-51.
- SEN, R. P., DELICADO, E. G., ALVAREZ, A., BROCKLEBANK, A. M., WILEY, J. S. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 1998. Flow cytometric studies of nucleoside transport regulation in single chromaffin cells. *FEBS Lett*, 422, 368-72.
- SETO, Y., NAKATANI, T., MASUYAMA, N., TAYA, S., KUMAI, M., MINAKI, Y., HAMAGUCHI, A., INOUE, Y. U., INOUE, T., MIYASHITA, S., FUJIYAMA, T., YAMADA, M., CHAPMAN, H., CAMPBELL, K.,

- MAGNUSON, M. A., WRIGHT, C. V., KAWAGUCHI, Y., IKENAKA, K., TAKEBAYASHI, H., ISHIWATA, S., ONO, Y. & HOSHINO, M. 2014. Temporal identity transition from Purkinje cell progenitors to GABAergic interneuron progenitors in the cerebellum. *Nat Commun*, 5, 3337.
- SHAH, P. T., STRATTON, J. A., STYKEL, M. G., ABBASI, S., SHARMA, S., MAYR, K. A., KOBLINGER, K., WHELAN, P. J. & BIERNASKIE, J. 2018. Single-Cell Transcriptomics and Fate Mapping of Ependymal Cells Reveals an Absence of Neural Stem Cell Function. *Cell*, 173, 1045-1057 e9.
- SHAPIRO, L. A., NG, K., ZHOU, Q. Y. & RIBAK, C. E. 2009. Subventricular zone-derived, newly generated neurons populate several olfactory and limbic forebrain regions. *Epilepsy Behav*, 14 Suppl 1, 74-80.
- SHEN, Q., WANG, Y., DIMOS, J. T., FASANO, C. A., PHOENIX, T. N., LEMISCHKA, I. R., IVANOVA, N. B., STIFANI, S., MORRISEY, E. E. & TEMPLE, S. 2006. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci*, 9, 743-51.
- SHEN, Q., WANG, Y., KOKOVAY, E., LIN, G., CHUANG, S. M., GODERIE, S. K., ROYSAM, B. & TEMPLE, S. 2008. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell*, 3, 289-300.
- SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., HOSHIKAWA, K., GOLDMAN, J. E., SEKINO, Y. & SATO, K. 2014. Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci*, 34, 2231-43.
- SHIMOZAKI, K., CLEMENSON, G. D., JR. & GAGE, F. H. 2013. Paired related homeobox protein 1 is a regulator of stemness in adult neural stem/progenitor cells. *J Neurosci*, 33, 4066-75.
- SHIN, Y. H., LEE, S. J. & JUNG, J. 2012. Secretion of ATP from Schwann cells through lysosomal exocytosis during Wallerian degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*, 429, 163-7.
- SHRESTHA, S. S., PARMAR, M., KENNEDY, C. & BUSHELL, T. J. 2010. Two-pore potassium ion channels are inhibited by both G(q/11)- and G(i)-coupled P2Y receptors. *Mol Cell Neurosci*, 43, 363-9.
- SIDMAN, R. L. & RAKIC, P. 1973. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res*, 62, 1-35.
- SILBEREIS, J., HEINTZ, T., TAYLOR, M. M., GANAT, Y., MENT, L. R., BORDEY, A. & VACCARINO, F. 2010. Astroglial cells in the external granular layer are precursors of cerebellar granule neurons in neonates. *Mol Cell Neurosci*, 44, 362-73.
- SILVA, A. O., ERCOLE, C. E. & MCLOON, S. C. 2003. Regulation of ganglion cell production by Notch signaling during retinal development. *J Neurobiol*, 54, 511-24.
- SIMON, J., VIGNE, P., EKLUND, K. M., MICHEL, A. D., CARRUTHERS, A. M., HUMPHREY, P. P., FRELIN, C. & BARNARD, E. A. 2001. Activity of adenosine diphosphates and triphosphates on a P2Y(T)-type receptor in brain capillary endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 132, 173-82.
- SINGER, D., THAMM, K., ZHUANG, H., KARBANOVA, J., GAO, Y., WALKER, J. V., JIN, H., WU, X., COVENEY, C. R., MARANGONI, P., LU, D., GRAYSON, P. R. C., GULSEN, T., LIU, K. J., ARDU, S., WANN, A. K., LUO, S., ZAMBON, A. C., JETTEN, A. M., TREDWIN, C., KLEIN, O. D., ATTANASIO, M., CARMELIET, P., HUTTNER, W. B., CORBEIL, D. & HU, B. 2019. Prominin-1 controls stem cell activation by orchestrating ciliary dynamics. *EMBO J*, 38.
