

Tesis Doctoral

Efectos de la exposición prenatal al agonista cannabinoide WIN55,212-2 sobre la proliferación, la migración y el citoesqueleto neuronal de la rata

Saez, Trinidad María de los Milagros

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Saez, Trinidad María de los Milagros. (2012). Efectos de la exposición prenatal al agonista cannabinoide WIN55,212-2 sobre la proliferación, la migración y el citoesqueleto neuronal de la rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Saez, Trinidad María de los Milagros. "Efectos de la exposición prenatal al agonista cannabinoide WIN55,212-2 sobre la proliferación, la migración y el citoesqueleto neuronal de la rata". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Efectos de la exposición prenatal al agonista cannabinoide
WIN55,212-2 sobre la proliferación, la migración y el
citoesqueleto neuronal de la rata.**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Ciencias Biológicas

Trinidad María de los Milagros Saez

Director de tesis: Dra. Herminia Alicia Brusco

Consejero de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencia, Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2012.

“Efectos de la exposición prenatal al agonista cannabinoide WIN55,212-2 sobre la proliferación, la migración y el citoesqueleto neuronal de la rata”.

Resumen

El sistema endocannabinoide (eCB), compuesto por los receptores cannabinoideos (rCB1 y rCB2), ligandos endógenos (endocannabinoideos), y enzimas de síntesis y degradación, está presente en el cerebro desde etapas muy tempranas de su desarrollo. En este periodo, el sistema eCB está involucrado en la regulación de la proliferación de progenitores neuronales, en la especificación, la migración y la diferenciación de neuronas piramidales e interneuronas y también en la sinaptogénesis. El consumo de marihuana durante la gestación representa un gran riesgo para el desarrollo del sistema nervioso central de los fetos, dado que el Δ^9 -tetrahidrocannabinol, el principal compuesto activo del *cannabis*, atraviesa la placenta y la barrera hemato-encefálica. Estudios realizados en niños y adolescentes cuyas madres consumieron marihuana durante el embarazo, documentaron anomalías cognitivas y comportamentales. En este trabajo se demostró la expresión del rCB1 durante la corticogénesis en neuronas postmitóticas en migración, así como en diversas poblaciones neuronales. Además, el presente trabajo aporta evidencias sobre los efectos que produce la exposición materna a un agonista cannabinoide sobre las neuronas postmitóticas en migración y la diferenciación de neuronas del linaje glutamatérgico. Estos resultados contribuyen al conocimiento sobre los sustratos neurobiológicos que determinarían los cambios neuro-comportamentales que persistentes en las funciones cerebrales durante la vida postnatal. Asimismo, se demostró que ratones CB1 *knockout* mostraron una disminución en el número de progenitores intermedios y un aumento en el número de neuronas postmitóticas glutamatérgicas. Durante la vida postnatal, la delección del rCB1 indujo una distribución de interneuronas anormal. En suma, los resultados obtenidos en este trabajo constituyen avances originales sobre el papel del sistema endocannabinoide en el desarrollo de la corteza cerebral.

Palabras clave: cannabinoideos, exposición prenatal, desarrollo de la corteza cerebral, migración neuronal, diferenciación neuronal.

“Effect of prenatal exposure to the cannabinoide receptor agonist WIN55,212-2 on neuronal proliferation, migration and neuronal cytoskeleton in the cerebral cortex of the rat”

Abstract

The endocannabinoid system (eCB), formed by the cannabinoid receptors (rCB1 and rCB2), endogenous ligands (endocannabinoids) and synthesis and degradation enzymes, is present since early stages of brain development. During this period, the eCB is involved in the regulation of proliferation of neural progenitors and in specification, migration and differentiation of pyramidal neurons and interneurons as well as in synaptogenesis. Marijuana consumption during pregnancy represents a serious risk for the proper development of the fetus's brain since Δ^9 -tetrahydrocannabinol, main active compound of *cannabis*, can reach the fetus through placenta and hemato-encephalic barrier. Cohort studies performed on children and adolescents of mothers who consumed marijuana during pregnancy, reported cognitive and comportamental abnormalities in these subjects. In the present study, we demonstrated the expression of the rCB1 during corticogenesis in migrating post-mitotic neurons as well as in other neuronal populations. Moreover, this Thesis work provides evidence on the effects accounted by prenatal exposure to a cannabinois agonist on migrating post-mitotic neurons and the differentiation of glutamatergic neurons. The present results contribute to the knowledge on neurobiologic substrates that determine neuro-comportamental changes that will persist through post-natal life. Finally, it was also proved that CB1 *knockout* mice showed a diminished number of intermediate progenitors and a higher number of glutamatergic post-mitotic neurons. During post-natal life, the deletion of rCB1 induced an abnormal distribution of interneurons. In summary, the results presented in this Thesis work represent an original advance in the understanding of the role played by the eCB system in the development of the cerebral cortex.

Key words: cannabinoids, prenatal exposure, cerebral cortex development, neuronal migration, neuronal differentiation.

A Alicia Brusco, por la absoluta libertad que me brindó desde mis primeros pasos en la neurociencia. Por la confianza que depositó en mi sobre cada una de mis ideas.

A todos los docentes de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por brindarme una excelente formación durante mis años de licenciatura.

A los secretarios del Departamento de Biología de la FCEyN, Luis Vazquez y Ana Bondia, gracias por resolver mis problemas burocráticos al instante!

Al CONICET y la UBA, por financiar mi doctorado.

A los investigadores del IBCN que me brindaron su ayuda y sus consejos.

A todos los profesores, JTPs y ayudantes de la cátedra que compartieron conmigo la grata tarea de enseñar histología.

A todos los becarios del IBCN que compartieron conmigo todos estos años: Antonella, Eugenia, Victorio, Sebastian, Gabriela, Lucas, Fernando, Lola, Paula F, Francisco, Diego, Sabrina, Cecilia, Helena, Luciano, Jenifer, Alejandro, Florencia, Rolando, Alejandra, Verónica, Marina, Victoria O. Gracias por las charlas de pasillo, por los consejos técnicos y no técnicos!

A Gabriela Otero y Tomás Falzone, por su ayuda en mis últimos experimentos.

A la Dra. Preciado y su becaria Pamela Valva por prestarme los insumos para el TUNEL. A los chicos del labo de Mario: sé que me brindan todo su apoyo, gracias por preocuparse por mí!

A Manuel Wolfson y Julieta Aisemberg, por compartir conmigo el cuidado de los *Knockout* y por realizar la genotipificación.

A Alicia Guevara, por enseñarme mis primeras técnicas en el laboratorio... tus conocimientos aún siguen siendo muy valiosos para mí.

A Silvia Mauro, gracias por estar siempre presente para resolver los problemas burocráticos del labo, especialmente por todos tus consejos.

A Mery, gracias por ocuparte de mantener constantemente la provisión de nuestras bebidas básicas! Gracias por ocuparte de todo lo que necesitábamos.

A Marga, por compartir todos estos años en el labo.

A Andrea Pecile, mil gracias por tu dedicación y empeño en el cuidado de mis animales.

A Lisandro Anton: qué paciencia!....gracias por tu asesoramiento ingenieril a toda hora!

A Damian Rutolo, gracias por escuchar todos mis dramas hipocondríacos derivados de la dura vida de decorando!

A Marina Vacotto, gracias por toda tu ayuda en el labo, por las charlas confocalísticas!

A las diosas totales! (nuestro pequeño e incondicional grupo de auto-ayuda!): María Rosa, Laura, Tamara, Paula, Eugenia, Antonella....gracias por todos los momentos compartidos....especialmente por las charlas de los más variados tópicos!

A María Rosa Katunar (Mery!), amiga!...gracias por transitar conmigo el áspero camino de los primeros años de doctorado. Gracias por contagiarme de tu risa y tu energía, por animarme cuando lo necesité (gracias por hacerme creer que soy una grosa!). Gracias por los miles de alfajores y chocolates a cambio de un lugarcito en la mesada! Miles de gracias amiga!

A Laura Caltana (Lowry!), gracias por poner orden en el labo!, por tu dedicación y compañerismo, por estar siempre presente en todos los problemas del labo. Siempre dispuesta a ayudar, siempre lista!

A Paula Aronne (Paulis!), gracias por contagiarme tu risa (y por compartir hasta la tortura los 2 o 3 CDs que pasaste una y otra vez en el labo!). Gracias por las extensas charlas introspectivas.

A Tamara Guadagnoli (Tamiflux), gracias por hacer del laboratorio un laboratorio feliz. Gracias por tus miles de consejos extra-científicos!

A Sergio Evrard, mi psiquiatra personal...gracias por escucharme s!, gracias por hacerme notar el valor de mi trabajo!

A Victorio Pozo Devoto, gracias por compartir todos estos años en el labo y en los TPs, por tu ayuda con mi trabajo, y especialmente nuestras charlas!

A Eugenia Bogetti, gracias por compartir absolutamente todo!

A Antonella Bonafina, gracias por desparramar simpatía por el IBCN!

A Jimena Ricatti, la nueva no nueva del labo!, gracias por levantarme el ánimo cuando lo necesité!

A Sebastian Giusti, el mundo necesita de más personas como vos!, gracias por enseñarme a enseñar!

A Analía Czerniczyniec, por los congresos compartidos!

A mis amigos de exactas: Vir, Nico, Nuria, Jime, Juaju, Javi, Marian, Flaco, Anabella, Analía, Gon, Martín, Luis, Fer, Charly, Marianito. Muchas gracias por todos los momentos compartidos allá lejos cuando éramos estudiantes y aún en el presente.

A mis hermanos: Conrado, Melania, Constantino, Stefania y Sofía, muchas gracias por estar siempre presente en mi vida. Mela y Ben: eternamente agradecida por darme mis dos sobrinitos adorables que me alegran la vida, Oliver y Etienne!

A mi mamá, gracias por contagiarme tu pasión por la naturaleza y la curiosidad por todo!. Gracias por todos tus años de completa dedicación, por tu apoyo y tus consejos. Gracias totales!

A Mario, mi pájaro carpintero personal!...gracias por taladrarme la cabeza todos estos años diciéndome una y otra vez que puedo hacerlo!. Por tus meticulosas correcciones en mi tesis. Gracias por ser mi gran compañero en todo momento!.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL DESARROLLO DE LA CORTEZA CEREBRAL	1
1.1.1. Neurogénesis durante el desarrollo	2
1.1.2. Origen de las neuronas de proyección corticales	5
1.1.3. Origen de las interneuronas corticales	7
1.1.4. Origen de las células de Cajal-Retzius	8
1.1.5. Migración neuronal en el telencéfalo en desarrollo	9
1.1.5.1. Migración radial	9
1.1.5.2. Migración tangencial	10
1.1.5.3. Mecanismos celulares de migración neuronal	12
1.1.5.4. Mecanismos moleculares de regulación de la migración neuronal	13
1.2. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE DURANTE EL DESARROLLO	15
1.2.1. Ontogenia del sistema endocannabinoide	16
1.2.1.1. Receptor cannabinoide tipo 1 (rCB1)	16
1.2.1.2. Receptor cannabinoide tipo 2 (rCB2)	18
1.2.1.3. Endocannabinoides y enzimas de síntesis y degradación	18
1.2.2. El rol del sistema endocannabinoide durante el desarrollo	19
1.2.2.1. Regulación de la proliferación de progenitores neurales	20
1.2.2.2. Regulación de la migración neuronal	22
1.2.2.3. Regulación de la guía axonal y sinaptogénesis	23
1.3. CONSECUENCIAS DE LA EXPOSICION PRENATAL A CANNABINOIDES	24
1.3.1. Consecuencias de la exposición prenatal a la marihuana en humanos	25
1.3.2. Consecuencias de la exposición prenatal a cannabinoides en modelos animales...	26
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	28
3. MATERIALES Y METODOS	29
3.1. Animales de experimentación	29
3.1.1. Cuidado y origen de los animales de experimentación	29
3.1.2. Apareamiento y diagnóstico de la preñez	29
3.1.3. Análisis de genotipificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
3.2. Modelo experimental: tratamiento prenatal con el agonista de receptores cannabinoides CB₁/CB₂ WIN55,212-2	30
3.2.1. Tratamiento	30

3.2.2. Control de parámetros gestacionales	31
3.3. Estudios por microscopía óptica y confocal	32
3.3.1. Procesamiento de los embriones para el análisis histológico	32
3.3.2. Procesamiento de los animales postnatales para el análisis histológico	32
3.3.3. Selección de secciones de tejido: áreas cerebrales evaluadas	33
3.3.4. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ)	34
3.3.5. Técnica de inmunofluorescencia (IF)	35
3.3.6. Controles de la técnica de IHQ e IF	36
3.3.7. Anticuerpos primarios	37
3.3.8. Anticuerpos secundarios	37
3.3.9. Reacción de TUNEL	38
3.3.10. Microscopía y adquisición de imágenes	38
3.3.11. Análisis de cuantificación sobre las imágenes adquiridas	38
3.4. Ensayo de Western Blot (WB)	40
3.4.1. Obtención de la fracción proteica total	40
3.4.2. Electroforesis y electrotransferencia	40
3.4.3. Inmunoblot	40
3.4.4. Anticuerpos primarios	41
3.4.5. Anticuerpos secundarios	41
3.4.6. Análisis semicuantitativo de WB	42
3.5. Análisis estadístico	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración DCX positivas y en neuronas calretinina, reelina y calbindina positivas durante el desarrollo prenatal de la corteza cerebral de la rata	43
4.1.1. Expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración	43
4.1.2. Expresión del rCB1 en neuronas reelina, calretinina y calbindina positivas	47
4.1.2.1. Expresión del rCB1 en neuronas reelina positivas	47
4.1.2.2. Expresión del rCB1 en neuronas calretinina positivas	49
4.1.2.3. Expresión del rCB1 en neuronas calbindina positivas	50
4.2. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre el desarrollo de la corteza cerebral de la rata	54
4.2.1. Efectos de la exposición prenatal a WIN sobre parámetros gestacionales	54

4.2.2. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre las neuronas postmitóticas en migración durante el desarrollo de la corteza cerebral	55
4.2.3. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre las interneuronas GABAérgicas en migración durante el desarrollo de la corteza cerebral	58
4.2.4. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre la proliferación y la muerte celular programada durante el desarrollo de la corteza cerebral	60
4.2.5. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre la diferenciación neuronal del linaje glutamatérgico	63
4.2.6. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre las células de Cajal-Retzius y la glía radial	68
4.3. Consecuencias de la deleción del rCB1 sobre el desarrollo de la corteza cerebral de ratón	71
..... 4.3.1. Efecto de la deleción del rCB1 sobre las neuronas postmitóticas en migración durante el desarrollo de la corteza cerebral	73
4.3.2. Efecto de la deleción del rCB1 sobre la diferenciación neuronal del linaje glutamatérgico	71
4.3.3. Consecuencias de la deleción del rCB1 sobre la citoarquitectura cortical en edades postnatales	75
4.3.3.1. Consecuencias de la deleción del rCB1 sobre la distribución de interneuronas corticales.....	75
4.3.3.2. Consecuencias de la deleción del rCB1 sobre el citoesqueleto neuronal	79
5. DISCUSIÓN	82
5.1. Expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración y en distintos subtipos neuronales durante la corticogénesis	80
5.2. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre la proliferación, migración y diferenciación neuronal de la corteza cerebral en desarrollo de la rata	85
5.3. Consecuencias de la deleción del rCB1 sobre la diferenciación de neuronas glutamatérgicas y la citoarquitectura de la corteza cerebral del ratón	92
6. CONCLUSIÓN	96
7. BIBLIOGRAFÍA	97

Abreviaturas

2-AG	2-araquidonilglicerol
AEA	anandamida
AEP	anteroentopeduncular
ApoER2	receptor de apolipoproteína E 2
BA	solución amortiguadora de acetato
BSA	seroalbúmina bovina
CALB	calbindina
cC-R	células de Cajal-Retzius
cGR	células de la glía radial
cNE	célula neuroepitelial
CCK	colecistoquinina
cPI	célula progenitora intermedia
CALR	calretinina
DAGα/β	<i>sn</i> -1-diacilglicerol lipasa
DCX	doblecortina
DP	día postnatal
E	día embrionario
EEM	error estándar medio
eCB	endocannabinoide
EG	Eminencia ganglionar
EGC	eminencia ganglionar caudal
EGL	eminencia ganglionar lateral
EGM	eminencia ganglionar media
FAAH	amino hidrolasa de ácidos grasos
GABA	ácido γ -aminobutírico
IF	inmunofluorescencia
IHQ	inmunohistoquímica
MAP	proteína asociada a microtúbulos
MGL	monoacilglicerol lipasa 1/2
NAPE-FLD	N-acil-fosfatidiletanolamida fosfolipasa D
NF-200	neurofilamento de 200KDa
PB	solución amortiguadora de fosfatos

PBS	solución salina amortiguadora de fosfatos
PBST	solución salina amortiguadora de fosfatos - Tween
PC	placa cortical
PN	progenitor neural
PP	preplaca
rCB1	receptor cannabinoide tipo 1
rCB2	receptor cannabinoide tipo 2
SNC	sistema nervioso central
SP	subplaca
Tbr1	factor de transcripción T-box 1
Tbr2	factor de transcripción T-box 2
THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
Vldlr	receptor de lipoproteína de muy baja densidad
WB	Western blot
WIN	WIN55,212-2
ZI	zona intermedia
ZM	zona marginal
ZSV	zona subventricular
ZV	zona ventricular

Resultados de esta tesis enviados para su publicación:

- *Effect of prenatal exposure to a cannabinoid receptor agonist on early-born glutamatergic neurons and tangentially migrating interneurons in the embryonic rat cerebral cortex.* **Saez TMM**; Caltana L; Aronne MP; Brusco A. Enviado a PlosOne. Estado: en revisión.

Otros trabajos publicados:

- *Ontogenetic Expression of Dopamine-Related Transcription Factors and Tyrosine Hydroxylase in Prenatally Stressed Rats.* Katunar MR., **Saez TMM.**, Brusco HA., Antonelli MC., 2010. *Neurotoxicity Research*;18(1):69-81.
- *Immunocytochemical expression of dopamine-related transcription factors Pitx3 and Nurr1 in prenatally stressed adult rats.* Katunar MR., **Saez TMM.**, Brusco HA., Antonelli MC., 2009. *Journal of Neuroscience Research*; 87(4):1014-22 87(4):1014-22.
- *Ultrastructural localization of neuronal brain CB₂ cannabinoid receptors.* Brusco HA, Tagliaferro PA., **Saez TMM.**, Onaivi ES., 2008. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1139:450-7.
- *Postsynaptic localization of CB₂ cannabinoid receptors in the rat hippocampus.* Brusco HA, Tagliaferro PA, **Saez TMM**, Onaivi ES., 2008. *Synapse*; 62(12):944-9.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. EL DESARROLLO DE LA CORTEZA CEREBRAL

El telencéfalo es la estructura del sistema nervioso central (SNC) responsable de las capacidades cognitivas superiores como el aprendizaje, la memoria, la conciencia, las emociones, la percepción de los sentidos y la coordinación motora [Striedter, 2006]. Está constituido por la corteza cerebral, el hipocampo, el bulbo olfatorio, los ganglios basales y la amígdala. Durante el desarrollo, el telencéfalo se divide en telencéfalo dorsal o palio, el cual formará la corteza cerebral, y telencéfalo ventral o subpalio, el cual formará los ganglios de la base. La corteza cerebral se origina a partir del neuroepitelio localizado en la parte dorso-caudal de las vesículas telencefálicas.

La neocorteza de los mamíferos es una estructura laminada compleja constituida por seis capas de neuronas. Dentro de cada capa, las neuronas presentan identidades específicas y forman conexiones sinápticas locales y de larga distancia. En la corteza cerebral postnatal existen dos poblaciones neuronales: las neuronas de proyección excitatorias (glutamatérgicas) y las neuronas de circuito local o interneuronas inhibitorias (GABAérgicas). Las neuronas de proyección representan el 80% del total de la población neuronal, utilizan glutamato como neurotransmisor y forman sinapsis de tipo excitatorias con otras áreas corticales; el tálamo, el cuerpo estriado, el tallo encefálico y la medula espinal. Dichas neuronas se originan a partir de progenitores de la zona germinal del telencéfalo dorsal o palio. Por su parte, las interneuronas GABAérgicas representan el 20% de la población neuronal y utilizan principalmente ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor y forman sinapsis de tipo inhibitoria con otras neuronas de proyección en la corteza. Se originan en la zona germinal del telencéfalo ventral o subpalio, y migran tangencialmente hacia la neocorteza [Anderson y col., 2002; Tan y col., 1998]. De esta manera, múltiples zonas progenitoras contribuyen a la gran variedad de tipos neuronales hallados en la neocorteza en desarrollo.

El desarrollo normal del SNC está orquestado por eventos moleculares y celulares sincronizados de manera precisa que comprenden la inducción de la placa neural, la proliferación neuronal, la especificación del destino neuronal, la migración y diferenciación neuronal, el crecimiento y la guía axonal, la sinaptogénesis y la muerte

celular programada. Particularmente, el ensamble de la corteza cerebral se produce a través de múltiples procesos que tienen lugar durante su construcción, incluyendo: i) la regulación de un correcto número de neuronas producidas por progenitores neurales, ii) la generación espacial y temporal de los distintos subtipos neuronales, y iii) el control de la migración y posicionamiento laminar y finalmente la diferenciación neuronal. Todos estos procesos son blancos potenciales de perturbación por la exposición a drogas durante periodos críticos del desarrollo.

1.1.1. Neurogénesis durante el desarrollo:

Durante el proceso de neurogénesis en la neocorteza en desarrollo, se describieron tres tipos básicos de progenitores neurogénicos: las células neuroepiteliales (cNE), las células de la glía radial (cGR) y las células progenitoras intermedias (cPI) [Kriegstein y col., 2009] (**Tabla 1**).

Tabla 1. Células progenitoras neurogénicas en la corteza cerebral en desarrollo de roedores.

	cNE	cGR	cPI
Edad	E9,5-E13,5	E11,5-P0,5	E10,5-P0,5
Morfología	radial	radial	multipolar (pocas radial)
Migración nuclear	intercínética	intercínética	multipolar
Mitosis	apical	apical	basal (rara apical)
Ciclos mitóticos	ilimitados	≥10	1-3
Destino de las células hijas	cNE, cGR, cPI, N	cGR, cPI, N	cPI, N
Marcador	nestina, prominina 1,	Pax6, vimentina, nestina, GLAST	Tbr2, Cux1, Cux2

Abreviaturas: cNE, célula neuroepitelial; cGR, célula de la glía radial; cPI, célula progenitora intermedia; N, neurona postmitótica.

Células neuroepiteliales. Previo al comienzo de la neurogénesis, la placa y el tubo neural se componen de una sola capa pseudoestratificada de cNE que limitan con la luz del ventrículo y forman la zona ventricular (ZV). Las cNE muestran características típicas de las células epiteliales: polarización a lo largo de su eje basal-apical, uniones estrechas y adherentes en el dominio latero-apical, expresión de receptores en el

dominio basal para compuestos de la lámina basal y proteínas transmembrana en el dominio apical. Si bien las cNE se dividen principalmente de manera simétrica para expandir el *pool* de progenitores multipotentes, un pequeño porcentaje se divide asimétricamente para generar las primeras neuronas postmitóticas [Gotz y col., 2005; Kriegstein y col., 2009].

Células de la glía radial. Después del inicio de la neurogénesis cortical, aproximadamente en el día embrionario 9-10 (E9-10) en los roedores, las cNE dan origen a las cGR. Las cGR presentan características residuales de las células epiteliales (expresión de nestina, presencia de uniones adherentes y el mantenimiento de una superficie apical con la característica polaridad basal-apical), así como también las características asociadas a células de la glía (expresión del transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST), la proteína de unión a Ca^{2+} S100 β). A su vez, en forma adicional, expresan filamentos intermedios en sus procesos radiales, como vimentina, y proteínas asociadas a estos, como la proteína célula radial 1 y 2 (RC1 y RC2) y en algunas especies la proteína acida fibrilar glial (GFAP)[Campbell y col., 2002; Gotz, 2003; Gotz y col., 2005; Kriegstein y col., 2009; Kriegstein y col., 2003; Mori y col., 2005]. Las cGR presentan una larga prolongación radial que se extiende desde la pared del ventrículo hasta la superficie pial y que se mantiene anclada a ambas superficies por uniones adherentes. Las cGR representan progenitores neurales (PN) con un destino más restrictivo que las cNE, dado que la mayoría de las cGR están restringidas a la generación de un solo tipo celular: astrocitos, oligodendrocitos o neuronas [Malatesta y col., 2003; Malatesta y col., 2000; McCarthy y col., 2001]. Las cGR sufren división celular simétrica para expandir la reserva de progenitores multipotentes, o división celular asimétrica para generar neuronas o cPI. Por lo tanto, en la corteza cerebral, las cGR generan neuronas mediante tres mecanismos: *i)* directamente por división celular asimétrica; *ii)* indirectamente por generación de cPI y una ronda de amplificación; o *iii)* indirectamente a través de cPI pero con dos rondas de divisiones y posterior amplificación [Kriegstein y col., 2009]. Después del periodo de migración neuronal, las cGR retraen sus prolongaciones radiales y se diferencian a astrocitos y más tarde, a oligodendrocitos;[Sauvageot y col., 2002; Tramontin y col., 2003].

Células progenitoras intermedias. Las cPI o progenitores basales se originan por mitosis y diferenciación de las cNE y cGR [Noctor y col., 2004]. A diferencia de las cNE y las cGR, el núcleo de las cPI sufre mitosis en el lado basal de la ZV y se localizan en la ZSV. En forma frecuente, presentan neuritas multipolares que no contactan ni con la superficie ventricular ni pial. A su vez, se diferencian de las cNE y cGR en la expresión ciertos factores de transcripción: tipo-cut 1 y 2 (CUX1 y CUX2) y T-box 2 (Tbr2) [Englund y col., 2005b]. Las cPI representan los progenitores más abundantes durante los estadios tardíos de la neurogénesis del telencéfalo y contribuyen a la neurogénesis generando dos neuronas o dos cPI por división celular simétrica y posterior diferenciación [Haubensak y col., 2004]. El número de veces que las cPI se dividen varía en las diferentes regiones del cerebro y también en las diferentes especies. Por ejemplo, el cerebro fetal de los primates contienen una extensa zona proliferativa periventricular o ZSV externa, la cual podría contribuir a la enorme expansión de la corteza cerebral observada en dichas especies [Smart y col., 2002]. Por lo tanto, la función de las cPI podría ser la de incrementar el número de neuronas, permitiendo rondas de divisiones celulares posteriores a las generadas en la ZV [Kriegstein y col., 2006] (Figura 1).

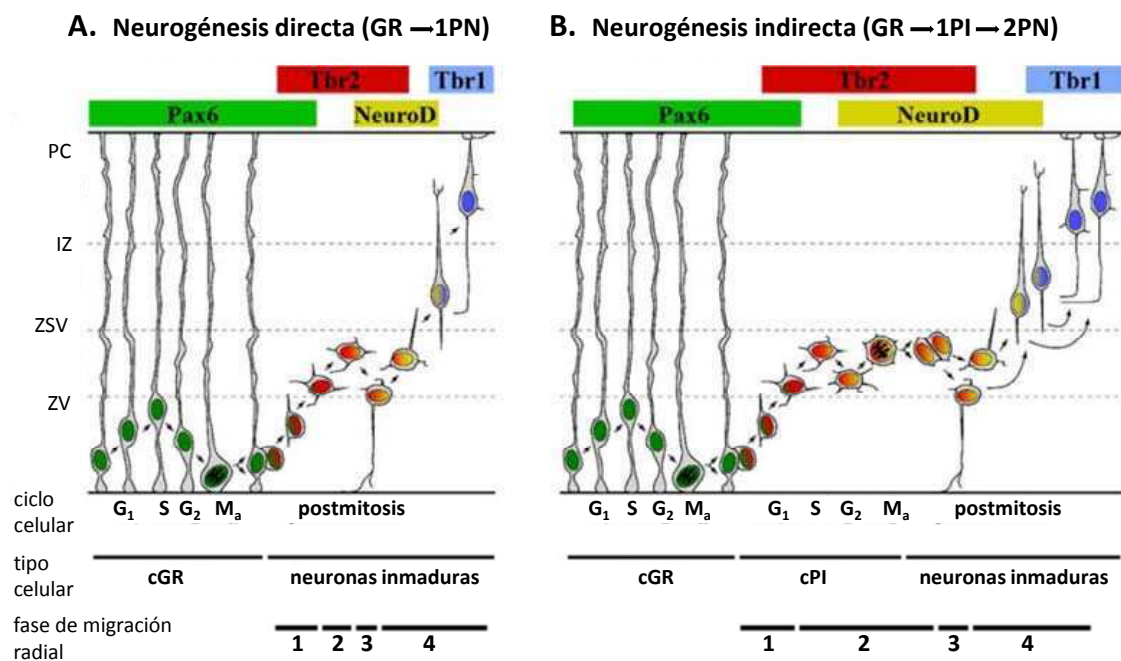


Figura 1. Tipos de secuencias neurogénicas que dan origen a las neuronas piramidales de proyección durante el desarrollo cortical. Las secuencias de expresión de factores de transcripción se indican en las barras coloreadas y corresponden con el color del núcleo celular. La secuencia neurogénica se correlaciona con las fases del ciclo celular, la identidad del tipo celular y la fase de migración (ver más adelante). **A:** neurogénesis directa de una neurona postmitótica desde la glía radial. Esta vía predomina durante estadios tempranos del desarrollo neocortical. **B:** Neurogénesis indirecta genera dos a cuatro neuronas postmitóticas desde la GR. Las cGR produce una cPI, que se divide una o dos veces para producir dos o cuatro neuronas postmitóticas. Esta vía predomina durante las fases tardías de neurogénesis cortical. Abreviaturas: Ma, divisiones asimétricas; Ms, divisiones simétricas. Esquema adaptado de [Hevner y col., 2006].

1.1.2. Origen de las neuronas de proyección corticales

En los ratones, a partir del día E10,5, las cNE de la ZV del palio comienzan a dividirse por mitosis generando las primeras neuronas postmitóticas de proyección. Estas primeras neuronas migran radialmente hacia una capa transitoria llamada preplaca (PP) o capa plexiforme primordial. En el día E12,5, la siguiente cohorte de neuronas postmitóticas migra hacia la PP y forma la placa cortical (PC, futuras capas II-VI). Así, la PP es dividida en una capa superficial, llamada zona marginal (ZM) y en una capa transitoria inferior, llamada subplaca (SP). Las sucesivas oleadas de nuevas neuronas postmitóticas se posicionan en una secuencia “dentro-fuera” (*inside-out*), de manera que las neuronas nacidas más tempranamente se ubican en la capa más profunda (capa VI), y las neuronas nacidas más recientemente migran atravesando la SP y las capas ya establecidas para ubicarse en una capa más superficial. Por lo tanto migran hacia su destino final estableciéndose en diferentes estratos según su fecha de nacimiento [Rakic, 1972; Rakic, 1974; Rakic, 1990]. A medida que progresa la neurogénesis, sobre la ZV se forma una nueva capa proliferativa que contiene cPI, la ZSV. Estas cPI van a contribuir con la generación de más neuronas postmitóticas de proyección. Sobre la ZSV se forma una zona migratoria denominada zona intermedia (ZI) y que, además, contiene los axones en desarrollo de las primeras neuronas postmitóticas de proyección. Hacia el final de la neurogénesis, la mayor parte de estas neuronas postmitóticas se diferencian a neuronas de proyección luego de posicionarse en una capa específica. La ZM contiene principalmente células de Cajal-Retzius (cC-R),

las cuales mueren durante la primera semana postnatal. En forma posterior, la ZM formará la capa I de la corteza madura, constituida principalmente por una red de dendritas apicales de las neuronas de proyección. Desde el día E13,5 al día E18,5 en el ratón, la PC originará las capas II a VI de la corteza madura [Takahashi y col., 1996]. La SP desaparece después del nacimiento y sus células se incorporan en la capa VI o son eliminadas por muerte celular programada. La ZSV también desaparece después del nacimiento, a excepción de la pared lateral de los ventrículos laterales, donde los precursores neurales forman un nicho neurogénico que continúa produciendo neuronas olfatorias en la adultez [Ming y col., 2005]. Al finalizar la neurogénesis, aproximadamente a partir del día E17,5, los PN se transforman en gliogénicos y generan los astrocitos y las células endimarias de la corteza adulta [Sauvageot y col., 2002] (**Figura 2**).

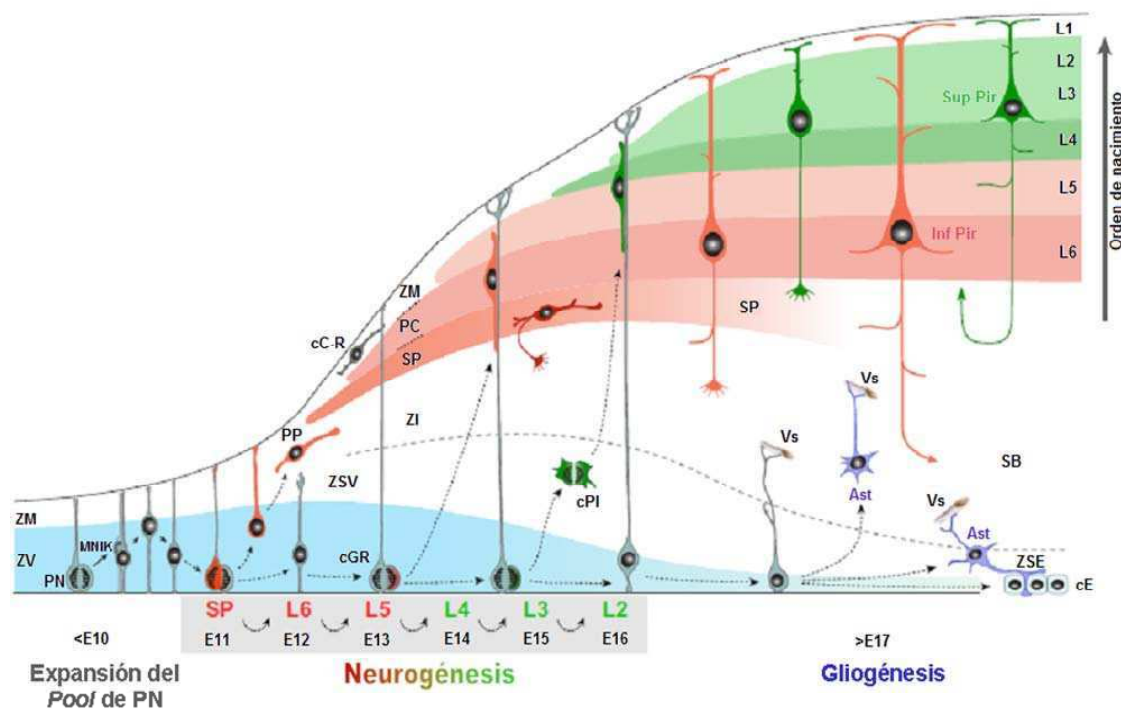


Figura 2. Generación de neuronas de proyección y migración radial en la corteza cerebral de los roedores. La migración tangencial y el posicionamiento laminar de las interneuronas no fué ilustrado. Abreviaturas: Ast, astrocito; cC-R, células de Cajal-Retzius; cE, célula endimaria; cGR, células de la glía radial; cPI, célula progenitora intermedia; Inf Pir, neuronas piramidales de capas inferiores; L2-6, capas 2-6; MNKI, migración nuclear intercinética; PC, placa cortical; PN, progenitor neural; PP, preplaca; SB, sustancia blanca; SP, subplaca; Sup Pir, neuronas piramidales de capas superiores; Vs, vaso sanguíneo; ZM, zona marginal, ZSV, zona subventricular; SV, zona ventricular. Adaptado de [Kwan y col., 2012].

Los diferentes subtipos de neuronas de proyección presentes en la corteza madura se generan en una secuencia temporal precisa y se posicionan en láminas específicas de la corteza cerebral. Las **neuronas de proyección asociativas** se localizan en las capas I a VI y forman conexiones axonales locales dentro del mismo hemisferio cortical. Por otro lado, las **neuronas de proyección comisurales** o **corticocorticales** se localizan principalmente en las capas II/III (aprox. 80%), y en menor número en las capas V (aprox. 20%) y VI; proyectan sus axones a través del cuerpo calloso hacia el hemisferio contra-lateral o hacia el cuerpo estriado. Finalmente, las **neuronas de proyección corticofugales** incluyen las neuronas corticotálámicas y las subcerebrales. Las neuronas de proyección corticotálámicas se localizan principalmente en la capa VI aunque una pequeña población también se localiza en la capa V; proyectan sus axones hacia diferentes núcleos del tálamo, mientras que las neuronas de proyección subcerebrales se localizan en la capa V y proyectan sus axones hacia el tronco encefálico y la medula espinal [Molyneaux y col., 2007].

1.1.3. Origen de las interneuronas corticales

Durante el desarrollo prenatal del telencéfalo, las interneuronas corticales se originan en el subpalio y migran de manera tangencial hacia el palio, donde se posicionan en láminas específicas de la corteza [Anderson y col., 2002]. El subpalio embrionario se subdivide en eminencia ganglionar media (EGM), lateral (EGL), caudal (EGC) y los dominios anteroentopeduncular (AEP). Cada una de estas regiones produce diferentes subtipos de interneuronas, contribuyendo así con la gran diversidad de tipos neuronales presentes en la corteza [Anderson y col., 2001; Marín y col., 2001]. En los roedores, la mayoría de las interneuronas corticales se generan en la EGM y en la EGC entre el día E12,5 y el día postnatal 0 (DP0) [Marín y col., 2003].