- SINGLA, V. & REITER, J. F. 2006. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science*, 313, 629-33.
- SIRKO, S., BEHRENDT, G., JOHANSSON, P. A., TRIPATHI, P., COSTA, M., BEK, S., HEINRICH, C., TIEDT, S., COLAK, D., DICHGANS, M., FISCHER, I. R., PLESNILA, N., STAUFENBIEL, M., HAASS, C., SNAPYAN, M., SAGHATELYAN, A., TSAI, L. H., FISCHER, A., GROBE, K., DIMOU, L. & GOTZ, M. 2013. Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]. *Cell Stem Cell*, 12, 426-39.
- SIRKO, S., IRMLER, M., GASCON, S., BEK, S., SCHNEIDER, S., DIMOU, L., OBERMANN, J., DE SOUZA PAIVA, D., POIRIER, F., BECKERS, J., HAUCK, S. M., BARDE, Y. A. & GOTZ, M. 2015. Astrocyte reactivity after brain injury-: The role of galectins 1 and 3. *Glia*, 63, 2340-61.
- SONG, J., ZHONG, C., BONAGUIDI, M. A., SUN, G. J., HSU, D., GU, Y., MELETIS, K., HUANG, Z. J., GE, S., ENIKOLOPOV, G., DEISSEROTH, K., LUSCHER, B., CHRISTIAN, K. M., MING, G. L. & SONG, H.

2012. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*, 489, 150-4.
- SOTELO, C. 2004. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol*, 72, 295-339.
- SOTELO, C. & WASSEF, M. 1991. Cerebellar development: afferent organization and Purkinje cell heterogeneity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 331, 307-13.
- SPASSKY, N., MERKLE, F. T., FLAMES, N., TRAMONTIN, A. D., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci*, 25, 10-8.
- SREEDHARAN, S., SHAIK, J. H., OLSZEWSKI, P. K., LEVINE, A. S., SCHIOTH, H. B. & FREDRIKSSON, R. 2010. Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression. *BMC Genomics*, 11, 17.
- STEFAN, C., JANSEN, S. & BOLLEN, M. 2006. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signal*, 2, 361-70.
- STEFANI, J., TSCHESNOKOWA, O., PARRILLA, M., ROBAYE, B., BOEYNAEMS, J. M., ACKER-PALMER, A., ZIMMERMANN, H. & GAMPE, K. 2018. Disruption of the Microglial ADP Receptor P2Y13 Enhances Adult Hippocampal Neurogenesis. *Front Cell Neurosci*, 12, 134.
- STEINER, B., KRONENBERG, G., JESSBERGER, S., BRANDT, M. D., REUTER, K. & KEMPERMANN, G. 2004. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia*, 46, 41-52.
- STOJILKOVIC, S. S., TOMIC, M., HE, M. L., YAN, Z., KOSHIMIZU, T. A. & ZEMKOVA, H. 2005. Molecular dissection of purinergic P2X receptor channels. *Ann N Y Acad Sci*, 1048, 116-30.
- SUDAROV, A., TURNBULL, R. K., KIM, E. J., LEBEL-POTTER, M., GUILLEMOT, F. & JOYNER, A. L. 2011. Ascl1 genetics reveals insights into cerebellum local circuit assembly. *J Neurosci*, 31, 11055-69.
- SUH, H., CONSIGLIO, A., RAY, J., SAWAI, T., D'AMOUR, K. A. & GAGE, F. H. 2007. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 1, 515-28.
- SUH, H., DENG, W. & GAGE, F. H. 2009. Signaling in adult neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 253-75.
- SUN, D., SAMUELSON, L. C., YANG, T., HUANG, Y., PALIEGE, A., SAUNDERS, T., BRIGGS, J. & SCHNERMANN, J. 2001. Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9983-8.
- SUYAMA, S., SUNABORI, T., KANKI, H., SAWAMOTO, K., GACHET, C., KOIZUMI, S. & OKANO, H. 2012. Purinergic signaling promotes proliferation of adult mouse subventricular zone cells. *J Neurosci*, 32, 9238-47.
- SUZUKI, S. O. & GOLDMAN, J. E. 2003. Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J Neurosci*, 23, 4240-50.
- TAKAHASHI, K., KAKUDA, Y., MUNEMOTO, S., YAMAZAKI, H., NOZAKI, I. & YAMADA, M. 2015. Differentiation of Donor-Derived Cells Into Microglia After Umbilical Cord Blood Stem Cell Transplantation. *J Neuropathol Exp Neurol*, 74, 862-6.
- TAVAZOIE, M., VAN DER VEKEN, L., SILVA-VARGAS, V., LOUISSAINT, M., COLONNA, L., ZAIDI, B., GARCIA-VERDUGO, J. M. & DOETSCH, F. 2008. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 3, 279-88.
- TEMPLE, S. 1989. Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature*, 340, 471-3.
- TODA, T. & GAGE, F. H. 2018. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res*, 373, 693-709.
- TOKUNAGA, A., TSUKIMOTO, M., HARADA, H., MORIYAMA, Y. & KOJIMA, S. 2010. Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *J Biol Chem*, 285, 17406-16.

- TONG, C. K., CHEN, J., CEBRIAN-SILLA, A., MIRZADEH, Z., OBERNIER, K., GUINTO, C. D., TECOTT, L. H., GARCIA-VERDUGO, J. M., KRIEGSTEIN, A. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2014a. Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 14, 500-11.
- TONG, C. K., HAN, Y. G., SHAH, J. K., OBERNIER, K., GUINTO, C. D. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2014b. Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 12438-43.
- TOZAKI-SAITOH, H., TSUDA, M., MIYATA, H., UEDA, K., KOHSAKA, S. & INOUE, K. 2008. P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, 28, 4949-56.
- ULRICH, H. & ILLES, P. 2014. P2X receptors in maintenance and differentiation of neural progenitor cells. *Neural Regen Res*, 9, 2040-1.
- URBAN, N. & CHEUNG, T. H. 2021. Stem cell quiescence: the challenging path to activation. *Development*, 148.
- VAN ESSEN, M. J., NAYLER, S., BECKER, E. B. E. & JACOB, J. 2020. Deconstructing cerebellar development cell by cell. *PLoS Genet*, 16, e1008630.
- VAN PRAAG, H., SCHINDER, A. F., CHRISTIE, B. R., TONI, N., PALMER, T. D. & GAGE, F. H. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415, 1030-4.
- VASCONCELOS, E. G., FERREIRA, S. T., CARVALHO, T. M., SOUZA, W., KETTLUN, A. M., MANCILLA, M., VALENZUELA, M. A. & VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 1996. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *J Biol Chem*, 271, 22139-45.
- VERGANO-VERA, E., MENDEZ-GOMEZ, H. R., HURTADO-CHONG, A., CIGUDOSA, J. C. & VICARIO-ABEJON, C. 2009. Fibroblast growth factor-2 increases the expression of neurogenic genes and promotes the migration and differentiation of neurons derived from transplanted neural stem/progenitor cells. *Neuroscience*, 162, 39-54.
- VERKHRATSKY, A. 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev*, 85, 201-79.
- VILLEDA, S. A., LUO, J., MOSHER, K. I., ZOU, B., BRITSCHGI, M., BIERI, G., STAN, T. M., FAINBERG, N., DING, Z., EGGEL, A., LUCIN, K. M., CZIRR, E., PARK, J. S., COUILLARD-DESPRES, S., AIGNER, L., LI, G., PESKIND, E. R., KAYE, J. A., QUINN, J. F., GALASKO, D. R., XIE, X. S., RANDO, T. A. & WYSS-CORAY, T. 2011. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, 477, 90-4.
- VOLONTE, C. & D'AMBROSI, N. 2009. Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *FEBS J*, 276, 318-29.
- WACLAW, R. R., ALLEN, Z. J., 2ND, BELL, S. M., ERDELYI, F., SZABO, G., POTTER, S. S. & CAMPBELL, K. 2006. The zinc finger transcription factor Sp8 regulates the generation and diversity of olfactory bulb interneurons. *Neuron*, 49, 503-16.
- WADA, T., HAIGH, J. J., EMA, M., HITOSHI, S., CHADDAH, R., ROSSANT, J., NAGY, A. & VAN DER KOOT, D. 2006. Vascular endothelial growth factor directly inhibits primitive neural stem cell survival but promotes definitive neural stem cell survival. *J Neurosci*, 26, 6803-12.