En la actualidad, la clasificación de los subtipos de interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral se basa en criterios morfológicos, electrofisiológicos y moleculares [Ascoli y col., 2008]. Uno de los criterios comunmente usados en la clasificación de los diferentes subtipos de interneuronas es el perfil de expresión de marcadores moleculares. Estos incluyen la expresión de proteínas de unión a calcio (parvalbumina (PV), calbindina (CALB) y calretinina (CALR)), neuropeptidos (somatostatina (SST), péptido intestinal vaso-activo (VIP), neuropéptido-Y y colecistoquinina (CCK)), canales

de potasio (Kv3.1 y Kv3.2), glucoproteína reelina, óxido nítrico sintetasa y el receptor de serotonina 5HT_{3a} [Faux y col., 2012].

Un creciente número de evidencias sugieren que la especificación de los diversos subtipos de interneuronas está dada por la activación de distintas combinaciones de factores de transcripciones, los cuales se activan en los progenitores de las interneuronas en dominios específicos del subpallio [Nery y col., 2002; Xu y col., 2004]. La EGM genera la mayoría de las interneuronas PV⁺, SST⁺ y NPY⁺ corticales, así como un pequeño número de interneuronas CALR⁺. Mientras que, las interneuronas corticales CALR⁺ derivan de progenitores Nkx2.1⁻/Dlx⁺ de la EGC [Butt y col., 2005; Lopez-Bendito y col., 2004; Nery y col., 2002; Xu y col., 2004]. Durante el desarrollo prenatal, la reelina se expresa específicamente en cC-R, sin embargo, en la vida postnatal temprana se expresa de forma secuencial en interneuronas GABAérgicas [Alcántara y col., 1998]. Por otro lado, un estudio reciente demostró que una gran proporción de interneuronas GABAérgicas derivadas de la EGC expresan reelina [Miyoshi y col., 2010]. Por otro lado, la EGL es la principal fuente de origen de las interneuronas estriatales (EGL ventral), así como de un subgrupo de interneuronas de la amígdala y el bulbo olfatorio (EGL dorsal) [Kohwi y col., 2007]

1.1.4. Origen de las células de Cajal-Retzius

Durante el desarrollo prenatal del telencéfalo en desarrollo, existe además una población neuronal, transitoria, localizada en la zona marginal de la corteza en desarrollo: las cC-R [Wonders y col., 2006]. Las cC-R son una de las primeras neuronas en formar la PP cortical [Hevner y col., 2003], y luego de la partición de la PP, estas células permanecen asociadas a la ZM a lo largo de la corticogénesis. Solo una pequeña proporción de estas células van a sobrevivir en la adultez, dado que la mayoría muere por apoptosis antes de la segunda semana postnatal [Chowdhury y col., 2010]. En el ratón, el mayor número de cC-R son generadas entre los días E10 y E12 en, al menos, tres sitios distintos: el *cortical hem*, el *septum* y el palio ventral [Garcia-Moreno y col., 2007; Takiguchi-Hayashi y col., 2004]. Desde estos sitios migran de forma tangencial hacia el manto cortical; sin embargo las cC-R originadas en los distintos sitios podrían eventualmente poblar distintas regiones corticales [Bielle y col., 2005].

1.1.5. Migración neuronal en el telencéfalo en desarrollo

Hasta la fecha se describieron dos tipos de migración neuronal durante el desarrollo de la neocorteza: i) la **migración radial**, en la cual las neuronas postmitóticas abandonan la ZV y ZSV y utilizan las fibras radiales de las cGR como andamiaje para migrar hacia su destino final en la PC [Rakic, 1971]; y ii) la **migración tangencial**, en la cual las interneuronas guiadas por señales químicas y por axones migran paralelas a la superficie pial hacia su posición final en la neocorteza [Nadarajah y col., 2002].

1.1.5.1. Migración radial

Mediante la utilización de imágenes de video de lapso de tiempo (*time-lapse imaging*) en fetas de corteza cerebral, Nadarajah y colaboradores, demostraron que existen dos formas distintas de movimiento celular, **translocación somática** y **locomoción**, responsables de la migración radial de los neuroblastos post-mitóticos. En la **translocación somática**, las neuronas en migración extienden una larga neurita de avance (*leading process*) que se adhiere a la superficie pial, luego el núcleo se transloca a lo largo de esta neurita (“nucleocinesis”) y finalmente la neurita posterior (*training process*), que se extiende desde la ZV, se retrae. Por su parte, en la **locomoción**, las neuronas en migración también extienden una corta neurita de avance y otra posterior, pero no alcanzan a contactar con la superficie pial ni ventricular. Los neuroblastos migran adheridos a lo largo de las fibras de la glía radial. La existencia de dos mecanismos de migración radial se debe a la expansión que sufre la corteza cerebral durante su desarrollo: los neuroblastos en migración utilizan el mecanismo de **translocación somática** en etapas tempranas del desarrollo cortical, cuando la pared cerebral es aun delgada; mientras que la **locomoción** ocurre en etapas tardías [Nadarajah y col., 2001].

En general, el patrón dinámico de la migración radial en la corteza cerebral puede ser resumido en 5 fases: i) los neuroblastos post-mitóticos abandonan rápidamente la ZV y se dirigen a lo largo de las fibras radiales hasta la ZSV; ii) en la ZSV, los neuroblastos adoptan una morfología multipolar mientras quedan arrestados durante por lo menos 24h antes de continuar con su migración; iii) los neuroblastos multipolares migran retrógradamente hacia la ZV. La funcionalidad de esta migración retrograda sería la de coordinar la migración de estos neuroblastos con la de las

interneuronas destinadas a la misma columna radial o capa cortical; iv) los neuroblastos pierden su morfología multipolar, extienden una neurita de avance hacia la superficie pial y ascienden hacia la PC a lo largo de las fibras de la glía radial [Noctor y col., 2004]; v) una vez que la neurita de avance de los neuroblastos en migración alcanzan la ZM, reciben una señal de parada dada por la reelina secretada por las cC-R. Subsecuentemente, los neuroblastos se disocian de las fibras de la glía radial y forman las capas corticales [Nadarajah y col., 2002] (**Figura 3**).

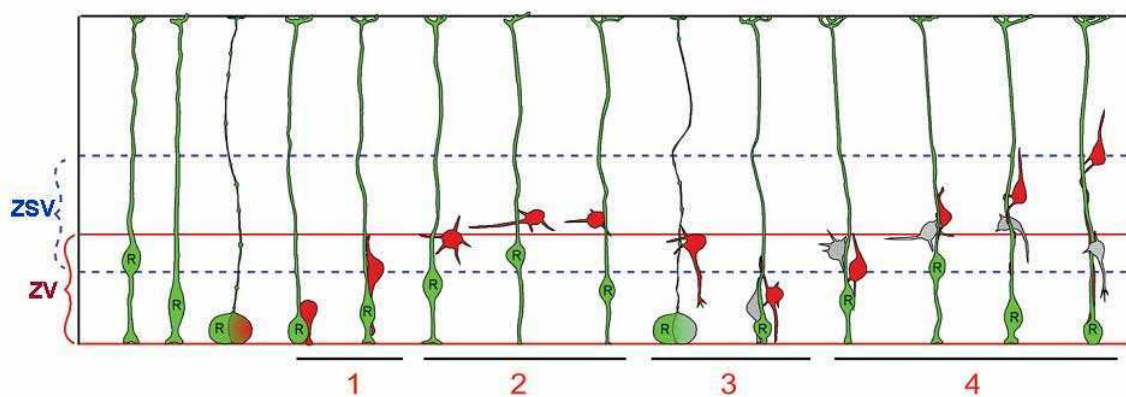


Figura 3. Esquema de las fases de la dinámica de migración neuronal radial. Adaptado de [Noctor y col., 2004].

1.1.5.2. Migración tangencial

Las trayectorias migratorias de las interneuronas presentan distintos patrones temporales y espaciales. En estadios tempranos del desarrollo (E12), la primera cohorte de interneuronas se origina principalmente en la EGM, migra ventralmente atravesando el estriado en desarrollo, e ingresan al palio por una corriente migratoria superficial a lo largo de la ZM y la SP. En estadios intermedios (E13,5-14,5), las interneuronas originadas en la EGM, circunvalan el manto estriatal y migran por una corriente migratoria profunda, atravesando el palio por la ZSV y la ZI inferior, mientras que una menor proporción de interneuronas continúan migrando por la corriente superficial. Finalmente, en estadios tardíos, entre E15,5 y E16,5, tanto la EGL como la EGM contribuyen con la generación de interneuronas corticales y estas siguen principalmente la corriente migratoria profunda [Ang y col., 2003; Kriegstein y col.,

2006; Marín y col., 2010; Tanaka y col., 2006]. Una vez completa la migración tangencial, las interneuronas invaden la PC por migración radial y alcanzan su posición laminar final [Ang y col., 2003; Metin y col., 2006; Nadarajah y col., 2002; Tanaka y col., 2006] (**Figura 4**).

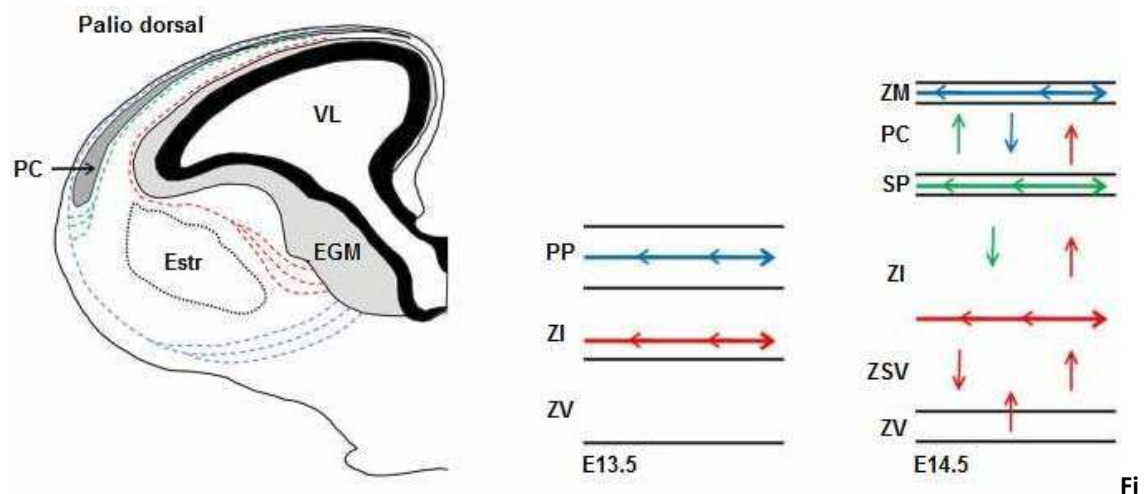


Figura 4. Rutas de migración tangencial de interneuronas inmaduras desde el subpalio hacia el palio. A: esquema de una sección coronal de cerebro de ratón de día E15. La línea azul punteada muestra la ruta tangencial de las interneuronas que se originan tempranamente, mientras y la línea roja punteada muestra la ruta de las interneuronas originadas tardíamente. Una vez que se forma la PC, se forma una ruta tangencial adicional que transcurre por la SP (línea verde punteada). **B:** esquema de los movimientos tangenciales y radiales de las interneuronas corticales una vez que alcanzan el palio dorsal. Adaptado de [Hernández-Miranda y col., 2010].

Una vez que alcanzan la PC, una gran proporción de interneuronas GABAérgicas buscan la misma localización *inside-out* de las neuronas excitatorias nacidas al mismo tiempo [Rymar y col., 2007; Valcanis y col., 2003; Xu y col., 2004]; mientras que otras interneuronas, parecen reconocer señales específicas de cada lámina provistas por las neuronas excitatorias para alcanzar su posición final [Lodato y col., 2011]. Sin embargo, ciertas interneuronas no parecen seguir ninguna de estos mecanismos [Rymar y col., 2007]. Por lo tanto, la correcta proporción de neuronas GABAérgicas/glutamatérgicas debe ser alcanzado en el contexto de la generación de neuronas en espacios y tiempos dispersos espacial y temporalmente dispersas.

1.1.5.3. Mecanismos celulares de migración neuronal

Los mecanismos celulares que regulan el proceso de migración neuronal pueden ser disociados en varios pasos: los mecanismos que controlan el modo de división celular en la ZV; aquellos que determinan la polaridad celular y despegamiento de la superficie ventricular; la extensión de un proceso de avance y su elección de la vía migratoria; la adhesión de la neuroblasto en migración a la superficie de la fibra de la cGR; el control de la translocación nuclear, la disociación del neuroblasto de la fibra de la cGR; el cese de la migración una vez alcanzado el destino final. Cada uno de estos pasos posee una maquinaria molecular compleja para su regulación [Marín y col., 2010].

Dinámica de las neuritas de avance

Las neuritas de avance de los neuroblastos en migración actúan como una brújula, direccionando la migración en respuesta a señales quimiotáctiles [Marín y col., 2010]. Hasta la fecha se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares que regulan la dinámica de los procesos de avance en las neuronas en migración. Lisencefalina-1 y doblecortina (DCX), dos proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), están involucradas en la regulación de la ramificación de las neuritas de avance en las interneuronas en migración [Kappeler y col., 2006; Nasrallah y col., 2006]. Las neuritas de avance de las interneuronas deficientes de DCX presentan más ramificaciones pero estas son muy inestables. Esto sugiere que DCX es necesaria para la estabilización de las nuevas ramificaciones, y que la inestabilidad en el citoesqueleto de éstas podría impulsar a las neuronas a extender un número mayor de ramificaciones [Kappeler y col., 2006]. En contraste, las neuritas de avance de las interneuronas de ratones *Lis*^{+/-} se ramifican con menor frecuencia y, en consecuencia, son más largas que en ratones salvajes [Nasrallah y col., 2006].

Nucleocinesis

La translocación del núcleo dentro de la neurita de avance es el mecanismo que mejor define a la migración neuronal. Estudios de imagen de lapso de tiempo revelaron que la nucleocinesis ocurre en dos pasos: primero, se forma una dilatación perinuclear que contiene el centrosoma y el aparato de Golgi sobre la neurita de

avance y luego la red perinuclear de microtúbulos arrastra al núcleo hasta alcanzar esta dilatación. Estos dos pasos se repiten produciendo el movimiento saltatorio típico de las neuronas en migración [Schaar y col., 2005; Tsai y col., 2005]. Varias proteínas motoras relacionadas con el citoesqueleto, incluida doblecortina, están implicadas en este proceso.

1.1.5.4. Mecanismos moleculares de regulación de la migración neuronal

El mecanismo que subyace la movilidad direccionada de una neurona requiere de la coordinación de múltiples señales extracelulares en un determinado microambiente. Las señales de guía extracelular son interpretadas por receptores que transmiten su señal a una red de señalización intracelular, las cuales convergen, en última instancia, en el citoesqueleto neuronal.

Doblecortina

Dado que los microtúbulos proveen estabilidad a las neuritas en crecimiento y además cumplen un papel importante en la asociación del centrosoma al núcleo durante la nucleocinesis, es necesaria una apropiada regulación de la dinámica de microtúbulos durante la migración neuronal. Un evento clave en la migración y en la división celular es la estabilización de microtúbulos controlada por proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). La DCX es una MAP neuronal de 40 kDa [Gleeson y col., 1999], encargada de la estabilización de los microtúbulos y fundamental para la reorganización del citoesqueleto en neuronas postmitóticas en migración [Bai y col., 2008]. Estudios realizados con ratones machos carentes del gen de DCX demostraron que estos presentan defectos similares a los observados en la lisencefalia, mientras ratones hembras presentan una PC secundaria por debajo de la PC primaria o “doble corteza” [Gleeson y col., 1999]. Si bien estos efectos en mutantes fueron atribuidos a defectos en la migración radial, experimentos recientes demostraron un retraso en la migración de interneuronas desde la EG hacia la corteza al bloquear la expresión de DCX [Friocourt y col., 2007].

DCX interactúa directamente con los microtúbulos de los extremos de las neuritas de avance de neuronas en migración, así como también con los microtúbulos de los extremos de las neuritas en neuronas diferenciadas. La extensión de las neuritas

depende, no solo del transporte a través de microtúbulos, sino también de la adición de membrana en los conos de crecimiento axonal. A su vez, se demostró que DCX interactúa con complejos adaptadores involucrados en el tráfico de vesículas, probablemente al facilitar la disociación de las vesículas transportadas desde los microtúbulos, y permitir la adición de nueva membrana a las neuritas en crecimiento. Más aún, DCX estaría involucrada en la regulación de la endocitosis y reciclado de moléculas de adhesión y receptores en las neuritas en crecimiento [Friocourt y col., 2003].

Reelina

La reelina es una glucoproteína de matriz extracelular secretada por las cC-R durante el desarrollo de la corteza cerebral. Extensas evidencias demuestran que la reelina cumple un papel esencial en la organización de la migración radial, orquestando la correcta laminación de la corteza cerebral y favoreciendo el gradiente *insidie-out* de posicionamiento de las neuronas de proyección [Rice y col., 2001]. Las neuronas postmitóticas que migran radialmente hacia la PC expresan en sus membranas los receptores sobre los cuales actúa la reelina: el receptor de lipoproteína de muy baja densidad (Vldlr) y el receptor de apolipoproteína E 2 (ApoER2) [Herz y col., 2006]. La unión de la reelina a estos receptores induce la fosforilación de los residuos de tirosina del adaptador proteico intracelular Dab-1, [Leemhuis y col., 2010], el cual activa diferentes vías de señalización que, en última instancia, actúan sobre la dinámica del citoesqueleto de las neuronas en migración [Chai y col., 2009].

La deficiencia en la expresión de reelina, Vldlr, ApoER2 o Dab1 en ratones resulta en un fenotipo *reeler*, caracterizado por una severa alteración en el posicionamiento de las neuronas en las laminas corticales [Curran y col., 1998]. Este comportamiento aberrante en las neuronas deficientes en la vía de señalización de la reelina tiene dos componentes: la incapacidad temprana de las primeras neuronas en migración de dividir la PP, y la incapacidad tardía de las neuronas guiadas por la glía radial de migrar atravesando las laminas corticales ya formadas [Frotscher, 2010].

Estudios recientes demostraron que la reelina, mediante la fosforilación de la proteína asociada a actina, n-cofilina, promueve la estabilización del citoesqueleto de actina en las neuritas de avance de neuronas en migración, lo cual permite anclar estas

neuritas a la superficie pial de la corteza en desarrollo [Chai y col., 2009]. La n-cofilina es una proteína depolimerizante de actina que une filamentos de actina y promueve su desensamblaje y en consecuencia, desestabiliza el citoesqueleto de los lamelipodios y conos de crecimiento [Kiuchi y col., 2007]. La estabilización de las neuritas de avances sería necesaria para arrastrar el soma neuronal de las neuronas en migración a las que todavía les resta atravesar la barrera de las neuronas nacidas con anterioridad [Förster y col., 2010]. Por lo tanto, la tensión de las neuritas de avance por la estabilización del citoesqueleto de actina es importante para la translocación del núcleo de la neurona en la fase final de la migración cortical [Cooper, 2008].

1.2. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE DURANTE EL DESARROLLO

El Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), el principal compuesto psicoactivo derivado de la planta *Cannabis sativa*, ejerce sus efectos en el SNC debido a que es similar a una familia de moléculas producidas prácticamente por todos los animales, incluido el ser humano y los roedores, y cuya acción por tanto mimetiza. Estas moléculas se denominan cannabinoides endógenos o endocannabinoides (eCB). Por otro lado, se han obtenido diversos análogos sintéticos, como el HU-210 y WIN55,212-2, los cuales son extensamente utilizados como herramientas farmacológicas en la investigación sobre cannabinoides. Tanto los eCB como sus análogos sintéticos, actúan mediante su unión a sus receptores específicos, los receptores cannabinoides tipo 1 (rCB1) y tipo 2 (rCB2). El rCB1 es el receptor de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G más abundantes en el SNC, y su activación regula una gran variedad de sistemas de señalización celular. Los eCB, junto con sus receptores y sistemas específicos de síntesis, metabolización, transporte y degradación, constituyen el sistema de señalización eCB [De Petrocellis y col., 2009].

En el cerebro postnatal, el sistema eCB constituye un mecanismo de neuromodulación de las sinapsis en el SNC: los eCB sintetizados a demanda en la postsinápsis actúan como mensajeros retrógrados uniéndose a rCB1 presinápticos de aferencias excitatorias e inhibitorias, los cuales atenúan la liberación de neurotransmisores [Chevalleyre y col., 2006]. Además de esta función, bien

caracterizada en las sinapsis adultas, hallazgos recientes demostraron que el sistema eCB está involucrado en procesos esenciales del desarrollo del SNC, tales como la proliferación, diferenciación, migración, especificación neuronal, la elongación y fasciculación de axones y la sinaptogénesis [Harkany y col., 2007].

1.2.1. Ontogenia del sistema endocannabinoide

El descubrimiento de un sistema eCB en el cerebro en desarrollo de mamíferos y de las variaciones espacio-temporales de su expresión, ha conducido a numerosos estudios que soportan la importancia de la participación de la señalización eCB en los principales eventos relacionados con el desarrollo del SNC (**Figura 5**).

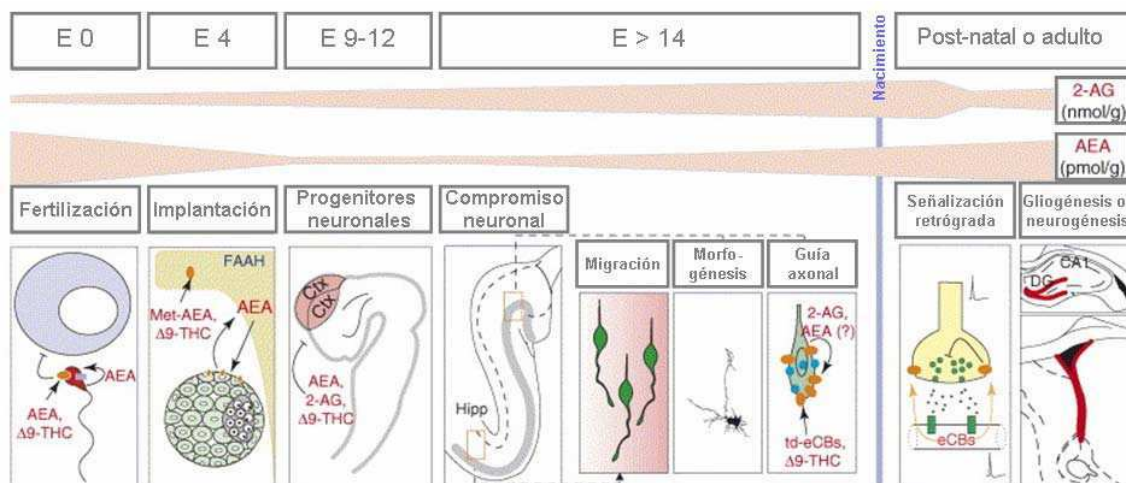


Figura 5. Rol propuesto del sistema eCB durante el desarrollo. El panel superior muestra la variación temporal en las cantidades disponibles de los principales eCB, 2-AG y AEA a lo largo de las etapas de desarrollo. El panel inferior ilustra los principales eventos de embriogénesis y desarrollo del SNC que estarían regulados por la señalización eCB a través del rCB1 (coloreado de naranja). Adaptado de [Harkany y col., 2007].

1.2.1.1. Receptor cannabinoide tipo 1 (rCB1)

El rCB1 se expresa desde estadios muy tempranos en el desarrollo del telencéfalo de roedores. Hasta la fecha se describió la expresión de dicho receptor en PN de la ZV, en cPI de la ZSV, y en células en división activa [Aguado y col., 2005; Mulder y col., 2008]. La expresión postnatal del rCB1 en células tipo glía radial (*radial*

glia-like) y en poblaciones de células madres neurales tipo-B [Aguado y col., 2005; Aguado y col., 2007; Arévalo-Martín y col., 2007; Jin y col., 2004], sugiere la conexión de un sistema eCB funcional en las áreas neurogénicas desde el periodo de embrión hasta la adultez [Galve-Roperh y col., 2007].

Durante el periodo de corticogénesis en los roedores, la expresión del rCB1 también se observa en las células ya comprometidas al linaje neuronal. A partir del día E12,5 el rCB1 se expresa en las cC-R reelin⁺ en la PP y luego en neuronas postmitóticas en la PC y en axones en crecimiento en la ZI, identificadas con el marcador de neuronas tempranas Tuj1 [Mulder y col., 2008; Vitalis y col., 2008]. La expresión del rCB1 en la corteza en desarrollo alcanza su máximo en el día E16, y luego disminuye gradualmente hacia el nacimiento, lo cual se podría correlacionar con el patrón temporal de diferenciación neuronal [Harkany y col., 2007]. Por otro lado, la expresión del rCB1 en las interneuronas GABAérgicas corticales se detectó en estadios tardíos de la corticogénesis, cuando las interneuronas comienzan a desviarse de sus corrientes migratorias tangenciales para migrar radialmente hacia la PC [Berghuis y col., 2007].

La presencia transitoria del rCB1 durante el desarrollo embrionario también fue detectada en axones y conos de crecimiento de neuronas de proyección cortical, en áreas donde transcurren los axones corticofugales en desarrollo. La expresión del rCB1 en estas zonas se reduce marcadamente durante la gestación tardía y el desarrollo postnatal temprano [Berghuis y col., 2007; Mulder y col., 2008; Vitalis y col., 2008]. Por lo tanto, esta localización del rCB1 sugiere un rol del sistema eCB en el establecimiento y organización de las redes neuronales.

En cerebros fetales humanos también se demostró la expresión de un sistema eCB funcional. Estudios por hibridación *in situ* y ensayos de unión a ligandos radiactivos muestran la expresión del rCB1 en áreas límbicas, como la corteza cerebral y el hipocampo. Así como ocurre en los roedores, se detectó una alta densidad de rCB1 en áreas de sustancia blanca durante el desarrollo fetal humano [Mato y col., 2003; Mulder y col., 2008].

1.2.1.2 Receptor cannabinoide tipo 2 (rCB2)

Hasta el momento, la expresión del rCB2 en el cerebro embrionario solo se ha podido demostrar en estudios *in vitro*. Estudios por inmunohistoquímica, *western blot* y *RT-PCR* realizados en cultivos de células madres neurales y en neuroesferas preparados a partir de tejido cerebral de ratón de día E15,5-17,5 y DP2, muestran la expresión del rCB2 en PN [Arévalo-Martín y col., 2007; Molina-Holgado y col., 2007; Palazuelos y col., 2006]. En el cerebro adulto de roedores, el rCB2 se expresa en células madres neurales (células nestina⁺) de la zona subgranular del giro dentado en hipocampo y en la ZSV de ratón adulto, una de las áreas neurogénicas más importantes a lo largo de la vida postnatal. [Arévalo-Martín y col., 2007; Goncalves y col., 2008; Palazuelos y col., 2006]. Sin embargo, hasta la fecha no se dispone de evidencias concretas acerca de la expresión del rCB2 en el cerebro en desarrollo.

1.2.1.3. Endocannabinoides y enzimas de síntesis y degradación

Los eCB son amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos de cadena larga poli-insaturada. Dos de los principales eCB, el 2-araquidonilglicerol (2-AG) y el N-araquidoniletanolamida o anandamida (AEA), pertenecen a la familia de los eicosanoides. Los niveles de 2-AG y AEA muestran una variación temporal durante el desarrollo prenatal del cerebro: la síntesis de 2-AG aumenta gradualmente durante el desarrollo embrionario, alcanza un pico luego del nacimiento y se estabiliza durante el desarrollo postnatal, mientras que los niveles de AEA aumentan gradualmente durante el desarrollo postnatal y alcanza su máximo durante la adultez. A lo largo del desarrollo del cerebro, la concentración de 2-AG (2-8 nmol/g tejido) es aproximadamente 1000 veces mayor que la de AEA (3-6 pmol/g tejido) [Berrendero y col., 1998; Berrendero y col., 1999].

La coordinación espacial y temporal de la liberación de eCB requiere de una ajustada expresión de sus enzimas metabólicas. Las *sn*-1-diacilglicerol lipasa α y β (DAGL α/β) son las principales enzimas de síntesis del 2-AG [Bisogno y col., 2003]. Esta enzima se expresa en axones corticotálámicos en elongación de neuronas de proyección a partir del día E14,5, y coincide con la expresión del rCB1 en estos axones. Sin embargo, a partir del día E18,5, al comienzo de la sinaptogénesis, la enzima se transloca hacia las espinas dendríticas postsinápticas de neuronas de proyección

glutamatérgicas, donde tendrá lugar la señalización retrograda en la vida postnatal. Esto sugiere que la liberación autocrina de 2-AG regularía el crecimiento del cono axonal y la formación de sinapsis rCB1⁺ [Berghuis y col., 2007]. Durante el desarrollo de la corteza perinatal, la expresión postsináptica de la DAGL α excede la de la DAGL β , siendo ésta última más abundante durante la vida postnatal [Bisogno y col., 2003].

La *N*-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD), la principal enzima de síntesis de la AEA [Ueda y col., 2005] se expresa a partir del día E18,5 asociada a espinas dendríticas de neuronas de proyección corticales. Las interneuronas GABAérgicas no expresan la enzima hasta que adquieren su compromiso en la migración radial intra-cortical, coincidiendo con el inicio de la selección de su blanco postsináptico [Berghuis y col., 2007].

Las enzimas Monoacilglicerol lipasa 1/2 (MGL) [Dinh y col., 2002] y la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) [Cravatt y col., 1996] son las principales enzimas catabólicas que degradan el 2-AG y la AEA, respectivamente. A partir del día E12,5, la expresión de MGL coincide con la expresión del DAGL y del rCB1 en los axones corticotalámicos en crecimiento de las neuronas de proyección [Keimpema y col., 2010]. Por otro lado, la FAAH es detectada en las cGR (células RC2⁺) durante la gestación tardía y en edades postnatales tempranas [Aguado y col., 2006]. Sin embargo, en las neuronas, la expresión de la FAAH aún no se ha detectado.

1.2.2. El rol del sistema endocannabinoide durante el desarrollo

La expresión dinámica del sistema eCB funcional durante el desarrollo neuronal, cuando los procesos neurogénicos se encuentran más activos, sugiere que los eCB están involucrados en la regulación de importantes decisiones en el destino celular [Galve-Roperh y col., 2009]. Por lo tanto, la completa comprensión del papel que juega el sistema eCB durante el desarrollo cerebral es de extrema importancia a fin de evaluar las consecuencias de la exposición prenatal a cannabinoides (**Figuras 5 y 6**).

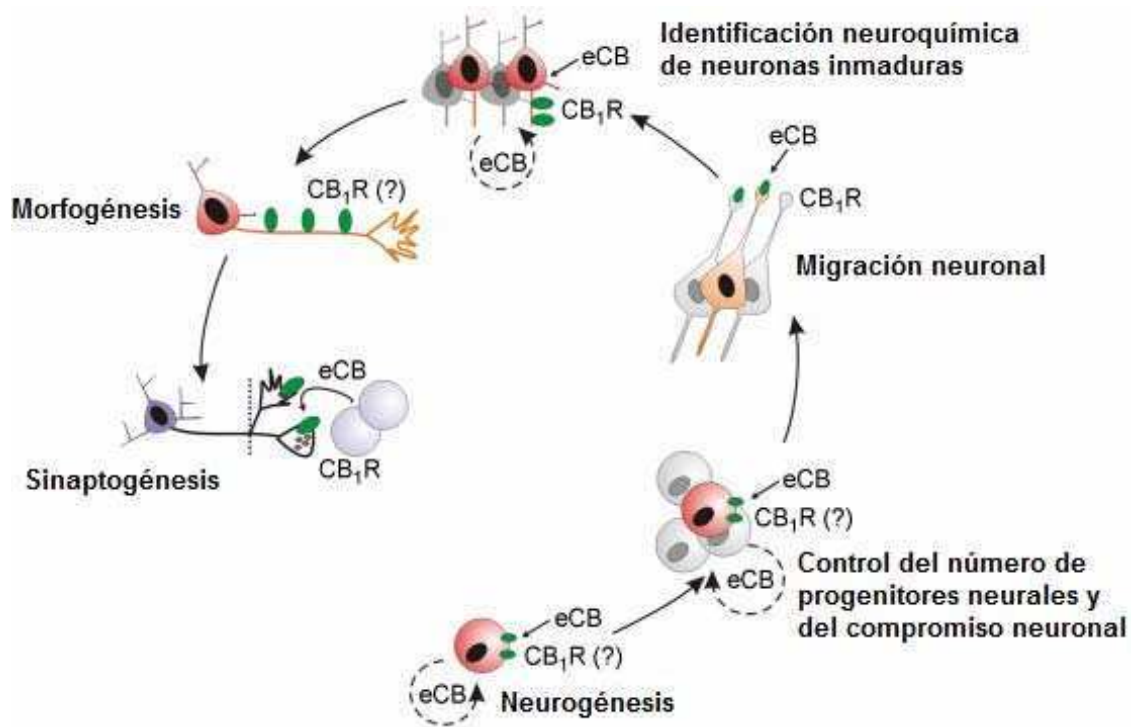


Figura 6. Papel de la señalización eCB vía rCB1 durante la especificación neuronal. Las flechas continuas indican el probable rol de los eCB sobre sus células blanco y las flechas punteadas indican la probable regulación autocrina a través de la expresión de DAGL intrínseca y la liberación de eCB regulada. Los signos de interrogación denotan la probable participación de otros receptores CB (CB2R, GPR55). Adaptado de [Harkany y col., 2008].

1.2.2.1. Regulación de la proliferación de progenitores neurales

El delicado balance entre proliferación y muerte celular programada de los progenitores neurales garantiza la generación de una adecuada cantidad de neuronas en el cerebro en desarrollo. Numerosas evidencias de la participación del sistema eCB en la proliferación de PN se encuentran extensamente soportadas por estudios de manipulación farmacológica y genética, tanto *in vivo* como *in vitro* [Harkany y col., 2007].

Durante el desarrollo de la corteza cerebral, el rCB1 presente en la ZV/ZSV participa en la regulación de la proliferación de progenitores piramidales y en el tamaño del *pool* de estas células: estudios de pulsos de BrdU en embriones de ratones $CB1^{-/-}$ demostraron una inhibición de la proliferación de PN corticales, mientras que embriones $FAAH^{-/-}$ presentaron un incremento en su proliferación. Experimentos realizados en cultivos organotípicos corticales de día E14,5 expuestos a un agonista

cannabinoide sintético no selectivo (HU-210) o a un inhibidor de la FAAH (URB597) mostraron un incremento en el número de células que incorporaron BrdU en la ZV/ZSV. Ratones con una delección condicional del rCB1 en neuronas piramidales ($CB1^{f/f, NEX-Cre}$) presentaron una significativa disminución en la tasa de proliferación de PN en las ZV/ZSV de la corteza de embriones, lo cual sugiere una acción del sistema eCB sobre los progenitores de neuronas piramidales [Mulder y col., 2008]. *In vitro*, la delección del rCB1 ($CB1^{-/-}$) o la inhibición farmacológica del rCB1 reduce la proliferación de PN y la generación de neuroesferas [Aguado y col., 2007]. Otros estudios *in vitro* en neuroesferas, mostraron que la activación de los rCB2 a través del agonista HU-210, promueve la proliferación celular a través de la activación de las vías de señalización de fosfoinositol-3 Kinasa /Akt y ERK1/2 [Molina-Holgado y col., 2007]. Por otro lado, estudios *in vivo* en ratones $CB1^{-/-}$ adultos demostraron una disminución en la proliferación de PN en el giro dentado y en la ZSV, mientras que los ratones $FAAH^{-/-}$ mostraron un incremento de estos progenitores [Aguado y col., 2005; Jiang y col., 2005; Jin y col., 2004].

Experimentos realizados en cultivos organotípicos corticales de día E14,5 mostraron que el tratamiento agudo con un agonista selectivo para el rCB2 (HU-308) induce un incremento en la proliferación de PN en las ZV/ZSV y que éste incremento es prevenido por el tratamiento con un antagonista del rCB2 (SR-144528). Estos experimentos además demuestran que el tratamiento agudo con HU-308 induce un incremento de células p27Kip1 fosforiladas en las ZV/ZSV y que éste efecto es prevenido por el tratamiento con el antagonista del rCB2 [Palazuelos y col., 2012]. La proteína p27Kip1 inhibe la transición de la fase G_1-S de los PN y cumple un importante rol en el balance entre proliferación de PN *versus* la diferenciación neuronal [Nguyen y col., 2006]. Varios autores sugieren que la regulación negativa del rCB2 a lo largo del proceso de diferenciación neuronal permitiría a los PN progresar más allá de su auto-renovación y comprometerse con el linaje neuronal [Molina-Holgado y col., 2007; Palazuelos y col., 2012]. Simultáneamente, la expresión del rCB1 en los PN sufre una fuerte regulación positiva luego de la diferenciación inicial hacia neurona [Mulder y col., 2008]. Esto sugeriría que los bajos niveles en la expresión del rCB1 son necesarios para mantener un estado proliferativo, pero que la tasa de proliferación estaría

regulada por la alteración de los niveles de eCB que señalizan a través del rCB2 [Anavi-Goffer y col., 2009].

1.2.2.2. Regulación de la migración neuronal

Durante la corticogénesis, los progenitores piramidales nacidos en la ZV/ZSV migran radialmente hacia la PC hasta su destino final en las distintas capas corticales. Estudios en ratones neonatos deficientes en el rCB1 mostraron una acumulación de neuronas postmitóticas en las capas más profundas de la corteza en desarrollo, mientras que ratones deficientes en la FAAH mostraron una acumulación de estas neuronas en las capas más superficiales. Por otro lado, el tratamiento farmacológico con un inhibidor de la FAAH (UR-597) o un agonista del rCB1 (HU-210) en cultivos organotípicos de corteza cerebral de día E14,5 promueve la migración radial desde la zona ZSV/ZV hacia la PC. La sobre-expresión de FAAH en embriones de ratón produce una acumulación de neuronas en la ZV/ZSV, lo cual sugiere un deterioro en la migración radial [Mulder y col., 2008].