- WALSH, C. & CEPKO, C. L. 1988. Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science*, 241, 1342-5.
- WALSH, C. & CEPKO, C. L. 1992. Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science*, 255, 434-40.
- WALLACE, V. A. 1999. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol*, 9, 445-8.
- WANG, D. D., KRUEGER, D. D. & BORDEY, A. 2003. GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. *J Physiol*, 550, 785-800.

- WANG, V. Y., ROSE, M. F. & ZOGHBI, H. Y. 2005. Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron*, 48, 31-43.
- WEISHEIT, G., GLIEM, M., ENDL, E., PFEFFER, P. L., BUSSLINGER, M. & SCHILLING, K. 2006. Postnatal development of the murine cerebellar cortex: formation and early dispersal of basket, stellate and Golgi neurons. *Eur J Neurosci*, 24, 466-78.
- WEISMAN, G. A., AJIT, D., GARRAD, R., PETERSON, T. S., WOODS, L. T., THEBEAU, C., CAMDEN, J. M. & ERB, L. 2012. Neuroprotective roles of the P2Y(2) receptor. *Purinergic Signal*, 8, 559-78.
- WEISSMAN, I. L., ANDERSON, D. J. & GAGE, F. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 387-403.
- WEISSMAN, T. A., RIQUELME, P. A., IVIC, L., FLINT, A. C. & KRIEGSTEIN, A. R. 2004. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, 43, 647-61.
- WHITE, J. J. & SILLITOE, R. V. 2013. Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2, 149-64.
- WILLIAMS, B. P. & PRICE, J. 1995. Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex. *Neuron*, 14, 1181-8.
- WILLIAMS, B. P., READ, J. & PRICE, J. 1991. The generation of neurons and oligodendrocytes from a common precursor cell. *Neuron*, 7, 685-93.
- WINGATE, R. J. 2001. The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 82-8.
- 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, 543-52.
- WITTKO, I. M., SCHANZER, A., KUZMICHEV, A., SCHNEIDER, F. T., SHIBUYA, M., RAAB, S. & PLATE, K. H. 2009. VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J Neurosci*, 29, 8704-14.
- WU, S., WU, Y. & CAPECCHI, M. R. 2006. Motoneurons and oligodendrocytes are sequentially generated from neural stem cells but do not appear to share common lineage-restricted progenitors in vivo. *Development*, 133, 581-90.
- XIE, X. P., LAKS, D. R., SUN, D., PORAN, A., LAUGHNEY, A. M., WANG, Z., SAM, J., BELENGUER, G., FARINAS, I., ELEMENTO, O., ZHOU, X. & PARADA, L. F. 2020. High-resolution mouse subventricular zone stem-cell niche transcriptome reveals features of lineage, anatomy, and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 31448-31458.
- XU, H., YANG, Y., TANG, X., ZHAO, M., LIANG, F., XU, P., HOU, B., XING, Y., BAO, X. & FAN, X. 2013. Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. *Mol Neurobiol*, 47, 833-44.
- YAMADA, K. & WATANABE, M. 2002. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int*, 77, 94-108.
- YAMADA, M., SETO, Y., TAYA, S., OWA, T., INOUE, Y. U., INOUE, T., KAWAGUCHI, Y., NABESHIMA, Y. & HOSHINO, M. 2014. Specification of spatial identities of cerebellar neuron progenitors by ptf1a and atoh1 for proper production of GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurosci*, 34, 4786-800.
- YANG, R., WANG, M., WANG, J., HUANG, X., YANG, R. & GAO, W. Q. 2015. Cell Division Mode Change Mediates the Regulation of Cerebellar Granule Neurogenesis Controlled by the Sonic Hedgehog Signaling. *Stem Cell Reports*, 5, 816-828.
- YASUDA, T., BARTLETT, P. F. & ADAMS, D. J. 2008. K(ir) and K(v) channels regulate electrical properties and proliferation of adult neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci*, 37, 284-97.
- YEGUTKIN, G. G. 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 673-94.
- YEH, C. Y., ASRICAN, B., MOSS, J., QUINTANILLA, L. J., HE, T., MAO, X., CASSE, F., GEBARA, E., BAO, H., LU, W., TONI, N. & SONG, J. 2018. Mossy Cells Control Adult Neural Stem Cell Quiescence and

- Maintenance through a Dynamic Balance between Direct and Indirect Pathways. *Neuron*, 99, 493-510 e4.