Por otro lado, las interneuronas que pueblan el hipocampo y la corteza nacen en la eminencia ganglionar y migran tangencialmente una larga distancia hasta su destino. Experimentos recientes demostraron que un grupo de interneuronas recién formadas en la EG y que expresaban el rCB1, dan origen a la población de interneuronas reelin⁻/CALR⁺ y CCK⁺ en el hipocampo y la corteza [Morozov y col., 2009]. A su vez, experimentos *in vivo* demostraron que la administración crónica de THC durante la gestación incrementa la densidad de interneuronas CCK⁺ en el hipocampo de la rata, mientras que experimentos *in vitro*, demostraron que la estimulación de interneuronas CCK⁺ con AEA estimula la migración. Si bien, la delección selectiva del rCB1 en interneuronas GABAérgicas corticales (CB1^{f/f;Dlx5/6-Cre}) no afecta el número total de diferentes subpoblaciones de interneuronas corticales [Berghuis y col., 2007], sería necesario realizar un análisis más detallado sobre la distribución de las diferentes subpoblaciones neuronales en las distintas capas corticales, tanto en ratones CB1^{-/-} como en animales expuestos prenatalmente a agonistas cannabinoides, a fin de comprender el rol de los eCB en el control de la migración neuronal.

1.2.2.3. Regulación de la guía axonal y sinaptogénesis

La supervivencia de grupos de neuronas definidas neuroquímicamente requiere el correcto modelado (*patterning*) de axones y el establecimiento de sinapsis funcionales. Evidencias recientes sugieren un papel fundamental en la señalización eCB, a través del rCB1, en la regulación de la fase inicial de la especificación neuroquímica y en la navegación del cono de crecimiento axonal, la elongación axonal, la dendritogénesis y la sinaptogénesis de interneuronas GABAérgicas y neuronas de proyección glutamatérgicas en el cerebro de los roedores [Berghuis y col., 2005; Berghuis y col., 2007; Kawaguchi y col., 2010; Mulder y col., 2008; Vitalis y col., 2008; Wu y col., 2010].

Estudios de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* mostraron una distribución atípica y transitoria del rCB1 en los tractos axonales en expansión de la ZI, entre el día E13,5 y DPO del cerebro de roedores [Berghuis y col., 2007; Mulder y col., 2008]. Un estudio más detallado reveló que el rCB1 se expresa en los axones corticotalámicos en desarrollo y mientras que la enzima de síntesis de 2-AG, DGLβ, se expresa en los axones talamocorticales. Este patrón de expresión sugiere que el 2-AG producido en los axones talamocorticales actúa sobre el rCB1 expresado en los axones corticotalámicos y modularía el *patterning* axonal durante el desarrollo [Wu y col., 2010]. Esto podría indicar un rol de los eCB en la guía axonal y en la supresión de la formación de axones colaterales [Anavi-Goffer y col., 2009].

En relación a dicha hipótesis, la delección del rCB1 en las neuronas piramidales (CB1R^{f/f,NEX-Cre}) o el bloqueo farmacológico mediante la administración *in utero* de un antagonista del rCB1 produce aberraciones en la fasciculación de los axones corticotalámicos de las neuronas de proyección L1-NCAM⁺, los cuales fallan en invadir el estriado dorsal. Estudios *in vitro* en cultivo primario de neuronas corticales estimuladas con AEA, demostraron un incremento en la elongación del axón primario y una supresión de la ramificación axonal en cultivo de neuronas corticales primarias de embrión estimulada con AEA [Mulder y col., 2008].

Adicionalmente, los axones y conos de crecimiento de interneuronas GABAérgicas inmaduras expresan el rCB1 y su estimulación con AEA inhibe la ramificación y el crecimiento de neuritas inducido por BDNF (factor neurotrófico

derivado de cerebro) y a su vez induce la repulsión del cono de crecimiento [Berghuis y col., 2007].

Los rCB1 también están involucrados en procesos de neuritogénesis y sinaptogénesis, dado que se demostró que la sobre-expresión de rCB1 en cultivos primarios de neuronas hipocampales regula negativamente el crecimiento de las neuritas [Vitalis y col., 2008]. Estudios realizados en líneas celulares mostraron que la activación del rCB1 puede inducir tanto el crecimiento como la retracción de las neuritas [He y col., 2005; Jordan y col., 2005; Zhou y col., 2001]. En células de neuroblastoma Neuro2A, la activación del rCB1 induce crecimiento de las neuritas vía Rap1, tirosina kinasa src, Stat-3 [He y col., 2005; Jordan y col., 2005]. Por el contrario, la retracción de las neuritas depende de la inhibición de la activación sostenida de ERK mediada por Rap1/B-Raf [Rueda y col., 2002] y la regulación de la dinámica del citoesqueleto vía proteína-G Rho [Ishii y col., 2002]. El establecimiento de las sinapsis glutamatérgicas también es regulado por el rCB1. En particular, la inhibición de la síntesis de 2-AG en neuronas piramidales redujo la expresión de vGlut1 y alteró la expresión de marcadores de sinapsis glutamatérgicas como SNAP25 y sinaptofisina [Mulder y col., 2008].

1.3. CONSECUENCIAS DE LA EXPOSICION PRENATAL A CANNABINOIDES

La marihuana es la droga de abuso ilegal más utilizada entre en la mujeres embarazadas de las sociedades occidentales [Fried y col., 2001]. Los cannabinoides pueden atravesar la barrera placentaria durante la gestación [Berrendero y col., 1999] y además ser transferidos a través de la leche materna durante la lactancia [Romero y col., 1997]. Por lo tanto, debido a que la barrera hemato-encefálica del embrión y del recién nacido es aún inmadura, estos compuestos pueden alcanzar el cerebro fetal y neonatal en cantidades sustanciales. Puesto que el sistema eCB está presente desde muy temprano en el desarrollo, los componentes activos del cannabis y sus metabolitos pueden afectar directamente el desarrollo del cerebro mediante la alteración de la señalización eCB, los neurotransmisores relacionados con éste y el sistema neuroendócrino [Campolongo y col., 2011].

Esta perturbación del delicado balance de cannabinoides endógenos durante la gestación, tanto por el consumo de marihuana como por el consumo de antagonistas comercializados como droga anti-obesidad, puede tener profundas consecuencias para el cerebro en desarrollo. Actualmente existe un creciente número de evidencias, obtenidas tanto a partir de la investigación en animales así como de estudios en humanos, que sugieren que la manipulación exógena del sistema eCB en periodos específicos en el desarrollo tiene consecuencias deletéreas a lo largo de la vida postnatal (revisado en [Wu y col., 2011]).

1.3.1. Consecuencias de la exposición prenatal a la marihuana en humanos

Hasta la fecha existen pocos estudios de cohorte longitudinal en los cuales se evaluaron las funciones cognitivas de niños nacidos de madres consumidoras de marihuana durante la gestación (revisado en [Wu y col., 2011]). En dichos estudios, los niños expuestos a marihuana durante el primer y segundo trimestre de gestación mostraron un menor rendimiento en la memoria a corto plazo y en el razonamiento verbal evaluado mediante la escala de inteligencia de Stanford-Binet. Mientras que en edades adolescentes, mostraron problemas de depresión, hiperactividad, falta de atención e impulsividad, lo cual sugiere un deterioro en procesos cognitivos complejos tales como las funciones ejecutivas [Day y col., 2011; Goldschmidt y col., 2012; Gray y col., 2005]. Dichas funciones ejecutivas comprenden diferentes capacidades, como la flexibilidad cognitiva, la atención focalizada y sostenida y la memoria de trabajo y son atribuidas a la corteza prefrontal [Fried y col., 2003]. Datos obtenidos de estas mismas cohortes, demostraron déficit en funciones ejecutivas en adolescentes de entre 13-16 años (revisado en [Wu y col., 2011]).

En un estudio reciente se evaluaron cambios volumétricos en el cerebro por medio de imágenes de resonancia magnética funcional (fMRI). Este estudio realizado en niños de entre 10 y 14 años de edad que habían sido expuestos a marihuana durante la gestación, describió un volumen de sustancia gris cortical y del parénquima reducido, en comparación con niños de madres no consumidoras [Rivkin y col., 2008]. En otro estudio realizado mediante fMRI en jóvenes de entre 18 y 22 años de edad expuestos prenatalmente a la marihuana se demostró la existencia de variaciones en la actividad neuronal de la corteza prefrontal bilateral y en la corteza premotora derecha

durante la realización de ciertas tareas. Más aún, el mismo trabajo describió cambios en los niveles de actividad neuronal durante la realización de tareas de memoria de trabajo visual-espacial [Smith y col., 2006].

En resumen, el consumo de marihuana durante la gestación tiene importantes y variables efectos sobre la descendencia en varias áreas del desarrollo cognitivo. Sin embargo, a pesar de la consistencia de estos datos clínicos, no se pueden excluir las variables genéticas, las cuales pueden contribuir a la relación entre el uso materno de cannabis y los déficit cognitivos de largo plazo de la descendencia.

1.3.2. Consecuencias de la exposición prenatal a cannabinoides en modelos animales

Los estudios longitudinales de cohorte realizado en humanos sobre las consecuencias neuro-comportamentales del uso de drogas de abuso durante la gestación están sujetos a numerosos factores como la dosis, el uso simultáneo de varias drogas, la duración y frecuencia del uso de la droga, el estadio de la gestación y factores ambientales como la nutrición maternal y/o los problemas socioeconómicos. Frente a estas variables, los modelos animales ofrecen un control experimental más ajustado sobre estos factores y permiten detectar múltiples alteraciones neurobiológicas en las crías de madres tratadas con cannabinoides sintéticos [Schneider, 2009].

La administración temprana, antes o durante la organogénesis, así como el uso de elevadas dosis de cannabinoides produce anormalidades morfológicas comparables con los del síndrome de alcoholismo fetal. Sin embargo, esto es un efecto tóxico a nivel sistémico [Fernandez-Ruiz y col., 2000]. Por tal motivo, en éste trabajo se utilizó una dosis de cannabinoides moderada, la cual reflejaría con más precisión las dosis utilizadas por mujeres embarazadas.

Numerosos trabajos validan el modelo de exposición prenatal a cannabinoides utilizado en ésta tesis [Antonelli y col., 2004; Antonelli y col., 2006; Antonelli y col., 2005; Castaldo y col., 2007; Castelli y col., 2007; Ferraro y col., 2009; Maj y col., 2007; Mereu y col., 2003; Shabani y col., 2011a]. La exposición prenatal a dosis moderadas del agonista sintético del rCB1 y rCB2 WIN55,212-2 induce, en la rata, una disrupción en la retención de la memoria en la crías de DP40 y 80 asociado con alteraciones en la potenciación a largo término (LTP) y la liberación de glutamato. Estos cambios en la

neurotransmisión glutamatérgicas podría explicar el deterioro en las funciones cognitivas a largo plazo. [Mereu y col., 2003]. Esta hipótesis esta soportada por experimentos *in vivo* de microdiálisis donde se observó que la exposición gestacional a WIN induce una consistente reducción en la liberación de glutamato basal y evocados por K^+ en la corteza prefrontal de las crías [Antonelli y col., 2004; Antonelli y col., 2005]. Los daños cognitivos observados en crías adultas expuestas prenatalmente a cannabinoides fueron asociados con alteraciones en la expresión cortical de genes relacionados con la neurotransmisión glutamatérgicas y a un incremento en los niveles corticales extracelulares de este neurotransmisor [Campolongo y col., 2007].

Si bien aún no se conocen con exactitud las vías moleculares que subyacen estos cambios neuro-comportamentales, numerosos estudios demostraron que la exposición prenatal a la marihuana produce alteraciones en los sistemas GABAérgicas, glutamatérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos y opioides (revisado en [Jutras-Aswad y col., 2009]).

En resumen, el paralelismo entre los daños cognitivos, tanto en humanos como en roedores, soporta la utilidad de estudios en animales de experimentación para obtener información acerca de las consecuencias neuro-comportamentales del uso materno de marihuana.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2. Objetivos e hipótesis

Hipótesis

La hipótesis de trabajo supone que tanto la exposición prenatal a un agonista de los receptores cannabinoides a través de la activación persistente de sus receptores como la delección del rCB1, produciría un desbalance del sistema eCB durante el desarrollo. Dicha desregulación del sistema de señalización endocannabinoide, el cual cumple un importante rol durante el desarrollo de SNC, induciría modificaciones en diversos procesos claves de la corticogénesis.

Objetivos

En base a las consideraciones mencionadas en la introducción, en el presente trabajo se plantea el estudio de las alteraciones inducidas por la exposición prenatal al agonista cannabinoide WIN 55,212-2 y por la delección del rCB1 sobre procesos claves que suceden durante el desarrollo de la corteza cerebral de los roedores.

De este objetivo general, se derivan los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Estudiar la expresión y localización espacio-temporal del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración y en distintos subtipos neuronales en el palio dorsal de la rata de día E12,5; E13,5; E14,5; E15,5; E16,5 y E20,5.
- II. Evaluar los efectos de la exposición prenatal al agonista de receptor cannabinoide CB₁/CB₂ WIN55,212-2 sobre la proliferación, migración y diferenciación neuronal de la corteza cerebral en desarrollo de la rata.
- III. Evaluar los efectos de la delección del rCB1 sobre la migración y diferenciación de neuronas glutamatérgicas y la citoarquitectura de la corteza del ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales de experimentación

3.1.1. Cuidado y origen de los animales de experimentación

Todos los procedimientos para el cuidado y el uso de animales de experimentación fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Facultad de Medicina (UBA) y fueron llevados a cabo de acuerdo con la Guía para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio del *National Institute of Health* (NIH). Se realizaron todos los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento de los animales y el número de animales utilizados fue el mínimo requerido para la interpretación significativa de los datos.

Las ratas hembras nulíparas y machos, de la especie *Rattus norvegicus*, cepa Wistar, fueron adquiridas en el Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Los ratones hembras nulíparas y machos (*Mus musculus*) de la cepa CD1 (CB1^{+/+}, *wildtype*) y ratones *cnr1*^{-/-} con *background* genético de la cepa CD1 (CB1^{-/-}, *knockout*), fueron donados por el laboratorio del Dr. Nagy (*Hungarian Academy of Science y la Semmelweis University*, Budapest, Hungría). Los ratones mutantes fueron generados según se describe en [Ledent y col., 1999].

Las ratas y los ratones fueron alojados en salas de animales independientes pertenecientes al Instituto de Biología Celular y Neurociencia. Los animales fueron mantenidos en cuartos con temperatura (22 ~ 2 °C) y humedad (50 - 70 /) controlada y con un ciclo luz/oscuridad artificial de 12:12 hs y alimentados con una dieta sólida estándar y agua disponible *ad libitum*. Los animales fueron manipulados por cinco días consecutivos previos a los experimentos para disminuir el estrés.

3.1.2. Apareamiento y diagnóstico de la preñez

Ratas hembras nulíparas de ocho a diez semanas de edad (220 a 280 g de peso corporal) en fase proestro de su ciclo estral fueron puestas a aparear con un único macho a las 18 hs. A las 8 hs de la mañana siguiente se diagnosticó la preñez mediante un extendido vaginal en el cual se determinó la presencia o ausencia de espermatozoides. El día en que el diagnóstico de la preñez resultó positivo se consideró como el día E0,5.

Ratones hembras nulíparas CB1^{+/+} y CB1^{-/-}, de siete a diez semanas de edad (25 a 35 g de peso corporal) fueron puestas a aparear con un único macho del mismo genotipo a las 18 hs. A las 8 hs de la mañana siguiente se diagnosticó la preñez mediante la observación del tapón vaginal. El día en que el diagnóstico de la preñez resultó positivo se consideró como el día embrionario 0,5 (E0,5).

3.1.3 Análisis de genotipificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El análisis de genotipificación fué realizado en el laboratorio de Fisiología de la Preñez y el Parto, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO, UBA-CONICET). Brevemente, las muestras para la extracción de ADN se tomaron de secciones de la cola de los ratones de la cepa CD1 y ratones de la cepa CD1 *cnr1*^{-/-} (CB1^{-/-}) de día postnatal 21. Para las reacciones de amplificación se utilizaron los siguientes cebadores específicos: *cnr1 forward*: 5'-catcatcacagatttctatgtac-3' y *cnr1 reverse*: 5'-gaggtgccaggaggaacc-3'; *Neo forward*: 5'-gcaggatctcctgtcatctcacc-3' y *Neo reverse*: 5'-gatgctcttcgtccagatcatcc-3'. De la primer reacción de PCR con los cebadores *cnr1 forward* y *reverse* se obtuvo un producto de amplificación de 366pb correspondiente al gen *cnr1* en el caso de los ratones CB1^{+/+}, mientras que los ratones CB1^{-/-} no produjeron un fragmento de amplificación. A su vez, para la segunda reacción de amplificación con los cebadores *Neo forward* y *Neo reverse* se obtuvo un fragmento de 200pb correspondiente al casete de neomisina en los ratones CB1^{-/-}, mientras que los ratones CB1^{+/+} no produjeron un fragmento de amplificación.

3.2. Modelo experimental: tratamiento prenatal con el agonista de receptores cannabinoides CB₁/CB₂ WIN55,212-2

3.2.1. Tratamiento

Para el tratamiento de exposición prenatal se utilizó un agonista no selectivo de los rCB1 y rCB2: mesilato de (R)-(+)-[2,3-dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil) pirrol [1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naftalenil-metanona (WIN55,212-22-2, Sigma). Una cantidad equivalente a 0,75 mg de WIN por cada kilogramo de peso corporal disuelta en una solución 0,3% Tween 80 en solución fisiológica fue administrada a los animales del grupo tratado. Brevemente, los mg de WIN correspondientes a cada dosis de cada animal fueron disueltos en etanol absoluto. Luego se adicionó la misma proporción de

Tween 80 (Sigma), se homogenizó la mezcla e inmediatamente se gaseó con N₂ para eliminar el etanol. Finalmente se añadió el volumen necesario de solución fisiológica estéril para completar un volumen de inyección de 1 ml/Kg. La preparación de cada una de las dosis a inyectar se realizó inmediatamente antes de su administración y en todo momento la droga fue protegida de la luz y del oxígeno ambiental. Para el grupo control se precedió con el mismo protocolo pero en ausencia del WIN.

Las ratas preñadas fueron asignadas al azar a dos grupos experimentales por cada día embrionario estudiado ($n=5$): **i)** grupo tratado, el cual recibió una dosis diaria de 0,75 mg/Kg de WIN y **ii)** grupo control, el cual recibió sólo el vehículo. El tratamiento se administró en una única dosis diaria por vía subcutánea aplicada en el cuello a fin de evitar lesiones en los sacos amnióticos producto de una inyección intraperitoneal. Las dosis de WIN y vehículo se administraron desde el día gestacional cinco hasta el día de la extracción de los fetos (E12,5; E14,5; E16,5 y E20,5).

La dosis de 0,75 mg/Kg se eligió en base a estudios previos en los cuales se observó que un tratamiento prolongado a dosis más altas, 1 mg/Kg, afecta significativamente ciertos parámetros gestacionales, tales como la ganancia de peso de las hembras preñadas y de sus crías y el peso de las crías al nacer [Mereu y col., 2003]. Más aún, las crías de las madres expuestas a 1 mg/Kg a WIN durante la gestación mostraron una mortalidad del 100% durante los primeros cinco días postnatales [Shabani y col., 2011b]. A su vez, se describió que los cannabinoides pueden resultar teratogénicos y afectar los procesos de implantación embrionaria y organogénesis. Por tal motivo, en los modelos de exposición prenatal a cannabinoides se evitan éstos efectos al iniciar el tratamiento a partir del día cinco de gestación. De esta forma, el tratamiento con WIN se inicia una vez que el embrión ya está implantado y después de los primeros días del periodo de organogénesis, pero se aplica durante los procesos de desarrollo del SNC que interesa estudiar, como la proliferación, la migración y diferenciación neuronal [Rice y col., 2000].

3.2.2. Control de parámetros gestacionales

En el periodo prenatal se controlaron los siguientes parámetros: ganancia diaria del peso de la madre duración de la gestación, tamaño de la camada al momento de la cesárea y mortalidad prenatal. La mortalidad prenatal se cuantificó mediante la

observación de embriones o fetos reabsorbidos, los cuales son evidenciados por los sacos amnióticos vacíos al momento de la cesárea.

3.3. Estudios por microscopía óptica y confocal

3.3.1. Procesamiento de los embriones para el análisis histológico

Para la caracterización de la expresión del rCB1 se utilizaron embriones de ratas de día E12,5, 13,5, E14,5, E15,5 y E16,5. Para el estudio de la exposición prenatal a WIN se utilizaron embriones de rata de día E12,5, E14,5, E16,5, E20,5. Para el estudio de los efectos de la delección del rCB1 se utilizaron embriones de ratones *wildtype* (CB1^{+/+}) y *knockout* (CB1^{-/-}) de E16,5. Los animales preñados fueron anestesiados con una solución de ketamina:xilacina, 70 mg/kg:10 mg/kg, i.p. e hysterectomizados. Para este fin, se realizó una incisión en los cuernos uterinos grávidos y se extrajeron los embriones con sus sacos amnióticos. Inmediatamente y sobre hielo, se abrieron los sacos y se decapitaron los embriones. Bajo un microscopio de disección se disecaron rápidamente las cabezas enteras de los embriones de rata (E12,5; E13,5; E14,5) o los cerebros de embriones de rata (E15,5; E16,5 y 20,5) y de ratón (E16,5). Los animales sometidos al procedimiento de hysterectomía fueron eutanasiados mediante una sobredosis de xilacina intraventricular.

Las cabezas y los cerebros aislados fueron fijados por inmersión en 4% p/v paraformaldehído en solución amortiguadora de fosfatos 0,1M pH7,4 (PB) durante 18 hs a 4 °C. Después, se lavaron en solución salina amortiguadora de fosfatos 0,1M pH7,4 (PBS) y se crioprotegieron por inmersión en una solución de 30% p/v sacarosa en PBS por 48 hs a 4 °C. Las cabezas y cerebros se congelaron rápidamente por inmersión en un líquido refrigerante a alta presión en aerosol (Electroquímica Delta) y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento. Las secciones coronales de 20 µm se obtuvieron mediante un criostato, se montaron sobre portaobjetos tratados con silano-acetona, y se conservaron a -20 °C.

3.3.2. Procesamiento de los animales postnatales para el análisis histológico

Los ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-} de día postnatal 21 (DP21) fueron anestesiados con una mezcla de ketamina:xilacina, 100 mg/kg:10 mg/kg, i.p., y perfundidos mediante una cánula introducida en el ventrículo izquierdo del corazón, en primer lugar con

solución fisiológica (0,9/ p/v NaCl) para eliminar la sangre y a continuación con una solución de 4/ p/v paraformaldehído en PB. Una vez perfundidos los animales, se extrajeron los cerebros y se post-fijaron por inmersión en la misma solución fijadora por 4 hs a 4 °C. A continuación, los cerebros fueron lavados en PBS y crioprotegidos por inmersión en una solución de 30/ p/v sacarosa en PBS durante 48 hs a 4 °C. Finalmente, los cerebros fueron fijados en forma rápida por inmersión en un líquido refrigerante a alta presión en aerosol (Electroquímica Delta). Por medio de un vibrátomo se obtuvieron secciones coronales de 40 µm, las cuales fueron conservadas en una solución de 50/ v/v glicerol en PBS a -20 °C hasta su procesamiento.

3.3.3. Selección de secciones de tejido: aéreas cerebrales evaluadas

Para seleccionar las secciones coronales de embriones de rata se tuvieron en cuenta estructuras anatómicas correspondientes a las planchas de día E12,5 a E19,5 del *Atlas of the developing rat nervous system* [Paxinos y col., 1994]. Para seleccionar las secciones coronales de embriones de ratón se tuvieron en cuenta estructuras anatómicas correspondientes a las planchas de día E16 del *Electronic Prenatal Mouse Brain Atlas* (<http://www.epmba.org>). Para ambas especies, las secciones fueron definidas por la presencia de diferentes estructuras del subpalio: EGM para las secciones rostrales, EGL y EGM para las secciones mediales y la EGC para las secciones caudales (**Figura 7**). A su vez, dado que el palio dorsal presenta un gradiente de desarrollo dorso-ventral, en cada sección coronal las cortezas fueron divididas en tres partes: dorsal (limita con las EG), media y ventral (limita con el primordio hipocampal).

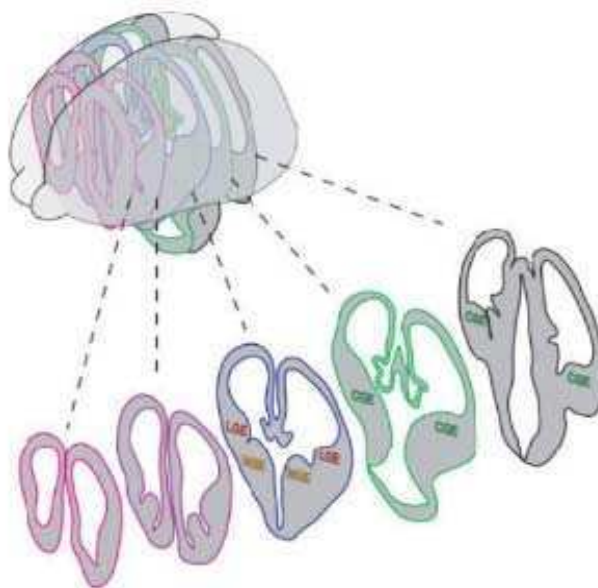


Figura 7. Esquema de cortes coronales de un embrión de día E14,5-16,5, a nivel rostral (sección rosa), medial (sección azul) y caudal (secciones verde y negro).

Para la selección de secciones coronales de cerebro de ratón de DP21 se utilizó el atlas *The mouse brain in stereotaxic coordinates* [Paxinos y col., 2004]. Con objeto de mantener un criterio constante a la hora de realizar las comparaciones entre el grupo $CB1^{+/+}$ y $CB1^{-/-}$, se utilizaron secciones correspondientes a niveles de Bregma entre 0,5mm a 1,10 mm, los cuales abarcaron la zona de interés para las cuantificaciones realizadas.

3.3.4. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ)

Las secciones coronales de las cabezas y cerebros de los embriones y fetos de rata y ratón, montadas previamente sobre portaobjetos, fueron delimitadas con un lápiz hidrofóbico *Dako Pen* (Dako). Las secciones fueron mantenidas en una cámara húmeda durante todo el procesamiento. Por su parte, las secciones coronales de los cerebros de ratones postnatales fueron procesadas en libre flotación en una placa *multiwell* de 24 pocillos. Tanto las secciones adheridas a portaobjetos como las de libre flotación, fueron tratadas de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Lavados en PBS - 2x10 min.

2. Permeabilización y bloqueo: 5/ v/v suero normal de cabra y 0,5/ v/v Tritón X-100 en PBS - 60 min a 25 °C.
3. Incubación de anticuerpo primario (**Tabla 2**) - 18 a 48 hs a 4 °C.
4. Lavados en PBS - 3x10 min.
5. Incubación con anticuerpo secundario conjugado a biotina (**Tabla 3**) - 90 min a 25 °C.
6. Lavados en PBS - 3x10 min.
7. Inhibición de peroxidasa endógena: 0,5/ v/v H₂O₂ (Merck) en PBS - 20 min a 25 °C.
8. Lavados en PBS - 3x5 min.
9. Incubación con *ExtrAvidin*[®]-peroxidasa (Sigma) - 90 min a 25 °C.
10. Lavados en PBS - 3x10 min.
11. Lavados en solución amortiguadora de acetato pH6 (BA) - 1x5 min.
12. Revelado de la actividad peroxidasa: incubación en 0,035/ p/v 3,3'-diaminobenzidina (tetrahidroclorhidrico) y 4/ p/v sulfato de níquel-amonio (hexahidratado) en BA - 1 a 5 min.
13. Lavados en BA - 1x5 min.
14. Lavados con H₂O_d - 1x5 min.
15. Las secciones en libre flotación se montaron en portaobjetos pre-tratados con silano-acetona.
16. Deshidratación: secado en platina calefactora y posterior inmersión en xilol.
17. Montaje con medio de montaje Canadax[®] (Biopur diagnostics).

Todos los anticuerpos fueron diluidos en 1/ v/v suero normal de cabra y 0,1/ v/v tritón X-100 en PBS.

3.3.5. Técnica de inmunofluorescencia (IF)

Las secciones coronales de las cabezas y cerebros de los embriones y fetos de rata y ratón, montadas previamente sobre portaobjetos, fueron delimitadas con un lápiz hidrofóbico *Dako Pen* (Dako). Las secciones fueron mantenidas en una cámara húmeda durante todo el procesamiento. Por su parte, las secciones coronales de los cerebros de ratones postnatales fueron procesadas en libre flotación en una placa

multiwell de 24 pocillos. Tanto las secciones adheridas a portaobjetos como las de libre flotación, fueron tratadas de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Lavados en PBS - 2x10 min.
2. Permeabilización y bloqueo: 5/ v/v suero normal de cabra y 0,5/ v/v Tritón X-100 en PBS - 60 min a 25 °C.
3. Incubación con uno (simple IF) o dos anticuerpos primarios (doble IF) (**Tabla 2**) - 18 a 48 hs a 4 °C.
4. Lavados en PBS - 3x10 min.
5. Incubación con uno o dos anticuerpos secundarios conjugados con el fluorocromo correspondiente (**Tabla 3**) - 4 hs a 25 °C.
6. Lavados en PBS - 3x10 min.
7. Contra-tinción de núcleos: incubación con bisbenzimidida H33342 (hoechst, Sigma) 1X en PBS - 10 min a 25 °C.
8. Lavados en PBS - 3x10 min.
9. Las secciones en libre flotación se montaron en portaobjetos pre-tratados con silano-acetona y se dejaron secar el tiempo suficiente para que se adhieran al vidrio.
10. Montaje con medio de montaje *Fluoroshield* (Sigma) o 70/ v/v glicerol en PBS.

Todos los anticuerpos fueron diluidos en 1/ v/v suero normal de cabra y 0,1/ v/v tritón X-100 en PBS.

3.3.6. Controles de la técnica de IHQ e IF

Se realizaron los siguientes controles de especificidad de los anticuerpos primarios y secundarios:

- a) Omisión del anticuerpo primario en la primera incubación, para detectar posibles uniones inespecíficas del anticuerpo secundario al tejido.
- b) Omisión del anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo para detectar posible auto-fluorescencia del tejido.
- c) Omisión de los anticuerpos primarios y secundarios, por si existen uniones inespecíficas del *ExtrAvidin*[®]-peroxidasa (Sigma).

- d) Pre-absorción del anticuerpo anti-receptor CB1 con péptido bloqueante inmunogénico (Cayman), el cual impide la formación del complejo proteína-anticuerpo durante el procesamiento de la IHQ.

3.3.7. Anticuerpos primarios

Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios utilizados para IHQ e IF.

epitope	tipo	dilución	clon	laboratorio
calbindina D-28K	ratón, monoclonal	1:500	CB-955	Sigma
calbindina D-28K	ratón, monoclonal	1:2000	-	Swant
calretinina	ratón, monoclonal	1:600	6B8.2	Millipore
calretinina	Conejo, policlonal	1:2000	-	Zymed
doblecortina	cobayo, policlonal	1:4000	-	Chemicon
GABA	conejo, policlonal	1:1000	-	Sigma
Ki67	ratón, monoclonal	1:800	Ki-S5	Chemicón
MAP-2	ratón, monoclonal	1:1000	HM-2	Sigma
nestina	ratón, monoclonal	1:3000	Rat-401	Chemicón
neurofilamento 200KDa	Ratón, monoclonal	1:2000	N52	Sigma
rCB1	conejo, policlonal	1:2000	-	Cayman
reelina	ratón, monoclonal	1:1000	G10	Chemicón
sinaptofisina	ratón, monoclonal	1:1000	SVP-38	Sigma
Tbr1	conejo, policlonal	1:1000	-	Abcam
Tbr2	conejo, policlonal	1:1000	-	Millipore

3.3.8. Anticuerpos secundarios

Tabla 3. Lista de anticuerpos secundarios utilizados para IHQ e IF.

epitope	conjugado	Tipo	Dilución	Laboratorio
cobayo IgG	FITC	cabra	1:400	Millipore
ratón IgG	biotina	cabra	1:400	Sigma
conejo IgG	biotina	cabra	1:400	Sigma
ratón IgG	FITC	caballo	1:400	Vector Laboratories
ratón IgG	Texas Red	caballo	1:300	Vector Laboratories
conejo IgG	FITC	cabra	1:400	Vector Laboratories
conejo IgG	Texas Red	cabra	1:300	Vector Laboratories

3.3.9. Reacción de TUNEL

Los fragmentos de ADN que se originan durante el proceso de apoptosis se evidenciaron mediante el kit comercial *ApopTag[®] Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit* (S7111, Chemicón), según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las secciones se incubaron con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y nucleótidos dNTP. La enzima TdT cataliza la unión de los nucleótidos dNTP conjugado a dioxigenina al extremo 3'OH terminal libre presente en los fragmentos de ADN de simple hebra. Luego las secciones se incubaron con un anticuerpo ant-dioxigenina conjugado con isotiocianato de fluoresceína para su visualización en un microscopio de epifluorescencia.

Todas las soluciones fueron preparadas en H₂O destilada libre de desoxirribonucleasa (DNAsa), utilizando reactivos de grado biología molecular, para evitar resultados falsos positivos debido a contaminación con DNAsa. Los controles positivos se realizaron mediante la pre-incubación de las secciones con DNAsal (Invitrogen) y los controles negativos mediante la omisión de la incubación con la enzima TdT. Se realizó una tinción de contraste y se procedió al montaje con medio de montaje.

3.3.10. Microscopía y adquisición de imágenes

Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio de epifluorescencia *Axiolab* (Carl Zeiss) acoplado a una cámara CCD *Q-Color3* (Olympus) y un microscopio confocal laser de barrido *FluoView FV1000* (Olympus). El tratamiento digital posterior a la toma de las imágenes se realizó mediante el software *Adobe[®] Photoshop[®] CS4* con el objeto de ajustar el tamaño, resolución y los balances de color.

3.3.11. Análisis de cuantificación sobre las imágenes adquiridas

Las imágenes adquiridas se analizaron con los softwares *ImageJ* (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e *Image-Pro[®] PLUS 4.5* (MediaCybernetics).

Cuantificación de células DCX⁺. Para el análisis de la orientación radial o tangencial de las neuronas postmitóticas en migración se cuantificaron las células DCX⁺ ubicadas en la ZV/ZSV, y se midió el ángulo de la neurita principal con respecto a una línea virtual

transversal a la superficie del ventrículo y se fijaron dos criterios: las células DCX⁺ orientadas con un ángulo de menor a 25° se consideraron radiales y las células orientadas con un ángulo mayor a 25° se consideraron tangenciales.

Cuantificación de células Ki-67⁺. Se cuantificó el número de células en proliferación marcadas con ki67 en la ZV y ZSV contenidas en una columna de 500 µm de ancho de secciones mediales del palio dorsal de embriones de rata de día E12,5, E14,5 y E16,5.

Cuantificación de células Tbr2⁺. Se cuantificó el número de células Tbr2⁺ en la ZV y ZSV contenidas en una columna de 500 µm de ancho de secciones mediales del palio dorsal de embriones de rata de día E12,5, E14,5, E16,5 y E20,5 y de ratón de día E16,5.

Cuantificación de células Tbr1⁺. Se cuantificó el número de células Tbr1⁺ en la SP, PC y ZM contenidas en una columna de 500 µm de ancho de secciones mediales del palio dorsal de embriones de rata de día E12,5, E14,5, E16,5 y E20,5 y de ratón de día E16,5.

Cuantificación de células reelina⁺. Se cuantificó el número de células reelina⁺ en la ZM contenidas en una columna de 500 µm de ancho de secciones mediales del palio dorsal de embriones de rata de día E14,5 y E16,5.

Cuantificación de cuerpos apoptóticos mediante la técnica de TUNEL⁺. Debido a que el número de cuerpos TUNEL⁺ en cada sección era muy pequeño, el análisis de las células TUNEL⁺ se realizó mediante recuento directo bajo un microscopio de epifluorescencia. Los resultados se expresaron como número medio de cuerpos apoptóticos por hemisferio para cada una de las áreas estudiada (palio dorsal y EG).

Cuantificación de la disposición laminar de interneuronas a edades postnatales. Una columna de 200 µm de ancho que abarcó el espesor de la corteza motora primaria, fue dividida en diez cuadrantes iguales y se cuantificó el número de células contenidas en cada uno de estos. Los datos se expresaron como el porcentaje medio de células por cuadrante a fin de determinar la distribución laminar de interneuronas.

3.4. Ensayo de Western Blot (WB)

3.4.1. Obtención de la fracción proteica total

Los ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-} preñados de día gestacional 16,5 fueron anestesiados (ketamina:xilacina, 70 mg/kg:10 mg/kg, i.p.) e hysterectomizados según se describió previamente. Una vez obtenidos los cerebros de los fetos, se disecaron los telencéfalos dorsales en solución salina sobre hielo, bajo un microscopio de disección. Para cada genotipo, se obtuvieron telencéfalos de tres embriones por unidad experimental ($n=4/5$).

Los telencéfalos aislados fueron homogenizados en un homogenizador con solución amortiguadora de lisis RIPA (tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, 0,1/ p/v SDS, 0,5/ p/v Na-desoxicolato, 1/ v/v Igepal CA-630, EDTA 1mM) suplementado con inhibidores de fosfatasas (Na₃VO₄ 1mM, NaF 10mM) e inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, coctel de inhibidores de proteasas 1X). Los homogenatos fueron centrifugados a 12.500g durante 30 min y los sobrenadantes resultantes alicuotados y conservados a -80 °C. Todo el procedimiento fue realizado a 4 °C. La determinación de la concentración de proteína se realizó mediante el método de Lowry [Lowry y col., 1951].

3.4.2. Electroforesis y electrotransferencia

Las proteínas fueron solubilizadas en solución amortiguadora de carga (tris-HCl 62,5mM pH6,8, 2/ p/v SDS, 10/ p/v 2β-mercaptoetanol, 10/ p/v glicerol, 0,002/ p/v azul de bromofenol) y desnaturalizadas a 98 °C durante 10 min. A continuación se sembró 30 μg de proteínas desnaturalizadas en un gel de poliacrilamida-SDS y se las sometió a electroforesis a 100V en la solución de corrida. Se utilizó un gel concentrador de 5/ de poro y un gel separador de 6,5 o 12/ de poro. Luego, las proteínas fueron electroforéticamente transferidas a una membrana de PVDF (*PolyVinildene DiFluoride* en idioma inglés) *Immobilon-P* (Millipore) a 300mA durante 90 o 120 min.

3.4.3. Inmunoblot

Las membranas de PVDF fueron tratadas según el siguiente procedimiento:

1. Lavados con PBS 0,1M pH7,4 - 2x10 min.
2. Bloqueo: en PBST (0,1/ Tween 20 en PBS 0,1M pH7,4) con 5/ p/v leche descremada - 18 hs a 4 °C en agitación.
3. Incubación de anticuerpo primario diluido en PBST con 1/ p/v BSA (**Tabla 4**) - 18 a 48 hs a 4 °C en agitación.
4. Lavados con PBST - 2x1 min, 3x10 min.
5. Incubación con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanita (**Tabla 5**) diluido en PBST con 1/ p/v BSA - 4 hs a 25 °C, en agitación.
6. Lavados con PBST - 2x1 min, 3x10 min.
7. Detección de los complejos antígeno-anticuerpo-peroxidasa mediante un kit comercial de quimioluminiscencia (*Enhanced Chemiluminescence Plus*, Pierce).
8. Exposición de las membranas de PVDF a las placas autoradiográficas (Agfa).
9. Revelado y fijado de las placas autoradiográficas.

3.4.4. Anticuerpos primarios

Tabla 4. Lista de anticuerpos primarios utilizados para WB.

epitope	tipo	dilución	clon	laboratorio
actina	conejo, policlonal	1:1000	-	Sigma
Tbr1	conejo, policlonal	1:2000	-	Abcam
Tbr2	conejo, policlonal	1:2000	-	Millipore

3.4.5. Anticuerpos secundarios

Tabla 5. Lista de anticuerpos secundarios utilizados para WB.

epitope	conjugado	Tipo	Dilución	Laboratorio
conejo IgG	peroxidasa de rabanita	cabra	1:4000	Millipore
ratón IgG	peroxidasa de rabanita	cabra	1:4000	Millipore

3.4.6. Análisis semicuantitativo de WB

Las películas reveladas se escanearon y se cuantificó la intensidad de cada una de las bandas inmunoreactivas por medio del *software* Image J. Los resultados se normalizaron a los niveles de actina, utilizada como control interno de carga, y los valores se reactivaron a los niveles del grupo control.

3.5. Análisis estadístico

En el modelo experimental de exposición prenatal a WIN se considero cada hembra como unidad experimental. Se realizaron dos a tres réplicas por cada inmunomarcador utilizado en los estudios de microscopía óptica. Los experimentos individuales estuvieron compuestos por dos a cuatro secciones de telencéfalo de cada embrión de cada grupo experimental. Se cuantificó uno a dos campos por cada hemisferio cerebral dependiendo del experimento y del estadio embrionario.

Se realizó un análisis estadístico de todos los resultados obtenidos en los distintos estudios, obteniéndose la media, el error estándar medio (EEM) y se realizó un contraste de hipótesis de normalidad. Las diferencias entre las medias de dos grupos se analizaron estadísticamente por medio de la prueba estadística test de Student de dos colas. El nivel de significancia estadística se estableció, en todos los casos, para un valor de $P < 0,05$. Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los programas *GraphPad Prism* v5.00 (GraphPad Software Inc.) y *Statistica* v7.0 (Statsoft Inc.)

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración DCX positivas y en neuronas calretinina, reelina y calbindina positivas durante el desarrollo prenatal de la corteza cerebral de la rata.

vjmy en neuronas que expresan reelina, CALB y CALR durante la corticogénesis. Se estudió la colocalización del rCB1 con estos marcadores por microscopía confocal en secciones de embriones de rata durante los periodos de migración neuronal tempranos (E12,5-E13,5) e intermedios (E14,5-E16,5).

4.1.1. Expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración

En estudios previos se describió la expresión de DCX durante el desarrollo cortical en neuronas postmitóticas en migración y en neuronas que ya han detenido su migración y que se encuentran en proceso de diferenciación neuronal [Gleeson y col., 1999]. Con el objetivo de evaluar si el rCB1 se expresa en dichas células, se realizó una doble-inmunofluorescencia con anticuerpos específicos anti-DCX y anti-rCB1.

En el día E12,5 se observó que todas las neuronas postmitóticas en migración DCX⁺ de la PP del palio dorsal expresaron el rCB1. En dichas células, el rCB1 se localizó tanto en el soma como en las neuritas. Dentro de la PP, las células CB1⁺/DCX⁺ exhibieron tanto una morfología multipolar, como una morfología bipolar de orientación tangencial. En el primer caso, esta morfología podría atribuirse a neuronas postmitóticas de proyección que ya han detenido su migración radial. Por su parte, la morfología bipolar podría atribuirse solo a cC-R, ya que en este estadio aún no arribaron las interneuronas GABAérgicas. A su vez, en la ZV se observó la expresión del rCB1 en células DCX⁺ con orientación radial, las cuales representarían neuronas postmitóticas de proyección en proceso de migración radial hacia la PP. La expresión del receptor en éstas células se observó tanto en el soma como en las neuritas de avance que presentan las neuronas durante la migración. Dichas células corresponderían a la primera oleada de neuronas postmitóticas de proyección en generarse y migrar hacia la PP (**Figura 8, A-C**).

En los embriones de día E13,5, la expresión del rCB1 presentó un patrón de localización celular similar al del día E12,5. Sin embargo en este estadio, se observó un

mayor número de neuronas $CB1^+/DCX^+$ con orientación tangencial dentro de la PP, pero por debajo de la capa que ocupa las cC-R. Por lo tanto, estas células podrían representar a las primeras interneuronas GABAérgicas en arribar al palio dorsal desde la EG (Figura 8, D-G).

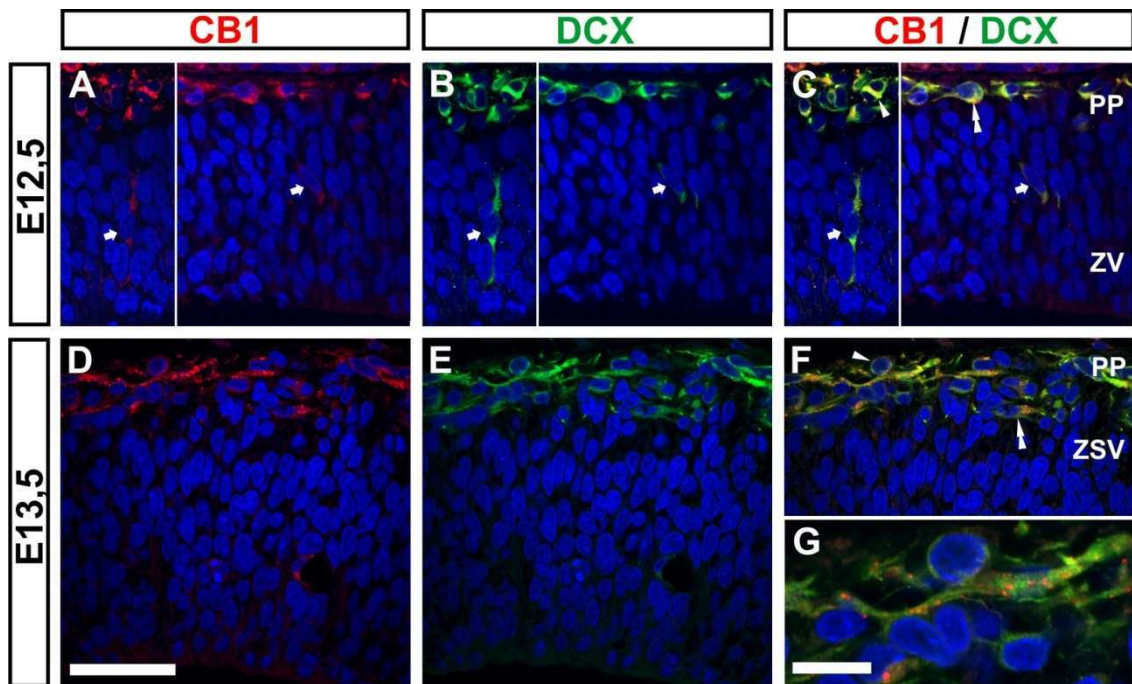


Figura 8. Expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración durante estadios tempranos de la corticogénesis. Imágenes por microscopía confocal de secciones coronales de palio dorsal de embriones de rata día E12,5 (A-C) y E13,5 (D-G), inmunomarcadas por inmunofluorescencia para rCB1 (rojo) y DCX (verde) y con contratinción con hoechst (azul). El rCB1 colocalizó con neuronas postmitóticas DCX^+ con morfología multipolar (punta de flecha) y con orientación tangencial (doble punta de flecha, inserto en G) en la PP y con orientación radial en la ZV (flecha). Abreviaturas: PP, preplaca; ZV, zona ventricular; ZSV, zona subventricular. Barras de escala: 40 μ m en A-F; 10 μ m en G.

En el día E14,5, a partir del cual se comienza a formar la placa cortical (PC) debido a las sucesivas oleadas migratorias, también se observó la expresión del rCB1 en prácticamente todas las neuronas postmitóticas de la PP (dato no mostrado). A su vez, se observó la expresión del receptor en neuronas postmitóticas en migración localizadas en las eminencias ganglionares, sitio donde se originan las interneuronas corticales y desde el cual migraran de forma tangencial hacia el telencéfalo dorsal

(Figura 9, A-D). Este hallazgo sugiere que el rCB1 se expresa en interneuronas desde etapas tempranas en la migración, previo a comenzar la migración hacia el palio.

A partir de los días E15,5 y E16,5, se observó una elevada expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas DCX⁺ en la ZM y PC. Pero, además, la expresión del receptor se extendió hacia la ZI, localizándose en neuritas DCX⁺ con orientación tangencial, las cuales podrían corresponder a axones en desarrollo de las primeras neuronas postmitóticas de proyección localizadas en la PC y SP (Figura 9, E-G). En la región más ventral del palio dorsal, próximo al límite palio/subpalio, la expresión del rCB1 se observó en somas y neuritas DCX⁺ de orientación principalmente radial, localizados en la ZV y ZSV (Figura 9, H-J). Dichas células podrían representar neuronas de proyección en migración radial hacia la PC o bien a interneuronas en migración radial hacia la ZM desde donde luego van a transitar la corriente migratoria tangencial superficial y dirigirse hacia el hipocampo. No se observó la expresión del rCB1 en las células DCX⁺ de la ZSV/ZV en regiones más mediales y dorsales del palio. En resumen, la expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas que están en activa migración y en neuronas que ya han detenido su migración en la PC reflejaría la participación del sistema eCB en los procesos de migración y diferenciación neuronal.

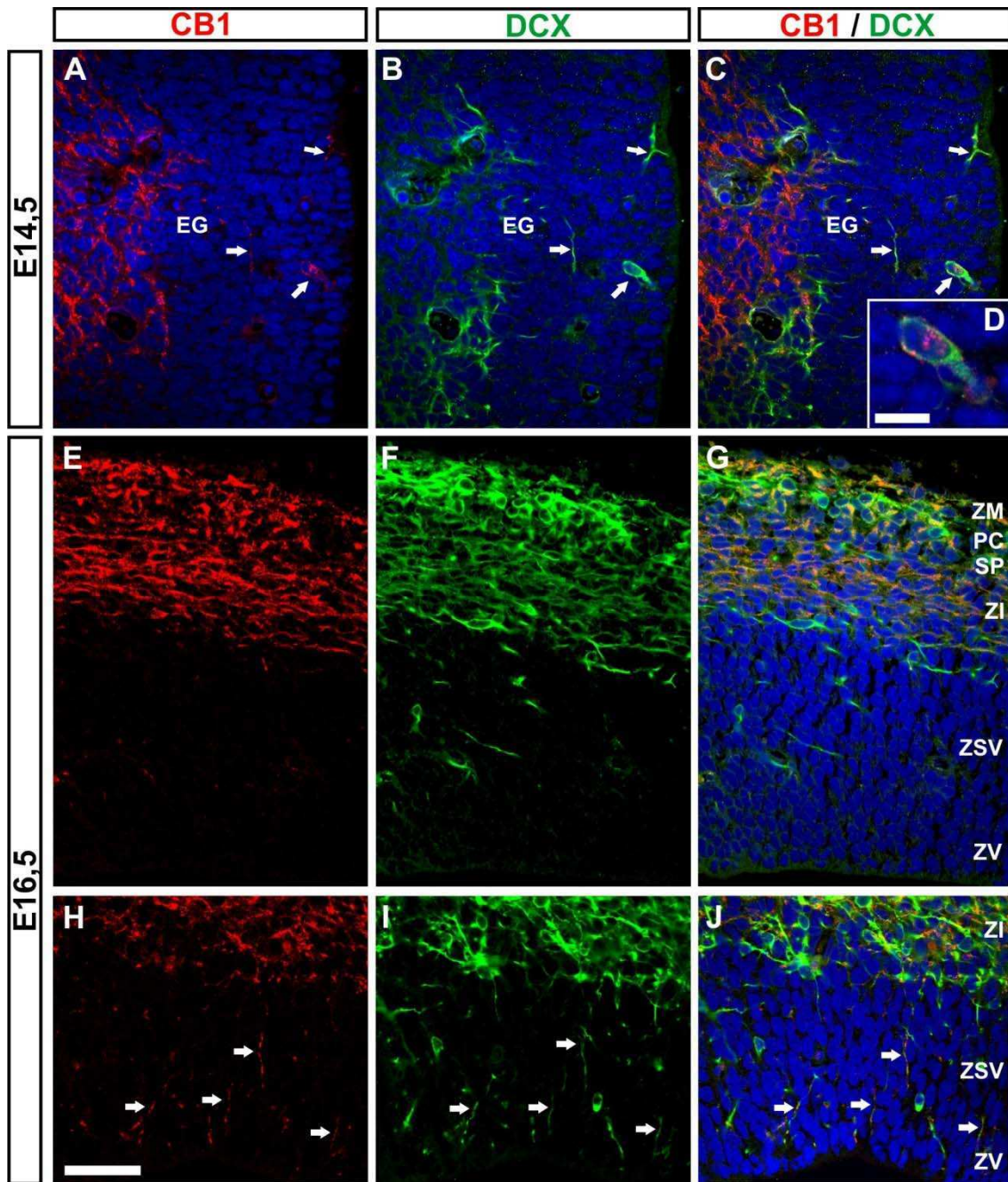


Figura 9. Expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración y post-migración durante estadios intermedios de la corticogénesis. Imágenes por microscopía confocal. Doble inmunofluorescencia para el rCB1 (rojo) y DCX (verde) y con contra-tinción con hoechst (azul) en secciones coronales de telencéfalo de embriones de rata de día E14,5 (A-D) y E16,5 (E-J). A-D: expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas DCX⁺ en la zona del manto y ZSV de la EG, en el telencéfalo ventral. E-G: expresión del rCB1 en células DCX⁺ en la ZM, PC y ZI en una región medial del palio dorsal. H-J: expresión del rCB1 en neuritas DCX⁺ con orientación radial (flechas) en la ZV/ZSV en una región próxima al límite palio/subpalio en el palio dorsal. Abreviaturas: EG, eminencia ganglionar; PC, placa cortical; ZM, zona marginal; ZI, zona intermedia; ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular. Barras de escala: 40 μm en A-C, E-J; 10 μm en D.

4.1.2. Expresión del rCB1 en neuronas reelina, calretinina y calbindina positivas

Si bien existen estudios sobre la expresión del rCB1 durante el desarrollo del telencéfalo [Morozov y col., 2009; Mulder y col., 2008; Vitalis y col., 2008], estos estudios están realizados principalmente en ratón, por otro lado, aún no hay un estudio de la expresión de este receptor en las distintas subpoblaciones neuronales durante la corticogénesis temprana.

4.1.2.1. Expresión del rCB1 en neuronas reelina positivas

Las cC-R, junto con las neuronas de proyección pioneras, son unas de las primeras células en arribar a la corteza cerebral en desarrollo y formar la PP. Las cC-R expresan específicamente reelina y no expresan GABA [Hevner y col., 2003; Jiménez y col., 2003]. Al comienzo de la corticogénesis, en el día E12,5, se observó que la mayoría de las células de la PP fueron $CB1^+/reelina^+$ y sólo algunas células fueron $CB1^+/reelina^-$ o $CB1^-/reelina^+$. Se observaron unas pocas cC-R $CB1^+/reelina^+$ ectópicas en la ZV, en proceso de migración radial hacia la PP, la cual no es una localización habitual de éstas células (**Figura 10, A-C**). El día embrionario siguiente, se observó una mayor cantidad de células $CB1^+/reelina^+$ que arribaron a la PP desde sus diversos sitios de origen. Sin embargo, también se observó una mayor cantidad de células $CB1^+/reelina^-$ que corresponderían a neuronas postmitóticas pioneras, originadas en la ZV del palio dorsal, y que luego permanecerán en la SP (**Figura 10, D-F**). Paralelamente, se observaron de forma esporádica oleadas discretas de neuronas en migración radial tanto $CB1^+/reelina^+$ como $CB1^+/reelina^-$ en la ZV (**Figura 10, F**).

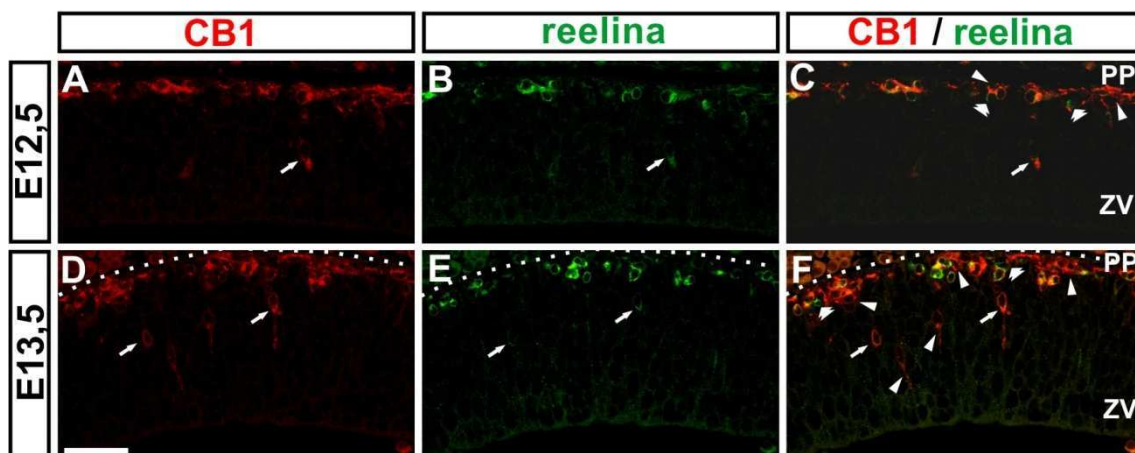


Figura 10. Expresión del rCB1 en células reelina⁺ durante estadios tempranos de la corticogénesis. Imágenes por microscopía confocal de doble inmunofluorescencia para el rCB1 (rojo) y reelina (verde) en secciones coronales de telencéfalo ventral de embriones de rata día E12,5 (A-C) y E13,5 (D-F). A-C: en el día E12,5 si bien la mayoría de las cC-R expresan el rCB1, se observaron algunas células CB1⁺/reelina⁻ (punta de flecha) y CB1⁻/reelina⁺ (doble punta de flecha). Esporádicamente se observaron células CB1⁺/reelina⁺ en la ZV (flecha). D-E: en el día E13,5 arribaron a la PP más células CB1⁺/reelina⁺ y células CB1⁺/reelina⁻ (punta de flechas) con respecto al día E12,5. También se observaron algunas células CB1⁻/reelina⁺ (doble punta de flecha). Se observó una oleada discreta de neuronas CB1⁺/reelina⁺ (flecha) y CB1⁺/reelina⁻ (punta de flecha) en migración radial hacia la PP. Abreviaturas: PP, preplaca; ZV, zona ventricular. Barra de escala: 40 μm en A-F.

Durante los estadios de desarrollo de la PC, las cC-R permanecen localizadas en la ZM y una elevada proporción de éstas expresaron el rCB1 (**Figura 11, A-H**). Esta expresión sostenida del rCB1 en estas células podría sugerir un papel específico del rCB1 relacionado con la regulación de la migración radial.

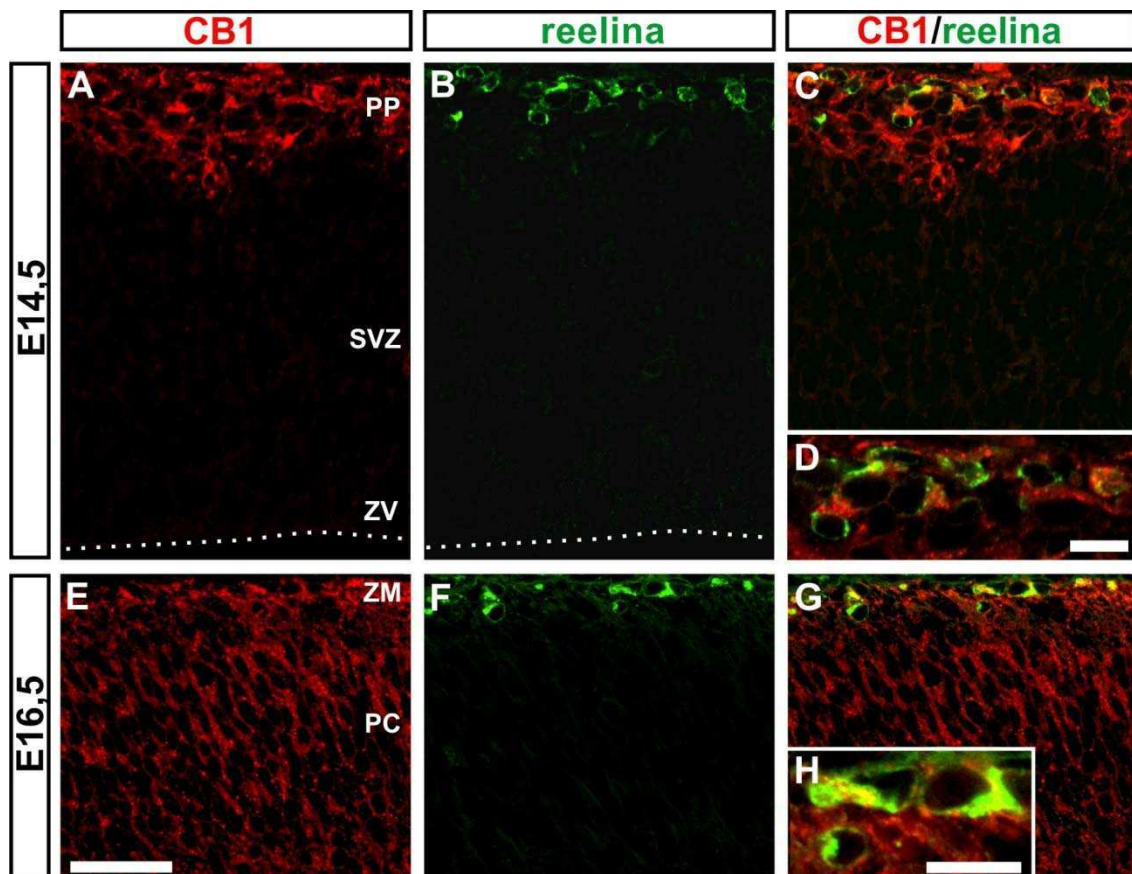


Figura 11. Expresión del rCB1 en células reelina⁺ en estadios intermedios de la corticogénesis. Imágenes por microscopía confocal. Doble inmunofluorescencia para el rCB1 (rojo) y reelina (verde) en secciones coronales de telencéfalo ventral de embriones de rata día E14,5 (A-D) y E16,5 (E-H). Prácticamente todas las células reelina⁺ expresaron el rCB1. D: inserto de C. H: inserto de G. Abreviaturas: ZM, zona margina; PC, placa cortical; SP, subplaca; ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular. Barra de escala: 40 μ m en A-C, E-G; 10 μ m en D, H.

4.1.2.2. Expresión del rCB1 en neuronas calretinina positivas

Además de las cC-R, otra población de neuronas postmitóticas que arriban a la PP hacia el día E12,5, son las neuronas de proyección pioneras que luego formarán parte de la SP. En la rata, la proteína de unión a calcio CALR se expresa tanto en cC-R como en neuronas de proyección pioneras durante el estadio de PP y, más tarde, durante el estadio de PC, en las neuronas de la SP y en sus axones en desarrollo. Durante el estadio de PP, CALR no se expresa en interneuronas GABAérgicas [Jiménez y col., 2003].

Durante el periodo de PP, tanto en el día E13,5 como en el día E14,5, se observaron células CB1⁺/CALR⁺ con orientación horizontal, las cuales podrían corresponder a cC-R, mientras que el resto de las células corresponderían a neuronas de proyección pioneras que acabaron de arribar por migración radial. Casi la totalidad de células CALR⁺ expresaron el rCB1 en ambas edades (**Figura 12, A-G**).

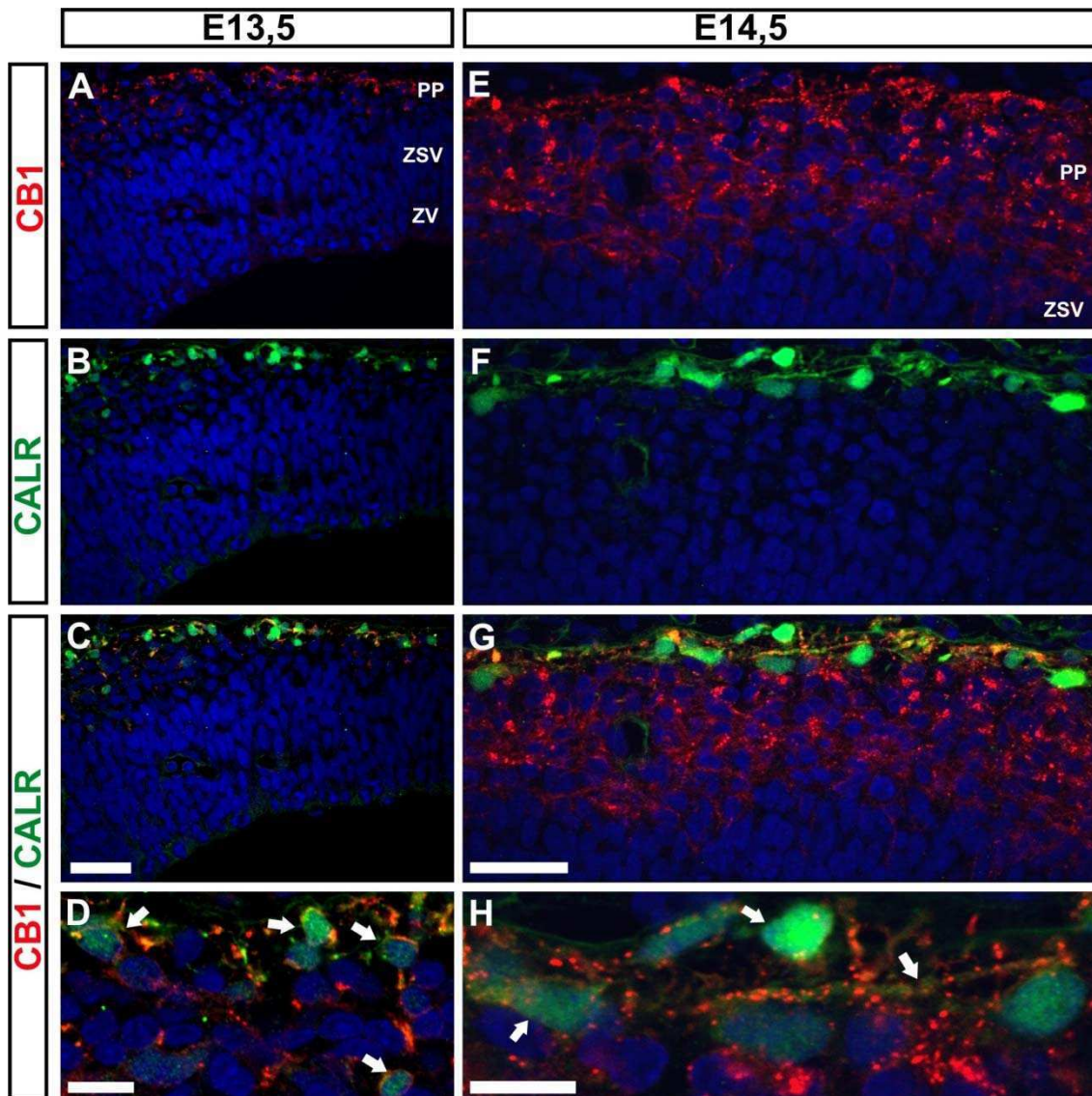


Figura 12. Expresión del rCB1 en neuronas calretinina⁺ en estadios tempranos de la corticogénesis. Imágenes por microscopía confocal de doble-inmunofluorescencia para el rCB1 (rojo) y CALR (verde) y contrateñido con hoechst (azul) en secciones coronales de palio dorsal de embriones de rata día E13,5 (A-D) y E14,5 (E-H). D, H: las flechas indican células CB1⁺/CALR⁺. Abreviaturas: PP, preplaca; ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular. Barras de escala: 40 μ m en A-C, E-G; 10 μ m en D y H.

4.1.2.3. Expresión del rCB1 en neuronas calbindina positivas

Calbindina (CALB) es una proteína de unión a calcio que se expresa en interneuronas en migración durante el desarrollo de la corteza del ratón, pero su utilización como marcador de estas células durante el desarrollo de la rata es controvertida. Por tal motivo, primero se evaluó su colocalización con células GABA⁺ en el día E14,5. Se observó una abundante proporción de células GABA⁺/CALB⁻ y de

células GABA⁻/CALB⁺ y una menor proporción de células GABA⁺/CALB⁺ (**Figura 13, A-C**). Dichas células GABA⁺/CALB⁺ presentaron una orientación horizontal, lo cual denotó que eran interneuronas en proceso de migración tangencial. Si bien la proteína de unión a calcio CALB no es un marcador específico de interneuronas en el embrión de la rata, nos pareció relevante evaluar la coexpresión del rCB1 en ésta las células CALB⁺ como una aproximación a la expresión del receptor en interneuronas GABAérgicas durante estadios tempranos de la corticogénesis dado que aún no se demostró la expresión de este receptor en estadios temprano de migración tangencial.

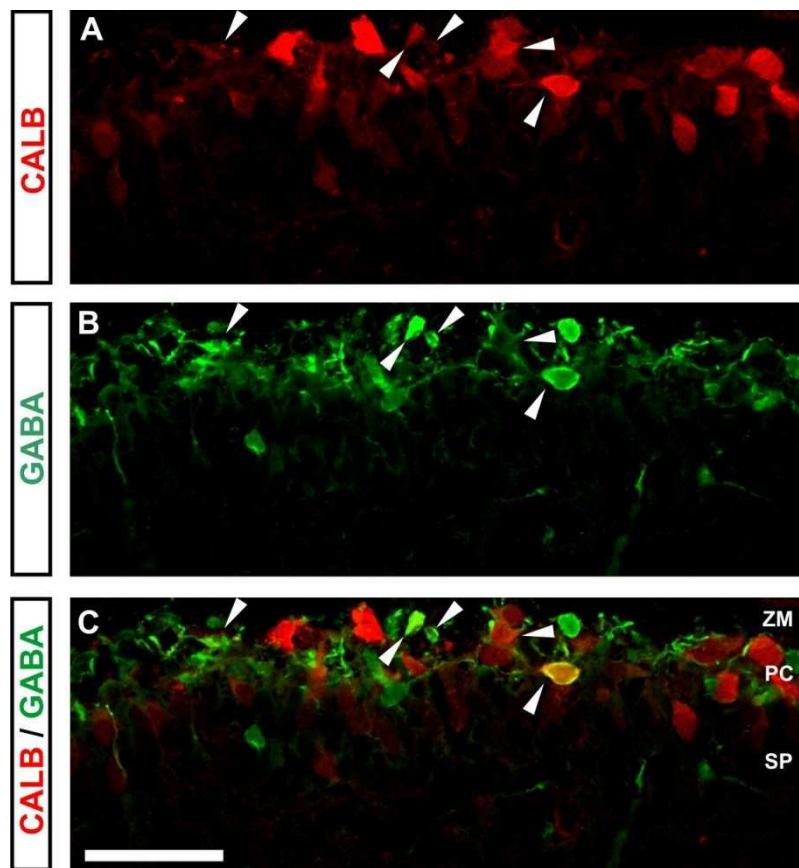


Figura 13. Co-localización de células calbindina⁺ y GABA⁺. A-C: Imágenes por microscopía confocal de doble-inmunofluorescencia para el CALB (rojo) y GABA (verde) en secciones coronales de telencéfalo ventral de embriones de rata día E14,5. Las puntas de lecha marcan células CALB⁺/GABA⁺. Abreviaturas: PC, placa cortical; SP, subplaca; ZM, zona marginal. Barras de escala: 40 μ m en A-C.

A partir del día E14,5, día en el que arriban a la PP las primeras interneuronas desde el telencéfalo ventral por la corriente migratoria superficial, se observaron neuronas CALB⁺ en el palio dorsal. La ausencia de células CALB⁺ en la zona subpial se debe a que las cC-R no expresan esta proteína. En la PP se observaron células CB1⁺/CALB⁺ con orientación tangencial, las cuales podrían corresponder a interneuronas en migración (**Figura 14, A-H**).

Al día E15,5, cuando la PC presenta un mayor número de neuronas de proyección que ya migraron hacia ésta, se observó una mayor proporción de neuronas CALB⁺ con orientación radial, las cuales expresan, en su mayoría, el receptor CB1. Por otro lado, en la ZI, donde las neuronas de proyección extienden sus axones en desarrollo, se observó la expresión del rCB1 en axones en desarrollo CALB⁺ (**Figura 14, I-N**).

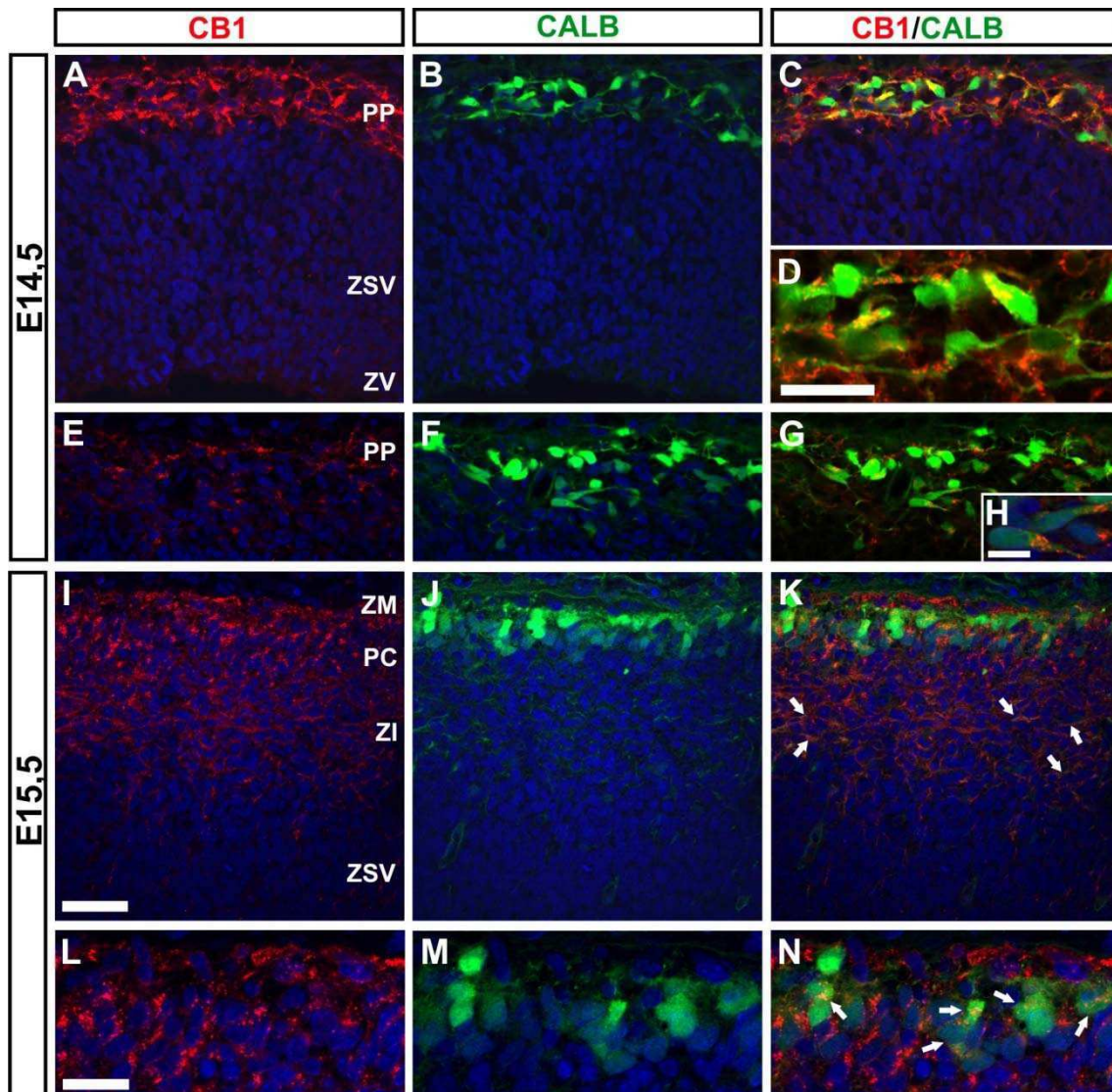


Figura 14. Expresión del rCB1 en neuronas CALB⁺ en la corteza en desarrollo. Imágenes de microscopía confocal de doble-IF para el rCB1 (rojo) y CALB (verde) y contrateñido con hoechst (azul) en secciones coronales de telencéfalo ventral de embriones de rata día E14,5 (A-H) y E15,5 (I-N). D: inserto de G. H: inserto de G. K: las flechas indican axones en desarrollo CALB⁺/CB1⁺. Abreviaturas: ZM, zona marginal; PC, placa cortical; PP, preplaca; SP, subplaca; ZI, zona intermedia; ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular. Barras de escala: 40 μ m en A-C, E-G, I-K; 10 μ m en D, H; 20 μ m en L-N.