- YEUNG, J., HA, T. J., SWANSON, D. J. & GOLDOWITZ, D. 2016. A Novel and Multivalent Role of Pax6 in Cerebellar Development. *J Neurosci*, 36, 9057-69.
- YOUNG, A., MACHACEK, D. W., DHARA, S. K., MACLEISH, P. R., BENVENISTE, M., DODLA, M. C., STURKIE, C. D. & STICE, S. L. 2011. Ion channels and ionotropic receptors in human embryonic stem cell derived neural progenitors. *Neuroscience*, 192, 793-805.
- YOUNG, K. M., FOGARTY, M., KESSARIS, N. & RICHARDSON, W. D. 2007. Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *J Neurosci*, 27, 8286-96.
- YUNG, S. Y., GOKHAN, S., JURCSAK, J., MOLERO, A. E., ABRAJANO, J. J. & MEHLER, M. F. 2002. Differential modulation of BMP signaling promotes the elaboration of cerebral cortical GABAergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog-responsive ventral forebrain progenitor species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 16273-8.
- YUZWA, S. A., BORRETT, M. J., INNES, B. T., VORONOVA, A., KETELA, T., KAPLAN, D. R., BADER, G. D. & MILLER, F. D. 2017. Developmental Emergence of Adult Neural Stem Cells as Revealed by Single-Cell Transcriptional Profiling. *Cell Rep*, 21, 3970-3986.
- ZHANG, D., GAO, Z. G., ZHANG, K., KISELEV, E., CRANE, S., WANG, J., PAOLETTA, S., YI, C., MA, L., ZHANG, W., HAN, G. W., LIU, H., CHEREZOV, V., KATRITCH, V., JIANG, H., STEVENS, R. C., JACOBSON, K. A., ZHAO, Q. & WU, B. 2015. Two disparate ligand-binding sites in the human P2Y1 receptor. *Nature*, 520, 317-21.
- ZHANG, H., VUTSKITS, L., PEPPER, M. S. & KISS, J. Z. 2003. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol*, 163, 1375-84.
- ZHANG, J., ZHANG, K., GAO, Z. G., PAOLETTA, S., ZHANG, D., HAN, G. W., LI, T., MA, L., ZHANG, W., MULLER, C. E., YANG, H., JIANG, H., CHEREZOV, V., KATRITCH, V., JACOBSON, K. A., STEVENS, R. C., WU, B. & ZHAO, Q. 2014. Agonist-bound structure of the human P2Y12 receptor. *Nature*, 509, 119-22.
- ZHANG, L. & GOLDMAN, J. E. 1996. Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. *J Comp Neurol*, 370, 536-50.
- ZHANG, X., SANTUCCIONE, A., LEUNG, C. & MARINO, S. 2011. Differentiation of postnatal cerebellar glial progenitors is controlled by Bmi1 through BMP pathway inhibition. *Glia*, 59, 1118-31.
- ZHANG, X. P., ZHENG, G., ZOU, L., LIU, H. L., HOU, L. H., ZHOU, P., YIN, D. D., ZHENG, Q. J., LIANG, L., ZHANG, S. Z., FENG, L., YAO, L. B., YANG, A. G., HAN, H. & CHEN, J. Y. 2008. Notch activation promotes cell proliferation and the formation of neural stem cell-like colonies in human glioma cells. *Mol Cell Biochem*, 307, 101-8.
- ZHAO, C., DENG, W. & GAGE, F. H. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132, 645-60.
- ZHAO, M., MOMMA, S., DELFANI, K., CARLEN, M., CASSIDY, R. M., JOHANSSON, C. B., BRISMAR, H., SHUPLIAKOV, O., FRISEN, J. & JANSON, A. M. 2003. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7925-30.
- ZHOU, P., PORCIONATTO, M., PILAPIL, M., CHEN, Y., CHOI, Y., TOLIAS, K. F., BIKOFF, J. B., HONG, E. J., GREENBERG, M. E. & SEGAL, R. A. 2007. Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron*, 55, 53-68.
- ZIMMERMANN, H. 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J*, 285 (Pt 2), 345-65.
- ZIMMERMANN, H. 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 49, 589-618.
- ZIMMERMANN, H. 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362, 299-309.
- ZIMMERMANN, H., ZEBISCH, M. & STRATER, N. 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*, 8, 437-502.