4.2. Estudio del efecto de la exposición prenatal a WIN sobre el desarrollo de la corteza cerebral de la rata

4.2.1. Efectos de la exposición prenatal a WIN sobre parámetros gestacionales

Con el objeto de evaluar la existencia de posibles efectos tóxicos y/o de malnutrición causados por el tratamiento crónico prenatal con WIN, y que pudieran sesgar los resultados de la experimentación, se registraron los principales parámetros gestacionales durante la preñez de las ratas. La ganancia de peso de las madres durante la gestación hasta la fecha en que se realizó la cesárea fue equivalente para los dos grupos en todas las edades gestacionales estudiadas ($P > 0,05$) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Ganancia de peso de la hembra durante la gestación, / .

	E0,5-E12,5	E0,5-E14,5	E0,5-E16,5	E0,5-E20,5
CONTROL	15,73 ~ 0,13	21,26 ~ 0,45	20,66 ~ 3,97	43,32 ~ 4,36
WIN	13,54 ~ 2,42	19,67 ~ 0,42	24,84 ~ 2,86	46,95 ~ 4,49

Los datos representan los valores de media ~ EEM.

El tamaño de la camada a la fecha de la cesárea fue estadísticamente equivalente para ambos grupos, control y WIN, y en todas las edades gestacionales evaluadas ($P > 0,05$) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Número de embriones por camada.

	E12,5	E14,5	E16,5	E20,5
CONTROL	10,0 ~ 2,0	11,8 ~ 0,3	10,8 ~ 0,9	13,0 ~ 1,2
WIN	11,5 ~ 0,9	13,0 ~ 1,1	11,4 ~ 2,2	10,8 ~ 1,9

Los datos representan los valores de media ~ EEM.

La mortalidad prenatal evaluada como el número de fetos reabsorbidos al momento de la cesárea no resultó significativamente influenciada por la exposición al WIN. Cualitativamente, no se observó ningún caso de malformación anatómica evidente.

A partir de los datos descriptos, es posible concluir que la administración prenatal a WIN, según la dosis y el protocolo de administración realizado, no producen alteraciones en los parámetros gestacionales evaluados que pudieran interferir con el desarrollo de los embriones.

4.2.2. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre las neuronas postmitóticas en migración durante el desarrollo de la corteza cerebral

En un estudio previo, Marín y col. describieron que durante el día E16,5, existe una activa migración, tanto radial como tangencial. En este estadio es posible observar las interneuronas atravesando el palio dorsal mediante una corriente migratoria profunda en la ZSV y la ZI y mediante una corriente superficial en la ZM y la SP [Marín y col., 2001]. Puesto que en este trabajo se observó la expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración a lo largo del periodo de migración neuronal, y que trabajos de otros autores demostraron que el sistema eCB está implicado en la regulación de procesos de migración radial y tangencial [Berghuis y col., 2005; Mulder y col., 2008], se evaluó el efecto de la exposición prenatal a WIN sobre estas neuronas en migración. En el día E16,5, periodo en el cual hay una abundante densidad de células DCX⁺ en las ZM, PC, SP y la ZI, sólo se pudieron distinguir de forma individual las neuronas postmitóticas de orientación tangencial correspondientes a la corriente tangencial profunda y a las neuronas postmitóticas de orientación radial en la ZSV/ZV (**Figura 15, A**). Así mismo, debido a la elevada densidad de células DCX⁺ se cuantificó el cociente entre el espesor de la corteza cerebral inmunomarcada con DCX, que incluye la ZM, PC, SP y ZI, sobre el espesor total de la corteza, a fin de obtener una estimación de la extensión de las neuronas postmitóticas a lo ancho de la corteza. El porcentaje relativo del espesor de las capas inmunomarcadas con DCX resultó disminuído en los embriones expuestos a WIN con respecto a los embriones controles (C: 78,02 ~ 1,06 / vs. W: 66,45 ~ 0,31 / ; P=0,0024) (**Figura 15, E**).

Las neuronas postmitóticas en migración presentan una neurita principal de avance que se extiende desde el soma, y el ángulo que forma esta neurita determina la posible dirección de la célula en migración. Para diferenciar las células de orientación tangencial de aquellas de orientación radial, se midió el ángulo que la neurita principal forma con una línea virtual perpendicular a la superficie del ventrículo, y se categorizó

a dichas células según el siguiente criterio tomado del trabajo de Martini y col. [Martini y col., 2009]: las células cuya neurita principal determinó un ángulo menor a 25° con respecto a la línea virtual fueron designadas como neuronas en proceso de migración radial; y las células cuya neurita principal determinó un ángulo mayor a 25° fueron determinadas designadas como neuronas en migración tangencial (**Figura 15, B**).

Se cuantificó el número de células DCX⁺ con orientación tangencial y radial en la región del palio dorsal próxima al límite subpalio/palio debido a que sólo en esta región se observó la expresión del rCB1 en las células DCX⁺. Se observó un incremento significativo en el número de neuronas postmitóticas tanto de orientación tangencial (C: 8,63 ~ 1,18 vs. W: 20,55 ~ 2,44; P=0,0292) como radial (C: 32,02 ~ 2,99 vs. W: 44,34 ~ 6,83; P=0,0428) en la ZSV/ZV de los cerebros de embriones expuestos prenatalmente a WIN. El número total de células en la ZSV/ZV de los cerebros de embriones expuestos a WIN también presentó un incremento significativo (C: 40,66 ~ 2,27 vs. W: 64,89 ~ 7,41; P=0,0148) (**Figura 15, C, D, F-H**).

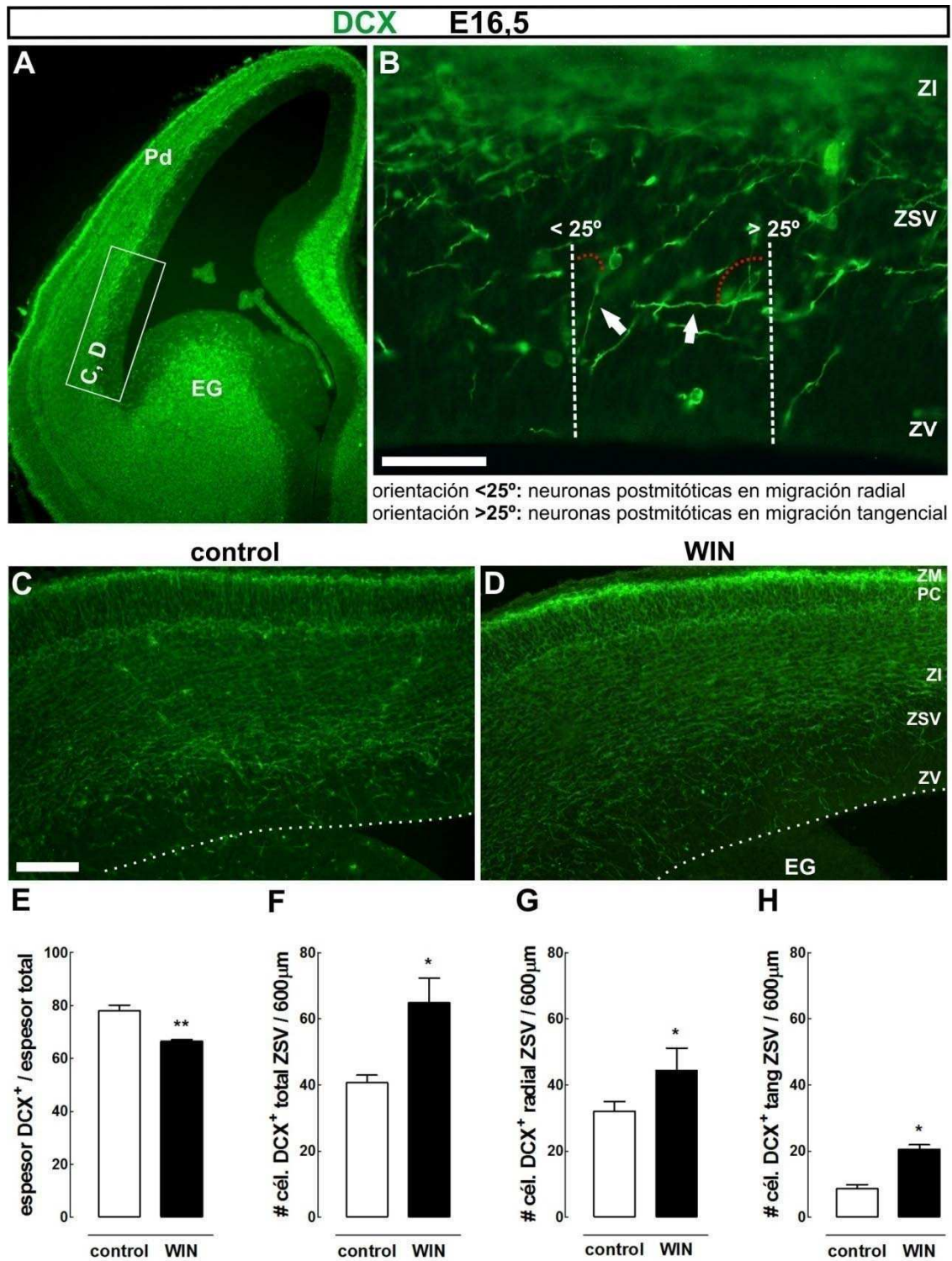


Figura 15. La exposición prenatal a WIN aumentó el número de neuronas postmitóticas en migración de orientación radial y tangencial en la ZSV/ZV del palio dorsal en desarrollo. **A:** imagen por microscopía de epifluorescencia. Inmunofluorescencia para DCX en una sección coronal de telencéfalo de rata de día E16,5. El recuadro indica la región seleccionada para la cuantificación de las células DCX⁺: ZSV/ZV del palio dorsal próximo al límite subpalio/palio. **B:** imagen por microscopía de epifluorescencia. Inmunofluorescencia para DCX en una sección coronal de palio dorsal de rata de día E16,5. Criterio de categorización de neuronas postmitóticas en migración tangencial y radial. **C, D:** imágenes por

microscopía de epifluorescencia, inmunofluorescencia para DCX en secciones coronales de palio dorsal de embriones control (**C**) y expuesto a WIN (**D**) de día E16,5. **E**: cuantificación del cociente del espesor de la ZM, PC, SP y ZI sobre el espesor total de la corteza cerebral. **F-H**: cuantificación del número de células DCX⁺ de orientación tangencial (**F**), radial (**G**) y total (**H**) en la ZSV/ZV de palio dorsal de embriones de rata control y expuestos a WIN. Las barras de error representan el EEM. ($n=5$), * $P<0,05$, ** $P<0,005$; test de Student. Abreviaturas: EG eminencia ganglionar; Pd, palio dorsal; PC, placa cortical; ZM, zona marginal; ZSV, zona subventricular; ZI, zona intermedia; ZV, zona ventricular. Barra de escala: 50 μm en B, 100 μm en C y D.

A partir de estos resultados el incremento en el número de neuronas postmitóticas DCX⁺ radiales y tangenciales en la ZSV/ZV observado en los embriones expuestos a WIN podría ser a expensas de la disminución del espesor relativo de la ZM/PC/SP/ZI inmunomarcada. Este efecto podría, entonces deberse a un defecto en: **i**) la proliferación celular, **ii**) la muerte celular programada, **iii**) la diferenciación de precursores neuronales a neuronas, **iv**), la migración neuronal radial y/o tangencial debido a un defecto en el posicionamiento de las cC-R o a un defecto en la glía radial.

4.2.3.

Trabajos previos han demostrado que una subpoblación de interneuronas hipocampales CB1⁺/CCK⁺ y CB1⁺/reelina⁺/CALR⁺ se origina en la EGC y en el límite subpalio/palio durante estadios tempranos de la corticogénesis y que alcanzan el hipocampo atravesando la corteza en desarrollo principalmente por la ZM [Morozov y col., 2009]. Por otro lado, como se mostró en la sección anterior, sólo hallamos interneuronas que expresaron el rCB1 en la ZM y SP del telencéfalo dorsal durante estadios tempranos de la corticogénesis (E13,5 y E14,5). Con el objeto de evaluar el efecto de la exposición prenatal a WIN sobre las interneuronas GABAérgicas en migración, tanto en la corriente migratoria superficiales (ZM/SP) como en la profunda (ZI/ZSV), se realizó una inmunofluorescencia para GABA, un marcador específico de interneuronas GABAérgicas. Se cuantificó el número de células GABA⁺ en la ZM, SP, PC y ZI/ZSV en una región medial del palio dorsal. Los embriones expuestos a WIN mostraron un incremento estadísticamente significativo en el número de células GABA⁺ en la ZM (C: 141,90 \pm 17,89 vs. W: 213,20 \pm 10,46; $P=0,0379$). No se

encontraron diferencias significativas en ninguna de las demás capas: PC (C: 33,74 ~ 9,15 vs. W: 34,27 ~ 11,33; $P=0,8056$), SP (C: 79,68 ~ 17,34 vs. W: 70,80 ~ 12,82; $P=0,6377$) y ZI/ZSV (C: 472,00 ~ 20,88 vs. W: 428,50 ~ 8,77; $P=0,0794$), ni en el número total de células GABA⁺ (C: 727,4 ~ 15,64 vs. W: 746,80 ~ 28,85; $P=0,4574$) (**Figura 16**).

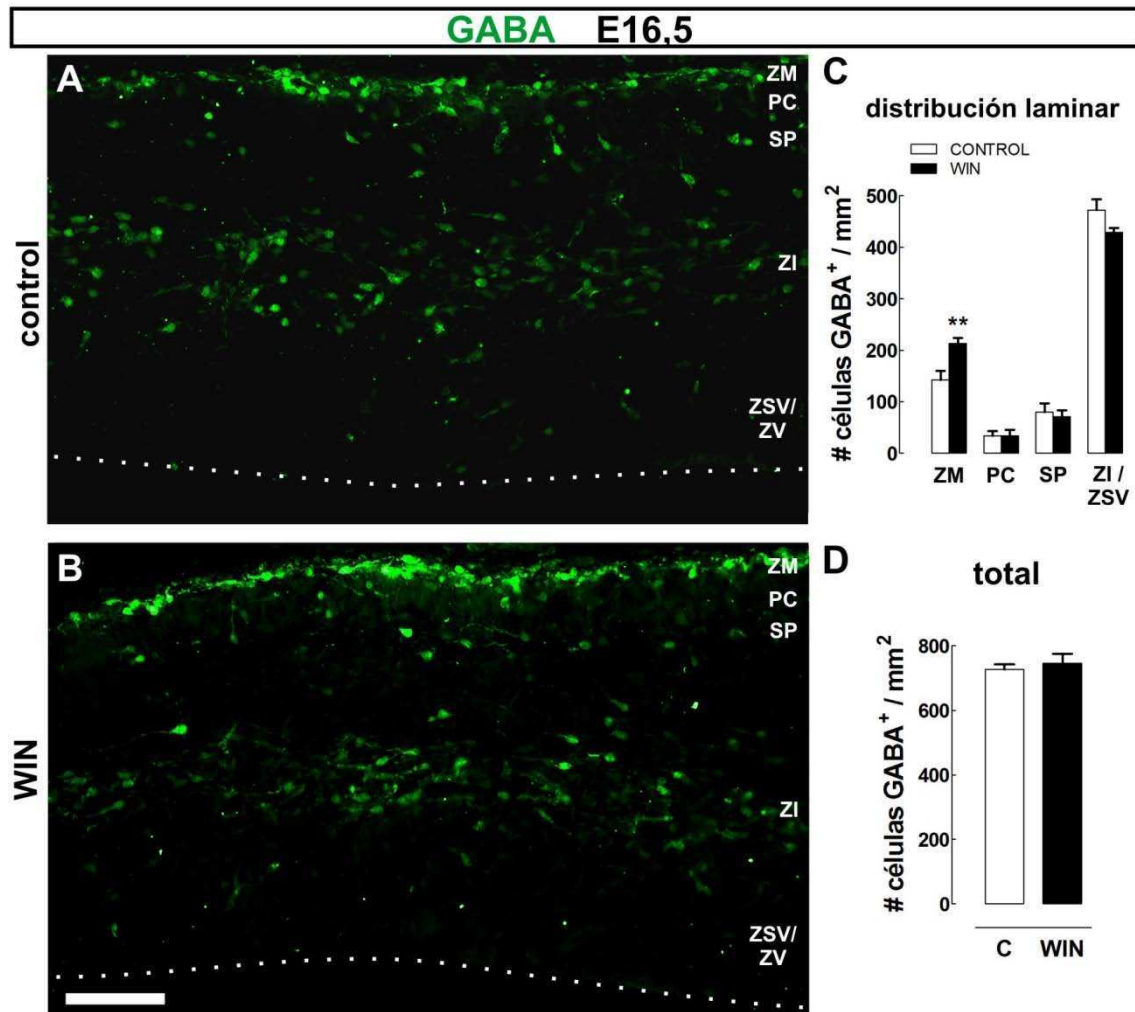


Figura 16. La exposición prenatal a WIN aumentó el número de interneuronas GABAérgicas en la ZM del palio dorsal en desarrollo. **A-B:** imágenes por microscopía de epifluorescencia. Inmunofluorescencia de secciones coronales de palio dorsal de embriones control (**A**) y expuesto a WIN (**B**) de día E16,5 inmunomarcados con GABA. **C:** cuantificación del número de células GABA⁺ en la ZM, PC, SP, ZI/ZSV. **D:** cuantificación del número total de células GABA⁺ en todas las láminas. Las barras de error representan el EEM, ($n=5$), $**P=0,0379$, test de Student. Abreviaturas: PC, placa cortical; SP, subplaca; ZM, zona marginal; ZI, zona intermedia; ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular. Barra de escala: 100 μ m en A y B.

4.2.4. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre la proliferación y la muerte celular programada durante el desarrollo de la corteza cerebral

El incremento en el número de neuronas postmitóticas en migración en la ZSV/ZV a expensas de una disminución de la inmunomarcación para DCX en el resto de las zonas del palio dorsal observado en embriones expuestos a WIN podría deberse a una alteración en la proliferación y/o en la muerte celular programada. Se realizó una inmunofluorescencia para Ki67, un marcador intrínseco de células en proliferación, y se cuantificó el número de células Ki67⁺ en la ZV de embriones de día E12,5 y en la ZV, y ZSV de los embriones de día E14,5 y E16,5. Las células Ki67⁺ en la ZV corresponden a cGR en proliferación, mientras que las células ki67⁺ en la ZSV corresponden a cPI en proliferación. Si bien se observó una tendencia, no hubo un aumento estadísticamente significativo en el número de células en proliferación en los embriones tratados en ninguna de las edades estudiadas ($P > 0,05$) (**Figura 17**).

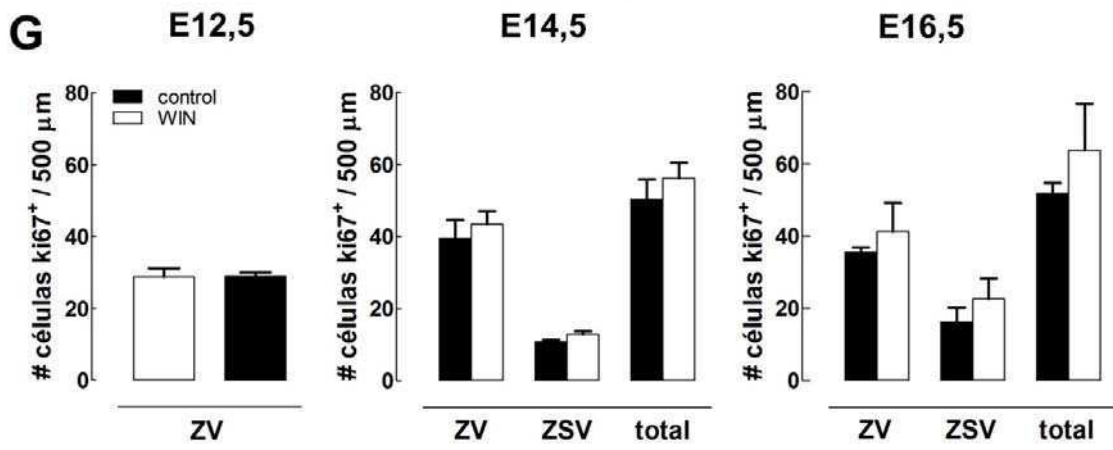
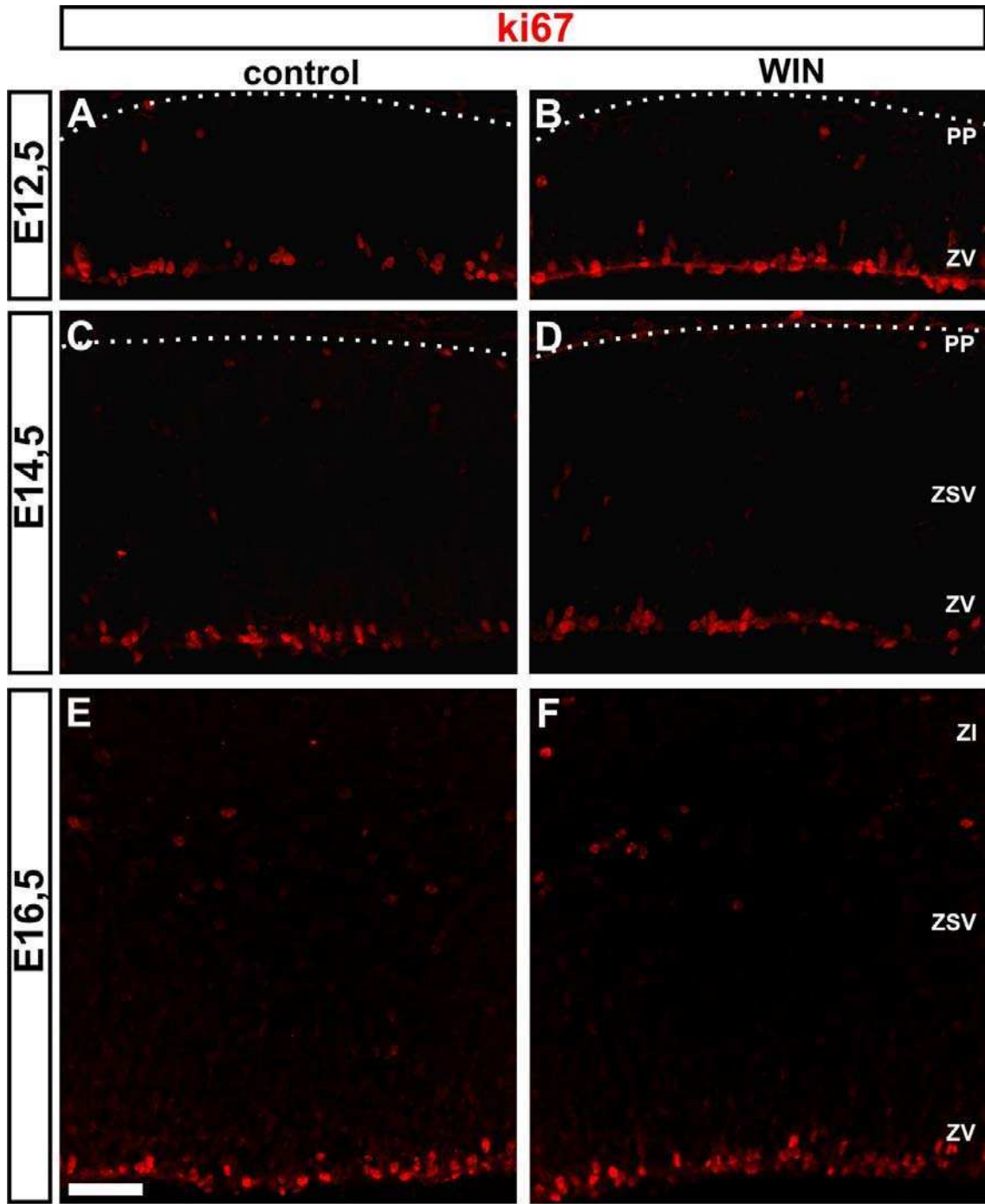


Figura 17. La exposición prenatal a WIN no afectó el número de células en proliferación en la ZV y ZSV del palio dorsal. A-D: imágenes por microscopía de epifluorescencia. Inmunofluorescencia para Ki67 de secciones coronales de palio dorsal de embriones de día E12.5 (**A, B**), E14.5 (**C, D**) y E16,5 (**E, F**), controles (**A, C, E**) y expuestos a WIN (**B, D, F**). **G:** Cuantificación del número medio de células ki67⁺. Las barras de error representa el EEM; (n=4/5); test de Student. Abreviaturas: PP, preplaca; ZI, zona intermedia; ZSV, zona subventricular; VZ, zona ventricular. Barra de escala: 50 μm en A-F.

Existen evidencias de que la exposición a WIN está asociada a una regulación negativa de moléculas pro-apotóticas y positiva de moléculas anti-apoptóticas en la corteza cerebral de roedores adultos [Alvaro-Bartolome y col., 2010]. Por lo tanto, a fin de excluir que la exposición prenatal a WIN induzca una alteración en la muerte celular propia del desarrollo que explique las alteraciones observadas en el número de neuronas postmitóticas en migración en la ZSV/ZV, se realizó un ensayo de TUNEL. La reacción de TUNEL se realizó sobre secciones coronales de telencéfalo de embriones de día E16,5 y E20,5 a fin de evidenciar la presencia de fragmentos de ADN, los cuales son indicadores de muerte celular programada. No se encontraron diferencias significativas en el número de cuerpos apoptóticos TUNEL⁺ en el palio dorsal (C: 13,79 ~ 1,36 vs. W: 14,50 ~ 2,44; P=0,8227) ni en la EG (C: 1,83 ~ 0,29 vs. W: 1,66 ~ 0,19; P=0,7621) de embriones control y expuestos a WIN de día E16,5 (**Figura 18**). Al día E20,5 se observaron escasas células TUNEL⁺ en el palio dorsal de ambos grupos experimentales (datos no mostrados). Por lo tanto, no se encontraron evidencias de que la exposición prenatal a WIN tenga un efecto sobre la muerte celular programada.

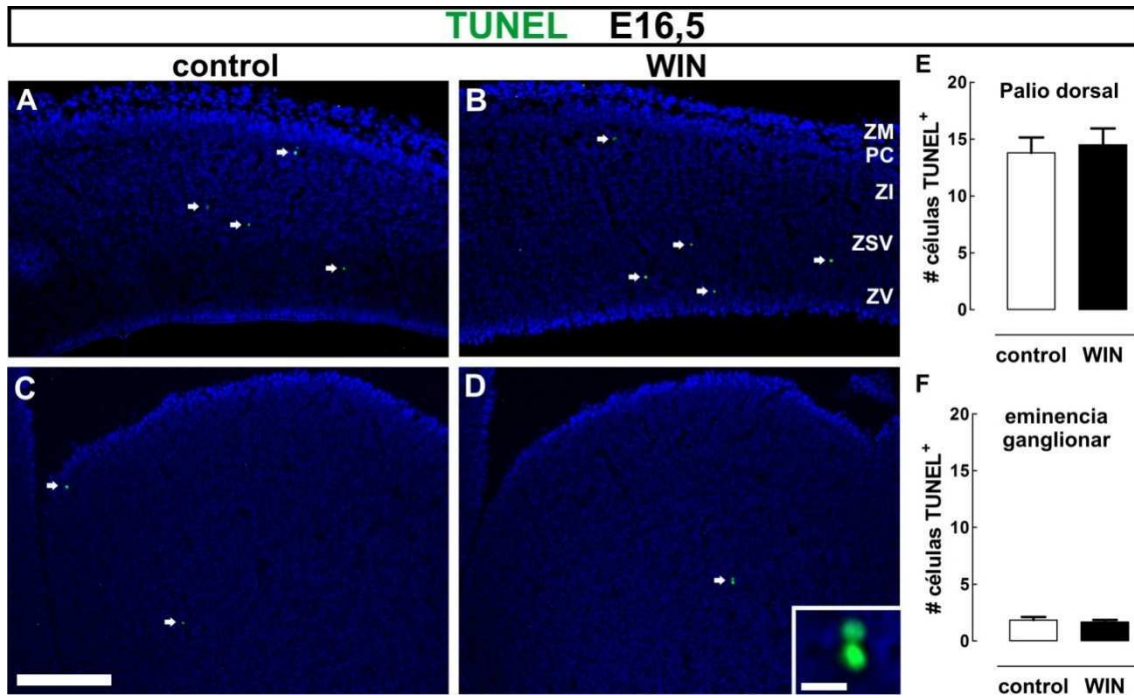


Figura 18. La exposición prenatal a WIN no afectó el número de células apoptóticas en el palio dorsal ni en la eminencia ganglionar. A-D: Imágenes por microscopía de epifluorescencia. Tinción de TUNEL (verde) contra-teñidos con hoescht (azul) de secciones coronales de palio dorsal (A, B) y eminencia ganglionar (C, D) de embriones controles (A, C) y expuestos a WIN (B, D) de día E16,5. E, F: cuantificación del número medio de cuerpos apoptóticos TUNEL⁺ (indicados con flechas) en el palio dorsal (E) y EG (F). Las barras de error representa el EEM, ($n=3$), test de Student. Abreviaturas: PC, placa cortical; ZM, zona marginal; ZSV, zona subventricular; ZI, zona intermedia; ZV, zona ventricular. Barra de escala: 200 μm en A-D, 10 μm en recuadro de D.

4.2.5. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre la diferenciación neuronal del linaje glutamatérgico

Los resultados hasta aquí descritos sugieren que ni la proliferación celular ni la muerte celular programada se ven afectados por la exposición prenatal a WIN. Por consiguiente, serían otros los mecanismos implicados en el incremento de las neuronas postmitóticas en migración en la ZSV/ZV observado en los embriones expuestos a WIN. En los últimos años, varios estudios sugirieron un papel esencial del rCB1 en la regulación de la diferenciación de progenitor neuronal a neurona postmitótica [Aguado y col., 2006; Rueda y col., 2002; Sideris y col., 2012; Soltys y col., 2010]. Dados estos antecedentes, se decidió evaluar si la exposición prenatal a WIN afectó la diferenciación de progenitores intermedios a neuronas postmitóticas

glutamatérgicas. La diferenciación celular del linaje glutamatérgico desde célula de glía radial a progenitor intermedio y de éste a neurona postmitótica glutamatérgica se caracteriza por la expresión de forma secuencial de los factores de transcripción *Pax6*, *Tbr2* y *Tbr1*, respectivamente [Englund y col., 2005a].

Tbr2 es un factor de transcripción de la familia T-box que se expresa en progenitores intermedios del linaje glutamatérgico y es regulado negativamente una vez que sale de su ciclo celular y se diferencia a neurona postmitótica de proyección [Englund y col., 2005a]. Asimismo, los progenitores intermedios contribuyen con la generación de la mayoría de las neuronas de proyección corticales, tanto de la PP, como de las capas corticales inferiores y superiores [Kowalczyk y col., 2009]. Se evaluó el número de cPI *Tbr2*⁺ en secciones coronales de palio dorsal de embriones controles y expuestos a WIN de día E12,5, E14,5, E16,5 y E20,5. El análisis de los resultados demostró que la exposición prenatal a WIN incrementó el número de progenitores intermedios en los embriones de día E12,5 (C: 49,89 ~ 2,58 vs. W: 64,58 ~ 5,78; P=0,0444), E14,5 (C: 416,2 ~ 24,61 vs. W: 471,30 ~ 15,77; P=0,0259), E16,5 (C: 743,30 ~ 22,65 vs. W: 995,00 ~ 37,33; P=0,049) y E20,5 (C: 657,90 ~ 28,70 vs. W: 1117,00 ~ 65,37; P=0,0033) (**Figura 19**).

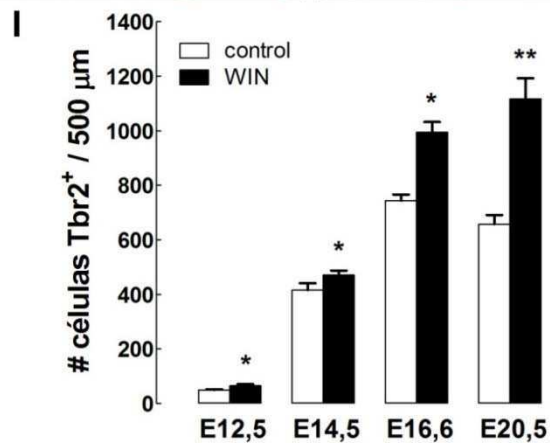
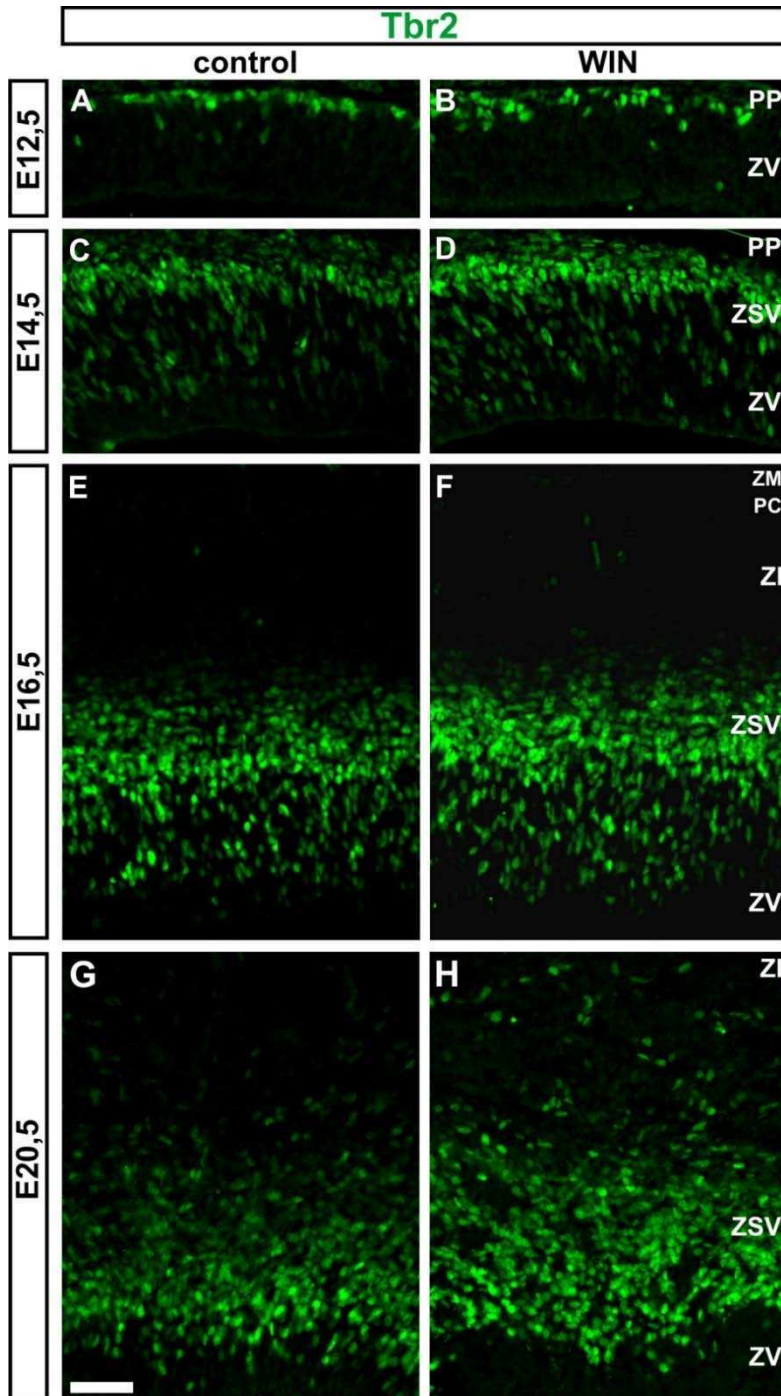


Figura 19. La exposición prenatal a WIN aumento el número de progenitores intermedios en el palio dorsal en desarrollo. A-H: imágenes por microscopía de epifluorescencia. Inmunofluorescencia para Tbr2 de secciones coronales de palio dorsal de embriones de día E12,5 (**A, B**), E14,5 (**C, D**), E16,5 (**E, F**) y E20,5 (**G, H**) en controles (**A, C, E, G**) y expuestos a WIN (**B, D, F, H**). **I:** cuantificación del número medio de células Tbr2⁺. El tratamiento prenatal con WIN incrementó significativamente el número de células Tbr2⁺ en todas las edades analizadas. Las barras de error representa el EEM, ($n=4$), * $P<0,05$, ** $P<0,005$, test de Student. Abreviaturas: ZM, zona margina; PC, placa cortical; PP, preplaca; ZI, zona intermedia; ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular. Barra de escala: 100 μm en A-H.

Por su parte, *Tbr1* es un factor de transcripción de la familia T-box que se expresa en neuronas postmitóticas glutamatérgicas al comienzo de su diferenciación, es decir, a la salida de su ciclo celular. Durante el desarrollo prenatal, *Tbr1* se expresa en las neuronas primordiales que forman la PP y, luego de la división de la PP, se expresa en las neuronas de la SP y en las neuronas de proyección corticotalámicas de la capa 6. Sin embargo, en edades postnatales, *Tbr1* se expresa en toda la corteza cerebral [Hevner y col., 2003; McKenna y col., 2011]. A continuación se evaluó el número de neuronas recién diferenciadas Tbr1⁺ en secciones coronales de palio dorsal en la misma región donde se realizó la cuantificación de células Tbr2⁺. De estos resultados se observó que el tratamiento prenatal con WIN disminuyó el número de células Tbr1⁺ en embriones de día E12,5 (C: 40,75 \sim 2,75 vs. W: 24,83 \sim 2,17; $P=0,0004$) y E14,5 (C: 241,60 \sim 22,58 vs. W: 150,80 \sim 7,48; $P=0,0372$), mientras que en el día E16,5 (C: 768,30 \sim 100,20 vs. W: 661,70 \sim 42,06; $P=0,4889$) E20,5 el número de células Tbr1⁺ no presentó diferencias significativas entre los embriones controles y expuestos a WIN (C: 1052 \sim 12,02 vs. W: 1060 \sim 45,09; $P=0,884$) (**Figura 20**).

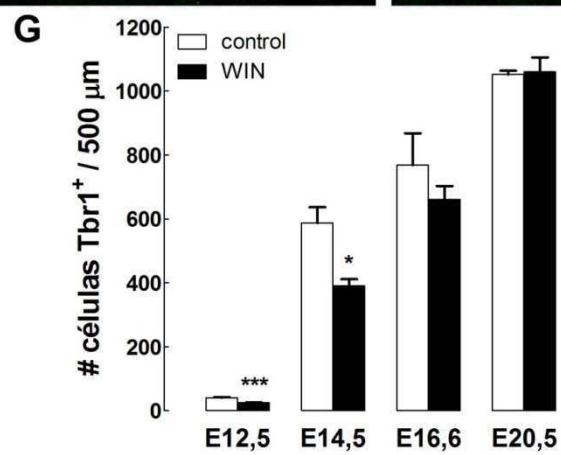
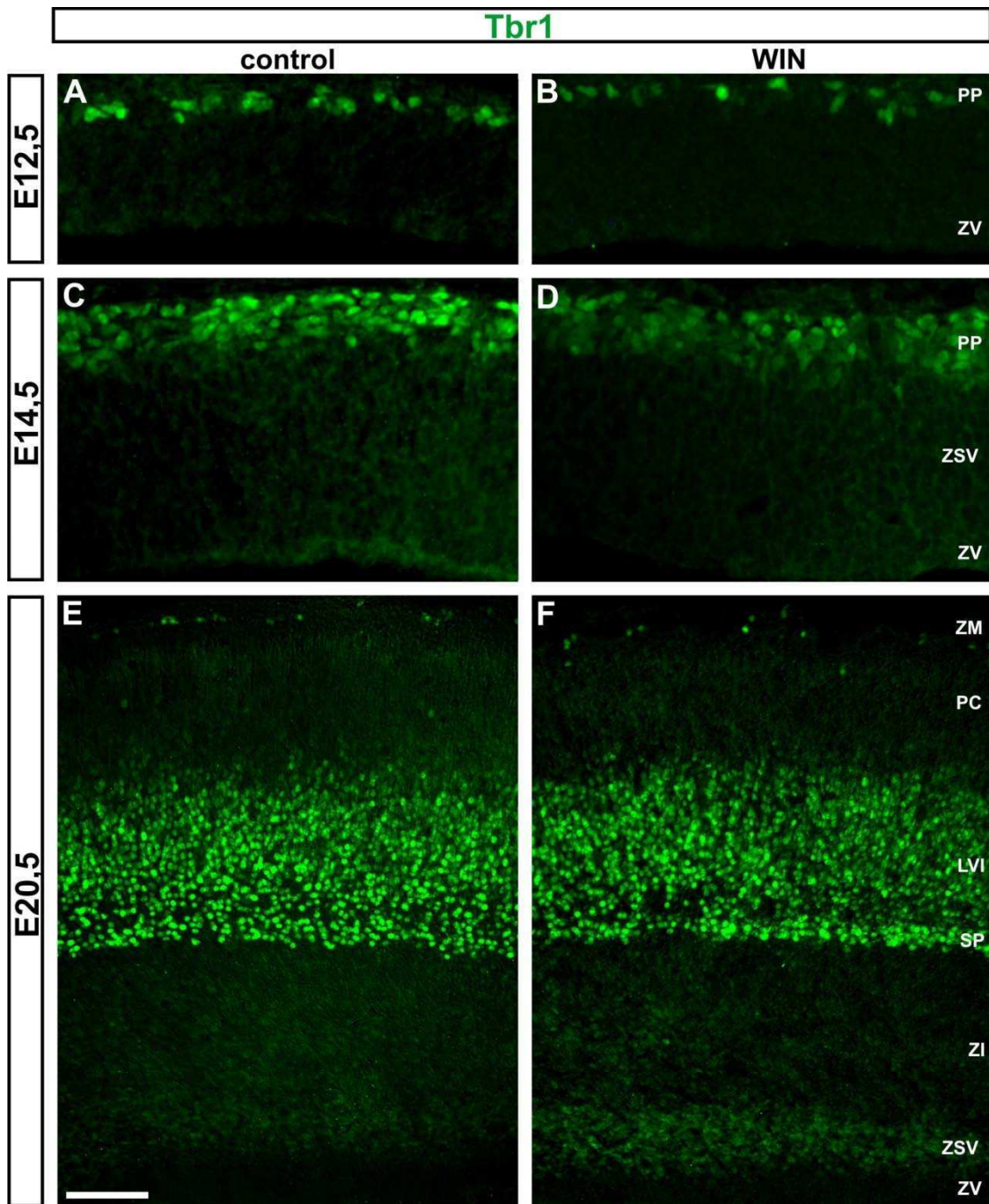


Figura 20. La exposición prenatal a WIN disminuyó el número de neuronas postmitóticas glutamatérgicas Tbr1⁺ en estadios tempranos de la corticogénesis. A-D: imágenes por microscopía de epifluorescencia. Inmunofluorescencia para Tbr1 de secciones de palio dorsal de embriones de día E12,5 (A, B), E14,5 (C, D) y E20,5 (E, F) en controles (A, C, E) y expuestos a WIN (B, D, F). G, H: Se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de células Tbr1⁺ en el palio dorsal de los embriones expuestos prenatalmente a WIN en las edades E12,5 y E14,5. Mientras que en el día E20,5 el número de células Tbr1⁺ se recuperó en los embriones tratados. Las barras de error representa el EEM, (n=5), *P<0,05, ***P<0,0005, test de Student. Abreviaturas: LVI, lámina 6; SP, subplaca; ZI, zona intermedia; ZM, zona margina ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular. Barra de escala: 100 μ m en A-F.

El incremento en el número de progenitores intermedios Tbr2⁺ acompañado de una disminución de neuronas postmitóticas Tbr1⁺ de la capa 6 y SP observado en los embriones expuestos a WIN, podría indicar un retardo en la salida del ciclo celular de los progenitores neuronales y por lo tanto, un retraso en la diferenciación neuronal. Dicho retraso en la diferenciación neuronal podría explicar, el incremento en el número de neuronas postmitóticas en migración en la ZSV/ZV de los embriones expuestos a WIN, así como la disminución en el espesor relativo de las demás zonas.

4.2.6. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre las células de Cajal-Retzius y la glía radial

Las cC-R, mediante la secreción de la proteína extracelular reelina, cumplen un papel importante en la guía de la migración radial durante el desarrollo cortical, además se postula que podría estar implicada en la regulación de la migración tangencial y la subsiguiente migración radial de las interneuronas [Hammond y col., 2006; Morante-Oria y col., 2003]. Dado que en este trabajo se observó la expresión del rCB1 en las cC-R a lo largo de todo el periodo de migración neuronal y que, por lo tanto, este receptor podría estar implicado también en la regulación de la migración radial, se evaluó el efecto de la exposición prenatal a WIN sobre esta población celular.

Se realizó un análisis cuantitativo del número de células reelina⁺ en la ZM del palio dorsal de embriones control y expuestos a WIN de día E14,5 y E16,5. Los embriones expuestos durante la gestación a WIN presentaron un incremento en el

número de células *reelina*⁺ en el día E14,5 (C: 32,37 \pm 1,05 vs. W: 44,20 \pm 2,195; P=0,0223), mientras que en el día E16,5 no se encontraron diferencias significativas entre los embriones controles y tratados (C: 33,96 \pm 1,835 vs. W: 39,83 \pm 5,34; P=0,277) (**Figura 21**).

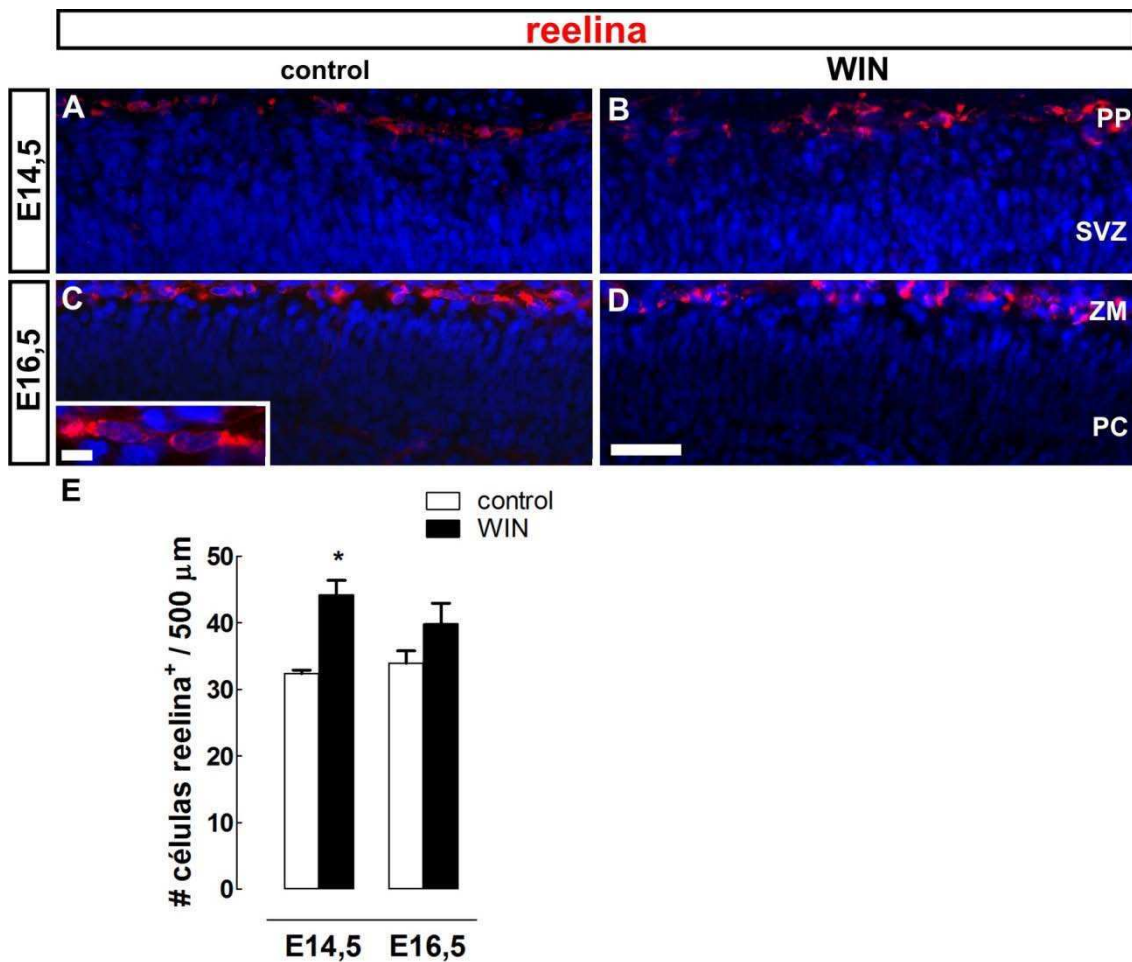


Figura 21. La exposición prenatal a WIN incrementó el número de células *reelina*⁺ en el palio dorsal de embriones de día E14,5. A-D: imágenes por microscopía de epifluorescencia. Inmunofluorescencia para *reelina* (rojo) contrateñido con hoechst (azul) en secciones coronales de palio dorsal de día E14,5 (A, B) y día E16,5 (C, D) de embriones control (A, C) y expuestos a WIN (B, D). E: los gráficos de barra muestran un incremento estadísticamente significativo del número de células *reelina*⁺ en la ZM de embriones expuestos a WIN de día E14,5. Las barras de error representa el EEM, (n=5), *P<0,05, test de student. Abreviaturas: PP, preplaca; PC, placa cortical; ZM, zona marginal; ZSV, zona subventricular. Barra de escala: 50 μ m en A-D; 10 μ m en inserto de C.

Las neuronas originadas en la ZV y ZSV utilizan las fibras de la glía radial como andamio para su migración radial hacia la PC. A fin de determinar si la exposición prenatal a WIN afectó la arquitectura de la glía radial, lo cual contribuiría a que ocurran defectos en la migración, se analizó la morfología y el área de las fibras de las cGR marcadas con nestina. Los embriones expuestos a WIN de día E14,5 y E16,5 no mostraron diferencias significativas en el área de fibras nestina⁺ y presentaron una organización de sus fibras normal (**Figura 22**).

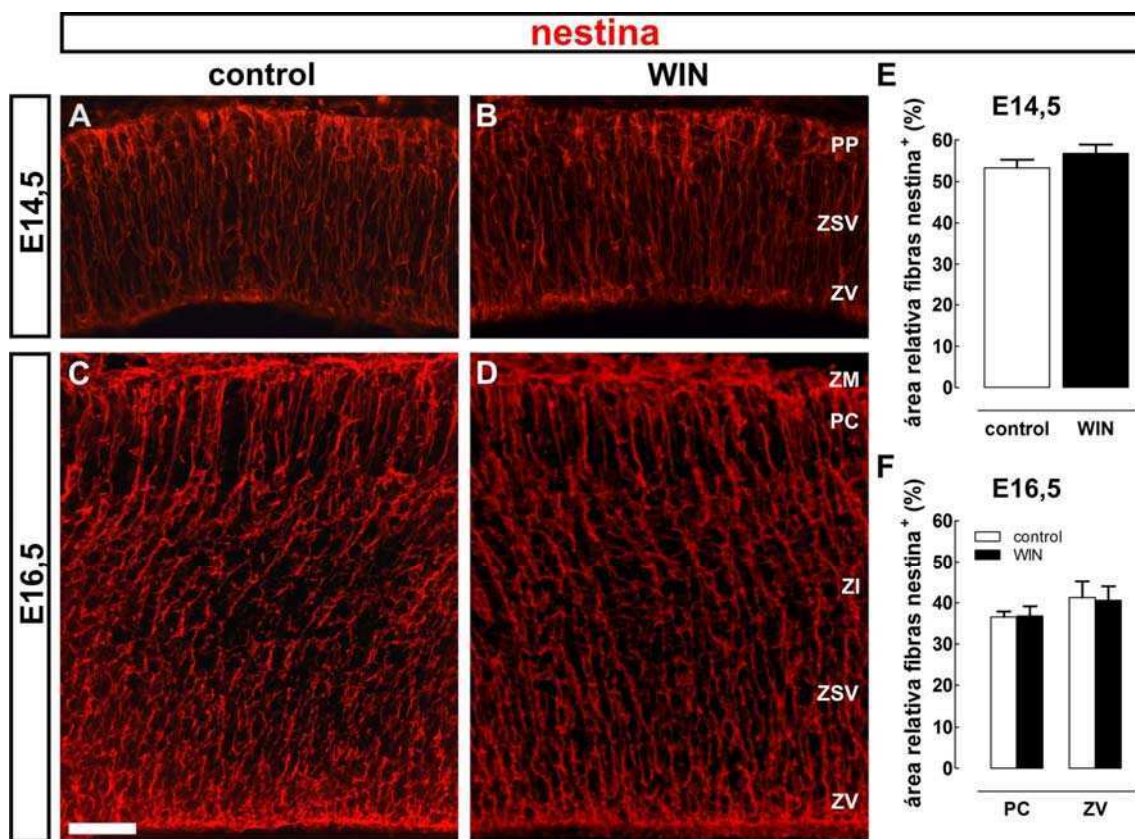


Figura 22. La exposición prenatal a WIN no afectó la morfología ni el área de fibras de las cGR. A-D: imágenes de microscopía de epifluorescencia. Inmunofluorescencia para nestina (rojo) en secciones coronales de pálido dorsal de día E14,5 (A, B) y día E16,5 (C, D) de embriones control (A, C) y expuestos a WIN (B, D). E-F: los gráficos de barra muestran la cuantificación del porcentaje de área relativa de fibras nestina⁺ de embriones de día E14,5 (E) y E16,5 (F). Las barras de error representa el EEM, (n=5), *P<0,05, test de student. Abreviaturas: PP, preplaca; PC, placa cortical; ZM, zona marginal; ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular. Barra de escala: 100 μm en A-D.

4.3. Consecuencias de la delección del rCB1 sobre el desarrollo de la corteza cerebral de ratón

4.3.1. Efecto de la delección del rCB1 sobre las neuronas postmitóticas en migración durante el desarrollo de la corteza cerebral

Puesto que en este trabajo se observó una alteración en el número de neuronas postmitóticas en migración en los embriones expuestos a un agonista de los rCB1/CB2 a lo largo del periodo de migración neuronal, y que trabajos de otros autores demostraron que el sistema eCB está implicado en la regulación de procesos de migración radial y tangencial [Berghuis y col., 2005; Mulder y col., 2008], se evaluó el efecto de la delección del rCB1 en ratones *knockout* sobre estas neuronas en migración. Se evaluó el día E13,5 ya que es un periodo de activa migración neuronal, tanto radial como tangencial. De forma similar que el estudio realizado en los embriones de rata, en este estadio hay una abundante densidad de células DCX⁺ en las ZM, SP y la ZI, por lo tanto sólo se pudieron distinguir de forma individual las neuronas postmitóticas en la ZI ZSV (**Figura 23, A**). Así mismo, debido a la elevada densidad de células DCX⁺ se cuantificó el cociente entre el espesor de la corteza cerebral inmunomarcada con DCX, que incluye la ZM, PC, SP y ZI, sobre el espesor total de la corteza, a fin de obtener una estimación de la extensión de las neuronas postmitóticas a lo ancho de la corteza. El porcentaje relativo del espesor de las capas inmunomarcadas con DCX no resultó afectado por la delección del rCB1 (CB1^{+/+}: 46,54 ± 4,86 vs. CB1^{-/-}: 53,21 ± 0,67; P=0,306) (**Figura 23, B**). No se realizó una categorización de neuronas postmitóticas DCX⁺ radiales y tangenciales puesto que en los ratones CB1^{+/+} se observó un escaso número de células DCX⁺ en la ZSV/ZV. Se observó un incremento significativo en el número de neuronas postmitóticas DCX⁺ en la ZSV de los cerebros de embriones CB1^{-/-} comparado con los embriones CB1^{+/+} (CB1^{+/+}: 7,29 ± 1,32 vs. CB1^{-/-}: 22,71 ± 1,82; P=0,0137) (**Figura 23, C-E**).

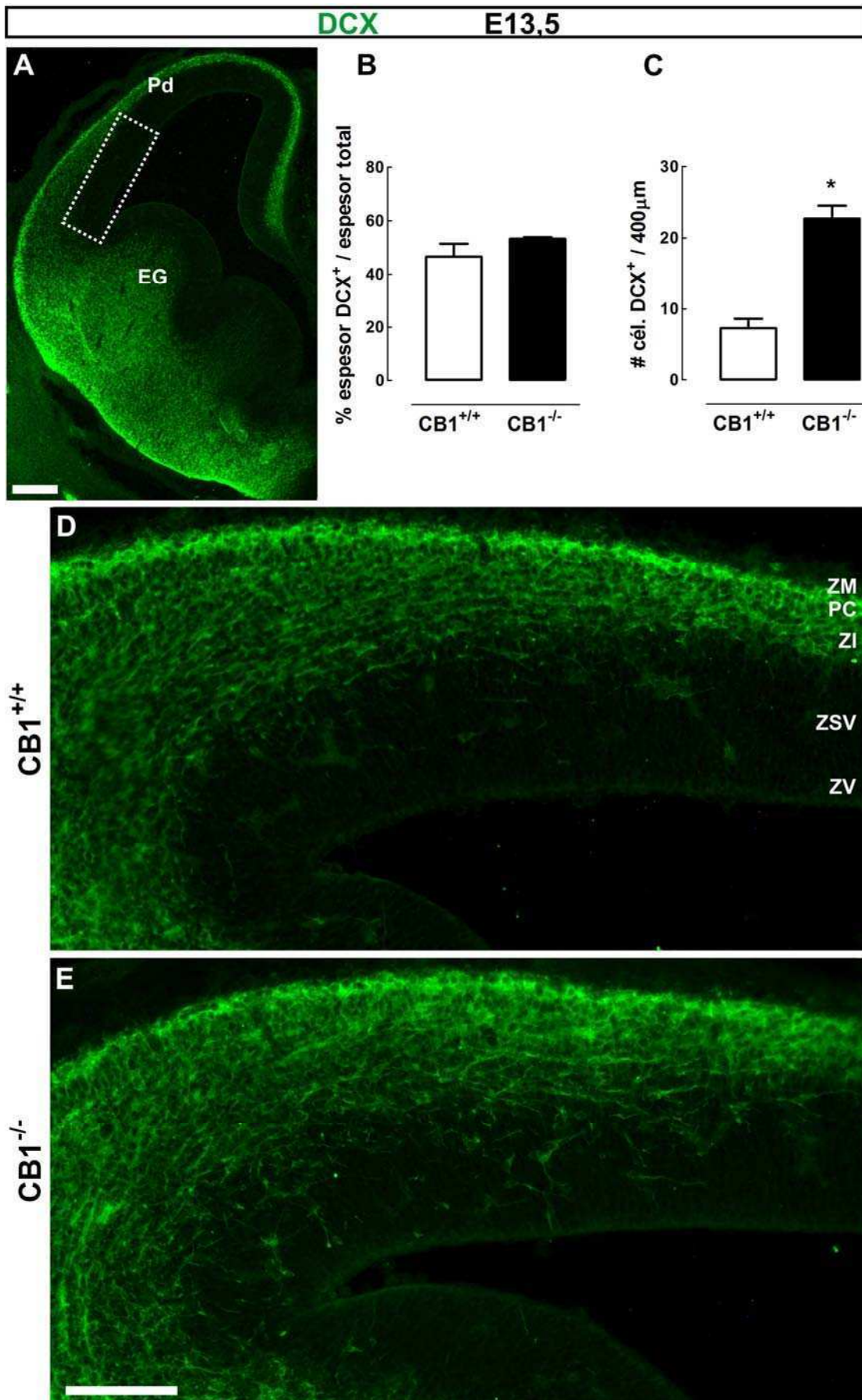


Figura 23. La delección del rCB1 aumentó el número de neuronas postmitóticas en migración de la ZSV/ZV del palio dorsal en desarrollo. A: imagen por microscopía de epifluorescencia. Inmunofluorescencia para DCX en una sección coronal de telencéfalo de ratón de día E13,5. El recuadro indica la región seleccionada para la cuantificación de las células DCX⁺: ZSV/ZV del palio dorsal próximo al límite subpalio/palio. **B:** cuantificación del cociente del espesor de la ZM, PC, SP y ZI sobre el espesor total de la corteza cerebral. **C:** cuantificación del número medio de células DCX⁺ en la ZSV/ZV del palio dorsal de embriones de ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-}. Las barras de error representan el EEM; (n=4); *P<0,05; test de Student. **D, E:** imágenes por microscopía de epifluorescencia, inmunofluorescencia para DCX en secciones coronales de telencéfalo de embriones CB1^{+/+} (**D**) y CB1^{-/-} (**E**) de día E13,5. Abreviaturas: EG eminencia ganglionar; Pd, palio dorsal; PC, placa cortical; ZM, zona marginal; ZSV, zona subventricular; ZI, zona intermedia; ZV, zona ventricular. Barra de escala: 200 μm en A, 100 μm en D y E.

4.3.2. Efecto de la delección del rCB1 sobre la diferenciación neuronal del linaje glutamatérgico

Con el objetivo de evaluar si la delección del rCB1 afectó la diferenciación de progenitores intermedios a neuronas postmitóticas glutamatérgicas de la capa 6, se evaluó el número de progenitores intermedios glutamatérgicos Tbr2⁺ y de neuronas postmitóticas glutamatérgicas de la capa 6 Tbr1⁺ en ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-} de día E16,5. El análisis de éstos experimentos demostró que la ausencia del rCB1 produjo una disminución estadísticamente significativa en el número de células Tbr2⁺ en la ZV/ZSV del palio dorsal con respecto a los ratones *wildtype* (CB1^{+/+}: 894,2 ± 20,48 vs. CB1^{-/-}: 569,2 ± 16,41; P=0,0126). Por otro lado, los ratones CB1^{-/-} mostraron un incremento significativo en el número de células Tbr1⁺ localizadas en la SP y capa 6 (CB1^{+/+}: 504,2 ± 12,94 vs. CB1^{-/-}: 734,8 ± 15,56; P=0,0019) (**Figura 24, A-F**).

A fin de evaluar los niveles de expresión relativos de Tbr2 y Tbr1 se realizaron ensayos de *western blot* de la fracción proteica total de telencéfalos dorsales de embriones CB1^{+/+} y CB1^{-/-}. En los ratones CB1^{-/-} se observó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de expresión de Tbr2, mientras que los niveles de Tbr1 presentaron un incremento que también resultó estadísticamente significativo (**Figura 24, G-J**).

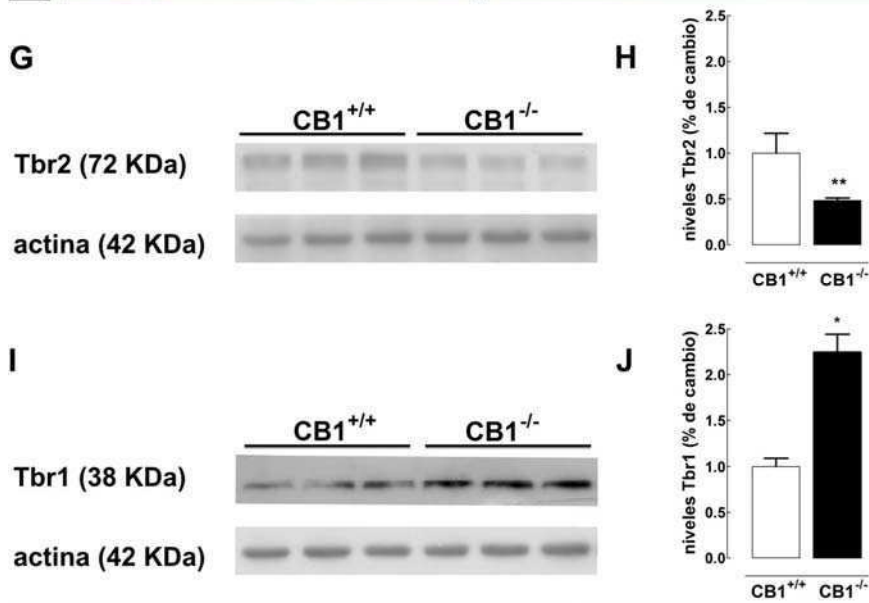
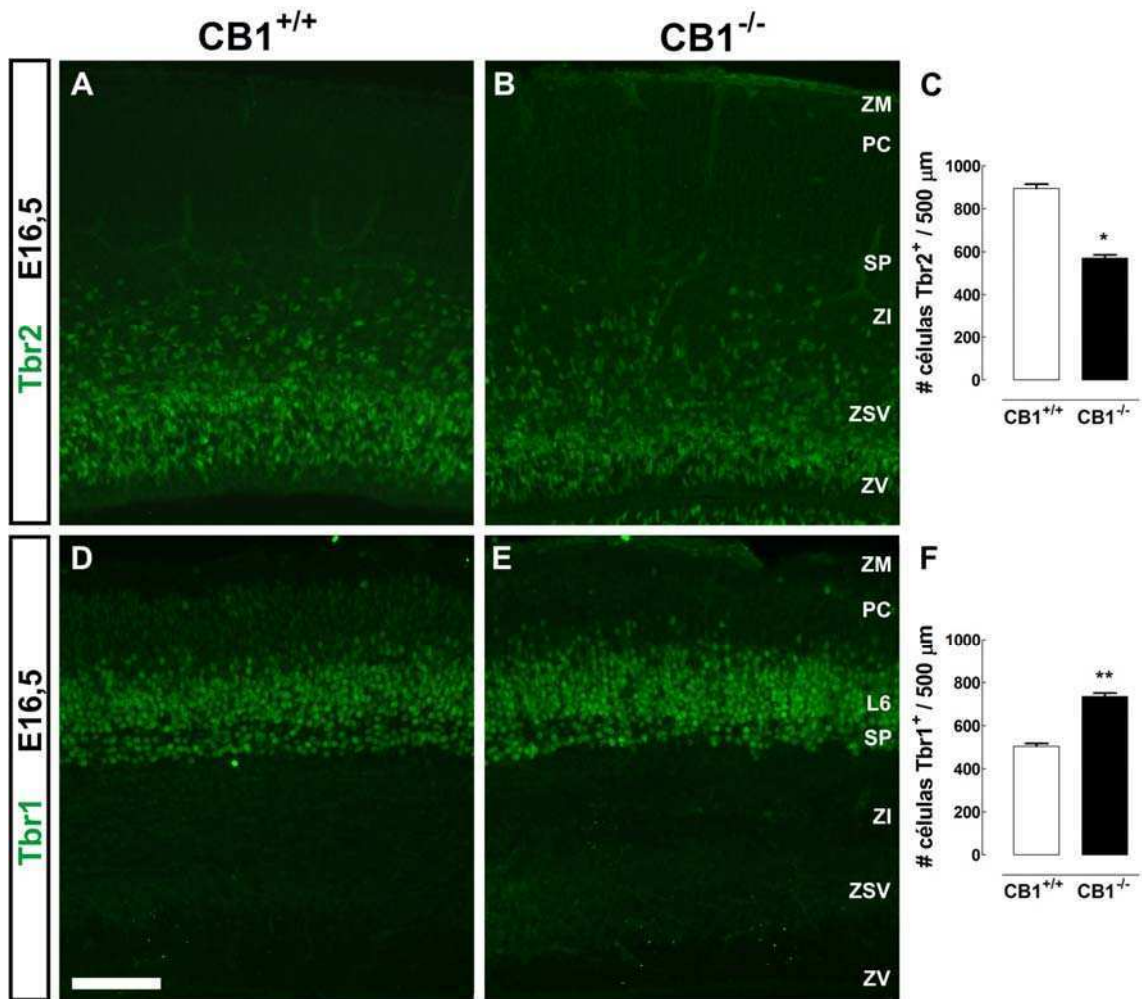


Figura 24. La delección del rCB1 disminuyó el número de células Tbr2⁺ e incrementó el número de células Tbr1⁺ en embriones de día E16,5. A, B, D, E: Imágenes por microscopía de epifluorescencia de secciones coronales de palio dorsal inmunomarcadas con Tbr2 (A, B) y Tbr1 (D, E) en embriones CB1^{+/+} y CB1^{-/-} de día E16,5. **C:** cuantificación del número medio de células Tbr2⁺ de embriones de ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-}. **F:** cuantificación del número medio de células Tbr1⁺ de embriones de ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-}. **G, I:** *Western blot* revelado con anticuerpo anti-Tbr2 (G) y anti-Tbr1 (I) de fracción protéica total de telencéfalo dorsal de ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-} de día E16,5. **H, J:** Los graficos de barra representan la semicuantificación de los niveles medios de proteína de Tbr2 y Tbr1 normalizado a los niveles de actina y relativizado a los niveles del CB1^{+/+}. Las barras de error representan el EEM, ($n=4/5$), * $P<0,05$, ** $P<0,005$, test de Student. Abreviaturas: LVI, lámina 6; SP, subplaca; ZI, zona intermedia; ZM, zona margina ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular. Barra de escala: 100 μ m en A, B, D, E.

4.3.3. Consecuencias de la delección del rCB1 sobre la citoarquitectura cortical en edades postnatales

Las consecuencias de la delección del rCB1 se evaluaron en la corteza frontal dado que es un área que juega un rol relevante en los procesos de aprendizaje y memoria y que, además, existen evidencias que atribuyen el déficit cognitivo causado por la exposición prenatal a cannabinoides a alteraciones en la función de esta región cortical.

4.3.3.1. Consecuencias de la delección del rCB1 sobre la distribución de interneuronas corticales

El apropiado posicionamiento de las interneuronas en la corteza cerebral requiere de dos fases de migración diferentes. Primero, las interneuronas migran de forma tangencial desde el subpalio al palio y, de forma subsecuente, migran de forma radial hasta alcanzar su posición laminar definida. Evidencias previas demostraron que el sistema eCB regula la migración de interneuronas corticales *in vitro* [Berghuis y col., 2005]. Dada estas evidencias, se buscó estudiar si la ausencia del rCB1 afectó el posicionamiento de distintos subtipos de interneuronas GABAérgicas. Mediante la utilización de dos marcadores de interneuronas corticales, reelina y CALR, se analizó la distribución de interneuronas en la corteza cerebral de los ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-} de DP21.

Áreas equivalentes de la corteza primaria motora de ratones $CB1^{+/+}$ y $CB1^{-/-}$ fueron subdivididas en diez cuadrantes equivalentes, y se cuantificó la proporción de células $reelina^+$ (**Figura 25**) y $CALR^+$ (**Figura 26**) en cada cuadrante. El análisis de la distribución de interneuronas $reelina^+$ mostró un incremento significativo en los cuadrantes 9 y 10, los cuales representan la lámina 6 en los ratones $CB1^{-/-}$. A su vez, estas interneuronas presentaron una menor proporción en el cuadrante 1, el cual representa la capa I (**Figura 25**). Por otro lado, en los ratones $CB1^{-/-}$ el análisis de la distribución de las interneuronas $CALR^+$ mostró un leve incremento en el cuadrante 7 de las capas inferiores y una disminución en la proporción de estas en la capa I (**Figura 26**).

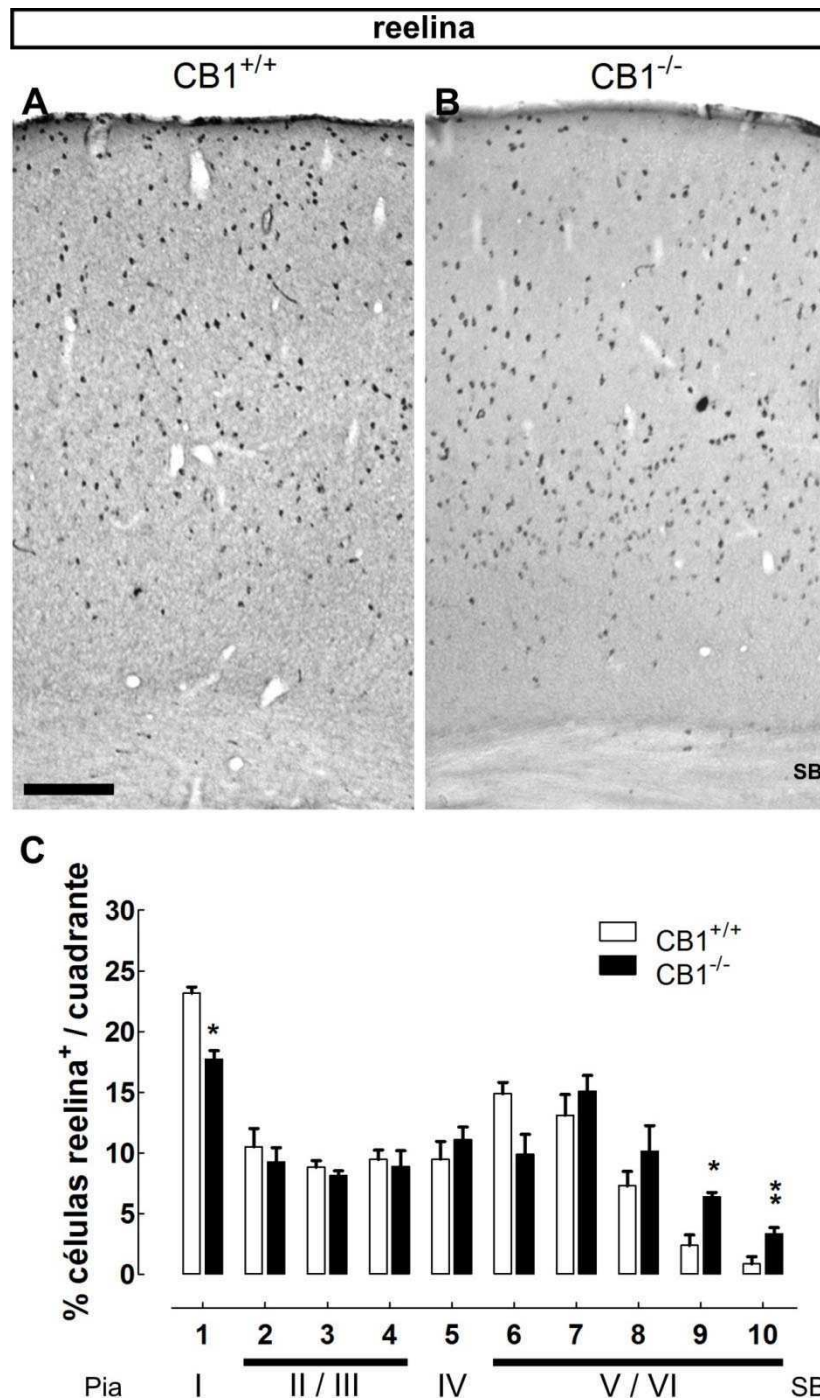


Figura 25. Distribución laminar de interneuronas reelina⁺ en la corteza de ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-}. A, B: imágenes por microscopía de campo claro. Inmunohistoquímica para reelina en secciones coronales de corteza motora primaria de ratones CB1^{+/+} (A) y CB1^{-/-} (B). C: los gráficos de barra representan el porcentaje de interneuronas reelina⁺ contenidas en cada uno de los diez cuadrantes con los cuales se subdividió el espesor de la corteza. Los números romanos indican la lámina cortical que representan los cuadrantes utilizados para la cuantificación de la distribución. Las barras de error representa el EEM, (n=3), *P<0,05, **P<0,005. Abreviatura: SB, sustancia blanca. Barra de escala: 200 µm en A y B.

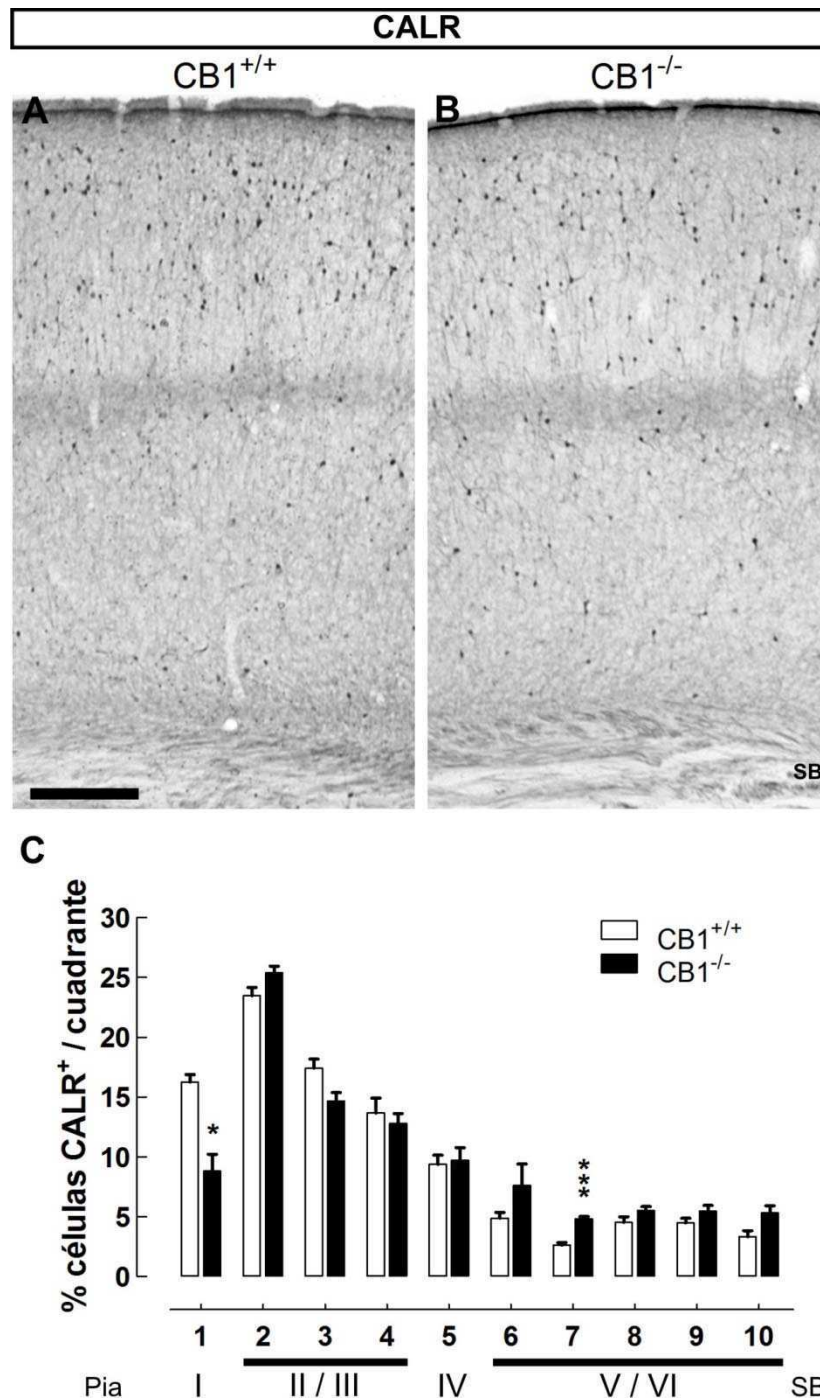


Figura 26. Distribución laminar de interneuronas CALR⁺ de la corteza de ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-} de DP21. A, B: imágenes por microscopía de campo claro. Inmunohistoquímica para calretinina en secciones coronales de corteza primaria motora de ratones CB1^{+/+} (A) y CB1^{-/-} (B). C: los graficos de barra representan el porcentaje de interneuronas CALR⁺ contenidas en cada uno de los diez cuadrantes con los cuales se subdividió el espesor de la corteza. Los números romanos indican la lámina cortical que representan los cuadrantes utilizados para la cuantificación de la distribución. Las barras de error representa el EEM, (n=3), *P<0,05; ***P<0,001. Abreviatura: SB, sustancia blanca. Barra de escala: 200 μ m en A y B.

4.3.3.2. Consecuencias de la delección del rCB1 sobre el citoesqueleto neuronal

Estudios previos demostraron que la delección del rCB1 o el bloqueo farmacológico *in utero* produce una anormal fasciculación de axones corticotalámicos y talamocorticales durante el desarrollo temprano de los roedores [Wu y col., 2010]. Dado estos antecedentes, sumado a las evidencias que sugieren que el sistema eCB regula la morfogénesis neuronal, se realizó un estudio por inmunohistoquímica para neurofilamento de 200 KDa (NF-200) a fin de evaluar las alteraciones en el citoesqueleto axonal de los ratones $CB1^{-/-}$ de día P21. Los ratones $CB1^{-/-}$ presentaron una trayectoria aberrante de los axones que transcurren el cuerpo calloso, evidenciado por el anormal posicionamiento de los neurofilamentos del citoesqueleto axonal (Figura 27).

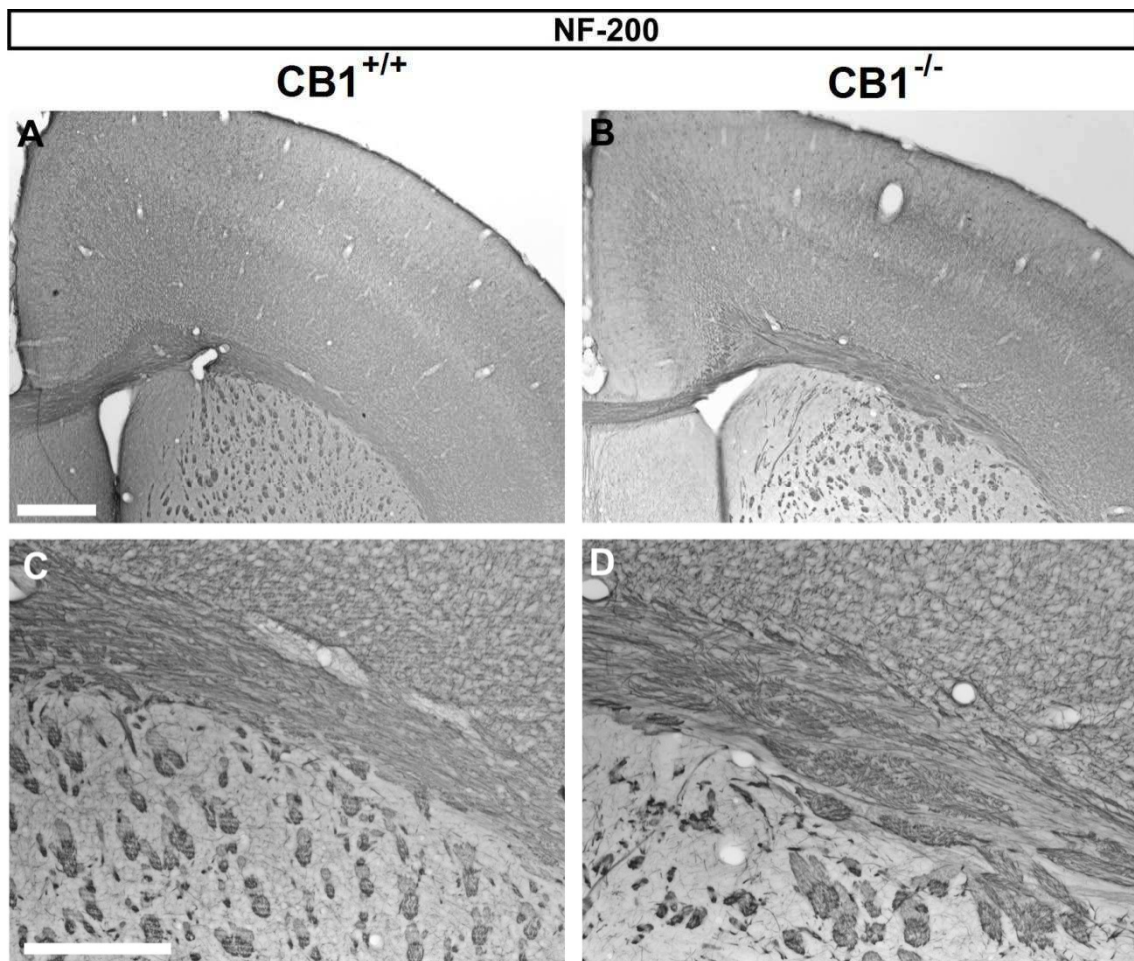


Figura 27. La delección del rCB1 produjo una fasciculación anormal en ratones de DP21. A-D: Imágenes por microscopía de campo claro. Inmunohistoquímica para NF-200 en secciones coronales de cerebro de ratones, a nivel de la corteza frontal y el cuerpo estriado, de ratones $CB1^{+/+}$ y $CB1^{-/-}$. Barra de escala: 400 μm en A y B; 200 μm en C y D.

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la delección del rCB1 sobre la morfogénesis neuronal, se evaluó la morfología neuronal mediante la cuantificación del área relativa de fibras NF-200⁺. La ausencia del rCB1 indujo cambios en el citoesqueleto neuronal evidenciado por la disminución del área relativa cubierta por el filamento intermedio NF-200 en la corteza primaria motora. A su vez, se observó una menor ramificación de las fibras NF-200 evidenciado por la pérdida del entramado que estas ramificaciones presentan en los ratones $CB1^{+/+}$ (**Figura 28, A, B y F**).

Trabajos previos demostraron que la activación del rCB1 regula la sinaptogénesis [Berghuis y col., 2007]. A fin de evaluar si la delección del rCB1 produjo alteraciones a nivel de los terminales presinápticos se realizó una IHQ para sinaptofisina, una proteína presente en los terminales presinápticos que participa en la formación y reciclado vesicular. La semicuantificación de la densidad óptica relativa de la inmunoreactividad de sinaptofisina resultó similar tanto en ratones $CB1^{+/+}$ como en los ratones $CB1^{-/-}$ (**Figura 28, C, D y G**).

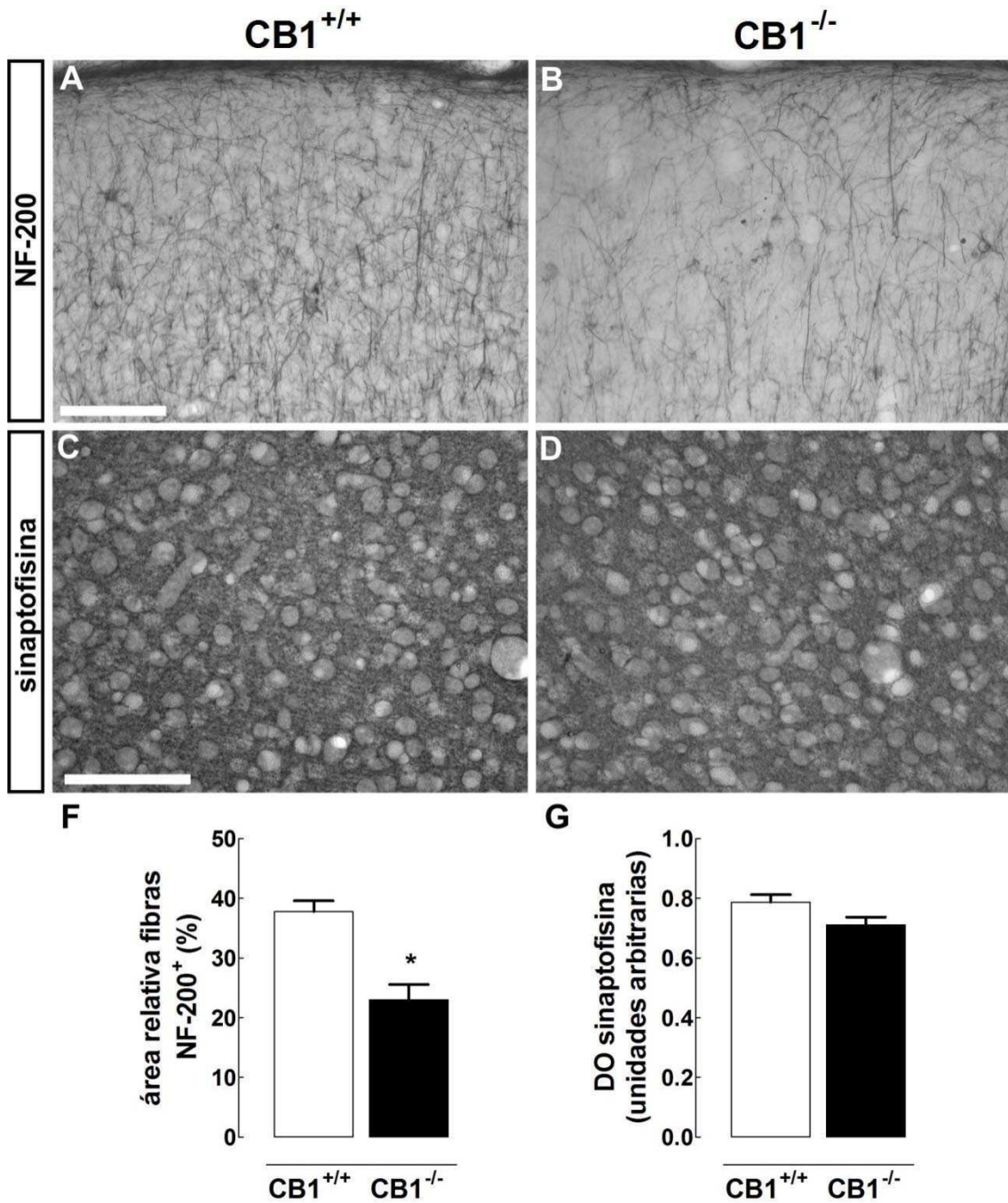


Figura 28. La delección del rCB1 produjo una disminución en el citoesqueleto cortical en ratones de DP21. **A, B:** Imágenes por microscopía de campo claro. Inmunohistoquímica para NF-200 en secciones coronales de corteza frontal de ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-}. **D, E:** Inmunohistoquímica para sinaptofisina en secciones coronales de corteza frontal de ratones CB1^{+/+} y CB1^{-/-}. **F:** los graficos de barra representan la cuantificación del área relativa cubierta por fibras NF-200⁺. **G:** los graficos de barra representan la semicuantificación de la densidad óptica de la inmunoreactividad de sinaptofisina. Las barras de error representa el EEM, (n=3), *P<0,05, test de Student. Barra de escala: 200 μ m en A-D.

DISCUSIÓN

5. Discusión

5.1. Expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración y en distintos subtipos neuronales durante la corticogénesis

En la primer parte de este trabajo de Tesis se estudió, por medio de microscopía confocal de alta resolución, la expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración y a su vez, en distintas subpoblaciones de neuronas corticales durante los estadios tempranos e intermedios de la corticogénesis de la rata.

El patrón temporal y espacial de expresión del rCB1 previamente descrito en el telencéfalo ventral en desarrollo [Berghuis y col., 2007; Mulder y col., 2008; Vitalis y col., 2008] fue confirmado en este trabajo.

La expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas en migración se observó desde los primeros estadios de formación de la corteza, cuando la primer oleada de migración radial de neuronas postmitóticas arriban desde la ZV para formar la PP. En dichas neuronas, el rCB1 se localizó en el soma y en neuritas en crecimiento, lo cual concuerda con la localización celular del rCB1 durante estadios embrionarios descrito por otros autores. A partir del día E13,5, cuando comienzan a arribar las primeras oleadas de interneuronas generadas en la EG a través de la corriente superficial [Nadarajah y col., 2002], se observó la expresión del rCB1 en neuronas inmaduras con orientación tangencial. Dichas neuronas podrían corresponder tanto a neuronas postmitóticas que se encuentran en proceso de migración tangencial, como a cC-R. Además se observó células $CB1^+/DCX^+$ en disposición radial en la ZV y en la ZSV, lo cual podría sugerir que son neuronas postmitóticas del linaje glutamatérgico que se encuentran migrando de forma radial hacia la PP. La localización del receptor en estas neuronas postmitóticas en migración concuerda con su papel en la migración neuronal reportado en trabajos previos [Berghuis y col., 2005; Mulder y col., 2008]

Contrariamente a lo que se observó en trabajos anteriores de otros autores [Berghuis y col., 2007; Vitalis y col., 2008], se observaron células $CB1^+$ en neuronas postmitóticas presentes en la zona proliferativa de la EG, desde donde nacen las interneuronas que luego van a migrar tangencialmente hacia palio. Este dato sugiere que el rCB1 se expresa en interneuronas corticales desde estadios muy tempranos de diferenciación, antes de comenzar su migración tangencial hacia el palio dorsal.

A partir del día E15,5, periodo en el cual la PP ya se dividió para dar lugar a la PC, se observó la localización del rCB1 en prácticamente todas las neuronas postmitóticas de la ZM, la PC y la SP. En este estadio, la expresión del receptor se extendió también a la ZI, donde transcurren los axones corticofugales en crecimiento de las neuronas glutamatérgicas localizadas en la SP y de las neuronas glutamatérgicas pioneras. La expresión del rCB1 en estos axones ocurre en un periodo muy acotado en el desarrollo, desde el día E15,5 hasta el día E18,5, en el cual las neuronas glutamatérgicas en desarrollo inician la elongación y fasciculación de sus axones. Entre los días E15,5 y E16,5, periodo en el cual hay un pico de migración tangencial, la corriente de migración tangencial profunda se dirige hacia la corteza por las ZSV y ZI. Sin embargo, debido a la abundante densidad de somas y neuritas DCX⁺ en la ZI superior y SP, solo se pudo distinguir la expresión del rCB1 en neuronas postmitóticas DCX⁺ en la ZI inferior y ZSV. En dichas zonas, la expresión del receptor se observó en neuritas principalmente de orientación radial sólo en la región más dorsal del palio dorsal, en la proximidad del límite del subpalio/palio. Estas células probablemente representen neuronas en migración radial hacia la PC o neuronas en migración, tanto de proyección como interneuronas, que alcanzan las zonas proliferativas antes de dirigirse hacia su posición final en la PC en busca de señales de especificación laminar [Nadarajah y col., 2002]. Por lo tanto, la localización del rCB1 en neuronas que están activamente en migración reflejaría la participación del sistema eCB en la migración neuronal y en la guía axonal.

Uno de los objetivos de este trabajo fue caracterizar la población neuronal que expresa el rCB1 durante estadios tempranos e intermedios de la corticogénesis, y para esto se evaluó la colocalización del receptor con dos proteínas de unión a calcio: CALB y CALR. En trabajos recientes se caracterizaron las poblaciones de neuronas pioneras en diferentes subtipos durante estadios de PP y de PC. Durante el estadio de PP, la población neuronal se compone de cC-R reelina⁺, neuronas de proyección pioneras Tbr1⁺, CALB⁺ o CALR⁺ y algunas interneuronas GABA⁺ o CALB⁺ [Hevner y col., 2003]

A diferencia de lo que sucede con el ratón, CALB⁺ se expresa en un muy bajo porcentaje en las interneuronas corticales de la corteza en desarrollo de la rata. Por lo cual, una gran proporción de estas neuronas CALB⁺ son del linaje de las neuronas glutamatérgicas. En el día E14,5, cuando comienza a formarse la PC, la expresión del

receptor en células CALB⁺ se observó tanto en la PC como en la SP. En esta edad, las neuronas rCB1⁺/CALB⁺ presentaron una morfología y orientación variable. En la PC se observó la expresión del receptor en células CALB⁺ con orientación principalmente radial, las cuales podrían corresponder a neuronas de proyección que migraron radialmente hacia la PC. Por el contrario, en la zona inferior a la PC se observaron algunas células CALB⁺/CB1⁺ de orientación tangencial, las cuales podrían corresponder a interneuronas GABAérgicas en migración tangencial. Aunque diversos autores describieron que las interneuronas GABAérgicas expresan el rCB1 hacia el final de la vida prenatal, cuando las interneuronas migran de forma radial hacia su posicionamiento en la PC [Mulder y col., 2008], o una vez que alcanzan el hipocampo [Morozov y col., 2009], las observaciones obtenidas en este trabajo sugieren que el receptor se expresa en interneuronas aún desde estadios tempranos de la migración, cuando se encuentran migrando de forma tangencial.

Las neuronas de la SP y de la PP son importantes en el desarrollo cortical pues cumplen un papel esencial en el desarrollo de las primeras conexiones axonales corticales. Estas neuronas guían a las primeras eferencias axonales fuera de la corteza y proveen los primeros blancos postsinápticos para los axones talamocorticales [Molnar y col., 1998]. La localización del rCB1 en estas neuronas pioneras CALB⁺ en la SP y en los axones CB1⁺/CALB⁺ localizados en la ZI concuerdan con el requerimiento de estas neuronas piramidales de una señalización eCB para la polarización axonal y la formación de los axones glutamatérgicos de largo alcance.

Si bien en trabajos anteriores se describió la expresión del rCB1 en células CALR⁺ durante el desarrollo embrionario de la corteza cerebral [Morozov y col., 2009], dichos estudios se centraron en el hipocampo y fueron realizados en ratón. En este trabajo se observó la expresión del rCB1 en células CALR⁺ desde estadios tempranos de la corticogénesis (E13,5 y E14,5), las cuales podrían corresponder, en su mayoría a neuronas de proyección pioneras.

Durante estadios de PP, tanto para el día E12,5 como E13,5, se observó la expresión del rCB1 con células reelina⁺. Si bien la población de cC-R presenta varios sitios orígenes, estas células se distribuyen a lo largo de la corteza por migración tangencial [Bielle y col., 2005]. Hasta el momento ningún trabajo describió que las cC-R migren de modo radial; sin embargo, en este trabajo se observaron algunas células

reelina⁺/CB1⁺ en las ZSV y ZV con una disposición radial, lo cual sugiere que estas también pueden migrar de forma radial radial hacia la PP. Esta observación sugiere un origen ventricular del palio dorsal, lo cual concuerda con la coexpresión de reelina y Tbr1, un marcador del linaje glutamatérgico [Hevner y col., 2003]. Por otro lado, se observaron grupos de células CB1⁺ en disposición radial en la ZSV/ZV como consecuencia de oleadas discretas de generación de las neuronas en las zonas proliferativas. Esta oleada discreta de migración de neuronas postmitóticas radiales presenta, tanto células reelina⁺/CB1⁺ como células reelina⁻/CB1⁺, lo cual podría sugerir que, si bien este grupo de neuronas se generarían en el mismo espacio y tiempo, presentarían una diversidad en cuanto a la expresión de estos marcadores. Además, la expresión del rCB1 en las cC-R se detectó en todas las edades analizadas y esto podría indicar que el sistema eCB, a través de su rCB1 interactuaría con la reelina en los procesos de migración radial.

5.2. Efecto de la exposición prenatal a WIN sobre la proliferación, migración y diferenciación neuronal de la corteza cerebral en desarrollo de la rata.

El presente trabajo aporta nuevas evidencias sobre los efectos que produce la exposición materna a un agonista cannabinoide en dosis moderadas sobre la migración y diferenciación neuronal en la corteza cerebral de embriones de rata y expande nuestro conocimiento sobre cómo la exposición a cannabinoides durante la gestación podría afectar el desarrollo del SNC e inducir deficiencias cognitivas y comportamentales durante la vida postnatal.

Dada la implicancia que tiene estos estudios es importante estimar, por extrapolación, si la dosis de este agonista sintético se compara con la dosis de THC absorbida por los consumidores de cannabis. Estudios previos han estimado que una dosis de 5mg/Kg de THC en ratas corresponde a una exposición moderada a la marihuana en humanos, corregida por las diferencias en la ruta de administración y la superficie del peso corporal [García-Gil y col., 1999]. Por otro lado se estima que el WIN es entre tres y diez veces más potente que el THC, dependiendo de la ruta de administración [Hampson y col., 2000]. Esta estimación es consistente con la K_i relativa de WIN y THC para el rCB1 en membranas de cerebro (2-12 nM y 35-80 nM para WIN y THC respectivamente) [Pertwee, 2000]. Basado en estas consideraciones, la dosis

utilizada en este trabajo (0,75 mg/Kg, subcutánea), podría corresponder a una dosis moderada de exposición para los humanos [Mereu y col., 2003]. Dado que dicha dosis no produjo malformaciones o signos aparentes de toxicidad, ni alteró significativamente los parámetros gestacionales medidos; se puede asumir que las alteraciones observadas en el desarrollo cortical de los embriones expuestos a WIN no son debidas a efectos indirectos de la droga, tales como la malnutrición de la madre.

Teniendo en cuenta que en los últimos años se demostró el papel fundamental que cumple el sistema eCB en la migración de neuronas de proyección [Mulder y col., 2008] y de interneuronas [Berghuis y col., 2005; Morozov y col., 2009], sumado al hecho que el rCB1 se expresa en neuronas postmitóticas en migración, se estudió el efecto de la exposición prenatal crónica a una agonista del rCB1 sobre la disposición de estas células en la corteza cerebral en desarrollo a fin de evaluar una posible disrupción en su migración. En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la exposición prenatal a WIN indujo un incremento en el número de neuronas postmitóticas en migración tangencial y radial en la ZSV/ZV. Este aumento en el número de neuronas postmitóticas en migración en la ZSV/ZV podría ser a expensas de una disminución del espesor relativo de las ZM/PC/SP/ZI inmunomarcada con DCX. Dichos resultados podrían deberse a una alteración en la proliferación celular y/o en la muerte celular programada o a un retraso en la diferenciación y por lo tanto en el inicio de la migración neuronal hacia la PC.

Durante el periodo analizado, las interneuronas migran tangencialmente hacia la corteza, y luego que atraviesan el límite entre el palio/subpalio pueden cambiar su dirección hacia la PC siguiendo una vía radial u oblicua a lo largo de la corteza. Una proporción de interneuronas descienden en dirección radial hacia la ZV donde son retenidas y luego revierte su dirección hacia la PC. Por su parte, las neuronas de proyección también presentan distintas fases de migración hacia la PC y pueden revertir su dirección de migración hacia la ZV para luego ingresar a la PC [Nadarajah y col., 2002]. La explicación de este comportamiento es que las neuronas en migración podrían buscar señales de su posicionamiento final en la ZV [Kriegstein y col., 2004]. Más aún, experimentos recientes demostraron que los eCB inducirían la migración de interneuronas al actuar como quimioattractantes [Berghuis y col., 2005]. Por lo tanto, dada la complejidad de la dinámica de migración de las interneuronas y de las

neuronas de proyección, la interpretación de estos resultados también es compleja. En vistas de estos antecedentes y que los embriones expuestos a WIN presentaron un incremento en número de neuronas postmitóticas radiales y tangenciales en la región próxima al límite entre el palio y subpalio, se podría sugerir que la exposición prenatal a cannabinoides produciría un cambio en la direccionalidad de estas interneuronas que alcanzan la corteza en dirección tangencial, produciendo una migración radial prematura hacia la PC. Por otro lado, estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, demostraron que la señalización eCB está involucrada en la migración radial, y por consiguiente, contribuye a definir la posición final y la densidad de neuronas inmaduras glutamatérgicas de proyección en la corteza [Mulder y col., 2008]. Por lo tanto, el incremento de células DCX⁺ radiales en la ZV/ZSV en embriones expuestos a WIN podría deberse a una alteración en la migración radial [Hevner y col., 2001].

Dada la complejidad que presenta la interpretación de estos interesantes resultados, se evaluó la disposición laminar de interneuronas GABAérgicas en las zonas de migración de la corriente superficial (ZM y SP) y profunda (ZI y ZSV) en embriones de rata control y expuestos a WIN. Los embriones expuestos a WIN mostraron un incremento estadísticamente significativo en el número de células GABA⁺ en la ZM, zona por la cual transcurre la corriente migratoria superficial. Trabajos de otro autores demostraron que las interneuronas alcanzan el hipocampo principalmente por esta corriente migratoria superficial [Manent y col., 2006]. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los resultados previos, los cuales demostraron que la exposición prenatal a THC produce un incremento de interneuronas CCK⁺ en el hipocampo de ratas adultas [Berghuis y col., 2005]. Por otro lado y contrariamente a lo que se esperaba, no se encontró un incremento en el número de células GABA⁺ en la ZI/ZSV. Este hecho podría deberse a que las interneuronas postmitóticas inmaduras adquieren la expresión de GABA en el transcurso de su maduración. Por lo tanto, probablemente una proporción de células DCX⁺ de orientación tangencial, cuantificadas en la ZSV, aún no expresen GABA y por lo tanto no fue posible cuantificarlas.

Una de las hipótesis evaluadas en este trabajo fue que las alteraciones observadas en el número de neuronas postmitóticas en migración de embriones expuestos a WIN podría deberse a una alteración en la proliferación y/o a una disminución en la muerte

celular programada. Durante el desarrollo neocortical, los rCB1 presentes en la ZSV/ZV participan en la regulación de la proliferación de progenitores neurales y el tamaño del pool de estas células [Aguado y col., 2005; Jiang y col., 2005; Trazzi y col., 2010]. Un estudio farmacológico realizado en cultivos organotípicos de día E14,5 reveló que la exposición a un agonista selectivo del rCB1 (HU-210) aumenta la proliferación de progenitores de la ZV/ZSV [Mulder y col., 2008]. A pesar de las evidencias presentadas en estos trabajos, aquí no se encontró un efecto significativo sobre el número de células en proliferación en la ZV y ZSV marcadas con ki67 del palio dorsal de embriones expuestos a dosis moderadas de WIN. Por consiguiente, podríamos sugerir que los efectos observados sobre la migración neuronal no se deben a una disrupción en la proliferación celular.

La exposición aguda a WIN regula de manera negativa moléculas pro-apotóticas y de manera positiva moléculas anti-apoptóticas en la corteza cerebral de roedores adultos [Alvaro-Bartolome y col., 2010]. Sin embargo, en este modelo experimental no se observó una diferencia estadísticamente significativa sobre la muerte celular programada en los embriones expuestos a WIN. En el periodo analizado, E16,5 y E20,5, se observaron escasas células TUNEL⁺ en el palio dorsal y en las EG de ambos grupos experimentales. Esto podría deberse a que la muerte por apoptosis ocurre principalmente en edades postnatales tempranas, durante la sinaptogénesis de las neuronas postmitóticas a fin de eliminar las neuronas que fallaron en posicionarse de forma correcta [Kim y col., 2011]. Por lo tanto, sería interesante evaluar si la exposición prenatal a WIN tiene un efecto sobre la muerte celular en estas edades postnatales tempranas.

Entre los mecanismos celulares intrínsecos involucrados en la corticogénesis, un complejo programa de factores de transcripción es responsable del correcto establecimiento de la identidad neuronal en una lámina cortical. Estos factores coordinan la salida del ciclo celular, la migración neuronal y un programa de expresión de genes específico que dicta la identidad neuronal de las neuronas corticales de cada lámina cortical específica y las conexiones axonales [Molyneaux y col., 2007]. *Tbr2* es un factor de transcripción de la familia T-box que se expresa en progenitores intermedios del linaje glutamatérgico y es regulado negativamente una vez que sale de su ciclo celular y se diferencia a neurona postmitótica de proyección [Englund y col.,

2005a]. En este trabajo se observó un incremento en el número de progenitores intermedios glutamatérgicos en los embriones expuestos a WIN a lo largo de todas las edades analizadas. Sin embargo, no se encontraron evidencias sobre si éste incremento se debió a un incremento en la proliferación celular, puesto que no se observaron diferencias significativas en el número de células $ki67^+$ en la ZSV entre los embriones controles y los expuestos a WIN.

A la salida de su ciclo celular, las neuronas postmitóticas glutamatérgicas recién diferenciadas expresan el factor de transcripción *Tbr1* en el palio embrionario [Bulfone y col., 1999]. El incremento de células $Tbr2^+$ fue acompañado de una disminución en el número de células $Tbr1^+$ en los embriones expuestos a WIN en el día E12,5 y E14, 5. A pesar que se observó un aumento en el número de cPI $Tbr2^+$ en todas las edades analizadas, el número de neuronas postmitóticas glutamatérgicas $Tbr1^+$ de la capa 6 y SP de los embriones expuesto a WIN de día E16,5 y E20,5 alcanzó los valores de los controles. Los progenitores intermedios contribuyen no solo con la generación de neuronas de proyección de la capa 6 y SP sino, también, con la generación de la mayoría de las neuronas de proyección corticales, tanto de la PP, como de las capas corticales inferiores y superiores [Kowalczyk y col., 2009]. Por lo tanto sería interesante analizar el efecto de la exposición a WIN sobre destino de las neuronas de proyección de las demás capas corticales mediante el análisis de marcadores específicos de la capa 5a, identificada por la expresión del factor de transcripción *Ctip2*, y de las capas superiores, identificada por la expresión del factor de transcripción *Satb2* [Alcamo y col., 2008].

En conjunto, todos estos resultados sugieren que la exposición prenatal a WIN induciría un retraso en la diferenciación de progenitor intermedio a neurona postmitótica glutamatérgica de la capa 6 y SP, lo cual podría causar a su vez, un retraso en el inicio de la migración de las neuronas postmitóticas que aún permanecen en la zonas proliferativas. Una posible explicación a dichos resultados podría ser que la exposición prenatal a WIN produzca un retraso en la salida del ciclo celular de los progenitores intermedio, y que por lo tanto se acumulen en la ZSV. Evidencias de otros autores demostraron que la activación del rCB1 esta involucrado en la modulación de genes reguladores del ciclo celular de los precursores neurales [Trazzi y col., 2010]. A fin de determinar si el retraso en la diferenciación se debió a una alteración en la

cinética del ciclo celular de los progenitores Tbr2⁺ sería interesante evaluar la dinámica del ciclo celular en los embriones expuestos a WIN.

El factor de transcripción Tbr1 se expresa en las primeras neuronas postmitóticas glutamatérgicas que forman la PP y luego en la SP. Dichas neuronas envían las primeras eferencias axonales y cumplen un papel esencial en la guía de de las proyecciones talamocorticales [Kanold y col., 2010]. Además, durante el desarrollo prenatal, Tbr1 se expresa en las neuronas de proyección de la capa 6, las cuales establecen las aferencias corticotalámicas. Estudios recientes mostraron que la delección del rCB1 en la neuronas piramidales o la delección completa o el bloqueo farmacológico mediante la administración *in utero* de un antagonista del rCB1 produce aberraciones en la fasciculación de los axones corticotalámicos y talamocorticales [Mulder y col., 2008; Wu y col., 2010]. La formación de un circuito neuronal preciso requiere de una interacción orquestada entre los tractos axonales y entre los conos de crecimiento en navegación y las señales del entorno en las diferentes posiciones. Por lo tanto, un retraso en la diferenciación y en la migración neuronal y por consiguiente en el posicionamiento de las neuronas de proyección podría inducir alteraciones en las conexiones corticotalámicas y talamocorticales. Dichas alteraciones podrían ser uno de los sustratos neurobiológicos de las alteraciones neurocomportamentales observados en los animales expuestos prenatalmente a WIN.

El patrón laminar de la neocorteza es establecido, en parte, por las cC-R mediante la secreción de reelina. Esta molécula cumple un papel importante en la guía de la migración radial de neuronas diferenciadas durante el desarrollo cortical y podría estar implicada, además, en la regulación de la migración tangencial y la subsiguiente migración radial de las interneuronas nacidas más tardíamente [Hammond y col., 2006; Morante-Oria y col., 2003]. Un defecto en el posicionamiento o diferenciación de estas células podría inducir una señalización de la migración anormal. Por lo tanto, el incremento transitorio de cC-R observado en los embriones expuestos a WIN de día E14,5 podría estar relacionado con los defectos en la migración previamente descritos. Sin embargo, hasta la fecha aún no existen estudios funcionales que demuestren la relación entre el sistema de señalización eCB y el sistema de señalización de la reelina. Por otro lado, puesto que: *i)* tanto el sistema de señalización eCB como el sistema de señalización de la reelina están involucrados en la regulación

de la migración, la morfogénesis neuronal y la guía del cono de crecimiento; *ii*) ambos sistemas comparten vías de señalización involucradas en la dinámica del citoesqueleto axonal; *iii*) el rCB1 se expresa en células de Cajal-Retzius y en las células blanco de la reelina; *iv*) los componentes de ambos sistemas de señalización se expresan en conos de crecimiento axonal y axones; sería de sumo interés estudiar los efectos de la administración conjunta de reelina y agonistas o antagonistas del rCB1 en cultivo de explantos corticales sobre la migración de neuronas postmitóticas y la neuritogénesis. A su vez, sería importante estudiar la localización celular y subcelular de componentes del sistema eCB (rCB1, DAGL y MLG α) y de la vía de la reelina (receptores Vldl y Apoer2 y adaptador Dab1) en la corteza cerebral en desarrollo.

Otro sustrato importante para la migración radial lo constituyen las cGR. Las neuronas postmitóticas glutamatérgicas se adhieren a las fibras radiales de las cG-R, las cuales guían la migración hacia su posición final en la PC. La función de la glía radial durante la corticogénesis depende de la modulación dinámica de su polaridad molecular, morfología y de citoesqueleto [Rakic, 2003]. Sin embargo, la exposición prenatal a WIN no afectó la integridad ni la organización de las fibras de las cG-R ni el área relativa de estas.

El cerebro es más vulnerable a la exposición a drogas de abuso durante el desarrollo prenatal y la vida postnatal temprana, periodos en los cuales las poblaciones neuronales atraviesan por un rápido crecimiento y diferenciación. Es durante este tiempo, que las neuronas nacen, migran hacia su destino final y se integran al circuito neuronal de su lámina específica en la corteza cerebral. Si bien numerosas evidencias sugieren que la exposición a cannabinoides durante la gestación tiene una profunda influencia sobre los eventos tempranos del desarrollo neurocomportamental, ninguno de los mencionados trabajos evaluó los efectos de la exposición prenatal a cannabinoides en estadios embrionarios [Antonelli y col., 2004; Antonelli y col., 2006; Antonelli y col., 2005; Mereu y col., 2003]. Los efectos de la exposición prenatal a WIN detallados en este trabajo de tesis contribuyen al conocimiento sobre los sustratos neurobiológicos que determinarían las anormalidades en la neurotransmisión glutamatérgica cortical que determinarían los cambios neurocomportamentales que persisten en las funciones del cerebro durante la vida postnatal.

5.3. Consecuencias de la delección del rCB1 sobre la diferenciación y migración de neuronas glutamatérgicas y la citoarquitectura de la corteza cerebral del ratón.

El presente trabajo de Tesis provee nuevas evidencias sobre el rol del rCB1 en la regulación de la migración de neuronas postmitóticas y en la regulación de factores de transcripción que controlan la diferenciación de neuronas glutamatérgicas corticales.

Como se mencionó en la sección anterior, el sistema eCB, a través de su rCB1, cumple un rol importante en la migración radial y tangencial [Berghuis y col., 2005; Mulder y col., 2008]. En este trabajo se demostró que la delección del rCB1 produjo un incremento del número de neuronas postmitóticas DCX⁺ en la la ZSV/ZV del palio dorsal sin disminuir el espesor de la ZM/PC/SP/ZI. Por lo que se podría sugerir que dicho aumento en el número de células DCX⁺ no se debió a expensas del número de células DCX⁺ en otras capas. Dicho efecto podría deberse, entonces a un defecto en la migración de interneuronas que se encuentran atravesando la ZSV y que por lo tanto se acumulen en dicha zona, y/ o de la migración radial de neuronas de proyección hacia la PC.

De manera contraria a lo que ocurrió con los embriones expuestos a WIN, la delección del rCB1 disminuyó significativamente el número de progenitores intermedios Tbr2⁺ y, a su vez, incrementó el número de neuronas postmitóticas glutamatérgicas en embriones de ratón día E16,5. En conjunto, todos estos resultados sugieren que la delección del rCB1 induciría una diferenciación prematura de progenitores intermedios a neurona postmitótica glutamatérgica de la capa 6 y SP. Esto podría ser consecuencia de una salida prematura del ciclo celular, lo cual explicaría la disminución en el número de progenitores intermedios y el aumento de neuronas postmitóticas glutamatérgicas Tbr1 y además explicaría el incremento en el número neuronas postmitóticas en migración en la ZSV. Los niveles de expresión de Tbr2 y Tbr1 obtenidos de una fracción protéica total de telencéfalos dorsales de embriones corroboraron los resultados obtenidos en el análisis histológico. La disminución de la expresión de Tbr2 en los ratones CB1^{-/-} concuerda con los resultados observados en un trabajo reciente, donde se demostró que durante el desarrollo de la corteza cerebral, el rCB1 es capaz de modular la actividad transcripcional de Tbr2 en los progenitores de la ZSV/ZV [Diaz-Alonso y col., 2012]. Además, en trabajos previos se demostró que la activación del rCB1 regula la expresión de otro factores de

transcripción, incluidos Sat3 y Pax6, que participan en el mantenimiento de de los progenitores neurales y el compromiso y diferenciación neuronal [Bromberg y col., 2008]. Esto podría sugerir que los eCB participarían en la regulación del destino celular mediante la alteración de la expresión de dichos factores de transcripción.

Un paso importante en el desarrollo del cerebro es la correcta incorporación de las neuronas dentro de la red neuronal. Esto requiere tanto de la especificación neuronal como de la formación de una adecuada conexión entre las neuronas vecinas y distales. Como se mencionó anteriormente, en los últimos años se demostró el papel fundamental que cumple el sistema eCB en la migración de interneuronas corticales [Berghuis y col., 2005; Morozov y col., 2009]. En concordancia con estos resultados, en este trabajo se observó que la ausencia del rCB1 produjo una distribución de interneuronas anormal en ciertas capas de la corteza en edades postnatales, cuando la migración neuronal finalizó. Esto podría deberse a un defecto en la migración de las interneuronas al ingresar a la PC o un defecto en la expresión de factores de transcripción que regulen la especificación de interneuronas corticales. En trabajos previos se propuso que las interneuronas utilizan los axones corticofugales como sustrato para su migración hacia la corteza cerebral [Denaxa y col., 2001]. En el presente trabajo se observó una fasciculación anormal en los axones corticofugales de los ratones CB1^{-/-} que concuerda con los efectos descritos en la literatura [Wu y col., 2010]. Esta fasciculación aberrante podría entonces, afectar la correcta migración de interneuronas corticales. Por otro lado, otro trabajo reciente demostró que el factor de transcripción Tbr2 regula la ruta migratoria de las interneuronas por la ZSV hacia el pialo dorsal [Sessa y col., 2010]. Por lo tanto, los niveles anormales de expresión de Tbr2 observados en los ratones CB1^{-/-} también podría explicar los defectos en el posicionamiento de las interneuronas dentro de la corteza cerebral.

La remodelación dinámica de citoesqueleto neuronal es necesaria para el crecimiento axonal y el establecimiento de sinapsis. Durante la morfogénesis, las neuronas se polarizan y extienden sus neuritas, las cuales se diferenciarán en axones y dendritas. Los neurofilamentos y la proteína asociada a microtúbulo MAP-2 forman parte de este citoesqueleto neuronal y proveen una estructura estable para el mantenimiento de la morfología neuronal. Sin bien las dendritas contienen neurofilamentos, estos constituyen el principal componente del citoesqueleto axonal.

Un creciente número de evidencias sugieren un papel fundamental de la señalización eCB, a través del rCB1, en la navegación del cono de crecimiento axonal, la elongación axonal, la dendritogénesis y la sinaptogénesis de interneuronas GABAérgicas y neuronas de proyección glutamatérgicas en el cerebro de los roedores [Berghuis y col., 2005; Berghuis y col., 2007; Kawaguchi y col., 2010; Mulder y col., 2008; Vitalis y col., 2008; Wu y col., 2010]. Sin embargo, todos estos trabajos fueron realizados en cultivos neuronales y líneas celulares, por lo cual no existen evidencias sobre la modulación de la señalización eCB sobre el citoesqueleto neuronal *in vivo*. En este trabajo se demostró que la ausencia del rCB1 indujo una disminución del área cubierta por NF-200 en la corteza primaria motora y más aún, que estas fibras presentaron una menor complejidad axonal.

Por otro lado, el establecimiento de las sinapsis glutamatérgicas también es regulado por el rCB1. En particular, se describió que la inhibición de la síntesis de 2-AG en neuronas piramidales redujo la expresión de vGlut1 y alteró la expresión de marcadores de sinapsis glutamatérgicas como SNAP25 y de postsinapsis como sinaptofisina [Mulder y col., 2008]. Sin embargo, en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la intensidad relativa de los niveles de inmunoreactividad de sinaptofisina, un marcador de postsinapsis. Sería interesante evaluar si la delección del rCB1 induce cambios en marcadores de presinápsis, así como realizar estudios por microscopía electrónica de transmisión a fin de evaluar si existen alteraciones a nivel ultraestructural de las sinapsis corticales.

La corteza cerebral juega un papel crucial en la integración de la información necesaria para la mayor parte de las funciones cerebrales complejas. Este proceso requiere de la actividad coordinada de los dos tipos principales de neuronas de la corteza cerebral, las neuronas de proyección y las interneuronas. La correcta proporción entre neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas es crítica para el normal tono excitatorio e inhibitorio [Hensch y col., 2005]. Un número creciente de evidencias sugieren que algunas enfermedades neurológicas podrían surgir como consecuencia de alteraciones producidas durante el desarrollo de la corteza cerebral [Galve-Roperh y col., 2009]. Puesto que las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas presentan programas de desarrollo diferentes y que requieren un alto grado de coordinación, es probable que problemas en el desarrollo de cualquiera de estas poblaciones

neuronales tenga importantes consecuencias en la organización normal de la corteza cerebral. Considerando el rol del rCB1 en la generación, migración y diferenciación de neuronas tanto excitatorias como inhibitorias, la alteración de la señalización dependiente del rCB1 durante el desarrollo podría tener un importante impacto sobre el apropiado balance de neuronas excitatorias/inhibitorias en el cerebro adulto. Dicho desbalance en la actividad exhitatoria/inhibitoria debido a alteraciones en el desarrollo cortical podría contribuir a la generación de desordenes neurocomportamentales como la epilepsia [Bernard y col., 2005; Ludanyi y col., 2008].

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

- A lo largo de la corticogénesis de la rata, el rCB1 se expresa en neuronas postmitóticas en migración radial y tangencial, en cC-R y en neuronas calretinina y calbindina positivas recién diferenciadas y en proceso de migración tangencial.
- La exposición prenatal a WIN indujo un aumento en el número de neuronas postmitóticas en migración radial y tangencial en la ZSV/ZV a expensas de una disminución del espesor de la ZM/PC/SP/ZI inmunomarcada con DCX.
- La exposición prenatal a WIN indujo un aumento en el número de interneuronas GABAérgicas en la ZM de la corteza cerebral en desarrollo.
- La exposición prenatal a WIN no afectó la proliferación celular ni la muerte celular programada en la corteza en desarrollo.
- La exposición prenatal a WIN indujo un incremento en el número de progenitores intermedios Tbr2⁺ y una disminución en el número de neuronas postmitóticas glutamatérgicas Tbr1⁺ de la capa 6 y SP, posiblemente debido a un retraso en la salida del ciclo celular y por consiguiente a una prematura diferenciación neuronal.
- La exposición prenatal a WIN indujo un aumento transitorio en el número de cC-R.
- La delección del rCB1 en ratones *knockout* indujo un aumento en el número de neuronas postmitóticas en migración en la ZSV de embriones de ratón
- La delección del rCB1 en ratones *knockout* indujo una disminución en el número de progenitores intermedios Tbr2⁺ y un aumento en el número de neuronas postmitóticas glutamatérgicas Tbr1⁺ de la capa 6 y SP, posiblemente debido a una prematura salida del ciclo celular y por consiguiente a una prematura diferencia y retraso en la diferenciación neuronal.
- La delección del rCB1 en ratones *knockout* indujo un posicionamiento anormal de interneuronas corticales.
- La delección del rCB1 en ratones *knockout* indujo una disminución en el área relativa de fibras NF-200⁺, una menor complejidad de neuritas en la corteza postnatal y una fasciculación anormal en los axones del cuerpo calloso

REFERENCIAS

7. Referencias

- Aguado, T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzman M, Galve-Roperh I. 2005. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J* 19(12):1704-1706.
- Aguado, T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzman M, Galve-Roperh I. 2006. The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci* 26(5):1551-1561.
- Aguado, T, Romero E, Monory K, Palazuelos J, Sendtner M, Marsicano G, Lutz B, Guzmán M, Galve-Roperh I. 2007. The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *The Journal of biological chemistry* 282:23892-23898.
- Alcamo, EA, Chirivella L, Dautzenberg M, Dobрева G, Farinas I, Grosschedl R, McConnell SK. 2008. Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron* 57(3):364-377.
- Alcántara, S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, Sotelo C, Soriano E. 1998. Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:7779-7799.
- Alvaro-Bartolome, M, Esteban S, Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J, Valverde O, Garcia-Sevilla JA. 2010. Regulation of Fas receptor/Fas-associated protein with death domain apoptotic complex and associated signalling systems by cannabinoid receptors in the mouse brain. *Br J Pharmacol* 160(3):643-656.
- Anavi-Goffer, S, Mulder J. 2009. The polarised life of the endocannabinoid system in CNS development. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 10:1591-1598.
- Anderson, SA, Kaznowski CE, Horn C, Rubenstein JL, McConnell SK. 2002. Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo. *Cereb Cortex* 12(7):702-709.
- Anderson, Sa, Marín O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL. 2001. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development (Cambridge, England)* 128:353-363.
- Ang, ES, Jr., Haydar TF, Gluncic V, Rakic P. 2003. Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* 23(13):5805-5815.
- Antonelli, T, Tanganelli S, Tomasini MC, Finetti S, Trabace L, Steardo L, Sabino V, Carratu MR, Cuomo V, Ferraro L. 2004. Long-term effects on cortical glutamate release induced by prenatal exposure to the cannabinoid receptor agonist (R)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone: an in vivo microdialysis. *Neuroscience* 124:367-375.
- Antonelli, T, Tomasini MC, Tattoli M, Cassano T, Finetti S, Mazzoni E, Trabace L, Carratù MR, Cuomo V, Tanganelli S, Ferraro L. 2006. Prenatal exposure to the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 and carbon monoxide reduces extracellular glutamate levels in primary rat cerebral cortex cell cultures. *Neurochemistry international* 49:568-576.

- Antonelli, T, Tomasini MC, Tattoli M, Cassano T, Tanganelli S, Finetti S, Mazzoni E, Trabace L, Steardo L, Cuomo V, Ferraro L. 2005. Prenatal exposure to the CB1 receptor agonist WIN 55,212-2 causes learning disruption associated with impaired cortical NMDA receptor function and emotional reactivity changes in rat offspring. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991) 15:2013-2020.
- Arévalo-Martín, A, García-Ovejero D, Rubio-Araiz A, Gómez O, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E. 2007. Cannabinoids modulate Olig2 and polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the subventricular zone of post-natal rats through cannabinoid receptor 1 and cannabinoid receptor 2. *The European journal of neuroscience* 26:1548-1559.
- Ascoli, GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvarday ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Munoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9(7):557-568.
- Bai, J, Ramos RL, Paramasivam M, Siddiqi F, Ackman JB, LoTurco JJ. 2008. The role of DCX and LIS1 in migration through the lateral cortical stream of developing forebrain. *Developmental neuroscience* 30:144-156.
- Berghuis, P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, Schulte G, Ernfors P, Mackie K, Paratcha G, Hurd YL, Harkany T. 2005. Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:19115-19120.
- Berghuis, P, Rajniecek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urbán GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T. 2007. Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science (New York, NY)* 316:1212-1216.
- Bernard, C, Milh M, Morozov YM, Ben-Ari Y, Freund TF, Gozlan H. 2005. Altering cannabinoid signaling during development disrupts neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26):9388-9393.
- Berrendero, F, Garcia-Gil L, Hernandez ML, Romero J, Cebeira M, de Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. 1998. Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development* 125(16):3179-3188.
- Berrendero, F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz JJ. 1999. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33(3):181-191.
- Bielle, F, Griveau A, Narboux-Neme N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A. 2005. Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8(8):1002-1012.
- Bisogno, T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. 2003. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163(3):463-468.

- Bromberg, KD, Ma'ayan A, Neves SR, Iyengar R. 2008. Design logic of a cannabinoid receptor signaling network that triggers neurite outgrowth. *Science* 320(5878):903-909.
- Bulfone, a, Martinez S, Marigo V, Campanella M, Basile A, Quaderi N, Gattuso C, Rubenstein JL, Ballabio A. 1999. Expression pattern of the *Tbr2* (Eomesodermin) gene during mouse and chick brain development. *Mechanisms of development* 84:133-138.
- Butt, SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G. 2005. The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48(4):591-604.
- Campbell, K, Gotz M. 2002. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25(5):235-238.
- Campolongo, P, Trezza V, Cassano T, Gaetani S, Morgese MG, Ubaldi M, Soverchia L, Antonelli T, Ferraro L, Massi M, Ciccocioppo R, Cuomo V. 2007. Perinatal exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol causes enduring cognitive deficits associated with alteration of cortical gene expression and neurotransmission in rats. *Addict Biol* 12(3-4):485-495.
- Campolongo, P, Trezza V, Ratano P, Palmery M, Cuomo V. 2011. Developmental consequences of perinatal cannabis exposure: behavioral and neuroendocrine effects in adult rodents. *Psychopharmacology (Berl)* 214(1):5-15.
- Castaldo, P, Magi S, Gaetani S, Cassano T, Ferraro L, Antonelli T, Amoroso S, Cuomo V. 2007. Prenatal exposure to the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 increases glutamate uptake through overexpression of GLT1 and EAAC1 glutamate transporter subtypes in rat frontal cerebral cortex. *Neuropharmacology* 53:369-378.
- Castelli, MP, Paola Piras A, D'Agostino A, Pibiri F, Perra S, Gessa GL, Maccarrone M, Pistis M. 2007. Dysregulation of the endogenous cannabinoid system in adult rats prenatally treated with the cannabinoid agonist WIN 55,212-2. *European journal of pharmacology* 573:11-19.
- Chai, X, Forster E, Zhao S, Bock HH, Frotscher M. 2009. Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. *J Neurosci* 29(1):288-299.
- Chevaleyre, V, Takahashi KA, Castillo PE. 2006. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29:37-76.
- Chowdhury, TG, Jimenez JC, Bomar JM, Cruz-Martin A, Cantle JP, Portera-Cailliau C. 2010. Fate of cajal-retzius neurons in the postnatal mouse neocortex. *Front Neuroanat* 4:10.
- Cooper, JA. 2008. A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci* 31(3):113-119.
- Cravatt, BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384(6604):83-87.
- Curran, T, D'Arcangelo G. 1998. Role of reelin in the control of brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 26(2-3):285-294.

- Day, NL, Leech SL, Goldschmidt L. 2011. The effects of prenatal marijuana exposure on delinquent behaviors are mediated by measures of neurocognitive functioning. *Neurotoxicol Teratol* 33(1):129-136.
- De Petrocellis, L, Di Marzo V. 2009. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23(1):1-15.
- Denaxa, M, Chan CH, Schachner M, Parnavelas JG, Karagogeos D. 2001. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128(22):4635-4644.
- Diaz-Alonso, J, Aguado T, Wu CS, Palazuelos J, Hofmann C, Garcez P, Guillemot F, Lu HC, Lutz B, Guzman M, Galve-Roperh I. 2012. The CB1 Cannabinoid Receptor Drives Corticospinal Motor Neuron Differentiation through the Ctip2/Satb2 Transcriptional Regulation Axis. *J Neurosci* 32(47):16651-16665.
- Dinh, TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. 2002. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16):10819-10824.
- Englund, C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF. 2005a. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* 25(1):247-251.
- Englund, C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RAM, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF. 2005b. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:247-251.
- Faux, C, Rakic S, Andrews W, Britto JM. 2012. Neurons on the move: migration and lamination of cortical interneurons. *Neurosignals* 20(3):168-189.
- Fernandez-Ruiz, J, Berrendero F, Hernandez ML, Ramos JA. 2000. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci* 23(1):14-20.
- Ferraro, L, Tomasini MC, Beggiato S, Gaetani S, Cassano T, Cuomo V, Amoroso S, Tanganelli S, Antonelli T. 2009. Short- and long-term consequences of prenatal exposure to the cannabinoid agonist WIN55,212-2 on rat glutamate transmission and cognitive functions. *J Neural Transm* 116(8):1017-1027.
- Förster, E, Bock HH, Herz J, Chai X, Frotscher M, Zhao S. 2010. Emerging topics in Reelin function. *The European journal of neuroscience* 31:1511-1518.
- Fried, PA, Watkinson B. 2001. Differential effects on facets of attention in adolescents prenatally exposed to cigarettes and marihuana. *Neurotoxicol Teratol* 23(5):421-430.
- Fried, PA, Watkinson B, Gray R. 2003. Differential effects on cognitive functioning in 13- to 16-year-olds prenatally exposed to cigarettes and marihuana. *Neurotoxicol Teratol* 25(4):427-436.

- Friocourt, G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J, Francis F. 2003. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 13:620-626.
- Friocourt, G, Liu JS, Antypa M, Rakic S, Walsh CA, Parnavelas JG. 2007. Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:3875-3883.
- Frotscher, M. 2010. Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. *Trends in neurosciences* 33:407-414.
- Galve-Roperh, I, Aguado T, Palazuelos J, Guzman M. 2007. The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist* 13(2):109-114.
- Galve-Roperh, I, Palazuelos J, Aguado T, Guzmán M. 2009. The endocannabinoid system and the regulation of neural development: potential implications in psychiatric disorders. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 259:371-382.
- Garcia-Gil, L, de Miguel R, Romero J, Perez A, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. 1999. Perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure augmented the magnitude of motor inhibition caused by GABA(B), but not GABA(A), receptor agonists in adult rats. *Neurotoxicol Teratol* 21(3):277-283.
- Garcia-Moreno, F, Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA. 2007. Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *J Comp Neurol* 500(3):419-432.
- Gleeson, JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. 1999. Doublecortin Is a Microtubule-Associated Protein and Is Expressed Widely by Migrating Neurons Brigham and Women ' s Hospital. 23:257-271.
- Goldschmidt, L, Richardson GA, Willford JA, Severtson SG, Day NL. 2012. School achievement in 14-year-old youths prenatally exposed to marijuana. *Neurotoxicol Teratol* 34(1):161-167.
- Goncalves, MB, Suetterlin P, Yip P, Molina-Holgado F, Walker DJ, Oudin MJ, Zentar MP, Pollard S, Yanez-Munoz RJ, Williams G, Walsh FS, Pangalos MN, Doherty P. 2008. A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner. *Mol Cell Neurosci* 38(4):526-536.
- Gotz, M. 2003. Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist* 9(5):379-397.
- Gotz, M, Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(10):777-788.
- Gray, KA, Day NL, Leech S, Richardson GA. 2005. Prenatal marijuana exposure: effect on child depressive symptoms at ten years of age. *Neurotoxicol Teratol* 27(3):439-448.
- Hammond, V, So E, Gunnarsen J, Valcanis H, Kalloniatis M, Tan SS. 2006. Layer positioning of late-born cortical interneurons is dependent on Reelin but not p35 signaling. *J Neurosci* 26(5):1646-1655.
- Hampson, RE, Deadwyler SA. 2000. Cannabinoids reveal the necessity of hippocampal neural encoding for short-term memory in rats. *J Neurosci* 20(23):8932-8942.

- Harkany, T, Guzmán M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi La, Mackie K. 2007. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends in pharmacological sciences* 28:83-92.
- Harkany, T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J. 2008. Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Molecular and cellular endocrinology* 286:S84-90.
- Haubensak, W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. 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(9):3196-3201.
- He, JC, Gomes I, Nguyen T, Jayaram G, Ram PT, Devi LA, Iyengar R. 2005. The G alpha(o/i)-coupled cannabinoid receptor-mediated neurite outgrowth involves Rap regulation of Src and Stat3. *J Biol Chem* 280(39):33426-33434.
- Hensch, TK, Fagiolini M. 2005. Excitatory-inhibitory balance and critical period plasticity in developing visual cortex. *Prog Brain Res* 147:115-124.
- Hernández-Miranda, LR, Parnavelas JG, Chiara F. 2010. Molecules and mechanisms involved in the generation and migration of cortical interneurons. *ASN neuro* 2:e00031.
- Herz, J, Chen Y. 2006. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 7(11):850-859.
- Hevner, RF, Daza RA, Rubenstein JL, Stunnenberg H, Olavarria JF, Englund C. 2003. Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons. *Dev Neurosci* 25(2-4):139-151.
- Hevner, RF, Hodge RD, Daza RaM, Englund C. 2006. Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neuroscience research* 55:223-233.
- Hevner, RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL. 2001. *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29:353-366.
- Ishii, I, Chun J. 2002. Anandamide-induced neuroblastoma cell rounding via the CB1 cannabinoid receptors. *Neuroreport* 13(5):593-596.
- Jiang, W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X. 2005. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest* 115(11):3104-3116.
- Jiménez, D, Rivera R, López-Mascaraque L, De Carlos Ja. 2003. Origin of the cortical layer I in rodents. *Developmental neuroscience* 25:105-115.
- Jin, K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, Childs J, Greenberg DA. 2004. Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 66(2):204-208.

- Jordan, JD, He JC, Eungdamrong NJ, Gomes I, Ali W, Nguyen T, Bivona TG, Philips MR, Devi LA, Iyengar R. 2005. Cannabinoid receptor-induced neurite outgrowth is mediated by Rap1 activation through G(alpha)o/i-triggered proteasomal degradation of Rap1GAPII. *J Biol Chem* 280(12):11413-11421.
- Jutras-Aswad, D, DiNieri Ja, Harkany T, Hurd YL. 2009. Neurobiological consequences of maternal cannabis on human fetal development and its neuropsychiatric outcome. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 259:395-412.
- Kanold, PO, Luhmann HJ. 2010. The subplate and early cortical circuits. *Annu Rev Neurosci* 33:23-48.
- Kappeler, C, Saillour Y, Baudoin JP, Tuy FP, Alvarez C, Houbron C, Gaspar P, Hamard G, Chelly J, Metin C, Francis F. 2006. Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum Mol Genet* 15(9):1387-1400.
- Kawaguchi, K, Habara T, Terashima T, Kikkawa S. 2010. GABA modulates development of cerebellar Purkinje cell dendrites under control of endocannabinoid signaling. *J Neurochem* 114(2):627-638.
- Keimpema, E, Barabas K, Morozov YM, Tortoriello G, Torii M, Cameron G, Yanagawa Y, Watanabe M, Mackie K, Harkany T. 2010. Differential Subcellular Recruitment of Monoacylglycerol Lipase Generates Spatial Specificity of 2-Arachidonoyl Glycerol Signaling during Axonal Pathfinding. *Journal of Neuroscience* 30:13992-14007.
- Kim, WR, Sun W. 2011. Programmed cell death during postnatal development of the rodent nervous system. *Dev Growth Differ* 53(2):225-235.
- Kiuchi, T, Ohashi K, Kurita S, Mizuno K. 2007. Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. *J Cell Biol* 177(3):465-476.
- Kohwi, M, Petryniak MA, Long JE, Ekker M, Obata K, Yanagawa Y, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A. 2007. A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci* 27(26):6878-6891.
- Kowalczyk, T, Pontious A, Englund C, Daza RA, Bedogni F, Hodge R, Attardo A, Bell C, Huttner WB, Hevner RF. 2009. Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb Cortex* 19(10):2439-2450.
- Kriegstein, A, Alvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149-184.
- Kriegstein, A, Noctor S, Martinez-Cerdeno V. 2006. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci* 7(11):883-890.
- Kriegstein, AR, Gotz M. 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43(1):37-43.
- Kriegstein, AR, Noctor SC. 2004. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends in neurosciences* 27:392-399.

- Kwan, KY, Sestan N, Anton ES. 2012. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* 139(9):1535-1546.
- Ledent, C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. 1999. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283(5400):401-404.
- Leemhuis, J, Bouche E, Frotscher M, Henle F, Hein L, Herz J, Meyer DK, Pichler M, Roth G, Schwan C, Bock HH. 2010. Reelin signals through apolipoprotein E receptor 2 and Cdc42 to increase growth cone motility and filopodia formation. *J Neurosci* 30(44):14759-14772.
- Lodato, S, Rouaux C, Quast KB, Jantrachotechatchawan C, Studer M, Hensch TK, Arlotta P. 2011. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* 69(4):763-779.
- Lopez-Bendito, G, Sturgess K, Erdelyi F, Szabo G, Molnar Z, Paulsen O. 2004. Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons. *Cereb Cortex* 14(10):1122-1133.
- Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275.
- Ludanyi, A, Eross L, Czirjak S, Vajda J, Halasz P, Watanabe M, Palkovits M, Magloczky Z, Freund TF, Katona I. 2008. Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *J Neurosci* 28(12):2976-2990.
- Maj, PF, Collu M, Fadda P, Cattaneo A, Racagni G, Riva MA. 2007. Long-term reduction of brain-derived neurotrophic factor levels and signaling impairment following prenatal treatment with the cannabinoid receptor 1 receptor agonist (R)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl) pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone. *Eur J Neurosci* 25(11):3305-3311.
- Malatesta, P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Gotz M. 2003. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37(5):751-764.
- Malatesta, P, Hartfuss E, Gotz M. 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127(24):5253-5263.
- Manent, JB, Jorquera I, Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Represa A. 2006. Glutamate acting on AMPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons. *J Neurosci* 26(22):5901-5909.
- Marín, O, Rubenstein JL. 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nature reviews Neuroscience* 2:780-790.
- Marín, O, Rubenstein JLR. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annual review of neuroscience* 26:441-483.
- Marín, O, Valiente M, Ge X, Tsai L-H. 2010. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2:a001834.

- Martini, FJ, Valiente M, López Bendito G, Szabó G, Moya F, Valdeolmillos M, Marín O. 2009. Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development (Cambridge, England)* 136:41-50.
- Mato, S, Del Olmo E, Pazos A. 2003. Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. *Eur J Neurosci* 17(9):1747-1754.
- McCarthy, M, Turnbull DH, Walsh CA, Fishell G. 2001. Telencephalic neural progenitors appear to be restricted to regional and glial fates before the onset of neurogenesis. *J Neurosci* 21(17):6772-6781.
- McKenna, WL, Betancourt J, Larkin KA, Abrams B, Guo C, Rubenstein JL, Chen B. 2011. *Tbr1* and *Fezf2* regulate alternate corticofugal neuronal identities during neocortical development. *J Neurosci* 31(2):549-564.
- Mereu, G, Fà M, Ferraro L, Cagiano R, Antonelli T, Tattoli M, Ghiglieri V, Tanganelli S, Gessa GL, Cuomo V. 2003. Prenatal exposure to a cannabinoid agonist produces memory deficits linked to dysfunction in hippocampal long-term potentiation and glutamate release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4915-4920.
- Metin, C, Baudoin JP, Rakic S, Parnavelas JG. 2006. Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 23(4):894-900.
- Ming, GL, Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Miyoshi, G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJB, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G. 2010. Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:1582-1594.
- Molina-Holgado, F, Rubio-Araiz A, Garcia-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, Arevalo-Martin A, Gomez-Torres O, Molina-Holgado E. 2007. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur J Neurosci* 25(3):629-634.
- Molnar, Z, Adams R, Goffinet AM, Blakemore C. 1998. The role of the first postmitotic cortical cells in the development of thalamocortical innervation in the reeler mouse. *J Neurosci* 18(15):5746-5765.
- Molyneaux, BJ, Arlotta P, Menezes JRL, Macklis JD. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature reviews Neuroscience* 8:427-437.
- Morante-Oria, J, Carleton A, Ortino B, Kremer EJ, Fairén A, Lledo P-M. 2003. Subpallial origin of a population of projecting pioneer neurons during corticogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:12468-12473.
- Mori, T, Buffo A, Gotz M. 2005. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 69:67-99.
- Morozov, YM, Torii M, Rakic P. 2009. Origin, early commitment, migratory routes, and destination of cannabinoid type 1 receptor-containing interneurons. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 19 Suppl 1:i78-89.

- Mulder, J, Aguado T, Keimpema E, Barabás K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YL, Guillemot F, Mackie K, Lutz B, Guzmán M, Lu H-C, Galve-Roperh I, Harkany T. 2008. Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:8760-8765.
- Nadarajah, B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL. 2001. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4(2):143-150.
- Nadarajah, B, Parnavelas JG. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3(6):423-432.
- Nasrallah, IM, McManus MF, Pancoast MM, Wynshaw-Boris A, Golden JA. 2006. Analysis of non-radial interneuron migration dynamics and its disruption in *Lis1*^{+/-} mice. *J Comp Neurol* 496(6):847-858.
- Nery, S, Fishell G, Corbin JG. 2002. The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci* 5(12):1279-1287.
- Nguyen, L, Besson A, Heng JI, Schuurmans C, Teboul L, Parras C, Philpott A, Roberts JM, Guillemot F. 2006. p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev* 20(11):1511-1524.
- Noctor, SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* 7:136-144.
- Palazuelos, J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzman M, Galve-Roperh I. 2006. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J* 20(13):2405-2407.
- Palazuelos, J, Ortega Z, Diaz-Alonso J, Guzman M, Galve-Roperh I. 2012. CB2 cannabinoid receptors promote neural progenitor cell proliferation via mTORC1 signaling. *J Biol Chem* 287(2):1198-1209.
- Paxinos, G, Ashwell KWS, Törk I. 1994. *Atlas of the developing rat nervous system*. San Diego: Academic Press.
- Paxinos, G, Franklin KBJ. 2004. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
- Pertwee, RG. 2000. Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin Investig Drugs* 9(7):1553-1571.
- Rakic, P. 1971. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res* 33(2):471-476.
- Rakic, P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145(1):61-83.
- Rakic, P. 1974. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183(4123):425-427.

- Rakic, P. 1990. Principles of neural cell migration. *Experientia* 46(9):882-891.
- Rakic, P. 2003. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* 43(1):19-32.
- Rice, D, Barone S. 2000. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environmental Health Perspectives* 108:511.
- Rice, DS, Curran T. 2001. Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24:1005-1039.
- Rivkin, MJ, Davis PE, Lemaster JL, Cabral HJ, Warfield SK, Mulkern RV, Robson CD, Rose-Jacobs R, Frank DA. 2008. Volumetric MRI study of brain in children with intrauterine exposure to cocaine, alcohol, tobacco, and marijuana. *Pediatrics* 121(4):741-750.
- Romero, J, Garcia-Palomero E, Berrendero F, Garcia-Gil L, Hernandez ML, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. 1997. Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development. *Synapse* 26(3):317-323.
- Rueda, D, Navarro B, Martinez-Serrano A, Guzman M, Galve-Roperh I. 2002. The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. *J Biol Chem* 277(48):46645-46650.
- Rymar, VV, Sadikot AF. 2007. Lamina fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype. *J Comp Neurol* 501(3):369-380.
- Sauvageot, CM, Stiles CD. 2002. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 12(3):244-249.
- Schaar, BT, McConnell SK. 2005. Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(38):13652-13657.
- Schneider, M. 2009. Cannabis use in pregnancy and early life and its consequences: animal models. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 259:383-393.
- Sessa, A, Mao CA, Colasante G, Nini A, Klein WH, Broccoli V. 2010. Tbr2-positive intermediate (basal) neuronal progenitors safeguard cerebral cortex expansion by controlling amplification of pallial glutamatergic neurons and attraction of subpallial GABAergic interneurons. *Genes Dev* 24(16):1816-1826.
- Shabani, M, Hosseinmardi N, Haghani M, Shaibani V, Janahmadi M. 2011a. Maternal exposure to the CB1 cannabinoid agonist WIN 55212-2 produces robust changes in motor function and intrinsic electrophysiological properties of cerebellar Purkinje neurons in rat offspring. *Neuroscience* 172:139-152.
- Shabani, M, Hosseinmardi N, Haghani M, Shaibani V, Janahmadi M. 2011b. Maternal exposure to the CB1 cannabinoid agonist WIN 55212-2 produces robust changes in motor function and intrinsic electrophysiological properties of cerebellar Purkinje neurons in rat offspring. *Neuroscience* 172:139-152.

- Sideris, A, Bekker T, Chan WS, Montoya-Gacharna JV, Blanck TJ, Recio-Pinto E. 2012. A Role for the Cannabinoid 1 Receptor in Neuronal Differentiation of Adult Spinal Cord Progenitors in vitro is Revealed through Pharmacological Inhibition and Genetic Deletion. *Front Neurosci* 6:4.
- Smart, IH, Dehay C, Giroud P, Berland M, Kennedy H. 2002. Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* 12(1):37-53.
- Smith, AM, Fried PA, Hogan MJ, Cameron I. 2006. Effects of prenatal marijuana on visuospatial working memory: an fMRI study in young adults. *Neurotoxicol Teratol* 28(2):286-295.
- Soltys, J, Yushak M, Mao-Draayer Y. 2010. Regulation of neural progenitor cell fate by anandamide. *Biochemical and biophysical research communications* 400:21-26.
- Striedter, GF. 2006. Precipice of principles of brain evolution. *Behav Brain Sci* 29(1):1-12; discussion 12-36.
- Takahashi, T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. 1996. The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neurogenesis. *J Neurosci* 16(19):6183-6196.
- Taguchi-Hayashi, K, Sekiguchi M, Ashigaki S, Takamatsu M, Hasegawa H, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Nakanishi S, Tanabe Y. 2004. Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J Neurosci* 24(9):2286-2295.
- Tan, SS, Kalloniatis M, Sturm K, Tam PP, Reese BE, Faulkner-Jones B. 1998. Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron* 21(2):295-304.
- Tanaka, DH, Maekawa K, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F. 2006. Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. *Development (Cambridge, England)* 133:2167-2176.
- Tramontin, AD, Garcia-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A. 2003. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* 13(6):580-587.
- Trazzi, S, Steger M, Mitrugno VM, Bartsaghi R, Ciani E. 2010. CB1 cannabinoid receptors increase neuronal precursor proliferation through AKT/glycogen synthase kinase-3 β /beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 285(13):10098-10109.
- Tsai, LH, Gleeson JG. 2005. Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* 46(3):383-388.
- Ueda, N, Okamoto Y, Morishita J. 2005. N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D: a novel enzyme of the beta-lactamase fold family releasing anandamide and other N-acylethanolamines. *Life Sci* 77(14):1750-1758.
- Valcanis, H, Tan SS. 2003. Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. *J Neurosci* 23(12):5113-5122.

- Vitalis, T, Lainé J, Simon A, Roland A, Leterrier C, Lenkei Z. 2008. The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro. *The European journal of neuroscience* 28:1705-1718.
- Wonders, CP, Anderson SA. 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* 7(9):687-696.
- Wu, C-S, Zhu J, Wager-Miller J, Wang S, O'Leary D, Monory K, Lutz B, Mackie K, Lu H-C. 2010. Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *The European journal of neuroscience* 32:693-706.
- Wu, CS, Jew CP, Lu HC. 2011. Lasting impacts of prenatal cannabis exposure and the role of endogenous cannabinoids in the developing brain. *Future Neurol* 6(4):459-480.
- Xu, Q, Cobos I, De La Cruz E, Rubenstein JL, Anderson SA. 2004. Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 24(11):2612-2622.
- Zhou, D, Song ZH. 2001. CB1 cannabinoid receptor-mediated neurite remodeling in mouse neuroblastoma N1E-115 cells. *J Neurosci Res* 65(4):346-353.